

禽脑脊髓炎冻干活疫苗安全性、最小免疫剂量及免疫效力试验*

焦铁军¹, 李河林¹, 张浩¹, 李健强^{1,2}

(1 杨凌绿方生物工程有限公司, 陕西 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 检测了4批自制禽脑脊髓炎冻干活疫苗的安全性和最小免疫剂量, 并对疫苗进行了病毒含量测定和攻毒保护试验。结果表明, 鸡接种疫苗后精神、食欲及发育均正常, 疫苗安全性良好; 接种病毒剂量为500 ED₅₀时, 可使免疫鸡产生可靠的免疫力, 抵抗AEV VR株强毒的攻击, 降低鸡群发病率, 所以该疫苗的最小免疫剂量500 ED₅₀/羽。4批疫苗病毒含量均大于10^{3.5} ED₅₀/羽份, 攻毒后保护率均在87.5%以上。

[关键词] 禽脑脊髓炎; 安全性; 最小免疫剂量; 免疫效力

[中图分类号] S851.347.201

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0025-04

禽脑脊髓炎(Avian Encephalomyelitis, AE)是由小RNA病毒科的禽脑脊髓炎病毒(AEV)引起的主要危害幼禽中枢神经系统的一种病毒性传染病^[1]。该病在我国流行日趋严重, 主要引起产蛋鸡产蛋率一过性下降, 1月龄以内的雏鸡感染后发生头颈震颤、瘫痪和衰竭死亡, 死亡率达10%~25%。由于本病具有发病突然, 难以预测持续期, 可通过水平接触和垂直传播等特点, 所以对养禽业的危害非常严重。控制该病的有效方法是对种鸡进行疫苗接种, 通过母源抗体使雏鸡获得保护^[2-4]。目前, 临床上使用的疫苗主要有弱毒疫苗及灭活疫苗2种, 其中弱毒疫苗具有接种方便、经济、省力、免疫期较长等优点, 对控制AE的发生起重要作用。国内对禽脑脊髓炎疫苗的研究大多集中在灭活疫苗上, 关于弱毒疫苗的研究报道较少, 市场上弱毒疫苗供应全部依赖进口。焦铁军等^[5]在对引进AEV 1143疫苗毒株进行系统鉴定研究后, 试制了几批禽脑脊髓炎冻干活疫苗, 本试验进一步对该疫苗的安全性、最小免疫剂量和免疫效力进行研究, 以为该疫苗的生产与检验技术参数的制定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疫苗 自制AE 1143株冻干活疫苗, 共4批, 批号分别为200009, 200103, 200109和200203。

1.1.2 病毒 AEV VR株强毒, ED₅₀为10^{7.2}/mL, 以0.05 mL/只的剂量脑内接种6~10周龄SPF雏鸡, 能引起80%以上雏鸡发病。

1.1.3 SPF鸡胚 鸡 SPF种蛋购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司, 部分孵化至7日龄(SPF鸡胚)用于实验, 部分孵化至出壳(SPF鸡), 饲喂于负压隔离器内。

1.2 禽脑脊髓炎病毒抗体的检测

AEV抗体的检测采用ELISA法。AEV酶标试剂盒购自美国DEXX公司, 血清ELISA抗体滴度低于1:396时判为阴性。

1.3 自制AE冻干活疫苗的安全性试验

将80只6~8周龄SPF鸡随机分为4组, 分别用于200009, 200103, 200109和200203各批次疫苗的安全性试验, 每组分口服和刺种2个处理, 每处理10只鸡。各批次疫苗均按瓶签注明羽份用生理盐水适当稀释后, 分别通过口服和刺种2种途径接种SPF鸡, 刺种组接种剂量为正常使用剂量的10倍, 口服组中5只鸡接种剂量为正常使用剂量的10倍, 另5只鸡接种剂量为正常使用剂量的100倍。接种后3~4周内观察所有鸡的精神、食欲是否正常, 有无局部和全身反应, 有无发病现象。

1.4 自制AE冻干活疫苗最小免疫剂量检测

将35只8周龄SPF鸡分为5组, 每组7只, I, II, III和IV组分别口服接种用生理盐水作1:200,

* [收稿日期] 2005-11-25

[作者简介] 焦铁军(1978-), 男, 陕西蒲城人, 助理兽医师, 主要从事畜禽生物制品研究。E-mail: jtj0081@yahoo.com.cn

[通讯作者] 李健强(1939-), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医微生物学研究。

1 1 000, 1 2 000 和 1 2 500 倍稀释(病毒含量分别为 24485, 5000, 2500 和 2035 $E D_{50}/mL$) 的 200009 批疫苗, 0.2 mL/只; V 组鸡接种相同剂量生理盐水作对照。接种后 7, 14, 17 和 21 d 分别翅下静脉采血, 分离血清, 用 ELISA 试剂盒检测血清中抗体水平, 并在第 21 天采血后, 所有鸡脑内攻击 AEV VR 强毒株, $10^3 E D_{50}/羽$, 观察 21 d, 统计发病鸡数并计算保护率, 确定疫苗最小免疫剂量。

1.5 自制 AE 冻干活疫苗的免疫效力试验

1.5.1 AE 含量的测定 (1) SPF 鸡胚检验。用灭菌生理盐水将疫苗作 10 倍系列稀释, 取 10^{-4} , 10^{-5} 和 10^{-6} 3 个稀释度, 分别卵黄囊内接种 6~7 日龄 SPF 鸡胚 10 枚 (0.2 mL/枚), 另取 20 枚 SPF 鸡胚作对照, 继续孵化并观察至出雏后 3 d, 弃去 72 h 前死胚, 将特异性死胚和麻痹、运动失调的雏鸡判为感染, 计算 $E D_{50}$, 对照鸡胚出雏率应在 70% 以上, 且无禽脑脊髓炎症状。

(2) SPF 雏鸡检验。用灭菌生理盐水将疫苗做

10 倍系列稀释, 取 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 3 个稀释度, 分别脑内接种 1 日龄 SPF 雏鸡 10 只 (0.05 mL/只), 另取 5 只鸡接种相同剂量生理盐水作对照, 观察 15 d 雏鸡运动失调、头部震颤判为感染, 计算 D_{50} , 对照鸡应不发病。

1.5.2 攻毒保护试验 将批号为 200009 的疫苗按正常使用剂量分别口服接种 21, 26, 56 日龄 SPF 鸡各 10 只, 另取 5 只鸡口服生理盐水做对照, 21 d 时所有鸡脑内接种禽脑脊髓炎强毒 VR 株, 进行攻毒, 剂量为 $10^3 E D_{50}/只$, 观察 17 d, 统计保护率。200103, 200109 和 200203 批疫苗均采用 28 和 56 日龄 SPF 鸡进行试验, 免疫、攻毒方法同前。

2 结果与分析

2.1 自制 AE 冻干活疫苗的安全性

所有试验鸡均未发生脑脊髓炎, 刺种部位也未见异常病变, 精神食欲不受影响, 发育正常(表1)。说明疫苗是安全的, 可用于 6 周龄以上的鸡。

表1 自制 AE 冻干活疫苗的安全性

Table 1 Safety of AE live vaccine

疫苗批号 Lot	鸡龄/周 Week-age	接种途径 Inoculate route	鸡数 No. of chickens	观察结果 Response of chicken
200009	6	刺种 Intramuscular	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal
		口服 Orally	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal
200103	7	刺种 Intramuscular	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal
		口服 Orally	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal
200109	8	刺种 Intramuscular	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal
		口服 Orally	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal
200203	8	刺种 Intramuscular	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal
		口服 Orally	10	无局部和全身反应, 精神、食欲正常 Normal

2.2 自制 AE 冻干活疫苗的最小免疫剂量

结果见表2。从表2可看出, 200009 批疫苗的免疫剂量为 500~489.7 $E D_{50}/羽$ 时, 免疫鸡 14~21 d 时血清中 AEV 抗体滴度为 1 583~1 727.8, 接种 489.7 $E D_{50}/只$ 剂量组 21 d 时抗体水平最高, 达 1

727.8, 产生的抗体水平能够抵抗 AEV VR 强毒的攻击, 保护率均为 100%。而 407 $E D_{50}/羽$ 剂量组与对照鸡血清抗体滴度在 1 247 以下, 攻毒保护率分别为 42.85% 和 10%。所以该疫苗的最小免疫剂量 500 $E D_{50}/羽$ 。

表2 自制 AE 冻干活疫苗最小免疫剂量

Table 2 Minimum immunity dose of AE live vaccine

组别 Group	免疫剂量/ ($E D_{50} \cdot 羽^{-1}$) Immune dose	免疫后不同时间血清 ELISA 滴度 Serum ELISA titers of different time post inoculation				攻毒保护率/% Protection rate
		7 d	14 d	17 d	21 d	
I	4 897	1 88	1 2 906	1 3 200	1 7 278	100
II	1 000	1 80	1 583	1 2 204	1 2 132	100
III	500	1 9	1 828	1 1 275	1 1 241	100
IV	407	1 8	1 190	1 213	1 247	43.85
对照 Control	生理盐水 Saline	1 20	1 4	1 90	1 31	10

2.3 自制 AE 冻干活疫苗的效力

2.3.1 病毒含量 由表3可知, 各批疫苗中病毒含量均在 $10^{3.59} E D_{50}/羽$ 或 $10^{5.1} D_{50}/羽$ 以上, 根据最小

免疫剂量测定结果可知, 4 批疫苗的病毒含量为最小免疫剂量的 6 倍以上, 所以疫苗中的病毒含量应能保证其具有足够的免疫效力。

表3 自制AE冻干活疫苗病毒含量测定结果

Table 3 Virus titers of AE living vaccine

疫苗批号 Lot	A EV 含量 Virus titers per bird dose		疫苗批号 Lot	A EV 含量 Virus titers per bird dose	
	ED ₅₀ /(ED ₅₀ ·羽 ⁻¹)	D ₅₀ /(D ₅₀ ·羽 ⁻¹)		ED ₅₀ /(ED ₅₀ ·羽 ⁻¹)	D ₅₀ /(D ₅₀ ·羽 ⁻¹)
200009	10 ^{3.69}	10 ^{5.5}	200109	10 ^{3.89}	10 ^{5.1}
200103	10 ^{3.59}	10 ^{5.6}	200203	10 ^{3.79}	10 ^{5.8}

2.3.2 疫苗攻毒保护试验结果 由表4可知,用200009批疫苗口服接种21,26,56日龄SPF鸡,免疫后21d脑内攻击VR强毒的保护率分别为80%,87.

5%和100%。其余3批疫苗在28日龄时接种的保护率90%,56日龄接种时保护率均为100%。而空白对照组80%鸡出现共济失调等AE症状。

表4 自制AE疫苗免疫鸡攻毒试验结果

Table 4 The result of immune chickens challenged with AEV VR strain

疫苗批号 Lot	免疫鸡日龄/d Day-age of chickens inoculated	免疫鸡数 No. of chickens inoculated	攻毒后健康鸡数 No. of chickens survival	保护率/% Protection rate
200009	21	10	8	80
	26	8	7	87.5
	56	10	10	100
200103	28	10	9	90
	56	10	10	100
200109	28	10	9	90
	56	10	10	100
200203	28	10	10	100
	56	10	10	100
对照组 Control	28	5	0	0
	56	5	1	20

3 讨论

A EV 1143株是一株具有高度免疫原性和低嗜神经毒力的疫苗毒株,但对日龄较小的易感鸡仍然可引起发病,并可通过粪便排毒,日龄愈小,排毒时间愈长,病毒的这些特点均可能对疫苗的安全性产生影响。本试验中疫苗的安全性试验结果表明,自制禽脑脊髓炎活疫苗对6周龄以上SPF鸡通过口服和刺种2种途径接种均是安全的。

有研究表明,以IgG为主的体液免疫在抵抗A EV感染过程中起关键作用^[2-7]。检测A EV抗体常用的方法有病毒中和试验(VN)、鸡胚易感性(ES)试验、琼脂扩散试验(AGP)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等。ELISA与VN以及ES所测免疫抗体水平有良好的相关性^[8-9],且比琼脂扩散试验更适用于评价免疫抗体水平。本研究最小免疫剂量测定试验中采用的ELISA方法,能够准确地反映血清中的抗体水平,从试验结果来看,免疫接种后14d前3组抗体均为阳性,且抗体水平与接种病毒剂量正相关,攻毒保护试验的结果也验证了这一点。所以,确定该疫苗的最小免疫剂量500ED₅₀/羽。

国外有研究表明,病毒含量、攻毒保护率与抗体

水平之间具有相关关系^[10-11]。美国规定AE活疫苗产品的病毒滴度应高于免疫原性测定的病毒滴度^[12],以保证在有效期内的任何时间抽检,产品的病毒滴度均比最小免疫剂量高10^{0.7}且不低于10^{2.5}ED₅₀/羽份。本研究中,根据疫苗最小免疫剂量测定结果可知,所制4批疫苗每羽份病毒含量为最小免疫剂量的6倍以上,所以应能保证接种鸡产生足够的免疫效力。

200009批疫苗的试验结果表明,免疫鸡日龄愈大,保护率愈高,同时对对照组鸡对强毒攻击也产生一定的抵抗力。分析原因,一方面由于鸡随日龄增大免疫系统功能日趋健全,抵抗力增强所致;另一方面也可能与其产生的细胞免疫有关。成子强等^[6]的研究结果表明,AE细胞免疫与日龄增长存在相关性。Westbury等^[13-14]和Nicholas等^[15]研究发现,A EV血清中和抗体在日龄较大鸡感染后很快产生,伴随着它的产生,脑组织中的病毒滴度降低,病毒血症停止,在1,7,14日龄感染病毒比在21,28日龄感染产生的中和抗体水平稍低,产生血清中和抗体能力是与年龄相关的抵抗A EV感染的重要因素。由于A EV对3周龄以内的雏鸡尤为易感,且有报道^[12]雏鸡的母源抗体可持续8周,所以本研究选择21,26,

56日龄SPF鸡进行攻毒保护试验。结果发现,疫苗对脑内攻击VR强毒的保护率均为80%~100%,对照组发病率为80%~100%。另外,本试验还发现,只要在3~4周龄时接种,保护率达到80%以上,才可保证8周龄以上鸡产生100%的保护率。因为本研究实验动物为SPF鸡,不存在母源抗体的干扰,所以

在进行疫苗效力检测时,只需避开易感年龄即可进行免疫攻毒保护试验。有的国家在AEV活疫苗的效力检验时采取2~4周龄免疫接种,考虑到过早免疫接种排毒时间长可能对环境安全性产生威胁,本试验初定疫苗成品效力检验接种时间为3~4周龄。

[参考文献]

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 512-513
- [2] 卡尔尼克B W. 禽病学[M]. 10版. 高福,苏敬良,译. 北京: 中国农业出版社, 1999: 727-736
- [3] Calnek B W, Taylor P J, Sevoian M. Studies on avian encephalomyelitis. V. Development and application of an oral vaccine[J]. *A vian Dis*, 1961, 5: 297-312
- [4] Calnek B W. Control of avian encephalomyelitis: a historical account[J]. *A vian Dis*, 1998, 42(4): 632-647.
- [5] 焦铁军,张浩,李河林,等. 禽脑脊髓炎活疫苗的研究. ILF₁种毒的繁殖及其生物学特性的鉴定[C]//中国畜牧兽医学会. 中国畜牧兽医学会生物制品学分会第十次学术研讨会论文集. 广东广州, 2005: 158-162
- [6] 成子强,赵振华,日穆德玛. 禽脑脊髓炎油乳剂灭活疫苗免疫效果及免疫机理的研究[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(3): 335-339
- [7] 顾玉芳,赵振华,郝俊峰,等. 禽脑脊髓炎免疫细胞类别和数量变化的分析[J]. *中国兽医杂志*, 1995, 21(11): 3-6
- [8] Shafren D R, Tannock G A, Groves P J. Antibody responses to avian encephalomyelitis virus vaccines when administered by different routes[J]. *Aust Vet J*, 1992, 69(11): 272-275
- [9] Smart I J, Grix D C, Barr D A. The application of the ELISA to the diagnosis and control of avian encephalomyelitis[J]. *Aust Vet J*, 1986, 63(9): 297-299
- [10] Nicholas R A, Hopkins I G, Southern S J, et al. A comparison of titration methods for live avian encephalomyelitis virus vaccines[J]. *Dev Biol Stand*, 1986, 64: 207-212
- [11] Nicholas R A, Goddard R D, Ream A J, et al. Improved potency test for live avian encephalomyelitis vaccines[J]. *Res Vet Sci*, 1986, 41(3): 420-422
- [12] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 661
- [13] Westbury H A, Sinkovic B. The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis 3 The relationship between viraemia, invasion of the brain by the virus, and the development of specific serum neutralising antibody[J]. *Aust Vet J*, 1978, 54(2): 76-80
- [14] Westbury H A, Sinkovic B. The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis 1 The effect of the age of the chicken and the route of administration of the virus[J]. *Aust Vet J*, 1978, 54(2): 68-71
- [15] Nicholas R A, Wood G W, Hopkins I G, et al. Detection of avian encephalomyelitis virus[J]. *Res Vet Sci*, 1986, 40(1): 118-122

Safety and minimum immune dose and immune potency tests of avian encephalomyelitis live vaccines

JIAO Tie-jun¹, LI He-lin¹, ZHANG Hao¹, LI Jian-qiang^{1,2}

(1 Yangling Lufang Bioengineering Co. LTD., Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Four lots of Avian Encephalomyelitis live vaccines made by ourselves were chosen and estimated in safety, minimum immune dose and immune potency. The results demonstrated that the inoculated chickens showed no sign of other discomforts, and their spirit, appetite and development were the same as those in controls in the period of 4 weeks post inoculation. The results showed that the immune dose of 500 ED₅₀ could induce solid immunity, effectively protect chicken against the challenge of the virulent virus AEV AR, and the minimum dose of the vaccine was 500 ED₅₀. The virus content of each lot was above 10^{3.5} ED₅₀ per bird dose, 3-4-week old chickens inoculated orally with graded dose were challenged after 3 weeks post inoculation, and the protection rate was more than 87.5%.

Key words: Avian Encephalomyelitis; safety; minimum immune dose; immune potency