

禽流感灭活疫苗(H5N2亚型,D7株)与同类产品 对鸭和鸡免疫后血清学比较试验

吴涛¹,毛娅卿¹,王嘉¹,王哲¹,叶贺佳²,蒋桃珍^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所,北京 100081;2. 广州市华南农大生物药品有限公司,广州 511300)

[收稿日期]2013-07-10 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2013)10-0015-06 [中图分类号]S859.797

[摘要] 为评价禽流感灭活疫苗(H5N2亚型,D7株)与同类产品对不同日龄鸭及SPF鸡的免疫效果,将该疫苗与国内两家禽流感生产企业的2批重组禽流感灭活疫苗(H5N1亚型,Re-5株)分别免疫鸭和SPF鸡,免疫后14、21、28、42 d采血测定各免疫组的HI抗体效价。禽流感灭活疫苗(D7株)以0.25 mL剂量免疫鸭后14 d,所有免疫组鸭的HI抗体几何平均滴度(GMT)即能达到 $6\log_2$ 以上,28 d HI抗体GMT达到峰值 $9.1\log_2$,而两批重组禽流感灭活疫苗以0.5 mL剂量免疫鸭21 d后HI抗体GMT均没有达到 $6\log_2$;两种疫苗分别免疫21日龄SPF鸡21 d后各免疫组的HI抗体GMT基本相似。试验结果表明,禽流感灭活疫苗(D7株)对鸭的免疫效果要明显优于重组禽流感灭活疫苗(Re-5株),而对鸡的免疫效果相似。

[关键词] 禽流感灭活疫苗;D7株;血清学比较试验

Comparative Test of Serology in Ducks and Chickens Immunized by Avian Influenza Vaccine, Inactivated (H5N2 Subtype, Strain D7) and Other Similar Products

WU Tao¹, MAO Ya-qing¹, WANG Jia¹, WANG Zhe¹, YE He-jia², JIANG Tao-zhen^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Guangzhou South China Biological Medicine Co Ltd, Guangzhou 511300, China)

Abstract: In order to evaluate the difference of immune effect between the avian influenza virus (AIV) inactivated vaccine (H5N2 subtype, strain D7) and other similar products, the D7 vaccine and two batches avian influenza inactivated vaccine (H5N1 subtype, strain Re-5) were immunized on different day-old ducks and SPF chickens. The hemagglutinin-inhibition (HI) antibody was detected in 14, 21, 28 and 42 days after immunization. The HI antibody geometric mean titer (GMT) of the duck could reach $6\log_2$ more in 14 days after immunized with D7 vaccine, while the HI antibody GMT of the duck couldn't reach $6\log_2$ in 21 days after immunized with the two batches of Re-5 vaccine. The HI antibody GMT of the 21 days old SPF chickens in 21 days after immunized with two group vaccines were basically similar. The results showed that the immune effect on ducks of the D7 vaccine was better than that of the Re-5 vaccine, while the immune effect on SPF chickens of the two group vaccines was similar.

Key words: avian influenza inactivated vaccine; strain D7; comparative test of serology

作者简介:吴涛,兽医硕士,从事兽用生物制品的检验和研发工作。

通讯作者:蒋桃珍。E-mail:jiangtaozhen@ivdc.gov.cn

高致病性禽流感 (Highly Pathogenic Avian Influenza, HPAI), 是由正粘病毒科流感病毒属 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病^[1-2], 是世界动物卫生组织 (OIE) 规定的必须报告的动物疫病, 我国将其列为一类动物疫病。针对在我国暴发的高致病性禽流感, 农业部采取免疫与扑杀相结合的防控措施^[3], 在较短时间内就控制了禽流感疫情, 在防控过程中, 禽流感灭活疫苗发挥了不可替代的作用。现有商品化禽流感疫苗对家禽具有良好的免疫效果, 但对水禽的免疫效果并不十分理想, 临床上常发生免疫失败^[4], 而水禽在 AIV 传播扩散和生物学进化中又起了重要作用^[5-7], 因此水禽的免疫效果直接影响到高致病性禽流感防控的成败。农业部动物疫病防控重点开放实验室 (设于华南农业大学) 在 2007 年从野鸭中分离到的 H5N2 亚型自然弱毒株, 命名为 A/Duck/D7/2007/ (简称 D7 株), 用该毒株研制成功的禽流感灭活疫苗对水禽和家禽都有较为理想的免疫保护效果, 同时具有抗原谱较广的特点。为进一步评价和验证禽流感灭活疫苗 (H5N2 亚型, D7 株) 与同类产品对不同日龄鸭及 SPF 鸡的免疫效果, 进行了本试验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 疫苗 禽流感灭活疫苗 (H5N2 亚型, D7 株) (以下简称 D7 株疫苗), 批号 2010001, 由华南农业大学兽医学院禽病研究室研制、提供; 重组禽流感灭活疫苗 (H5N1 亚型, Re-5 株) (以下简称 Re-5 株疫苗), 批号为 10031284 和 100226, 分别由南京梅里亚动物保健有限公司和乾元浩生物股份有限公司郑州生物药厂生产。

1.1.2 HI 试验抗原 禽流感 H5 亚型 HI 试验抗原 (D7 株) (以下简称 D7 株抗原), 由华南农业大学兽医学院禽病研究室提供; 禽流感病毒 H5 亚型 HI 试验抗原 (Re-5 株) (以下简称 Re-5 株抗原), 批号为 201001, 由哈尔滨维科生物技术开发有限公司生产。

1.1.3 试验鸭 种蛋, 由北京平谷养殖合作社提供, 品种为北京麻鸭。种蛋由实验室孵化出雏, 1 日

龄雏鸭置隔离器饲养至 11 日龄和 21 日龄, 检测血清、禽流感 H5 亚型抗体均为阴性, 用于免疫试验。

1.1.4 SPF 鸡 21 日龄, 由北京梅里亚维通实验动物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 11 日龄雏鸭的免疫试验 将 38 只 11 日龄雏鸭分为四组, 第一组 10 只, 每只鸭经肌肉接种 0.25 mL D7 株疫苗; 第二组 10 只, 每只接种 10031284 批 Re-5 株疫苗 0.5 mL; 第三组 10 只, 每只接种 100226 批 Re-5 株疫苗 0.5 mL; 第四组作为正常对照, 8 只, 不免疫。免疫后 14、21、28 和 42 d 分别静脉采血, 分离血清, 分别用 D7 株抗原和 Re-5 株抗原测定 HI 抗体效价。

1.2.2 21 日龄鸭的免疫试验 将 28 只 21 日龄雏鸭分为三组, 第一组 10 只, 每只鸭经肌肉接种 0.25 mL D7 株疫苗; 第二组 10 只, 每只接种 10031284 批 Re-5 株疫苗 0.5 mL; 第三组 8 只, 不免疫作为正常对照。免疫后 14、21 和 28 d 分别静脉采血, 分离血清, 分别用 D7 株抗原和 Re-5 株抗原测定 HI 抗体效价。

1.2.3 SPF 鸡的免疫试验 将 50 只 21 日龄 SPF 鸡分为四组, 第一组 15 只, 每只鸡经肌肉接种 0.25 mL D7 株疫苗; 第二组 15 只, 每只接种 10031284 批 Re-5 株疫苗 0.3 mL (按产品质量标准中效力检验接种剂量^[8]); 第三组 15 只, 每只接种 100226 批 Re-5 株疫苗 0.3 mL; 第 4 组 5 只, 不免疫作为正常对照。免疫后 14、21 和 28 d 分别翅静脉采血, 分离血清, 分别用 D7 株抗原和 Re-5 株抗原测定 HI 抗体效价。

1.2.4 血清 HI 抗体效价的检测 按照《中华人民共和国兽药典》二〇一〇年版三部附录微量法进行。

2 结果

2.1 11 日龄鸭的免疫试验结果 11 日龄鸭以 0.25 mL 剂量免疫 D7 株疫苗 14 d 后, 用 D7 株抗原检测 HI 抗体几何平均滴度 (GMT) 即可达到 6.2 log₂, 28 d 时 HI 抗体 GMT 达到峰值 9.1 log₂; 而 2 批 Re-5 株疫苗以 0.5 mL 剂量免疫鸭 21 d

后,用 Re-5 株抗原检测 HI 抗体效价 GMT 均低于 $6.0 \log_2$,28 d 后 HI 抗体效价 GMT 才达到 $6.0 \log_2$ 以上。用 D7 株抗原检测 Re-5 株疫苗免疫后产生的抗体,其 HI 抗体 GMT 比用 Re-5 株抗原检测时

低 $2.2 \log_2 \sim -1.3 \log_2$;用 Re-5 株抗原检测 D7 株疫苗免疫后产生的抗体,其 HI 抗体 GMT 比用 D7 株抗原检测时低 $4.3 \log_2 \sim 4.8 \log_2$ 。详细结果见表 1。

表 1 11 日龄鸭免疫不同疫苗后的 HI 抗体效价 (\log_2)

疫苗种类及免疫剂量	试验鸭编号	14 d		21 d		28 d		42 d	
		D7	Re-5	D7	Re-5	D7	Re-5	D7	Re-5
2010001 批 D7 株疫苗, 每只接种 0.25 mL	0851	7	3	8	4	9	5	7	2
	0852	7	2	7	3	10	5	9	3
	0853	7	4	8	5	10	6	8	5
	0854	5	<1	5	<1	7	2	6	<1
	0855	7	<1	8	2	10	4	7	2
	0856	6	<1	6	<1	9	2	7	2
	0857	7	<1	7	3	9	5	8	4
	0858	6	2	8	3	10	5	8	4
	0859	5	<1	6	2	9	4	8	3
	0860	5	<1	7	3	8	5	7	3
	GMT	6.2	<1.7	7.0	<2.7	9.1	4.3	7.5	<2.9
10031284 批 Re-5 株疫苗, 每只接种 0.5 mL	0871	2	5	2	5	4	5	7	4
	0872	<1	4	4	4	6	5	5	4
	0873	<1	6	6	7	7	7	3	5
	0874	<1	4	6	5	7	6	5	4
	0875	3	4	6	6	8	7	6	6
	0876	2	5	4	6	6	8	5	6
	0877	3	5	5	6	7	7	5	5
	0878	2	5	5	6	7	7	5	5
	0879	4	4	4	5	7	6	5	4
	0880	3	2	3	3	5	4	4	2
	GMT	<2.2	4.4	4.4	5.3	6.4	6.2	5.0	4.5
100226 批 Re-5 株疫苗, 每只接种 0.5 mL	0881	4	5	6	6	9	7	7	6
	0882	4	5	6	7	9	8	9	8
	0883	3	4	5	6	7	6	6	4
	0884	3	4	5	6	8	5	6	4
	0885	3	4	5	4	7	6	5	5
	0886	2	4	5	5	7	6	6	5
	0887	2	4	5	5	7	6	6	5
	0888	4	4	6	5	8	7	6	5
	0889	3	4	6	5	6	5	5	3
	0890	3	4	6	5	8	7	8	7
	GMT	3.7	4.2	5.5	5.4	7.6	6.3	6.4	5.2
对照组	D001~D008	HI 抗体效价均小于 1							

2.2 21 日龄鸭的免疫试验结果 21 日龄鸭以 0.25 mL 剂量免疫 D7 株疫苗 14 d 后,用 D7 株抗原检测 HI 抗体几何平均滴度(GMT)即可达到 $7.0 \log_2$,21 d HI 抗体 GMT 达到峰值 $8.5 \log_2$;而 10031284 批 Re-5 株疫苗以 0.5 mL 剂量免疫鸭 14、21、28 d,用 Re-5 株抗原检测 HI 抗体效价 GMT 均低于 $6.0 \log_2$ 。用

D7 株抗原检测 Re-5 株疫苗免疫后产生的抗体,其 HI 抗体 GMT 比用 Re-5 株抗原检测时低 $0 \sim 2.0 \log_2$;用 Re-5 株抗原检测 D7 株疫苗免疫后产生的抗体,其 HI 抗体 GMT 比用 D7 株抗原检测时低 $4.4 \log_2 \sim 5.1 \log_2$ 。详细结果见表 2。

表2 21日龄鸭免疫不同疫苗后的HI抗体效价(\log_2)

疫苗种类及免疫剂量	试验鸭编号	14 d		21 d		28 d	
		D7	Re-5	D7	Re-5	D7	Re-5
2010001批D7株疫苗, 每只接种0.25 mL	3584	7	2	9	3	8	3
	3585	8	4	10	5	9	5
	3586	6	3	6	2	6	2
	3587	7	2	9	4	8	3
	3588	7	4	10	6	8	5
	3589	6	<1	7	<1	6	<1
	3590	8	3	9	4	8	<1
	3591	7	4	9	4	7	4
	3592	8	<1	9	2	7	2
	3593	6	<1	7	3	6	3
	GMT	7.0	<2.5	8.5	<3.4	7.3	<2.9
	10031284批Re-5株疫苗, 每只接种0.5 mL	0788	2	4	3	3	<1
0789		5	6	6	6	5	5
0790		4	6	6	6	5	5
0791		5	7	7	6	6	5
0792		5	6	7	6	7	5
0793		4	6	6	6	5	5
0794		4	6	5	5	4	4
0795		4	6	6	7	7	6
0796		2	5	4	4	3	3
0797		4	7	5	6	3	5
GMT		3.9	5.9	5.5	5.5	<4.6	4.5
对照组		D011~D018	HI抗体效价均小于1				

2.3 SPF鸡的免疫试验结果 21日龄SPF鸡分别免疫D7株疫苗和2批Re-5株疫苗21d后,用疫苗株抗原检测HI抗体(GMT)均高于 $7.0\log_2$,两种疫苗免疫鸡产生的HI抗体效价相近。用D7株抗原检测Re-5株疫苗免疫后产生的抗体,其HI抗体GMT比用Re-5株抗原检测时低 $1.1\log_2 \sim -0.5\log_2$;用Re-5株抗原检测D7株疫苗免疫后产生的抗体,其HI抗体GMT比用D7株抗原检测时低 $3.6\log_2 \sim 4.3\log_2$ 。详细结果见表3。

3 小结与分析

3.1 从试验结果看,D7株疫苗以0.25 mL剂量免

疫11日龄和21日龄鸭后14 d就能产生较高的HI抗体效价(HI抗体GMT大于 $6.0\log_2$),21~42 d内的HI抗体滴度均大于 $7.0\log_2$;而Re-5株疫苗以一个使用剂量(0.5 mL)免疫11日龄和21日龄鸭后,所产生的抗体水平明显低于D7株疫苗,28 d抗体才达到 $6.0\log_2$ 左右(Re-5株疫苗质量的判定标准^[8]是以免疫SPF鸡21 d后产生抗体的GMT应不低于 $6\log_2$ 来判定,并未以免疫鸭后产生抗体的高低来判定),而42 d时仅能维持在 $5.0\log_2$ 左右。表明禽流感灭活疫苗(D7株)对鸭的免疫效果要明显好于重组禽流感灭活疫苗(Re-5株)。

表3 21日龄SPF鸡免疫不同疫苗后的HI抗体效价(log₂)

疫苗种类及剂量	试验鸡编号	14 d		21 d		28 d	
		D7	Re-5	D7	Re-5	D7	Re-5
2010001 批 D7 株疫苗, 每只接种 0.25 mL	1	5	2	9	4	8	5
	2	4	<1	9	4	8	4
	3	6	<1	8	4	8	5
	4	5	3	9	5	9	5
	5	6	<1	7	<1	9	6
	6	5	2	8	3	10	4
	7	8	5	7	3	7	4
	8	6	<1	7	4	8	5
	9	3	<1	7	2	8	4
	10	7	4	10	5	8	4
	11	7	4	8	3	8	6
	12	6	2	7	3	8	4
	13	6	2	9	6	8	4
	14	8	3	9	6	7	4
	15	7	2	7	4	8	4
	GMT		5.9	<2.3	8.1	<3.8	8.1
10031284 批 Re-5 株疫苗, 每只接种 0.3 mL	1	3	3	7	7	5	6
	2	8	6	6	6	7	7
	3	5	4	7	7	7	7
	4	4	3	4	4	6	7
	5	3	4	7	7	6	6
	6	4	3	6	7	5	5
	7	4	5	6	7	6	7
	8	5	5	8	9	6	6
	9	3	3	5	8	5	6
	10	3	3	6	8	4	7
	11	2	2	7	9	7	8
	12	<1	<1	7	8	4	5
	13	4	3	7	8	6	7
	14	2	<1	5	8	6	7
	15	3	5	5	6	5	7
	GMT		<3.6	<3.4	6.2	7.3	5.7
100226 批 Re-5 株疫苗, 每只接种 0.3 mL	1	8	9	7	9	4	5
	2	6	4	9	9	9	9
	3	6	5	10	7	8	9
	4	6	5	7	8	7	8
	5	6	7	9	8	9	8
	6	4	4	7	7	7	7
	7	8	7	8	8	8	9
	8	6	6	7	7	8	8
	9	8	6	9	9	8	9
	10	7	5	10	5	7	8
	11	7	8	7	8	6	8
	12	8	9	9	9	7	8
	13	7	7	9	8	6	7
	14	7	9	9	8	7	8
	15	8	7	8	8	6	8
	GMT		6.8	6.5	8.3	7.8	7.1
对照组	D021 ~ D025	HI 抗体效价均小于 1					

3.2 从对 SPF 鸡的免疫试验结果看, D7 株疫苗免疫后所产生的 HI 抗体水平与 Re-5 株疫苗相近, 且免疫后 21 d 抗体水平可达 $8.0 \log_2$ 以上, 表明禽流感灭活疫苗(H5N2 亚型, D7 株)对鸡也有良好的免疫效力。

3.3 世界卫生组织(WHO)根据高致病性流感病毒 HA 基因特点, 将 H5N1 高致病性禽流感病毒分为不同的进化分支(Clade)。到目前为止, H5N1 病毒共分为 0~9 共 10 个不同的分支^[9]。Re-5 疫苗株就属于 2.3.4 分支, 而 D7 疫苗株属于我国近年来主要流行的 2.3.2 分支。从交叉血凝抑制试验结果看, 用 D7 株抗原检测 Re-5 株疫苗免疫后的血清时, 其血清 HI 效价的 GMT 与用 Re-5 株抗原检测的结果差异不显著; 而用 Re-5 株 HI 抗原检测 D7 株疫苗免疫后的血清时, 其血清 HI 效价的 GMT 明显低于用 D7 株 HI 抗原检测的结果。试验结果表明, D7 株具有更广的抗原谱, 也证明了同一分支内部的不同小分支之间的病毒抗原性也可存在较大的差异^[9]。因此, 在今后的禽流感 H5 亚型 HI 抗体监测中, 使用与疫苗毒株同源的 HI 试验抗原十分重要。

参考文献:

- [1] Saif Y M. Diseases of Poultry[M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 北京: 中国农业出版社, 2012: 171-176.
- [2] 世界动物卫生组织. OIE 陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂) [S].
- [3] 田国彬. 禽流感综合防控[J]. 兽医导刊, 2011, 12: 33-36.
- [4] 郭光楷, 颜思通, 刘尚文, 等. 影响水禽禽流感免疫效果的原因分析及应对措施[C]. 中国畜牧兽医学会 2009 学术年会论文集(上册), 2009: 403-409.
- [5] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [6] Chen H, Deng G, Li Z, *et al.* The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China[J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101(28): 10452-10457.
- [7] Hulse - Post D J, Sturm - Ramirez K M, Humberd J, *et al.* Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(30): 10682-10687.
- [8] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告(第 1005 号)[S].
- [9] 高玉伟. 中国 H5N1 亚型禽流感的流行现状与防控策略[J]. 兽医导刊, 2012, 2: 28-29.

(责任编辑: 侯向辉)