

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.11.02

鸡痘鹌鹑化弱毒株种子批的建立及鉴定

毛娅卿,王嘉,吴涛,王哲,孔冬妮,李岭,李慧姣*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-12-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 11-0009-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为保证制苗所用毒种质量和稳定性,在对鸡痘鹌鹑化弱毒株病毒含量、病毒纯净性、特异性、免疫原性及安全性等研究的基础上,建立了鸡痘鹌鹑化弱毒株种子批。将鸡痘鹌鹑化弱毒 F278 E1(1966 年 6 月 3 日冻干)通过鹌鹑连续传至 4 代(F282 E1)后,再经鸡胚传至 14 代(F282 E14)。传代毒种的鉴定结果表明:抽检的各代次的毒种均无细菌、支原体、外源病毒污染,且病毒含量检测稳定,均 $\geq 10^{6.2} \text{EID}_{50}/0.2 \text{mL}$ 。将抽检的各代次的毒种制成活疫苗,免疫适龄鸡只后均能产生完全保护。因此,确定鸡痘鹌鹑化弱毒株基础种子代数 F282 E2-E6 代,生产用毒种继代应不超过 3 代。种子批的建立,为鸡痘鹌鹑化弱毒株疫苗的生产奠定了基础。

[关键词] 鸡痘鹌鹑化弱毒株;种子批;建立及鉴定

The Seed Lots Establishment and Identification of Avian Pox Virus (Quail Adapted Strain)

MAO Ya-qing, WANG Jia, WU Tao, WANG Zhe, KONG Dong-ni, LI Ling, LI HUI-Jiao*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LI HUI-Jiao, E-mail: lihuijiao@ivdc.org.cn

Abstract: In order to ensure the vaccine virus seed quality and stability, avian pox virus quail adapted strain vaccine virus seed lots were established on the research basis of virus seed content, purity, specific, immunogenicity, safety and expanding propagation generations. The avian pox virus quail adapted strain attenuated F278 E1 (June 3, 1966 gelsiccation) by quail 4 passages (F282 E1), followed by chicken embryo passaged for 14 generations (F282 E14). The passaged identification results showed that the each generation of the virus had no bacteria, mycoplasma and exogenous virus pollution. The virus content was stable, no less than $10^{6.2} \text{EID}_{50}/0.2 \text{mL}$. The various generations of the virus was made live vaccine, the chickens after immunization can produce complete protection. Therefore, we ultimately determined that the master seed was F282 E2 - E6 generation, the production virus following the generation should not exceed 3 generations. The establishment of the seed lot laid the foundation for avian pox virus quail adapted strain vaccine production.

Key words: avian pox virus quail adapted strain; seed lots; establishment and identification

作者简介:毛娅卿,博士,从事兽用生物制品检测工作。

通讯作者:李慧姣。E-mail:lihuijiao@ivdc.org.cn

鸡痘 (Avian Pox) 是鸡的一种急性、接触性传染病,是危害养鸡业发展的一种重要传染病之一^[1]。成鸡发病后不造成死亡,但可使病禽生长迟缓,产蛋下降,种禽发病时孵化率降低等,若并发其他传染病、寄生虫病和卫生条件、营养状况不良时也可引起大批死亡,死亡率甚至高达 40%~50%。雏鸡发病死亡率较高,一般 5%~30% 不等。

鸡痘鹌鹑化弱毒株是中国兽医药品监察所于 20 世纪 50~60 年代开发的具有自主知识产权的产品,经过 50 多年来的大量实验室试验和田间实践证明,该毒种毒力稳定、安全、免疫原性好,是一株优良的疫苗毒株^[2]。为确保疫苗的有效性、纯净性和稳定性,建立了鸡痘鹌鹑化弱毒株毒种的种子批,为生产出合格的鸡痘鹌鹑化弱毒株疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒种 分别取 CVCC AV1003 F282 E2、E5、E9 和 E14 代冻干毒种各 2 支,由中国兽医药品监察所冻干、保存。

1.2 SPF 鸡及鸡胚 11~12 日龄鸡胚、SPF 鸡由北京梅里亚维通实验动物技术有限公司提供。

1.3 诊断用抗原及抗体

1.3.1 琼脂扩散 (AGP) 抗原和阳性血清 包括马立克氏病病毒 (MDV)、鸡痘病毒 (APV)、鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV)、禽呼肠孤病毒 (REOV) 等 AGP 抗原和阳性血清,均由中国兽医药品监察所制备。

1.3.2 血凝抑制 (HI) 抗原及标准阳性血清 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒 (AIV) HI 抗原及标准阳性血清,购自哈尔滨维科生物技术开发公司。新城疫病毒 (NDV) 和减蛋综合征病毒 (EDSV) HI 抗原及标准阳性血清由中国兽医药品监察所制备。

1.3.3 ELISA 检测试剂盒 包括禽白血病病毒 (ALV)、禽脑脊髓炎病毒 (AEV)、网状内皮组织增生症病毒 (REV)、鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV)、鸡传染性支气管炎病毒 (IBV)、禽呼肠孤病毒 (REOV) 和鸡传染性贫血病毒 (CAV) 等 ELISA 检测试剂盒,均购自 IDEXX 公司。

1.3.4 阴性血清 SPF 鸡血清,由中国兽医药品监

察所制备。

1.4 检验用培养基 硫乙醇酸盐 (T.G)、酪胨琼脂 (G.A)、葡萄糖蛋白胨汤 (G.P)、改良 Frey 氏液体培养基、改良 Frey 氏固体培养基,均由中国兽医药品监察所制备。

1.5 毒种繁殖、冻干 将毒种用灭菌生理盐水稀释至 10^{-2} ~ 10^{-3} ,经鸡胚绒毛尿囊膜上接种 11~12 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.2 mL,37 °C 继续孵育至 120 h。选接种后 96~120 h 死胚和 120 h 活胚,无菌采集有水肿或痘斑的绒毛尿囊膜,混合研磨后过滤,加入蔗糖脱脂奶保护剂后,进行冷冻真空干燥。

1.6 病毒含量及对鸡胚的最小感染量测定 将 E2、E5、E9 和 E14 代毒种分别用生理盐水进行 10 倍系列稀释,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 三个稀释度,经绒毛尿囊膜接种 12 日龄 SPF 鸡胚,每个稀释度接种鸡胚 5 个,每胚 0.2 mL,置 37 °C 继续孵育至 120 h,鸡胚绒毛尿囊膜水肿增厚或出现痘斑判为感染,计算 EID_{50} 和对鸡胚的最小感染量^[3-4]。

1.7 纯净性 对 E2、E5、E9 和 E14 代种毒进行了纯净性检验,按照现行的《中华人民共和国兽药典》有关规定^[5],对种毒进行细菌、霉菌、支原体和外源病毒污染检验,其中外源病毒污染检验采用鸡胚法。

1.8 免疫原性试验 将 E2、E5、E9 和 E14 代毒种分别用灭菌生理盐水稀释至 $10^{3.0} EID_{50}/0.1\text{mL}$ (含 1 羽份)。将 50 只 14 日龄的 SPF 鸡分为 5 组,每组 10 只。第 1、2、3、4 组,翅内侧皮下分别注射 E2、E5、E9 和 E14 代病毒液 0.1 mL/只 (含 1 羽份);第 5 组,不注射疫苗,作为对照组。免疫接种 3 周后,将所有鸡用 APV 102 株强毒攻击 (含 100 个最小发痘量),记录鸡群每日的发病与死亡情况。

1.9 最小发痘量 将 E2、E5、E9 和 E14 代毒种分别用生理盐水按装量复原后,稀释至 10^{-4} ,每代次用 3 月龄 SPF 鸡 3 只,将鸡大腿部毛拔掉约 3 cm^2 ,取 0.2 mL 毒液涂抹毛囊,观察 3 周,记录发痘情况。

1.10 对鸡的安全性 将 E2、E5、E9 和 E14 代毒种用灭菌生理盐水稀释至 $10^{4.0} EID_{50}/0.1\text{mL}$ (10 羽份),经肌肉接种 10 只 7 日龄 SPF 鸡,每只 10 羽

份,同时加 5 只对照鸡。观察 14 d 的临床症状,并记录结果。

1.11 最小免疫剂量测定 将 50 只 21 日龄的 SPF 鸡分为 5 组,第 1 组-第 4 组为接种组,第 5 组为对照组。接种组每只翅内侧皮下注射 0.1 mL 稀释的 E5 代病毒液。其中第 1 组,接种剂量为每只鸡 40 EID₅₀;第 2 组,接种剂量为每只鸡 20 EID₅₀;第 3 组,接种剂量为每只鸡 10 EID₅₀;第 4 组,接种剂量为每只鸡 5 EID₅₀;第 5 组,不注射疫苗,作为对照组。免疫接种 3 周后,将所有鸡用 APV 102 株攻击(含 100 个最小发痘量),记录鸡群每日的发病与死亡情况。

1.12 毒种保存期试验 抽检 1990 年 7 月(E2

代)、1993 年 1 月(E5 代)、1996 年 4 月(E9 代)三个代次的毒种,测定病毒含量测定和对鸡胚的最小感染量。

1.13 剩余水分测定 按照现行的《中国兽药典》附录进行。

1.14 真空度测定 按照现行的《中国兽药典》附录进行。

2 结果

2.1 病毒含量及对鸡胚的最小感染量 E2、E5、E9 和 E14 代冻干毒种的病毒含量及对鸡胚最小感染量测定结果见表 1,病毒含量在 10^{6.4} ~ 10^{6.5} EID₅₀/0.2mL,对鸡胚的最小感染量在 10⁻⁵/0.2mL ~ 10⁻⁶/0.2mL。试验结果见表 1。

表 1 毒种病毒含量及对鸡胚的最小感染量

Tab 1 The virus content and the minimum infective dose of chick embryo

| 编号 | 稀释度 | 鸡胚感染率 | 病毒含量/(EID ₅₀ · 0.2mL ⁻¹) | 最小感染量 |
|-----|------------------|-------|--|-------------------------|
| E2 | 10 ⁻⁵ | 5/5 | 10 ^{6.4} | 10 ⁻⁵ /0.2mL |
| | 10 ⁻⁶ | 4/5 | | |
| | 10 ⁻⁷ | 0/5 | | |
| E5 | 10 ⁻⁵ | 5/5 | 10 ^{6.4} | 10 ⁻⁵ /0.2mL |
| | 10 ⁻⁶ | 4/5 | | |
| | 10 ⁻⁷ | 0/5 | | |
| E9 | 10 ⁻⁵ | 5/5 | 10 ^{6.5} | 10 ⁻⁶ /0.2mL |
| | 10 ⁻⁶ | 5/5 | | |
| | 10 ⁻⁷ | 0/5 | | |
| E14 | 10 ⁻⁵ | 5/5 | 10 ^{6.8} | 10 ⁻⁶ /0.2mL |
| | 10 ⁻⁶ | 5/5 | | |
| | 10 ⁻⁷ | 2/5 | | |

2.2 纯净性 鸡痘鹌鹑化弱毒株毒种 E2、E5、E9 和 E14 代纯净,未受细菌、霉菌、支原体及外源病毒污染。试验结果见表 2。

2.3 免疫原性 第 1、2、3、4 组鸡接种后 14 d,对鸡痘强毒攻击均能产生完全保护作用,而第 5 组未免疫对照鸡攻毒后,10/10 发病。鸡痘鹌鹑化弱毒株毒种 E2、E5、E9 和 E14 代免疫原性没有明显差异,均具有良好的免疫原性,免疫后攻毒均获得保护。

2.4 最小发痘量 鸡痘鹌鹑化弱毒株 E2、E5、E9 和 E14 代涂沫毛囊后,试验鸡均出现局部毛囊红肿、结痂,涂沫皮肤有轻微水肿,10 d 左右结痂开始脱落,2~3 周时康复,不引起全身痘及其他反应。最小发痘量均为 ≤ 10⁻⁴/0.2mL。

2.5 对鸡的安全性 所有接种鸡均健活,除接种局部出现红肿、结痂,均无其他全身不良反应,精神食欲不受影响。由此证明鸡痘鹌鹑化弱毒株对 1

周龄以上雏鸡是安全的,可用于 1 周龄以上雏鸡的免疫。试验结果见表 3。

2.6 最小免疫剂量测定 以含 40 EID₅₀、20 EID₅₀、10 EID₅₀ 的 E5 代种毒接种的 21 日龄 SPF 鸡,攻毒

保护率均为 10/10,而以含 5 EID₅₀ 的 E5 代种毒接种的 21 日龄 SPF 鸡,攻毒保护率为 6/10,即最小免疫量为 10 EID₅₀。试验结果见表 3。

表 2 毒种外源病毒血清学检测结果

Tab 2 Serological test of exogenous virus

| 序号 | 检测抗原 | 抗体检查方法 | 检测结果 | | | |
|----|----------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| | | | E2 | E5 | E9 | E14 |
| 1 | AEV | ELISA | - | - | - | - |
| 2 | IBV | ELISA | - | - | - | - |
| 3 | ALV | ELISA | - | - | - | - |
| 4 | IBDV | AGP/ELISA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 5 | REV | IFA/ELISA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 6 | AIV (H5、H7、H9 亚型) | HI | -/-/- | -/-/- | -/-/- | -/-/- |
| 7 | NDV | HI | - | - | - | - |
| 8 | EDSV | HI | - | - | - | - |
| 9 | REOV | AGP/ELISA | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 10 | CAV | ELISA | - | - | - | - |
| 11 | MDV | AGP | - | - | - | - |
| 12 | ILTV | 中和抗体 | - | - | - | - |
| 13 | APV | AGP/临床 | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ |

“-”表示阴性,“+”表示阳性

"-" means negative, "+" means positive

表 3 不同接种剂量免疫攻毒保护结果

Tab 3 Results of attack protection against different doses of vaccination

| 分组 | 代次 | 试验鸡 | | | 接种剂量 /EID ₅₀ | 攻毒方法 及剂量 | 攻毒保护 |
|-------|-----|-----|------|------|----------------------------|------------------------------------|----------|
| | | 品种 | 日龄 | 数量/只 | | | |
| 免疫组 | E5 | SPF | 21 日 | 10 | 40 | 腿部毛囊涂抹 鸡痘 102 株强毒 100 个最小发痘量 | 10/10 保护 |
| | | SPF | 21 日 | 10 | 20 | | 10/10 保护 |
| | | SPF | 21 日 | 10 | 10 | | 10/10 保护 |
| | | SPF | 21 日 | 10 | 5 | | 6/10 保护 |
| 攻毒对照组 | 不免疫 | SPF | 21 日 | 10 | - | 0/10 保护 | |

2.7 保存期试验 鸡痘鹤鹑化弱毒株分别在 -70 ℃ 以下保存 22 年、20 年和 17 年进行病毒含量测定,结果病毒含量几乎没有变化,对鸡胚最小感

染量 $\leq 10^{-5}/0.2\text{mL}$, 均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇年版)规定。试验结果见表 4。

表 4 保存前后病毒含量测定结果和对鸡胚最小感染量

Tab 4 The virus content before and after preservation and the minimum infective dose of chick embryo

| 毒种 冻干时间 | 保存年限 | 效价/(EID ₅₀ · 0.2mL ⁻¹) | | 对鸡胚最小感染量 |
|------------|-------|---|-------------------|-------------------------|
| | | 保存前 | 保存后 | |
| 1990.7 | 22 年 | 10 ^{5.5} | 10 ^{6.2} | 10 ⁻⁵ /0.2mL |
| | 10 个月 | (非免疫鸡胚) | 10 ^{6.4} | |
| 1993.1 | 20 年 | 10 ^{6.5} | 10 ^{6.4} | 10 ⁻⁶ /0.2mL |
| | 4 个月 | | 10 ^{6.4} | |
| 1996.4 | 17 年 | 10 ^{6.6} | 10 ^{6.5} | 10 ⁻⁶ /0.2mL |
| | 1 个月 | | 10 ^{6.5} | |

2.8 剩余水分测定和真空度测定 四个代次的鸡痘鹌鹑化弱毒冻干毒种剩余水分测定均小于 3%，

真空度测定均发出紫色辉光，检验结果符合规定。试验结果见表 5。

表 5 毒种剩余水分与真空度测定结果

Tab 5 Determination of residual water and vacuum of virus

| 种毒代次 | 剩余水分 | 真空度测定 | 小结 |
|------|---------------------|-------|------|
| E2 | 2.8%、2.5%、2.2%、1.8% | 紫色辉光 | 符合规定 |
| E5 | 2.1%、2.7%、2.2%、2.5% | 紫色辉光 | 符合规定 |
| E9 | 3.0%、2.9%、2.5%、2.8% | 紫色辉光 | 符合规定 |
| E14 | 2.6%、2.8%、2.6%、2.1% | 紫色辉光 | 符合规定 |

3 小 结

本研究通过选用中国兽医药品监察所鸡痘鹌鹑化弱毒株 CVCC AV1003 F282 冻干毒种制备活疫苗，通过本动物免疫攻毒试验表明，毒种 E2、E5、E9 和 E14 代免疫原性没有明显差异，均具有良好的免疫原性，免疫后攻毒均能够产生完全的攻毒保护，以此为依据，建立了毒种的种子批，可以确定鸡痘鹌鹑化弱毒株基础种子代数为 F282 E2~E6 代，生产用毒种继代应不超过 3 代^[6-11]。

为保证各代次毒种质量，本研究对 E2、E5、E9 和 E14 代次毒种分别进行安全性试验。所有接种鸡均健活，除接种局部出现红肿、结痂，均无其他全身不良反应，精神食欲不受影响。由此证明鸡痘鹌鹑化弱毒株对 1 周龄以上雏鸡是安全的，可用于 1 周龄以上雏鸡的免疫。

通过对鸡痘鹌鹑化弱毒株各代次冻干种毒抽

检病毒含量测定、纯净性、特异性、免疫原性和安全性等，证明各代次病毒传代稳定；纯净性检验均无细菌、霉菌、支原体和外源病毒污染；鸡痘鹌鹑化弱毒株冻干毒种在 -70℃ 及以下保存，至少可达 17 年。本试验种子批的建立可为鸡痘鹌鹑化弱毒株疫苗的研制，以及将来的规模化生产提供稳定、可靠的生产用种毒。

参考文献：

[1] Y M Saif, A M Fadly. 禽病学[M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 主译. 第 12 版. 北京: 中国农业出版社, 2012.
Y M Saif, A M Fadly. Diseases of poultry[M]. Su J L, Gao F, Suo X, main translation. Twelfth Edition. Beijing: China Agricultural Press, 2012.

[2] 中国兽医药品监察所, 中国兽医微生物菌种保藏管理中心. 中国兽医菌种目录[M]. 2008 年版. 北京: 中国科学技术出版社, 2008.

- China Institute of Veterinary Drug Control, China Veterinary Culture Collection Center. Chinese veterinary species list [M]. 2008 Edition, Beijing: China Science and Technology Press, 2008.
- [3] 农业部兽药审评中心. 兽用生物制品试验研究技术指导原则 [M]. 北京. 2006 年版.
Center for Veterinary Drug Evaluation, MOA. Technical guidelines for veterinary biological products test and research [M]. Beijing, 2006 Edition.
- [4] 马兴树. 禽传染病实验诊断技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006:170-176.
Ma X S. Avian infectious diseases laboratory diagnosis technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006:170-176.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 [M]. 2010 年版. 三部. 北京: 中国农业出版社, 2010.
Chinese Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia [M]. 2010 edition. Third Volume. Beijing: China Agriculture Press, 2010.
- [6] 范书才, 李虹, 朱良全, 等. 鸭瘟灭活疫苗种毒筛选及生产用种毒种子批的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(6): 458-461.
Fan S C, Li H, Zhu L Q, *et al.* Establishment of master stocks for preparation of inactivated vaccine against duck plague [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2009, 31(6): 458-461.
- [7] 王新卫, 贾文科, 王泽霖, 等. 传染性支气管炎病毒 M41 株种子批的建立 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3663-3664, 3729.
Wang X W, Jia WK, Wang Z L, *et al.* Establishment of seed batches of strain M41 of infectious bronchitis virus [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(9): 3663-3664, 3729.
- [8] 黄宇翔, 刘力威, 王志强, 等. 鹅细小病毒灭活疫苗种子批建立 [J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(4): 11-15.
Huang Y X, Liu LW, Wang Z Q, *et al.* The seed lots built of goose parvovirus inactivated vaccine candidate [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(4): 11-15.
- [9] 王永录, 张永光, 方玉珍, 等. 口蹄疫 A 型灭活疫苗毒种和种子批的研究 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(5): 371-375.
Wang Y L, Zhang Y G, Fang Y Z, *et al.* Studies on the virus seeds and seed batches of inactivated vaccine against foot-and-mouth disease virus type A [J]. Veterinary Science in China, 2006, 36(5): 371-375.
- [10] 公殿力, 李开军, 王舰兵, 等. 长 47 株麻疹减毒活疫苗纯化毒种三级种子批的建立及疫苗的临床观察 [J]. 吉林医学, 2005, 26(4): 407.
Gong D L, Li K J, Wang X B, *et al.* Establishment of three-tier virus seed library of 47 species of purified measles vaccine live and clinical observation of vaccine [J]. Jilin Medical University, 2005, 26(4): 407.
- [11] 李萍萍, 杨晓明, 张爱华, 等. SARS 病毒 NS-1 株三级毒种库的建立 [J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(3): 227-228.
Li P P, Yang X M, Zhang A H, *et al.* Construction of three-tier virus seed library of SARS virus NS-1 strain [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2005, 18(3): 227-228.

(编辑: 李文平)