

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.02

悬浮 MDCK 细胞源与鸡胚源 H9 亚型 禽流感疫苗免疫效力比较研究

习 硕, 赵 蕾, 史爱华, 章振华, 李 林, 沈 佳, 崔丽娜, 姜北宇, 张建伟*

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097)

[收稿日期] 2019-08-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 11-0009-07 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为探讨 MDCK 纯悬浮细胞制备的 H9 亚型禽流感灭活疫苗的免疫效果, 使用 10 日龄 SPF 鸡胚和 MDCK 纯悬浮细胞分别接种 H9 亚型禽流感 BX13 株病毒, 收获抗原液, 制备 2 种单价油佐剂灭活疫苗, 按照不同免疫剂量对 21 日龄 SPF 鸡进行免疫接种, 测定免疫后不同时间的血清 HI 抗体, 免疫后 21 d 翅静脉攻毒, 测定疫苗的保护率。结果表明: 2 种疫苗分别以 0.3、0.2、0.1、0.02 mL/只的剂量接种 21 日龄 SPF 鸡后, 7 d HI 抗体均为 0log₂, 免后 14 d、21 d 时 2 种疫苗相同免疫剂量组间 HI 抗体无明显规律性差异。免疫后 21 d, 2 种疫苗 0.1 mL/只 ~ 0.3 mL/只的免疫剂量, 各组间 HI 抗体水平无明显差异, 可以达到 1:128 以上。攻毒试验表明, 鸡胚源疫苗 0.1 mL/只、MDCK 细胞源疫苗 0.2 mL/只的免疫剂量可以达到 10/10 保护。本研究为使用 MDCK 纯悬浮细胞制备的 H9 亚型禽流感疫苗的深化研究和应用奠定了基础。

[关键词] MDCK 悬浮细胞; 禽流感病毒; 免疫剂量

Comparative Study on Immune Efficacy of MDCK Suspension Cell - derived and Chicken Embryo - derived H9 Subtype Avian Influenza Vaccine

XI Shuo, ZHAO Lei, SHI Ai - hua, ZHANG Zhen - hua, LI Lin,

SHEN Jia, CUI Li - na, JIANG Bei - yu, ZHANG Jian - wei*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Corresponding author: ZHANG Jian - wei, E - mail: jweizhang@sina.com

Abstract: In order to evaluate the immune effectiveness of H9 subtype avian influenza inactivated vaccine prepared from pure suspension MDCK cells, the 10 days - old SPF chicken embryos and MDCK pure suspension cells were inoculated with H9 subtype AIV BX13 strain respectively. Two kinds antigen were harvested and with which two monovalent oil - based inactivated vaccine was prepared. 21 days - old SPF chickens were immunized

基金项目: 北京市农林科学院畜牧兽医研究所公益院所基金(XMS201908)

作者简介: 习 硕, 硕士研究生, 从事兽用生物制品研究。

通讯作者: 张建伟。E - mail: jweizhang@sina.com

with the two vaccine and with different immunizing doses. HI titers were tested at 7 days period after immunization, and protection rate were tested by challenge the chickens with the same AIV strain to the vaccine antigen by intravenous route at 21 days after immunization. The results showed there is no HI titers were detected 7 days after immunization of the two vaccines with the 4 inoculation doses. There was no significant HI titer difference between the two vaccines when immunized with the same doses 14 days and 21 days after inoculation. When immunized the two vaccine with 0.1 mL/chicken ~ 0.3 mL/chicken both vaccine can stimulate the chickens produce more than 1:128 HI titer. The challenge results indicated that 10/10 protection were obtained for the chicken embryo - derived vaccine when immunized with more than 0.1 mL/chicken and more than 0.2 mL/chicken for the cell - derived vaccine. This study laid a foundation for further research and application of H9 subtype avian influenza vaccine prepared by MDCK pure suspension cells.

Key words: MDCK suspension cell; avian influenza virus; immune dose

禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 是严重危害家禽和野禽的一种烈性传染性病原, 根据其临床致病性差异, 将其分为高致病性禽流感病毒 (highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV) 和低致病性禽流感病毒 (low pathogenic avian influenza virus, LPAIV) [1]。其中, H9N2 亚型低致病性禽流感病毒 (LPAIV) 感染禽类虽然引起的死亡率较低、临床症状较轻, 但仍然是威胁我国养禽业的重要病原之一 [2]。H9 AIV 不仅广泛存在于活禽市场, 还可以感染人 [3-4]。有报道表明, 目前流行的 H9 AIV 可以作为基因供体, 为多种流感病毒提供内部基因与其他亚型病毒重排, 给新型流感病毒在人群中的大规模流行埋下了隐患 [5]。通过疫苗免疫接种预防禽流感仍然是现今采用的主要手段。值得注意的是, 近年来 H9 AIV 的变异现象时有发生, 其中 2011 - 2014 年 H9 VIA 的变异速度是 1999 - 2005 年的 10.64 倍 [6]。然而, AIV 抗原大多利用非免疫鸡胚制备, 病毒在鸡胚中的传代是造成 AIV 基因变异的主要原因之一 [7-8]; 其次, 禽流感流行需要大量疫苗时, 有可能存在鸡胚供应不足的问题; 同时, 制苗用鸡胚的来源不明, 也有造成外源病毒污染的可能 [9]。与传统鸡胚制苗方法比较, 动物悬浮细胞制备疫苗具有细胞来源和背景清晰, 不含有外源病毒的优点, 病毒抗原稳定, 批间差异小, 易于扩大和大规模生产等优点。许多学者比较了 MDCK 贴壁细胞制备的人流感疫苗与鸡胚源疫苗的效果,

认为两种疫苗有着相当的免疫效果 [10-12]。为了探讨和验证由北京市农林科学院畜牧兽医研究所纯悬浮驯化的 MDCK 细胞制备 H9 亚型 AIV 抗原疫苗免疫效力, 进行了 MDCK 细胞源疫苗和鸡胚源 H9 亚型 AIV 疫苗的比较试验, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 MDCK 悬浮细胞株 (MDCK - sus) 由北京市农林科学院畜牧兽医研究所免疫与预防研究室购自中国兽药药品监察所的 MDCK 贴壁细胞自行驯化获得, 悬浮细胞批号为 20190520, 代次为 MDCK - sus F10。

1.1.2 病毒株 制苗毒株: H9 亚型 AIV BX13 株由北京市农林科学院畜牧兽医研究所免疫预防研究室 2013 年从北京某鸡场分离、纯化及鉴定, 毒株代号为 A/Chicken/Beijing/BX/13 (H9N2) 株 (BX13)。制苗毒株为 H9 亚型 AIV BX13 株 1 - E3, 批号: 20170523, 毒价为 $10^{7.7}$ EID₅₀/0.1 mL。攻毒毒株为 H9 亚型 AIV BX13 株 1 - E1, 批号: 20170411, 毒价为 $10^{8.7}$ EID₅₀/0.1 mL。

1.1.3 鸡胚 SPF 鸡胚购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司, 在本研究室孵化至 10 日龄, 用于毒种繁殖, 毒价测定及攻毒后的分毒试验。

1.1.4 试验动物 21 日龄 SPF 鸡购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司, 北京市农林科学

院畜牧兽医研究所 SPF 鸡舍饲养。

1.1.5 HI 抗原 HI 工作抗原由本研究室制备, H9 亚型 AIV BX13 株 1 - E3, 批号: 20170425, HA 效价为 2^9 , 使用时按照 1: 128 配制 4HA 工作抗原。

1.1.6 鸡红细胞悬液 1% 鸡红血球由本研究室采集成年公鸡血液制备, 用于收获的病毒液 HA 和试验鸡的血清 HI 抗体测定。

1.1.7 主要试剂与耗材 无血清培养基 MS01 购自苏州市沃美生物技术有限公司; 250 mL 三角瓶购自 Corning 公司。

1.1.8 仪器设备 细胞摇床购自上海一恒科技有限公司; 倒置显微镜购自上海光学仪器厂; 血球计数板购自上海市求精生化试剂仪器有限公司; 2L 生物反应器 BioFlo[®]/CelliGen[®] 115 购自美国 NBS 公司。

1.2 方法

1.2.1 疫苗制备 分别制备鸡胚源和 MDCK 纯悬浮细胞源疫苗。鸡胚源疫苗抗原制备方法为取 10 万倍稀释的 AIV BX13 制苗毒株, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.1 mL, 密封针孔, 置 37 °C 孵育, 每 24 h 照蛋, 弃去 24 h 内死亡鸡胚, 收获 24 h ~ 120 h 内死胚和 120 h 时活胚的鸡胚尿囊液, 测定其 HA 和 EID₅₀, 用作制备鸡胚源疫苗抗原。

MDCK 细胞源疫苗抗原制备方法为将 2L 生物反应器进行清洗、安装、高压灭菌后冷却备用, 取生长到一定密度的细胞, 使用无血清 MS01 培养基制备成密度为 $2.0 \times 10^6/\text{mL}$ ~ $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液 1L, 以感染复数 (MOI) 0.01 接种 H9 亚型禽流感病毒 BX13 株, 同时按照 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的终浓度加入 TPCK - Trypsin, 将以上细胞 - 病毒混合液加入到生物反应器中, 设置生物反应器参数, 溶氧 DO 为 40%, pH 7.2, 温度 33 °C, 搅拌速度 60 r/min, 收获培养 72 h 的抗原液, 测定其 HA 和 EID₅₀, 用作制备细胞源疫苗抗原。

疫苗制备方法为首先分别将 2 种抗原液加入终浓度为 2 mL/L 的甲醛溶液, 置 37 °C 恒温摇床内灭活 24 h。经灭活检验合格后取上述 2 种灭活抗

原液, 分别制备鸡胚源抗原水相和细胞源抗原水相, 同时制备油相, 以油相: 水相比为 2: 1 的比例乳化制成油包水型灭活疫苗, 配苗时收获抗原液的病毒滴度均为 $10^{7.7}\text{EID}_{50}/0.1\text{mL}$ 。

1.2.2 疫苗物理性状检验 外观: 应为白色均匀乳剂。剂型: 取一清洁吸管, 吸取少量疫苗滴于冷水中, 除第 1 滴外, 均应不扩散。稳定性: 吸取疫苗 10 mL 加入离心管中, 以 3500 r/min 离心 15 min, 管底析出水相应不超过 0.5 mL。粘度: 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应符合规定。无菌检验: 按现行《中国兽药典》进行, 应无菌生长。

1.2.3 免疫试验分组与免疫接种 90 只 21 日龄 SPF 鸡随机分为 9 组, A1 ~ A4 组每组 10 只鸡, 分别胸肌注射鸡胚源灭活疫苗, 注射剂量为 0.3、0.2、0.1、0.02 mL/只 ($10^{7.7}\text{EID}_{50}/\text{只}$ 、 $10^{7.5}\text{EID}_{50}/\text{只}$ 、 $10^{7.2}\text{EID}_{50}/\text{只}$ 、 $10^{6.5}\text{EID}_{50}/\text{只}$); B1 ~ B4 组每组 10 只, 分别胸肌注射 MDCK 悬浮源灭活疫苗, 注射剂量为 0.3、0.2、0.1、0.02 mL/只 ($10^{7.7}\text{EID}_{50}/\text{只}$ 、 $10^{7.5}\text{EID}_{50}/\text{只}$ 、 $10^{7.2}\text{EID}_{50}/\text{只}$ 、 $10^{6.5}\text{EID}_{50}/\text{只}$); C 组 5 只鸡, 不免疫接种, 用于攻毒对照; D 组 5 只鸡为健康对照。

1.2.4 试验鸡 HI 抗体检测 各组鸡均在免疫接种后 7 d、14 d、21 d 翅静脉采血、分离血清, 待检测 AIV HI 抗体。

1.2.5 攻毒试验 免疫后 21 d 采血后, A1 ~ A4, B1 ~ B4, C 组鸡分别翅静脉注射 100 倍稀释的 AIV BX13 攻毒毒株, 每只 0.5 mL (病毒含量 $10^{7.4}\text{EID}_{50}$), D 组 5 只鸡不做任何处理, 为健康对照。

1.2.6 分毒试验 试验鸡攻毒后第 3 天, 分别采集每只鸡的咽拭子和泄殖腔拭子, 置于装有 0.8 mL 生理盐水 (含青、链霉素双抗 1 万单位, pH 7.2) 的 eppendorf 管中, 涡旋振荡混匀后, 3000 r/min 离心 5 min, 取同一只鸡的咽拭子和泄殖腔拭子上清液混合作为 1 个样品, 尿囊腔接种 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚, 0.2 mL/胚。接种后定期照蛋, 弃去 24 h 内死亡鸡胚, 收获 72 ~ 120 h 死亡鸡胚尿囊液, 分别测定 HA 价, 至 120 h, 按照分组分别收获活胚尿囊液, 测定 HA 价。若同一只鸡的样品接种的 5 枚鸡胚

中有 1 枚鸡胚的 HA 价 $\geq 4 \log_2$, 该样品判定为分毒阳性。若接种样品的 5 枚鸡胚均为阴性, 取 5 枚鸡胚尿囊液的混合液再接种 5 枚 10 龄 SPF 鸡胚进行盲传, 最终确定样品的分毒结果。

2 结果与分析

2.1 疫苗制备 参照《中国兽药典》有关鸡禽流感疫苗的检验方法, 对 2 种疫苗的试验室制品进行了物理性状和无菌检验, 结果见表 1。

表 1 AIV BX13 株鸡胚源疫苗与 MDCK 细胞源疫苗物理性状和无菌检验

Tab 1 Physical characters and sterility test of AIV BX13 strain of the two vaccines

疫苗	外观	剂型	稳定性	粘度	无菌检验
鸡胚源疫苗	白色均匀乳剂	W/O 型	3 500 r/min 离心 15 min 不分层	58.25cP	无菌生长
MDCK 细胞源疫苗	白色均匀乳剂	W/O 型	3 500 r/min 离心 15 min 不分层	56.33cP	无菌生长

2.2 血清 HI 抗体消长规律 不同源和剂量疫苗免疫后 7 d、14 d、21 d 各组鸡的血清 HI 抗体, 结果见表 2。免疫前随机抽取 90 只 21 日龄试验鸡中 10 只, 测定其 AIV HI 抗体水平均为阴性。以不同免疫剂量的鸡胚源疫苗和 MDCK 细胞源疫苗免疫 21 日龄 SPF 鸡后 7 d, AIV HI 抗体水平为 $0 \log_2$; 免后 14 d 和 21 d, 两种疫苗免疫鸡的 HI 抗体滴度随着

免疫时间的增加而提高, 同时也随着免疫剂量的增加而提高, 两种疫苗免疫接种后 21 d 的 HI 抗体也较免疫后 7 d、14 d 显著提高。MDCK 细胞源疫苗免疫组与鸡胚源疫苗组均在免疫后 21 d 产生了更高级别的 HI 抗体。攻毒前攻毒对照组和健康对照组试验鸡 HI 抗体均为阴性。

表 2 禽流感 BX13 株不同源疫苗和剂量免疫后抗体消长规律

Tab 2 Growth and decline of AIV BX13 HI titer after different source vaccines and doses of immunization

疫苗	0.02 mL/只免疫后 HI 抗体水平			0.1 mL/只免疫后 HI 抗体水平			0.2 mL/只免疫后 HI 抗体水平			0.3 mL/只免疫后 HI 抗体水平		
	7d	14d	21d	7d	14d	21d	7d	14d	21d	7d	14d	21d
鸡胚源疫苗	0	1.6	5.1	0	2.3	7.3	0	2.4	7.0	0	3.6	8.8
MDCK 细胞源疫苗	0	1.6	4.3	0	3.7	7.5	0	3.4	7.2	0	4.6	8.3

HI 抗体单位 \log_2

2.3 攻毒试验结果 攻毒保护试验结果见表 3。攻毒试验结果显示, 鸡胚源疫苗和细胞源疫苗免疫接种后 21 d, 用与制苗株同源的 H9 亚型 AIV BX13 株翅静脉攻毒, 鸡胚源疫苗免疫鸡的接种剂量为 0.1 mL/只鸡 ($10^{7.2} \text{EID}_{50}/\text{只}$) 以上时, 试验鸡

的攻毒保护率达到 100%; MDCK 细胞源疫苗免疫鸡的免疫剂量为 0.2 mL/只鸡 ($10^{7.5} \text{EID}_{50}/\text{只}$) 以上时, 试验鸡的攻毒保护率达到 100%。攻毒对照鸡均 100% 分毒阳性, 健康对照鸡分毒阴性。

表 3 2 种灭活疫苗不同免疫接种剂量的攻毒试验结果

Tab 3 The challenge results of the 2 vaccines with different immune doses

疫苗	免疫剂量				攻毒对照	健康对照
	0.02 mL/只	0.1 mL/只	0.2 mL/只	0.3 mL/只		
鸡胚源疫苗	4/10	0/10	0/10	0/10	5/5	0/5
MDCK 细胞源疫苗	9/10	2/10	0/10	0/10		

攻毒试验结果: 阳性数/攻毒数 (健康对照除外)

2.4 抗体水平与分毒阳性率的关系 抗体水平与分毒率关系结果分别见表 4 和表 5。鸡胚源疫苗免疫后,3 只 AIV HI 抗体为 $0\log_2 \sim 3\log_2$ 的试验鸡均分毒阳性,5 只 AIV HI 抗体 $4\log_2 \sim 5\log_2$ 的试验鸡均毒阴性,7 只 AIV HI 抗体为 6 的试验鸡 1 只分毒阳性,25 只 AIV HI 抗体为 $7\log_2 \sim 11\log_2$ 的试验鸡,分毒阳性率为 0,试验鸡均保护;MDCK 细胞源疫苗免疫组,3 只 AIV HI 抗体水平为 $0\log_2 \sim 3\log_2$ 的试验鸡分毒阳性,9 只 AIV HI 抗体为 $4\log_2$ 、 $5\log_2$ 、 $6\log_2$ 的试验鸡 5 只病毒分离阳性,12 只 AIV HI 抗体为 $7\log_2$ 的鸡 1 只分毒阳性,16 只 AIV HI 抗体水平为 $8\log_2 \sim 10\log_2$ 的试验鸡均未分离到病毒,100% 保护。

表 4 鸡胚源疫苗免疫后抗体水平与攻毒保护率的关系

Table 4 The relationship of AIV HI titer to the protection rate after chicken embryo - derived vaccine immunization

抗体水平 (log)	鸡数	分毒阳性数	分毒阴性数	阳性数/总数 (%)
0-3	3	3	0	3/3(100)
4-5	5	0	5	0/5(0)
6	7	1	6	1/7(14.3)
7-11	25	0	25	0/25(0)

表 5 MDCK 细胞源疫苗免疫后抗体水平与保护率的关系

Table 5 The relationship of AIV HI titer to the protection rate after cell - derived vaccine immunization

抗体水平 (log)	鸡数	分毒阳性数	分毒阴性数	阳性数/总数 (%)
0-3	3	3	0	3/3(100)
4	1	0	1	0/1(0)
5	2	2	0	2/2(100)
6	6	3	3	3/6(50)
7	12	1	11	1/12(8.3)
8-10	16	0	16	0/16(0)

3 讨论与结论

本研究分别采用鸡胚培养的方式和纯悬浮培养 MDCK 细胞的方式制备了 2 种 H9 亚型 AIV BX13 株灭活疫苗,以不同剂量(0.02、0.1、0.2 和

0.3 mL/只)免疫接种 21 日龄 SPF 鸡后两种疫苗均能诱发鸡只产生 AIV HI 抗体,免疫鸡的 AIV HI 抗体水平均随着免疫剂量的增加而提高。2 种疫苗免疫后 7 d 均未检测到 AIV HI 抗体,免疫后 14 d 最高免疫剂量组鸡胚源疫苗免疫鸡的 AIV HI 抗体滴度最高达到 $3.6\log_2$,MDCK 细胞源疫苗 AIV HI 抗体滴度最高达到 $4.6\log_2$,细胞源疫苗组稍高。免疫后 21 d,两种疫苗免疫鸡的 AIV HI 抗体水平明显高于免后 14 d,结果说明免疫时间和 AIV HI 抗体水平呈正相关。当免疫剂量为 0.1~0.3 mL/只时,鸡胚源疫苗的抗体水平为 $7.0\log_2 \sim 8.8\log_2$,细胞源疫苗的抗体水平为 $7.2\log_2 \sim 8.3\log_2$ 。张建伟等^[13]使用微载体悬浮培养 MDCK 细胞制备禽流感病毒疫苗,证明 MDCK 细胞制备的禽流感病毒疫苗具有较好的免疫效果,使用不同剂量接种 21 日龄 SPF 鸡,免后 21 d HI 抗体水平最高为 $5.6\log_2$,如果以免疫后抗体水平评价免疫效果,与本研究对比,免疫剂量相同时,纯悬浮细胞源疫苗免疫效果明显高于贴壁培养的 MDCK 细胞源疫苗。

攻毒试验结果显示,本研究中相同免疫剂量时,鸡胚源疫苗的保护效果高于纯悬浮 MDCK 细胞制备的 H9 亚型 AIV 疫苗,鸡胚源病毒液制备的疫苗以 0.1 mL/只 ($10^{7.2}EID_{50}$ /只) 剂量免疫就可以达到 100% 保护;细胞源病毒液制备的疫苗抗原以 0.1 mL/只 ($10^{7.2}EID_{50}$ /只) 剂量免疫保护率为 80%,当免疫剂量达到 0.2~0.3 mL/只 ($10^{7.5}EID_{50}$ /只~ $10^{7.7}EID_{50}$ /只) 时,保护率达到 100%,说明当免疫剂量为 0.2 mL/只 ($10^{7.5}EID_{50}$ /只) 以上时,鸡胚源疫苗和 MDCK 细胞源疫苗的攻毒保护率无显著差异。免疫剂量相同时,鸡胚源疫苗免疫效果高于细胞源疫苗的原因尚不清楚,笔者认为有以下几种原因,病毒在 MDCK 细胞中传代是否会导致病毒变异,抗原液中的 MDCK 细胞组分是否影响鸡的免疫应答,是否存在试验鸡只的个体差异等都有待进一步试验证实和深入研究。

鲜有学者针对使用悬浮 MDCK 细胞制备禽流

感疫苗免疫鸡后产生的抗体水平与分毒阳性率的关系做过比较,本试验分析了 2 种疫苗免疫试验鸡后 21 d, HI 抗体滴度与分毒阳性率之间的关系。当使用鸡胚源疫苗免疫时, 15 只 AIV HI 抗体水平为 $0\log_2 \sim 6\log_2$ 的试验鸡有 4 只分毒阳性, 其中 1 只 AIV HI 为 $6\log_2$ 也分毒阳性, 因此不排除抗体水平为 $4\log_2 \sim 6\log_2$ 鸡只感染 AIV 后向环境排毒的风险, 当 AIV HI 抗体水平为 $7\log_2 \sim 11\log_2$ 时, 所有免疫鸡均未分离到病毒, 说明使用鸡胚源抗原制备 H9 亚型 AIV BX13 株疫苗免疫试验鸡, 当 HI 抗体滴度达到 $7\log_2$ 时, 即可阻止鸡只排毒。当使用 MDCK 细胞源疫苗免疫时, 24 只 AIV HI 抗体水平为 $0\log_2 \sim 7\log_2$ 的试验鸡中 9 只分毒阳性, 其中 4 只 AIV HI 抗体水平为 $6\log_2 \sim 7\log_2$ 的试验鸡病毒分离阳性, 说明细胞源疫苗的免疫效力可能稍低于鸡胚源疫苗, 是疫苗本身的原因还是试验鸡只的个体原因尚待进一步确认, 当细胞源疫苗免疫鸡的 AIV HI 抗体水平达到 $8\log_2$ 以上时, 鸡只停止向外排毒, 说明该抗体水平可以有效抑制病毒的排放。综上所述, 抗体水平与排毒有明显相关性, 鸡胚苗源疫苗的 AIV HI 抗体滴度达到 $7\log_2$, 细胞苗源疫苗的 AIV HI 达到 $8\log_2$ 时均可抑制病毒排放, 本研究由于统计数量较少, 也由于鸡只个体间存在差异, 结论尚需更多数据验证。

本研究显示, 如果用攻毒保护率评价疫苗的免疫效果, 细胞苗与鸡胚苗尚有差异, 但差异不大, 通过进一步筛选对 AIV 敏感的细胞株和改进培养工艺, 或许可以获得高产细胞株和高毒价的抗原, 通过提高毒价获得与鸡胚苗一致的保护率的疫苗是可能的。

本研究的目的是找到一种能够替代鸡胚制备 AIV 疫苗抗原的方法, 有学者研究发现, AIV 在 MDCK 悬浮细胞上的增殖能力与 MDCK 贴壁细胞相当, 可获得较高的病毒滴度, 但贴壁细胞增殖病毒工艺复杂, 同一批次细胞瓶中的病毒滴度也存在差异^[14]。因此, 悬浮培养细胞增殖 AIV 成为了研究热点。本研究采用纯悬浮的 MDCK 细胞接种

AIV 制备抗原和疫苗, 通过 AIV HI 抗体检测和攻毒试验证明纯悬浮培养方式制备的 AIV 疫苗具有较好的免疫效果, 使用该疫苗免疫 SPF 鸡, 0.1 mL/ 只以上的免疫剂量免疫 SPF 鸡后 21 d, 抗体水平达到 $7.2\log_2 \sim 8.3\log_2$, 0.2 mL/ 只的免疫剂量即可保护 100% 的鸡不向外界排毒, 证明悬浮培养 MDCK 细胞制备的禽流感疫苗免疫效力确实可靠。本研究的结果为后续继续筛选对 AIV 增殖效率更高的 MDCK 细胞株和利用纯悬浮培养 MDCK 细胞制备 AIV 疫苗抗原奠定了基础。

参考文献:

- [1] 李莉, 杜鑫, 张丽娜, 等. 重组禽流感病毒 H7N9 H7 - Re1 株培养条件的优化 [J]. 中国农业科学, 2018, 51 (17): 3415 - 3426.
Li L, Du X, Zhang L L, *et al.* Optimization of cultivation conditions for reassortant avian influenza virus H7N9 H7 - Re1 strain [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51 (17): 3415 - 3426.
- [2] 毕英佐. H9N2 亚型禽流感的流行现状和防控措施 [J]. 中国家禽, 2009, 31 (11): 33 - 34.
Bi Y Z. Epidemiological status and control measures of H9N2 subtype avian influenza [J]. *China Poultry*, 2009, 31 (11): 33 - 34.
- [3] Kang N, Chen M, Bi F Y, *et al.* First positive detection of H9 subtype of avian influenza virus nucleic acid in aerosol samples from live poultry markets in Guangxi [J]. *South of China*, 2016, 129 (11): 1371 - 1373.
- [4] Wang M W, Fu C X, Zheng B J. Antibodies against H5 and H9 avian influenza among poultry workers in China [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360 (24): 2583 - 2584.
- [5] Li K S, Xu K M, Peiris J S M, *et al.* Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? [J]. *Journal of Virology*, 2003, 77 (12): 6988 - 6994.
- [6] 孟芳, 徐怀英, 张伟, 等. 近 20 年中国部分地区鸡源 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因遗传演化及其变异频率 [J]. 微生物学报, 2016, 56 (1): 35 - 43.
Meng F, Xu H Y, Zhang W, *et al.* Genetic evolution and substitution frequency of avian influenza virus HA gene in chicken H9N2 subtype in China in the last 20 years [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56 (1): 35 - 43.

- [7] 杜燕, 娄本红, 武专昌, 等. 抗体选择压作用下 H9N2 亚型禽流感病毒 NA 基因的变异[J]. 病毒学报, 2012, 28(1): 1-6.
- Du Y, Lou B H, Wu Z C, *et al.* Influence of antibody-mediated immune pressure on neuraminidase gene mutations of avian influenza virus H9N2 [J]. Chinese Journal of Virology, 2012, 28(1): 1-6.
- [8] 娄本红, 朱秀同, 孙贝贝, 等. 抗体选择压作用下 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因的变异[J]. 微生物学报, 2009, 49(7): 955-959.
- Lou B H, Zhu X T, Sun B B, *et al.* Mutations of the hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza viruses under selective pressure of antibody [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(7): 955-959.
- [9] Kistner O, Barrett P N, Mundt W, *et al.* Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine [J]. Vaccine, 1998, 16(9/10): 960-968.
- [10] Makizumi K, Kimachi K, Fukada K, *et al.* Timely production of A/Fujian-like influenza vaccine matching the 2003-2004 epidemic strain may have been possible using Madin-Darby canine kidney cells [J]. Vaccine, 2008, 26(52): 6852-6858.
- [11] Lohr V, Genzel Y, Behrendt I, *et al.* A new MDCK suspension line cultivated in a fully defined medium in stirred-tank and wave bioreactor [J]. Vaccine, 2010, 28(38): 6256-6264.
- [12] Liu J, Shi X, Schwartz R, *et al.* Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine [J]. Vaccine, 2009, 27(46): 6460-6463.
- [13] 张建伟, 史爱华, 章振华, 等. 悬浮培养 MDCK 细胞制备的 H9 亚型禽流感灭活疫苗免疫剂量试验 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(4): 37-40.
- Zhang J W, Shi A H, Zhang Z H, *et al.* Determination of immune dose of MDCK cell suspension cultured H9 subtype avian influenza inactivated vaccine [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(4): 37-40.
- [14] 陈宏, 杨柳, 宋海岩, 等. 悬浮 MDCK 细胞的驯化与 H5 亚型禽流感病毒的培养 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(17): 3405-3414.
- Chen H, Yang L, Song H Y, *et al.* Doestimation of suspended MDCK cells and cultivation of H5 subtype avian influenza virus [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(17): 3405-3414.

(编辑: 李文平)