

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.08.02

4 型禽腺病毒 HLJ1701 株灭活疫苗的研制

朱庆贺, 苗艳, 杨旭东, 王爽, 张鹏宇, 陈曦, 王观悦, 史同瑞*

(黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院, 黑龙江齐齐哈尔 161005)

[收稿日期] 2020-04-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)08-0009-05 [中图分类号] S852.65

[摘要] 利用 4 型禽腺病毒 HLJ1701 株进行灭活疫苗的研制, 并对疫苗的免疫效果进行评价, 为家禽 4 型禽腺病毒的防控提供数据及参考。将 HLJ1701 株用灭菌生理盐水作 10^4 倍稀释后, 接种 9 日龄 SPF 鸡胚, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 72 h 后收获感染鸡胚尿囊液, 经甲醛灭活后, 加白油佐剂乳化制成油乳剂灭活疫苗, 对制备疫苗的性状、安全性、免疫效力等进行检验。结果显示, 制备的 3 批 4 型禽腺病毒灭活疫苗(HLJ1701 株)均为油包水型, 黏度均在 50 cP 以内, 对 3 批疫苗取样, 样品经 3000 r/min 离心 15 min, 管底无水相析出。安全性试验结果显示, 将疫苗按 1 mL/只超剂量接种 3 周龄 SPF 鸡, 试验鸡在观察期内全部健活, 未出现局部或全身不良反应, 表明疫苗对 SPF 鸡具有良好的安全性; 免疫效力及攻毒保护试验结果显示, 用疫苗按 0.2 mL/只的剂量免疫接种 3 周龄 SPF 鸡 1 次, 免疫接种后 21d 试验鸡血清中 HLJ1701 株的抗体平均效价可达 2^8 以上, 使用 4 型禽腺病毒(HLJ1701 株)接种 0.2 mL/只 (100 LD_{50}) 对免疫鸡进行攻毒, 疫苗对免疫鸡的保护率均为 100%。研究表明, 实验室条件下研制的 4 型禽腺病毒(HLJ1701 株)灭活疫苗的各项指标均符合标准。

[关键词] 4 型禽腺病毒; 灭活疫苗; 佐剂; 研制; 安全性; 保护率

Development of Inactivated Avian Adenovirus Type 4 HLJ1701 Strain

ZHU Qing-he, MIAO Yan, YANG Xu-dong, WANG Shuang, ZHANG Peng-yu,

CHEN Xi, WANG Guan-yue, SHI Tong-ruì*

(Branch of Animal Husbandry and Veterinary of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihaer, Heilongjiang 161005, China)

Corresponding author: SHI Tong-ruì, E-mail: systr@sina.com

Abstract: Inactivated vaccine was developed by type 4 avian adenovirus HLJ1701 strain, and the immune effect of the vaccine was evaluated to provide data and reference for the prevention and control of poultry type 4 avian adenovirus. The HLJ1701 strain was diluted 10^4 times with sterilized physiological saline, and 9-day-old SPF chicken embryos were inoculated, and the allantoic fluid of infected chicken embryos was harvested after incubation at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 72 hours. After being inactivated by formaldehyde, white oil adjuvant was added to

基金项目: 黑龙江科研机构创新能力提升专项“兽药新药新品种开发”(YC2016D004)

作者简介: 朱庆贺, 硕士研究生, 助理研究员, 从事兽用生物制品开发。

通讯作者: 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

emulsify to make oil. The vaccines are used to test the characteristics, safety, and immune efficacy of the vaccine. The results showed that the three batches of type 4 inactivated avian adenovirus vaccine (HLJ1701 strain) were all w/o and the viscosity was within 50 cP. The samples were centrifuged at 3000 r/min for 15 minutes. The bottom anhydrous phase precipitated. The results of the safety test showed that the vaccine was inoculated with SPF chicken at an overdose of 1 mL per animal. The test chickens were all alive during the observation period without local or systemic adverse reactions, indicating that the vaccine has good safety to SPF chickens. The immune efficacy and challenge protection test results show that the vaccine was used to vaccinate 2-week-old SPF chickens once at a dose of 0.2 mL per animal. The average titer of the antibody against HLJ1701 strain in the serum of test chickens reached 2^8 type 4 avian adenovirus (HLJ1701 strain) was inoculated with 0.2 mL ($100 LD_{50}$) to challenge the immunized chickens, and the protection ratio of the vaccine to the immunized chickens was 100%. An inactivated vaccine against avian adenovirus type 4 (HLJ1701 strain) was developed under laboratory conditions, and all indexes of the vaccine met the standards.

Key words: avian adenovirus type 4; inactivated vaccine; adjuvant; development; safety; protection rate

4 型禽腺病毒是指禽腺病毒 1 亚群血清 4 型,能够引起鸡心包积水。该病的特征性症状为心包出现淡黄色透明液体,同时也会出现如肝脏肿胀、肾脏水肿、尿酸盐沉积等临床症状,因此临床中称为鸡心包积水综合征。该病最早在巴基斯坦的安卡拉首先被报道,因此又称安卡拉病,其后在斯洛伐克、印度、墨西哥、秘鲁、俄罗斯、孟加拉国、韩国相继出现^[1]。2006 年该病第一次在中国被报道^[2],2015 年 7 月开始在我国的河南、河北、新疆、安徽、山东、江西、湖北和江苏等省份迅速传播^[3-4]。该病主要发生在炎热湿润的夏季,但其他季节也可零星发生,发病率和死亡率可高达 40%~90%^[5]。自 2016 年以来黑龙江省部分地区出现流行^[6],给该省养鸡业造成严重经济损失。鉴于当前 4 型禽腺病毒的严重情况,迫切需要研发针对性疫苗,以加强对 4 型禽腺病毒感染的有效防控。因此,本研究利用在黑龙江省发病鸡场分离的 4 型禽腺病毒 (HLJ1701 株)进行了灭活疫苗的研制。

1 材料

1.1 毒株 4 型禽腺病毒 (HLJ1701 株)由黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院兽药研究室分离并保存。

1.2 实验动物 SPF 鸡胚、种蛋及 SPF 雏鸡购自

哈尔滨维科生物技术有限公司,自行孵化至适合日龄使用。

1.3 佐剂 注射用白油、司本-80、吐温-80,均购自天津市巴斯夫化学试剂有限公司。

2 方法

2.1 抗原制备 4 型禽腺病毒 (HLJ1701 株)用生理盐水作 10^4 倍稀释,经尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚,0.2 mL/枚,置 37 °C 孵育 72 h,24 h 内死亡为非特异性死亡,废弃不计,收获后测定 LD_{50} 应不小于 $10^{-5.49}$ 。按照以上方法分别制备 3 批病毒液,批号分别为 FAdV4-1、FAdV4-2、FAdV4-3。

2.2 病毒液灭活 4 型禽腺病毒 (HLJ1701 株)病毒液中加入甲醛 (终浓度 0.3%),37 °C 灭活 24 h,灭活后的病毒液置于 2~8 °C 保存。

2.3 半成品检验

2.3.1 无菌检验 按照《中华人民共和国兽药典》(2015 版)对样品进行检验,应无细菌生长,检验不合格应废弃。

2.3.2 病毒含量测定 将灭活前的病毒,做 10 倍系列稀释,0.2 mL/只定量接种 2 周龄 SPF 鸡,每个稀释度接种 6 只,观察记录实验动物死亡数,直至攻毒后 14 d,计算各稀释度死亡实验动物的百分率。按 Reed-Muench 法计算 LD_{50} 。

2.3.3 灭活检验 取灭活后的 HLJ1701 株病毒液,尿囊腔内接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 10 枚,每胚 0.2 mL,37 °C 继续孵育,剔除 24 h 内死亡鸡胚,观察 3 日,鸡胚非特异性死亡不应超过 2 枚。收获所有鸡胚的胚液,颈部皮下接种 10 只 2 周龄 SPF 鸡胚,应全部无异常。

2.4 疫苗配制

2.4.1 油相制备 取优质注射白油 96 份,司本-80 4 份。先将白油缓缓加温,加入 4% 的司本-80,边搅拌边加温,直到充分溶解至透明,高压灭菌备用。

2.4.2 水相制备 取疫苗抗原(灭活鸡胚尿囊液) 96 份加入灭菌后的吐温-80 4 份,开始搅拌直至全部溶解为止,制成水相。

2.4.3 乳化 将油相与水相按 2:1 的比例利用 IKA 乳化机 25000 r/min 乳化 5 min。批号分别为 20170711、20170824、20170913。

2.5 成品检验

2.5.1 性状 按照《中华人民共和国兽药典》附录对疫苗的外观、剂型、稳定性和黏度等性状进行检验。

2.5.2 装量检查 按《中华人民共和国兽药典》附录进行装量检查。

2.5.3 无菌检验 按《中华人民共和国兽药典》附录进行无菌检验。

2.5.4 安全检验 取 3 周龄 SPF 鸡 15 只,每只肌肉或颈部皮下注射疫苗 1 mL,观察 14 d,记录是否出现局部或全身不良反应。

2.5.5 效力检验

2.5.5.1 血清学方法 取 3 周龄 SPF 鸡 40 只,其中 30 只分别利用 3 批次疫苗进行颈部皮下接种,每批次 10 只,0.2 mL/只,另 10 只作不免疫接种对照。接种后 21 d,分别采血分离血清,使用 ELISA 检测抗体效价。

2.5.5.2 免疫攻毒法 取 3 周龄 SPF 鸡 40 只,其中 30 只分别利用 3 批次疫苗进行颈部皮下接种,每批次 10 只,0.2 mL/只,另 10 只作不免疫接种对照。接种后 21 d,将免疫鸡连同 10 只对照鸡,分别

通过皮下接种病毒液,0.2 mL/只(含 100 LD₅₀),连续观察 10 d 后分别采集试验鸡的肝脏组织进行病毒分离。

3 结果与分析

3.1 半成品检验 在实验室条件下连续制备了 3 批病毒液,批号分别为 FAdV4-1、FAdV4-2、FAdV4-3。检验结果显示,3 批病毒液的病毒含量(LD₅₀) 在 10^{-5.49}~10^{-5.66} 之间,病毒液经 0.3% 甲醛液在 37 °C 灭活 24 h 后,均可灭活完全(表 1)。

表 1 病毒液半成品检验结果

Tab 1 The detecting result of virus antigen

病毒液批号	收获量	病毒含量	灭活检验	无菌检验
FAdV4-1	850	10 ^{-5.66} /0.1 mL	合格	合格
FAdV4-2	865	10 ^{-5.49} /0.1 mL	合格	合格
FAdV4-3	860	10 ^{-5.66} /0.1 mL	合格	合格

3.2 性状检验 经检验,制备的 3 批 4 型禽腺病毒灭活疫苗批号分别为 20170711、20170824、20170913 均为乳白色乳剂,油包水型,将疫苗置 3000 r/min 离心 15 min,管底无水相析出,3 批疫苗的黏度均在 50 cP 以内(表 2)。

表 2 3 批实验室制品性状检验结果

Tab 2 The physical characteristics result of 3 batch of products

疫苗批号	外观	剂型	稳定性	粘度/cP
20170711	白色均匀乳状	油包水型	合格	40.5
20170824	白色均匀乳状	油包水型	合格	41.4
20170913	白色均匀乳状	油包水型	合格	39.5

3.3 装量检查 经检查,所制备的 3 批次 4 型禽腺病毒灭活疫苗的装量均为 250 mL 以上,符合规定(表 3)。

表 3 装量检查结果

Tab 3 Filling inspection results

疫苗批号	测定值/mL	结果
20170711	253.2	合格
20170824	252.4	合格
20170913	253.4	合格

3.4 无菌检验 经检验,所制备的 3 批 4 型禽腺病毒灭活疫苗均无细菌生长,检验合格。

3.5 安全检验 将所制备的 3 批 4 型禽腺病毒灭活疫苗分别经颈部皮下接种 3 周龄 SPF 鸡,试验鸡接种后均全部健活,未出现局部或全身不良反应。

3.6 效力检验 试验结果显示,3 批 4 型禽腺病毒灭活疫苗免疫 3 周龄 SPF 鸡后 21 d,抗体平均效价可达到 2⁸以上,使用 4 型禽腺病毒(HLJ1701 株)进行攻毒,攻毒后各免疫鸡均全部存活,攻毒 10 d 后分别采集试验鸡的肝脏组织进行病毒分离,

均为阴性,3 批疫苗对免疫鸡的攻毒保护率均为 100%;对照鸡在攻毒后 4 d 内均全部发病死亡(表 4 和表 5)。

表 4 抗体检测结果

Tab 4 Results of Antibody test

组别	抗体/log2	均值/log2
20170711	8,8,8,8,9,8,9,8,9,8	8.3
20170824	9,9,9,8,8,8,10,9,9,8	8.7
20170913	8,8,8,9,9,8,9,8,8,9	8.4
对照组	0,0,0,0,0,0,0,0,0,0	0

表 5 3 批 4 型禽腺病毒灭活疫苗对 HLJ201701 株的攻毒保护试验

Tab 5 The result of virus challenge experiment with strain HLJ201701 of 3 batch virus vaccine

组别	项目	攻毒保护结果										保护率	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
20170711	攻毒后发病死亡情况	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100%
	肝脏病毒分离结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20170824	攻毒后发病死亡情况	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100%
	肝脏病毒分离结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20170913	攻毒后发病死亡情况	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	100%
	肝脏病毒分离结果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
对照组	攻毒后发病死亡情况	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	0%
	肝脏病毒分离结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

“+”表示病毒分离阳性,“-”表示病毒阴性;“N”表示攻毒后未死亡,“D”表示攻毒后死亡

“+” indicated virus isolation positive,“-” indicated virus isolation negative;“N” indicated no death after virus challenge,“D” indicated death after virus challenge

4 讨论与结论

不同于其他大部分禽类病毒,4 型禽腺病毒不具备使鸡、大鼠和小鼠红细胞凝集的能力^[7],不过 Manzoor S 利用人 O 型红细胞血凝抑制试验进行了野生鸟类中 4 型禽腺病毒的血清抗体情况调查^[8],说明 4 型禽腺病毒能够使人 O 型红细胞凝集,但是人 O 型红细胞获取较为困难,不适宜生物制品生产的实践应用,因此本研究未应用凝集试验进行抗体滴度检测。ELISA 方法是实验室诊断中常用的抗体检测方法^[9-10],本研究中利用黑龙江省农业科学院畜牧兽医分院兽药研究室建立的 ELISA 方法对疫苗抗体进行了检测^[10],结果表明 ELISA 检测方

法可以完成疫苗抗体检测任务,而且灵敏度高,测定准确。

目前已有其他 4 型禽腺病毒灭活疫苗制备的报道^[11-13],但疫苗免疫成功最主要的因素之一就是免疫毒株基因型的吻合。本研究利用黑龙江地区 4 型禽腺病毒分离株 HLJ1701 进行了灭活疫苗的研制,利用 MEGA7 软件进行分离株 HLJ1701 遗传进化分析,结果显示分离株序列与国外的分离株同源性差异较大,与加拿大分离株(GenBank: GU188428.1)核苷酸序列同源性仅为 96.00%,氨基酸同源性仅为 88.70%;与 Meng K 等^[13]用于制备灭活疫苗的中国山东分离株(GenBank:

MN102413.1, 分离于 2017 年 8 月) 核苷酸同源性较高, 为 98.80%, 但氨基酸同源性仅为 91.40%, 其中 hexon 蛋白第 367-395 位氨基酸序列有明显差异。不同地区分离毒株序列可能具有地域特异性, 基因序列的差异引起氨基酸序列的改变, 进而影响蛋白质结构, 尤其是具备抗原决定簇的 hexon 蛋白的改变极大可能影响疫苗的免疫效果, 因此利用本地区毒株进行疫苗制备更具地域优势, 也更具有针对性。本研究利用黑龙江地区分离毒株制备疫苗可能更适于黑龙江地区 4 型禽腺病毒的免疫防治。

本研究利用分离株 HLJ1701 进行了灭活疫苗的研制, 结果表明自制的灭活疫苗均符合药典规定, 而且疫苗的保护率达到 100%, 可以为临床 4 型禽腺病毒的疫苗制备及临床防控提供参考。

参考文献:

[1] Jaffery M S. A treatise on Angara disease (hydropericardium pulmonary oedema - hepatonephritis syndrome)[J]. J Pakistan Vet Med Asso, 1988, 34:1-33.

[2] Mittal D, Jindal N, Tiwari A K, *et al.* Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens [J]. Virus Dis, 2014, 25(1):114-119.

[3] Xia J, Yao K C, Liu Y Y, *et al.* Isolation and molecular characterization of prevalent Fowl adenovirus strains in southwestern China during 2015-2016 for the development of a control strategy[J]. Emerg Microbes Infect, 2017, 6(11): e103.

[4] Zhang T Q, Jin P, Ding Y, *et al.* Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak - associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China [J]. Virol J, 2016, 13: 188.

[5] 朱庆贺, 张鹏宇, 王观悦, 等. 血清 4 型禽腺病毒研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(11): 80-85.

Zhu Q H, Zhang P Y, Wang G Y, *et al.* The development of fowl adenovirus serotype 4 [J]. Chinses Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(11): 80-85.

[6] 朱庆贺, 王爽, 张莎, 等. 黑龙江省 I 亚群 4 型禽腺病毒分离鉴定及致病性分析 [J]. 动物医学进展, 2019, 40(10):

39-43.

Zhu Q H, Wang S, Zhang S, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity test of serotype 4 fowl adenovirus from Heilongjiang [J]. Progress of Veterinary Medicine, 2019, 40(10): 39-43.

- [7] 塞弗. 禽病学 [M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 主译. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- Saif Y M. Diseases of poultry [M]. Su J L, Gao F, Suo X, translated. 12ed. Beijing: China Agriculture Press, 2012.
- [8] Manzoor S, Hussain Z, Rahman S U, *et al.* Identification of antibodies against hydropericardium syndrome in wild birds [J]. British Poultry Science, 2013, 54(3): 325-328.
- [9] 文艳玲. 禽腺病毒 hexon 基因克隆表达及间接 ELISA 检测方法的建立 [D]. 南宁: 广西大学, 2008.
- Wen Y L. Cloning and expression of the hexon gene of avian adenovirus and development of ELISA base on antigen of recombinant proteins and quantitative real-time PCR method for detecting avian adenovirus [D]. Nanning: Guangxi University, 2008.
- [10] 朱庆贺, 张鹏宇, 崔红玉, 等. 4 型禽腺病毒抗体间接 hexon-ELISA 检测方法的建立 [J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(8): 7-11.
- Zhu Q H, Zhang P Y, Cui H Y, *et al.* Establishment of an indirect hexon-ELISA method for the detection of antibodies against fowl avainadenovirus serotype 4 [J]. Chinses Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(8): 7-11.
- [11] 安坤. I 群 4 型禽腺病毒灭活疫苗的试剂及质量评价 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- An K. Preparation and quality evaluation of inactivated avian adenovirus vaccine (DN strain) of group I, type 4 [D]. Guiyang: Guizhou University, 2016.
- [12] 殷国政. I 群 4 型禽腺病毒灭活疫苗及卵黄抗体的研制 [D]. 聊城: 聊城大学, 2019.
- Yin G Z. Development of the inactivated vaccine and yolk antibody for serotype 4 group I of fowl adenovirus [D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2019.
- [13] Meng K, Yuan X Y, Yu J, *et al.* Identification, pathogenicity of novel fowl adenovirus serotype 4 SDJN0105 in Shandong, China and immunoprotective evaluation of the newly developed inactivated oil-emulsion FAdV-4 vaccine [J]. Viruses, 2019, 11(7): 627.

(编辑: 李文平)