

H₅ 亚型禽流感灭活疫苗的研制

王贺民¹ 何诚² 张建平¹ 李浩鹏¹

(1. 中牧实业股份有限公司郑州生物药厂, 郑州 450061; 2. 中国农业大学 实验动物研究所, 北京 100094)

摘要 以 H₅N₁ 亚型禽流感病毒接种鸡胚, 收取鸡胚液为抗原研制了禽流感灭活疫苗, 并对制苗抗原以及疫苗的物理性状、安全性、免疫效力、免疫剂量和保护期等进行了试验。结果表明, 获得了较高效价的制苗抗原, 灭活前后 HA 分别为 2^{10.0-11.0} 和 2^{9.0-10.0}。试制疫苗物理性状符合要求, 安全性良好。试验鸡在免疫 14 d 后血清抗体达到 2^{7.5}, 210 d 血清 HI 抗体仍维持在 2^{5.0} 左右; 免疫后 18 d 使用高致病性 H₅ 亚型禽流感病毒攻毒, 获得 100% 的保护。分别使用 0.1, 0.3 和 0.5 mL 免疫鸡, 发现 0.3~0.5 mL 剂量组免疫后血清抗体达到 2^{7.4-8.0}。疫苗在 2~8 保存 540 d, 疫苗物理性状没有改变, 免疫后血清 HI 抗体可以达到 2^{7.5}。这提示研制的疫苗可以有效控制禽流感 H₅ 亚型的流行。

关键词 禽流感; H₅ 亚型; 疫苗; 鸡

中图分类号 S 854.43

文章编号 1007-4333(2004)01-0041-04

文献标识码 A

Studies on avian influenza inactivated vaccine of AIV-H₅N₁

Wang Hemin¹, He Cheng², Zhang Jianping¹, Li Haopeng¹

(1. Zhengzhou Biological Product Manufactory of China Animal Husbandry Industry Co., Ltd., Zhengzhou, 450061, China;

2. Laboratory Animal Institute, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The H₅N₁ strain of avian influenza virus (AIV) was inoculated into chicken embryo, collected the dead embryo, after which it was inactivated and made into oil adjuvant vaccine. The antigen, physical characteristic, safety, efficacy, dosage and protection period were tested according to the requirement of new biological product. Results showed the high quality antigen was harvested, the HA of the antigen was up to 2^{10.0-11.0} and 2^{9.0-10.0} respectively during the active and inactivated period. The inactivated vaccine was safe; its physical characterization was also fit for the requirement of the oil-adjuvant vaccine. 14 day later, the HI antibody rose to 2^{7.5} and maintained 2^{5.0} on day 210. The all vaccinated poultry acquired protection challenged with AIV-H₅N₁ strain after 18-day vaccination. If the birds were injected with 0.1, 0.2 and 0.3 mL respectively, the HI antibody rose to 2^{7.4-8.0} in latter two groups. No obvious physical change was observed for 540 days when the vaccine was conserved between 2 and 8, and the HI antibody responded to AIV-H₅ was 2^{7.5}. The above results suggest that the vaccine can be used to prevent the epidemic AIV-H₅N₁.

Key words avian influenza; H₅N₁ strain; vaccine; poultry

禽流感(Avian influenza virus, AIV)是由 A 型流感病毒引起的严重危害养禽业的一种传染病, 它的爆发和流行, 常常给当地的养禽业造成巨大的经济损失^[1]。2004 年以来我国周边国家和国内 16 个省市相继爆发 H₅N₁ 亚型的高致病性禽流感, 严重威胁我国养禽业和相关产业的健康发展, 同时对人类的健康也构成了严重威胁。为了有效控制此病,

我们研制了 H₅ 亚型禽流感灭活疫苗, 并对疫苗的半成品和成品进行了各项试验。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

H₅ 亚型禽流感试验用标准抗原及阳性血清购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所; 甲醛溶液购

收稿日期: 2004-01-15

作者简介: 王贺民, 硕士研究生; 何诚, 副教授, 通讯作者, 主要从事禽病研究。E-mail: hecheng@cau.edu.cn

自中国医药集团上海化学试剂公司;吐温-80 购自上海大众药业有限公司;10 号化妆品级白油购自杭州炼油厂;司本-80 购自上海大众药业有限公司;硬脂酸铝购自上海远航试剂厂。

1.2 实验鸡和鸡胚

SPF 种蛋及 28 d SPF 鸡购自中牧股份南京药械厂;试验用种蛋购自中牧股份定点种鸡场,经检测禽流感病毒 HI 抗体阴性。

1.3 试验用种毒

AVF_{H5N1} 种毒:由中牧股份郑州生物药厂分离、保存,经国家流感中心鉴定。ELD₅₀ 为 $10^{-0.8} \cdot 0.2 \text{ mL}^{-1}$,胸部肌肉注射对 28 d SPF 鸡 LD50 小于 $10^{-4.0} \cdot 0.2 \text{ mL}^{-1}$ 。接种 11 d SPF 鸡胚,收获感染死亡鸡胚胚液,-70 保存备用。

1.4 制苗用 AIV-H₅ 抗原的制备

AIV-H_{5N1} 种毒稀释后接种 11 d 鸡胚,经 37 培养后收取合格鸡胚的胚液,加入一定浓度的甲醛溶液按文献[2]方法进行灭活,2~8 保存备用。

1.5 制苗用 AIV-H₅ 抗原的检测

对未经灭活的 AIV-H₅ 胚液抽样,按 2000 版部颁规程的方法检测 ELD₅₀ 和 HA 效价。对灭活后的 AIV-H₅ 胚液抽样,进行无菌检验和灭活检验、并检测 HA 效价^[2]。

1.6 H₅ 亚型禽流感灭活疫苗的制备

按文献[3]方法制备疫苗的油相和水相,将水相缓慢加入盛有油相的乳化反应釜中,同时开启高速乳化剪切机进行乳化制备疫苗。

1.7 H₅ 亚型禽流感灭活疫苗的质量检测

1.7.1 疫苗的无菌试验 按 2000 版生物制品规程规定的方法进行。

1.7.2 疫苗的物理性状试验

疫苗外观试验 观察疫苗的外观和分层情况。

疫苗的稳定性试验 将疫苗样品 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,观察有无分层和破乳现象。

疫苗剂型试验 将疫苗样品滴于冷水表面,疫苗分散为水包油型,疫苗不分散为油包水型。

疫苗粘度试验 用出口内径为 1.2 mm 的 1 mL 吸管于常温下吸取 1 mL 疫苗样品,观察垂直放出 0.4 mL 疫苗所用的时间。

1.8 疫苗的安全性试验

每批疫苗取 5 只 28 d SPF 鸡,分别在颈部皮下注射疫苗样品 1 mL,在负压隔离饲养器中饲养观察 14 d,观察临床体征,到期逐只进行剖检,观察注射

部位的病理变化。

1.9 疫苗的效力试验

1.9.1 疫苗免疫后 AIV-H₅ 的血清保护抗体试验 每批疫苗取 10 只 28 d SPF 鸡,分别在颈部皮下注射疫苗样品 0.3 mL,在负压隔离饲养器中饲养观察,分别于免疫后的前 28 d 每 7 d 一次、28 d 以后每 14 d 一次采免疫鸡心脏血样,按 2000 版部颁规程规定的方法检测 AIV-H₅ 的 HI 抗体。

1.9.2 免疫鸡的 AIV-H₅ 攻毒保护试验 每批疫苗取 10 只 28 d SPF 鸡,分别在颈部皮下注射疫苗样品 0.5 mL,在负压隔离饲养器中饲养观察 18 d 后,每只鸡用 1 000 倍稀释的 AIV-H_{5N1} 病毒液攻毒 1 mL,同时取未免疫的同批 SPF 鸡 10 只使用相同剂量病毒攻毒作为阳性对照。在负压隔离饲养器中饲养,观察疫苗的免疫保护效果。

1.9.3 疫苗的最小免疫量试验 每批疫苗取 15 只 28 d SPF 鸡,分成 3 组,每组 5 只,分别在颈部皮下注射疫苗样品 0.3、0.2 和 0.1 mL,在负压隔离饲养器中饲养观察 14 d 后,检测免疫鸡对 AIV-H₅ 的 HI 抗体。

1.9.4 疫苗保存期的试验 将疫苗置 2~8 保存,分别于试制后的 180、270、360 和 540 d 时观察疫苗的物理性状。每批疫苗取 5 只 28 d SPF 鸡,分别在颈部皮下注射疫苗样品 0.3 mL,在负压隔离饲养器中饲养观察 14 d,测定免疫鸡对 AIV-H₅ 的血清 HI 抗体。

2 结果

2.1 制苗用 AIV-H₅ 抗原质量检测 and 无菌试验

5 批未灭活 AIV-H₅ 胚液的 ELD₅₀ 检测结果均小于 $10^{-0.8} \cdot 0.2 \text{ mL}^{-1}$ 、HA 效价均在 210 以上。灭活胚液无菌检验、灭活检验结果合格,HA 效价均在 29 以上。5 批疫苗无菌检测结果均合格(表 1)。

2.2 疫苗物理性状试验

试制的 5 批疫苗物理外观均呈均匀乳白色; $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 未见分层和破乳现象;疫苗滴于冷水表面不分散,为油包水型乳剂;垂直放出 0.4 mL 疫苗所用的时间在 5~7 s 之间。以上结果均符合研制要求。

2.3 疫苗的安全性检测

5 批疫苗安全检验用鸡在饲养观察期间均未发现有不良反应和明显的临床症状,14 d 后逐只进行剖检,注射局部组织未见有明显的肉芽肿胀。

表 1 抗原灭活前后质量检测结果

Table 1 The quality test of the activated and inactivated antigen

抗原 批次	灭活前		灭活后		
	ELD ⁵⁰ · 0.2 mL ⁻¹	HA (log ₂)	无菌 检验	灭活 检验	HA (log ₂)
01	10 ^{-8.33}	10	合格	合格	9
02	10 ^{-8.17}	11	合格	合格	11
03	10 ^{-8.5}	10	合格	合格	9
04	10 ^{-8.0}	10	合格	合格	10
05	10 ^{-8.33}	11	合格	合格	10

表 2 免疫后不同时间血清 HI 抗体检测结果

Table 2 HI antibody response by AIV-H₅ vaccine in different time

检测时间/d	7	14	21	28	42	56	70	84	98	100	128	140	150	170	180	200	210	220
HI(log ₂)	3.9	7.5	8.4	8.8	8.5	9.0	8.8	8.5	8.0	7.6	7.7	7.2	6.9	6.5	6.0	5.7	5.2	5.0

疫苗的最小免疫量试验 免疫鸡对 AIV-H₅ 的 HI 抗体检测结果表明,5 批试验疫苗按每只鸡 0.1, 0.2 和 0.3 mL 的剂量进行免疫,14 d 后均能得到较高的 AIV-H₅ 的 HI 抗体,但 0.1 mL 及 0.2 mL 剂量组的 HI 抗体均匀度不及 0.3 mL 剂量组(表 3)。

表 3 AIV-H₅ 疫苗的最小免疫剂量抗体结果Table 3 HI antibody in relation to minimum immunized dose of AIV-H₅ vaccine

免疫剂量/ mL	不同批次疫苗免疫鸡 HI(log ₂)				
	01	02	03	04	05
0.1	7.2	6.4	7.2	7.0	6.8
0.2	7.4	7.4	7.4	7.6	7.6
0.3	7.8	7.4	7.6	7.4	8.0

2.6 疫苗保存期的试验

试制的 5 批疫苗置 2~8 ℃ 保存,分别于试制后的 180,270,360 和 540 d 观察疫苗的物理性状,疫苗物理性状良好,没有出现变色、分层、破乳及剂型改变现象。免疫鸡后均能得到较高对 AIV-H₅ 的血清 HI 抗体,尤其保存到 540 d,疫苗的血清抗体仍能达到 27.4(表 4)。

3 讨论

3.1 H₅ 亚型禽流感灭活疫苗的制备工艺优化

禽流感病毒 HI 抗体在免疫鸡抵抗禽流感病毒的侵袭中起主导作用^[4],获得高水平禽流感病毒 HI 抗体的关键是疫苗中含有足够的禽流感病毒 HA 抗

2.4 疫苗的效力试验

疫苗免疫鸡血清 HI 抗体试验 疫苗免疫后血清 AIV-H₅ 的 HI 抗体检测结果表明,14 d 对 AIV-H₅ 的 HI 抗体达到 27.5,56 d 达到高峰(29)。高水平抗体一直持续到 140 d 才开始显著下降,至 210 d 降到 25 左右(表 2)。

免疫鸡 AIV-H₅ 攻毒保护试验 5 批疫苗免疫鸡在免疫 18 d 攻毒,均为 100% 保护,未免疫鸡攻毒后在观察期内全部死亡。免疫鸡未见典型禽流感症状和病理变化,而阳性对照鸡出现典型的病理变化。

表 4 不同保存期疫苗免疫鸡后 AIV-H₅ 的 HI 抗体结果Table 4 The HI antibody against AIV-H₅ vaccine in different conservative period

保存期/d	不同批次疫苗免疫鸡 HI(log ₂)				
	01	02	03	04	05
180	7.6	7.6	7.6	7.6	8.0
270	7.4	8.0	7.8	7.4	8.2
360	7.4	7.4	7.6	7.8	7.6
540	7.8	7.6	7.8	7.4	7.4

原。所以在 H₅ 亚型禽流感灭活疫苗的研制过程中,应十分注重获取高水平的禽流感病毒 HA 抗原,并尽量减小制苗过程对禽流感病毒 HA 抗原的破坏。我们制备的抗原灭活前禽流感病毒 ELD₅₀ 均在 10^{-8.0}~0.2 mL⁻¹ 以下,HA 效价高达 2^{10.0~11.0},灭活后禽流感病毒 HA 效价亦保持在 29 以上,这为制备高效禽流感疫苗提供了可能。Wood 等实验结果表明疫苗中血凝素的含量与免疫后抗体水平和攻毒保护率有密切的关系。随着血凝素含量增加,HI 抗体水平有增加的趋势,血凝素含量常受温度的影响^[5],所以我们用高速乳化剪切机代替胶体磨乳化制苗,不仅确保同批疫苗均匀一致,而且整个乳化过程中疫苗温度升高仅在 1 ℃ 以内,避免了因乳化过程中疫苗温度过度升高对抗原血凝素造成的损害。

3.2 H₅ 亚型禽流感灭活疫苗的安全性和实用性

作为生产使用的疫苗必须具备安全性、稳定性和高保护力,才能推广使用。本试验显示采用甲醛

溶液能够灭活禽流感制苗病毒,加上高水平的疫苗研究软硬件条件,完全能保证疫苗的安全性,避免因疫苗引起的生物安全事故。5批疫苗的安全检验结果证明了疫苗的安全性和制苗工艺的合理性。疫苗在2~8℃保存540d后,不仅物理性状稳定,而且免疫鸡以后,完全能够获得高水平的HI血清抗体,提示H₅亚型禽流感灭活疫苗稳定性较好,保存期可以达到18个月以上。

H₅亚型禽流感灭活疫苗按每只鸡0.3mL剂量进行免疫后,在14d内就能获得较高的HI血清抗体,并且这种抗体完全能抵御禽流感病毒的侵袭。免疫鸡高水平的HI血清抗体一直持续到26~30周,提示我们该疫苗的免疫保护期在半年以上。虽然试验证明较小剂量的疫苗免疫鸡以后也能获得比较满意的HI血清抗体,但抗体匀度不及高剂量组,所以在实际免疫接种时,建议采用428d以内小鸡每只鸡0.3mL的免疫剂量,中鸡至成鸡采用每只鸡0.5mL的免疫剂量,以确保免疫效果。

目前世界上已经家禽体内分离到15种血凝素亚型的禽流感病毒,不同亚型没有交叉保护力。一种亚型禽流感病毒制备疫苗,只对同亚型的强毒攻击具有高度保护作用,这要求生产和应用禽流感疫苗必须有针对性。Deroo等通过研究也证实禽流感

神经氨酸酶(NA)疫苗对致病性禽流感的攻击具有一定保护作用^[6]。鉴于国内目前16个省市出现高致病性禽流感H₅N₁的流行,根据国外经验,国内疫苗研究必须有针对性地选择血凝素和神经氨酸酶亚型种毒制成疫苗,才能有效预防禽流感的发生和免疫后排毒问题。

参 考 文 献

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京:北京农业大学出版社, 1995. 1~134
- [2] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程[M]. 北京:化学工业出版社, 2001. 83~86
- [3] 王明俊, 马闻天, 冀锡霖, 等. 兽医生物制品学[M]. 北京:中国农业出版社, 1997. 149~153
- [4] 卡尔尼克 B W 主编. 禽病学[M]. 第9版. 高福, 刘文军译. 北京:北京农业大学出版社, 1991. 455~471
- [5] Wood J M, Kawaoka Y, Newberry La, et al. Standardization of inactivated H₅N₂ influenza vaccine and efficacy against lethal influenza[J]. Avian Disease, 1985, 29: 867~872
- [6] Deroo T, Min Jou Wang, Fiers W. Recombinant Neuraminidase vaccine protects against lethal influenza[J]. Vaccine, 1996, 14(6): 561~569