

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.7.01

鸡新城疫基因 VII 型灭活标记疫苗 (MG7 株) 最小有效免疫剂量的研究

罗琼^{1,2}, 李延鹏², 王宏飞², 同戈², 张晓楠², 朱启运³, 李慧敏¹, 陈瑞爱^{2*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2. 广东省兽用生物制品生物技术研究与企业应用重点实验室, 广东肇庆 526238;

3. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046)

[收稿日期] 2017-03-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 07-0001-05 [中图分类号] S859.797

[摘要] 为科学指导鸡新城疫基因 VII 型灭活标记疫苗 (MG7 株) 的临床免疫剂量, 通过测定免疫鸡 HI 抗体滴度和攻毒保护试验, 进行了 10 日龄和 30 日龄 SPF 鸡最小有效免疫剂量的研究。动物实验使用 10 μL 、20 μL 和 40 μL 三种不同免疫剂量, 免疫疫苗后 21 d 检测 HI 抗体效价, 10 日龄 SPF 鸡 001 批次疫苗 HI 抗体平均效价依次为 4.8、6.2 和 6.5, 攻毒保护率依次为 80%、100% 和 100%, 30 日龄 SPF 鸡 HI 抗体平均效价依次为 5.0、6.3 和 6.5, 攻毒保护率依次为 70%、100% 和 100%。结果表明, 新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株) HI 抗体效价和保护效力呈正相关, 免疫剂量与 HI 抗体效价和保护效力也呈正相关。用 NDV 基因 VII 型强毒 G7 株进行攻毒保护试验, 两种日龄鸡在 20 μL 的免疫剂量下, 疫苗仍能达到良好的免疫保护效果。

[关键词] 鸡新城疫灭活标记疫苗; 基因 VII 型; 最小有效免疫剂量

Study on the Minimum Effective Immune Dose of Genotype VII Newcastle Disease Inactivated Marker Vaccine (MG7 strain)

LUO Qiong^{1,2}, LI Yan-peng², WANG Hong-fei², TONG Ge², ZHANG Xiao-nan²,
ZHU Qi-yun³, LI Hui-min¹, CHEN Rui-ai^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangdong Enterprise Key Laboratory of Biotechnology R&D of Veterinary Biological Products, Zhaoqing, Guangdong 526238, China;

3. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Corresponding author: CHEN Rui-ai, E-mail: chensa727@126.com

Abstract: In order to scientifically guide the clinical immunization dose of genotype VII Newcastle disease inactivated marker vaccine (MG7 strain), the minimum effective immune dose of 10 days and 30 days SPF chickens was studied by measuring the immunized chicken HI antibody and challenge protection test. Animal experiment using 10 μL , 20 μL and 40 μL in three different doses of 3 batches of vaccine immune, The HI

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016B020202007)

作者简介: 罗琼, 硕士研究生, 从事生物制品方面的研究。

通讯作者: 陈瑞爱。E-mail: chensa727@126.com

antibody titers were detected 21 days after immunization, the 10 day old SPF chickens of 001 batches of vaccine HI antibody titers were 4.8, 6.2 and 6.5, protective rates were 80%, 100% and 100%. The 30 day old SPF chickens of 001 batches of vaccine HI antibody titers were 5, 6.3 and 6.5, protective rates were 70%, 100% and 100%. The results showed that there was a positive correlation between the HI antibody titer and protective efficacy after vaccination, and the immunization dose was positively correlated with HI antibody titer and protective effect. The NDV genotype VII virulent G7 strain was used to challenge protection test. The vaccine was able to achieve good immunoprotective effect at 20 μL immunization dose.

Key words: Newcastle disease inactivated marker vaccine; genotype VII; minimum effective immune dose

新城疫 (Newcastle Disease, ND) 是由新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus, NDV) 引起禽类的一种高度接触性传染病, 该病具有发病急、死亡快和死亡率高等特点, 给养鸡业造成了巨大的经济损失, 严重影响养禽业的发展。不同 NDV 分离株间的毒力差异大, 严维巍等^[1] 在 2000 年首次报道了基因 VII 型 NDV 在中国大陆的存在。2001 年刘华雷等^[2] 选取 1994 年以来国内不同地区的代表株进行遗传分析证实, 所分离的毒株在裂解位点的氨基酸序列均符合 NDV 的强毒株特征, 通过遗传进化树分析表明, 选取的 8 株病毒中有 7 株为基因 VII 型新城疫病毒。虽然基因 VII 型 NDV 的毒力指标和其他强毒株相似, 但该型毒株感染鸡的脾脏、胸腺、法氏囊及盲肠扁桃体的病变程度均明显高于 II 型和 V 型毒株^[3]。因此研制基因 VII 型 NDV 疫苗十分必要。

兰州兽医研究所于 2008 年在广东省某养鸡场发病鸡只中分离得到一株 NDV, 命名为 NDV/Chicken/Guangdong/2008/G7 (Newcastle disease virus G7, 简称 NDV G7), 利用 NDV F 基因 1~374 bp 核苷酸分型发现, 该分离株为 NDV 基因 VII d 亚型^[4]。利用已建立的反向遗传操作平台, 将基因 VII 型 NDV 强毒 G7 株的 NP 蛋白缺失 18 个氨基酸, 并对 F 蛋白裂解位点进行突变, 获得 NDV 低毒力标记疫苗毒株 MG7 株, 该毒株毒力明显减弱, NP 蛋白缺失 18 个氨基酸可与野毒株有明显区分 (可以做为标记疫苗使用), 对病毒的基因修饰不影响其在鸡胚上的复制能力, 该毒株适合于 ND 疫苗的大规模生产, 可用于制备基因 VII 型新城疫标记疫苗。本研究

进行了鸡新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株) 对鸡的最小有效免疫剂量的测定试验, 为疫苗每羽份剂量的确定提供依据。

1 材料

1.1 试验用疫苗 实验室制备的 3 批鸡新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株), 批号为 001、002、003, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 SPF 鸡 SPF 鸡由广东温氏大华农生物科技有限公司禽蛋分公司提供, 动物房隔离器内按 SPF 鸡饲养要求饲养, 供试验使用。

1.3 检验用试剂 MG7 抗原和阳性血清由兰州兽医研究所制备保存。

1.4 效检用鸡新城疫病毒 鸡新城疫基因 VII 型强毒 G7 株由兰州兽医研究所分离纯化并保存。

2 方法

2.1 不同剂量疫苗免疫试验 取 10 日龄 SPF 鸡 100 只随机分成 10 组, 每组 10 只鸡。编号 1~10 组。其中第 1~3 组免疫批号为 001 的鸡新城疫灭活标记疫苗, 免疫剂量依次为 10 μL 、20 μL 和 40 μL 每羽份, 第 4~6 组免疫批号为 002 的鸡新城疫灭活标记疫苗, 免疫剂量依次为 10 μL 、20 μL 和 40 μL 每羽份, 第 7~9 组免疫批号为 003 的鸡新城疫灭活标记疫苗, 免疫剂量依次为 10 μL 、20 μL 和 40 μL 每羽份, 第 10 组为空白对照。取 30 日龄 SPF 鸡 100 只, 免疫剂量和分组情况均与 10 日龄 SPF 鸡相同。

2.2 抗体水平测定 在鸡新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株) 接种当天和接种后 21 d, 分别采血, 分离血清。用 MG7 抗原检测免疫当天 ND 的 HI 抗体水平

及免疫后 21 d 的 ND HI 抗体水平, 求出几何平均值。

2.3 攻毒保护试验 采取与 1.2.1 同样的分组方法, 取 10 日龄 SPF 鸡 100 只随机分成 10 组, 每组 10 只鸡。编号 1-10 组。其中第 1-3 组免疫批号为 001 的鸡新城疫灭活标记疫苗, 免疫剂量依次为 10 μ L、20 μ L 和 40 μ L 每羽份, 第 4-6 组免疫批号为 002 的鸡新城疫灭活标记疫苗, 免疫剂量依次为 10 μ L、20 μ L 和 40 μ L 每羽份, 第 7-9 组免疫批号为 003 的鸡新城疫灭活标记疫苗, 免疫剂量依次为 10 μ L、20 μ L 和 40 μ L 每羽份, 第 10 组为空白对照。取 30 日龄 SPF 鸡 100 只, 免疫剂量和分组情况均与 10 日龄 SPF 鸡相同。免疫后 21 d, 免疫组和攻毒对照组注射 G7 强毒, 肌肉注射 0.5 mL 每羽

(含 10^5 ELD₅₀), 攻毒后观察有无新城疫临床症状, 观察 14 d, 测定雏鸡对新城疫强毒攻击的被动免疫保护效力。攻毒后 5 d 采集泄殖腔拭子接种 SPF 鸡胚进行病毒分离, 对病毒分离阴性的, 应在 SPF 鸡胚盲传一代后进行判定。

3 结果

3.1 抗体水平测定 10 日龄 SPF 鸡使用不同剂量免疫鸡新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株), 21 d 时进行 HI 抗体测定, 免疫试验结果显示 3 批次实验室试制的疫苗在 40 μ L 免疫组的 HI 抗体效价大于 6.5, 20 μ L 免疫组的 HI 抗体效价大于 6.2, 10 μ L 免疫组的 HI 抗体效价不高于 5.5, 结果表明 ND 灭活疫苗 HI 抗体效价与免疫剂量呈现正相关 (表 1)。

表 1 不同日龄 SPF 鸡免疫后 21 d HI 抗体效价 (log₂) ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 HI antibody titers (log₂) of SPF chickens at different ages on 21 dpi ($\bar{x} \pm s$)

鸡日龄	免疫剂量/ μ L	疫苗批号	HI 抗体	鸡日龄	免疫剂量/ μ L	疫苗批号	HI 抗体
10 日龄	10	001	4.8 \pm 0.54	30 日龄	10	001	5.0 \pm 0.33
		002	5.5 \pm 0.53			002	5.3 \pm 0.48
		003	5.1 \pm 0.39			003	5.6 \pm 0.5
	20	001	6.2 \pm 0.59		20	001	6.3 \pm 0.54
		002	6.4 \pm 0.39			002	6.4 \pm 0.39
		003	6.2 \pm 0.35			003	6.1 \pm 0.46
	40	001	6.5 \pm 0.41		40	001	6.5 \pm 0.33
		002	6.8 \pm 0.35			002	7.0 \pm 0.37
		003	6.6 \pm 0.39			003	6.8 \pm 0.54
空白对照	/	1 \pm 0.47	空白对照	/	1.1 \pm 0.32		

/空白对照组鸡全部健活

/Chickens of blank control group were all alive

3.2 攻毒保护试验 攻毒试验结果表明, 免疫剂量与 HI 抗体效价和抗攻毒保护效果呈正相关。20 μ L 免疫组即可有效抵御新城疫强毒 G7 株的攻击, 攻毒对照组 5 d 内全部死亡, 20 μ L 及以上免疫剂量组全部获得保护。攻毒后 5 d 采集泄殖腔拭子进行病毒分离, 40 μ L 免疫组均未分离到病毒; 20 μ L 免疫组有 1 只鸡可以分离到病毒; 10 μ L 免疫组有 3 只鸡可以分离到病毒 (表 2)。

标记疫苗 (MG7 株), 21 d 时进行 HI 抗体测定, ND 灭活疫苗 HI 抗体效价与免疫剂量呈现正相关, 3 批次实验室试制的疫苗在 40 μ L 免疫组的 HI 抗体效价均大于 6.5, 20 μ L 免疫组的 HI 抗体效价均大于 6.1, 10 μ L 免疫组的 HI 抗体效价不高于 5.6。攻毒试验结果表明, 免疫剂量与 HI 抗体效价和抗攻毒保护呈正相关。20 μ L 免疫组, 能有效抵御新城疫强毒 G7 株的攻击, 攻毒对照组 5 d 内全部死亡, 20 μ L 及以上免疫剂量组全部获得保护。攻毒后

30 日龄 SPF 鸡以不同剂量免疫鸡新城疫灭活

5 d 采集泄殖腔拭子进行病毒分离, 40 μL 免疫组均未分离到病毒; 20 μL 免疫组有 2 只鸡可以分离到病毒; 10 μL 免疫组有 2 只鸡可以分离到病毒 (表 2)。

上述结果表明, 10 日龄和 30 日龄 SPF 鸡, 在 20 μL 免疫剂量下, 接种后 21 d HI 抗体效价达到 6 以上, 利用新城疫基因 VII 型强毒 G7 株攻毒后, 可以获得 100% 保护, 病毒分离阳性率不高于 20%。

表 2 不同日龄 SPF 鸡攻毒保护试验

Tab 2 Challenge protection test of SPF chickens at different ages

鸡日龄	免疫剂量 / μL	疫苗批号	攻毒保护率 /%	病毒分离	鸡日龄	免疫剂量 / μL	疫苗批号	攻毒保护率 /%	病毒分离		
10 日龄	10	001	80	3/10	30 日龄	10	001	70	3/10		
		002	80	2/10			002	80	3/10		
		003	70	4/10			003	80	2/10		
	20	001	100	1/10		20	20	001	100	1/10	
		002	100	1/10				002	100	1/10	
		003	100	1/10				003	100	2/10	
	40	40	001	100		0/10	40	40	001	100	0/10
			002	100		0/10			002	100	0/10
			003	100		0/10			003	100	0/10
攻毒对照组		/	0	/-	攻毒对照组		/	0	/-		

/攻毒对照组在攻毒后 5 d 内全部死亡

/Chickens of the poison control group were all dead within 5 days after the attack

4 讨论

目前国内外使用的疫苗株 LaSota 为基因 II 型, 距今已有 70 多年的历史。NDV 持续进化过程中出现了多个基因型, 在临床使用中常发生疫苗株与流行毒株基因型不一致的情况, 这也是免疫鸡群中发生非典型 ND 的主要原因。使用与流行毒株相同基因型的疫苗株可有效预防 NDV 流行强毒株的感染^[5]。疫苗的好坏能直接影响免疫保护期的长短及免疫效果, 而疫苗里边抗原含量是疫苗质量的重要指标, 进入动物机体的抗原需要有一定的数量才能刺激机体产生免疫应答, 这个量的大小取决于抗原的抗原性强弱, 好的抗原少量即可刺激机体产生强烈的免疫反应, 产生高水平的免疫抗体, 提供良好的免疫保护。提高抗原量能增强免疫效力, 过量则引起免疫副反应也增加成本, 确定最小有效免疫剂量为疫苗使用给用户理论依据, 做到既确保免疫有效, 又不增加副反应和成本。

本研究利用不同日龄 (10 日龄和 30 日龄) 的 SPF 鸡进行了鸡新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株) 的最小有效免疫剂量研究, 结果表明, 疫苗免疫剂量与 HI 抗体效价和攻毒保护效果呈正相关。对于两种日龄的 SPF 鸡, 鸡新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株) 免疫 20 μL 及以上剂量时, HI 抗体效价均大于 6, 攻毒保护效率 100%。同期利用 LaSota 疫苗 (与 MG7 疫苗采用相同工艺制备) 20 μL 免疫组, 21 d 后的 HI 抗体效价 (利用 LaSota 抗原测定) 仅为 4~5 (待发表数据), 表明研制的 MG7 株疫苗可以诱导更高的 ND 抗体效价。

攻毒试验结果显示, 免疫剂量为 20 μL , 不同日龄鸡群均能抵抗流行的基因 VII 型强毒 G7 的攻击, 而对照组最终全部发病死亡, 显示出了该疫苗在控制我国新城疫的流行中具有广阔的应用前景。通过对鸡新城疫灭活标记疫苗 (MG7 株) 的最小有效免疫剂量研究, 我们在临床使用中可以更加科学合

理的使用免疫剂量,以确保疫苗安全有效。

参考文献:

- [1] 严维巍,王永坤,周继宏,等.一株鸡副粘病毒的分子特性研究[J].扬州大学学报(自然科学版),2000,3(1):27-31.

Yan W W, Wang Y K, Zhou J H, *et al.* Molecular characterization of an unassigned avian paramyxovirus isolate[J]. Journal of Yangzhou University (Natureal Science Edition), 2000, 3(1): 27-31.

- [2] 刘华雷,王永坤,严维巍,等.中国部分地区新城疫病毒的分子流行病学研究[J].扬州大学学报(自然科学版),2001,4(1):35-40.

Liu H L, Wang Y K, Yan W W, *et al.* The Investigation on the molecular epizootiology of Newcastle disease virus [J]. Journal of Yangzhou University (Natureal Science Edition), 2001, 4(1):

35-40.

- [3] Susta L, Miller P J, Afonso C L, *et al.* Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks[J]. Vet Pathol, 2011, 48: 349-360.

- [4] Liu B, Ji Y, Lin Z, Fu Y, *et al.* Two single amino acid substitutions in the intervening region of Newcastle disease virus HN protein attenuate viral replication and pathogenicity[J]. Scientific reports 2015, 5:13038.

- [5] Miller P J, King D J, Afonso C L, *et al.* Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge[J]. Vaccine, 2007, 25: 7238-7246.

(编辑:李文平)