

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.07.03

# 禽脑脊髓炎、鸡痘二联活疫苗安全性、 最小免疫剂量及免疫效力试验

王红<sup>1</sup>, 曹志<sup>1</sup>, 毛娅卿<sup>2</sup>, 吴涛<sup>2</sup>, 宋新宇<sup>1</sup>, 官晓<sup>1</sup>,  
张恒<sup>1</sup>, 马爽<sup>1</sup>, 李慧姣<sup>2</sup>, 范根成<sup>1\*</sup>

(1. 青岛易邦生物工程有限公司 动物基因工程疫苗国家重点实验室, 山东青岛 266114; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-10-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 07-0016-06 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为确定禽脑脊髓炎(AE)、鸡痘(AP)二联活疫苗的安全性、最小免疫剂量及免疫效力, 自制3批二联活疫苗进行研究。结果显示, 鸡接种10倍剂量疫苗后精神、食欲及发育均正常, 临床表现和剖检均无异常; AEV YBF02株的最小免疫剂量为100 EID<sub>50</sub>, 鸡痘鹌鹑化弱毒株的最小免疫剂量为10 EID<sub>50</sub>; 3批疫苗AEV YBF02株的病毒含量均 $\geq 10^{3.2}$  EID<sub>50</sub>/羽份, 鸡痘鹌鹑化弱毒株的病毒含量均 $\geq 10^{3.4}$  EID<sub>50</sub>/羽份, 攻毒后保护指数为89~100。试验表明, 自制二联活疫苗安全、有效、质量可控, 可用于预防禽脑脊髓炎和鸡痘。

**[关键词]** 禽脑脊髓炎; 鸡痘; 安全性; 最小免疫剂量; 免疫效力

## Safety, Minimum Immune Dose and Immune Efficacy Tests of the Combined Avian Encephalomyelitis and Avian Pox Live Vaccine

WANG Hong<sup>1</sup>, CAO Zhi<sup>1</sup>, MAO Ya-qing<sup>2</sup>, WU Tao<sup>2</sup>, SONG Xin-yu<sup>1</sup>, GONG Xiao<sup>1</sup>,  
ZHANG Heng<sup>1</sup>, MA Shuang<sup>1</sup>, LI Hui-jiao<sup>2</sup>, FAN Gen-cheng<sup>1\*</sup>

(1. Yebio Bioengineering Co., Ltd., State Key Laboratory of Animal Genetic Engineering Vaccine, Qingdao, Shandong, 266114, China;

2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: FAN Gen-cheng, E-mail: fgcheng@126.com

**Abstract:** The safety, minimum immune dose, virus content and challenge-protection tests were conducted with three batches of the combined Avian Encephalomyelitis (AE) and Avian Pox (AP) live vaccine. The results showed that the spirit, appetite and growth level of the chickens inoculated with tenfold-dose vaccine were the same as those in control post inoculation, there was not any abnormal signs during clinical and autopsy examination; the minimum immune dose of the AEV (Strain YBF02) and the APV (Strain Quail-Adapted) were respectively 100 EID<sub>50</sub> and 10 EID<sub>50</sub>; the virus content of the AEV (Strain YBF02) and APV (Strain Quail-Adapted) were respectively  $\geq 10^{3.2}$  EID<sub>50</sub>/bird and  $\geq 10^{3.4}$  EID<sub>50</sub>/bird; the protective index after challenging was 89~100.

**作者简介:** 王红, 兽医师, 从事禽用疫苗研究和检验工作。

**通讯作者:** 范根成。E-mail: fgcheng@126.com

These results demonstrated that the safe, stable and effective vaccine is able to prevent poultry against AE and AP.

**Key words:** avian encephalomyelitis; avian pox; safety; minimum immune dose; immune efficacy

禽脑脊髓炎 (Avian Encephalomyelitis, AE) 又称流行性震颤, 是由禽脑脊髓炎病毒 (AEV) 引起的一种主要危害 4 周龄以下雏鸡, 以侵害中枢神经系统引起非化脓性脑炎为主要病理特征的病毒性传染病<sup>[1-3]</sup>。种鸡群发病期间及发病前后各 1 个月内所产种蛋, 导致孵化率降低并引起子代雏鸡带毒发病<sup>[4-5]</sup>。该病现已遍布世界各地, 在我国流行日趋严重, 但尚无有效的治疗药物, 预防主要依靠疫苗免疫<sup>[6]</sup>, 疫苗主要有弱毒活疫苗和灭活疫苗两种<sup>[7-8]</sup>。目前, 国内无活疫苗, 只有灭活疫苗, 但生产厂家未生产和供应, 且 2007 年停止了进口苗注册, 故市场上急需疫苗免疫, 禽脑脊髓炎相关疫苗的研发非常必要。

鸡痘 (Avian Pox, AP) 是由鸡痘病毒引起鸡和火鸡的一种疾病, 特征是体表无羽毛部位出现散在的、结节状的增生性皮肤病灶 (皮肤型), 或上呼吸道、口腔和食管黏膜出现纤维性坏死和增生性病灶 (白喉型), 也可能同时发生全身性感染<sup>[9-10]</sup>。世界各地已广泛流行, 目前国内只有鸡痘活疫苗产品用于预防。

鉴于禽脑脊髓炎、鸡痘活疫苗的免疫日龄相似, 免疫途径一致, 且国外已有同类产品注册上市, 试验利用有自主知识产权的种毒禽脑脊髓炎 YBF02 株和鸡痘鹌鹑化弱毒株研制成活疫苗, 并进一步对该疫苗的安全性、最小免疫剂量和免疫效力进行了研究, 以期为该疫苗生产和检验技术参数的制定提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 疫苗 用禽脑脊髓炎 YBF02 株和鸡痘鹌鹑化弱毒株毒种, 自制 3 批禽脑脊髓炎、鸡痘二联活疫苗 (以下简称“疫苗”), 批号分别为 2012001、2012002、2012003。

1.1.2 攻毒用强毒 禽脑脊髓炎强毒 VR 株、鸡痘

强毒 102 株, 均由中国兽医药品监察所冻干鉴定。

1.1.3 SPF 鸡胚、鸡 SPF 种蛋 购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司, 部分孵化至 6 日龄 (SPF 鸡胚) 用于实验, 部分孵化至出壳 (SPF 鸡), 饲养于负压隔离器内。

### 1.2 方法

1.2.1 疫苗的安全性试验 将 40 只 21 日龄 SPF 鸡随机分为 4 组, 10 只/组, 用于 2012001、2012002、2012003 批疫苗进行安全性试验。将各批次疫苗均按瓶签注明羽份用灭菌 PBS 适当稀释后, 经刺种途径接种 SPF 鸡, 10 羽份/只 (10 倍使用剂量)。最后 10 只不接种作为空白对照。接种后 28 d 内观察所有鸡的精神、食欲、生长发育是否正常, 28 d 时进行称重, 并剖检观察有无病理变化。

#### 1.2.2 疫苗最小免疫剂量测定

1.2.2.1 AEV YBF02 株的最小免疫剂量 取 40 只 21 日龄 SPF 鸡随机分为 4 组, 每组 10 只。1~3 组, 分别刺种 25 EID<sub>50</sub>、50 EID<sub>50</sub>、100 EID<sub>50</sub> 的 AEV YBF02 株; 第 4 组不免疫作对照。免疫后 21 d, 4 组试验鸡每只脑内注射 AE 强毒 VR 株 0.1 mL (含 10<sup>4.0</sup> EID<sub>50</sub>/只)。攻毒后连续观察 21 d, 记录各组发病情况, 计算保护率, 确定 AEV YBF02 株的最小免疫剂量。

1.2.2.2 鸡痘鹌鹑化弱毒株的最小免疫剂量 取 40 只 21 日龄 SPF 鸡随机分为 4 组, 每组 10 只。1~3 组, 分别刺种 5 EID<sub>50</sub>、10 EID<sub>50</sub>、20 EID<sub>50</sub> 的鸡痘鹌鹑化弱毒株; 第 4 组不免疫作对照。免疫后观察 6 d, 统计各组痘肿率; 免疫后 21 d, 4 组试验鸡每只腿部毛囊涂抹鸡痘强毒 102 株 (含 100 个最小发痘量)。攻毒后连续观察 14 d, 记录各组病变情况, 计算保护率, 确定鸡痘鹌鹑化弱毒株的最小免疫剂量。

#### 1.2.2.3 判定标准

1.2.2.3.1 禽脑脊髓炎雏鸡临床症状 以下症状出现任何一项均判为发病。(1) 精神沉郁、反应迟钝、

缩脖;(2)喜卧,驱赶时共济失调,偶尔见头颈部出现不同程度的震颤;(3)站立困难,斜坐在跗部;(4)瘫痪或死亡。

1.2.2.3.2 鸡痘临床病变表现 涂抹毛囊开始红肿、增厚,后变黄白色干酪样物,结血痂等融合全经过型。

1.2.3 疫苗的免疫效力试验

1.2.3.1 病毒含量测定

1.2.3.1.1 AEV 含量测定 将疫苗用灭菌 PBS 稀释至 1 羽份/0.2 mL,取 5 mL 在 2~8 ℃ 条件下以 12000 g 离心 15 min;上清液经 0.22 μm 滤器过滤 1 次,0.10 μm 滤器过滤 2 次;取滤液再继续作 10 倍系列稀释,取 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 3 个稀释度,分别卵黄囊接种 10 枚 6 日龄 SPF 鸡胚各 10 枚,每胚 0.2 mL,另取 10 枚同批次 SPF 鸡胚不接种作对照。37 ℃ 孵育(48 h 内死亡者弃去不计)至正常出雏日的 3 d 后,统计其未出壳胚数、特异性死亡雏数及有禽脑脊髓炎特异性临床症状的雏鸡数,计算 EID<sub>50</sub>。对照组应至少 8 枚正常出雏,且均无禽脑脊髓炎的特异性临床症状。

1.2.3.1.2 APV 含量测定 将疫苗用灭菌 PBS 稀释至 1 羽份/0.2 mL,再继续作 10 倍系列稀释,取 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 3 个稀释度,经绒毛尿囊膜分别接种 11~12 日龄 SPF 鸡胚 5 枚,每胚 0.2 mL,置 37℃ 孵育 96~120 h 时,鸡胚绒毛尿囊膜水肿增厚或出现痘斑判为感染,计算 EID<sub>50</sub>。

1.2.3.2 攻毒保护试验 将 3 批疫苗分别用灭菌 PBS 适当稀释后,每批疫苗各免疫 21~35 日龄 SPF 鸡 20 只,每只于翅内侧无血管处皮下刺种疫苗 1 羽份,另取 20 只 SPF 鸡不免疫作对照,分别隔离饲养。

1.2.3.2.1 疫苗对 AEV 的免疫效力评价 免疫后 21 d,免疫组和对照组各随机取 10 只鸡,每只脑内注射禽脑脊髓炎强毒 VR 株 0.1 mL(含 10<sup>4.0</sup> EID<sub>50</sub>),观察 21 d,观察期间未出现“1.2.2.3.1”判定标准中禽脑脊髓炎雏鸡临床症状的判为免疫保护,计算免疫组保护指数(protective index, PI)。免疫组 PI 计算方法为攻毒对照组鸡产生病变百分数减去免疫组鸡产生病变百分数,再除以攻毒对照组鸡产生病变百分数,乘以 100;攻毒对照鸡的保护率不计算。

1.2.3.2.2 疫苗对 APV 的免疫效力评价 免疫后 21 d,免疫组和对照组各随机取 10 只,每只鸡各腿部毛囊涂抹鸡痘强毒 102 株 0.1 mL(含 100 个最小发痘量),观察 14 d,观察期间未出现“1.2.2.3.2”判定标准中鸡痘临床病变表现的判为免疫保护,计算免疫组 PI。

2 结果与分析

2.1 疫苗的安全性 所有试验鸡均未发生禽脑脊髓炎、鸡痘,刺种部位均出现痘肿(鸡痘免疫成功的标志),精神食欲、生长发育均正常;各免疫组与对照组的体重无明显差异;剖检所有试验鸡脏器均未见异常(表 1)。

表 1 疫苗的安全性试验结果

Tab 1 Safety of the combined AE and AP live vaccine

| 组别 | 批号      | 鸡数/只 | 接种剂量<br>/(羽份·只 <sup>-1</sup> ) | 观察结果           |                 |          |          |
|----|---------|------|--------------------------------|----------------|-----------------|----------|----------|
|    |         |      |                                | 精神、采食、<br>生长发育 | 免后 28 d<br>体重/g | 临床<br>症状 | 剖检<br>病变 |
| 1  | 2012001 | 10   | 10                             | 10/10 均正常      | 523.2~534.5     | 无        | 无        |
| 2  | 2012002 | 10   | 10                             | 10/10 均正常      | 519.6~530.9     | 无        | 无        |
| 3  | 2012003 | 10   | 10                             | 10/10 均正常      | 520.5~536.3     | 无        | 无        |
| 4  | 对照组     | 10   | 不免疫                            | 10/10 均正常      | 516.1~532.5     | 无        | 无        |

2.2 疫苗的最小免疫剂量 结果见表 2、表 3。从表 2 可知,AEV YBF02 株以 100 EID<sub>50</sub> 刺种免疫 21 日龄 SPF 鸡后,攻毒保护率为 100%;对照组 90% 发病。从表 3 可知,鸡痘鹌鹑化弱毒株以 10 EID<sub>50</sub> 和 5 EID<sub>50</sub> 分别刺种免疫 21 日龄 SPF 鸡后,痘肿率分别为 10/10 和 7/10;攻毒保护率分别为 100% 和

70%;对照组 100% 鸡痘病变。以上试验结果说明,AEV YBF02 株免疫 100 EID<sub>50</sub> 即能达到 100% 保护,鸡痘鹌鹑化弱毒株免疫 10 EID<sub>50</sub> 即能达到 100% 保护。所以 AEV YBF02 株的最小免疫剂量为 100 EID<sub>50</sub>,鸡痘鹌鹑化弱毒株的最小免疫剂量为 10 EID<sub>50</sub>。

表 2 疫苗 AEV YBF02 株最小免疫剂量

Tab 2 The minimum immune dose of the AEV (YBF02 Strain) of the vaccine

| 组别  | 免疫剂量                  | 攻毒途径及剂量                                                            | 攻毒保护率/% |
|-----|-----------------------|--------------------------------------------------------------------|---------|
| 免疫组 | 100 EID <sub>50</sub> | 脑内注射 AE 强毒 VR 株 0.1 mL<br>(含 10 <sup>4.0</sup> EID <sub>50</sub> ) | 100     |
|     | 50 EID <sub>50</sub>  |                                                                    | 80      |
|     | 25 EID <sub>50</sub>  |                                                                    | 40      |
| 对照组 | 不免疫                   |                                                                    | 9/10 发病 |

表 3 疫苗鸡痘鹌鹑化弱毒株最小免疫剂量

Tab 3 The minimum immune dose of the APV (Quail-Adapted Strain) of the vaccine

| 组别  | 免疫剂量                 | 痘肿率   | 攻毒途径及剂量                               | 攻毒保护率/%  |
|-----|----------------------|-------|---------------------------------------|----------|
| 免疫组 | 20 EID <sub>50</sub> | 10/10 | 腿部毛囊涂抹鸡痘强毒 102 株 0.1 mL(含 100 个最小发痘量) | 100      |
|     | 10 EID <sub>50</sub> | 10/10 |                                       | 100      |
|     | 5 EID <sub>50</sub>  | 7/10  |                                       | 70       |
| 对照组 | 不免疫                  | 0/10  |                                       | 10/10 病变 |

2.3 疫苗的免疫效力

2.3.1 病毒含量测定 由表 4 可知,各批疫苗中 AEV YBF02 株病毒含量均≥10<sup>3.2</sup> EID<sub>50</sub>/羽份,鸡痘鹌鹑化弱毒株的病毒含量均≥10<sup>3.4</sup> EID<sub>50</sub>/羽份。

2.3.2 疫苗攻毒保护试验结果 由表 5 可知,3 批

疫苗各刺种免疫 21~35 日龄 SPF 鸡,免疫后 21 d 进行攻毒;脑内攻击 AE 强毒 VR 株的免疫组 PI 为 89~100,空白对照组 80%~90% 发病;腿部毛囊涂抹鸡痘强毒 102 株的免疫组 PI 均为 100,空白对照组 100% 鸡痘病变。

表 4 疫苗病毒含量测定结果

Tab 4 The virus content of the combined live vaccine

| 疫苗批号    | AEV 含量                                 | APV 含量                                 |
|---------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| 2012001 | 10 <sup>3.2</sup> EID <sub>50</sub> /羽 | 10 <sup>3.5</sup> EID <sub>50</sub> /羽 |
| 2012002 | 10 <sup>3.3</sup> EID <sub>50</sub> /羽 | 10 <sup>3.5</sup> EID <sub>50</sub> /羽 |
| 2012003 | 10 <sup>3.2</sup> EID <sub>50</sub> /羽 | 10 <sup>3.4</sup> EID <sub>50</sub> /羽 |

表 5 疫苗免疫攻毒试验结果

Tab 5 The result of the tested chickens challenged with AEV VR strain and APV 102 strain

| 疫苗批号    | 免疫鸡日龄 | PI(AE)  | PI(AP)   |
|---------|-------|---------|----------|
| 2012001 | 21    | 100     | 100      |
| 2012002 | 21    | 89      | 100      |
| 2012003 | 35    | 100     | 100      |
| 对照组     | 21    | 9/10 发病 | 10/10 病变 |
|         | 35    | 8/10 发病 | 10/10 病变 |

3 讨论与结论

AEV YBF02 株是自行分离鉴定的一株具有高度免疫原性和嗜肠型的疫苗毒株,仅对 1 日龄 SPF 鸡大剂量刺种可引起约 10%发病,并可通过粪便排毒,对疫苗的安全性产生影响<sup>[11]</sup>。本试验中疫苗的安全性试验结果表明,疫苗对 21 日龄 SPF 鸡通过刺种途径接种 10 倍使用剂量是安全的。此外,有研究表明,21 日龄及以上鸡免疫系统发育已经健全,免疫功能正常时,能够很快产生免疫应答,攻毒保护试验结果证明了这一点。且该日龄段鸡较易获得,饲养成本也相对较低,同时对禽脑脊髓炎和鸡痘均易感。因此,建议在实际疫苗检验时采用 21~35 日龄作为疫苗的检验用 SPF 鸡日龄。

由疫苗的最小免疫剂量和病毒含量测定结果可知,3 批疫苗 AEV YBF02 株的病毒含量为最小免疫剂量的 15 倍以上,鸡痘鹌鹑化弱毒株的病毒含量为最小免疫剂量的 250 倍以上,所以疫苗中的病毒含量应能保证免疫鸡产生足够的免疫效力。

APV 不同剂量免疫后鸡痘痘肿率和攻毒保护结果显示,免疫 10 EID<sub>50</sub> 达到 10/10 的痘肿率和 10/10 攻毒保护率;免疫 5 EID<sub>50</sub> 达到 7/10 痘肿率和 7/10 攻毒保护率。上述结果说明,疫苗免疫后鸡痘痘肿率和攻毒保护具有很好的相关性。考虑到生物安全和检验工作方便,可以用鸡痘痘肿法替代免疫攻毒法进行鸡痘鹌鹑化弱毒株的效力检验。

疫苗攻毒保护试验中 2012002 批疫苗 AE 免疫组,攻毒后 10 只鸡中有 1 只发病,免疫保护 9/10。虽然试验理论接种剂量为 1 羽份/只,超过最小免疫剂量多倍,但是整个免疫攻毒保护试验过程中,

可能会受到鸡个体差异、进入鸡体内有效免疫剂量、强毒株的有效攻毒剂量和试验操作等因素的影响,导致免疫组中个别鸡没有达到理想的免疫效果。这种现象在试验中是可能存在的,此试验数据将会为制定疫苗效力检验判定标准提供依据。

参考文献:

[1] 塞夫(Y.M.Saif)[美]. 禽病学[M].(第十二版). 中国农业出版社,2012.  
Saif Y M. Diseases of poultry[M]. The 12th edition . China Agriculture Press , 2012.

[2] 王纯洁,马学恩,赵振华. 禽脑脊髓炎研究进展[J]. 动物医学进展,2003,24(2):45-48.  
Wang C J, Ma X E, Zhao Z H. Research development of avian encephalomyelitis[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(2):45-48.

[3] 张淑霞,杨增歧,季芳,等. 禽脑脊髓炎病毒感染雏鸡的病理组织学观察[J]. 中国兽医杂志,2009,45(11):26-28.  
Zhang S X, Yang Z Q, Ji F, et al. Histopathological observation of chicken infected with avian encephalomyelitis virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2009, 45(11):26-28.

[4] 张淑霞,杨增歧,李金钧,等. 禽脑脊髓炎的调查及病毒分离[J]. 中国兽医学报,2000,20(6):551-553.  
Zhang S X, Yang Z Q, Li J J, et al. Investigation and virus isolation of avian encephalomyelitis[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2000, 20(6):551-553.

[5] Calnek B W. Control of avian encephalomyelitis; A historical account[J]. Avian Dis, 1998, 42(4):632-647.

[6] 焦铁军,李河林,张浩,等. 禽脑脊髓炎冻干活疫苗安全性、最小免疫剂量及免疫效力试验[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(12):25-28.  
Jiao T J, Li H L, Zhang H, et al. Safety and minimum immune dose and immune potency tests of avian encephalomyelitis live

vaccines[ J ]. Journal of Northwest Sci - Tech University of Agriculture and Forestry ( Natural Science Edition ), 2006, 34( 12 ):25-28.

[ 7 ] Calnek B W, Taylor P J, Sevoian M. Studies on avian encephalomyelitis. V. Development and application of an oral vaccine[ J ]. Avian Dis, 1961, 5:297-312.

[ 8 ] 秦卓明, 何叶峰, 刘 伟, 等. 禽脑脊髓炎的研究进展和控制对策[ J ]. 中国禽业导刊, 2002, 19( 1 ):18-20.

Qin Z M, He Y F, Liu W, *et al.* Research progress and control strategy of avian encephalomyelitis[ J ]. Guide to Chinese Poultry, 2002, 19( 1 ):18-20.

[ 9 ] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[ M ]. 北京: 科学出版社, 1997.

Yin Z, Liu J H. Animal virology[ M ]. Beijing: Science Press, 1997.

[ 10 ] Srinivasan V, Schnitzlein W M, Tripathy D N. A consideration of previously uncharacterized fowl poxvirus unidirectional and bidirectional late promoters for inclusion in homologous recombinant vaccines[ J ]. Avian Dis, 2003, 47( 2 ): 286-295.

[ 11 ] 李凯善. 禽脑脊髓炎病毒 YBF02 毒株的毒力测定与种子批建立[ D ]. 西北农林科技大学, 2012.

Li K S. Avian Encephalomyelitis virus strain virulence YBF02 determination to establish the seed lots[ D ]. Northwest Agriculture and Forestry University, 2012.

( 编 辑:李文平 )