

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.04.04

水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株, 悬浮培养)临床安全性和免疫效力评价

冯二凯^{1,2}, 易立¹, 陈立志^{1,2}, 张淼², 罗国良¹, 郭利¹,
王振军¹, 程世鹏¹, 任飞², 程悦宁^{1*}

(1. 中国农业科学院特产研究所, 长春 130112; 2. 吉林特研生物技术有限责任公司, 长春 130122)

[收稿日期] 2019-12-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 04-0024-06 [中图分类号] S859.797

[摘要] 为评价水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株, 悬浮培养)冻干制剂在临床应用中的安全性和免疫效果, 分别在吉林、辽宁两省选择饲养规模相似的 3 个毛皮兽场进行疫苗安全性(10 头份)和免疫效力实验(1 头份)研究, 接种后观察动物的临床症状, 检测抗体水平并随机选择部分水貂进行攻毒试验。结果显示, 超剂量接种水貂未见有明显的临床症状, 对水貂的生产性能无明显影响; 水貂免疫疫苗后 21 d 即可获得达到免疫保护的抗体水平; 免疫 180 d 仍能维持较高水平的抗体, 且能够保护动物抵抗强毒攻击。试验表明, 水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株, 悬浮培养)冻干制剂具有较好的临床保护效果。

[关键词] 水貂; 犬瘟热; 活疫苗; 悬浮培养; 临床试用

Clinical Safety and Immune Efficacy Evaluation of Mink Canine Distemper Virus Attenuated Live Vaccine (CDV₃-CL strain, Suspension) in Field Trial

FENG Er-kai^{1,2}, YI Li¹, CHEN Li-zhi^{1,2}, ZHANG Miao², LUO Guo-liang¹, GUO Li¹,
WANG Zhen-jun¹, CHENG Shi-peng¹, REN Fei², CHENG Yue-ning^{1*}

(1. Institution of Special Animal and Plant Science of Chinese Academy of Agriculture Science, Changchun 130112, China;

2. Jiling Teyan Biotechnology Co., Ltd, Changchun 130122, China)

Corresponding author: CHENG Yue-ning, E-mail: 89331641@qq.com

Abstract: Clinical safety (10 dose) and immune efficacy (1 dose) evaluation of the mink canine distemper attenuated live vaccine (CDV₃-CL strain, suspension) have been conducted in 3 fur animal farms (one in Liaoning province, two were in Jilin provinces), respectively. During the whole period of the clinical safety

基金项目: 吉林省“双十项目”重大科技攻关(20150201006NY); 吉林省科技发展计划(20150204073NY)

作者简介: 冯二凯, 博士研究生, 从事毛皮动物疫苗新型制备工艺开发研究。

通讯作者: 程悦宁。E-mail: 89331641@qq.com

trials, all vaccinated animals were clinically normal as non-immunized controls. At the onset of immune efficacy tests, animals were vaccinated with one dose of newly prepared vaccine, and sera were collected on 7, 14, 21, 60, 120 and 180 days post immunization (dpi) for test CDV serum neutralizing antibody (SN). The results showed that the SN could be detected as early as 7 dpi and it could reach to a high level ($\geq 1:64$) at 21 dpi, which enough to protect mink from a challenge of 100 ID₅₀ virulent CDV-LNM strain. The period of immunity duration is over 180 d. The above results demonstrated that this vaccine could be widely used in practice.

Key words: mink; canine distemper virus; live vaccine; suspension; filed trail

水貂犬瘟热是由副黏病毒科、麻疹病毒属的犬瘟热病毒(Canine distemper virus, CDV)感染水貂引起的一种急性、高度接触性、高死亡率的传染病^[1-2], Rudolf 在 1928 年首次报道了该病,我国首例水貂犬瘟热发生于 1968 年^[3],以后逐渐蔓延至全国,给我国乃至全世界的水貂养殖者或农场主造成了严重经济损失。

水貂犬瘟热没有有效治疗药物,疫苗免疫是预防和控制该病的最有效手段。中国农业科学院特产研究所研制的水貂犬瘟热鸡胚成纤维细胞活疫苗和水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗,为预防和控制我国毛皮动物犬瘟热的爆发和流行,减少广大毛皮动物养殖户经济损失等方面奠定了基础^[4-5]。

然而,目前常见的水貂犬瘟热疫苗都是基于传统转瓶工艺生产,需要添加高浓度血清,具有生产成本高、产量有限、生产周期长等缺点,无法满足不断扩大的毛皮动物病毒类疫苗的市场需求;其次,在病毒类疫苗市场竞争越来越激烈的背景下,越来越多的企业开始注重自身疫苗悬浮培养平台的建立,提升疫苗质量、降低疫苗生产成本,提升本企业疫苗的市场竞争力^[6-8]。此外,根据《新兽药研制管理办法》2005 版中关于新兽药研制的要求,疫苗需要开展临床研究,以验证疫苗在临床应用中的安全性和有效性。

因此,本研究在前期水貂犬瘟热 Vero 细胞活

疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)冻干制剂的安全检验、性状检验、无菌检验、效力检验等均合格的基础上^[9-10],分别在吉林、辽宁两省进行了犬瘟热 Vero 活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)冻干制剂的临床安全性和免疫效力评价。

1 材料与方法

1.1 试用疫苗 3 批犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)冻干制剂,批号:201701、201702、201703,由吉林特研生物技术有限公司试制。

1.2 试验试剂 Vero 细胞(CCL-81),购自美国国家菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC);新生牛血清(批号:20160405),由内蒙古金源康生物提供;DMEM(批号:1693945),由美国 Gibco 公司提供;CDV 强毒株(LNM 株),由中国农业科学院特产研究所分离鉴定、保存;犬瘟热病毒阳性血清,血清中和抗体(Serum neutralizing antibody, SN) $\geq 1:256$,中国农业科学院特产研究所制备和保存。

1.3 试验场所及动物 选择饲养规模相近的 3 个毛皮兽养殖场(吉林省 2 个,辽宁省 1 个)作为疫苗试用场所;选择美国短毛黑水貂,2~4 月龄,未接种任何疫苗,经犬瘟热病毒抗体检测,其血清中和抗体 SN $\leq 1:4$,作为疫苗接种对象;接种方式为后肢内侧肌肉注射;各试验场使用试验动物数量、性别统计结果见表 1。

表 1 疫苗临床试用毛皮兽场及试验动物情况一览表

Tab 1 The list of fur farms and animals that used to evaluate the vaccine

试验动物	性别	临床试用地点以及水貂接种数量/只			
		吉林某毛皮兽场 1	辽宁某毛皮兽场	吉林某毛皮兽场 2	
		201701	201702	201701	201703
育成水貂	公	400	500	200	600
	母	400	500	300	400
总计		800	1000	1500	

1.4 疫苗安全性试验 将 3 批疫苗分别接种 2~4 月龄育成水貂,10 头份/只,分 4 点注射;每个试验点 100 只水貂,接种后每天观察水貂的精神、食欲、粪便的变化,连续观察 14 d,记录结果。

1.5 疫苗效力试验 将 3 批疫苗分别接种 2~4 月龄育成水貂,1 头份/只;免疫 21 d 后每组随机选择水貂 20 只,采血、分离血清、测定抗体,记录结果;免疫 180 d 后,从每个实验组随机选水貂 20 只,采血分离血清测定血清抗体;用 100 个 ID₅₀ 的 CDV 强毒(CDV-LNM 株)对 3 批疫苗免疫组(5 只/批)和对照组水貂(3 只)进行攻毒,观察动物是否出现典型犬瘟热临床症状,统计动物死亡和存活数,持

续 15 d,记录结果。

1.6 疫苗抗体监测 3 批疫苗分别接种 2~4 月龄育成水貂,1 mL/只;分别在接种 7 d、14 d、21 d、60 d、120 d、180 d 分别随机选水貂各 10 只进行采血,分离血清,测定血清中和抗体,记录结果。

2 结果与分析

2.1 犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)试制和性状检验结果 基于前期建立的犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)制备工艺,试制 3 批疫苗,疫苗试制数量、疫苗性状检测结果见表 2。

表 2 犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)中间试制及检验结果

Tab 2 Pilot scale production and inspection of the mink canine distemper attenuated live vaccine

检验项目	疫苗批号		
	201701	201702	201703
生产量/头份	3000	4500	4500
物理性状检验	呈微黄白色海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,稀释后为乳黄色液体		
无菌检验	无细菌、霉菌	无细菌、霉菌	无细菌、霉菌
支原体检验	无支原体	无支原体	无支原体
外源病毒检验	无外源病毒	无外源病毒	无外源病毒
鉴别检验	合格	合格	合格
病毒含量	10 ^{3.90}	10 ^{3.88}	10 ^{3.90}
安全性检验	正常	正常	正常
水分测定	合格	合格	合格
真空度测定	合格	合格	合格

2.2 疫苗安全性试验结果 3 批疫苗在 3 个毛皮兽场分别超剂量皮下接种(后肢内侧肌肉)2~4 月龄育成水貂,观察 14 d,接种水貂食欲、精神状态正

常,接种局部无肿胀和炎症,未出现局部和全身反应,说明疫苗对水貂具有较好的安全性。结果见表 3。

表 3 犬瘟热活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)安全性试验结果

Tab 3 The security test recor of the mink canine distemper attenuated live vaccine (CDV ₃ -CL strain, Suspension)					
试验场	试验动物	组别	精神或食欲变化	生长性能	发病和死亡数/只
吉林某毛皮兽场 1	育成水貂	201701	无明显变化	良好	0
		对照	无明显变化	良好	0
辽宁某毛皮兽场	育成水貂	201702	无明显变化	良好	0
		对照	无明显变化	良好	0
吉林某毛皮兽场 2	育成水貂	201701	无明显变化	良好	0
		201703	无明显变化	良好	0
		对照	无明显变化	良好	0

2.3 犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)效力试验结果 由表 4 及表 5 可知,犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)接种水貂 21 d 后,血清中 SN 抗体效价均在 1:64 以上,对

照组 SN 抗体在 1:4 以下;疫苗接种水貂 180 d,免疫水貂血清 SN 抗体均在 1:81 以上;用 100 个 ID₅₀ 的 CDV 强毒(CDV-LNM 株)攻击,免疫组水貂获得 100% 保护,对照组均发病。

表 4 犬瘟热活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)免疫水貂 21d 效力试验结果

Tab 4 The 21 d immune efficacy result of mink canine distemper attenuated live vaccine CDV ₃ -CL strain, Suspension)					
试验动物	组别	试验动物数/只	21 d SN 效价	攻毒保护率	
				发病数/只	保护率/%
育成水貂	201701	5	1:76~1:181	0/5	100
	201702	5	1:64~1:181	0/5	100
	201703	5	1:81~1:181	0/5	100
	对照	5	0~1:4	3/3	0

表 5 犬瘟热活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮培养)免疫水貂 180 d 效力试验结果

Tab 5 The 180 d immune efficacy result of mink canine distemper attenuated live vaccine (CDV ₃ -CL strain, Suspension)					
试验动物	组别	试验动物数/只	180 d SN 效价	攻毒保护率	
				发病数/只	保护率/%
育成水貂	201701	5	1:91~1:181	0/5	100
	201702	5	1:81~1:181	0/5	100
	201703	5	1:101~1:181	0/5	100
	对照	5	0~1:4	3/3	0

2.4 不同批次疫苗免疫水貂抗体监测结果 由表 6 可知,犬瘟热 Vero 细胞活疫苗(CDV₃-CL 株,悬浮)接种水貂,7 d 抗体开始产生,部分水貂 14 d 即

可达到免疫保护水平;21 d 水貂的中和抗体均在免疫保护水平之上;疫苗免疫 180 d,仍保持较高的抗体滴度。

表 6 犬瘟热 Vero 细胞活疫苗 (CDV₃ - CL 株, 悬浮培养) 免疫水貂 SN 抗体持续时间测定结果

Tab 6 The duration period of serum neutralizing antibody of different batch of mink canine distemper acttenuated live vaccine (CDV₃ - CL strain, Suspension)

疫苗批号	动物种类	血清 SN 抗体效价					
		7 d	14 d	21d	60 d	120 d	180 d
201701	水貂	1:4 ~ 1:22	1:64 ~ 1:91	1:76 ~ 1:181	1:91 ~ 1:181	1:102 ~ 1:181	1:91 ~ 1:181
201702	水貂	1:4 ~ 1:16	1:55 ~ 1:91	1:64 ~ 1:181	1:81 ~ 1:181	1:101 ~ 1:181	1:81 ~ 1:181
201703	水貂	1:4 ~ 1:22	1:56 ~ 1:102	1:81 ~ 1:181	1:101 ~ 1:181	1:102 ~ 1:181	1:81 ~ 1:181

3 讨论与结论

根据《新兽药研制管理办法》2005 版中关于新兽药研制的要求,本研究按照水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗 (CDV₃ - CL 株, 悬浮培养) 制造与检验试行规程 (草案) 中试生产了 3 批疫苗, 并选择吉林省、辽宁省 3 个饲养规模相近的毛皮兽场开展疫苗临床试用, 评价疫苗的临床试用效果。

生物制品的安全性是养殖业健康发展的前提条件。本研究通过后肢内侧肌肉注射途径, 将超剂量疫苗接种试验场水貂, 接种后水貂在观察期 (14 d) 内无全身和局部异常反应, 且无死亡和发病病例出现, 说明疫苗具有较好的安全性; 此外, 接种水貂的食欲和精神均正常, 且对动物的生产性能无影响, 进一步说明疫苗的安全性, 可以用于临床疾病防治。

疫苗的效力, 尤其是疫苗的临床效力, 是养殖业健康发展的关键。本研究通过将试制的 3 批水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗接种生产中的水貂, 考察疫苗的临床免疫效果。疫苗免疫后 7 d 即可检测抗体; 14 d 时, 部分动物的抗体水平即可达到免疫保护水平; 21 d 即可获得坚强的免疫力, 且犬瘟热病毒中和抗体水平均在临界保护值 1:64 以上; 免疫 180 d 血清中的犬瘟热病毒中和抗体仍然在临界值之上。动物攻毒实验也证实, 免疫水貂能够抵抗 100 ID₅₀ CDV 强毒的攻击, 获得 100% 保护。

本研究制备的犬瘟热 Vero 细胞活疫苗 (CDV₃ - CL 株, 悬浮培养) 在免疫接种水貂 21d 后, 可以产生具有免疫保护水平的抗体, 且可持续 180 d 以上, 可用于水貂犬瘟热的临床预防使用。

参考文献:

[1] 苏凤艳. 水貂 CDV 的分离鉴定及其主要基因的克隆与免疫研究[D]. 吉林: 吉林农业大学, 2007.

Su F Y. Study on isolation, identification, major gene cloning and immunity of mink canine distemper virus [D]. Jilin: Jilin Agriculture University, 2007.

[2] 陈美荣, 林伟东, 宋天琪, 等. 犬瘟热病毒 BJ16B2 株的分离鉴定及 H 基因遗传进化分析[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(8): 82 - 89.

Cheng M L, Lin W D, Song T Q, *et al.* Isolation and identification of the canine distemper virus BJ16B2 strain and the genetic variability analysis of its H gene [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine. 2018. 50 (8): 82 - 89.

[3] 钱国成, 郭焯久, 王 斌, 等. 水貂犬瘟热弱毒鸡胚细胞活疫苗试验报告[J]. 中国兽医杂志, 1981, (8): 7 - 10.

Qian G C, Guo C J, Wang B, *et al.* Experiment report on mink canine distemper virus attenuated live vaccine (chicken embryo fibroblast) [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1981, (8): 7 - 10.

[4] 周 莉, 吴亨进, 浦同灿, 等. 犬瘟热疫苗研究进展[J]. 贵州畜牧兽医, 2014, 38(3): 21 - 23.

Zhou L, Wu H J, Pu T C, *et al.* Progress on Canine Distemper Vaccine [J]. Guizhou Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 38(3): 21 - 23.

[5] 冯二凯, 冷 雪, 程世鹏, 等. 大规模细胞培养技术及其在兽用疫苗生产中的应用[C] // 中国毛皮动物科学研究进展 - 2014 年全国毛皮动物专业学术研讨会论文集. 吉林: 吉林科学技术出版社, 2014: 177 - 180.

Feng E K, Leng X, Cheng S P, *et al.* Large - scale animal cell culture technology and its application in the field of veterinary vaccines production[C] // Progress in Chinese fur animal science research - Proceedings of the 2014 National Fur Animals Academic Symposium. Jilin: Jilin Science and Technology Publishing House, 2014: 177 - 180.

[6] 严石, 黄文强, 刘兆环, 等. 悬浮培养技术在兽用疫苗领域的应用[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(3): 76 – 79.

Yan S, Huang W Q, Liu Z H, *et al.* Application of suspension culture technology in the field of veterinary vaccines[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(8): 15 – 22.

[7] 梁武. 猪圆环病毒 2 型悬浮培养技术及冻干灭活疫苗研究[D]. 中国农业大学, 2016.

Liang W. Studies on the suspension culture technique and lyophilized inactivated vaccine of porcine circovirus type 2[D]. China Agricultural University, 2016.

[8] 冯二凯, 易立, 罗国良, 等. 水貂犬瘟热 Vero 细胞活疫苗 (CDV₃ – CL 株, 悬浮培养) 安全性评价[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(8): 15 – 22.

Feng E K, Yi L, Luo G L, *et al.* Safety Evaluation of newly prepared attenuated canine distemper live vaccine (CDV₃ – CL strain, suspension) [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(8): 15 – 22.

[9] 冯二凯, 程悦宁, 罗国良, 等. 生物反应器悬浮培养 Vero 细胞制备水貂犬瘟热活疫苗[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(6): 41 – 47.

Feng E K, Cheng Y L, Luo G L, *et al.* Suspension culture of Vero cells in bioreactor for preparation of mink canine distemper attenuated live vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, 53(6): 41 – 47.

(编辑:李文平)