

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.10.04

鸽新城疫 rGX - mF 株灭活疫苗的制备及免疫原性分析

涂敏¹, 赵蕾¹, 史爱华¹, 沈佳¹, 习硕¹, 张建伟¹, 彭湃², 王海良³, 章振华^{1*}, 靳换^{1*}

(1. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097; 2. 北京翎羽生物科技有限公司, 北京 101302;

3. 北京市兽药饲料检测中心, 北京 102200。)

[收稿日期] 2023-07-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 10-0025-08 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为有效控制临床中鸽新城疫的发生, 选取基因 VI 型鸽新城疫病毒弱毒株 rGX - mF 作为疫苗候选株, 评价其生物学特性, 并将 rGX - mF 灭活后制备成油佐剂灭活疫苗, 接种雏鸽和 SPF 鸡进行 rGX - mF 株的免疫原性分析, 为研制安全高效的鸽新城疫灭活疫苗奠定基础。结果表明, rGX - mF 株能够在鸡胚中稳定传代, 效价高, 毒力弱; rGX - mF 株灭活疫苗接种雏鸽后疫苗吸收良好, 无局部和全身不良反应, 安全性好, 免疫持续期长达 12 个月; rGX - mF 株灭活疫苗与 LaSota 株灭活疫苗相比, rGX - mF 株灭活疫苗在鸽体内能产生更高水平的抗体; rGX - mF 株灭活疫苗同时免疫 SPF 鸡和雏鸽, SPF 鸡产生的抗体显著高于鸽产生的抗体, 这可能与鸽和鸡的免疫系统存在差异有关。综上, 利用基因 VI 型鸽新城疫病毒弱毒 rGX - mF 株制备的灭活疫苗可在鸽体内产生有效的抗体, 免疫效果好, 免疫持续期长。

[关键词] 基因 VI 型, 鸽新城疫, 灭活疫苗, 免疫原, 抗体

Preparation and Immunogenicity Analysis of Inactivated Vaccine of Pigeon Newcastle Disease rGX - mF Strain

TU Min¹, ZHAO Lei¹, SHI Ai - hua¹, SHEN Jia¹, XI Shuo¹, ZHANG Jian - wei¹,

PENG Pai², WANG Hai - liang³, ZHANG Zhen - hua^{1*}, JIN Huan^{1*}

1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences.

2. Beijing Lingyu Biotechnology Co., Ltd. 3. Beijing Veterinary Medicine and Feed Monitoring Center.

Abstract: The attenuated strain rGX - mF of gene VI type pigeon newcastle disease virus was selected as a vaccine candidate, and its biological characteristics were evaluated. Pigeons and SPF chickens were inoculated to analyze

基金项目: 北京市农林科学院青年基金 (QNJJ202111); 北京市农林科学院创新能力建设 (KJCX20230424); 国家自然科学基金青年基金 (32202793); 北京市农林科学院畜牧兽医研究所改革与发展 (XMS202313)。

作者简介: 涂敏, 动物医学专业, 从事禽用生物制品研究。

通讯作者: 靳换, E - mail: jinhuan0717@126.com; 章振华, E - mail: 13401014936@163.com。

the immunogenicity of rGX - mF strain. The rGX - mF strain was inactivated, and an oil adjuvant inactivated vaccine was prepared, which was used to control the occurrence of pigeon newcastle disease. These will laying the foundation for the development of a safe and efficient pigeon newcastle disease inactivated vaccine. The results showed that the rGX - mF strain can be stably passaged in chicken embryos with high potency and weak toxicity; The rGX - mF inactivated vaccine is well absorbed in pigeons after inoculation. The immunity period of the vaccine is up to 12 months; When compared with the La Sota strain, the rGX - mF strain induces higher levels of antibodies in pigeons; The SPF chickens and pigeons were immunized with rGX - mF inactivated vaccine at the same time, and the antibody level of SPF chickens was significantly higher than that of pigeons, which is related to the differences of immune systems between pigeons and chickens. In summary, the rGX - mF inactivated vaccine, an attenuated strain of gene VI type pigeon newcastle disease virus, can produce effective antibodies in pigeons.

Key words: Gene VI type, Pigeon Newcastle Disease, Inactivated Vaccine, Immunogen, Antibody

鸽 I 型副黏病毒 (Pigeon paramyxovirus type I, PPMV - I), 又称鸽新城疫病毒, 其引起的临床症状与鸡新城疫相似, 常见肠炎、下痢和神经症状, 尤以嗜神经速发型多见^[1]。各年龄段鸽均易感染, 发病率可达 80%, 死亡率可达 50% 以上。

新城疫在世界范围内呈地方流行, 因此世界各国对该疫病的发生和流行均高度重视^[2]。虽然世界各国充分认识到了新城疫的危害, 促进了新城疫疫苗的研发和开发, 免疫预防策略得到高度重视, 但是赛鸽、观赏鸽和肉鸽等作为新城疫强毒的潜在来源则被忽视。正因为如此, 鸽子作为媒介在短时间里把新城疫病毒传播到世界各国, 造成了大流行, 此次流行主要归咎于赛鸽。1981 年到 1984 年, PPMV - I 通过赛鸽迅速传遍整个欧洲^[3,4]。美国第一例 PPMV - I 是 1984 年在纽约分离得到的, 随后 1990 ~ 1998 年间, 美国国家兽医局先后在东海岸地区、加利福尼亚州和德克萨斯州等地, 从鸽群中分离到 PPMV - I, 分离到的这些毒株基本都属于基因 VIb 亚型。2001 年到 2009 年间, Pchelkina 等人对从俄罗斯分离得到的 77 株 PPMV - I 进行测序分析, 发现这些毒株都属于基因 VI 型^[5]。我国最早于 1985 年和 1986 年在深圳和珠海的进口鸽中分离到 PPMV - I, 随后我国多个省市出现鸽新城疫的报道。我国目前鸽群中主要流行的毒株为基因 VIb 亚型, 该基因型对鸽有明显的宿主特异性, 在系统进化树上形成了一个独立的分支^[6-7]。

到目前为止, 除了主要的新城疫基因 VII 型流行株外, 其他基因型的毒株依然存在^[8,9]。尤其是对鸽有明显宿主特异性的 VI 型毒株, 由于疫苗和其他生物制品的缺失, 以及随着我国养鸽业的迅速发展和在发展过程中凸显出来的不平衡因素导致鸽新城疫给养鸽业造成了不可估量的经济损失。

到目前为止, 疫苗的免疫接种是防治新城疫最有效的手段, 其不仅可以减轻发病和死亡的经济损失, 而且还可以降低强毒感染后的排毒量。目前常规的新城疫疫苗主要是弱毒疫苗和灭活疫苗, 包括 I 系疫苗 (Mukteswar 株)^[10]、II 系疫苗 (Hitchner B1)^[11,12]、III 系疫苗 (F 株)^[13]、IV 系疫苗 (Lasota 株与 Clone30 株)^[14,15] 和 V4 疫苗株^[16], 由于市场上的这些疫苗主要是为防控鸡新城疫而开发的, 虽然在实际应用中能 为 鸽 提 供 一 定 的 免 疫 保 护, 但 是 效 果 不 佳, 经 常 出 现 免 疫 过 的 鸽 场 散 发 鸽 新 城 疫 的 现 象。其主要原因是由于疫苗毒株与流行毒株之间存在抗原差异。PPMV - I 为基因 VI 型, 在系统进化树上形成了一个独立的分支^[17,18], 而疫苗株主要属于基因 I、II 和 III 等基因型, 其与基因 VI 型的鸽新城疫病毒遗传关系较远, 存在明显的抗原差异性; 另外, 交叉血凝抑制试验和交叉中和实验表明 PPMV - I 与常用的疫苗 Lasota 株和强毒株之间存在显著的抗原差异^[19], 表明了基因 VI 型的鸽新城疫病毒抗原发生了变异。用于疫苗免疫的毒株与流行毒株基因型越接近, 则保护效果越好, 群体带

毒和排毒量越低^[20]。因此,研发与目前流行毒株匹配的基因Ⅵ型新城疫疫苗将有利于我国鸽新城疫的防控,对保障鸽养殖业的健康发展具有重要的意义。本研究利用基因Ⅵ新城疫致弱毒株 rGX - mF 制备灭活疫苗,评价该疫苗的免疫效果,为鸽新城疫的防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 鸽新城疫病毒弱毒 rGX - mF 株和鸡新城疫病毒弱毒株 La Sota 株均为本实验室保存。

1.1.2 实验动物 10 日龄 SPF 鸡胚,3 周龄和 6 周龄 SPF 雏鸡购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司;1 日龄雏鸡:SPF 种蛋购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司,在本实验室孵化出雏;1 月龄~2 月龄鸽新城疫病毒抗体阴性鸽,购自某鸽厂。

1.2 方法

1.2.1 种毒的传代增殖及无菌检验 将 rGX - mF 株第一代种毒 E1 原液用灭菌生理盐水按照 1:10000 倍进行稀释,经尿囊腔接种于 10 日龄 SPF 鸡胚,0.1 mL/胚。接种后 24 h 内死胚弃去,收获 24 h~120 h 死胚及 120 h 活胚,测定 HA 效价,收获 HA 效价为 2^{10} 以上的尿囊液, -80 °C 保存备用。按此方法将种毒连续传 6 代,命名为 E1~E6。每代次种毒测定 HA 效价、鸡胚半数感染量 (EID_{50}) 以及进行无菌检验。

1.2.2 种毒的遗传稳定性 参考引物 F:5' - GT-CAGTTTACCTGCCTAT - 3', R:5' - CTCCGAC-CGTTCTAC - 3',扩增插入的 La Sota F 基因序列。提取 E1~E6 各代次种毒的病毒基因组 RNA,利用随机引物对 RNA 进行反转录,随后进行 PCR 扩增试验,对扩增得到的目的片段进行测序鉴定。

1.2.3 种毒毒力的测定 根据世界动物卫生组织 (WOAH) 推荐的判定标准,通过测定种毒的鸡胚最小致死量的平均死亡时间 (MDT)、1 日龄雏鸡脑内接种致病指数 (ICPI) 以及 6 周龄鸡静脉接种致病指数 (IVPI) 来判定 rGX - mF 种毒毒力的强弱。

1.2.4 灭活疫苗的制备 rGX - mF 株毒种用灭菌

生理盐水稀释按照 1:10000 倍,接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每胚接 0.1 mL,置 37 °C 继续孵育。将接种后 24 h 内死胚弃去,24 h~120 h 死胚及 120 h 活胚及时收取尿囊液,将 HA 效价为 2^9 及以上的样品混合。测定混合后样本的 HA 效价为 2^{10} ,病毒滴度为 $10^{9.3} EID_{50}/0.1 mL$ 。将测定好效价的病毒液导入灭活瓶内,加入终浓度为 0.1% 的甲醛溶液使其充分混合,置摇床 160 转/min,37 °C 灭活 24 h。灭活后的病毒原液按常规方法制备油佐剂灭活疫苗。用同样的方法制备 La Sota 株灭活疫苗。

1.2.5 灭活疫苗的安全性试验 将制备的 rGX - mF 株灭活疫苗免疫 1~2 月龄非免疫鸽 10 只,每只肌肉注射疫苗 0.4 mL,同时设对照 5 只,在相同的条件下饲养,连续观察 14 日,记录试验鸽采食、饮水及精神状态。观察疫苗接种后局部和全身不良反应情况。

1.2.6 抗体产生时间及免疫持续期 将 15 只鸽新城疫抗体阴性的雏鸽分为 2 组,免疫组 10 只,对照组 5 只。将 rGX - mF 株灭活疫苗经胸部肌肉注射免疫,0.2 mL/只,分别于免疫后第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、16、20、24、28、32、36、40、44、48 和 52 周对两组鸽子进行翅静脉采血分离血清,检测抗体水平,结果以 log₂ 表示,确定免疫后抗体产生的规律及持续期。

1.2.7 rGX - mF 株与 La Sota 株灭活疫苗免疫原性的对比试验 将 20 只 1~2 月龄鸽新城疫抗体阴性的雏鸽随机分为 2 组,rGX - mF 株组和 La Sota 株组,每组 10 只。将 rGX - mF 株灭活疫苗和 La Sota 株灭活疫苗分别经胸部肌肉注射免疫,0.2 mL/只,分别于免疫后第 21 和 28 天对两组鸽子进行翅静脉采血分离血清,检测抗体水平,结果以 log₂ 表示,对比分析两种疫苗产生抗体的差异。

1.2.8 rGX - mF 株灭活疫苗对不同宿主免疫原性的对比试验 分别取 10 只 3 周龄 SPF 鸡作为鸡免疫组,取 10 只 1~2 月龄鸽新城疫抗体阴性的雏鸽作为鸽免疫组。将 rGX - mF 株灭活疫苗经胸部肌肉注射免疫,0.2 mL/只,分别注射鸡免疫组和鸽免疫组,于免疫后第 7、14、21 和 28 天对两组实验动物进行翅静脉采血分离血清,检测抗体水平,结果

以 log2 表示,对比分析 rGX - mF 株灭活疫苗在不同宿主中产生抗体水平的差异。

2 结果与分析

2.1 种毒的传代增殖及无菌检验 rGX - mF 株毒种经 SPF 鸡胚连续传代后,各个代次种毒的 HA 效价在 1:1024 ~ 1:2048 之间,毒价均在 10^{8.7} EID₅₀/0.1 mL 以上,无菌检验合格,结果见表 1。以上结果表明 rGX - mF 株病毒能在 SPF 鸡胚中维持较高且稳定的毒价。

表 1 rGX - mF 株 E1 ~ E6 代毒种无菌、支原体检验及病毒含量测定结果

Tab 1 The sterility test, mycoplasma test and virus titer of E1 ~ E6 generation viruses of rGX - mF strain				
毒种代次	无菌检验	支原体检验	HA	EID ₅₀ /0.1 mL
E1	-	-	2 ¹⁰	10 ^{9.3}
E2	-	-	2 ¹¹	10 ^{8.9}
E3	-	-	2 ¹¹	10 ^{9.3}
E4	-	-	2 ¹¹	10 ^{8.9}
E5	-	-	2 ¹⁰	10 ^{9.1}
E6	-	-	2 ¹⁰	10 ^{8.7}

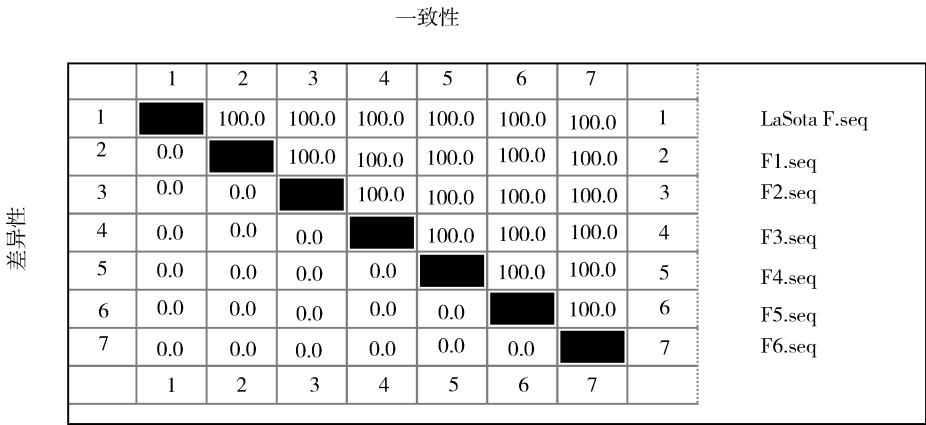


图 1 rGX - mF 株 E1 - E6 代 F 基因核苷酸序列比对

Fig 1 Comparison of the nucleotide sequence of the F gene in the rGX - mF strain E1 - E6

2.2 种毒的遗传稳定性 将 E1 ~ E6 代种毒的 F 基因进行测序,对序列进行比对分析,结果见图 1。结果表明,F 基因序列中的核苷酸未发生任何突变或缺失,rGX - mF 株种毒能够在 SPF 鸡胚中连续稳定的传代。

2.3 种毒毒力的测定 用于评价新城疫毒力的方法有 MDT、ICPI 及 IVPI。取 1 日龄 SPF 雏鸡 10 只,鸡只经脑内接种 rGX - mF 株 E5 代种毒后,观察的 8 天,10 只雏鸡全部正常,计算 ICPI 为 0,结果见表 2。

用灭菌生理盐水将收获新鲜的含毒尿囊液做 10 倍系列稀释从 10⁻¹至 10⁻⁹共 9 个稀释度,分别接种 10 日龄 SPF 鸡胚,上午 8 点每个稀释度接种 5 个鸡胚,每胚尿囊腔内注射 0.1 mL,标记为 A 组。接种后剩余的病毒稀释液放 4 ℃ 保存,下午 5 点每个稀释度分别再接种剩余的 5 个鸡胚,标记为 B

组。接种后,每天分别于上午 8 点和下午 5 点,对 A 组和 B 组鸡胚分别各照蛋一次,记录每一鸡胚的死亡时间,并测定每胚 HA 效价,7 天后,将所有活胚冷却,测定每胚 HA 效价。A 组和 B 组接种的鸡胚全部死亡的最高稀释度即为最小致死量,计算最小致死量的平均死亡时间。结果表明,120 h 以内每个稀释度的鸡胚均没有全部死亡,因此判定结果为 MDT ≥ 120 h,结果见表 3A 和表 3B。

表 2 rGX - mF 株对 1 日龄 SPF 雏鸡的脑内致病指数 (ICPI)

Tab 2 Intracerebral pathogenicity index (ICPI) of rGX - mF strain in 1 - day - old SPF chicks											
状态	1 天	3 天	4 天	5 天	6 天	7 天	8 天	总和	权值	总分	
正常	10	10	10	10	10	10	10	80	0	0	
发病	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
死亡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
总和	10	10	10	10	10	10	10	80		0	

取 6 周龄 SPF 雏鸡 10 只,用 1 mL 一次性注射器各静脉注射 10^{-1} 稀释的新鲜 rGX - mF 株 E5 代毒种 0.1 mL。另取 5 只以同样方法注射稀释病毒用的生理盐水各 0.1 mL。接种后,每天在相应接种的时间观察、记录雏鸡情况,包括正常、发

病、瘫痪或出现其他神经症状和死亡。观察 10 天,计算分数,正常为 0,发病为 1,瘫痪或出现神经症状为 2,死亡为 3。IVPI 是指每只鸡 10 天内所有每次观察数值的平均值,计算 $IVPI = 0$,结果见表 4。

表 3 A rGX - mF 株对鸡胚最小致死量的平均死亡时间(MDT/MLD)

Tab 3 A The mean time to death (MDT/MLD) of minimum lethal dose of rGX - mF strain on chicken embryos									
A 组									
稀释度	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
接种胚数	5	5	5	5	5	5	5	5	5
死亡胚数	2	1	4	3	3	2	2	0	0
活胚数	3	4	1	2	2	3	3	5	5
死亡时间	79 ~ 120 h	103 h	79 ~ 168 h	96 ~ 144 h	96 ~ 168 h	72 ~ 96 h	144 ~ 149 h		
HA	$\geq 2^8$	$\geq 2^9$	$\geq 2^9$	$\geq 2^9$	$\geq 2^{10}$	$\geq 2^9$	$\geq 2^{10}$	$\geq 2^{10}$	$\geq 2^{10}$

表 3 B rGX - mF 株对鸡胚最小致死量的平均死亡时间(MDT/MLD)

Tab 3 B The mean time to death (MDT/MLD) of minimum lethal dose of rGX - mF strain on chicken embryos									
B 组									
稀释度	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
接种胚数	5	5	5	5	5	5	5	5	5
死亡胚数	2	4	2	3	2	4	1	0	3
活胚数	3	1	3	2	3	1	4	5	2
死亡时间	17 ~ 161 h	65 ~ 113 h	137 ~ 166 h	96 ~ 161 h	113 h	113 ~ 119 h	113 h		113 ~ 142 h
HA	$\geq 2^3$	$\geq 2^8$	$\geq 2^{10}$	$\geq 2^{10}$	$\geq 2^8$	$\geq 2^{10}$	$\geq 2^{10}$	$\geq 2^9$	$\geq 2^{11}$

表 4 rGX - mF 株对 6 周龄 SPF 雏鸡的静脉致病指数 (IVPI)

Tab 4 Intravenous pathogenicity index (IVPI) of rGX - mF strain in 6 - weeks - old SPF chicks											
状态	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天	6 天	7 天	8 天	总和	权值	总分
正常	10	10	10	10	10	10	10	10	80	0	0
发病	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
神经症状	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
死亡	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
总和	10	10	10	10	10	10	10	10	80		0

测定 rGX - mF 毒株的 MDT, ICPI 和 IVPI。结果显示, $MDT \geq 120$ h, $ICPI = 0$, $IVPI = 0$, 参照 OIE 的判定标准^[21]得出 rGX - mF 株为弱毒。需要指出的是三个指标有时不一定一致,一种指数往往难以确定毒力的强弱,此时应结合 3 种指数综合判定,特别应注重 ICPI 值的大小^[22]。

2.4 灭活疫苗的制备 按常规方法制备 rGX - mF 株油佐剂灭活疫苗,油水比为 2:1。经检验, rGX - mF 株灭活疫苗性状如下:为乳白色均匀乳剂; W/O 型,将疫苗滴入水中除第一滴外,均呈滴状不扩散;

黏度为 74.10 cP;稳定性,吸取 10 mL 疫苗, 3500 转/min,离心 15 min,管底无水相析出;无菌检验合格。

2.5 灭活疫苗的安全性试验 与对照组鸽相比,免疫组鸽采食和饮水正常,精神状态良好,注射部位疫苗吸收良好、无结块和肿胀等炎性反应,注射疫苗未对雏鸽产生不良影响。

2.6 抗体产生时间及免疫持续期 免疫后第 1 ~ 52 周采集免疫组和对照组鸽翅静脉血,分离血清,进行血凝抑制试验,检测血清中抗体水平,确定免疫后抗体产生的规律及持续期。结果显示,免疫组

在免疫后至 52 周监测期结束均可产生一定效价的抗体,对照组无抗体(图 3)。rGX - mF 株灭活疫苗免疫组在免疫后第 7、8 周免疫鸽的抗体水平达到

最高,HI 抗体滴度几何平均值为 8.8 log₂,且其在免疫后第 52 周还可以产生较高的抗体水平,HI 抗体滴度几何平均值为 5.6 log₂(图 2)。

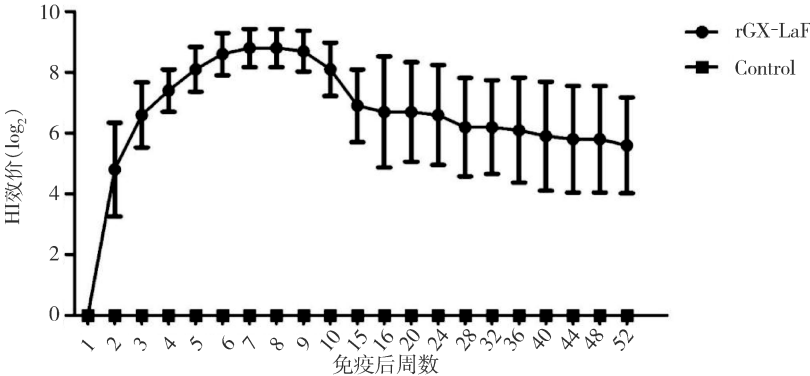


图 2 rGX - mF 株灭活疫苗抗体的产生期和持续期

Fig 2 The antibody production and duration of rGX - mF inactivated vaccine

2.7 rGX - mF 株灭活疫苗与 La Sota 株灭活疫苗的对比试验 测定 rGX - mF 株疫苗免疫组和 La Sota 株疫苗免疫组血清中的抗体水平,对比分析两种疫苗产生抗体的差异。结果显示,两组免疫组免疫 21 和 28 天后均可产生一定效价的抗体,rGX - mF 株灭活疫苗免疫组的抗体效价明显高于 La Sota 株灭活疫苗免疫组,并且差异显著(图 3)。

2.8 rGX - mF 株灭活疫苗对不同宿主免疫原性的对比试验

检测 rGX - mF 株灭活疫苗在鸡免疫组和鸽免疫组血清中的抗体水平,对比分析 rGX - mF 株灭活疫苗在不同宿主中产生抗体水平的差异。结果显示免疫后 7、14、21 和 28 天,SPF 鸡产生的抗体水平显著高于鸽(图 4)。

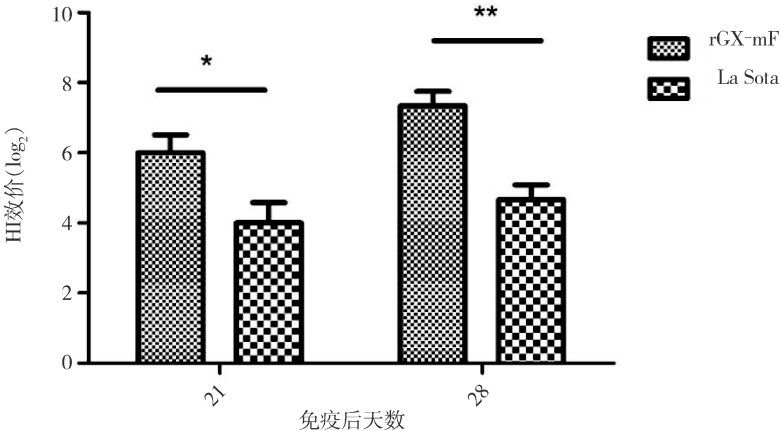


图 3 rGX - mF 株 La Sota 株灭活疫苗免疫鸽产生抗体的差异

Fig 3 Difference of antibody production in pigeons immunized with rGX - mF strain and La Sota strain Inactivated vaccine

3 讨论

基因 VI 型鸽新城疫病毒在世界范围内的鸽群中广泛流行,给养鸽业造成了严重的经济损失。我国目前对鸽新城疫的防控主要是以疫苗免疫为主,但是用于鸽免疫的疫苗株都是鸡源新城疫疫苗,对鸽不能产生有效的免疫保护。研发与目前流行毒株基因型一致的鸽新城疫疫苗,可以有效的控制鸽

新城疫的病程,为鸽群提供良好的免疫保护,降低鸽新城疫的防控成本。基因 VI 型鸽新城疫病毒有明显的宿主特异性,主要感染鸽^[23,24]。因此,本研究利用基因 VI 型鸽新城疫病毒弱毒株 rGX - mF 制备灭活疫苗,评估其免疫原性,为鸽新城疫灭活疫苗的研发奠定基础。

WOAH 规定禁止使用新城疫病毒强毒株制备新

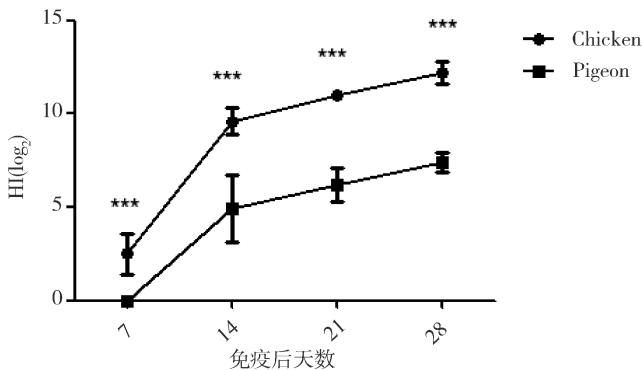


图 4 rGX - mF 株灭活疫苗免疫鸽和鸡产生抗体的差异

Fig 4 Difference of antibody production between pigeons and chickens immunized with rGX - mF strain Inactivated vaccine

城疫疫苗,本研究首先测定 rGX - mF 株的毒力,结果显示 rGX - mF 株的 MDT 大于 120 h, ICPI = 0, IVPI = 0。依据 WOA H 的判定标准, rGX - mF 株为弱毒株。将 rGX - mF 株在 SPF 鸡胚上连续传代,各个代次种毒的 HA 效价在 1:1024 ~ 1:2048 之间,毒价均在 10^{8.7} EID₅₀/0.1 mL 以上。将各个代次病毒的 F 基因进行测序,结果显示 F 基因序列中的核苷酸未发生任何突变或缺失,表明 rGX - mF 株在 SPF 鸡胚中具有稳定的遗传能力。以上研究结果表明, rGX - mF 株具有毒力弱,繁殖能力高和遗传稳定性好的特点。

本研究将 rGX - mF 株制备成油佐剂灭活疫苗,对该疫苗的免疫原性进行评价。使用制备合格的 rGX - mF 灭活疫苗,免疫 1 ~ 2 月龄雏鸽,免疫后鸽采食和饮水正常,精神状态良好,注射部位疫苗吸收良好、无结块和肿胀等炎性反应,表明疫苗注射未对雏鸽产生不良影响,无其他副作用。随后对疫苗免疫后的抗体产生规律和水平进行了研究,发现免疫后第 2 周开始产生抗体,抗体滴度为 4.8 log₂,第 4 周抗体滴度达到 7.4 log₂,第 7、8 周抗体水平达到高峰,平均值为 8.8 log₂,且其在免疫后第 52 周还可以产生较高水平的抗体,平均滴度为 5.6 log₂。表明制备的油佐剂疫苗能在短时间内产生较高滴度的抗体,并且抗体滴度在 5.6 log₂ 以上至少可以维持 12 个月。参考叶贺佳^[25]等制定的标准,本研究制备的 rGX - mF 株灭活疫苗免疫鸽后可以产生良好的免疫效果。

与鸡新城疫灭活疫苗 (La Sota 株) 进行对比,发现 rGX - mF 株灭活疫苗在鸽体内能够产生更高

水平的抗体。张俊平^[26]等研究表明在免疫保护实验中鸽新城疫疫苗的保护效果明显优于鸡新城疫疫苗,表明本研究制备的 rGX - mF 株灭活疫苗更适宜于鸽群中流行的基因 VI 型鸽新城疫病毒的防控。另外,本研究还对比了 rGX - mF 株灭活疫苗在不同靶动物体内产生抗体水平的差异,结果表明鸡体内的抗体水平显著高于鸽体内的抗体水平,这可能与鸡和鸽的免疫系统差异有关。

综上所述, rGX - mF 株具有毒力弱,繁殖能力高,遗传稳定性和免疫原性好的特点,可以作为鸽新城疫疫苗候选株,为临床中鸽新城疫的防控提供保障。

参考文献:

[1] Alexander D J, Russell P H, Parsons G, *et al.* Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons - - an international collaborative study [J]. *Avian Pathology*, 1985, 14(3):365 - 376.

[2] Ganar K, Das M, Sinha S, *et al.* Newcastle disease virus: Current status and our understanding [J]. *Virus Research*, 2014, 184:71 - 81.

[3] Aldous E W, Fuller C M, Ridgeon J H, *et al.* The Evolution of Pigeon Paramyxovirus Type 1 (PPMV - 1) in Great Britain: A Molecular Epidemiological Study[J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2014, 61(2):134 - 9.

[4] Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, *et al.* Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII) [J]. *Archives of Virology*, 1998, 143(1):49 - 64.

[5] Pchelkina I P, Manin T B, Kolosov S N, *et al.* Characteristics of

- pigeon paramyxovirus serotype - 1 isolates (PPMV - 1) from the Russian Federation from 2001 to 2009 [J]. Avian Diseases, 2013, 57(1):2 - 7.
- [6] Awu A, Shao M Y, Liu M M, *et al.* Characterization of two pigeon paramyxovirus type 1 isolates in China [J]. Avian Pathology, 2015, 44(3):204 - 211.
- [7] Guo H, Liu X, Han Z, *et al.* Phylogenetic analysis and comparison of eight strains of pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV - 1) isolated in China between 2010 and 2012 [J]. Archives of Virology, 2013, 158(6):1121 - 31.
- [8] Liu M M, Cheng J L, Yu X H, *et al.* Generation by reverse genetics of an effective attenuated Newcastle disease virus vaccine based on a prevalent highly virulent Chinese strain [J]. Biotechnology Letters, 2015 Jun;37(6):1287 - 96.
- [9] Zhang Y Y, Shao M Y, Yu X H, *et al.* Molecular characterization of chicken - derived genotype VIIId Newcastle disease virus isolates in China during 2005 - 2012 reveals a new length in hemagglutinin - neuraminidase [J]. Infection Genetics & Evolution, 2014, 21:359 - 366.
- [10] Rehmani S F, Firdous S. Passive immunity in chicks from a laying flock vaccinated with the Mukteswar strain of Newcastle disease virus [J]. Preventive Veterinary Medicine, 1995, 23(1 - 2):111 - 118.
- [11] Czeglédi, Alíz, Wehmann E, Lomniczi B. On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts33 [J]. Avian Pathology, 2003, 32(3):271 - 276.
- [12] Russell P H, Ezeifeka G O. The Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus induces high levels of IgA, IgG and IgM in newly hatched chicks [J]. Vaccine, 1995, 13(1):61.
- [13] Desingu P A, Singh S D, Dhama K, *et al.* Phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates occurring in India during 1989 - 2013 [J]. Virus disease, 2016, 27(2):203 - 6.
- [14] Ingrid, Cornax, Patti, *et al.* Characterization of Live LaSota Vaccine Strain - Induced Protection in Chickens upon Early Challenge with a Virulent Newcastle Disease Virus of Heterologous Genotype [J]. Avian Diseases Digest, 2012, 56(3):464 - 70.
- [15] Wehmann E, Herczeg J, Ballagi - Pordány A, *et al.* Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B - 1 by restriction site analysis of their matrix gene [J]. Vaccine, 1997, 15(12 - 13):1430 - 1433.
- [16] Ren X, Zeng Z, Shang Y, *et al.* C - terminal truncation of the hemagglutinin - neuraminidase (HN) protein enhances the virulence and immunogenicity of Newcastle disease virus (NDV) vaccine strain V4 [J]. Archives of Virology, 2023, 168(8):203.
- [17] Miller P J, Decanini E L, Afonso C L. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges [J]. Infection Genetics & Evolution, 2010, 10(1):26 - 35.
- [18] Abolnik C, Gerders G H, Kitching J, *et al.* Characterization of pigeon paramyxoviruses (Newcastle disease virus) isolated in South Africa from 2001 to 2006 [J]. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2008, 75(2):147.
- [19] Dortmans JC, Koch G, Rottier PJ, Peeters BP. A comparative infection study of pigeon and avian paramyxovirus type 1 viruses in pigeons: evaluation of clinical signs, virus shedding and seroconversion [J]. Avian Pathology, 2011, 40(2):125 - 30.
- [20] Hu S, Ma H, Wu Y, *et al.* A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics [J]. Vaccine, 2009, 27(6):904 - 910.
- [21] OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) 5th Edn. Volumes 1 & 2. World Organization for Animal Health 2004. ISBN 92 9044 622 6.
- [22] 靳继惠. HN 蛋白的来源和长度对新城疫病毒生物学特性的影响[D]. 中国农业大学, 2017.
- Jin J H. The influence of the source and length of HN protein on the biological characteristics of Newcastle disease virus [D]. China agricultural university, 2017.
- [23] Zhang Y, Wang W, Li Y, *et al.* A pigeon paramyxovirus type 1 isolated from racing pigeon as an inactivated vaccine candidate provides effective protection [J]. Poultry Science, 2022, 101(10):102097.
- [24] Yu X, Luo Y, Wang J, *et al.* A molecular, epidemiological and pathogenicity analysis of pigeon paramyxovirus type 1 viruses isolated from live bird markets in China in 2014 - 2021 [J]. Virus Research, 2022, 318:198846.
- [25] 叶贺佳, 仇微红, 李敏, 等. 鸽新城疫灭活疫苗的研制及免疫效果研究[J]. 中国家禽, 2012, 34(16):5.
- Ye J H, Qiu W H, Li M, *et al.* Development of inactivated vaccine of pigeon newcastle disease and its immune effect [J]. Chinese poultry, 2012, 34(16):5.
- [26] 张俊平, 杨惠萍, 邹勇, 等. 鸽副黏病毒 I 型灭活疫苗(S - 1 株)与鸡新城疫灭活疫苗对比试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2009(4):1.
- Zhang J P, Yang H P, Zhou Y, *et al.* Comparative test between inactivated vaccine of pigeon paramyxovirus type I (S - 1 strain) and inactivated vaccine of newcastle disease [J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2009(4):1.