

鸭病毒性肝炎二价灭活疫苗 (DHAV-SH 和 DHAV-FS 株) 的制备和评价

银凤桂^{1,2}, 李晶², 张爽², 余萌², 张万林³, 范国兵³, 董秀凯⁴, 刘文军^{1,2}

1 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

2 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 北京信得威特科技有限公司, 北京 102600

4 大连锦绣生物工程有限公司, 辽宁 大连 116450

银凤桂, 李晶, 张爽, 等. 鸭病毒性肝炎二价灭活疫苗 (DHAV-SH 和 DHAV-FS 株) 的制备和评价. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1579–1588.

Yin FG, Li J, Zhang S, et al. Development and evaluation of an inactivated bivalent vaccine against duck viral hepatitis. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1579–1588.

摘要: 我国鸭甲型肝炎病毒 (DHAV) 的快速变异及广泛流行给养鸭业造成了较大的经济损失, 为研究鸭病毒性肝炎二价灭活疫苗 (DHAV-SH 和 DHAV-FS 株) 的制备和评价方法, 首先对我国多个鸭场进行血清型流行病学分析, 从 201 株 DHAV-1、38 株 DHAV-3 中筛选出 6 株毒力较强的 DHAV, 验证了 DHAV-1 和 DHAV-3 为我国流行优势株, 并对 6 株 DHAV 进行 ELD₅₀ 和 LD₅₀ 测定, 筛选疫苗候选株后经传代确定疫苗毒种, 选取 F₅ 代鸭胚研磨液作为疫苗毒种, 经甲醛灭活后制成 3 批水包油包水 (W/O/W) 型乳剂二价灭活疫苗实验室制品。通过安全性试验、抗体中和试验、攻毒保护及免疫交叉保护试验发现: 疫苗安全性良好, 雏鸭免疫后第 7 天可以检测到 DHAV 中和抗体, 第 14–21 天的攻毒保护率为 90%–100%, 免疫持续期可达 5 周以上, DHAV-SH 和 DHAV-FS 之间的交叉保护为 20%–30%。研究表明本试验研制的鸭病毒性肝炎二价灭活疫苗实验室制品安全且高效, 为我国 DHAV 预防和控制提供了一种新方法和新产品。

关键词: 鸭病毒性肝炎, 灭活疫苗, 免疫效果

Received: December 24, 2014; **Accepted:** March 17, 2015

Supported by: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (No. 201003012), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A215), National Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2013ZX10004-610).

Corresponding authors: Jing Li. Tel/Fax: +86-10-64807503; E-mail: lj418@163.com

公益性行业 (农业) 科研专项 (No. 201003012), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA10A215), “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (No. 2013ZX10004-610) 资助。

Development and evaluation of an inactivated bivalent vaccine against duck viral hepatitis

Fenggui Yin^{1,2}, Jing Li², Shuang Zhang², Meng Yu², Wanlin Zhang³, Guobing Fan³,
Xiukai Dong⁴, and Wenjun Liu^{1,2}

1 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Beijing Sinder Technology Co., Ltd., Beijing 102600, China

4 Dalian Jinxiu Biotechnology Co., Ltd., Dalian 116450, Liaoning, China

Abstract: The rapid mutation and widely spread of duck hepatitis A virus (DHAV) lead to the vast economic loss of the duck industry. To prepare and evaluate bivalent inactivated vaccine laboratory products of DHAV, 6 strains were screened from 201 DHAV-1 strains and 38 DHAV-3 strains by using serotype epidemiological analysis in most of the duck factory. Vaccine candidate strains were selected by ELD₅₀ and LD₅₀ tests in the 6 strains. Continuously passaged, the 5th passaged duck embryos bodies grinding fluid was selected as vaccine virus seeds. The virus seeds were treated with formaldehyde and water in oil in water (W/O/W) emulsions, making into three batches of two bivalent inactivated vaccine laboratory products. The safety test, antibody neutralization test, challenged protection and cross immune protection experiment suggested that the vaccines possessed good safety, and neutralizing antibodies were detected at 7th day and the challenged protection rate reached 90% to 100% at the 14th and 21st day. Moreover, immune duration of ducklings lasted more than five weeks. However, cross-immunity protection experiments with DHAV-SH and DHAV-FS only had 20%–30%. The two bivalent inactivated vaccine laboratory products of duck viral hepatitis were effective and reliable, providing a new method as well as a new product for DHAV prevention and control.

Keywords: duck viral hepatitis (DVH), inactivated vaccine, immune efficacy

鸭病毒性肝炎 (Duck viral hepatitis, DVH) 是由鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV) 引起的, 主要感染 21 日龄以内的雏鸭, 引起典型的肝炎症状, 雏鸭死亡率高达 80% 以上, 传播迅速, 呈广泛性分布^[1-3]。2008 年, DHV 被重新命名为鸭甲型肝炎病毒 (Duck hepatitis A virus, DHAV)。DHAV 分为 A、B、C 三个基因型, 分别对应血清 1 型 (DHAV-1)^[4]、台湾新型 (DHAV-2)^[5]、韩国和中国新型 (DHAV-3)^[6-7]。

为了解我国 DVH 的流行现状, Fu 等^[8] 2001–2007 年从北京、天津等 5 个发病鸭场分离到的 28 份死亡雏鸭的肝脏样品进行核苷酸序列

分析和血清型分析, 分离到 15 株 DHAV-3 和 13 株 DHAV-1。何冉娅等^[9] 在 2007–2009 年对华南地区发病鸭场的病料进行病原学鉴定和 VP1 基因序列分析, 分离到 15 株 DHAV-3 和 3 株 DHAV-1。由此可知, 目前我国主要是 DHAV-1 和 DHAV-3 同时流行, 且 DHAV-3 的流行地域分布在扩大。

多年来, 科学工作者一直致力于 DHAV 疫苗的研究并取得了一定的进展。1981 年, Gough 等^[10] 研制的鸭胚灭活疫苗 3 次免疫雏鸭后, 血清中和滴度值为 178, 当与弱毒疫苗联合免疫雏鸭时, 血清中和抗体滴度值高达 768, 比单独免疫

高出 4.3 倍。2000 年,陈克强等^[11]研制的蜂胶灭活疫苗,免疫雏鸭 7 d 后,攻毒保护率为 85.7%。目前,DHAV-1 的防制主要使用弱毒疫苗^[12],该疫苗免疫雏鸭后免疫保护率为 88.0%–94.0%^[13],或通过免疫种鸭为雏鸭提供母源抗体^[14]。但 Woolcock 等^[15]将弱毒疫苗免疫于易感雏鸭,连续传代检测其毒力情况,结果显示弱毒疫苗存在毒力返强现象。对于 DHAV-3 的预防可以采用经 SPF 鸡胚连续传代 100 次致弱的病毒研制而成的疫苗免疫雏鸭,结果显示对雏鸭有较好的临床保护,且疫苗不存在毒力返强现象,但疫苗是否能通过免疫种鸭为雏鸭提供保护还需要进一步研究^[16]。目前,我国 DHAV 的快速变异及广泛流行给养鸭业造成了巨大的经济损失,迫切需要研制针对流行毒株且安全有效的疫苗^[17]。为此,本试验选取目前临床流行毒株 1 型 DHAV-SH 和 3 型 DHAV-FS 的鸭胚胚体研磨液作为疫苗毒种研制成二价灭活疫苗并进行免疫效果评价,旨在为该病的防控提供一定的理论指导。

1 材料与方 法

1.1 病毒株

1 型毒株 :DHAV-SH、DHAV-GD、DHAV-FJ、DHAV-PT; 3 型毒株 :DHAV-FS、DHAV-BZ, 毒株来源为上海、广东、福建、北京、山东某鸭场病死雏鸭,由中国科学院微生物研究所分离、鉴定和保藏。

1.2 实验动物

1 日龄 DHAV 抗体阴性雏鸭 (雌性北京白羽鸭)、11 日龄鸭胚均购自北京金星鸭业有限公司; 5 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; 4 月龄雌性日本大耳白

种兔购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.3 主要试剂

佐剂 Montanide_ISA206 购自法国赛比克公司; 吐温-80 购自上海申宇医药化工有限公司; 硬脂酸铝购自上海裕明实业有限公司; 甲醛溶液购自国药集团化学试剂有限公司; DHAV-1 和 DHAV-3 标准阳性血清购自中国兽医药品监察所; 硫乙醇酸盐培养基 (T.G)、酷胨琼脂 (G.A) 和葡萄糖蛋白胨汤 (G.P.) 均由福州大北农生物技术有限公司制备; DNA marker DL5 000、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、AMV 反转录酶、RNase 抑制剂购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 反转录试剂盒购自 Promega 公司。

1.4 病毒的传代

取 DHAV-SH、DHAV-GD、DHAV-FJ、DHAV-PT、DHAV-FS、DHAV-BZ (简称: 6 株 DHAV), 分别用灭菌生理盐水稀释 10 倍后, 接种 11 日龄鸭胚, 0.1 mL/枚, 无菌收取接种后 24–120 h 死亡鸭胚胚体, 在 11 日龄鸭胚上传代 15 次, 收集鸭胚胚体并制成研磨液, 于 -20 °C 保存, 备用。

1.5 病毒的分子生物学鉴定

取 6 株 DHAV 的 F₅ 代鸭胚胚体研磨液, 按照 Trizol 试剂说明, 提取病毒 RNA, 反转录后以合成的 cDNA 为模板, 根据 GenBank 上登录的 DHAV-1-R85952 (DQ22654.1) 和 DHAV-3-FS (EU877916.1) 基因组序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 使用 P1/P2、P3/P4 两对引物 (表 1), 分别进行 PCR 扩增, 取 10 μL PCR 产物, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 将 PCR 产物进行测序及序列分析。

表 1 检测鸭病毒性肝炎 1、3 型引物

Table 1 Primers for detection of DHAV

Primers	Primer sequence (5'-3')
P1	GTTCCAAATGATGATTATTATG
P2	GGATCTGATTAGTACCAGATAAG
P3	CCCATGTCTAAGTCTCTATGAAT
P4	CTGAAGGTGTCTGTATCCAAG

1.6 病毒含量测定

取 6 株 DHAV 的鸭胚胚体研磨液，融化后 3 000 r/min 离心 5 min，吸取上清进行 10 倍系列稀释，每个稀释度接种 5 枚鸭胚，0.1 mL/枚，37 °C 孵育 120 h，记录 24–120 h 内死亡和存活的鸭胚。按 Reed-Muench 氏法计算鸭胚半数致死量 (ELD₅₀)。

1.7 毒力的测定

取 6 株 DHAV 的 F₅ 代鸭胚胚体研磨液，进行 10 倍系列稀释，每个稀释度接种 5 只 1 日龄雏鸭，每只腿部肌肉注射 0.1 mL，观察 7 d，记录雏鸭发病和死亡情况，按 Reed-Muench 氏法计算雏鸭半数致死量 (LD₅₀)。

1.8 疫苗候选毒种的筛选

6 株 DHAV 经 ELD₅₀ 和 LD₅₀ 测定后，确定毒株 DHAV-SH 和 DHAV-FS 作为疫苗候选株。为了确定疫苗候选毒种的使用代次，分别将 DHAV-SH 和 DHAV-FS 经鸭胚传代 15 次，无菌收取 F₁₋₁₅ 代鸭胚胚体并制成研磨液，然后对其进行 ELD₅₀ 测定。

1.9 二价灭活疫苗实验室制品的制备

水相制备：取 DHAV-SH 和 DHAV-FS 的 F₅ 代鸭胚胚体研磨液，作为疫苗毒种，使用 2‰ 甲醛溶液进行灭活，检验合格后等量混合，再与吐温-80 按 96：4 比例混合，充分搅拌，使吐温-80

完全溶解。

油相制备 佐剂 (Montanide_ISA206) 94 份、司本-80 6 份、硬脂酸铝 2 份，116 °C 灭菌 30 min，冷至室温。

疫苗的配制：取 1.5 份油相置于乳化罐内，慢速搅拌，同时加入 1 份水相，以 3 000 r/min 搅拌 5 min，在终止搅拌前加入 1% 硫柳汞溶液，使其最终浓度为 0.005%。乳化结束后进行定量分装，4 °C 保存，批号分别为 LW2013001、LW2013002 和 LW2013003。

1.10 物理性状检验

参照《中华人民共和国兽用生物制品规程》^[18] 附录方法，对 3 批二价灭活疫苗实验室制品进行物理性状检验。

1.11 安全性检测

1 日龄雏鸭 10 只，各颈部、背部皮下注射疫苗 0.4 mL；5 周龄雌性 BALB/c 小鼠 10 只，各背部皮下注射疫苗 0.4 mL；4 月龄健康的雌性日本大耳白种兔 6 只，各腿部肌肉注射疫苗 0.4 mL，观察 14 d，记录局部反应和临床症状。

1.12 疫苗中和抗体试验和攻毒保护试验

将 420 只健康的 1 日龄雏鸭随机分成 2 组，免疫组 360 只，对照组 60 只。免疫组再随机平均分成 3 个组，每组 120 只，分别免疫 3 批二价灭活疫苗实验室制品，对照组注射生理盐水。雏鸭免疫后第 7、14、21、28、42、63 天分别从各免疫组取 20 只、对照组 10 只进行攻毒试验和血清学检测，其中免疫雏鸭 10 只和对照鸭 5 只，每只腿部肌肉注射 DHAV-SH 的 F₅ 代鸭胚胚体研磨液 0.2 mL；另外免疫雏鸭 10 只和对照鸭 5 只，每只腿部肌肉注射 DHAV-FS 的 F₅ 代鸭胚胚体研磨液 0.2 mL。

1.13 免疫交叉保护试验

取 60 只 1 日龄雏鸭, 分为 3 组: 1 型 (DHAV-SH) 单价灭活疫苗组、3 型 (DHAV-FS) 单价灭活疫苗组和不注射对照组, 每组 20 只。采用颈部皮下注射的方法接种鸭肝炎病毒各单价灭活苗, 0.4 mL/只。免疫后 14 d, 各组取 10 只攻击 DHAV-FS 毒株, 另 10 只攻击 DHAV-SD 毒株, 攻击量均为 1 000 LD₅₀, 观察 14 d, 记录各组发病情况。

2 结果

2.1 病毒分子生物学鉴定

对北京市、辽宁省等 134 个鸭场共 352 份样本进行 DHV 血清型分析, 其中分离到 201 株 DHAV-1、38 株 DHAV-3, 结果显示 DHAV-1 和 DHAV-3 为我国流行优势血清型。挑选毒力较高的 6 株 DHAV, 以其 cDNA 为模板, PCR 扩增得到大小分别为 229 bp (DHAV-1)、311 bp (DHAV-3) 的阳性条带。由此判定分离到的 DHAV-SH、DHAV-GD、DHAV-FJ、DHAV-PT 为 DHAV-1 型毒株; DHAV-FS、DHAV-BZ 为 DHAV-3 型毒株 (图 1), 毒株分子测序鉴定结果见图 2。

2.2 病毒 ELD₅₀ 与 LD₅₀ 的测定

分别对 6 株 DHAV 进行 ELD₅₀ 和 LD₅₀ 测定, 计算平均值。结果显示, 在这 6 株 DHAV 中, DHAV-SH 和 DHAV-FS 的 ELD₅₀ 和 LD₅₀ 的平均值是最高的 (表 2), 因此确定 DHAV-SH 和 DHAV-FS 为疫苗候选毒株。

2.3 疫苗毒种的确定

DHAV-SH 和 DHAV-FS 在鸭胚上传代 15 次 F₁₋₁₅ 鸭胚胚体研磨液的病毒含量均 10^{-7.0} ELD₅₀/mL,

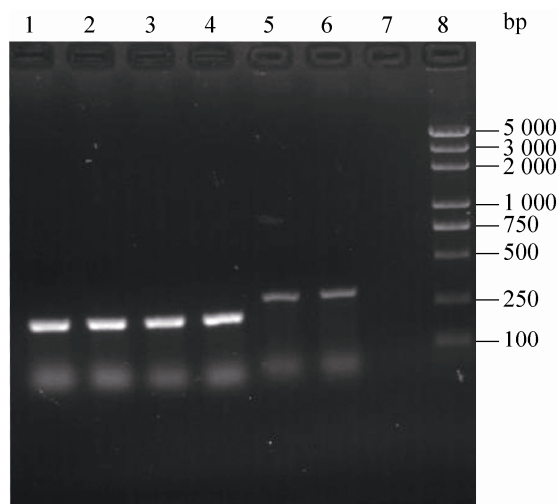


图 1 6 株分离毒株 RT-PCR 检测结果

Fig. 1 RT-PCR identification of six isolate strains. 1-4: represent type 1 strains: DHAV-SH, DHAV-GD, DHAV-FJ, DHAV-PT, respectively; 5-6: represent type 3 strains: DHAV-FS, DHAV-BZ, respectively; 7: negative control; 8: marker DL5 000.

A
 GTTCCAAATGATGATTATTATGCCTGCCTACGCTGGTT
 AGCAACACCTGCTTGTTTTTTTCAAAATAACACACAAC
 CAGCATATGGTCAGACACGATATTTTAGGTTTATCAGA
 TGTGGCTTTCATTTTAGGTTGCTGTGAATGCCCTCT
 GGCTCCGCTGGAGCGCTCATGCTAGTTTGGATGCCCTA
 CCCCTACTGCCGGGCTTATCTGGTACTAATCAGATCC
 B
 CCCATGTCTAAGTCCTATGAATTTTGTAGTGGTTAGC
 CTACCACCCCTTGGCCACTAATTCITGGCTTTCGTTTT
 GGGATCCACCATATCTTGGAGGTGGTGCTGAAATATTG
 CAAGCCACTTGGTATGTGTGTGTTTTCTAAACATGAAG
 CTTTGGTGCAGTGGTTTTGGACAAGGAAAGGCTAGTG
 TTTGGTCTGGGTACAAACCCCTGTGTGAAACGGATTA
 CCGGTAGTAGCATCTAGTGGTTCAGTCCATAACATGA
 GTGTATGGTCTAGAGTGGACATAGCTTGGATACAGACA
 CCTTCAG

图 2 DHAV-1 和 DHAV-3 的分子测序结果

Fig. 2 The results of molecular sequencing. (A) DHAV-1. (B) DHAV-3.

表 2 鸭胚半数致死量和雏鸭半数致死量的测定

Table 2 Titration of ELD₅₀ (Median embryo lethal dose) for duck embryos and LD₅₀ (Median lethal dose) for ducklings

Strains	ELD ₅₀ /mL	LD ₅₀ /mL
DHAV-SH	10 ^{-6.25}	10 ^{-2.50}
DHAV-GD	10 ^{-6.01}	10 ^{-2.01}
DHAV-FJ	10 ^{-5.80}	10 ^{-1.30}
DHAV-PT	10 ^{-5.80}	10 ^{-2.01}
DHAV-FS	10 ^{-6.30}	10 ^{-2.01}
DHAV-BZ	10 ^{-6.01}	10 ^{-1.85}

毒力稳定。为了保证二价灭活疫苗实验室制品的质量,选取 ELD₅₀ 最高且稳定的鸭胚胚体研磨液作为疫苗毒种,即 DHAV-SH 和 DHAV-FS 的 F₅ 代鸭胚胚体研磨液,其 ELD₅₀/mL 分别为 10^{-7.3} 和 10^{-7.1}。

2.4 物理性状检测

3 批二价灭活疫苗实验室制品的物理性状的检测结果,如表 3 所示。

2.5 安全性检测

为了检测 3 批二价灭活疫苗实验室制品的安全性,分别给健康的雏鸭、BALB/c 小鼠及日本大耳白种兔接种疫苗,观察 14 d,结果显示,

免疫的动物均无红肿、硬结和鸭病毒性肝炎的临床症状(表 4)。

2.6 疫苗中和抗体试验

在雏鸭免疫二价灭活疫苗实验室制品 0.4 mL/只后,第 7、14、21、28、42、63 天血清用鸭胚中和法测定其效价(以 10ⁿ 表示)^[19]。结果显示第 7 天可检测到 DHAV-SH 和 DHAV-FS 中和抗体,分别为 10^{0.64}-10^{0.75} 和 10^{0.62}-10^{0.72};第 7 天开始缓慢上升,第 28 天达到最高值(DHAV-SH 和 DHAV-FS 的平均效价分别为 10^{1.48} 和 10^{1.33}),之后缓慢下降,第 63 天平均效价仍大于第 7 天。对照组在各个时间点的效价均为 0(图 3)。

2.7 攻毒试验

1 日龄雏鸭免疫后第 7、14、21、28、42、63 天,用 F₅ 代的 DHAV-SH 和 DHAV-FS 的鸭胚胚体研磨液各 0.2 mL 进行攻毒。其保护率在 7 天时开始产生保护,保护率为 30%-60%,14-21 d 时上升到 90%-100%;28 d 达到 100%。对照组的攻毒死亡率在 7、14 及 28 d 均为 100%。28 d 后雏鸭对强毒不太敏感(表 5)。从结果可知,本试验研制的二价灭活疫苗实验室制品对雏鸭有较好的免疫保护作用。

表 3 三批灭活疫苗实验室制品的物理性状检测

Table 3 Test of physical properties about three batches of inactivated vaccines

Items	Vaccine batches		
	LW2013001	LW2013002	LW2013003
Appearance	Uniform milky emulsion	Uniform milky emulsion	Uniform milky emulsion
Viscosity (s/0.4 mL)	7.6	7.7	7.9
Dosage forms	W/O/W type	W/O/W type	W/O/W type
Sterility test	No bacterial growth	No bacterial growth	No bacterial growth
Formaldehyde residue (%)	0.158	0.160	0.154
Thimerosal content (%)	0.004 8	0.005 4	0.005 0
Stability	No demulsification	No demulsification	No demulsification

表 4 三批灭活疫苗实验室制品的安全性检测

Table 4 The safety test of three batches of inactivated vaccines

Animal species	Vaccine batches		
	LW2013001	LW2013002	LW2013003
Duckling	-	-	-
Rabbit	-	-	-
BALB/c Mice	-	-	-

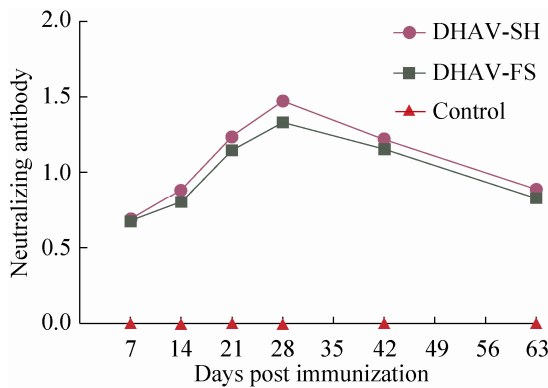


图 3 血清中和抗体效价 (以 10ⁿ 表示) 的消长动态
Fig. 3 The VN titers (Shown as 10ⁿ) of serum antibodies in immunized ducklings.

2.8 免疫交叉保护试验

1 日龄雏鸭免疫单价灭活疫苗 DHAV-SH 和 DHAV-FS 后, 第 14 天进行交叉攻毒保护试验, 结果显示, DHAV-SH 灭活疫苗对 DHAV-1 型强毒攻击的保护率为 80% 以上, 而对 DHAV-3 型病毒的攻击保护率仅为 30%; DHAV-FS 灭活疫苗对 DHAV-3 型病毒的攻击保护率为 80% 以上, 而对 DHAV-1 型病毒的攻击保护率仅为 20% (表 6)。

3 讨论

本试验所使用的疫苗候选毒株 1 型 DHAV-SH 和 3 型 DHAV-FS 均为 DHAV 流行优势株, 其 ELD₅₀ 10^{-6.25}、LD₅₀ 10^{-2.0}。Gough 等^[10]报道称鸭胚灭活疫苗诱导的抗体反应优于鸡胚灭活疫苗。因此, DHAV-SH 和 DHAV-FS 经鸭胚传代 15 次后, 挑选 ELD₅₀ 10^{-7.1} 的 F₅ 代鸭胚胚体研磨液作为疫苗毒种候选株。疫苗配制时将非离子型乳化剂吐温-80 和司本-80 制

表 5 DHAV-1 和 DHAV-3 攻毒保护试验

Table 5 The protection against challenge with DHAV type 1 or 3

Vaccine batches	Immunizing number	Immunizing does (mL)	Challenge does (mL)	Challenge strains	Number	Protection rate at different time points (d)			
						7	14	21	28
LW2013001	120	0.4	0.2	DHAV-SH	10	5/10	9/10	9/10	10/10
			0.2	DHAV-FS	10	6/10	9/10	10/10	10/10
LW2013002	120	0.4	0.2	DHAV-SH	10	3/10	9/10	9/10	10/10
			0.2	DHAV-FS	10	4/10	10/10	9/10	10/10
LW2013003	120	0.4	0.2	DHAV-SH	10	5/10	9/10	9/10	10/10
			0.2	DHAV-FS	10	5/10	9/10	9/10	10/10
Control	60	-	0.2	DHAV-SH	5	0/5	0/5	0/5	3/5
			0.2	DHAV-FS	5	0/5	0/5	0/5	3/5

表 6 免疫交叉保护试验

Table 6 Cross-protection experiment

Batches	Challenge strains	Ducklings incidence	Protection rate (%)
DHAV-1	DHAV-SH	1/10	90
	DHAV-FS	7/10	30
DHAV-3	DHAV-SH	8/10	20
	DHAV-FS	0/10	100
Control	DHAV-SH	10/10	0
	DHAV-FS	8/10	20

备成二价灭活疫苗,这两种乳化剂是单油酸酯,可以增加疫苗的安全性。在安全性检测中,被免疫的实验动物均无局部反应和鸭病毒性肝炎的临床症状,说明该疫苗实验室制品的安全性较好。研制的疫苗实验室制品以 0.4 mL 剂量免疫雏鸭,攻毒后第 7–21 天雏鸭保护率为 90%–100%,雏鸭免疫持续期可达 5 d 以上。

随着疫苗中的抗原变得越来越单一,佐剂对疫苗效率起着重要的作用。为了应用到动物疫苗领域,佐剂应具备增强疫苗对病原的特异性免疫应答、提高保护力、使用方便、减少免疫剂量、降低疫苗成本等特点^[20]。随着养鸭业对疫苗需求量的增加,乳剂符合动物疫苗佐剂的标准成为常用佐剂类型^[21]。根据分散状态不同,乳剂分为油包水 (W/O) 型乳剂和水包油 (O/W) 型乳剂。白油佐剂质量对于疫苗安全性及其免疫效力有着重大影响。常规矿物油佐剂黏度较高、吸收不完全^[22]且产生抗体速度较慢。本试验使用的 Montanide_ISA206,属于水包油包水 (W/O/W) 型复合乳剂,与传统油佐剂相比,粘度低,易与毒株混合,同时产生抗体快便于灭活疫苗尽早发挥作用,同时稳定性较好^[23]。另外,

与 O/W 型乳剂相比, Montanide_ISA206 通过缓慢释放抗原增加免疫持续时间实现长期保护,这一点与 W/O 型乳剂作用机理相同,但是注射部分的安全性又优于 W/O 型乳剂^[20]。

田间试验是疫苗研制非常重要的环节。本试验研制的 DHAV 二价灭活疫苗目前为实验室阶段产品,目前正在向农业部审核批准临床试验申请,批复后将进行田间试验。

针对目前我国 DHAV-1 和 DHAV-3 两种血清型同时流行的现状^[24],目前已经批复了弱毒疫苗对其进行防控^[13],但存在毒力返强的风险^[15]。弱毒疫苗若减毒不足,则无法保证疫苗的安全性,但减毒过度会降低病毒的毒力,也有可能降低疫苗的免疫原性^[25-26]。同时,弱毒疫苗在普通的冻干剂中不稳定,储存和运输过程中需要特殊的冷藏设备,使得成本升高^[27]。本试验利用鸭病毒性肝炎的南、北方流行毒株研制成二价灭活疫苗实验室制品。我们可以把该疫苗应用到鸭养殖场,针对雏鸭进行免疫来预防 DHAV-1 和 DHAV-3 的流行。因此本试验研制的 DHAV 二价灭活疫苗实验室制品安全、可控、稳定、高效,为我国鸭病毒性肝炎的预防和控制提供了一种新方法和新产品。

REFERENCES

- [1] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 11): 3307–3316.
- [2] Li J, Bi YH, Chen C, et al. Genetic characterization of duck hepatitis A viruses isolated in China. *Virus Res*, 2013, 178(2): 211–216.
- [3] Shi SH, Cheng LF, Fu GH, et al. Genomic sequence

- of a new serotype duck hepatitis virus. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49(3): 309–315 (in Chinese).
施少华, 程龙飞, 傅光华, 等. 鸭肝炎病毒新血清型基因组序列分析. *微生物学报*, 2009, 49(3): 309–315.
- [4] Wang LY, Pan M, Fu Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes*, 2008, 37(1): 52–59.
- [5] Tseng CH, Knowles NJ, Tsai HJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Res*, 2007, 123(2): 190–203.
- [6] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Arch Virol*, 2007, 152(11): 2059–2072.
- [7] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, 2008, 37(2): 171–177.
- [8] Fu Y, Pan M, Wang XY, et al. Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens. *Vet Microbiol*, 2008, 131(3/4): 247–257.
- [9] He RY, Yu M, zhang YL, et al. Epidemiological investigation and genetic variation in VP1 gene of duck hepatitis virus isolates from in southwestern China in 2007–2009. *Chin J Anim Infect Dis*, 2010, 18(1): 7–15 (in Chinese).
何冉娅, 于淼, 张玉玲, 等. 2007–2009 年华南地区鸭肝炎病毒流行病学调查及分离株的 VP1 基因变异分析. *中国动物传染病学报*, 2010, 18(1): 7–15.
- [10] Gough RE, Spackman D. Studies with inactivated duck virus hepatitis vaccines in breeder ducks. *Avian Pathol*, 1981, 10(4): 471–479.
- [11] Chen KQ, Cao SF, Liu P, et al. Preliminary report on propolis inactivated vaccine of ducklings' virus hepatitis. *J Anim Sci Vet Med*, 2000, 19(3): 3–5 (in Chinese).
陈克强, 曹盛丰, 刘萍, 等. 雏鸭病毒性肝炎蜂胶灭活苗研究初报. *畜牧兽医杂志*, 2000, 19(3): 3–5.
- [12] Fu YZ, Chen ZY, Li CF, et al. Protective immune responses in ducklings induced by a suicidal DNA vaccine of the VP1 gene of duck hepatitis virus type 1. *Vet Microbiol*, 2012, 160(3/4): 314–318.
- [13] Crighton GW, Woolcock PR. Active immunisation of ducklings against duck virus hepatitis. *Vet Rec*, 1978, 102(16): 358–361.
- [14] Rispiens BH. Some aspects of control of infectious hepatitis in ducklings. *Avian Dis*, 1969, 13(3): 417–426.
- [15] Woolcock PR, Crighton GW. Duck virus hepatitis: serial passage of attenuated virus in ducklings. *Vet Rec*, 1979, 105(2): 30–32.
- [16] Kim MC, Kim MJ, Kwon YK, et al. Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections. *Vaccine*, 2009, 27(48): 6688–6694.
- [17] Ren LQ, Li J, Bi YH, et al. Overview on duck virus hepatitis A. *Chin J Biotech*, 2012, 28(7): 789–799 (in Chinese).
任丽倩, 李晶, 毕玉海, 等. 鸭甲型病毒性肝炎的研究进展. *生物工程学报*, 2012, 28(7): 789–799.
- [18] Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committees. The Veterinary Drug Standard of the People's Republic of China. 3rd Ed. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 448–449 (in Chinese).
中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 448–449.
- [19] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. Beijing: Science Press, 1985: 228 (in Chinese).
殷震, 刘景华. *动物病毒学*. 北京: 科学出版社, 1985: 228.
- [20] Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines.

- Vaccine, 2001, 19(17/19): 2666–2672.
- [21] Stewart-Tull DES. The Theory and Practical Application of Adjuvants. US: Wiley, 1995: 1–19.
- [22] Yi XF, Ding MJ, Huan XM, et al. Comparative tests of vaccines prepared with domestic and import oil adjuvants. Chin Anim Husb Vet Med, 2014, 41(3): 245–247 (in Chinese).
尹秀凤, 丁美娟, 黄显明, 等. 新型国产白油佐剂与进口 Marcol-52 白油佐剂配制疫苗的比较试验. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3): 245–247.
- [23] Barnett PV, Pullen L, Williams L, et al. International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. Vaccine, 1996, 14(13): 1187–1198.
- [24] Zhang DB. The current situation and countermeasures of prevention and control of epidemic disease of ducks. China Poultry, 2012, 34(7): 38–40 (in Chinese).
张大丙. 当前鸭病流行现状及防控对策. 中国家禽, 2012, 34(7): 38–40.
- [25] Xu ZY, Zhao SJ, OuYang PY, et al. Hepatitis A vaccine prevention effect and application strategy. Chin J Prev Med, 1996, 30(Suppl): 3–5 (in Chinese).
徐志一, 赵守军, 欧阳佩英, 等. 甲型肝炎疫苗预防效果与应用策略. 中华预防医学杂志, 1996, 30(增刊): 3–5.
- [26] André FE. Approaches to a vaccine against hepatitis A: development and manufacture of an inactivated vaccine. J Infect Dis, 1995, 171 (Suppl 1): S33–S39.
- [27] Kang MS, Jang H, Kim MC, et al. Development of a stabilizer for lyophilization of an attenuated duck viral hepatitis vaccine. Poult Sci, 2010, 89(6): 1167–1170.

(本文责编 郝丽芳)