



EGGS
PROGRAM

总第24期/2015年12月

从三个不同角度论述囊胚宝的安全性

前言

如果囊胚宝还算不上市场上最为成功的家禽疫苗的话，至少应是最成功的之一。自2006年上市以来，囊胚宝已经在60多个国家，各种截然不同的环境条件下得到应用，其使用量已超过510亿羽份。这些令人印象深刻的事实背后是这一创新型疫苗无可比拟的有效性。

免疫抑制

免疫抑制可以被定义为“一种由免疫系统损伤造成的免疫反应暂时或永久性功能缺失状态，可导致对疾病的敏感性增加”（Yegani & Butcher, 2005）。它可能由传染性病原体、霉菌毒素、营养不良、管理不善所导致的应激及其他因素引起。在田间条件下，通常是由多个因素合并存在而导致免疫抑制。

尽管深知导致免疫抑制的因素存在多重性，正确诊断免疫抑制的成因又很难，所以传染性法氏囊病常被认为是导致免疫抑制的首要罪魁祸首。在田间条件下，人们一旦发现法氏囊萎缩，即刻就会怀疑这种免疫抑制效应的存在。然而，真实情况并不如此。

实际上，免疫抑制程度主要取决于IBDV在法氏囊中的感染日龄以及淋巴细胞的损伤程度。传统的IBD活疫苗需要在法氏囊中进行复制来诱导针对野毒感染的保护，这在一定程度上会导致淋巴细胞的部分损伤以及随后的法氏囊萎缩，那么，疫苗株的复制会对禽类的免疫能力造成什么样的影响呢？

本文从三个不同视角介绍了关于诗华囊胚宝安全性：即学术角度、注册法规角度以及家禽业观点。

学术角度

法氏囊是一种只存在于禽类体内的初级淋巴器官，其主要作用是调节B细胞的发育。在B细胞个体发育过程中，可在胚胎期将其分为主要的两个步骤。在胚胎期8-14天，法氏囊前体干细胞在法氏囊定殖。在胚胎期18日龄以后，完全成熟的B淋巴细胞开始从法氏囊中释放到外周血中并到达次级淋巴器官（脾、肠道相关淋巴组织、哈德氏腺等）。在雏鸡的2-3周龄，所有的次级淋巴器官都充满了可以再生的B淋巴细胞群，B淋巴细胞的增殖及迁徙阶段结束。实际



EGGS PROGRAM

上，在该日龄时仍然存在一些法氏囊干细胞。

如上所述，IBD活苗需要在法氏囊中进行复制来诱导免疫力。然而，这种复制意味着存在某种程度的未成熟淋巴细胞损伤以及随后的法氏囊的损伤。存在争议的是疫苗毒株在不同日龄法氏囊中进行复制所造成的影响以及随后对于禽类免疫力的影响是否不同。

实际上，在1972年，Faragher及其同事即首次报道了不同感染日龄所造成的免疫抑制影响。有趣的是，作者观察到当1日龄感染法氏囊病毒时，对新城疫抗体应答抑制作用最为显著。当7日龄感染法氏囊病毒时，对新城疫免疫抑制作用较温和，最终，当IBD感染发生在14到21日龄时，其免疫抑制作用几乎可以忽略不计。

已明确证明，囊胚宝疫苗病毒在法氏囊中复制时间为3-4周龄。在这种情况下，当B淋巴细胞已经在次级淋巴组织中定植之后，W2512毒株复制对于免疫系统的真正影响究竟是怎样的呢？换言之，囊胚宝还会存在免疫抑制作用吗？

为此我们开展了多个研究工作，评估囊胚宝中W2512毒株复制对于禽类免疫能力的影响。在这里，我们总结了两个完全不同的研究。

研究 1:

一种毋庸置疑的评估方法，那就是简单的用外科手术方法将法氏囊摘除，然后对禽类进行新城疫疫苗免疫，最终与具有完整法氏囊的鸡群的血清学结果进行比较。匈牙利SSIU-Phylaxia开展了这项试验。实用外科手术摘除21日龄（组1）和28日龄（组2）商品肉鸡的法氏囊（图1）。组1和组2分别在27日龄和29日龄进行新城疫（ND）疫苗免疫，通过点眼途径免疫含有Hitchner B1毒株的疫苗。含有完整法氏囊的对照组（组3和组4）在相同日龄免疫新城疫疫苗（表1）。最终，在免疫后第0天（0dpv）和第1、2、3周采集血清样本。所有的血清样品一次性进行血凝抑制试验（HI）。

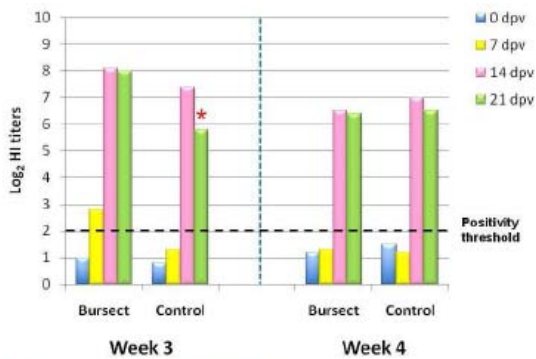
表1: ND免疫

分组	切除法氏囊日龄	ND免疫日龄
1	21天	27天
2	28天	29天
3	-	27天
4	-	29天



EGGS PROGRAM

Graphic 1. Effect of bursectomy on ND HI titers



*: significantly different antibody level

在图表1中显示出了HI检测结果。各组的HI滴度在免疫后两周达到了顶峰。在法氏囊切除组和对照组之间并没有观察到明显差异。这些结果说明在21天和28天龄外科切除法氏囊并不会影响随后ND免疫（法氏囊切除后1天和6天）所诱导的体液免疫应答。在试验的结尾阶段，解剖了所有切除了法氏囊的鸡只并进行了检查，在所有的鸡只中均未发现任何法氏囊的残余。

图1：手术摘除法氏囊的主要步骤



戊巴比妥麻醉鸡只



泄殖腔上方切开



法氏囊



结扎法氏囊



烧烙



缝合肌肉、上皮组织及皮肤



EGGS PROGRAM

研究 2:

另一种评估囊胚宝复制后对于免疫能力影响的方法是攻毒试验。该试验也是由SSIU-Phylaxia进行的。

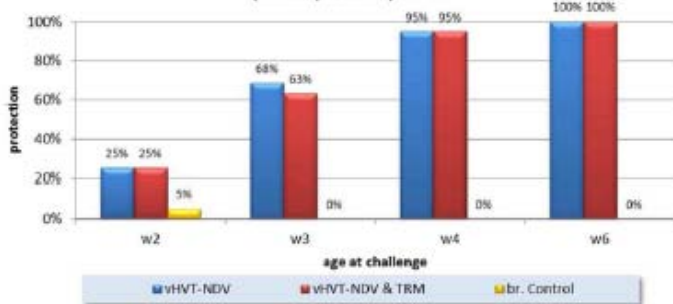
简言之，将1日龄Hubbard F15商品肉鸡分为3组，并按下列程序进行免疫：

- 1、1日龄皮下注射Vectormune[®] ND（新城疫基因工程疫苗）；
- 2、1日龄皮下注射Vectormune[®] ND和囊胚宝；
- 3、非免疫对照组。

使用一株基因VII型嗜内脏型新城疫病毒马来西亚分离强毒株(ref. D1524/1/1, 2/MY/10)对所有组通过滴鼻途径进行攻毒（200u1），攻毒剂量为5 log₁₀ EID₅₀/只。其中每组随机选取10只鸡，在第2、3、4和6周龄进行攻毒。观察期为攻毒后2周。

另外，为检测囊胚宝病毒复制情况，从第14天到35天，各组每周分别采集两次样品，每次采集10个法氏囊及血液样本。当组织学检测显示出法氏囊的变化后，对两次连续采集的样品进行PCR检测，以确定病毒性质。

Protection against vvNDV challenge
(clinical protection)



试验结果总结在旁边的图表中。两个试验组（单独免疫Vectormune ND疫苗或联合免疫囊胚宝）对于新城疫的保护力是一致的，明确表明囊胚宝并不会损伤Vectormune ND疫苗的免疫力。非常有趣的是我们发现，检测到囊胚宝病毒的时间是3到4周龄之间，而这正是超强毒力新城疫毒株攻毒的时间，这说明囊胚宝对于新城疫免疫应答表现出的安全性。

注册法规角度

当申请产品注册时，各国监管机构均要求进行大量的实验室研究、野外试验以及环境风险评估，以证明显示该疫苗的安全性。

疫苗的实验室¹评估包括对SPF鸡和肉鸡接种1剂量和10剂量的囊胚宝疫苗；在SPF鸡胚中进行的所有安全试验；对免疫功能的影响（免疫抑制）；疫苗病毒对空白同居鸡的传播试验；疫苗毒株的毒力返强试验；疫苗毒株的生物特性以及其他试验。以下是一个评估蛋内注射囊胚宝对肉鸡的免疫抑制作用的研究。在该试验中，科宝肉鸡的鸡胚被随机分为以下

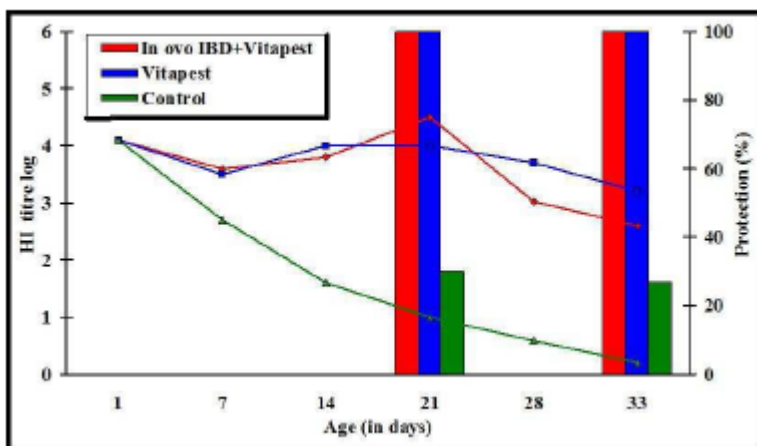


EGGS PROGRAM

三组：

1. 18日龄蛋内注射囊胚宝疫苗，随后1日龄雏鸡点眼免疫Cevac Vitapest L新城疫疫苗
2. 1日龄雏鸡点眼免疫Cevac Vitapest L新城疫疫苗
3. 非免疫对照组

在第1、7、14、21、28及33天分别测定各组的新城疫HI平均滴度，在第21天和33天使用Herts 33新城疫强毒株肌注途径进行攻毒，攻毒剂量为 $6 \log_{10} \text{ELD}_{50}$ 。



在下图中对试验结果进行了总结。1日龄雏鸡的新城疫母源抗体水平很低（4.15），在21日龄时被动免疫几乎消失。

在21日龄囊胚宝+Vitapest免疫组（HI滴度4.46）的主动免疫应答水平稍稍高于单独免疫Vitapest疫苗组（HI滴度4.06）。在第33天，两个组的抗体水平均有所下降。

所有免疫ND疫苗的鸡只（组1和组2）在21日龄和33日龄进行攻毒感染后全部存活，而且没有出现任何临床症状（100%保护），而组3（未免疫ND疫苗）仅凭母源抗体攻毒后死亡率高达72%。这些结果明确表明，囊胚宝没有影响Vitapest疫苗诱导的针对ND感染的保护力，从而认为囊胚宝不会导致免疫抑制。

在进行广泛的调查后，结果表明：

“实验室试验及田间试验结果证明诗华囊胚宝，即使在很小日龄接种10倍剂量，无论是通过蛋内注射还是皮下注射，都是安全的，不必担心在存在IBD母源抗体的肉鸡上使用产生免疫抑制效果。”

囊胚宝已在全球60多个国家进行注册，并且在欧盟获准注册使用（目前世界上规定最为严苛），这一事实说明这一创新型疫苗完全是安全的。



EGGS PROGRAM

家禽业观点

毋庸置疑，可控条件下的研究对于展现某一种疫苗的安全性来说更有说服力，不过，现场的广泛使用也可以同时佐证该疫苗的安全性。下面是囊胚宝自上市以来的全球使用情况。自2006年上市以来，全球主要肉鸡生产商在田间已使用了超过510亿羽份的囊胚宝疫苗。

自06年上市以来全球共计销售510亿羽份



TRANSMUNE[®]
IBD

STOP
THE GUMBORO CYCLE

现场使用情况毋庸置疑地证明了囊胚宝的安全性。实际上，正是因为囊胚宝的安全性加上高效的保护力，使得囊胚宝成为了世界上肉鸡产业中使用最为广泛的IBD疫苗。