

张秀华, 吕晓妍, 苏玮玮, 等. 猪流感二价灭活疫苗对 H1N1 亚型流行毒株的攻毒保护效果 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (12): 81-84.

ZHANG X H, LÜ X Y, SU W W, et al. Swine influenza bivalent inactivated vaccine for the cross protection effect of a pandemic H1N1 subtype strain in 2021 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (12): 81-84.

猪流感二价灭活疫苗对 H1N1 亚型流行毒株的攻毒保护效果

张秀华^{1#}, 吕晓妍^{1#}, 苏玮玮¹, 陈超阳^{1,2}, 路伟^{1*}

(1. 华威特(江苏)生物制药有限公司, 江苏 泰州 225300;

2. 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 旨在评价猪流感二价灭活疫苗 (H1N1 LN 株+H3N2 HLJ 株) 对 2021 年国内 H1N1 亚型猪流感流行毒株的交叉保护效果。将 10 头 4 周龄健康易感猪随机均分为疫苗接种组和对照组, 疫苗接种组每头接种疫苗 2 mL, 首免 14 d 后进行二免, 对照组未接种疫苗; 首免后 28 d, 每头猪经气管内注射 A/Swine/Jiangsu/NL33/2021 (H1N1) (简称 NL33 株) 4.0 mL; 综合临床症状、鼻拭子病毒分离和肺脏病变 3 个方面进行判定。结果: 试验组保护率为 80%, 对照组发病率为 100%。综上, 猪流感二价灭活疫苗 (H1N1 LN 株+H3N2 HLJ 株) 接种对 2021 年国内流行的 H1N1 亚型猪流感病毒攻击产生了较好的交叉保护效果, 猪群接种该疫苗后能有效抵抗猪流感流行毒株的攻击。

关键词: 猪流感二价灭活疫苗; H1N1 亚型; 流行毒株; 交叉保护

中图分类号: S828 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)12-0081-04

Swine influenza bivalent inactivated vaccine for the cross protection effect of a pandemic H1N1 subtype strain in 2021

ZHANG Xiuhua^{1#}, LÜ Xiaoyan^{1#}, SU Weiwei¹, CHEN Chaoyang^{1,2}, LU Wei^{1*}

(1. Sinovet (Jiangsu) Biopharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 225300, China;

2. College of Veterinary Medicines, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To evaluate the cross-protection effect of a swine influenza bivalent inactivated vaccine (H1N1 LN strain + H3N2 HLJ strain) against the epidemic H1N1 swine influenza virus strain in China in 2021, ten healthy susceptible 4-week-old piglets were used and randomly assigned to a vaccinated group and a control group, with 5 piglets in each group. Each piglet in the vaccinated group received intramuscularly a dose of 2 ml of the vaccine, followed by a booster immunization with the same dose at 14 days after the first vaccination. The control group did not receive the vaccine. At 28 days after the first immunization, all the piglets were challenged intratracheally with 4.0 ml of A/Swine/Jiangsu/NL33/2021 (H1N1) (NL33 strain). Then, the protection effect was assessed based on clinical symptoms, virus isolation from nasal swabs, and lung lesions. The results showed an 80% protection rate in the vaccinated group, and a 100% morbidity rate in the control group. In conclusion, the SIV bivalent inactivated vaccine demonstrated a significant cross-protection against the epidemic H1N1 swine influenza virus, effectively enabling vaccinated pigs to resist against the virus challenge.

Keywords: swine influenza bivalent inactivated vaccine; H1N1 subtype; epidemic strains; cross-protection

猪流感 (swine influenza, SI) 是由猪流感病毒 (swine influenza virus, SIV) 引起的猪的一种急性、传染性呼吸道疾病。猪可感染不同亚型的流感病毒, 广泛流行于猪群中的主要有 H1N1、H3N2 和 H1N2 亚型^[1]。因猪的呼吸道上皮细胞中存在 SA-a-2, 3-Gal (禽) 和 SA-a-2, 6-Gal (人) 受体, 为猪流

感、禽流感和人流感病毒的重组提供了温床, 因此猪被称为流感病毒的“混合器”^[2-3]。SIV 单纯感染致死率不高, 但易与其他疫病如猪繁殖与呼吸综合征、猪传染性胸膜肺炎、猪链球菌病等并发或继发, 导致死亡率迅速上升, 经济损失严重^[4]。农业农村部 2023 年 7 月公布全国动物疫病情况, 猪流感发病率第二, 死亡率 31.6%^[5]。打破了 SI 夏季少发, 秋冬交替或冬春交替季节多发的历史。因此, 研制和生产安全有效的 SI 疫苗既能保护猪群有效抵抗 SI 的发生, 从而降低经济损失, 又能减少流感对人类的影响。国内已上市的 SI 疫苗中, 以 H1N1 单价灭活苗或 H1N1 和 H3N2 二价灭活苗为主, 以鸡胚工艺和转

收稿日期: 2023-12-27; 修回日期: 2024-10-28

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX (22) 2018]

第一作者: 张秀华, 女, 硕士, 高级兽医师; 吕晓妍, 女, 学士, 助理兽医师。*共同第一作者

*通信作者: 路伟, 博士, 高级畜牧兽医师, E-mail: luwei@sinovetah.com。

瓶工艺居多,正在向悬浮工艺升级的过程中。华威特(江苏)生物制药有限公司的悬浮培养工艺的猪流感二价灭活疫苗已获得临床试验批件。本研究拟调查传代细胞转瓶培养工艺的猪流感二价灭活疫苗(H1N1 LN株+H3N2 HLJ株)对H1N1亚型国内流行毒株的攻毒保护效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

A/Swine/Liaoning/32/2006(H1N1)^[6]简称SIV-H1N1 LN, A/Swine/Heilongjiang/10/2007(H3N2)^[4]简称SIV-H3N2 HLJ株为制苗用毒株, A/Swine/Jiangsu/NL33/2021(H1N1)(简称NL33株)为攻毒毒株,均由华威特(江苏)生物制药有限公司分离、鉴定和保存。猪流感二价灭活疫苗(H1N1 LN株+H3N2 HLJ株)^[7],批号:202206001,以及兔源多克隆抗体均由华威特(江苏)生物制药有限公司提供。

1.2 试验动物及分组

10头4周龄健康易感猪,经SIV RT-PCR检测为抗原阴性,且经微量血凝抑制(HI)试验检测H1N1和H3N2 HI抗体均为阴性(HI效价均 $\leq 1:10$)的猪,随机编号为1~10号,购自江苏省泰州市苏陈养猪场。1~5号为疫苗接种组,每头接种猪流感疫苗2 mL,首免14 d后进行二免;6~10号为对照组,未接种疫苗。

1.3 攻毒程序

首免后28 d攻毒,疫苗接种组和对照组均经气管内注射流行毒株NL33,每头4.0 mL。

1.4 攻毒后监测

攻毒后1~5 d进行上呼吸道症状观察,每日上午8~10点和下午14~16点测定直肠温度,同时观察是否有精神沉郁、流涕、咳嗽、喷嚏等症状出现。攻毒后第3和4天每日上、下午和第5天上午测温后采集鼻拭子进行病毒分离,利用微量红细胞凝集法进行分离毒的血凝价测定,血凝价 $\geq 1:16$ 即判定病毒分离阳性。攻毒后5 d对所有猪进行大体剖检,观察每头猪的肺脏是否出现实变病变,并取肺脏组织放入福尔马林溶液中固定,利用HE染色对肺脏组织进行病理组织染色观察。另外,将肺脏组织切片利用H1N1多克隆抗体作为一抗,委托泰州康为世经生物科技有限公司进行免疫组化染色^[8]。

2 结果

2.1 攻毒后上呼吸道症状

5头疫苗接种猪用H1N1亚型流行毒株NL33攻毒后均未出现猪流感临床症状,对照组5头猪均出现猪流感临床症状。疫苗接种猪攻毒后有两头猪(2和5号)体温 ≥ 40.2 °C且出现2 d,其余3头猪(1、3和4号)体温均 < 40.2 °C。5头对照猪攻毒后均出现体温升高,且体温 ≥ 40.2 °C至少2 d(见表1)。

表1 疫苗接种猪和对照猪用H1N1亚型流行毒株NL33攻击后的体温测定 °C

组别	编号	试验时间/d					
		0	1	2	3	4	5
疫苗接种	1	39.9	40.0	39.9	39.4	39.7	39.3
	2	39.8	41.2	40.2	39.9	39.9	39.4
	3	40.0	40.1	39.9	39.8	39.6	39.5
	4	39.5	40.0	39.7	39.8	40.0	39.6
	5	39.5	40.6	39.8	40.3	39.6	38.8
对照	6	40.0	41.0	41.1	40.2	40.3	39.9
	7	39.8	40.8	40.5	39.9	39.8	39.5
	8	40.1	40.7	40.8	40.3	40.0	39.2
	9	39.2	41.2	40.5	40.8	40.2	39.6
	10	39.5	40.4	40.2	40.2	39.5	39.5

2.2 攻毒后病毒感染检测

5头疫苗接种猪用H1N1亚型流行毒株NL33攻毒后,1头猪(2号)鼻拭子样品的血凝价为1:16,判定为病毒阳性,其余4头猪鼻拭子样品的血凝价均 $< 1:16$,判为病毒阴性;5头对照猪的鼻拭子血凝价均 $\geq 1:16$,均判定为病毒阳性(见表2)。

2.3 攻毒后肺脏病变观察

5头疫苗接种猪用H1N1亚型流行毒株NL33攻击后,其中3头猪(1、4、5号)肺脏无病变,另两头猪(2、3号)肺脏膈叶均有实变病变;5头对照猪攻击后肺脏膈叶均有大面积实变(图1A)。取实变的肺脏组织HE组织病理学染色可见肺脏上皮细胞坏死,支气管上皮细胞脱落,气道充满坏死的上皮细胞和以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润(图1B)。经免疫组化确认,实变的肺脏组织内均有H1N1阳性抗原的表达(见图1C)。

表2 疫苗接种猪和对照猪用 H1N1 亚型流行毒株 NL33 攻击后鼻拭子病毒检测情况

组别	编号	试验时间/d					
		0	1	2	3	4	5
疫苗接种	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
对照	6	-	+	+	+	+	+
	7	-	-	+	+	+	-
	8	-	+	+	+	+	+
	9	-	-	+	+	+	+
	10	-	-	-	+	+	+

注：“-”代表病毒阴性（血凝价 $<1:16$ ）；“+”代表病毒阳性（血凝价 $\geq 1:16$ ）。下同。

活疫苗对国内流行的 H1N1 亚型猪流感病毒攻击具有较好的交叉保护作用（见表3）。

表3 疫苗接种猪和对照猪用 H1N1 亚型流行毒株 NL33 攻击后的临床表现汇总

组别	编号	上呼吸道症状	病毒分离	肺脏实变	保护率/%	发病率/%
疫苗接种	1	-	-	-		
	2	+	+	+		
	3	-	-	+	80	20
	4	-	-	-		
	5	+	-	-		
对照	6	+	+	+		
	7	+	+	+		
	8	+	+	+	/	100
	9	+	+	+		
	10	+	+	+		

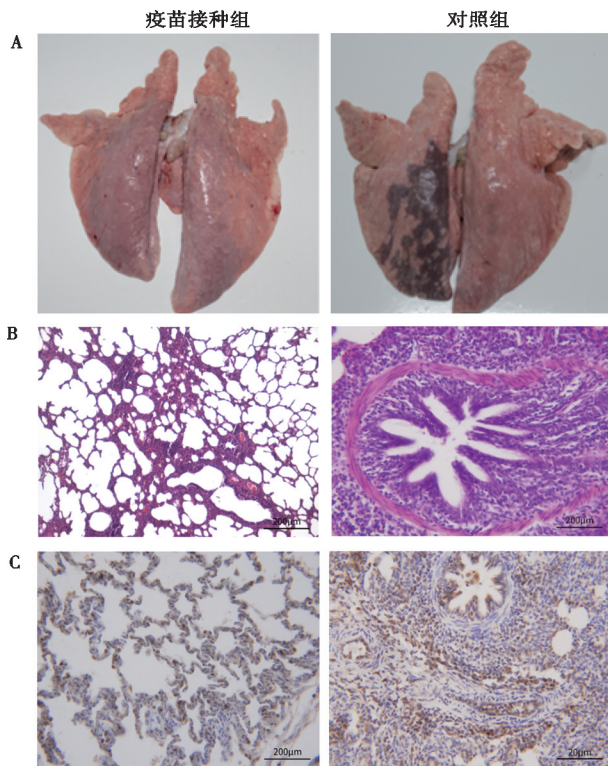


图1 猪攻毒后肺脏 (A)、肺组织 HE 染色 (B) 和免疫组化染色 (C)

2.4 疫苗接种猪和对照猪用 NL33 攻击后临床表现结果汇总

上呼吸道症状、鼻拭子病毒分离、肺脏病变这3个指标同时出现两个即判为发病，否则判为保护。疫苗接种组用 H1N1 亚型流行毒株 NL33 株攻击后 20% 发病，对照组 100% 发病。结果表明，猪流感二价灭

3 讨论

我国猪流感的流行以 H1N1 亚型占主导，其他亚型时有发生，但未形成大规模流行。刘丽萍等^[9] 2012—2013 年采集猪血清 5856 份，SIV 的 H1N1 抗体阳性率 EA H1N1 为 55.52%、2009 甲型 pdm/09H1N1 为 13.92%。魏园园等^[10] 2019—2022 年从辽宁采集猪血清 572 份，pdm/09 H1N1、EA H1N1 和 CS H1N1 阳性率达 53.15%，90% 猪场 SI 抗体阳性。推测 2009 年 H1N1 甲流的 HA 可能是北美地区 SIV 与人甲型流感病毒部分基因重排组而成，H1N1 甲型流感病毒疫苗可能对新型甲型 H1N1 流感病毒保护性达不到效果^[11]。近二十年来，SI 发生频繁，病毒变异重组快，SIV 多亚型和突变型不断出现^[12]。

猪流感二价灭活疫苗的制苗用毒株 SIV-H1N1 LN 株和 SIV-H3N2 HLJ 株均是由国内猪群中分离出的流行毒株，均具有较好的免疫原性。两毒株经过病毒传代和纯化，获得纯净性良好、无外源病毒污染的疫苗毒株，用传代细胞系替代鸡胚进行抗原生产，实现了大规模生产，批间差异小。通过灭活剂的筛选和佐剂的筛选，与优良毒株结合研制成功了猪流感二价灭活疫苗（H1N1 LN 株+H3N2 HLJ 株）。该疫苗具有以下特点：用传代细胞生产，纯净性好，无外源病毒污染；国内首创的猪流感 H1N1 和 H3N2 亚型二价疫苗，一针两防，持续期达 6 个月以上；流行毒株精心筛选，全病毒灭活，安全有效，2~8℃ 保存 18 个月以上；进口双相佐剂（W/O/W），好抽易打。两制苗用毒株的全基因测序已完成，8 段基因序列已上传

至 GenBank 上, SIV-H1N1 LN 株登录号为 HM754645~HM754652, SIV-H3N2 HLJ 株登录号为 HM765429~HM765436。经过 HA 和 NA 基因序列比对, 两制苗用毒株的 HA 和 NA 基因均与国内流行毒株亲缘关系较近^[4,6], 因此用两毒株制备二价苗将对国内 H1N1 和 H3N2 流行毒株攻击应能起到较好的保护作用。经过大量攻毒试验证明, 该二价苗接种猪安全性良好, 疫苗接种猪对制苗用 H1N1 LN 株和 H3N2 HLJ 株两个毒株攻毒保护率均达 100%^[13], 对 2009 年国内分离的 pdm/09 H1N1 流感病毒和 2021 年国内分离的 H1N1 亚型 NL33 株攻毒保护率均达 80%, 充分证明猪流感二价灭活疫苗 (H1N1 LN 株+H3N2 HLJ 株) 接种猪对猪流感流行毒株的攻击具有较好的交叉保护力, 可有效预防猪流感的暴发和流行。

参考文献:

- [1] 黄良宗, 颜广智, 邓汝森, 等. 猪流感病毒广东株分离鉴定及遗传进化分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47 (8): 2625-2633.
- [2] 李海玲, 张世伟, 冯亚莉, 等. 欧亚类禽 H1N1 猪流感病毒研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 2022, 53 (4): 492-503.
- [3] 张金燕, 李刚, 王泽源, 等. 一株 H1N1 亚型猪流感病毒的分离鉴定及小鼠致病性的研究 [J]. 中国动物传染病学报, 2023, 31 (5): 40-47.
- [4] 路伟, 张秀华, 苏玮玮, 等. 一株 H3N2 亚型猪流感病毒株的分离鉴定及对猪的感染性研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40 (1): 66-69.
- [5] 中华人民共和国农业农村部. 2023 年 7 月全国主要动物疫病情况 [EB/OL]. [2023-08-14]. <http://www.xmsyj.moa.gov.cn/yqfb/202308/t20230814-6434213.htm>.
- [6] 路伟, 张秀华, 王秀东, 等. 一株 H1N1 亚型猪流感病毒的分离鉴定及全基因序列分析 [J]. 病毒学报, 2010, 26 (5): 396-401.
- [7] 路伟. 猪流感病毒 H1N1 和 H3N2 亚型分离鉴定及猪流感二价灭活疫苗的研制 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.
- [8] 陈超阳, 张颖雪, 徐聪聪, 等. 1 株 H3N2 亚型猪流感病毒的分离鉴定、基因序列分析及其致病性评价 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44 (9): 1841-1847.
- [9] 刘丽萍, 乔传玲, 杨焕良, 等. 2012 年—2013 年我国养猪重点省份猪流感的血清学调查 [J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36 (6): 431-434.
- [10] 魏园园, 吴浩, 魏澍, 等. 2019—2022 年辽宁省规模场猪流感血清流行病学调查 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2023, 4 (4): 44-46.
- [11] 马英英. 2009—2019 年中国新型甲型 H1N1 流感病毒的进化动力学 [D]. 上海: 中国科学院大学 (中国科学院上海巴斯德研究所), 2020.
- [12] 蒲娟, 刘金华. 动物流感病毒对人类健康的威胁 [J]. 病毒学报, 2023, 39 (3): 877-899.
- [13] SU W W, LU W, ZHANG X H, et al. Protective efficacy of an inactivated bivalent swine influenza vaccine [J]. Ann Biotechnol, 2018, 1 (1): 1004-1007.