

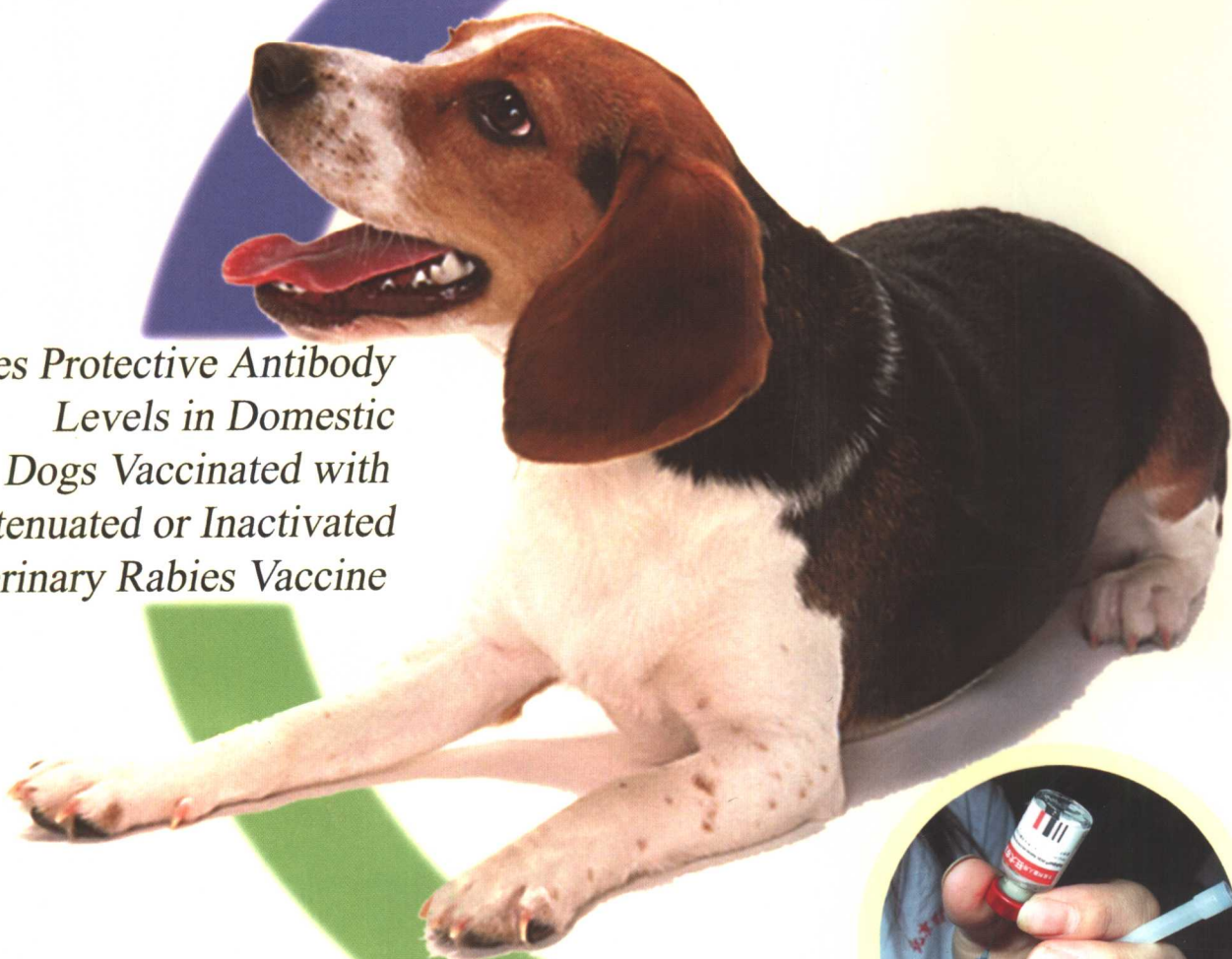


家犬免疫注射兽用狂犬病疫苗后 血清抗体效价的研究及分析

周桂兰 赵德明 著

刘亚清 审校

*Rabies Protective Antibody
Levels in Domestic
Dogs Vaccinated with
Live Attenuated or Inactivated
Veterinary Rabies Vaccine*



中国农业出版社

家犬免疫注射兽用狂犬病疫苗后 血清抗体效价的研究及分析

Rabies Protective Antibody Levels in Domestic Dogs
Vaccinated with Live Attenuated or Inactivated Veterinary Rabies Vaccine

周桂兰 赵德明 著

刘亚清 审核

中国农业出版社



前言

自新中国成立以来,狂犬病在我国已出现3次流行和发病高峰,最严重的是80年代初期,因狂犬病年死亡人数约7 000人。1997年以来,中国的狂犬病发病和死亡人数直线攀升。日本、法国、英国、美国等国家狂犬病已控制和消灭多年,而中国狂犬病流行,近几年发病死亡人数居世界前2位之内,作为一名兽医预防工作者我深感责任重大。

北京是首都,犬猫类宠物饲养量较大,我十分担心发生狂犬病。为此,我努力争取在狂犬病预防与控制方面多做工作,同时也得到了关爱生命的人们热心帮助与支持。在克服了重重困难的情况下,以我为主的与狂犬病作斗争的专家们检测了狂犬病弱毒活疫苗的免疫效果及安全问题,同时也检测了狂犬病灭活疫苗的免疫效果与安全性,总结了狂犬病预防与控制技术。

为了拯救众多的生灵免受狂犬病的杀戮,为了使众多的中国人不再受狂犬病的威胁,同时也为狂犬病流行的国家和地区控制狂犬病提供技术参考,更重要的是为我国的兽医管理部门、科研人员、狂犬病疫苗生产企业提供科学的参考数据,以利于提高我国的疫苗质量,我把自己和几位国内著名的专家、学者在科研和实践的基础上总结出来的狂犬病预防技术,详细在本书中予以介绍。如果能在全国狂犬病预防与控制的工作中做出自己的应有贡献,将是我一生中最大的光荣,我总算为国家、为人民做了点有益的事情。

作者

2005年10月15日于北京



摘要

为了探索有效的预防和控制狂犬病发生的重要途径,进行了兽用狂犬病(ERA株)活疫苗和进口兽用狂犬病灭活疫苗免疫效果比较实验,本项实验采用小鼠中和试验和RFFIT试验方法,分别对63只注射了狂犬病(ERA株)活疫苗的健康成年家犬和102只注射了狂犬病灭活疫苗的健康成年家犬进行了免疫抗体监测(按OIE标准,血清抗体滴度 $\geq 0.5\text{IU/ml}$ 为免疫保护标准)。采用ELISA方法监测试验犬唾液中的狂犬病毒抗原。

1. A厂生产的兽用狂犬病(ERA株)活疫苗免疫接种35只成年健康家犬后,经小鼠中和试验监测免疫犬血清抗体,首免6个月后,其中10只(28.57%)犬免疫达标;首免8个月后仅有2只(5.71%)犬免疫达标。对首免6个月后血清抗体滴度未达保护标准的22只家犬进行第2次免疫,2个月后,其中18只(81.82%)犬免疫达标。

2. B厂生产的兽用狂犬病(ERA株)活疫苗免疫接种28只成年健康家犬,采用小鼠中和试验法,定期监测犬接种疫苗后的血清抗体滴度。结果表明:28只成年健康犬连续接种兽用狂犬病(ERA株)活疫苗3次(免疫间隔1个月),首免3周后,其中13只(46.43%)犬免疫达标;2免3周后,其中20只(71.43%)犬免疫达标;3免2个月后,抽检16只犬全部免疫达标。进一步跟踪监测免疫抗体,3免7个月后,28只试验犬中仅有7只犬(25%)免疫达标。在3免后第8、10、11个月,用ELISA方法检测试验犬唾液中的狂犬病毒抗原,从20只试验犬中检出8只狂犬病毒抗原阳性。

3. 进口兽用狂犬病灭活疫苗免疫注射21只成年健康家犬后,采用小鼠中和试验法,定期监测犬接种疫苗后的血清抗体滴度。结果表明:注射疫苗21天后,其中20只(95.24%)犬免疫达标,注射疫苗6个月后,其中12只(57.14%)犬免疫达标。在注射疫苗后的第8、10、11个月,用ELISA方法检测试验犬唾液中的狂犬病抗原,发现其中2只曾经有过兽用狂犬病(ERA株)活疫苗接种史的犬唾液狂犬病抗原阳性。

4. 自2004年12月1日至2005年3月20日对注射进口狂犬病灭活疫苗



家犬免疫注射兽用狂犬病疫苗后血清抗体效价的研究及分析

的家犬采集血样,共采血样81份,采用快速荧光斑点抑制实验(RFFIT)检测方法,检测其血清。结果表明:连续免疫接种狂犬病灭活疫苗3次以上的犬(免疫间隔1年),检测26只,血清抗体滴度均在0.5 IU/ml以上(免疫达标率100%);连续免疫接种狂犬病灭活疫苗2次的犬(免疫间隔1年),检测17只,其中15只免疫达标(达标率88.24%);免疫接种狂犬病灭活疫苗1次的犬,检测24只,其中15只免疫达标(达标率62.50%);抽检14只免疫记录不详的犬,其中7只免疫达标(达标率50%);另外抽检5只未曾接种过狂犬病疫苗的犬只,狂犬病血清抗体均为阴性。

根据兽用狂犬病(ERA株)活疫苗和狂犬病灭活疫苗免疫接种家犬后的血清抗体监测情况和唾液中狂犬病毒抗原的检测结果,推论狂犬病灭活疫苗比A厂和B厂生产的兽用狂犬病(ERA株)活疫苗免疫后的血清抗体滴度高、持久性好、安全。伤口及时处理与紧急免疫注射狂犬病灭活疫苗是预防和控制狂犬病发生的关键。研发和家养动物免疫注射兽用狂犬病灭活疫苗将是我国控制和消灭狂犬病的重要途径。

关键词: 狂犬病 疫苗 免疫 检测 抗体 病毒



Abstract

In this study, in order to compare the vaccination effect of live rabies vaccine and inactivated rabies vaccine, 63 health pet dogs vaccinated with live rabies virus vaccine (ERA strain) and 102 health pet dogs vaccinated with inactivated rabies virus vaccine were monitored for rabies specific protective antibody using mouse neutralization assay or RFFIT in both titers equal or higher than 0.5 IU/ml were considered positive. And virus shedding was monitored by virus antigen ELISA.

In 35 health pet dogs vaccinated with live rabies vaccine (ERA) produced by company A, 10 dogs showed positive serum antibody levels at 6 months after the first vaccination (28.57%), but the level dropped to 2 dogs (5.71%) seropositive at 8 months of the first vaccination. Among the dogs having no protective antibodies at 6 months after the first vaccination, 22 were vaccinated once again and at 2 months after the second vaccination, 18 dogs out of the 22 (81.82%) examined were seropositive.

In 28 health pet dogs vaccinated with live rabies vaccine (ERA) produced by company B, they were vaccinated once a month for three months. At three weeks after the first vaccination, 13 dogs (46.43%) were seropositive. At three weeks after the second vaccination, 20 dogs (71.43%) were seropositive. At two months after the third vaccination, 16 dogs were sampled and all (100%) were seropositive. And at seven months after the third vaccination, only 7 out of 28 dogs (25%) were seropositive. Meanwhile, at eight months, ten months and eleven months after the third vaccination, rabies antigen in sputum was examined with ELISA, and 8 out of 20 dogs were positive.

In 21 health pet dogs vaccinated once with inactivated rabies virus vaccine, 20 dogs (95.24%) were seropositive at 21 days after vaccination, and 12 dogs (57.14%) were positive at 6 months after the vaccination. And after eight, ten and eleven months, rabies antigen in sputum was examined with ELISA, and 2 dogs with history of vaccination with live rabies vaccine (ERA) were antigen



positive.

A total of 81 blood samples were collected from domestic dogs vaccinated with inactivated rabies virus vaccine from December 1, 2004 to March 20, 2005, and these serum samples were examined by RFFIT. Of which, 26 dogs vaccinated with inactivated rabies vaccine once a year in three years were 100% positive for serum antibodies. In 17 dogs vaccinated with inactivated rabies vaccine once a year for two years, 15 out of 17 dogs (88.24%) were seropositive. In 14 dogs with unknown vaccination record, 7 out of 14 dogs (50%) were seropositive. And all 5 dogs with no vaccination history were seronegative.

Based on monitoring serum antibody levels and rabies virus in sputum in dogs vaccinated with either a live or an inactivated rabies virus vaccine, we conclude that the inactivated rabies virus vaccine had better effect in evoking antibody production, antibody duration and safety. Vaccination with inactivated rabies vaccine and treating bites in time were key to the prevention and control of rabies. Research on the inactivated rabies vaccine on pet animals is important for the control and eradication of rabies in China.

Keys: rabies vaccine immunity, monitor antibody virus



英文缩写表

续表

缩略词	英文全称	中文全称
FAT	Fluorescent Antibody Test	荧光抗体实验
IHA	Indirect Haemagglutination Test	间接血凝试验
IP	Intraperitoneal	腹膜内注射
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay	酶联免疫吸附试验
IM	Intramuscular	肌肉注射
SC	Subcutaneous	皮下注射
FAVN	Fluorescent Antibody Virus Neutralization	荧光抗体病毒中和试验
RFFIT	Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test	快速荧光斑点抑制试验
RTCIT	Rabies Tissue Culture Infection Test	狂犬病组织培养感染实验
LD ₅₀	50% Lethal Dose	50% 致死量
MIT	Mouse Infection Test	小鼠感染试验
MNT	Mouse Neutralization Test	小鼠中和试验
IU	International Units	国际单位
CVS	Criterion Virus Strain	狂犬病标准毒株
VNT	Virus Neutralizing Test	病毒中和试验
WHO	World Health Organization	世界卫生组织
OIE	Office International Des Epizooties (法文)	世界动物卫生组织
CDC	Centers For Disease Control	疾病控制中心
RV	Rabies Virus	狂犬病毒
SPF	Specific Pathogen Free	无特定病原体

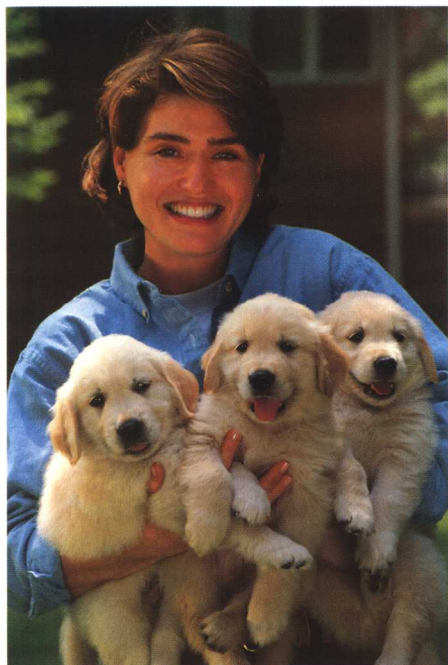


法国维克公司简介

法国维克公司 (Virbac S.A.) 成立于1968年, 是一家专门从事动物药品及保健品生产、研发和销售的跨国公司, 年销售额达4亿欧元, 为全球十大动物保健品公司之一。其产品覆盖宠物、家畜、和家禽等领域。维克公司在全球有23家分支机构, 与100多个国家有业务往来。同时, 维克公司在法国、美国、澳大利亚、巴西、墨西哥和越南设有研发机构, 并在这些国家都设有工厂, 生产宠物、家禽及家畜产品。2003年1月, 法国维克有限公司北京代表处正式成立, 这标志着维克公司将努力拓展在华业务。



维克公司深谙研究和开发是保持在动物保健领域前进的主要动力, 每年更将销售额的8%投入生物学的基本研究和药品应用研究。维克公司拥有全球惟一的猫白血病基因工程疫苗 (Leucogen) 以及世界卫生组织 (WHO) 指定使用的狂犬灭活疫苗 (Rabigen Mono)、犬六联苗 (Canigen DHA2PPiL)、犬七联苗 (Canigen DHA2PPiL/R)、犬窝咳疫苗 (Canigen KC)、猫三联 (Feligen CRP) 等符合欧盟标准的高品质疫苗; 更重要的是, 这些疫苗完全由维克公司自己的工厂生产, 其品质得到了很好的保证!



除此之外, 维克公司在犬猫皮肤病领域的预防及治疗药品和保健品占全球55%以上的市场份额, 处于绝对领先的地位。我们有理由相信, 维克公司凭借其全球化的优质产品和服务, 必将成为中国动物保健行业忠诚的合作伙伴!

维克VIRBAC, 动物健康的好伙伴!



第一章 文献综述

狂犬病 (Rabies) 俗称疯狗病, 是一种高度致死性传染病, 该病由狂犬病毒属的嗜神经病毒引起, 可在所有哺乳动物中传播, 主要通过咬伤、破损皮肤、粘膜或吸入传染性病毒而感染。人一旦被携带狂犬病毒的动物咬伤或抓伤后, 狂犬病毒经伤口周围的神经末梢进入神经系统, 沿着神经移动, 进入大脑, 引起全脑炎。病人以脑炎症状为主, 后期出现典型的对风、光、水刺激敏感症状 (恐水、怕光), 最后麻痹、衰竭而死。

1. 狂犬病疫情现状

1.1 国际概况

据世界卫生组织 (WHO) 2004 年报告: 狂犬病已广泛流行于世界各地。目前约有 90 多个国家流行此病, 而以亚、非、拉地区最为严重。其中, 在亚洲和非洲每年约有 55 000 人死于狂犬病, 且大部分受害者是孩子, 30%~50% 的狂犬病例报告是 15 岁以下的儿童, 中国狂犬病死亡人数位居第二。然而, 法国、英国、美国、日本、马来西亚、中国台湾等国家和地区已成功地控制甚至消灭狂犬病多年。

1.2 国内概况

据中国卫生部报告: 2002 年狂犬病发病人数 1 191 人; 2003 年狂犬病发病人数 2 037 人; 2004 年因狂犬病死亡 2 651 人; 2005 年上半年狂犬病发病人数为 920 人, 其病死率为 100%。自 1997 年至今, 我国狂犬病对人的危害持续上升, 其病死率和死亡人数均居人类各种法定报告传染病前 2 位之内, 中国狂犬病人 93% 由家犬引起, 6% 由猫引起, 另外还有为数不多的由猪和老鼠引起^[1]。目前, 狂犬病疫区呈由南向北扩展趋势。

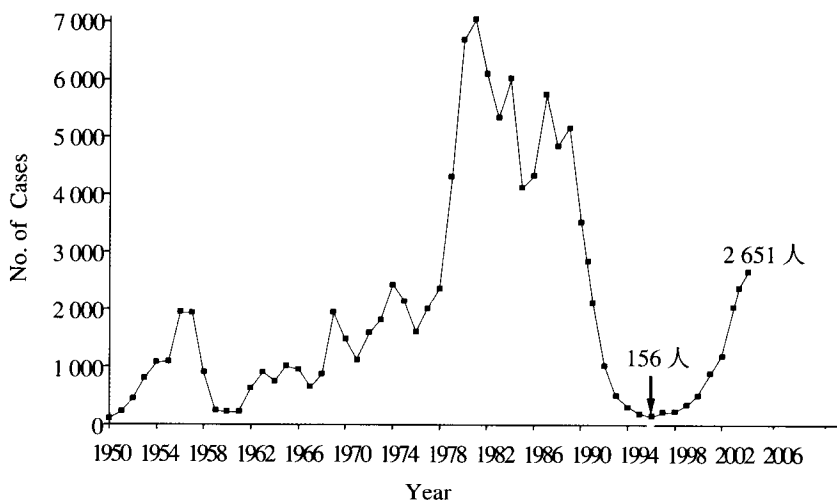


图 1-1 1950—2004 年中国狂犬病人发病情况回顾 (病死人数)



2. 狂犬病临床症状新动向

传统狂犬病分狂暴、麻痹两种类型。典型的狂暴型狂犬病例经过前驱期、兴奋期、麻痹期。近年来，呈典型狂犬病临床症状的发病动物较少见，多呈隐性带毒，经检测发现：犬类隐性带毒率 10%~30%，呈南高北低的趋势。人类狂犬病发病症状也出现新的变化，在泰国目前约 20% 的狂犬病人不出现典型的“恐水、怕光、狂暴”狂犬病症状，我国狂犬病人也出现类似的情况，往往被误诊为脑炎、脊髓炎等病^[2]。



图 1-2 有狂犬病症状的狗，行为异常，攻击人畜



图 1-3 部分唾液中携带狂犬病毒的狗，无发病症状



图 1-4 经细胞培养的狂犬病毒

3. 预 防

对家养动物定期注射狂犬病灭活疫苗和对野生动物口服基因工程狂犬病疫苗是预防和控制狂犬病传播和减少危害的主要方法。对伤口及时消毒处理是预防狂犬病发生的关键环节。

被动物咬伤或抓伤后：第一步，迅速用 10%~20% 的浓肥皂水彻底清洗伤口，清洗时间不少于 20 分钟。第二步，用大量的清水冲洗伤口，冲洗时间不少于 10 分钟，彻底清除局部的病毒和脏物。第三步，用碘酒（有效碘 0.5%）或 75% 的酒精涂擦伤口 4~5 次，彻底对伤口消毒。第四步，去医院接受治疗并



且紧急注射狂犬病灭活疫苗(0、3、7、14、28天,共5次)^[3]。

4. 检测狂犬病免疫抗体及狂犬病活疫苗 安全性实验研究进展

4.1 国内检测家犬狂犬病免疫抗体有关报告

张刚等(1997)^[4]为了探索家犬免疫兽用狂犬病疫苗后抗体水平的消长规律,对用狂犬病疫苗免疫后的犬进行了抗体水平监测研究。试验疫苗采用ERA兽用狂犬病冻干疫苗,检测方法采用酶标葡萄球菌A蛋白作第二抗体的间接酶联免疫吸附试验。判断标准:P/N<2.1为阴性,P/N>2.1为阳性。试验结果表明,家犬正常注射疫苗(每只犬1ml)后15天产生抗体,60天达到最高,群体达标率85.0%,随之到5个月降为72.5%,基本达到群体保护作用,实际有效期为说明书保护期1a的一半,因此按正常剂量使用时需要每半年注射1次。增加注射剂量(1.5ml)的犬,抗体产生并维持时间较长,66.7%的犬抗体保持时间达1a。郭万柱等(1994)^[5]研究报告了应用ABC—ELISA和SPA—ELISA检测狂犬病疫苗免疫犬后血清中的抗体水平,并比较了两种方法的特异性、敏感性和重复性,结果显示两种方法均适用于检测狂犬病血清抗体水平。王为民等(1989)^[6]报告了应用斑点酶联免疫吸附法对狂犬病疫苗抗体水平监测的研究。周桂兰等(2004)^[7]报告了兽用狂犬病(ERA株)活疫苗首次免疫接种成年健康家犬6个月后,经小鼠中和试验监测免疫犬血清抗体,28.57%的犬血清抗体滴度高于0.5IU/ml(达OIE和WHO共同推荐的狂犬病免疫抗体保护标准)。首免后6个月进行第2次免疫,2免2个月后监测,81.82%(免疫达标率)的犬血清抗体滴度高于0.5IU/ml。

4.2 国外检测家犬狂犬病抗体有关报告

Morshedi等(2002)^[8]报告了在乌尔米耶(Urmia)用ELISA方法检测预防接种和没有预防接种狂犬病疫苗的狗(pet dogs and stray dogs)血清抗体,结果表明:在60份血样中,49例(81.6%)血清抗体滴度达保护(0.5~2.4IU/ml)。但是,未注射狂犬病疫苗的狗,血清抗体为0,有6只注射了3次狂犬病疫苗的狗,血清抗体滴度最高(2.4IU/ml),单独注射1次狂犬病疫苗的犬往往免疫失败。Shimazaki等(2003)^[9]报告了日本狂犬病疫苗对家狗的免疫应答,采用RFFIT法检测家狗的血样,结果表明:首免1个月后,抗体水平1.0~2.0IU/ml,1年后抗体水平下降到0.2~1.5IU/ml;2免后抗体水平增加到12~47IU/ml;2免后,87份血样中有65份(74.7%)血清抗体滴度>0.1IU/ml;1岁内的幼狗57%血清抗体滴度>0.1IU/ml。Osinubi等(1999)^[10]报告了狗经过3次狂犬病活疫苗和狂犬病灭活疫苗免疫后,血清抗体100%阳转,第1次接种疫苗后7天抗体阳转,第3次接种疫苗后3天抗体阳转。Trom BioBest于2003年报告了英国人携带宠物外出旅行时对犬猫的狂犬病抗体检测情况,经过对4342只狗和718只猫的检测数据统计分析发现:在1次免疫C狂犬病灭活疫苗的情况下,180天内的幼犬免疫失败率为10.3%(血清抗体滴度≤0.5IU/ml判定为免疫失败),180~4500天的成年犬免疫失败率为5.7%,大于4500天的老犬免疫失败率为12.5%,免疫失败率与取血样时间有关,取样与疫苗接种间隔时间越长,免疫失败率越高,疫苗接种后0~14天、15~21天、22~28天、29~35天、36~42天、43~56天、57~70天、71~90天、91~120天、121~184天、185~365天的免疫失败率分别为:3.2%、5.6%、3.4%、4.7%、4.7%、9.5%、13.0%、23.2%、36.2%、20%、21.4%。经过2次或3次加强免疫的犬,免疫失败率分别降低到1.5%、0%。

4.3 狂犬病疫苗注射部位对免疫效果的影响报告

Wunderli等(2003)^[11]报告了对2213只老鼠以不同的途径注射狂犬病灭活疫苗后,脑内攻毒,结果表明:肌肉注射(IM)和腹膜内注射(IP)血清抗体滴度最高,达标率最高,IM和IP两种疫苗注射



效果无显著差异。皮下注射 (SC) 比 IM、IP 免疫效果差。

4.4 犬科动物狂犬病母源抗体的研究报告

Vos 等 (2001) ^[12] 报告了 10 只幼小犬科动物 (raccoon dogs) 狂犬病母源抗体的检测结果, 出生后的第 31、36、43、50、57、64 天, 血清母源抗体滴度分别是 1.19、1.18、0.45、0.25、0.25、0.16 IU/ml。

4.5 狂犬病活疫苗的安全性实验研究有关报告

贾元宏等 (2002) ^[13] 报告了犬用口服狂犬病减毒活疫苗猴体安全性试验研究, 用高于现场 4 倍浓度疫苗肌肉注射猴体后, 采血进行中和抗体检测。结果: 猴体肌肉注射疫苗后均健康存活, 中和抗体 1 个月为 1:13.8~19.5, 2 个月上升为 1:33.5~1:37.6, 结论: CTN—22 毒株制备的犬用口服狂犬病减毒疫苗是安全的, 可靠的。唐学慧等 (1999) ^[14] 报告了犬用口服狂犬病减毒活疫苗 (CTN—22 毒株) 的安全实验研究, 结果: 口服免疫的 5 只猫和口服、注射免疫的各 5 只黄毛鼠, 观察 21 天, 无任何症状发生, 均健康存活; 用本疫苗 10 个现场使用剂量的 1ml, 各对 5 只家犬肌肉和大隐神经及其周围组织浸润注射后, 观察 3~35 天, 无狂犬病症状, 免后观察 6 个月未显示狂犬病任何征象, 均健康存活。

Dr.Bourhy 于 2004 年 3 月 25 日 ^[15] 在狂犬病学术讲座会上报告了在法国、英国、美国等国家, 法律规定禁止家养动物使用狂犬病减毒活疫苗的情况, 有关狂犬病减毒活疫苗安全方面的研究未见报告。

5. 本试验的目的和意义

为了预防控制和逐步消灭狂犬病, 怎样使用现有的兽用狂犬病疫苗, 才能使 95% 以上的免疫家犬尽早获 OIE 和 WHO 共同推荐的血清抗体滴度 ≥ 0.5 IU/ml 的保护标准, 是亟待解决的家犬狂犬病预防免疫技术。获狂犬病免疫抗体保护水平的家犬, 保护期能维持多长时间? 是做好家犬狂犬病免疫工作急需要解决的重要问题。经过免疫注射狂犬病疫苗的犬, 唾液中是否仍携带狂犬病毒, 也无此方面的研究报告, 是预防狂犬病发生需要解决的重要问题。2003 年北京市有 90% 以上的家犬紧急接种了狂犬病疫苗, 下一步工作如何做? 怎样使 90% 的狂犬病疫苗注射犬的血清抗体滴度达保护水平? 本项目是解决上述问题的关键。



第二章 试验设计

1. 试验名称

家犬免疫注射兽用狂犬病疫苗后血清抗体效价的研究及分析。

2. 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 试验动物

2.1.1.1 小鼠 SPF 试验小鼠（中国药品检定所、武汉生物制品研究所提供）。

2.1.1.2 试验犬 共分4组：第1组35只，第2组28只，第3组21只，第4组86只。

第1组、第2组、第3组均为金民养犬场提供的6月龄至5岁的成年健康家犬品种，饲养方式、营养配餐、饲养环境、饲养员均相同。

第1组、第2组试验犬在试验前均未曾注射过任何狂犬病疫苗。

第3组中的1号、2号、3号、4号、5号、6号、7号、8号、9号、10号、11号、12号、18号试验犬，在本试验前1年均有过1次兽用狂犬病（ERA株）活疫苗的接种史。

第4组为随机抽样的北京市民家庭养犬，其中81只均有狂犬病灭活疫苗的注射历史，另外5只未曾注射过狂犬病疫苗作为对照。

2.1.2 被检疫苗品种

2.1.2.1 A厂生产的兽用狂犬病（ERA株）活疫苗，批号为020909，有效期1年。

2.1.2.2 B厂生产的兽用狂犬病（ERA株）活疫苗，批号为030618，有效期1年。

2.1.2.3 C进口兽用狂犬病灭活疫苗，批号为73127A，有效期4年。

2.1.2.4 北京市居民的家犬在2003—2005年间免疫注射常用的进口狂犬病灭活疫苗。

2.1.3 疫苗效力测定（NIH法）^[16]

2.1.3.1 攻击毒株的制备 攻击毒株（CVS）由国家药品管理部门提供。启开冻干毒种，稀释成 10^{-2} 悬液，用体重11~13g小鼠，脑内接种0.03ml，连续传2~3代，收脑时应选择4~5天有典型狂犬病症状小鼠。将鼠脑研磨并加入适量含正常马血清或小牛血清蒸馏水，制成20%悬液，经1000r/min沉淀10分钟，经用体重18~20g小鼠10只做病毒滴定及无菌试验，符合要求后，方可作攻击毒用。分装小管，-60℃保存。

2.1.3.2 参考疫苗 由国家药品管理部门制备。

2.1.4 小鼠中和试验（MNT）

2.1.4.1 病毒 狂犬病标准毒，为中国药品检定所保存。

2.1.4.2 标准血清 狂犬病标准血清，为中国药品检定所保存。

2.1.4.3 小鼠 见第二章，2.1.1.1

2.1.4.4 实验犬 见第二章，2.1.1.2



2.1.4.5 疫苗 见第二章, 2.1.2

2.1.5 狂犬病毒抗原诊断试验 (ELISA)

ELISA 试剂盒 武汉生物制品研究所生产。



图 2-1

2.1.5.1 已包被的酶标可拆板条 48 孔 (12 × 4)

2.1.5.2 阳性病毒对照 (冻干, 已灭活) 1 瓶 (1ml)

2.1.5.3 样品稀释液 (2 ×) 1 瓶

2.1.5.4 酶结合物 1 瓶

2.1.5.5 洗涤液 (30 ×) 1 瓶

2.1.5.6 底物 A 1 瓶

2.1.5.7 底物 B 1 瓶

2.1.5.8 终止液 1 瓶

2.1.5.9 牛白 1 支

2.1.6 快速荧光斑点抑制试验 (RFFIT)

2.1.6.1 细胞、病毒和血清 BHK21/BSR 细胞, 已适应该细胞系的 RV 攻击病毒 CVS 株 (ATCC VR 959), 以及已知中和滴度 (IU/ml) 的抗 RV 标准血清 (批号 I-1995-10-11) 由法国巴斯德研究所 Herry Tsiang 博士惠赠。

2.1.6.2 主要试剂和仪器 细胞培养基: D-MEM, GibcoBRL 产品。Lab-Tak 细胞培养载玻片, Nunc 产品。Falcon 96 孔平底细胞培养板。Opton 荧光显微镜。抗 RV NP 荧光标记抗体: 参考标准品为法国巴斯德 Sanofi 诊断用品公司产品 (批号 6E 022U), 本文简称 pNF; 武汉生物制品研究所自制的相应产品, 本文中简称 mNF。

2.2 方法

按 OIE 推荐的《WHO 狂犬病实验技术》标准, 测定狂犬病疫苗效力和监测狂犬病疫苗免疫犬的血清抗体, 以及抽检试验犬唾液中的狂犬病毒抗原。

2.2.1 疫苗效力测定试验步骤^[16]

2.2.1.1 待检疫苗免疫 取待检疫苗, 用 pH 7.6、0.07mol/L 的 PBS 做 5 倍系列稀释, 采用 3 个稀释度进行免疫: 1:5、1:25 和 1:125。同时, 参考疫苗作 1:25、1:125 和 1:625 稀释, 选用体重 12~



14g 小鼠, 每个稀释度免疫 16 只, 每只腹腔接种 0.5ml, 间隔 1 周后再免疫 1 次, 免疫时将疫苗保存于冰浴中, 各组小鼠在同样条件下饲养, 并预留 40 只同批小鼠作待测攻击病毒 LD_{50} 用。

2.2.1.2 攻击 小鼠于第 1 次免疫后 14 天, 用预先测定每 0.03ml 含 5~100 个 LD_{50} 的病毒量脑内攻击 0.03ml/只。病毒测定用 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} , 每稀释度 8 只。疫苗免疫组小鼠每个稀释度为 16 只, 所有小鼠自攻击之日起观察 14 天。攻击后最初 4 日内死亡的小鼠不作统计, 第 5 天后死亡和呈现典型脑病症状的小鼠进行计算统计。

2.2.1.3 结果计算

2.2.1.3.1 ED_{50} 计算。先测定各免疫组的 ED_{50} 值;

2.2.1.3.2 疫苗效力的计算:

$$\text{疫苗效力} = \frac{\text{待测疫苗的 } ED_{50}}{\text{参考疫苗的 } ED_{50}} \times \frac{\text{待测疫苗 (ml/剂)}}{\text{参考疫苗 (ml/剂)}} \times \text{参考疫苗效价 (IU)}$$

原病毒悬液注射的小鼠 80% 以上死亡, 攻击病毒含量为 5~100 个 $LD_{50}/0.03\text{ml}$ 。OIE 标准: 犬用狂犬病疫苗抗原效价 $\geq 1\text{IU}$ 为合格^[17]。

2.2.2 小鼠中和试验方法 (MNT)^[16]

2.2.2.1 血清抗体监测 用变量的被测血清在体外中和恒量狂犬病毒 [$50LD_{50}$ (50% 致死量) / 0.03ml 攻毒标准株 CVS], 37°C 作用 90 分钟。将每一个稀释度的病毒—血清混合液脑内接种 5 只 3 周龄小鼠, 0.03ml/只。接种后观察到第 21 天, 记录死亡率, 接种后 4 天内死亡的为非特异性死亡。血清滴度的计算按血清—病毒混合液使 50% 的小鼠 (不中和时 100% 致死) 获保护的血清最高稀释度, 与国际标准血清相比较, 以国际单位 (IU/ml) 表示。

2.2.2.2 疫苗注射方法 狂犬病活疫苗生理盐水稀释后, 30 分钟内颈背部皮下注射。

狂犬病灭活疫苗直接颈背部皮下注射。

2.2.3 狂犬病毒抗原诊断 (ELISA) 试验步骤

2.2.3.1 将样品稀释液用蒸馏水 2 倍稀释成工作浓度 (并将牛白按 0.5%~1% 加入), 取 1ml 加入阳性病毒对照瓶中溶解。

2.2.3.2 直接取待检动物唾液 0.5ml, 加入各自对应孔中, 其中待测样品各 1 孔, 阴、阳性对照各 2 孔, $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 。设 2 孔为空白对照, 只加样品稀释液, $100\mu\text{l}/\text{孔}$, 将酶标可拆板置湿盒内, 37°C 温育 1 小时。剩余的阳性病毒对照及板条保存于 -20°C 备用。

2.2.3.3 将浓缩的洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释成工作浓度, 取出酶标板, 甩干, 将洗涤液加满各孔, 倾出, 甩干, 洗板 6 次, 每次必须甩干。

2.2.3.4 取酶结合物加入各孔, (空白对照孔不加酶结合物) $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 或 2 滴, 置湿盒内, 37°C 温育 0.5 小时。

2.2.3.5 取出酶标板, 倾出液体, 甩干, 洗板 6 次。

2.2.3.6 将底物 A、B 各一滴加入各孔中, 置湿盒内 15 分钟。将终止液加入各孔, $50\mu\text{l}/\text{孔}$ 或 1 滴, 终止反应。

2.2.3.7 结果判断 空白和阴性对照孔无色, 而阳性对照孔显兰色, 结果成立。加终止液后, 以空白两孔的平均数调零, 在酶标仪上测定 450nm 处各孔 A 值, 阴性对照 A 值 ≤ 0.1 , 待测样品 A 值 ≥ 0.2 者, 表明为狂犬病毒抗原阳性。

2.2.4 快速荧光斑点抑制试验 (RFFIT) 方法

2.2.4.1 细胞培养 RV 的快速滴定和最适攻击病毒剂量的确定 组织培养 RV 的快速滴定按文献^[18], 待测 RV 样品经系列稀释后感染 BSR 细胞, 细胞质内的包涵体 (主要成分为 RV 的 NP) 的荧光可在 24 小时 (固定毒) 或 48 小时 (街毒) 后检测到。通常在低倍显微镜 (160X) 下检查 20 个视野 (用 Lab-Tak 载



玻片时), 或 8 个视野 (微量法, 用 96 孔细胞培养板时)。滴度用 Reed&Muench 方法计算, 用荧光灶单位 (FFU/ml) 表示。进行 RFFIT 时攻击病毒采用 CVS 株, 病毒的最适攻击剂量为经 24 小时温育后能被 80% 的细胞感染 (产生荧光包含体) 的最高稀释度。

2.2.4.2 快速荧光斑点抑制试验 将固定量的 CVS 病毒与系列稀释的待测血清 (包括已知滴度的参考血清) 一起温育 (体外中和反应), 然后加入敏感细胞 (BSR) 悬液。经 24 小时温育后, 细胞单层用丙酮固定, 用荧光标记的抗 NP 抗体染色, 以检测未被中和的病毒的存在 (荧光灶)。与病毒对照组比较, 计算每种待测血清使用固定量 CVS 病毒的 FFU/ml 减少 50% 的稀释度, 然后与已知滴度的参考血清比较, 计算每种待测血清的中和抗体滴度。

3. 检测项目与分组

3.1 A 兽用狂犬病 (ERA 株) 活疫苗免疫效果监测

A 厂生产的兽用狂犬病 (ERA 株) 活疫苗免疫效果监测, 共监测 35 只成年健康家犬, 为第 1 试验组。

3.2 B 兽用狂犬病 (ERA 株) 活疫苗免疫效果监测

B 厂生产的兽用狂犬病 (ERA 株) 活疫苗免疫效果监测, 共监测 28 只成年健康家犬, 为第 2 试验组。

3.3 C 进口狂犬病灭活疫苗免疫效果监测

C 进口狂犬病灭活疫苗免疫效果监测, 共监测 21 只成年健康家犬, 为第 3 试验组。

3.4 北京市民家狗注射进口狂犬病灭活疫苗免疫效果监测

北京市民家狗常用的进口狂犬病灭活疫苗免疫效果监测, 共监测 86 只成年健康家犬, 为第 4 试验组。

4. 试验室操作条件

生物安全 III 级, P3 实验室

中国药品检定所、武汉生物制品研究所、中国农业大学动物医学院、中国 CDC 流研所均在本项目执行过程中给予了试验支持与合作。



图 2-2