

使用血清方法评估TS-11和MS-H疫苗效果

温度敏感性 (TS) 的支原体活苗是非常安全而能够产生足够的免疫原性的。在这种情况下，我们怎么能在现场上评估这些产品的免疫原性呢？

本公告中总结了疫苗在过去20年中的监测和正常反应下出现的问题。我们采用了不同的方法来提高血清学监测 (比如：克隆同源抗原) 和了解问题，结论还是抗体并非是支原体免疫的主要保护方式且与疫苗的保护作用非相关。由于血清检测和免疫效率不相关，检测结果对鸡群免疫效果评估就失去了作用，且检测结果让人费解，容易造成资源和成本的浪费。

TS-11和MS-H免疫后的血清学反应

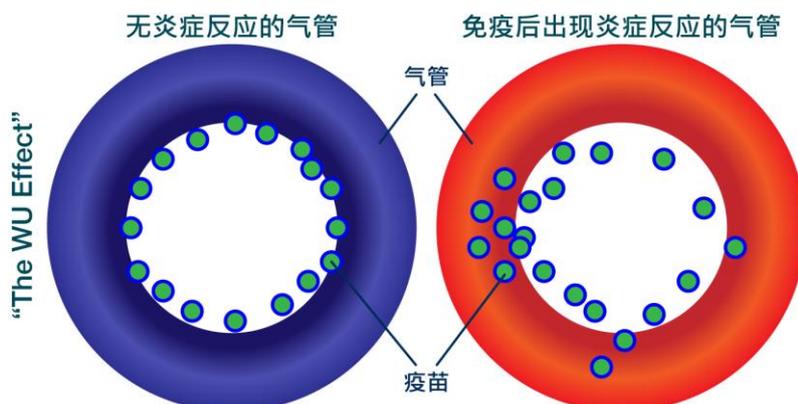
由于血清学对TS-11和MS-H的反应可变，因而其对于野毒株的监测和免疫操作的用途是有限的。可以说，使用血清来评估免疫效率极大程度上造成了成本的浪费。

使用滴度偏压区分接种和感染鸡群的方法在实际应用中不起作用。随着疫苗产品不断发展，如今即使在对新城疫的检测中，这种方法也往往被忽略。在支原体方面，血清学检测结果的可靠性就更低了。

区别于野毒感染，经TS-11和MS-H免疫后的鸡群抗体产生较慢且抗体高阳性率低。在实验室条件下，对3周龄的SPF白羽蛋鸡品种 White Leghorn 进行TS-11点眼免疫4周后，能够检测出微弱的抗体阳性。

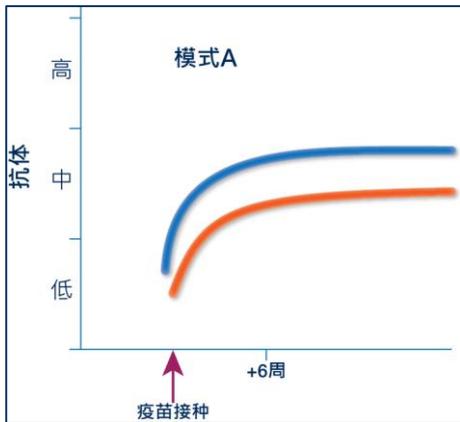
在实际应用中这些血清反应往往更为复杂。阳性率的不定变异很有可能与鸡群接受疫苗免疫时，呼吸道的炎症程度有关 (可能有更多的抗原被免疫系统察觉)。一些专家认为这个理论是导致免疫后阳性率不定的原因，而并非疫苗的问题。

免疫后- 疫苗在气管中的分布



一些专家认为，疫苗株在无气管炎或感染轻微气管炎的鸡群里会完全依附在黏膜表面 (起到了刺激产生保护性局部免疫反应的作用) 而全身性免疫过程却并未受到刺激。但对于感染有气管炎的鸡群，抗原能进一步深入体内，作用和刺激全身免疫反应。因此，即使血清学反应为阴性也不能得出疫苗尚未诱导鸡群产生免疫力的结论。

在实际应用中，我们观察到4种血清学模式 (A, B, C 或D)。通常情况下TS-11的抗体阳性率比MS-H要低，ELISA 检测平均滴度也低于MS-H。肉种鸡的抗体阳性率通常低于产蛋鸡。4种血清学反应如下图所示



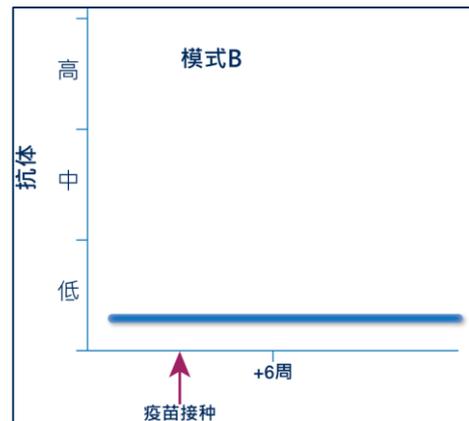
个别鸡群抗体阳性有所变异。例如：橘色和蓝色模式指两个免疫鸡群的阳性率。

模式A: 疫苗接种6周后产生中度血清型阳性反应。在ELISA 检测中，平均滴度通常介于800和4000之间，且结果几年内在同一养殖场内的不同鸡群中保持一致。但其日后可能会发生变化。在一些地区，鸡群ELISA检测的反应更强，而且这些鸡群的抗体滴度可能会长期一直持续维持在该水平。

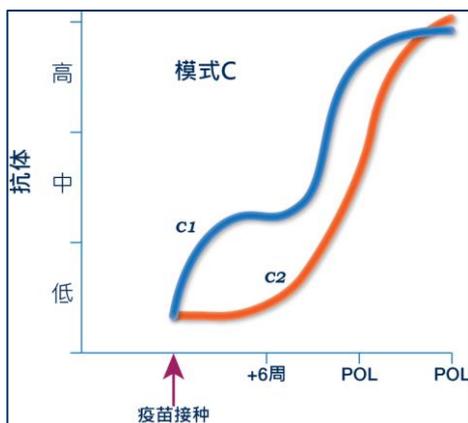
虽然ELISA检测技术一直在进步，但其并非是一种DIVA检测技术 (DIVA - Differentiating Infected from Vaccinated Animals 能区分有无疫苗接种的动物)。在ELISA检测中所使用的同源性抗原，包括克隆出的疫苗抗原能够有效提高体液血清学检测反应的灵敏度，但其仍然不能证明鸡群已接种疫苗且未感染野毒株。有人建议用两种不同的MS ELISA检测方法对MS-H免疫后的鸡群检测 - 一种方法使用克隆疫苗作为抗原，另一种方法用全细胞作为抗原。这种检测系统能够在疫苗接种后的第四周后更早检测出血清对克隆抗原的反应，以此来确认鸡群的疫苗接种情况(Todte, 2014)。

模式B: 滴度低或全阴性。

这个模式通常在全场免疫几年后发生。原因可能是野毒株被完全取代后，鸡群只表现出轻微的气管炎。这个模式在TS-11免疫鸡群中更常见，但有时也发生在MS-H免疫鸡群中。



正常，尤其是在长期免疫的环境里 (模式D)

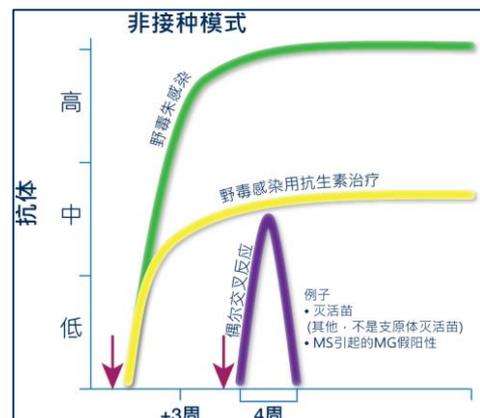


POL - 产蛋开始 POL - 产蛋高峰期

在这种情况下做PCR从来没有测到野毒株，只有疫苗朱纯在。模式C1开始的时候象模式A，模式C2开始的时候象模式B。

模式C: 在该模式中，免疫鸡群的抗体水平自产蛋起到40周龄呈上升趋势。检测结果显示，所有检测到的菌株均为疫苗株 (Zavala和其他，2015)。这里所采用的检测技术 (细菌培养和PCR) 的灵敏度并不足以检测出可能同时存在的另一种菌株 (如果有少量存在)。但如果这些占极少数的菌株并不具备传播的能力，它们的存在对鸡群也不会造成影响。

模式 D: 模式出现变化。这种变化通常为中等滴度的血清学反应 (模式) A变成模式B。原因可能与野毒株在免疫后的鸡群中被净化有关 (Morrow和Whithear, 2011)。



关于接种鸡群的体液抗体保护作用的实验室研究

MG平板血清检测 (RSA) 预测值： 现场受到TS-11免疫的鸡群

组	免疫周龄	RSA 阳性*	气管粘膜厚度 [†]
TS-11免疫/ 攻毒组	3	0% (0-0)	101±5 ^a
TS-11免疫/无攻毒组	3	0% (0-0)	98±5 ^a
TS-11免疫/ 攻毒组	6	40% (0-1)	105±5 ^a
TS-11免疫/无攻毒组	6	20% (0-0.5)	105±6 ^a
无免疫/攻毒组	无免	0% (0-0)	273±44 ^b

*17周攻毒之前检测 (评分0-4)
†攻毒后2周检测



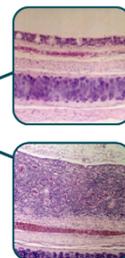
无抗体产生并不代表疫苗免疫无效！

对于免疫后的鸡群观察不到抗体产生不禁会让人产生疑问，“我们的鸡群是否受到了保护？”
墨尔本大学做了许多实验来观察鸡群抗体产生和TS-11保护之间的关系。TS-11免疫后抗体呈低阳性的鸡群在17周龄时被采集回实验室里重检和喷雾攻毒。TS-11的保护力以气管粘膜厚度作为判断。结果显示，所有经过TS-11免疫的鸡群都受到保护。(Noormohammadi and others, 2002b)

MG疫苗保护率：实验室内

组	n	RSA分数 (平均)	气管粘膜厚度
TS-11活苗*	10	1.8±1.1	71.4 ^b
MG灭活苗*	10	3.7±0.5	251.1 ^c
无免疫*	10	0	253.6 ^c
无免·无攻毒	10	0	44.3 ^a

*喷雾攻毒
^{a,b,c} P<0.05
RSA = 快速血清凝集试验



经灭活苗免疫后，拥有高滴度抗体的鸡群并不被保护

TS-11和MG灭活苗组经毒性MG喷雾攻毒。保护力以气管粘膜厚度作为判断。在本实验中，MG灭活苗免疫组在攻毒前已产生了高滴度的抗体，但鸡群在攻毒后却并未得到保护。

抗体反应	免疫周龄 (6周起)	其他原因	怎么判断
高滴度抗体	有无野毒株进场? 无影响	野毒进场问题	PCR 调查鸡群的养殖历史
中等滴度抗体	正常	野毒进场：早期	PCR 重新采集血样
低滴度抗体	可能发生，尤其在产蛋前	免疫操作失败	PCR 重新采集血样

表1：免疫鸡群的血清学反应影响因素概述

结论：疫苗保护力与血清学反应结果不相关，未来需要更多的检测结果为支持以做出最终的判断。

如何判断鸡群在

TS-11/MS-H

免疫后的情况？

活苗。确保鸡群正常免疫接种最常规的方式是审核免疫操作。审核目标应该包括：

1. 冷链
2. 免疫操作 – 使用染色色素来观察操作者的准确性
3. 接种前后抗生素使用情况以及长期的抗生素用量历史
4. 鸡群的免疫质量
5. 鸡场的生物安全和预计感染暴发时间

如果需要区分野毒或疫苗株，PCR分析检测是最好的方法。疫苗株在经过了恰当疫苗接种的鸡群中很容易被检出。PCR检测的最佳时间是免疫至少6周以后。

References

- Ghorashi SA, Kanci A, & Noormohammadi AH (2015) "Evaluation of the Capacity of PCR and High-Resolution Melt Curve Analysis for Identification of mixed Infection with *Mycoplasma gallisepticum* Strains". PLoS One. 10(5):e0126824.
- Ghorashi SA, Bradbury JM, Ferguson-Noel NM, Noormohammadi AH. (2013). "Comparison of multiple genes and 16S-23S rRNA intergenic space region for their capacity in high resolution melt curve analysis to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strain ts-11 from field strains". Vet Microbiol. 167:440-7.
- Hammond PP, Ramirez AS, Morrow CJ, & Bradbury JM. (2009). "Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing". Vet Microbiol. 136:61-8.
- Jeffery N, Gasser RB, Steer PA, & Noormohammadi AH. (2007). "Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region". Microbiology. 153:2679-88.
- Markham JF, Scott PC, Whithear KG. (1998). "Field evaluation of the safety and efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine". Avian Dis. 42:682-9.
- Morrow CJ & Whithear KG. (2011). "Mycoplasma ts vaccines – 20 years field experience, pen trials and myths". International Hatchery Practice. 25.5: 13-15.
- Noormohammadi AH, Markham PF, Markham JF, Whithear KG, & Browning GF. (1999). "*Mycoplasma synoviae* surface protein MSPB as a recombinant antigen in an indirect ELISA". Microbiology. 145:2087-94.
- Noormohammadi AH, Browning GF, Cowling PJ, O'Rourke D, Whithear KG, & Markham PF. (2002a). "Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 by an autologous pMGA enzyme-linked immunosorbent assay". Avian Dis. 46:405-11.
- Noormohammadi AH, Browning GF, Jones J, & Whithear KG. (2002b). "Improved detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* vaccine MS-H using an autologous recombinant MSPB enzyme-linked immunosorbent assay". Avian Pathol. 31:611-7.
- Noormohammadi AH, Jones JE, Underwood G, & Whithear KG. (2002c) "Poor systemic antibody response after vaccination of commercial broiler breeders with *Mycoplasma gallisepticum* vaccine ts-11 not associated with susceptibility to challenge". Avian Dis. 46:623-8.
- Todte M (2014) "FAQ MS-H" First international avian mycoplasma conference, Antwerp.
- Zavala G, Ferguson N, Chappell L and Dufour-Zavala L. (2015) "Unexpected seroconversion against a Live Temperature sensitive *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine in organic Brown layers". AAAP conference, Boston.



Bioproperties Pty Ltd

ABN 49 007 303 728

**36 Charter Street
Ringwood Vic 3134
Australia**

T: +61 3 9876 0567

F: +61 3 9876 0556

W: www.bioproperties.com.au