

传染性法氏囊病 Vero 细胞灭活疫苗的研究

李健强 伊 岚 梁 荣 张耀相

(西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 传染性法氏囊病 Vero 细胞灭活疫苗的免疫试验表明, 用 0.5 和 0.8 mL/只剂量分别肌肉接种。10~14 日龄首免, 8 d 后可检出病毒特异性抗体, 14 d 抗体 P/N 值为 3.8~5.6, 病毒中和抗体滴度为 $1:32 \sim 1:64$; 21 d P/N 值为 6.3~6.8, 中和抗体滴度平均为 $1:1024 \sim 1:2048$, 此时血清抗体对鸡的保护率为 85.7%。30~35 日龄二免, 14 d 后 P/N 值 5.0~5.2, 中和抗体滴度高达 $1:2048 \sim 1:8192$, 对鸡的保护率为 100%。二免后 112 d (147 日龄) 抗体仍保持较高水平, P/N 值为 3.2~3.4。野外试验表明, 这种疫苗安全、有效。在 3000 只蛋鸡群平行试验, 灭活苗比活苗抗体水平高出 0.2 个光密度值, 抗体持续期长。接种灭活苗的鸡群 5 个月内未发生此病。

关键词 传染性法氏囊病, 细胞灭活苗, 免疫试验, 野外试验

分类号 S855.3

传染性法氏囊病 (Infectious Bursal Disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (Infectious Bursal Disease Virus; IBDV) 引起的危害幼鸡的一种急性、高度接触性传染病。IBD 的防治主要采用疫苗的预防接种和抗 IBDV 高免血清的治疗。IBDV 有两种血清型, 鸡主要为血清 I 型。由于 IBDV 基因组 V_p2 区易发生抗原漂变, 毒株间抗原性会发生变异, 出现了型内有亚型的存在和抗原性的差异, 单一的疫苗达不到理想预防效果。选择不同地方的毒株, 采用非鸡胚源细胞增毒, 既可保持多个亚型毒株, 又可避免鸡胚源细胞增毒的不足之处。这种疫苗由陕西毒株 X 和南京毒株 N 在 Vero 细胞增毒灭活制成, 具有免疫原性好, 安全有效的特点。

1 材料与方法

1.1 材料

种毒 ① 疫苗制造用的毒种为 IBDV 地方毒株 X 和 N, 由西北农业大学动物病毒研究室分离鉴定^[1], -60°C 冻存。② 攻毒试验用 IBDV 强毒株 CJ801, 自中国兽药监察所引进, -60°C 冻存。将强毒适当稀释后, 感染 5 只 40 日龄易感幼鸡, 3.5 d 后剖杀, 取病变严重的法氏囊组织, 按 200 mg/L 加灭菌盐水研磨后离心, 取上清液测其半数感染量 (Infection Dose 50%, ID_{50}), -60°C 冻存备用。

细胞系 Vero 细胞, 自中国兽药监察所引进, 西北农业大学动物病毒研究室保存。

ELISA 试验用抗原和琼扩抗原 西北农业大学动物病毒研究室制备。

收稿日期 1997-10-24

课题来源 陕西省科委资助项目 (95K02-G1-01)

作者简介 李健强, 男, 1939 年出生, 教授, 博士生导师

IBD Vero 细胞灭活苗 按兽医生物药品制造规定^[2]制备 (批号 960306, 960420, 960518, 970327, 970507, 970518), 供试验用, 4°C 保存。

试验鸡 西北农业大学种鸡场提供刚出壳雏鸡尼克红 200 只。

IBD 阳性血清 ① IBD 标准阳性血清购自中国兽药监察所; ② 免疫试验鸡血清, 为 IBD Vero 细胞灭活苗免疫接种后不同时间翅静脉采血分离, -40°C 保存备用; ③ 野外试验鸡血清系试验鸡场用鸡胚弱毒苗 (南京药械厂生产, 批号 87-1, 每瓶 500 羽份稀释后, 每羽 0.03 mL 滴鼻、点眼) 和西北农业大学动物病毒研究室制备的 IBD Vero 细胞灭活苗 (970327, 970507, 970518), 接种鸡后间隔一定时间采血分离血清, -40°C 保存备用。

抗鸡 Ig 单抗辣根过氧化物酶结合物 西北农业大学动物病毒研究室研制, 工作浓度 $1:2\,000$ ^[3]。

1.2 方 法

IBD Vero 细胞灭活苗的制备 用适应于 Vero 细胞增殖的 IBDV X 和 N 种毒接种于单层细胞, 待细胞出现 90% CPE 时, 将细胞培养物冻融 3 次, 除去细胞碎片, 测定并调整其含毒量, 分装冻存于 -40°C 备用。制备疫苗时, 将含病毒的细胞培养液灭活后与油佐剂乳化即可。按兽医生物制品制造规定, 检验合格后方可应用。

试验用抗原的制备 ① ELISA 试验用抗原采用王成明等人报道的方法^[4]制备; ② 琼扩试验用抗原可用两种方法制备, 一是用强毒株感染易感幼鸡的法氏囊组织匀浆离心上清作抗原, 一是用 X 和 N 毒株病毒细胞培养液经浓缩制得。两种琼扩抗原与已知 IBD 标准阳性血清能出现特异沉淀线。

IBD 细胞灭活苗的免疫试验 整个试验在特定的实验房进行, 对照组和试验组分隔饲养, 试验鸡在正式试验前已接种 NDV IV 系鸡胚尿囊液灭活苗。试验分四组: I 组试验鸡 50 只, 10~14 日龄首免灭活苗 0.5 mL/只肌肉注射, 免后 8, 14 和 21 d 测 IBDV 抗体水平, 28 d 后进行第一次攻毒试验。35 日龄二免, 免后每隔 14 d 测抗体水平直至 112 d (147 日龄)。70~90 日龄进行第二次攻毒试验; II 组与 I 组相同, 只是疫苗注射剂量为 0.8 mL/只; III 组为疫苗保存期试验组, 所用疫苗为 960420, 960306, 960518 三批制品, 4°C 保存期一年, 其他同试验 I 组; IV 组为对照, 同试验 II 组, 试验鸡接种不含病毒的细胞培养上清液。

疫苗接种后病毒特异抗体的检测 ① 间接 ELISA 法。试验用抗原 $2\mu\text{g}$ /孔包被酶标板。封阻液为含 6% 马血清的 PBST 洗液。待检鸡血清作 $1:128$ 稀释, 酶结合物 $1:2\,000$, 底物为邻苯二胺, 终止剂为 $2\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$ 溶液。在 490 nm 波长测光密度值。待检血清中 IBDV 抗体水平可以用两种方式表示, 一是用阳性血清光密度值 (P) 和阴性血清光密度值 (N) 之比表示, $P/N \geq 2.1$, 表明待检血清中有 IBDV 抗体, 则为阳性。一是直接用 ELISA 光密度值表示, 光密度值与 P/N 值呈正相关, 光密度值愈高 P/N 值愈大, 则抗体水平愈高; ② 微量血清病毒中和试验。按常规法^[5]进行; ③ 琼扩试验。按常规法进行; ④ 疫苗接种后一定时间鸡体对强毒株攻击的保护试验。按试验设计, 在首免和二免后 28~30 d, 用 100 个 ID₅₀ 的 IBDV 强毒株攻毒, 综合评定鸡体保护力 (观察法氏囊病理变化, 测血清病毒中和抗体滴度和 ELISA 测得 IBDV 抗体水平)。

IBD 细胞灭活苗的野外试验 采用两种方式进行, 一是在西北农业大学种鸡场, 该场

引进尼克红鸡 3 000只,经抽样检测 IBDV 母源抗体不高,在 10日龄分别用 Vero细胞灭活苗和鸡胚弱毒苗按上述剂量和接种途径免疫 首免和二免后定期采血,检测血清中抗体水平。另一是将疫苗提供给某鸡场,按规定进行两次免疫接种,记录试验鸡和鸡群安全性和效力,综合评定疫苗效果

2 结 果

2.1 雏鸡母源抗体的测定与首免日龄的确定

雏鸡母源抗体的测定采用 ELISA法,其结果如表 1所示

表 1 雏鸡 IBDV 母源抗体的变化

日龄 (d)	ELISA光密度值 (λ= 490 nm)	阳性比例	百分率 %
7	0.52± 0.04	15/15	100.0
14	0.38± 0.03	4/15	26.6
21	0.24± 0.04	1/15	6.6
28	0.15± 0.03	0/15	0.0

注: 阳性比例中分子为阳性数,分母为测试鸡数。

2.2 IBD细胞灭活苗接种后血清中 IBDV 抗体水平

1996年 3~ 6月和 1997年 3~ 10月先后进行两次免疫试验 免疫接种后一定时间采血,测 IBDV 抗体的动态变化,其结果如表 2和表 3所示

表 2 首免后不同时间鸡体内抗体水平

组别	接种 /mL	试验鸡数 只	ELISA光密度值 (λ= 490 nm) P /N值		
			8 d ¹⁾ (21) ²⁾	14 d(28)	21 d(35)
I	0.5	50	0.4± 0.08(3.1) ³⁾	0.50± 0.09(3.8)	0.74± 0.089(5.7)
II	0.8	50	0.32± 0.09(2.5)	0.73± 0.05(5.6)	0.89± 0.048(6.8)
III	0.5	50	0.34± 0.067(2.6)	0.56± 0.06(4.3)	0.70± 0.05(5.4)
IV	0.8	50	0.13± 0.034	0.13± 0.034	0.13± 0.034

注: 1)首免后天数; 2)鸡的日龄; 3)括弧内为 P /N值

表 3 二免后不同时间鸡体内抗体水平

免疫后 /d	鸡的日龄 /d	光密度值 P /N值			
		I	II	III	IV
14	49	1.06± 0.09(5.0)	1.10± 0.02(5.2)	0.90± 0.03(4.2)	0.2± 0.04
28	63	1.12± 0.06(5.3)	1.29± 0.01(6.1)	1.09± 0.05(5.2)	0.2± 0.04
42	77	1.14± 0.04(5.0)	1.25± 0.07(5.4)	1.2± 0.07(5.3)	0.23± 0.02
56	91	1.05± 0.03(4.6)	1.07± 0.06(4.7)	0.99± 0.07(4.3)	0.23± 0.01
70	105	0.92± 0.05(4.0)	0.98± 0.02(4.3)	0.90± 0.07(3.9)	0.23± 0.03
84	119	0.88± 0.07(3.8)	0.90± 0.09(4.0)	0.86± 0.09(3.7)	0.23± 0.03
98	133	0.82± 0.09(3.7)	0.86± 0.09(3.6)	0.80± 0.08(3.5)	0.23± 0.03
112	147	0.74± 0.06(3.2)	0.78± 0.07(3.4)	0.70± 0.05(3.0)	0.23± 0.03

注: I ~ IV组的接种量分别为 0.5,0.8,0.5,0.8 mL; 试验鸡各为 33只。

由表 2和表 3可知,IBD细胞灭活苗首免后 8 d即可测出 IBDV 抗体,ELISA光密度值平均为 0.36± 0.07,P /N 值平均为 2.7. 14 d后抗体滴度明显上升,21 d ELISA光密度值平均为 0.78± 0.06,P /N 值平均 6.0 二免后抗体滴度显著提高,112 d(147日龄),

ELISA光密度值平均在 0.74± 0.06, *P* /*N* 值平均为 3.2

2.3 疫苗接种后鸡体中和抗体与保护力

对 IBD 细胞灭活苗接种后血清病毒中和抗体滴度及其对鸡的免疫保护作用进行测试,其结果如表 4和表 5所示

表 4 首免和二免后血清病毒中和抗体滴度

组别	测试鸡数 /只	首免后		二免后 14 d
		14 d	21 d	
I	5	1∶ 32	1∶ 1 024	1∶ 2 048~ 1∶ 8 192
II	5	1∶ 64	1∶ 2 048	1∶ 2 048~ 1∶ 8 192
III	5	1∶ 32	1∶ 1 024	1∶ 2 048~ 1∶ 8 192
IV	5	0	0	0

表 5 首免和二免后机体的免疫保护力

组别	攻毒剂量 ¹⁾ /mL	接种途径	试验鸡数 /只	第一次攻毒 首免 28 d	保护率 %	第二次攻毒 二免后 30 d	保护率 %
I	1.0	滴鼻点眼	14	1/7 ²⁾	85.7	0/7 ²⁾	100
II	1.0	滴鼻点眼	14	0/7	100	0/7	100
III	1.0	滴鼻点眼	14	1/7	85.7	0/7	100
IV	1.0	滴鼻点眼	14	7/7	0	7/7	0

注: 1) 1 mL内含 100个 ID₅₀; 2) 分子为发病鸡数,分母为试验鸡数.

由表 4和表 5可知,首免后 14 d血清中就出现病毒中和抗体,21 d病毒中和抗体滴度达 1∶ 1 024~ 1∶ 2 048,28 d攻毒时对鸡的保护率可达 86% ~ 100%.二免后 14 d病毒中和抗体滴度最高达 1∶ 8 192(2³),30 d攻毒时保护率均为 100%.

2.4 强毒株攻击后法氏囊的病理变化

对照组可见法氏囊粘膜上皮局部变性、坏死脱落,间质和粘膜下层结缔组织增生.髓质内出现腺泡或腺管样结构,淋巴细胞减少,核碎裂和浓缩明显,皮质变薄,有少量浆细胞,异嗜性白细胞出现.

免疫试验各组,法氏囊粘膜上皮完整无损,淋巴小结髓质扩大,皮质相对变薄,在淋巴小结内除见少量淋巴细胞核溶解消失外,出现大量淋巴母细胞,间质无明显变化.

2.5 IBD细胞灭活苗的野外试验

野外试验采用 0.5 mL/只剂量细胞灭活苗(I 组)和鸡胚弱毒苗分别肌肉注射和滴鼻点眼,接种雏鸡为 10日龄,两种疫苗免疫接种后 IBDV 抗体水平如表 6所示.

表 6 IBD灭活苗与弱毒苗抗体水平的比较

疫苗	免疫剂量 /mL	鸡数 /只	首免后 20 d(30日) ¹⁾	二免后		
				14 d(44)	28 d(58)	42 d(72)
I	0.5	600	0.76± 0.05 ²⁾	0.86± 0.06	0.91± 0.03	1.08± 0.07
II	0.03	2 400	0.51± 0.02	0.62± 0.04	0.79± 0.05	0.71± 0.06

注: 1) 括号内为鸡的日龄; 2) ELISA光密度值的标准差.

由表 6可知,IBD细胞毒灭活油剂苗首免后 20 d(30日龄),IBDV 抗体滴度平均光密度值达 0.76± 0.05,而弱毒苗光密度值只有 0.51± 0.02.二免后 14 d(44日龄)、28 d(58

日龄)、42 d(72日龄)两种疫苗所激发的抗体滴度均有显著提高,但油剂灭活苗比活苗增长更明显。根据西安、兴平、杨凌等地部分鸡场 3 000羽鸡的试用结果表明,IBD细胞灭活苗安全有效。

3 小结与讨论

3.1 母源抗体与细胞灭活苗接种时间

雏鸡母源抗体会干扰弱毒苗的免疫效果,对灭活苗的影响较小。由表 1可知,当母源抗体降至 70%以上的 14日龄时,给雏鸡注射细胞灭活苗是适宜的,确保母源抗体 21日龄以后消失时疫苗抗体发挥免疫效力^[6]。

3.2 IBD细胞灭活苗的有效免疫剂量

经多次试验,确定用 0.5 mL 只和 0.8 mL 只两个剂量进行免疫试验。结果表明,首免后 14 d和 21 d两个剂量组抗体滴度有差异,血清病毒中和抗体滴度前者为 1:32和 1:1 024,后者为 1:64和 1:2 048;二免后两个剂量组则无明显差异,均有高的抗体水平和 100%的保护率,血清病毒中和抗体滴度均在 1:2 048以上。在野外试验中,用 0.5 mL/只剂量免疫,首免后 21 d,ELISA O.D值为 0.76,二免后 14 d,28 d和 42 d已达到 0.86,0.91和 1.08。这一结果与免疫试验结果基本一致,说明 0.5 mL/只是合适的有效免疫量^[7]。

3.3 IBD细胞灭活苗保存期

对制作的 IBD细胞灭活苗(批号 960306,960420,960518)在 4℃存放一年,以 0.5 mL 只免疫接种,各项测试指标与试验 I 组基本一致(见表 2~5)。说明这种疫苗在 4℃下保存一年,理化性状稳定,抗原性良好,疫苗质量不受影响。

致谢:参加本项研究的还有林永康、刘伯华、陈杰、任智慧(西北农业大学种鸡场)和严宝英(陕西省畜牧兽医总站);本试验的病理剖检和组织学检验,承蒙西北农业大学动物科学与动物医学学院病理课题组薛登民教授亲临剖检和病理组织学观察,张联莉小姐制作切片,在此衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 李健强,伊 岚,黄金海,等.非鸡胚源细胞对传染性法氏囊病病毒的分离与鉴定.中国兽医科技,1996,26(7): 5~ 7
- 2 农业部.兽医生物制品制造及检验规程(修订版).1985
- 3 梁 荣,冯 斌,李健强.分泌抗鸡 Ig 杂交瘤细胞系的建立与单抗生物学特定的鉴定.中国兽医学报,1997,17(2): 140~ 144
- 4 王成明,蔡宝祥,陈博言.鸡传染性法氏囊病病毒的提纯和鉴定.中国兽医科技,1995,25(2): 4~ 6
- 5 殷 震,刘景华.动物病毒学.北京:科学出版社,1985
- 6 Mekkes D R,de Wit J J. Diagnostic tools in detection virant and virulent strains and antibody. World Poultry, 1994, 12 10~ 11
- 7 Wyeth P J, Chettle N J, Mohepat A R. Use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial layer chicks, Vet Rec, 1992, 130(2): 30~ 32

Vero Cell Culture Inactivated Virus Vaccine of IBD

Li Jianqiang Yi Lan Liang Rong Zhang Yaoxiang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwestern

Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The research results of immunovaccination and field tests of IBD Vero cell culture inactivated virus vaccine has been reported. The results showed that the vaccine had a quality immunogenicity when chicken was given 0.5 mL or 0.8 mL dosage by subcutaneous or muscular route. The date of vaccination first was conducted at 10–14 days of age. 8 d later, the chickens could be detected specific antibodies against IBDV and P/N value detected by ELISA was 3.8–5.6 at 14 d, and titers of virus neutralization (VN) antibody were 1:32–1:64. After 21 d, P/N value was 6.3–6.8, and titer of VN antibody was 1:1024–1:2048. At this time, protective rate of sera for chicken against virulent IBD virus challenge was 85.7 percent. Second vaccination was conducted at 30–35 days of age. After 14 d of immunization, the P/N value of antibodies in sera was 5.0–5.2, and titer of VN antibody was up to 1:2048–1:8192, and protective rate of sera for chickens against virulent IBDV challenge was 100 percent. After 112 d of second vaccination, the chicken had already been 147 days of age and still maintained high level of antibodies and the P/N value was 3.2–3.4. Field tests showed that the IBD Vero cell inactivated vaccine was salty and efficient.

Key words IBD Vero, cell culture inactivated vaccine, immunovaccination, field tests