

ND-EDS-76 异源二联油苗的研制^{*}

贾英科¹, 高梅秀¹, 崔学艺², 张巨洲², 熊 峰²

(1 天津农学院动物系, 天津 300384; 2 农业部 郑州生物药厂, 郑州 450061)

[摘 要] 将鸭源鸡新城疫(ND)病毒D₁₀株和鸡减蛋综合症(EDS-76)病毒GC₂株同时接种于同一鸭胚内复制, 增殖96 h收取尿囊液, 用甲醛灭活后加白油佐剂制成ND-EDS-76异源二联油乳剂灭活疫苗。该疫苗生产工艺简单, 成本低, 经试用表明可有效地预防ND和EDS-76的发生。

[关键词] 鸡新城疫; 鸡减蛋综合症; 异源二联油乳剂灭活疫苗; 油苗研制

[中图分类号] S858.322.5⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)02-029-04

鸡新城疫(ND)和鸡减蛋综合症(EDS-76)是引起母鸡产蛋率下降的两种重要疫病, 给养鸡业带来严重的经济损失。目前, 常用的预防疫苗有普通单苗和二联灭活苗, 分别由鸡胚和鸭胚增毒制成, 具有良好的免疫效果^[1]。为了进一步简化二联苗的生产工艺, 降低成本, 本试验在反复证实2种病毒能同时在同一鸭胚内复制增殖的基础上, 又进一步使其繁殖滴度达到制苗的要求, 加入白油佐剂制成异源二联油乳剂灭活疫苗^[2], 经试用取得了满意的效果。现报告如下。

1 材料与方法

种 毒 NDV-D₁₀毒株系鸭源ND自然弱毒, HA价1/2⁷(河南农业大学惠赠), 经鸭胚传代活化后, HA价≥1/2¹⁰。EDS-76GC₂毒株系鸡减蛋综合症强毒株(本室保存), HA价≥1/2¹⁶。

试验动物 鸭胚来自天津精武集团种鸭场, 鸭群经HI检测ND和EDS-76抗体阴性。试验用鸡由郑州生物药厂动物养殖室提供, 为迪卡120~130日龄未免疫鸡群, 封闭饲养。HI检测ND和EDS-76抗体阴性。

标准强毒 NDV-F₄₈E₉毒株(由中监所惠赠), 鸡最小致死量MLD10⁻⁵/mL。EDS-76病毒GC₂强毒株(本室保存), ICD 5×10¹⁴/mL。

病毒增殖与滴度测定 将NDV和EDS-76种毒分别按一定比例稀释后, 等量混匀。取孵育10~11日龄鸭胚, 尿囊腔接种, 每胚0.2 mL。37~38

孵育5 d, 弃去48 h以前死亡的鸭胚, 收集72~120 h死亡胚和120 h鸭胚尿囊液及绒毛膜(CAM), 捣碎混匀, 加入甲醛灭活, 用体积分数1%人红细胞(RBC)和体积分数0.8%鸡红细胞悬液测定其HA价。当HA价分别达到ND HA价≥1/2¹⁰和EDS-76 HA价≥1/2¹⁵时即可用于配苗。配苗前将灭活病毒液接种10~11日龄鸡胚, 进行安全检验和菌检阴性后即可用其制苗^[3-5]。

制苗佐剂材料 7号白油、司本-80、吐温-80(天津生产); 硬脂酸铝(上海生产)。

制苗方法 将无菌吐温-80按4%加入灭活病毒液中, 充分混匀后作为水相, 再按配比缓缓加入到7号白油、司本-80和硬脂酸铝配制成的无菌油相中, 搅拌均匀, 以8 000~10 000 r/min高速连续乳化5~10 min, 呈乳白色即成油乳剂苗, 分装后4保存备用^[4]。

疫苗的无菌检验和安全检验 按农业部颁兽医生物制品规程进行^[3]。

疫苗免疫效力测定 用3批疫苗分别接种3组120~130日龄的迪卡鸡群(每组200只); 间隔10 d, 20 d, 30 d, 6个月, 12个月, 分别按10%采血分离血清, 测定HI价。并每组随机取出30只免疫鸡为一组, 用一定量ND和EDS-76强毒攻击, 测定其对该2种病毒的保护率。

疫苗保存期测定 将3种疫苗分别于4 保存6个月和12个月、15~20 保存1个月和3个月, 经物理性状观察, 接种120~130日龄迪卡鸡, 每组

^{*} [收稿日期] 2000-11-06

[基金项目] 天津市自然科学基金资助项目(933611911)

[作者简介] 贾英科(1955-), 男, 河北无极人, 副教授, 主要从事预防动物医学方面的研究。

30 只, 免疫后 30 d 随机采血 10 份分离血清, 测定 H I 效价, 判定其保存期^[2~ 4]。

2 结果及分析

2 1 病毒收获与保存

试验结果表明, 接种后 72 h NDV 滴度达高峰, 以后逐渐下降; EDS-76 病毒滴度 72 h 较高, 120 h 达高峰。2 种病毒均主要分布于尿囊液中, 其次为 CAM , 而胚体中含量最低(表 1)。故实际应用中, 收获 48~ 96 h 死亡胚和 96 h 活胚尿囊液, 测定 ND HA 价 $\geq 1 \times 2^{10}$ 、EDS-76 HA 价 $\geq 1 \times 2^{15}$ 即可用于制苗。

表 1 NDV 和 EDS-76 病毒在鸭胚中增殖规律

Table 1 The growth pattern of NDV and EDS-76 virus in one duck embryo

孵育时间/h Inocubation time	NDV (HA log2)			EDS-76(HA log2)		
	尿囊液 Allantoicfluid	CAM	胚体 Embryo	尿囊液 Allantoicfluid	CAM	胚体 Embryo
24	2 0	—	—	2 0	—	—
48	7 0	3 0	2 0	7 5	5 0	2 0
72	11 0	7 0	3 0	16 0	13 0	4 0
96	10 0	5 0	3 0	17 0	16 0	5 0
120	9 5	3 0	2 0	19 0	17 0	6 0

病毒液灭活后于 4℃ 保存 3 个月和- 20℃ 保存 10 个月, HA 价基本不变。而 4℃ 保存 6~ 12 个月则 HA 价逐步降低 3~ 4 个滴度。故病毒液在- 20℃ 可保存半年以上。

2 2 安全性检验

120~ 130 日龄鸡大剂量接种该苗后精神、食欲正常, 接种局部无溃烂和硬结。10 日龄鸭胚接种灭活病毒液后发育正常, 无 HA 价出现。说明该苗安全性良好。

2 3 免疫期测定

2 3 1 抗体消长规律 鸡群免疫后 H I 抗体动态观察结果表明, 鸡群免疫后 10 d 即可产生一定滴度的抗体, 20~ 30 d H I 抗体即达高峰。12 个月内均维持在 5log2 以上。与普通二联苗免疫效果差异不显著(t 检验, $P > 0.05$, 表 2)。

表 2 鸡群免疫后 H I 抗体的消长规律 log2

Table 2 The H I antibody titres of laying hens immunized by different ND and EDS-76 vaccines

疫苗类型 Type of vaccine	病毒 Virus	免疫后时间/d Period of postinoculation				
		10	20	30	120	360
异源二联 Heterogenous vaccine	ND	8 0	10	10 0	8 0	6 5
	EDS-76	5 0	8 0	8 8	7 5	5 5
普通二联 Homoeogenous vaccine	ND	8 0	10	10 0	8 0	5 0
	EDS-76	5 0	7 0	8 5	7 0	5 0

2 3 2 攻毒保护试验 各试验组免疫后 1 个月、6 个月、12 个月, 分别随机取出鸡 30 只, 用 NDV -F₄₈ E₉ (100 ELD₅₀/mL) 及 EDS-76GC₂ 病毒原液进行攻击试验。结果表明, 该苗免疫后 1 个月即可产生很强免疫力, 保护率均为 100%; 免疫后 12 个月对 2 种病毒的免疫保护率仍分别在 90% 和 80% 以上(表 3)。因此, 可判定鸡群免疫该苗后 20~ 30 d 即可产生免疫力, 免疫期为 1 年。

表 3 鸡群攻毒后死亡及产蛋数的变化情况

Table 3 The number of death and egg production of laying after challenge with NDV and EDS-76 virus

攻毒时间/月 The time of postinoculation	免疫组 Immunized group		对照组 Control group	
	ND	EDS-76	ND	EDS-76
	/	/	/	/
1	30/30	22/24	0/30	15/24
6	30/30	20/22	0/30	12/21
12	28/30	16/20	0/30	12/21

注: 攻毒鸡数; 攻毒后健活数; 攻毒前产蛋数; 攻毒后产蛋数。
Note: The number of challenge; The number of survival post challenge; The number of egg production before challenge; The number of egg production post challenge.

2 4 疫苗保存期测定

经物理性状观察,3 批疫苗分别于 4 保存 6 个月、12 个月和 15~ 20 保存 3 个月仍呈乳白色,不破乳,不分层,呈油包水型。表明该疫苗乳化状态稳定。3 批疫苗保存期测定结果表明,该苗于 4 保存 6 个月和 15~ 20 保存 1 个月,接种后鸡群 H I

抗体效价与保存前接种鸡群无显著差异(t 检测 $P>0.05$); 4 保存 12 个月和 15~ 20 保存 3 个月,免疫效果有所下降,但仍保持在 $7\lg 2$ 以上。因此,该疫苗保存期可判定为 4 12 个月,15~ 20 3 个月(表 4)。

表 4 疫苗保存期测定(H I 抗体滴度(log2))

Table 4 The estimation of the preservation period of the vaccine (H I antibody titres(log2))

批次 Lot	保存温度 Temperature	病毒 Virus	保存期/月 Preservation period				
			0	1	3	6	12
I	4	ND	10	-	9.5	9.0	7.5
		EDS-76	8.5	-	8.5	8.5	7.0
II	4	ND	9.5	-	9.5	9.0	7.0
		EDS-76	8.5	—	8.5	8.5	7.0
III	4	ND	10	-	9.5	9.0	7.5
		EDS-76	9.0	-	8.5	8.0	7.0
IV	15~ 20	ND	10	9.0	7.0	5.0	-
		EDS-76	9.0	8.0	7.0	3.5	-

2 5 临床免疫效果试验

为进一步验证实验室试验结果,临床应用该苗免疫不同地区、不同气候环境条件下的母鸡群近 10 万羽份。经跟踪观察检测,统计结果表明,NDV 和 EDS-76 病毒 H I 抗体效价在免疫后 6 个月分别在 $8\lg 2$ 和 $7\lg 2$ 以上,免疫后 12 个月分别在 $6\lg 2$ 和 $5\lg 2$ 以上。母鸡注苗后无不良反应。

3 小结与讨论

1)NDV 和 EDS-76 病毒可在同一鸭胚中复制且互不干扰,但两者在鸭胚中的增殖速度却不同步。故选择适宜的收获时间和方法是获取高滴度病毒液的重要环节。本试验结果表明,种毒接种后孵育 72 h 和 120 h 时 NDV 和 EDS-76 病毒滴度分别达到高峰,且主要分布于尿囊液中(表 1)。故制备疫苗时应收获 48~ 96 h 死亡胚和 96 h 胚胎尿囊液,此时 HA 价 NDV 达到最高峰 HA 价 $\geq 10^{10}$ 、EDS-76 病毒滴度也同时达到了较高水平 HA 价 $\geq 10^{15}$,兼顾两者都达到了制苗所需毒量要求。病毒原液经甲醛灭活后于- 15~ 20 可保存半年以上。

2)对该苗的安全性检验、免疫效力及保存期的测定结果表明,该苗乳化状态稳定,在 4 可保存 12 个月,15~ 20 可保存 3 个月;使用安全可靠,鸡群注苗后无不良反应,20~ 30 d 即可产生免疫力,免疫期 1 年,可有效地预防 ND 和 EDS 的发生。实验室和临床应用结果与普通二联苗的免疫效果差异不显著(表 2~ 4)。但该苗病毒液的制备由原来用鸡胚和鸭胚分别增殖,改进为在同一鸭胚同时接种 2 种病毒种毒,并同时收获病毒原液,具有省时、省力、省工的特点,简化了生产工艺,降低了成本,使工作效率和经济效益提高 1 倍以上。

3)根据 NDV 和 EDS-76 病毒的血凝价不同以及对不同动物 RBC 的敏感性不同的特点,选择人的红细胞(RBC)和鸡的红细胞(RBC)对同一批病毒原液分别做 HA 检测,可准确地测定 NDV 和 EDS-76 病毒的抗原含量,确保疫苗质量。

4)经临床鸡群 10 万羽份免疫效果验证,该苗可有效地预防 ND 和 EDS-76 的发生,免疫效果确切,无不良反应。但临床应用面积尚小,有待进一步开展田间试验或区域性试验。

[参考文献]

[1] 姜 平. 鸡产蛋下降综合症病原分离与鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1993, 3: 1- 3
[2] 马闻天. 油乳剂灭活苗临床应用效果观察[J]. 家畜传染病, 1984, 2: 1- 5
[3] 农业部颁. 兽医生物制品规程[M]. 北京: 中国农业出版社, 1984
[4] 张振兴. 实用兽医生物制品技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996 164- 173, 189~ 191

[5] H Graham Purchase 主编 禽病原分离鉴定实验室手册[M] 唐桂运译 北京: 北京农业大学出版社, 1993 98- 104, 144- 152, 223- 230

Study on oil emulsion inactivated duck origin ND-EDS-76 bivalent combined vaccine

JIA Ying-ke¹, GAO Mei-xin¹, CUI Xue-yi², ZHANG Ju-zhou², XIONG Feng²

(1 Department of Animal Science, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384, China; 2 Zhengzhou Bioproducts Factory, Zhengzhou, 450061, China)

Abstract Duck origin ND₁₀ strain and EDS-76GC₂ strain were inoculated into the same duck embryos and harvested after 96 hours of culture. The propagated virus were inactivated by formalin and mingled with oil emulsion adjuvant according to rational rate, and a combined inactivated oil-adjuvant duck origin NDV and EDS-76 vaccine was developed, which simplified the production process and reduced production cost. The tests of vaccine safety, antibody response, protective rate and duration of immunity were also performed. The results show that this kind of vaccine could prevent ND virus and EDS-76 virus infection successfully.

Key words: new castle disease; egg drop syndrome (EDS-76); oil emulsion inactivated duck origin ND-EDS-76 bivalent vaccine; oil emulsion production