

ND-EDS-76 异源二联油苗田间试验研究

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 动物科学系, 天津 300384; 2 农业部 郑州生物药厂, 河南 郑州 450061)

[摘要] 鸭源 NDV-D₁₀ 毒株与 EDS-76GC₂ 毒株混合接种同一鸭胚, 培养 96 h 收集尿囊液, 制成 ND-EDS-76 异源二联油乳剂灭活疫苗, 然后与普通二联油乳剂灭活疫苗接种同一鸡群, 在 10, 20, 30, 180, 360 d 分别检测抗体滴度并进行比较, 结果差异不显著。在免疫后 30, 180, 360 d 随机取鸡各 60 只为 1 组, 用 NDV-F₄₈E₉ 和 EDS-76GC₂ 强毒株进行攻毒保护试验并进行比较, 结果表明两种疫苗在 30, 180 d 免疫保护率均为 100%, 360 d 对 ND 和 EDS-76 的免疫保护率分别为 92% 和 87% 以上。对临床 200 万只开产前 120 日龄左右蛋鸡群免疫接种 ND-EDS-76 异源二联油乳剂灭活疫苗, 可有效地保护整个产蛋期对 ND 和 EDS-76 强毒的攻击。

[关键词] ND-EDS-76 异源二联油苗; 田间对比试验; 抗体滴度; 免疫保护率

[中图分类号] S858.31

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)03-087-04

鸡新城疫(ND)和鸡减蛋综合症(EDS-76), 分别为鸡新城疫病毒(NDV)和鸡减蛋综合症病毒(EDSV-76)所引起的母鸡产蛋率下降, 并造成重大死亡的两种重要疫病, 给养鸡业带来严重的经济损失。目前, 预防 ND 和 EDS-76 的常用疫苗有普通单苗和二联灭活苗, 分别用鸡胚和鸭胚繁殖增毒制成, 具有良好的免疫效果^[1,2]。但生产工艺复杂, 成本较高。为克服以上缺点, 应用鸭源 NDV-D₁₀ 毒株和 EDS-76GC₂ 毒株混合后接种同一鸭胚, 收集 96 h 尿囊液制成 ND-EDS-76 异源二联油乳剂灭活疫苗, 经实验室试验和临床验证, 对 ND 和 EDS-76 的预防效果令人满意。为了验证 ND-EDS-76 异源二联油乳剂灭活疫苗临床应用效果与普通二联油乳剂灭活疫苗是否存在差异, 设计了田间对比试验研究, 现将试验结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

(1) 种毒: NDV-D₁₀ 毒株系鸭源 ND 自然强毒, 血球凝集(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(天津农学院传染病实验室保存), HA 价 ≥ 1:2¹⁶。

(2) 鸭胚: 来自天津精武集团种禽场, 鸭群经 HI 检测 ND 和 EDS-76 抗体阴性。

(3) 制苗佐剂材料: 7 号白油、司班-80、吐温-80 均由天津石化生产, 硬脂酸铝由上海远征化工厂生产。

(4) 试验鸡群: 天津西郊养殖户、兴华养殖厂 120 日龄罗斯、迪卡临产蛋健康母鸡群。

(5) ND-EDS-76 普通二联油乳剂灭活疫苗由郑州生物药厂提供。

(6) 标准强毒: NDV-F₄₈E₉ 毒株由中国兽药监察所提供, 鸡最小致死量(MLD) 10⁻⁵ mL⁻¹; EDS-76GC₂ 毒株由天津农学院传染病实验室保存, 感染细胞最小致死量(ICLD) 5×10^{14.5} mL⁻¹。

(7) 标准抗原、血清: 由中国兽药监察所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 种毒繁殖 将 NDV-D₁₀ 种毒 0.2 mL 和 EDS-76GC₂ 种毒 1.0 mL 分别加入到 100 mL 生理盐水中混匀。取孵育 10~11 日龄鸭胚尿囊腔接种, 接种量为 0.2 mL/胚。37.5℃ 静置孵育 96 h, 收取存活胚尿囊液, 用 10 mL/L 人红细胞悬液和 8 mL/L 鸡红细胞悬液分别测定 NDV 和 EDS-76 病毒 HA 价。对 NDV HA ≥ 1:2¹⁰ 同时 EDS-76 HA ≥ 1:2¹⁵ 者, 加入 2 g/L 甲醛溶液使其终质量浓度为 0.2%, 于 38℃ 灭活 16 h, 经安检和菌检阴性后即用于制苗^[2~4]。

1.2.2 ND-EDS-76 异源二联油苗配制 将灭菌吐温-80 按 40 mL/L 比例加入到灭活病毒尿囊液中,

[收稿日期] 2001-01-08

[基金项目] 天津市自然科学基金资助项目(973611911)

[作者简介] 贾英科(1955—), 男, 河北无极人, 副教授, 学士, 主要从事动物预防医学研究。

充分搅匀后作为水相,再按比例缓缓加入到用 7 号白油、司班-80 和硬脂酸铝配制的灭菌油相中,边加边搅拌均匀,最后以 10 000 r/min 高速连续乳化 5~10 min,呈乳白色即成油乳剂疫苗。经过安检和菌检合格后分装,4 ℃ 保存备用^[2,5]。

1.2.3 田间预防效果对比试验 选用兴华养殖厂和天津西郊户养商品蛋鸡群,在开产前 120 日龄(16~18 周龄)左右接种油佐剂疫苗。接种前先将鸡群分成两群,其中一群接种 ND-EDS-76 异源二联油苗,另一群接种普通二联油苗。接种剂量为 0.5 mL/只,接种途径为胸部或腿部肌肉注射。免疫接种后 10,20,30,180,360 d 分别抽样采血分离血清,检测两鸡群血球凝集抑制(HI)价抗体水平并进行比较。

1.2.4 预防攻毒保护试验 在两鸡群免疫后 30,180,360 d 分别随机取鸡 60 只为 1 组,同时设对照。用 NDV-F₄₈E₉ 及 EDS-76GC₂ 强毒进行人工攻毒感染试验,肌肉或皮下注射 0.2 mL/只,逐日观察 14 d,统计免疫保护率。

1.2.5 区域性试验 选定不同地形、气候条件的试点 10 个,进行临床大面积中试。分别对临床开产前 120 日龄左右的鸡群接种 ND-EDS-76 异源二联油

苗和普通二联油苗。接种剂量为 0.5 mL/只,接种途径为胸部或腿部肌肉注射。免疫接种后 30,180,360 d 分别抽样采血分离血清,检测两鸡群抗体滴度血球凝集抑制效价并进行比较。

2 结果与分析

2.1 预防效果对比

两组鸡群分别免疫后抗体滴度血球凝集抑制效价动态观察结果表明,鸡群免疫后 10 d 即可产生一定滴度的抗体,随后抗体(HI)效价(log2)呈对数级增长,30 d 抗体滴度即达高峰。ND-EDS-76 异源二联油苗免疫后 30 d 抗体滴度达 ND 抗体(HI)效价 10.0 log2,EDS-76 抗体(HI)效价 8.7 log2 以上;普通二联油苗抗体滴度达 ND 抗体(HI)效价 10.0 log2,EDS-76 抗体(HI)效价 8.5 log2。异源二联油苗免疫后 360 d 抗体滴度仍达 ND 抗体(HI)效价 6.5 log2,EDS-76 抗体(HI)效价 5.5 log2;普通二联油苗免疫后 360 d 抗体滴度达 ND 抗体(HI)效价 6.4 log2,EDS-76 抗体(HI)效价 5.0 log2 以上。两种疫苗免疫效果比较差异不显著(*t* 测验 *P*>0.05),见表 1。

表 1 鸡群免疫后 HI 抗体消长规律

Table 1 The HI antibody titres of laying hens immunized by different ND and EDS-76 vaccines

疫苗类型 Type of vaccine	鸡群来源 Chicken origin	日龄/d Days	数量 Number	抗原 Virus	抗体滴度/log2 The HI antibody titres after the period of postinoculation				
					10 d	20 d	30 d	180 d	360 d
异源二联 Heterogenous vaccine	I	120	4 000	ND	8.6	9.0	10.0	9.0	6.5
				EDS-76	6.0	8.0	8.9	8.0	5.5
	II	120	2 000	ND	8.0	10.0	10.0	9.1	6.5
				EDS-76	5.0	7.0	8.7	7.5	5.5
普通二联 Homoeogenous vaccine	I	120	4 000	ND	7.9	8.8	10.0	8.9	6.4
				EDS-76	5.0	7.0	8.5	7.2	6.0
	II	120	2 000	ND	8.0	10.0	10.0	8.0	6.5
				EDS-76	6.0	7.5	8.5	7.0	5.0

注: I. 兴华养殖厂; II. 西郊养殖户。下表同。

Note: I. Xinghua chicken farm; II. West suburban district. The same as below.

2.2 预防攻毒保护试验结果

统计结果表明,两种疫苗免疫后即可产生很强免疫力,免疫后 30,180 d 免疫保护率均为 100%,免疫后 360 d 对 ND 和 EDS-76 的免疫保护率仍分别在 92%和 87%以上(表 2)。两种疫苗分别免疫鸡群后对强毒的攻击免疫保护率比较差异不显著(*t* 测验 *P*>0.05)。空白对照组正常,无病症出现。非免疫强毒攻击对照 ND 组发病率为 100%,死亡率为

85%;EDS-76 组产蛋率下降 55%。

2.3 区域性试验结果

在实验室试验和田间试验的基础上,为了进一步验证 ND-EDS-76 异源二联油苗的临床防疫效果,在天津市和河南省等地的山区、丘陵、平原等不同地形、气候条件下,选定 10 个养殖不同品种蛋鸡的饲养场,免疫 120 日龄左右开产前不同品种商品蛋鸡群 200 万只。免疫后 30 d 抽样检测,ND 和 EDS-76 抗体(HI)效

价分别达到 $9.5 \log_2$ 和 $8.5 \log_2$ 以上;180 d 分别为 $8.5 \log_2$ 和 $8.0 \log_2$ 以上;360 d 分别为 $6.0 \log_2$ 和 $5.0 \log_2$ 以上。蛋鸡注射疫苗后

局部反应甚微,无毒副作用,产蛋率平均达 85% 以上,与普通二联油苗的临床使用效果比较差异不显著(t 测验 $P > 0.05$)。

表2 鸡群免疫后抗强毒感染保护率

Table 2 The protection rate for chicken group infected by virulent

疫苗类型 Type of vaccine	鸡组来源 Chicken origin	攻毒数量 The number of challenge (only)	强毒毒株 Virus	保护率/% Period of postinoculation protection		
				30 d	180 d	360 d
异源二联 Heterogenous vaccin	I	60	ND-F ₄₈ E ₉	100	100	97
		60	EDS-76GC ₂	100	100	90
	II	60	ND-F ₄₈ E ₉	100	100	96
		60	EDS-76GC ₂	100	100	90
普通二联 Homoeogenous vaccine	I	60	ND-F ₄₈ E ₉	100	100	95
		60	EDS-76GC ₂	100	100	89
	II	60	ND-F ₄₈ E ₉	100	100	92
		60	EDS-76GC ₂	100	100	87

3 讨论与结语

(1)ND-EDS-76 异源二联油苗和普通二联油苗分别接种蛋鸡群后,10 d 即产生一定抗体,至 30 d 抗体滴度达最高峰。两种疫苗在 30 d 抗体滴度均达 ND 抗体(HI)效价 $10.0 \log_2$,EDS-76 抗体(HI)效价 $8.5 \log_2$ 以上;360 d 抗体滴度仍达 ND 抗体(HI)效价 $6.4 \log_2$,EDS-76 抗体(HI)效价 $5.0 \log_2$ 以上。免疫后 10,20,30,180,360 d 分别检测抗体水平并进行比较,结果差异均不显著。从而说明两种疫苗对 ND 和 EDS-76 具有同等免疫效力,且异源二联油苗因其制造工艺简化,更具有实际意义。

(2)ND-EDS-76 异源二联油苗和普通二联油苗分别同时免疫接种蛋鸡组。免疫后 30,180 d 用 ND 和 EDS-76 强毒攻击,免疫保护率均为 100%,360 d 后免疫保护率分别都在 92% 和 87% 以上。两种疫苗免疫保护率比较差异不显著,说明两种疫苗对鸡群 ND 和 EDS-76 强毒的攻击具有同等防疫效力。

(3)临床应用 ND-EDS-76 异源二联油苗对开产前 120 日龄左右的蛋鸡群 200 万只进行免疫接

种,免疫后 30 d ND,EDS-76 抗体滴度(HI)效价分别达到 $9.5 \log_2$ 和 $8.5 \log_2$ 以上,180 d 分别达到 $8.5 \log_2$ 和 $8.0 \log_2$ 以上,360 d 仍分别为 $6.0 \log_2$ 和 $5.0 \log_2$ 以上。临床免疫鸡群及区域试验的免疫保护率均表明,应用 ND-EDS-76 异源二联油苗对开产前 120 日龄左右蛋鸡群肌肉注射接种 0.5 mL/只,可获得对 ND 和 EDS-76 强毒感染的免疫力,免疫期可维持到整个产蛋期。和普通二联油苗比较没有显著差异,亦无毒副作用,确是一种理想的防疫生物制品。

(4)ND-EDS-76 普通二联油苗制备时病毒增殖需在鸡胚和鸭胚中分别进行,而异源二联油苗的制备其病毒增殖仅在同一鸭胚内就可完成 NDV 和 EDS-76 病毒复制增殖,并互不干扰,且在 96 h 收毒均可达到制苗所需滴度要求,操作起来省时、省力、省工,简化了生产工艺,降低了成本,工作效率和经济效益提高 1 倍以上。ND-EDS-76 异源二联油乳剂灭活疫苗的研制和临床免疫鸡群及区域试验的研究成果,为临床防治鸡新城疫和鸡减蛋综合症提供了新的试验数据和有效途径^[6]。

[参考文献]

- [1] 费恩阁. 动物传染病学[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1995. 378—382;410—413.
- [2] 张振兴. 实用兽医生物制品技术[M]. 北京:中国农业科技出版社,1996. 164—171;189—190.
- [3] H. Grabam Parchmase. 禽病原分离鉴定实验手册[M]. 唐桂运译. 北京:北京农业大学出版社,1993. 98—104;144—152;223—230.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 于船. 动物疾病防治[M]. 北京:北京农业大学出版社,1995. 5—61.

Field test on oil emulsion inactive duck origin ND-EDS-76 bivalent combined vaccine

JIA Ying-ke¹, GAO Mei-xiu¹, CUI Xue-yi², ZHANG Ju-zhou², XIONG Feng²

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

Abstract: Duck origin NDV-D₁₀ and EDS-76GC₂ virus strains were propagated by the same embryos and harvested from embryo allantoic fluid after 96 h culture, and used to prepare oil emulsion inactivated ND-EDS-76 bivalent combined vaccine. Two groups of chicken were vaccinated with the newly developed vaccine and ordinary oil emulsion inactivated bivalent combined vaccine respectively, and the difference of antibody titres between the two groups were not significant. The challenge NDV-F₄₈E₉ and EDS-76GC₂ virulent strains both acted at 30, 180 and 360 d post-immunization. The two vaccinated groups with 60 birds each, selected randomly, showed 100% protectivity at the first two challenge and over 97% and 87% protectivity at last challenge, but not significant difference. The clinical inoculation of layers aged about 120 d with oil emulsion inactivated duck origin ND-EDS-76 bivalent combined vaccine to 2 million single chicken could obtain excellent immune effects of prevent two corresponding field virulent virus infection throughout the laying period.

Key words: oil emulsion inactivated duck origin ND-EDS-76 bivalent combined vaccine; field comparison test; antibody titre; immune protective rate