

鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、传染性 脑脊髓炎四联油佐剂灭活疫苗的研究

姜北宇,刘月焕,郑世兰,景小冬,姚 颖,白丽萍

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所,北京 100089)

摘要:用 NDV La Sota 株、IBV M41 株、EDS₇₆V HSH₂₃株、AEV Van Roekel 株为种毒,分别接种鸡胚或鸭胚,制备各种病毒抗原液,经福尔马林灭活后,采用 FILTRON 盒式超滤系统对制苗病毒抗原液进行浓缩,然后按一定比例混合,以司本 80 及吐温 80 为乳化剂,10 号白油为佐剂,制成 ND-IB-EDS₇₆-AE 四联灭活疫苗。对四联苗各项技术指标进行了测定,证明本疫苗安全、无任何副作用;免疫 10~14 d 后产生免疫力;ND 部分效检,攻毒 100% 保护,每羽份含 ND 效价达 50~123 PD₅₀;IB 部分效检,免疫 21~28 d 后攻毒保护率达 80%~100%,IB HI 效价 $\geq 1:64$;EDS₇₆ 效检,免疫后 21 d HI 效价 $\geq 1:128$;AE 效检,保护率达 80%~100%。

关键词:鸡;四联疫苗;免疫;浓缩

中图分类号:S858.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2003)03-0106-08

Studies on the Tetravalent Inactivated Oil Emulsion Vaccine Against Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, Egg Drop Syndrome and Avian Encephalomyelitis

JIANG Bei-yu, LIU Yue-huan, ZHENG Shi-lan, JING Xiao-dong, YAO Ying, BAI Li-ping

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Beijing

Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: Newcastle disease (ND) virus La Sota strain, infectious bronchitis (IB) virus M41 strain, egg drop syndrome (EDS₇₆) virus HSH₂₃ strain and avian encephalomyelitis (AE) virus Van Roekel strain, used as seed viruses, were separately inoculated into chicken embryos or duck embryos. Four virus fluids were harvested from the inoculated chicken embryos and duck embryos. After they were inactivated with formalin, the viruses were concentrated with the FILTRON cassette ultrafiltration system. A tetravalent inactivated oil emulsion vaccine against ND, IB, EDS₇₆ and AE was prepared by using the concentrated viruses as antigen components, No 10 white mineral oil as adjuvant, Tween-80 and Span-80 as emulsifiers, merthiolate as preservative. The experimental results indicated that the vaccine was safe, and had no adverse effects for chickens. The earliest immunity was produced at 10-14 days post inoculation. The duration of immunity could last 180-360 days for adult birds. Potency tests showed that a single dose contained 50-123 PD₅₀ of ND. Protective rates for NDV, IBV and AEV challenges were 100%, 80%-100% respectively. Mean hemagglutination inhibition (HI) titers for IB and EDS₇₆ were $\geq 1:64$ and $\geq 1:128$ respectively.

Key words: Newcastle disease; Infectious bronchitis; Egg drop syndrome; Avian encephalomyelitis; Virus; Vaccine; Immunity

收稿日期:2002-12-11

作者简介:姜北宇(1956-),男,湖南长沙人,研究员,学士学位,现主要从事禽病研究工作。

鸡新城疫(ND)、传染性支气管炎(IB)、减蛋综合征(EDS₇₆)、传染性脑脊髓炎(AE)是危害我国养禽业发展的4种主要病毒性传染病。控制这4种传染病的有效手段是进行疫苗免疫接种^[1~4]。然而以往预防这4种传染病的疫苗都是单独免疫的,不仅耗费了大量人力物力,而且还会使鸡产生严重应激反应。为了减少接种次数,便于生产中应用,我们在单苗研制成功的基础之上开展了四联油佐剂灭活疫苗的研制工作。经过4年系统地研究工作,完成了四联苗实验室试验、田间试验、中间试制及区域试验,完成了本项目的全部试验内容。试验取得了满意的结果,在国内外首次研制成功ND-IB-EDS₇₆-AE四联灭活苗。现将结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 制苗用种毒株

1.1.1 NDV La Sota 株 由中国兽药监察所引入冻干毒,经SPF鸡胚增殖复壮2代作为种毒,其毒价为 10^{10} EID₅₀/mL,HA价为1:1280。

1.1.2 IBV M41 株 由中国兽药监察所引入冻干毒,经过SPF鸡胚增殖2代作为种毒,其毒价为 $10^{8.75}$ EID₅₀/mL。

1.1.3 EDS₇₆ V HSH₂₃ 株 本组1991年自河北某EDS₇₆流行地区分离,经过系统病毒鉴定证明为纯净EDS₇₆病毒株。其毒价为 $10^{8.5}$ EID₅₀/mL,HA价 $\geq 1:10240$ 。

1.1.4 AEV Van Roekel 株 由中国兽药监察所引入冻干毒,经SPF鸡胚传2~4代,取胚脑制成1:10的悬液为种毒,其毒价为 $10^{7.0}$ EID₅₀/mL。

1.2 鸡胚和鸭胚

1.2.1 鸡胚 从北京实验动物中心购入SPF鸡种蛋,北京某种鸡场购入非免疫种蛋,北京某种鸡场购入的普通健康鸡种蛋,在本研究室孵化。SPF种蛋用于种毒继代、繁殖及毒价测定;非免疫种蛋用于EID₅₀试验、抗体测定及疫苗抗原液制备;普通种蛋用于抗原制备。

1.2.2 鸭胚 从北京某种鸭场购入健康的、EDS₇₆ HI抗体为阴性的鸭种蛋,在本研究室孵化。

1.3 试验鸡

1.3.1 SPF白色来航鸡 由北京实验动物中心购入种蛋,在本所SPF鸡专用孵化器孵化出雏,饲养在SPF隔离器内。

1.3.2 非免疫健康鸡 从北京某个体户鸡场购入

非免疫种蛋,本组孵化出雏。

1.3.3 普通健康鸡 从北京某种鸡场购入1日龄雏鸡,在本所饲养至母源抗体消失后进行免疫。

1.4 攻击用强毒、攻毒方法及剂量

1.4.1 NDV F48E8 株强毒 由中国兽药监察所引入。经SPF鸡胚增殖2代,毒价为 $10^{9.7}$ ELD₅₀/mL,攻毒途径为肌肉注射,剂量为 10^{-4} 稀释液每只注射1 mL。

1.4.2 IBV M41 株 来源、代次、毒价同1.1.2。攻毒采用气管内注入,攻毒量为毒尿囊液原液0.3~0.5 mL/只。

1.4.3 EDS₇₆ V127 株 由中监所引入,本组用易感鸭胚增殖,HA价为1:20480。

1.4.4 AEV Van Roekel 株 来源、代次、毒价同1.1.4。攻毒采用脑内途径,攻击原毒或10~100倍稀释毒0.03~0.05 mL/只,含毒量为 $10^{3.2}$ ~ $10^{5.4}$ EID₅₀。

1.5 疫苗的试制

1.5.1 疫苗抗原液的制备 (1)NDV La Sota 株:以 10^{-2} ~ 10^{-3} NDV种毒稀释液0.1 mL接种于10~11日龄非免疫鸡胚或普通鸡胚尿囊腔,接种后放入37℃孵化器内继续孵化,接种后72 h照蛋,弃去死胚,72~120 h内每4~8 h照蛋1次,收取72 h后死亡鸡胚及120 h后活胚,放入4℃冰箱内,4~12 h后收取尿囊液,在-30℃冰箱内保存。经菌检为阴性、HA价在1:320~1:2560、毒价 $\geq 10^9$ EID₅₀/mL,可作为制备疫苗用抗原。(2)IBV株,以20~100倍稀释的M41株种毒0.1 mL接种于10~11日龄非免疫鸡胚或普通鸡胚尿囊腔,接种后放入37℃条件下继续孵化,定期照蛋,弃去24 h内死亡鸡胚,收取24~48 h死胚及48 h全部活胚放入4℃冰箱内,4~10 h后收获尿囊液,经检验无菌、毒价 $\geq 10^{7.5}$ EID₅₀/mL可作为制苗抗原液。(3)EDS₇₆ V HSH₂₃株,以10~100倍稀释的HSH₂₃种毒0.1 mL接种于10日龄鸭胚尿囊腔,接种后继续孵化,定期照蛋,弃去72 h前死亡鸭胚,收取72~120 h死亡鸭胚及120 h活胚,放入4℃冰箱内,4~12 h收取鸭胚尿囊液及羊水,放入-30℃冰箱内保存,经检验无菌、HA价达1:10240的毒液可作为制苗抗原液。(4)AEV VR株,以10倍稀释的AEV VR株种毒0.2 mL接种于6日龄SPF鸡胚或非免疫鸡胚卵黄囊,接种后放入37℃下继续孵化,接种8~9 d后收集胚体(去喙、肢趾、眼球)及绒毛尿囊膜,称重,

加入倍量生理盐水,用捣碎机将胚组织捣碎,装入瓶内,反复冻融3次后,以3 500 r/min离心30 min,取上清液,经检验无菌、毒价达 $5 \times 10^{6.0}$ EID₅₀/mL可作为制备疫苗抗原液。

1.5.2 疫苗抗原液的灭活 经检验合格的抗原液,加入一定量的福尔马林后,放入37℃恒温摇床内灭活,NDV抗原液用最终浓度为0.1%的福尔马林灭活16 h;EDS₇₆ V抗原液用最终浓度为0.12%的福尔马林灭活16 h;IBV用最终浓度为0.15%的福尔马林灭活16 h;AEV抗原液用0.3%福尔马林灭活24 h。上述抗原液经各自灭活检验证明无活病毒存在,可用于制备四联苗。

1.5.3 抗原液的浓缩 采用日本富士公司生产的中型盒式超滤系统,选用中型低吸附超滤组合膜浓缩制苗抗原液,浓缩时可根据四联苗内所必需的抗原用量选取任何浓缩的倍数^[5,6]。浓缩前必需将待浓缩液进行前处理,除去大颗粒杂质,以延长超滤膜的使用寿命。

1.5.4 乳化制苗 以各种病毒液按一定配比混合均匀后为水相,杭州炼油厂生产的10号白油为佐剂,上海大众制药厂生产的吐温-80及司本-80为乳化剂,按本组双相(W/O/W型)油佐剂配方及乳化方法,制备四联油佐剂灭活疫苗。

1.6 四联苗的实验室检验

1.6.1 物理性状观察 按文献方法^[6]进行,包括剂型、粘度、粒度及稳定性。

1.6.2 安全性检验 每批疫苗肌肉或颈部皮下接种21~35日龄SPF鸡或抗体阴性鸡8~20只,每只注射四联苗2羽份(1.0 mL),观察21~28 d,观察期间鸡只应全部健活,不应出现由疫苗引起的全身及局部反应。

1.6.3 效力检验 我们按下述四联苗各成份效检的标准及方法,对连续8批四联苗进行了效力测定工作。

(1)ND效检 按文献方法^[7,8]将四联苗用不含抗原的生理盐水乳剂稀释成1/25,1/50,1/100三个稀释度,每个稀释度注射无ND抗体的3~6周龄雏鸡10只,免疫后21 d连同对照鸡5~10只攻NDV强毒,观察14 d,记录死亡与保护的鸡数,对照鸡应在6 d内全部死亡。以Karber法计算PD₅₀。合格的疫苗ND效价应达50 PD₅₀/羽份,可信范围不低于35 PD₅₀/羽份。

(2)IB的效检 IB效检可采用以下二种方法:

①血清抗体效价测定。按英国药典^[7],8只以上3~6周龄SPF鸡或IB抗体阴性鸡,每只用1羽份四联苗以肌肉途径免疫,免疫21~35 d后采血测IB HI抗体,免疫鸡平均效价 $\geq 1:64$ 、对照鸡为阴性,则疫苗合格。②M41株攻毒。依照我国IB灭活苗规程,按①进行免疫,免疫后21~35 d用M41强毒气管内攻毒,攻毒后观察10 d,对照应全部发病、免疫鸡保护6/8以上,或对照鸡发病3/4、免疫鸡全部保护。

(3)EDS₇₆的效检 按英国药典,用3~6周龄的易感鸡(EDS₇₆ HI抗体 $\leq 1:4$)8~20只,每只肌肉注射疫苗1羽份,接种后21~35 d采血测定HI抗体,免疫鸡HI抗体价应 $\geq 1:128$,对照鸡抗体应 $\leq 1:4$ 。

(4)AE的效检 按英国药典,用3~6周龄易感鸡(AE中和抗体为阴性)4只以上,每只肌肉注射疫苗1羽份,接种后21~35 d用AEV VR株强毒脑内攻击,攻毒后观察临床变化21 d,对照组鸡发病应达80%以上,免疫组鸡保护率应达80%以上。

1.6.4 免疫产生期试验 本试验采用50只SPF鸡,4周龄时免疫。将这50只鸡分成免疫组及对照组2个组,免疫组30只鸡,每只肌注1羽份四联苗,其余20只鸡为对照组,注射生理盐水乳剂。免疫后7,10,14,21,28 d分别取6只免疫组鸡及4只对照组鸡,采血测定ND HI,IB HI及EDS₇₆ HI抗体,并且用AE VR株强毒株脑内攻击及用IBV M41株气管内注射攻毒。

1.6.5 保存期试验 将疫苗放在4℃及室温(20℃左右)条件下不同时间取出,分别免疫3~4周龄SPF或抗体阴性鸡只,进行疫苗效力测定,观察其保存期。

1.6.6 四联苗与进口三联苗及国产三联苗比较试验 试验采用80只抗体阴性健康鸡,将其分成4组,每组20只,第1组每只免疫本组四联苗1羽份(0.5 mL/只),第2组每只免疫国内ND-IB-EDS₇₆三联灭活苗1羽份(0.5 mL/只),第3组每只免疫进口ND-IB-EDS₇₆三联灭活苗1羽份(0.5 mL/只),第4组每只注射生理盐水乳剂0.5 mL,28日龄进行免疫。免疫后分别测定ND HI,IB HI及EDS₇₆ HI效价,并且用NDV,AEV及IBV强毒分别攻击,测定各种疫苗的保护效力。

1.6.7 四联苗的免疫持续期试验 本试验使用海赛克斯父母代种鸡,试验分成4组。在18周龄时,

第1,2,3组鸡,分别用批号为9801,9802,9803的四联苗免疫(肌肉注射),每只1羽份。同时,这3组鸡只均用ND La Sota活苗滴鼻、点眼免疫。第4组鸡为对照鸡,仅用ND La Sota活苗免疫。免疫前及免疫后定期采血测ND,IB,EDS₇₆ HI抗体,定期采集种蛋进行AE胚易感试验^[9,10],测定免疫鸡群仔代鸡AE的保护情况,此外,定期对免疫组及对照组种鸡进行NDV,IBV,EDS₇₆ V,AEV 4种强毒攻毒试验,攻击NDV及IBV强毒时还设抗体阴性非免疫成年鸡对照组。

1.7 四联苗田间试验

将实验室制品用于生产,免疫开产前的种鸡及蛋鸡,免疫后观察鸡群状况,定期采血测定ND HI,IB HI,EDS₇₆ HI及/或AE中和指数,另外定期采集免疫鸡种蛋,进行AE胚易感试验,了解免疫鸡群对仔代AE的保护情况。

1.8 四联苗的中间试制与区域试验

按照本课题组制订的《鸡新城疫-传染性支气管炎-减蛋综合征-传染性脑脊髓炎四联油佐剂灭

活疫苗制造及检验试行规程》(草案),在北京市农林科学院畜禽生物制品中试基地进行疫苗的中试生产及检验,用中试疫苗免疫开产前的种鸡(16~20周龄)进行大规模的区域试验。

2 结果

2.1 四联灭活苗的物理性状观察

ND-IB-EDS₇₆-AE四联油佐剂灭活苗的剂型为W/O/W型;粘度为1~1.4 s,非常稀薄;粒度均匀,98%以上为1 μm左右,个别2~3 μm,3 500 r/mim离心15 min,管底少量出水,4~8℃冰箱内保存180 d不分层,180 d以后瓶底出现轻微分层现象,轻轻摇动即成为均匀乳状液,这种状态可保持1~2年。室温条件下保存60~120 d不分层,37℃只能保存数天。

2.2 安全性检验

用连续8批疫苗接种3~5周龄SPF鸡或抗体阴性健康鸡,每只接种2羽份(1.0 mL)疫苗,接种后观察21~28 d,免疫鸡精神食欲良好,无不良反应(表1)。证明本疫苗是安全的。

表1 四联灭活苗对鸡的安全性试验

疫苗批号	注射剂量 (mL)	接种途径	鸡数	品种	日龄	观察天数	临床反应	
							全身	局部
9701	1.0	胸肌注射	14	来航	27	21	无	无
9702	1.0	胸肌注射	8	来航(SPF)	21	28	无	无
9703	1.0	胸肌注射	8	来航(SPF)	21	28	无	无
9704	1.0	胸肌注射	20	海赛	31	21	无	无
9705	1.0	胸肌注射	10	海赛	31	21	无	无
9706	1.0	胸肌注射	8	来航(SPF)	21	28	无	无
9707	1.0	胸肌注射	10	来航(SPF)	28	28	无	无
9801	1.0	胸肌注射	10	来航(SPF)	28	28	无	无

2.3 效力检验

我们在6次试验(试验1至试验6)中,分别对8批四联苗进行了效力检验,效检方法包括血清抗体测定及攻毒试验。

2.3.1 四联苗免疫鸡的血清抗体监测 结果见表2。从表中可以看出,采用1羽份(0.5 mL)四联苗免疫鸡只,免疫21~28 d后,ND,IB,EDS₇₆ HI抗体

均明显上升,并达到较高水平,对照组鸡抗体保持阴性。四联苗IB及EDS₇₆二部分效力检验均可采用抗体测定方法,对照IB灭活苗效力标准,8批疫苗免疫鸡的平均IB HI抗体滴度均达到了1:64的标准,8批疫苗IB效检均合格;EDS₇₆效检,8批疫苗均合格,达到了1:128的效力标准。

表 2 四联苗免疫后血清抗体监测结果

	疫苗 批号	免疫 鸡数	免疫 剂量	ND HI(GMT)				IB HI(GMT)				EDS ₇₆ HI(GMT)			
				0d	21 d	28 d	49 d	0d	21 d	28 d	49 d	0d	21 d	28 d	49 d
试验 1	9702	8	0.5 mL	1.5	-	676	388	5.3	-	48.5	338	0	-	1 024	1 024
	9703	8	0.5 mL	1.5	-	512	256	5.3	-	111	588	0	-	1 024	1 024
	ck	8	盐水乳剂	1.5	-	0	0	5.3	-	2.3	3.5	0	-	0	0
试验 2	9704	20	0.5mL	1	512	388	-	1.8	276	223	-	1	194	223	-
	9705	20	0.5 mL	1	208	362	-	1.8	181	256	-	1	104	137	-
	ck	20	盐水乳剂	1	1.4	1.3	-	1.8	32	8	-	1	0	0	-
试验 3	9706	8	0.5 mL	0	0	776	-	1.4	-	84	-	0	-	1024	-
	ck	4	盐水乳剂	0	-	0	-	1.4	-	1.7	-	0	-	0	-
试验 4	9707	12	0.5 mL	0	512	294	-	<4	18	223	-	0	256	512	-
	ck	8	盐水乳剂	0	0	0	-	<4	<4	<4	-	0	0	0	-
试验 5	9801	20	0.5 mL	0	223	239	-	8	-	76	-	0	256	512	-
	ck	10	盐水乳剂	0	0	0	-	8	-	4	-	0	0	0	-
试验 6	9802	20	0/5 mL	0	-	338	-	<4	-	74	-	0	-	446	-
	ck	10	盐水乳剂	0	-	0	-	<4	-	<4	-	0	-	0	-

注:试验 1、试验 3、试验 5 及试验 6 使用的是 SPF 鸡,于 3~4 周龄时进行免疫;试验 2 及试验 4 使用的是普通海赛雏鸡,分别于 31 日龄及 28 日龄免疫

2.3.2 四联苗免疫鸡攻毒试验 对这 8 批四联苗免疫鸡 ND,IB 及 AE 攻毒结果见表 3。1 羽份四联苗免疫鸡 ND 攻毒保护率为 100%,ND 效价为 50~123 PD₅₀/羽份,达到或超过国际上有关 ND 灭活苗

的效力标准。对四联苗免疫鸡 IB M41 株攻毒结果,保护率达 80%~100%,而对照鸡发病率达 80%以上;AE 脑内攻毒后免疫鸡保护率达 80%~100%。

表 3 四联苗免疫鸡 ND,IB 及 AE 攻毒试验结果

疫苗批号	分组	ND		IB 攻毒保护率(%)	AE 攻毒保护率(%)
		攻毒保护率(%)	PD ₅₀ /羽份		
9702	免疫	-	50	-	4/4(100%)
	ck	-	全部死亡	-	1/4(25%)
9703	免疫	-	54	4/5(80%)	4/4(100%)
	ck	-	全部死亡	0/5(0)	1/4(25%)
9704	免疫	20/20(100%)	87	7/8(87.5%)	10/10(100%)
	ck	0/10(0)	全部死亡	0/4(0)	1/5(20%)
9705	免疫	20/20(100%)	107	8/8(100%)	9/10(90%)
	ck	0/10(0)	全部死亡	0/4(0)	1/5(20%)
9706	免疫	-	123	-	8/10(80%)
	ck	-	全部死亡	-	1/4(25%)
9707	免疫	10/10(100%)	71	5/6(83%)	6/6(100%)
	ck	0/5(0)	全部死亡	0/4(0)	0/4(0)
9801	免疫	10/10(100%)	71	10/10(100%)	5/5(100%)
	ck	0/10(0)	全部死亡	1/5(20%)	1/5(20%)
9802	免疫	10/10(100%)	-	4/5(80%)	4/5(80%)
	ck	0/10(0)	-	1/5(20%)	1/5(20%)

2.4 免疫产生期试验结果

从表 4 试验结果可以看出,ND 及 EDS₇₆ HI 抗体在四联苗免疫后 10 d 达到较高水平,分别为 102 及 256;而 IB HI 抗体及 IB 和 AE 攻毒试验证明,四

联苗免疫后 14 d 可产生部分抵抗 IB 及 AE 强毒攻击的保护力(3/6),免疫 21 d 后才产生较强的抵抗 IB 及 AE 攻毒的保护力。因此,四联苗 ND 及 EDS₇₆的最早产生免疫时间为 10 d,IB 及 AE 最早

产生免疫时间为 14~21 d。

下保存 420 d 效力不变。在室温条件下可保存 90 d 以上。

2.5 疫苗保存期试验结果

四联苗保存期试验表明,四联苗在 4~8℃ 条件

表 4 免疫产生期试验

免后时间	分组	ND HI	IB		EDS ₇₆ HI (GMT)	AE 攻毒 保护数/攻毒数
			HI	保护率		
0	免疫	0	<4	—	0	—
	ck	0	<4	—	0	—
7	免疫	2.38	<4	1/4	11.3	0/6
	ck	0	<4	0/4	0	0/4
10	免疫	102	4.5	1/6	256	1/6
	ck	0	<4	0/4	0	0/4
14	免疫	322	6.36	3/6	815	3/6
	ck	0	<4	0/4	0	1/4
21	免疫	512	18	6/6	512	5/6
	ck	0	<4	1/4	0	0/4
28	免疫	294	223	5/6	446	6/6
	ck	0	<4	0/4	0	0/4

2.6 本组四联苗与国产三联苗及进口三联苗比较试验结果

将本组四联苗、国产商品 ND-IB-EDS₇₆ 三联苗及进口 ND-IB-EDS₇₆ 三联苗分别免疫鸡只,比较其 ND、IB 及 EDS₇₆ 三种成分的免疫效力,结果见表 5。免疫 21~28 d 后,这三种疫苗 ND 及 EDS₇₆ HI 效价

没有明显差异,ND 攻毒均 100% 保护,ND 效价四联苗与国内三联苗均为 71 PD₅₀/羽份,进口苗为 54 PD₅₀/羽份,三种苗均达到国际标准。IB 部分的免疫效力,本组四联苗及国外进口三联苗较好,攻毒 100% 保护,而国内三联苗 IB 部分的免疫效力较差,攻毒 6/10 保护。

表 5 本组四联苗与国产三联苗及进口三联苗比较试验

疫苗种类	免疫 剂量 (mL)	鸡数	免后时间 (d)	ND			IB		EDS ₇₆ HI	AE 攻毒
				HI	攻毒	PD ₅₀	HI	攻毒		
本组四 联苗	0.5	20	0	0	—	—	8	—	0	—
			21	223	10/10	71	60	—	256	—
			28	239	—	—	76	10/10	512	5/5
国产三 联苗	0.5	20	0	0	—	—	8	—	0	—
			21	208	10/10	71	16	—	194	—
			28	181	—	—	19	6/10	338	—
进口三 联苗	0.3	20	0	0	—	—	8	—	0	—
			21	181	10/10	54	23	—	315	—
			28	104	—	—	128	10/10	338	—
对照组	—	20	0	0	—	—	8	—	0	—
			21	0	0/10	全部死亡	2	—	0	—
			28	0	—	—	4.6	1/5	0	1/5

2.7 四联苗的免疫持续期

表 6 列出了三批四联苗免疫期抗体测定及 AE 胚易感试验结果。

2.7.1 鸡新城疫的免疫持续期 四联苗免疫接种后,免疫组 ND HI 抗体水平明显升高达 1:256~2048,免疫后 210 d 平均 HI 抗体水平可维持在 1:

512, 270 d 达 1:200 以上。360 d 在 1:97 以上。ND 强毒攻击免疫鸡, 免后 180 d 及 300 d 攻击, 3 批疫苗免疫鸡均 100% 保护, 无任何症状, 产蛋正常。同批仅免疫活苗鸡虽无死亡, 但出现下痢, 产蛋下降等非典型 ND 症状, 另外, 我们还用无 ND

抗体的非免疫成年鸡作对照, 非免疫鸡在攻毒后 6 d 内全部死亡。免疫后 12 个月攻 ND 强毒, 免疫鸡均健活, 但出现轻度下痢, 产蛋下降, 产软壳蛋, 14 d 内恢复。

表 6 三批四联苗抗体测定及 AE 胚易感试验结果

疫苗批号	检测项目	免后时间(d)					
		0	90	150	210	270	360
9801	ND HI	15	832	724	724	362	181
	EDS ₇₆ HI	0	832	446	477	415	477
	IB HI	147	549	256	891	197	256
	AE 胚易感	-	20/20(100%)	17/22(77%)	16/20(80%)	14/21(67%)	-
9802	ND HI	15	832	588	630	239	128
	EDS ₇₆ HI	0	832	512	388	256	294
	IB HI	147	724	549	1552	279	208
	AE 胚易感	-	21/21(100%)	20/21(95%)	18/21(86%)	13/19(68%)	-
9803	ND HI	15	676	676	549	208	128
	EDS ₇₆ HI	0	891	338	362	512	446
	IB HI	147	477	1097	1351	256	128
	AE 胚易感	-	22/22(100%)	16/20(80%)	16/22(73%)	15/23(65%)	-
对照	ND HI	15	9.2	27.9	15	14	12
	EDS ₇₆ HI	0	0	0	0	0	0
	IB HI	147	97	17	34	38	97
	AE 胚易感	-	0/21(0)	0/21(0)	0/20(0)	0/20(0)	-

2.7.2 鸡传染性支气管炎的免疫持续期 免疫后 IB HI 抗体水平明显升高, 几何平均抗滴度达 1:512 ~ 1024, 并且可持续大约 210 d, 270 d 抗体水平有所下降在 1:128 ~ 256, 到 360 d 仍可达 1:128 以上。IBV M41 株强毒攻毒, 免后 150 d 及 210 d 攻击, 三批疫苗均 100% 保护, 同批对照 2/5 (150 d)、3/5 (210 d) 出现呼吸症状。非免疫对照鸡 5/5 出现呼吸道症状, 免疫后 270 d, 三批疫苗免疫鸡虽未出现呼吸道症状, 但产蛋下降, 有软壳蛋出现。

2.7.3 产蛋下降综合症的免疫持续期 免疫后, 四联苗免疫鸡 EDS₇₆ HI 抗体水平明显升高, 在免后的 360 d 内, 维持在 1:256 ~ 1024, 免疫后 120, 240, 360 d 攻毒, 三批疫苗免疫鸡产蛋均正常, 而对照鸡出现大幅度产蛋下降, 下降幅度为 30% ~ 50%。同时蛋壳颜色变淡, 出现了许多无壳蛋、沙壳蛋、小蛋等。

2.7.4 传染性脑脊髓炎的免疫持续期 种鸡免疫 210 d 后, 用 AEV-VR 株经肌肉途径进行攻击, 攻毒后免疫组鸡产蛋正常, 而对照组鸡产蛋出现轻微下降(下降幅度为 6% ~ 11%); 免疫后定期采集种蛋, 进行胚易感试验, 免后 90 d 保护率为 100%, 150 d 为 77% ~ 95%, 210 d 达 73% ~ 86%, 270 d 达 65% ~ 68%。

2.8 四联苗的田间试验

用实验室制备四联苗进行田间试验, 共进行 7 批疫苗的试验, 免疫开产前的种鸡共 5.1 万羽份。结果表明, 鸡群免疫后 ND, IB, EDS₇₆ HI 抗体滴度明显升高, 并且在免疫后的 180 ~ 360 d 内 ND, IB, EDS₇₆ 三种抗体均维持在一个较高水平。免疫后 90 d 采集种蛋进行 AE 胚易感试验, 保护率达 100%, 免后 150 d 保护率达 77% ~ 96%, 210 d 达 75% ~ 95%, 270 d 达 76% ~ 85%。免疫鸡群生产状况良好, 产蛋达到了高水平, 种蛋孵化出雏率正常, 孵出的雏鸡健康生长发育。

2.9 四联苗的中间试制与区域试验

中试四联苗 11 批共 28.6 万羽, 用中试苗免疫开产前的种鸡 26.5 万羽, 免疫后鸡群安全无任何不良反应, 免疫效果良好。

3 结论与讨论

对连续 7 批四联苗进行了物理性状观察, 表明 ND-IB-EDS₇₆-AE 四联油佐剂灭活苗的剂型为 W/O/W 型, 粘度为 1 ~ 1.4 s, 非常稀薄, 易于注射, 并具有良好的稳定性, 4 ~ 8 ℃ 冰箱保存 180 d 左右不分层, 室温条件下保存 60 ~ 120 d 不分层, 37 ℃ 条件下可保存数天。

用连续 8 批疫苗以 2 羽份的免疫剂量接种 3~5 周龄 SPF 鸡或抗体阴性鸡, 观察 21~28 d, 免疫鸡精神食欲良好, 无不良反应, 证明本疫苗是安全的。

为了解决联苗生产过程中出现的免疫剂量过大、抗原含量不足这一关键技术难题, 我们采用了日本富士滤器公司生产的 FILTRON 盒式超滤系统对制苗病毒液进行了浓缩, 保证了每羽份有限的疫苗量内含有足够的抗原, 生产出了高效价的浓缩四联灭活苗。

对连续 8 批四联苗效力检验试验结果表明, ND 效检达到或超过国际上有关 ND 灭活苗的效力标准; IB 效检, 8 批疫苗均合格, 免疫后 HI 测定均超过了 1:64 这一标准(批号为 9702 的疫苗免疫后 28 d HI 滴度 < 1:64, 但免疫后 49 d 测定 HI 滴度达 1:338, 超过了 1:64 这一标准); EDS₇₆ 效检, 9 批均合格, 达到或超过了 1:128 的标准; AE 的效检, 脑内攻毒保护率达 80%~100%, 达到了设计指标。试验结果充分证明了本组研制的四联灭活苗具有良好的抵抗 NDV, IBV, EDS₇₆V 及 AEV 强毒攻击的保护力, 达到或超过了国际上有关预防这四种传染病单苗的效力标准。

免疫产生期试验结果表明, 四联苗内不同抗原成份的免疫产生期存在一定差异, ND 及 EDS₇₆ 部分的免疫产生期为 10 d; IB 及 AE 部分的免疫产生期为 14~21 d, 即免疫后 14 d 可产生一定免疫力, 21 d 才能产生较坚强的免疫力。

四联苗保存期的试验结果表明, 疫苗 4℃ 条件下保存 420 d, 其效力不变。在室温条件下, 可保存 21 d 以上。

将本组四联苗与国产三联苗及进口三联苗的免疫效力进行比较, 免疫后 21~28 d, 三种疫苗 ND HI 抗体水平无明显差异, ND 强毒攻击均 100% 保护, ND 效价本组四联苗与国产三联苗均为 71 PD₅₀/羽份, 进口三联苗稍低为 54 PD₅₀/羽份, 但也达到了国际上有关 ND 灭活苗的效力标准; EDS₇₆ 的 HI 效价三种疫苗相似; IB HI 试验结果, 本组四联苗与进口四联苗效价相似, 攻毒均为 100% 保护, 而国内三联苗免后 IB HI 效价较低, 攻毒仅 6/10 保护。因此, 四联苗内 ND, IB, EDS₇₆ 三种成份的总体免疫效力与进口三联苗相似, 而优于国产三联苗。

四联苗免疫持续期试验结果证明: ND 部分免疫持续期为 300 d 以上, EDS₇₆ 部分的免疫持续期 360 d, IB 部分的免疫期为 210 d 以上, AE 部分免疫持续期为 210 d 以上。

四联苗田间试验及区域试验 免疫开产前的种鸡共 31.6 万羽, 对免疫鸡群免疫后的 180~360 d 效力测定结果表明, ND, IB, EDS₇₆ HI 抗体一直维持在较高水平; AE 胚易感试验证实, 免疫后 90 d 对仔代雏鸡的保护率达 100%, 150 d 达 77%~96%; 210 d 达 75%~95%, 270 d 达 76%~85%。免疫鸡群生产状况良好, 产蛋达到了高水平, 种蛋孵化出雏率正常, 孵出的雏鸡健康生长发育。试验取得了满意的结果, 在国内外首次研制成功 ND, IB, EDS₇₆, AE 四联油佐剂灭活疫苗。

参考文献:

- [1] 郑世兰, 姜北宇, 刘福致, 等. 鸡新城疫油佐剂灭活疫苗的研究[J]. 华北农学报, 1995, 3(10): 115-123.
- [2] 马闻天, 徐翠华, 李慧蛟. 鸡新城疫灭能苗研究: I 鸡新城疫灭能苗比较试验[J]. 家畜传染病, 1984, 19(2): 1-5.
- [3] 王凤龙, 赵振华, 马学恩. 禽脑脊髓炎灭活油乳剂疫苗的研制[J]. 中国畜禽传染病, 1995, (4): 5-7.
- [4] 唐秀英, 王立南, 王立滨. 鸡新城疫、传染性支气管炎、病毒性关节炎三联油乳剂灭活疫苗的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1992, (3): 10-15.
- [5] 高以恒, 叶凌碧. 膜分离技术基础[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 254-259.
- [6] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990. 149-153.
- [7] British Pharmacopoeia (Veterinary) 1985: HMSO London Veterinary Vaccine: 162, 169, 172, 180.
- [8] 马闻天, 李慧蛟, 徐翠华. 鸡新城疫灭能苗研究 II 鸡新城疫油乳剂灭能苗免疫试验[J]. 中国畜禽传染病, 1987, 32(1): 9-12.
- [9] (美) H. Graham Purc hase. 禽病原分离与鉴定实验手册(第 3 版)[M]. 唐桂运译. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 186-189.
- [10] (美) B.W. 卡尔尼克. 禽病学(第九版)[M]. 高福, 等译. 北京: 北京农业大学出版社, 1991. 445-454.