

# 鸡传染性鼻炎

## 二价油苗免疫鸡群抗体动态研究

苗得园<sup>1</sup>, 张培君<sup>1</sup>, 龚玉梅<sup>1</sup>, 苗德荣<sup>2</sup>

(1. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089; 2. 山东省鲁抗医药集团鲁原公司, 山东 济宁 272041)

**摘要:** 应用阻断 ELISA (B-ELISA)、血凝抑制试验(HI)和血清平板凝集试验(SPA)方法, 检测了鸡群用鸡传染性鼻炎 A、C 二价油乳剂灭活疫苗免疫后 0~390 d 的血清阻断 ELISA、HI 和平板凝集抗体消长情况, 并绘制了相应抗体曲线。结果表明, 鸡体按规定免疫程序免疫后, A 型 B-ELISA 抗体和 HI 抗体在测定期内一直保持比较高的水平, C 型 B-ELISA 抗体首免 50~180 d, SPA 抗体在首免后 50~60 d 达到高峰, 此后抗体缓慢下降, 但各种抗体至少可持续 390 d 以上。结果进一步显示了二价苗良好的免疫原性以及 B-ELISA 和 SPA 较好的敏感性, 为二价苗、各种诊断方法或其试剂盒产品的进一步应用提供了参考。

**关键词:** 阻断 ELISA; 血凝抑制试验; 血清平板凝集试验; 鸡传染性鼻炎二价油乳剂灭活苗; 抗体曲线

中图分类号: S858.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)03-0135-05

鸡传染性鼻炎(IC)是由副鸡嗜血杆菌(*Hpg*)引起的鸡的重要的细菌性传染病之一。可引起蛋鸡产蛋率下降、生长发育鸡群的生长受阻及淘汰率的增加, 并易继发或并发其他传染病造成更严重的后果, 从而引起很大的经济损失。本菌通常分为 A, B, C 3 个血清型, 由于各型均能致病且现有疫苗无型间交叉保护, 因此在诊断时确定感染菌的血清分型对于节约成本和更好的防治本病有重要意义。为了使本病的诊断更加准确、快速和方便, 并能在诊断同时确定感染菌的血清分型, 作者已在 A、C 型特异性单抗的基础上建立了可检测 A 型和 C 型副鸡嗜血杆菌特异性抗体单抗阻断酶联免疫吸附试验方法(B-ELISA)<sup>[1,2]</sup>及其试剂盒产品<sup>[3]</sup>, 并在临床上进行了初步应用<sup>[4]</sup>, 为给本方法和产品在 IC 诊断上的应用提供参考, 作者曾研究了副鸡嗜血杆菌人工感染鸡和 A 型抗原免疫鸡抗体动态<sup>[5,6]</sup>, 为了解成品苗免疫后鸡群的各种抗体动态, 以及为 B-ELISA 试剂盒和其他诊断方法在临床中的应用提供进一步的数据参考, 作者又进行了二价油乳剂灭活疫苗免疫鸡群 B-ELISA 和 SPA 抗体的观察, 现将研究情况报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

0083 (A 型)、Modesto (C 型)来自美国菌种保藏中心。其他菌株均为本实验室保存。阴、

收稿日期: 2000-07-18

基金项目: 农业部“九五”畜牧业重点科研计划资助项目部分内容(95 牧-02-03-08)

作者简介: 苗得园(1973-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事畜禽疾病病原学及防治研究。

阳性对照血清: 本实验室保存, 阴性血清采自无鸡传染性鼻炎病史和未用过本病疫苗的鸡场或SPF鸡群(经琼脂双向双扩散检查为阴性<sup>[3]</sup>), A、C型阳性血清分别应用0083或Modesto株全细胞抗原免疫与阴性血清相同来源的鸡只制备<sup>[3]</sup>。平板凝集抗原, 用Modesto株制备, 本室保存。鸡传染性鼻炎二价油乳剂灭活疫苗为中国兽药监察所和本所联合研制的试验产品, 批号9901, 9902和9903。

## 1.2 B-ELISA试剂盒

本所生产的试验产品, 各种组分见参考文献[2]。

## 1.3 B-ELISA程序

参照参考文献[2, 3]方法进行。大致步骤如下: A、C型抗原包被相同数目的孔(或板)→洗涤→将血清分别加于A、C型抗原包被孔→37℃作用→洗涤→加A、C单抗→加酶标抗体→37℃作用→洗涤→加入新配制底物液→显色→终止→读取OD值→分别计算待检血清对A、C型单抗的阻断率。

阻断率(%) =  $100 - 100 \times \text{被检血清样品 OD 值} / \text{阴性对照血清平均 OD 值}$

若对A型单抗阻断率 $\geq 50\%$ 则判为A阳性, 记为“A+”, 若对C型单抗阻断率 $\geq 50\%$ 则判为C阳性, 记为“C+”, 两者有其一为阳性, 结果即为阳性。

## 1.4 血凝抑制试验(HI)及血清平板凝集试验(SPA)程序

血凝抑制试验参照Sawata等<sup>[7]</sup>方法进行, A、C型抗体的测定均采用醛化红血球进行, 血清在测定前进行吸附, 效价在15以上判为阳性。A、C型抗原亦参照Sawata等<sup>[7]</sup>方法制备, HA效价分别为160和64。SPA程序参照Yamamoto<sup>[8]</sup>方法进行, 各取抗原和血清15~20μL在玻片上混合均匀, 5min内观察结果。

## 1.5 免疫鸡阻断抗体动态观测方法

将疫苗免疫56日龄健康蛋鸡, 并于首免后24d进行第2次免疫, 免疫途径、剂量和程序均按鸡传染性鼻炎二价苗说明书要求进行, 对照组不进行该苗免疫(各组鸡群按常规进行ND, IBD的免疫), 然后于免疫后不同时间随机挑取不同鸡只采血, 分离血清, 用B-ELISA试剂盒、HI和SPA方法进行检测。

# 2 结果与分析

鸡只免疫后0~390d的血清阻断ELISA、HI和SPA阳性检出率结果见表1。

根据免疫后不同天数的阳性检出率结果绘制各种血清抗体的消长示意曲线如图1所示。从表1、图1中可以看出, 鸡群在A、C二价油乳剂灭活疫苗按推荐程序免疫后B-ELISA, HI和SPA抗体均能达到较高的水平(C抗体的水平相对略低), 而且都能持续至少390d以上, 充分显示出了二价苗良好的效力。在整个检测过程中, B-ELISA检测A型抗体的平均检出率达到92%, 检测C型抗体的平均检出率达到56%, HI检测A型抗体的平均检出率达到96%, 检测C型抗体的平均检出率达到72%, SPA达到80%。

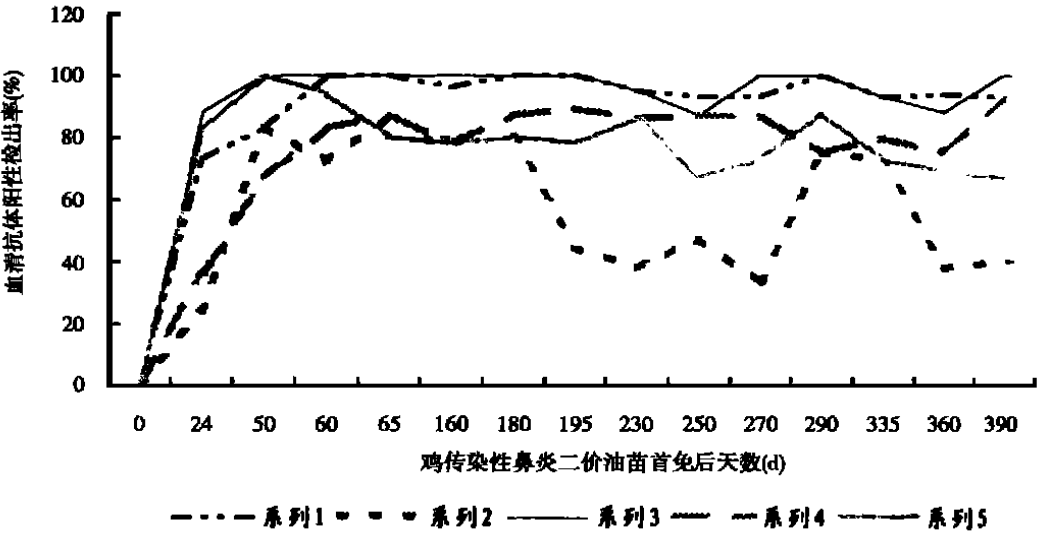
另外, A型B-ELISA抗体在首免后60d左右即可达到较高的水平, 持续390d后均保持较高水平, 下降幅度不明显。SPA抗体于50~60d达到峰值, 其后缓慢下降。C型B-ELISA抗体在首免后50~180d达到高峰后也开始下降。HI抗体一直保持较高的水平。各种抗体

的曲线除 A 型 B-ELISA 和 A 型 HI 略有近似外,其余曲线各不相同。

表 1 鸡体免疫后不同时间血清的 B-ELISA、HI 和 SPA 阳性检出率结果

鸡只首免后 日龄	免 疫 组										对照组	
	B-ELISA				HI				SPA		B-ELISA+HI+ SPA	
	A+ 检出数	A+ 检出率 (%)	C+ 检出数	C+ 检出率 (%)	A+ 检出数	A+ 检出率 (%)	C+ 检出数	C+ 检出率 (%)	+ 检出数	+ 检出率 (%)	+ 检出数	+ 检出率 (%)
0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/5	0
24 <sup>①</sup>	24/33	73	8/33	24	29/33	88	12/33	36	27/33	82	0/6	0
50	15/18	83	15/18	83	18/18	100	12/18	67	18/18	100	0/5	0
60	18/18	100	13/18	72	18/18	100	15/18	83	17/18	94	0/6	0
65	15/15	100	13/15	87	15/15	100	13/15	87	12/15	80	0/5	0
160	22/23	96	18/23	78	23/23	100	18/23	78	18/23	78	0/10	0
180	15/15	100	12/15	80	15/15	100	13/15	87	12/15	80	0/5	0
195	9/9	100	4/9	44	9/9	100	8/9	89	7/9	78	0/3	0
230	20/21	95	8/21	38	20/21	95	18/21	86	18/21	86	0/3	0
250	14/15	93	7/15	47	13/15	87	13/15	87	10/15	67	0/10	0
270	14/15	93	6/15	33	15/15	100	13/15	87	11/15	73	0/5	0
290	8/8	100	6/8	75	8/8	100	6/8	75	7/8	88	0/4	0
335	14/15	93	11/15	73	14/15	93	12/15	80	11/15	73	0/5	0
360	15/16	94	6/16	38	14/16	88	12/16	75	11/16	69	0/5	0
390	14/15	93	6/15	40	15/15	100	14/15	93	10/15	67	0/5	0
合计 <sup>②</sup>	217/236	92	133/236	56	226/236	96	169/236	72	189/236	80	0/82	0

注：①首免后 24 d 采血结果，并于采血后进行第 2 次免疫；②合计时不计入免疫后 0 d 的结果；③表中“+”指抗体检出阳性；分母所示数字为本组试验血清样品数



系列 1 表示 A 型 HI 抗体动态,系列 2 表示 C 型 B-ELISA 抗体,系列 3 表示 A 型 B-ELISA 抗体,系列 4 表示 C 型 HI 抗体,系列 5 表示 SPA 抗体

图 1 二价苗免疫后各种抗体消长曲线

### 3 讨论

本研究结果中, 二价苗免疫鸡群血清各种抗体的阳性检出率都较高, 除说明二价苗较好的免疫原性外, 也体现了 B-ELISA, HI 和 SPA 3 种诊断方法较高的敏感性。由于各种方法的特点不同, 如 ELISA 适合大量样品的检测、HI 抗体与保护力密切相关、SPA 快速简便等, 因此, 在临床应用时应根据检测时间和检测要求的不同, 灵活选用不同的诊断方法, 充分发挥各诊断方法之长。

由于本研究实验设计是采用免疫后随机挑取若干鸡只采取血清测定抗体, 而未采用定期定鸡采取血清的方法, 虽然能较客观地反映大群中不同时期的抗体水平, 但由于取样数目太小, 不能消除鸡体素质差异和其他系统误差, 因此各种抗体的消长曲线并不呈严格的一贯性升高或降低, 尤其是 C 型 B-ELISA 抗体, 其在 190~290 d 所出现的低谷和 335 d 出现小峰值极有可能是由试验误差所致。

在本研究中, 二价苗首免后 24 d 的 A 型 B-ELISA 抗体阳性检出率为 73%, SPA 抗体的检出率为 82%。而在以前报道中<sup>[6]</sup>, 用 A 抗原制作的灭活疫苗在第 4 周的 A 型 B-ELISA 抗体和 SPA 抗体的阳性检出率分别为 33%和 42%, 明显较低。这主要由于两次试验所用疫苗的差异所致。以往研究所用疫苗是为确定 A 型抗原免疫后的抗体规律而自行制作的试验用非成品苗, 本次试验应用的是临床用成品苗, 每只鸡所注射的 A 抗原量是以前报道试验的 5 倍以上, 因此激发出的抗体水平要高得多。

由于 HI 抗体与鸡体保护性抗体的水平密切相关, 因此 HI 的较高检出率证实了鸡传染性鼻炎二价油乳剂灭活疫苗良好的免疫原性。其他各种抗体曲线除 A 型 B-ELISA 与同 A 型 HI 有些许重复外多有所不同, 说明其余各种抗体虽能作为疫苗是否刺激高水平抗体产生的参考, 并不能真正反映鸡群的抵抗力。至于 A 型 B-ELISA 与 A 型 HI 的消长关系如何, 仍需对大量血清进行检测后方可判定。

### 参考文献:

- [1] Zhang P, Blackall P J, Yamaguchi T. A monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of serovar-specific antibodies to *Haemophilus paragallinarum*[J]. *Avian Diseases* 1999, 43: 75—82
- [2] 苗得园, 张培君, 龚玉梅, 等. 单抗阻断 ELISA 检测副鸡嗜血杆菌型特异性抗体的研究[J]. *中国兽医杂志*, 1999, 25(6): 8—10.
- [3] 苗得园, 张培君, 龚玉梅, 等. 鸡传染性鼻炎单抗阻断 ELISA 诊断试剂盒的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 1999, 21(6): 450—453
- [4] 张培君, 苗得园, 龚玉梅, 等. 鸡传染性鼻炎流行病学调查(I)[J]. *中国兽药杂志*, 1998, 32(4): 28—29.
- [5] 苗得园, 张培君, 龚玉梅, 等. 鸡传染性鼻炎病鸡抗体消长规律的研究[A]. *中国畜牧兽医学会禽病学分会第十次学术研讨会论文集*[C]. 北京: 中国畜牧兽医学会禽病学分会, 2000. 226—230.
- [6] 苗得园, 张培君, 龚玉梅, 等. 副鸡嗜血杆菌免疫鸡阻断 ELISA 抗体曲线的观察[J]. *中国兽医杂志*, 2000, 26(1): 18—19.

- [ 7 ] Sawata A, Kume K, Nakase Y. Hemagglutinin of haemophilus paragallinarum serotype 2 organisms; Occurrence and immunological properties of hemagglutinin[ J]. American Journal of Veterinary Research, 1982, 43: 1311—1314.
- [ 8 ] Yamamoto R, Somersett D T. Antibody response in chickens to infection with haemophilus gallinarum[ J]. Avian Diseases, 1964, 8: 441—453.
- [ 9 ] 苗得园, 陈小玲, 张培君. 鸡传染性鼻炎诊断研究进展[ J]. 中国兽医杂志, 1998, 24(11): 52—53.

## Studies on Dynamics of Antibodies to Haemophilus Paragallinarum in Sera from Chickens Vaccinated with Bivalent Inactivated Oil Adjuvant Vaccine to Infectious Coryza

MIAO De-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Pei-jun<sup>1</sup>, GONG Yu-mei<sup>1</sup>, MIAO De-rong<sup>2</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy  
of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China;

2. Luyuan Company, Shandong Lukang Pharmaceutical Group, Jining Shandong 272041, China)

**Abstract:** The antibodies in sera from chickens vaccinated with bivalent vaccine of Infectious Coryza were measured by B-ELISA, HI and SPA, and the antibody curves were also protracted. The results showed that the B-ELISA antibody to serovar A and HI antibodies remained a high level post-vaccination; the C serovar B-ELISA antibody and SPA antibodies reached their vertex at 50—180 days and 50—60 days respectively, and after that the level of the antibodies decreased slowly. All the antibodies could be detected more than 390 days post-vaccination. These results also demonstrated the good sensitivity of the B-ELISA and SPA, and gave a reference for the further application of the bivalent vaccine, all the diagnostic methods and correlative products.

**Key words:** Blocking ELISA; HI; SPA; Bivalent Inactivated Oil Adjuvant Vaccine to Infectious Coryza; Antibody curve