

# 禽用疫苗病毒浓缩技术的研究

姜北宇<sup>1</sup>, 刘月焕<sup>1</sup>, 景小冬<sup>1</sup>, 黄凤军<sup>1</sup>, 校海霞<sup>2</sup>, 章振华<sup>1</sup>

(1. 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100097; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要:** 采用 FILTRON 中型盒式超滤系统, 分别选用截留分子量为 30, 50, 100 及 300 K 4 种不同孔径的超滤膜, 对 NDV, AIV, EDS<sub>76</sub>V, IBV 及 IBDV 共 5 种病毒抗原液进行了浓缩试验研究。结果显示, 这 4 种孔径的超滤膜均可用于上述 5 种病毒液的浓缩, 其病毒的截留率可达 99.9% ~ 100%; 采用各种病毒浓缩液、未浓缩病毒液及超滤液制成各种相应浓缩苗、未浓缩苗及超滤液乳剂免疫试验鸡。试验证明, 浓缩苗明显优于未浓缩苗, 在病毒浓缩过程中均未出现有效抗原成分的丢失, 其抗原性也未发生变化。

**关键词:** 病毒浓缩; 疫苗; 免疫; 鸡

中图分类号: S851.2 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2007) 05- 0165- 07

## Studies on Concentration of Avian Viruses Used in Poultry Vaccines

JIANG Bei-yu<sup>1</sup>, LIU Yue-huan<sup>1</sup>, JING Xiao-dong<sup>1</sup>, HUANG Feng-jun<sup>1</sup>,  
XIAO Hai-xia<sup>2</sup>, ZHANG Zhen-hua<sup>1</sup>

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** By using the FILTRON medium-cassette ultra-filtration system, the viral antigens of newcastle disease virus (NDV), avian influenza virus (AIV), infectious bronchitis virus (IBV), infectious bursal disease virus (IBDV) and egg drop syndrome virus (EDS<sub>76</sub>V) were concentrated with different pore size ultra-filtration membranes of 30, 50, 100 and 300 K respectively. The results showed that the above five viruses could be concentrated by 30, 50, 100 and 300 K molecular weight of ultra-filtration membranes, the virus recovery rate reached 99.90% - 100%. The oil emulsion vaccines were made with concentrated virus fluid, virus fluid and ultra-filtrated fluid, and then were tested in chickens. The vaccination results revealed that concentrated virus vaccines were better than original virus vaccines. The effectiveness of virus fluid were not lost in the course of viral concentration and the virus antigenicity were not altered either.

**Key words:** Virus concentration; Vaccines; Vaccination; Chicken

家禽传染病一直严重困扰着我国养禽业的健康发展, 造成了极其巨大的经济损失。控制家禽传染病的最有效手段是进行疫苗的免疫接种。由于传染病的种类繁多, 并且新的传染病及变异株不断出现, 使得疫病的防治更加困难。鸡只不得不多次接种疫苗, 不仅耗费了大量的人力、物力, 而且多次免疫会导致鸡只严重应激反应的发生。解决上述问题的最好办法是使用多联多价疫苗<sup>[1]</sup>。但如果按传统单苗的生产工艺进行联苗的生产, 由于在常规的免疫剂量内不能容纳足量的多种抗原, 而无法保证其免疫

效力, 如果要使家禽获得足够的抗原, 就必须加大接种剂量, 使得注射部位出现过度的炎性反应, 不适合在实际生产中应用。因此, 提高单位体积的抗原含量是联苗生产的技术关键, 而抗原浓缩是达到此目的的理想办法<sup>[2-4]</sup>。

本项目研究拟采用日本富士滤器公司生产的国际先进的 FILTRON 中型盒式超滤系统, 对主要禽用疫苗抗原进行系统的浓缩试验研究。旨在建立一套完整的适用于工厂化大批量禽用疫苗生产的浓缩工艺流程, 为研制生产新一代系列化禽用浓缩疫苗奠

定基础, 解决目前我国禽用多联多价疫苗生产中的一项目关键技术难题, 促进我国兽用生物制品的研制与开发。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒株

1.1.1 鸡新城疫病毒(NDV) La Sota 株, F<sub>48</sub>E<sub>8</sub> 株均由中国兽药监察所引入, 本研究室用 SPF 鸡胚扩繁; La Sota 株毒种的 HA 价为 1: 1 280, 毒价为 10<sup>9.0</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 mL, 用于制备 ND 抗原病毒液; F<sub>48</sub>E<sub>8</sub> 株毒种的毒价为 10<sup>8.7</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 mL, 用于疫苗效力检验攻毒。

1.1.2 禽流感病毒(AIV) WD 株 由本研究室自河北省某肉种鸡场分离, 经中国预防医学科学院国家禽流感中心鉴定为 H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 亚型, HA 为 1: 640, 毒价为 10<sup>8.5</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 mL, 用于制备 AI 抗原病毒液。

1.1.3 鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV) BJQ<sub>902</sub> 株 本研究室分离鉴定并培育出的细胞适应毒株, 毒价 ≥ 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1 mL, 用于制备 IBD 抗原病毒液。

1.1.4 鸡传染性支气管炎病毒(IBV) M<sub>41</sub> 株 由中国兽药监察所引入, 经过 SPF 鸡胚增殖 2 代为种毒, 毒价为 10<sup>7.5</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 mL, 用于制备 IB 抗原病毒液。

1.1.5 减蛋综合征病毒(EDS<sub>76</sub>V) HSH<sub>23</sub> 株 本研究室 1991 年于河北某 EDS<sub>76</sub> 流行地区的鸡场分离, 经过系统鉴定, 证明为纯净的 EDS<sub>76</sub> 病毒株, 其毒价为 10<sup>6.0</sup> EID<sub>50</sub>/0.1 mL, HA 价 ≥ 1: 10 240。

### 1.2 鸡胚及鸭胚

由北京实验动物中心购入 SPF 鸡种蛋, 由北京某鸡场购入非免疫鸡种蛋, 北京某种鸡场购入普通健康鸡种蛋, 北京某鸭场购入健康鸭种蛋, 本研究室自行孵化。SPF 鸡种蛋用于毒种繁殖、毒价测定、灭活检验及鸡胚成纤维细胞制备; IBDV 毒种的繁殖、抗原的生产、毒价测定及灭活检验均使用 SPF 鸡胚成纤维细胞; 非免疫鸡种蛋用于 AIV, IBV 抗原液的生产, 普通鸡种蛋用于 NDV 抗原生产, 健康鸭种蛋用于 EDS<sub>76</sub> 抗原液的生产及检验。

### 1.3 试验鸡

SPF 鸡由北京实验动物中心购入。

### 1.4 超滤浓缩设备及超滤膜

FILTRON 中型盒式超滤系统及不同孔径的超滤膜(其截留分子量分别为 30, 50, 100, 300 K), 均由武汉日本富士滤器公司购入。

### 1.5 病毒抗原液的生产

分别用 NDV, AIV 及 IBV 毒种接种鸡胚; 用 IBDV 毒种接种鸡胚成纤维细胞, 用 EDS<sub>76</sub>V 毒种接种鸭胚,

分别收获病毒液, 放在 -20℃ 冰箱内保存备用。

### 1.6 病毒浓缩

将病毒液从 -20℃ 冰箱取出, 融化后用过滤或离心的方法对病毒液进行浓缩前的澄清处理, 使其成透明或半透明溶液, 将澄清处理后病毒液倒入浓缩瓶中, 开启浓缩设备, 对病毒液进行浓缩。分别选用不同孔径的超滤膜(截留分子量分别为 30, 50, 100 及 300 K), 对不同病毒液(NDV, IBDV, IBV, AIV 及 EDS<sub>76</sub>V)进行浓缩, 在浓缩试验中, 分别取病毒原液、浓缩液及超滤液, 测定其毒价(HA, EID<sub>50</sub>或 TCID<sub>50</sub>)以及蛋白含量, 观察病毒液的浓缩效果。

### 1.7 疫苗的制备

分别采用不同的病毒原液、浓缩病毒液及超滤液, 用甲醛溶液灭活后按一定配比混合与油佐剂乳化制成各种不同的灭活疫苗单苗、二联苗、三联苗、四联苗及相应超滤液乳剂。

### 1.8 浓缩苗实验室试验

1.8.1 浓缩与未浓缩 ND 油苗的比较试验 将灭活的浓缩 2 倍的 NDV 毒液, 灭活的 NDV 原液及超滤液分别与油佐剂一起制成 ND 浓缩苗、ND 未浓缩苗及 ND 超滤液乳剂, 免疫 3 周龄 SPF 鸡, 0.5 mL/只。免疫后 3 周用 ND 强毒 F<sub>48</sub>E<sub>8</sub> 攻击, 攻毒后观察 2 周。另外, 按常规方法进行 NDV 浓缩苗与未浓缩苗的 ND PD<sub>50</sub> 试验<sup>[5,6]</sup>。

1.8.2 浓缩与未浓缩的 IB 油苗及 IBDV 油苗的比较试验 分别将浓缩 2 倍的 IB 毒液、未浓缩的 IB 毒液、浓缩 2 倍的 IBDV 毒液、未浓缩的 IBDV 毒液、IB 超滤液及 IBDV 超滤液用甲醛溶液灭活后, 与油佐剂乳化制成相应灭活苗及超滤液乳剂, 免疫 33 日龄 SPF 鸡, 免疫后 3 周, 采血分别测定 IBV HI 抗体和 IBDV 中和抗体滴度。

1.8.3 浓缩与未浓缩的 ND+AI+EDS<sub>76</sub> 三联苗的比较试验 分别将 ND, AI, EDS<sub>76</sub> 浓缩液, ND, AI, EDS<sub>76</sub> 未浓缩的病毒液用甲醛灭活后, 与油佐剂一起制成浓缩的 ND+AI+EDS<sub>76</sub> 三联苗及未浓缩的 ND+AI+EDS<sub>76</sub> 三联苗, 分别免疫 34 日龄的 SPF 鸡, 每只 0.5 mL。免疫前及免疫后 3~4 周分别采血测 ND, AI, EDS<sub>76</sub> HI 抗体。

### 1.9 各种浓缩苗的野外田间试验

将制备的各种浓缩疫苗应用于我国一些省市的鸡场, 观察其临床使用效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 NDV La Sota 株病毒的浓缩效果

由表 1 可见, 浓缩病毒液的 HA 价与未浓缩病毒

液相比均按浓缩的比例相应上升, 而超滤液的 HA 价均为零。浓缩液的 EID<sub>50</sub>效价大多数情况下比未浓缩的病毒液要高, 但并不一定与浓缩比例完全吻合, 有时两者相同。用 30 及 50 K 分子量的超滤膜浓缩, 其超滤液中未检测出病毒, 而用 100 及 300 K 分子量的

超滤膜浓缩, 其超滤液中有病毒存在, 但含量很低, 用 HA 试验检测不到, 用鸡胚接种才能检测到。病毒丢失在百万分之一以下; 对病毒液的蛋白含量检测结果显示, 超滤液中可去除一部分杂蛋白。

表 1 NDV La Sota 株病毒的浓缩效果

Tab. 1 Concentration effect of NDV La Sota virus fluid

检测项目 Items of detection	用不同孔径超滤膜浓缩的检测结果 Detection results of virus concentration with different pore size ultra-filtration membranes						
	30 K ①	30 K ①	50 K ①	100 K ①	300 K ①	300 K ①	300 K ①
病毒原液容量/L Virus fluid volume	6. 0	5. 4	10	5. 3	5. 6	7. 5	10. 45
浓缩液容量/L Concentrated virus fluid volume	2. 0	2. 7	3. 3	2. 1	2. 4	3. 75	2. 5
浓缩倍数 Times of concentration	3. 0	2	3	2. 5	2. 5	2	4
病毒原液 HA 价 Virus fluid HA titer	640	2048	1024	1024	512	1024	512
浓缩液 HA 价 Concentrated virus fluid HA titer	1920	4096	4096	4096	2048	2048	2048
超滤液 HA 价 Ultra-filtrated fluid HA titer	0	0	0	0	0	0	0
病毒原液 EID <sub>50</sub> (0. 1 mL) (0. 1 mL) 50% Embryo Infective Dose of virus fluid	/	10 <sup>8. 9</sup>	10 <sup>8. 7</sup>	10 <sup>9. 3</sup>	10 <sup>8. 7</sup>	10 <sup>8. 1</sup>	10 <sup>8. 1</sup>
浓缩液 EID <sub>50</sub> (0. 1 mL) 50% Embryo Infective Dose of concentrated virus fluid	/	10 <sup>9. 3</sup>	10 <sup>9. 1</sup>	10 <sup>9. 5</sup>	10 <sup>8. 7</sup>	10 <sup>8. 1</sup>	10 <sup>8. 9</sup>
超滤液 EID <sub>50</sub> (0. 1mL) 50% Embryo Infective Dose of ultra-filtrated fluid	/	—	—	10 <sup>2. 88</sup>	10 <sup>1. 5</sup>	+	+
病毒原液蛋白含量/(mg/ L) Virus fluid protein content	/	253	350	155	430	630	350
浓缩液蛋白含量/(mg/ L) Concentrated virus fluid protein content	/	641	750	438	438	881	1277
超滤液蛋白含量/(mg/ L) Ultra-filtrated fluid protein content	/	52	35	83	13	72	46

注: ①代表浓缩试验时所用超滤膜的孔径,K 为 1 000 道尔顿  
Note: ①indicated concentration test with different pore size ultra-filtration membranes, K is 1 000 Da, the same as Tab 2,3, 4, 5

2.2 AIV WD 株病毒浓缩效果

由表 2 可见, 浓缩病毒液的 HA 价与未浓缩病毒液相比均按浓缩比率相应上升, 而超滤液 HA 均为零。浓缩液的 EID<sub>50</sub>效价均高于未浓缩的病毒液, 但与浓缩比率不完全相吻合, 两者之间存在一定差异; 用 30 及 50 K 分子量的超滤膜浓缩可完全截留 AIV, 但用 100 及 300 K 的超滤膜浓缩有少量 AIV 丢失, 其比率在百万分之一以下。对病毒液的蛋白含量检测结果显示, 浓缩过程中可去除一部分杂蛋白, 较大分子量超滤膜( 100 及 300 K) 去除杂蛋白比率要比小分子量超滤膜( 30 及 50 K) 高。

2.3 IBV M<sub>41</sub>株病毒的浓缩效果

从表 3 可见, 采用不同孔径的超滤膜浓缩 IBV, 其浓缩的 EID<sub>50</sub>效价大多比未浓缩病毒液要高, 但有的浓缩液与未浓缩液的 EID<sub>50</sub>效价相同, 用 30 及 50 K 分子量超滤膜浓缩病毒, 其超滤液中无病毒存在, 而使用 100 及 300 K 孔径超滤膜, 其超滤液中含有

微量病毒。对各种样品的蛋白含量测定结果显示, 浓缩过程中可通过超滤膜去除一定量的杂蛋白。

2.4 IBDV 的浓缩效果

从表 4 可见, 将 IBDV 浓缩 2 倍, 其病毒效价大多相应升高, 但有的浓缩前后病毒液的毒价相同。用孔径为 30, 50 及 100 K 的超滤膜浓缩, 其超滤液中未检测出病毒, 而用 300 K 分子量的超滤膜浓缩, 其超滤液中有少量病毒。蛋白含量测定结果显示, 超滤液中也含有一定量的杂蛋白。

2.5 EDS<sub>76</sub>V 浓缩效果

从表 5 可见, 用三种不同孔径的超滤膜进行浓缩, 浓缩病毒液的 HA 价均比未浓缩病毒液相应增高。用 30 K 分子量的超滤膜浓缩, 其超滤液中未检测到病毒, 而用 100 及 300 K 分子量的超滤膜浓缩, 其超滤液中可检测到病毒, 但毒价较低, 病毒丢失比率在千分之一以下。

表 2 AIV WD 株病毒的浓缩效果

Tab. 2 Concentration effect of AIV WD virus fluid

检测项目 Items of detection	用不同孔径超滤膜浓缩的检测结果 Detection results of virus concentration with different pore size ultra-filtration membranes				
	30 K①	30 K①	50 K①	100 K①	300 K①
病毒原液容量/L Virus fluid volume	6	5.0	6.4	10.0	6.6
浓缩液容量/L Concentrated virus fluid volume	2.4	2.5	3.2	5.0	2.7
浓缩倍数 Times of concentration	2.5	2	2	2	2.4
病毒原液 HA 价 Virus fluid HA titer	240	256	256	256	256
浓缩液 HA 价 Concentrated virus fluid HA titer	640	512	512	512	512
超滤液 HA 价 Ultra-filtrated fluid HA titer	0	0	0	0	0
病毒原液 EID <sub>50</sub> (0.1 mL) 50% Embryo Infective Dose of virus fluid	/	10 <sup>6.7</sup>	10 <sup>7.3</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>6.1</sup>
浓缩液 EID <sub>50</sub> (0.1 mL) 50% Embryo Infective Dose of concentrated virus fluid	/	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>7.5</sup>	10 <sup>7.5</sup>	10 <sup>7.1</sup>
超滤液 EID <sub>50</sub> (0.1mL) 50% Embryo Infective Dose of ultra-filtrate	/	—	—	10 <sup>1.5</sup>	+
病毒原液蛋白含量/(mg/L) Virus fluid protein content	/	865	752	489	481
浓缩液蛋白含量/(mg/L) Concentrated virus fluid protein content	/	1 238	1 350	1 230	1 252
超滤液蛋白含量/(mg/L) Ultra-filtrated fluid protein content	/	39	89	177	152

表 3 IBV 毒液的浓缩效果

Tab. 3 Concentration effect of IBV virus fluid

检测项目 Items of detection	用不同孔径超滤膜浓缩的检测结果 Detection results of virus concentration with different pore size ultra-filtration membranes				
	30 K①	30 K①	50 K①	100 K①	300 K①
病毒原液容量/L Virus fluid volume	6.4	5.0	7.0	9.6	6.4
浓缩液容量/L Concentrated virus fluid volume	3.2	2.5	3.5	4.8	3.2
浓缩倍数 Times of concentration	2	2	2	2	2
病毒原液 EID <sub>50</sub> (0.1 mL) 50% Embryo Infective Dose of virus fluid	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>6.7</sup>	10 <sup>7.1</sup>	10 <sup>7.1</sup>
浓缩液 EID <sub>50</sub> (0.1 mL) 50% Embryo Infective Dose of concentrated virus fluid	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>7.5</sup>	10 <sup>7.0</sup>	10 <sup>7.5</sup>	10 <sup>7.5</sup>
超滤液 EID <sub>50</sub> (0.1 mL) 50% Embryo Infective Dose of ultra-filtrated fluid	0	0	0	+	10 <sup>1.83</sup>
病毒原液蛋白含量/(mg/L) Virus fluid protein content	—	341	453	293	685
浓缩液蛋白含量/(mg/L) Concentrated virus fluid protein content	—	899	752	653	1 095
超滤液蛋白含量/(mg/L) Ultra-filtrated fluid protein content	—	57	64	42	161

2.6 浓缩苗的实验室试验结果

2.6.1 浓缩与未浓缩 ND 油苗的比较试验 结果见表 6。试验结果显示,浓缩苗所诱导的抗体水平明显高于相应未浓缩苗,浓缩苗的 PD<sub>50</sub>效价与未浓缩苗相比,也按比例相应升高,而超滤液乳剂未能诱

导机体产生任何免疫反应。

2.6.2 IB 及 IBD 浓缩苗与未浓缩苗的比较试验 结果见表 7。试验结果显示,IB 及 IBD 浓缩苗所诱导的抗体水平明显高于相应未浓缩苗,IB 及 IBD 病毒液的超滤液乳剂未能诱导机体产生任何免疫反应。

表 4 IBDV 病毒的浓缩效果

Tab. 4 Concentration effect of IBDV virus fluid

检测项目 Items of detection	用不同孔径超滤膜浓缩的检测结果 Detection results of virus concentration with different pore size ultra-filtration membranes			
	30 K①	50 K①	100 K①	300 K①
病毒原液容量/L Virus fluid volume	5. 0	6. 2	9. 4	5. 8
浓缩液容量/L Concentrated virus fluid volume	2. 5	3. 1	5. 2	2. 0
浓缩倍数 Times of concentration	2. 0	2. 0	1. 8	2. 9
病毒原液 TCID <sub>50</sub> (0. 1 mL) 50% Tissue Culture Infective Dose of virus fluid	10 <sup>6. 5</sup>	10 <sup>6. 5</sup>	10 <sup>6. 0</sup>	10 <sup>6. 5</sup>
浓缩液 TCID <sub>50</sub> (0. 1 mL) 50% Tissue Culture Infective Dose of concentrated virus fluid	10 <sup>7. 0</sup>	10 <sup>6. 75</sup>	10 <sup>6. 0</sup>	10 <sup>6. 75</sup>
超滤液 TCID <sub>50</sub> (0. 1 mL) 50% Tissue Culture Infective Dose of ultra-filtrated fluid	0	0	0	10 <sup>1. 5</sup>
病毒原液蛋白含量/ (mg/L) Virus fluid protein content	—	865	956	1 002
浓缩液蛋白含量/ (mg/L) Concentrated virus fluid protein content	—	1 250	1 156	1 141
超滤液蛋白含量/ (mg/L) Ultra-filtrated fluid protein content	—	42	35	182

表 5 EDS<sub>76</sub>V 浓缩效果

Tab. 5 Concentration effect of EDS<sub>76</sub>V virus fluid

检测项目 Items of detection	用不同孔径超滤膜浓缩的检测结果 Detection results of virus concentration with different pore size ultra-filtration membranes		
	30 K①	100 K①	300 K①
病毒原液容量/L Virus fluid volume	6. 0	6. 4	6. 0
浓缩液容量/L Concentrated virus fluid volume	3. 0	3. 2	2. 7
浓缩倍数 Times of concentration	2. 0	2. 0	2. 2
病毒原液 HA 价 Virus fluid HA titer	20 480	16 384	16 384
浓缩液 HA 价 Concentrated virus fluid HA titer	40 960	32 768	32 768
超滤液 HA 价 Ultra-filtrated fluid HA titer	0	2	8
病毒丢失比率/ % Percentage of virus lost	0	0. 012	0. 049

表 6 ND 疫苗比较试验

Tab. 6 Comparative tests of inactivated ND vaccine

分组 Group	疫苗种类 Type of vaccine	免疫剂 量/ mL Injection dose	病毒含量 ( EID <sub>50</sub> ) Content of the virus ( EID <sub>50</sub> )	ND HI 价( GMT) ND HI titer( GMT)		保护数/ 攻毒数 Number of protection / Number of challenge	PD <sub>50</sub>
				免前 Before vaccination	免后 3 周 Three weeks after vaccination		
1	浓缩苗 Concentrated vaccine	0. 5	10 <sup>9. 3</sup>	0	446	5/ 5	174
2	未浓缩苗 Original vaccine	0. 5	10 <sup>8. 9</sup>	0	194	5/ 5	87
3	超滤液乳剂 Oil emulsion with ultra-filtrated fluid	0. 5	—	0	0	0/ 5	0
4	生理盐水乳剂 Oil emulsion with saline	0. 5	—	0	0	0/ 5	0

表 7 浓缩与未浓缩 IB, IBD 油苗的比较试验结果

Tab. 7 Comparative tests of IB, IBD inactivated vaccine with concentrated virus fluid and original virus fluid					
分组 Groups	疫苗种类 Type of vaccine	免疫剂量/ mL Injection dose	病毒含量 (EID <sub>50</sub> ) Content of virus ( EID <sub>50</sub> )	抗体效价( GMT) Titer of antibody	
				免前 Before vaccination	免后 3 周 Three weeks after vaccination
1	IB 浓缩苗 IB vaccine with concentrated virus fluid	0. 5	10 <sup>7. 4</sup>	0	294( IB HI) ①
2	IB 未浓缩苗 IB vaccine with original virus fluid	0. 5	10 <sup>7. 1</sup>	0	84( IB HI) ①
3	IB 超滤液 IB oil emulsion with ultra-filtrated fluid	0. 5	—	0	0( IB HI) ①
4	IBD 浓缩苗 IB vaccine with concentrated virus fluid	0. 5	10 <sup>6. 4</sup>	0	1866( VN) ②
5	IBD 未浓缩苗 IBD vaccine with original virus fluid	0. 5	10 <sup>6. 1</sup>	0	356( VN) ②
6	IBD 超滤液 IBD oil emulsion with ultra-filtrated fluid	0. 5	—	0	< 8( VN) ②
7	对照组 Control	0. 5	—	0	< 8( VN) ②

注: ①HI 表示血凝抑制抗体滴度; ②VN 表示病毒中和抗体滴度  
Note: HI indicated hemagglutination inhibition titers; ② VN indicated virus neutralization antibodies titers

2. 6. 3 浓缩与未浓缩的 ND, AI+EDS<sub>76</sub> 三联苗的比较 诱导的 ND, AI 及 EDS<sub>76</sub> HI 抗体水平明显高于相应试验 结果见表 8。试验结果显示, 浓缩三联苗所 未浓缩三联苗。

表 8 浓缩与未浓缩 ND, AI, EDS<sub>76</sub> 三联苗的比较试验

Tab. 8 Comparative tests of ND, AI and EDS <sub>76</sub> triple inactivated vaccine with concentrated virus fluids and original virus fluids											
分组 Group	疫苗种类及剂量 Type and injection dose of vaccines	病毒含量 Dosage of virus	免疫鸡数 Number of chickens	不同时间(周) 抗体检测结果( GMT) Results of detection for HI titers at different time(week)							
				ND			AI			EDS <sub>76</sub>	
				0	3	4	0	3	4	0	4
1	浓缩三联(0. 5 mL) Triple inactivated vaccine with concentrated virus fluid	ND 10 <sup>8. 5</sup> AI 10 <sup>7. 0</sup> EDS: 1000	6	0	315	512	0	119	294	0	223 588
2	未浓缩三联(0. 5 mL) Triple inactivated vaccine with or- iginal virus fluid	ND 10 <sup>8. 1</sup> AI 10 <sup>6. 6</sup> EDS: 300	6	0	158	315	0	37	91	0	56 256
3	对照组 Control	—	6	0	0	0	0	0	0	0	0

2. 7 浓缩苗的野外田间试验

将 NDV, IBV, EDS<sub>76</sub>V, AIV, IBDV 共 5 种病毒液用盒式超滤系统浓缩后, 按一定的比例及组合混合, 与油佐剂一起乳化制成各种不同的二联、三联及四联疫苗, 应用于北京、河北、山东、广西等省市鸡场, 免疫各日龄、各品种的鸡 1 000 万羽以上, 免疫后, 鸡只无不良反应, 免疫效果良好。

3 结论与讨论

采用 FILTRON 中型盒式超滤系统, 分别选用截留分子量为 30, 50, 100 及 300 K 4 种不同孔径的超滤膜, 对 NDV, AIV(H<sub>9</sub>), EDS<sub>76</sub>V, IBV, IBDV 共 5 种病毒抗原液进行了浓缩试验研究。结果, 用孔径为 30 及 50 K 的超滤膜浓缩上述 5 种病毒液, 其超滤液中均未检测出任何病毒存在, 病毒的截留率达 100%; 而用孔径为 100 及 300 K 分子量的超滤膜浓缩, 其超滤液中可检测到病毒存在, 但其含量微乎其微, 病

毒的截留率也可达 99. 9% 以上。浓缩的 NDV, AIV 及 EDS<sub>76</sub>V 病毒液的 HA 价与相应未浓缩液的 HA 价相比, 均按浓缩比例相应上升; 而尽管其 EID<sub>50</sub> 效价大多按浓缩的比率相应上升, 但 EID<sub>50</sub> 效价不能与浓缩比率完全吻合, 有时会出现浓缩液与未浓缩液 EID<sub>50</sub> 相同的情况; 同样, 浓缩的 IBV 及 IBDV 的 EID<sub>50</sub> 或 TCID<sub>50</sub> 效价也不能完全与浓缩的比率完全吻合。分析原因, 可能是由于滴定误差或其他原因所造成的。试验结果表明, 截留分子量为 30, 50, 100 及 300 K 的超滤膜均可用于上述 5 种病毒液的浓缩, 而选用 100 及 300 K 分子量的超滤膜, 由于其浓缩速度要高于 30 及 50 K 分子量的超滤膜, 更适合工厂化大批量疫苗生产。

各种病毒浓缩液、病毒原液及超滤液的蛋白含量测定结果表明, 在浓缩过程中可去除一部分杂蛋白, 用分子量较大的超滤膜浓缩后杂蛋白的去除比率比低分子量的超滤膜的去除比率高, 但差异不显

著。

用各种病毒浓缩液、未浓缩病毒液及超滤液制成各种浓缩苗、未浓缩苗及超滤液乳剂, 免疫动物。结果表明, 超滤液乳剂未能诱导机体产生任何免疫反应, 浓缩苗所诱导的抗体水平明显高于相应未浓缩苗, 浓缩苗的 PD<sub>50</sub>效价与未浓缩苗相比, 也按比例相应升高, 因此, 证明在病毒浓缩过程中均未出现有效抗原成分的丢失, 其抗原性也未发生变化。

用各种浓缩病毒液制备出了各种组合的二联苗、三联苗及四联苗, 对制备的各种疫苗进行了物理性状、安全、效力等检验, 均符合要求。将上述疫苗在生产中应用, 免疫各种鸡, 共 1 000 万羽以上, 免疫后, 鸡只无不良反应, 鸡群正常发育, 产蛋达高水平, 有效控制了疫病的流行。

通过系统的病毒浓缩技术研究, 建立起了一整套禽用疫苗多种病毒抗原液的浓缩工艺流程, 为我国兽用生物制品生产提供了一套关键的实用新技

术, 将极大地推动我国兽用生物制品的研制与开发, 促进我国畜牧业的健康可持续发展。

参考文献:

[1] 姜北宇, 刘月焕, 郑世兰, 等. 鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合症、传染性脑脊髓炎四联油佐剂灭活疫苗的研究[J]. 华北农学报, 2003, 18(3): 106–113.

[2] 高以恒, 叶凌碧. 膜分离技术基础[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 254–259.

[3] 郑世兰, 姜北宇, 刘福致, 等. 用平板式超滤机浓缩鸡新城疫及法氏囊病毒试验效果观察[J]. 华北农学报, 1999, 14(2): 139–144.

[4] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 149–153.

[5] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品质量标准(2001)[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001: 314–315.

[6] (美) B. W. 卡尔尼克. 禽病学[M]. 第 10 版. 高福, 苏敬良译. 北京: 北京农业大学出版社, 1999: 691–713.