

# 用平板式超滤机浓缩鸡新城疫病毒 及法氏囊病毒试验效果观察

郑世兰 姜北宇 刘福致 张淑平 景小冬 李 林 姚 颖

(北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089)

**摘 要** 采用 UF-1 型工业平板式超滤机对鸡新城疫病毒(NDV)及法氏囊病毒(IBDV)进行了初步的浓缩试验。该设备浓缩工艺简单、效率高,浓缩液 HA 效价与未浓缩液比较按浓缩比率相应上升。用浓缩液与未浓缩液制成灭活疫苗免疫鸡,均可获得 100% 抵抗 ND 及 IBD 的保护力,以浓缩苗免疫的 ND HI 抗体及 IBD 中和抗体滴度明显高于未浓缩苗。试验表明,浓缩苗安全有效,并优于未浓缩苗。

**关键词** 鸡新城疫病毒 法氏囊病毒 浓缩 灭活疫苗

自 70 年代以来,随着各种畜禽油乳剂灭活疫苗的研制成功,并在世界各国广泛应用,对控制畜禽疫病的流行起了极其重要的作用<sup>[1,2]</sup>。从 80 年代初各国开始研制各种多联多价灭活疫苗,如 ND-IBD 二联苗、ND-IB-IBD 三联苗、ND-IB-EDS<sub>76</sub>-IBD 四联苗等<sup>[3,4]</sup>,用联苗免疫一次即可达到防治二种或多种传染病的目的,从而可节省大量劳力,简化免疫程序。然而,如果简单按单苗的生产工艺进行联苗的生产,要保证联苗中的抗原含量,疫苗的注射剂量必然会增大,不适合在实际中应用。因此,提高单位体积内病毒抗原的含量(滴度)是联苗生产的技术关键。国外生产联苗多采用超滤设备浓缩病毒液,使每羽份 0.5 mL 联苗中含有足够的抗原量,而我国兽医界尚未采用该项技术。为解决生产联苗这一关键技术难题,我们在进行二联苗研制过程中,用 UF-1 型工业平板型超滤机对 ND 病毒液及 IBD 病毒液进行了浓缩试验,并将浓缩抗原制成疫苗免疫鸡只,以证实其浓缩效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒浓缩

1.1.1 病毒株 ①鸡新城疫病毒(NDV)Lasota 株。种毒由中监所提供,本组用无 ND 抗体的 10 日龄鸡胚接种生产 NDV 毒液,毒液批号 920330,HA 1:1280, EID<sub>50</sub>= $10^{-8.75}$ /0.1 mL,浓缩前用 100 目铜纱网过滤去掉杂质,然后加入福尔马林,使毒液内福尔马林的最终浓度为 0.1%。在 37℃ 条件下灭活 16 h 后,保存在 4~8℃ 冰箱内备用。②鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)BJQ902 株,该毒株为适应于鸡胚成纤维细胞的“超强”细胞毒,由本课题组从病鸡法氏囊分离,经鸡胚传代后又在鸡胚成纤维细胞上传育。培育成适应鸡胚成纤维细胞上生长的

BJQ902 株,毒液批号 92320,毒价为  $10^7$ TCID<sub>50</sub>/mL,浓缩前用 100 目铜纱网过滤,然后加入福尔马林,使毒液内福尔马林最终浓度为 0.12%,在 37℃条件下灭活 16 h 后,放入 4~8℃冰箱内备用。

1.1.2 病毒浓缩设备及浓缩工艺流程 设备:UF-1 型工业平板式超滤机,国营兰天机械厂制造(中国人民解放军第五七二二工厂,中国甘肃省天水市)。

超滤膜:在病毒浓缩过程中选择孔径合适的超滤膜是至关重要的,如果超滤膜孔径太小浓缩速度很慢,而孔径太大有可能造成病毒有效成份过多丢失。理想的浓缩过程应是在短时间内完成病毒浓缩,并使病毒的有效成份尽可能少地丢失,即病毒有效成份接近于 100% 的回收。超滤膜与支撑板(导流板)相互叠加构成模组件,每块板的两侧面装有两张膜。共装 10 块导流板,20 张膜,膜的有效过滤面积为 2 m<sup>2</sup>,膜的品种及孔径见表 1。

表 1 膜的种类及孔径			表 2 疫苗种类及含毒液种类	
膜的种类	装填张数	膜的孔径 (截留分子量)	疫苗种类	所含毒液种类
醋酸纤维素膜	10	45000(道尔顿)	1 ND 未浓缩苗	未浓缩的 ND 毒液
醋酸纤维素膜	4	50000(道尔顿)	2 ND 浓缩苗	浓缩 ND 毒液
聚丙烯晴	4	60000(道尔顿)	3 ND 超滤液乳剂	ND 超滤液(透过液)
聚矾酰胺	2	60000(道尔顿)	4 ND-IBD 二联未浓缩苗	未浓缩 ND、IBD 混合毒液
总 计	20		5 ND-IBD 二联浓缩苗	浓缩 ND、IBD 混合毒液
			6 ND-IBD 超滤液乳剂	ND、IBD 混合超滤液(透过液)
			7 生理盐水乳剂	生理盐水

工作原理:本平板式超滤机是借助于机泵造成压力差作为驱动力,使病毒液沿着膜面而快速流动,病毒液中的水分子等小分子物质透过膜片经导流板析出,连续排出病毒液中的水份(超滤液)。而病毒颗粒等大分子量物质则在流动中被截留,从而完成病毒浓缩的过程。

超滤机的消毒处理:用 20% 金星消毒液浸泡机器 30 min,然后用生理盐水冲洗机器 3 次,将机内残留液冲洗干净。

浓缩操作:将欲浓缩的病毒液倒入圆形贮筒;接通电源;先开分流阀,后开控制阀,并缓慢地同时调节上述两阀使进口端表压不超过 0.3 MPa(以 0.2~0.3 MPa 为宜),出口端表压不超过 0.3 MPa(以 0.1~0.25 MPa 为宜)。病毒液在机泵驱动下连续循环,水份在机泵的压力下不断析出,完成病毒浓缩过程。我们进行了两批浓缩,第一批浓缩 NDV 毒液 8.1 L,第二批浓缩 NDV 及 IBDV 混合毒液共 36 L,浓缩前后分别取样进行 HA 试验。

1.2 灭能苗的制备及免疫试验

1.2.1 灭能苗制备 将浓缩毒液、超滤液以及未浓缩液作为制苗用毒液,按本组双相油乳剂灭能苗配方及工艺流程制备不同种类双相油乳剂灭能苗(见表 2)。

1.2.2 试验鸡 由北京种禽公司引入,为巴布考克公雏,隔离饲养,免疫时鸡只为 39 日龄,随机采集鸡群血样,检测鸡只血清中 ND HI 抗体 GMT 为 3.03,IBD 中和抗体为 5.28。

1.2.3 免疫试验设计 试验 1:ND 毒液的浓缩效果观察。试验分成 4 组,第 1 组每只鸡注射 ND 未浓缩苗 0.5 mL,第 2 组每只鸡注射 ND 浓缩苗 0.5 mL,第 3 组每只鸡注射 1.0 mL 超滤液乳剂,第 4 组为对照组注射 0.5 mL 生理盐水乳剂,前三组每组 10 只鸡,第 4 组对照组为 5 只鸡。注射部位为颈背侧皮下,免疫后 20 d 采血测 NDHI 抗体,并用 ND 强毒攻击,攻毒后观察 2 周。

试验 2: ND、IBD 混合毒液的浓缩效果观察。试验分成 5 组(第 5~ 第 9 组), 每组 20 只鸡(对照组, 即第 9 组 10 只鸡), 第 5 组鸡注射 ND-IBD 二联未浓缩苗 1. 0 mL, 第 6 组鸡注射 ND-IBD 二联浓缩苗 1. 0 mL, 第 7 组鸡注射 ND-IBD 二联浓缩苗 0. 5 mL, 第 8 组鸡注射 ND-IBD 超滤液乳剂 1. 0 mL, 第 9 组注射生理盐水乳剂 1. 0 mL, 注射部位是颈背侧皮下, 免疫后 20 d, 第 5、第 8 组每组 10 只鸡(第 9 组 5 只鸡) 采血测 ND HI 抗体并用 NDV 强毒攻击, 攻毒后观察 2 周。另外 10 只鸡(第 9 组为 5 只) 在 1 月龄时采血测 IBD 中和抗体, 并用 IBD 强毒攻击, 攻毒后 72 h 剖杀观察法氏囊变化。

1. 2. 4 攻毒试验 NDV 攻毒: 攻毒用强毒株由中监所提供, NDVF<sub>48E6</sub> 本组复壮 2 代, 强毒批号 920320ELD<sub>50</sub>= 10<sup>-8.7</sup>/0. 1 mL, 攻毒剂量为 5 × 10<sup>5</sup>ELD<sub>50</sub>/0. 5 mL, 腿部或胸部肌肉注射。凡鸡只攻毒后 2 周内未见出现任何临床症状, 呈现良好健康状况, 即可判为保护, 对照鸡应在攻毒 6 d 内全部死亡。

IBDV 攻毒: 攻毒用强毒株由本组提供, IBDV、BJQ902 F<sub>3</sub> 代攻毒剂量 10<sup>5</sup>BI<sub>D</sub><sub>50</sub>/0. 2 mL, 途径为滴眼及口服, 攻毒后 72 h 剖杀。凡鸡只攻毒后 72 h 内未出现任何临床症状, 剖杀观察法氏囊正常, 可判为保护。

2 结果与分析

2. 1 病毒浓缩

2. 1. 1 NDV 的浓缩 NDV 毒液 8. 1 L, 浓缩到 3. 7 L, 约用 5 min。浓缩时超滤机压力为进口 0. 08MPa, 出口 0. 06MPa, 浓缩液的 HA 价(1: 2560) 比浓缩前毒液的 HA 价(1: 1280) 上升了一倍, 但超滤液中出现了 HA, 效价为 1: 2, 表明有少量血凝素透过滤膜而丢失(表 3)。

表 3 NDV 及 IBV 的超滤浓缩

测 试 项 目	试 样	
	1	2
毒液成份	NDV 毒液	ND+ IBD 等量混合液
浓缩前毒液量(L)	8. 1	36. 00
浓缩后毒液量(L)	3. 7	12
浓缩倍数	2. 19	3. 0
浓缩机压力	进口 0. 08MPa	进口 0. 47MPa
	出口 0. 06MPa	出口 0. 140MPa
浓缩时间	5 min	26 min
浓缩前毒液 HA 价	1: 1280	1: 640
浓缩后毒液 HA 价	1: 2560	1: 2560
超滤液 HA 价	1: 2	1: 8
血凝素从超滤液中丢失比率	1/ 1280= 0. 15625%	8/ 640= 1. 25%

2. 1. 2 ND、IBD 混合毒液的浓缩 ND、IBD 等量混合液 36 L, 浓缩到 12 L, 用了 26 min, 超滤机的工作压力进口 0. 147MPa, 出口 0. 14MPa, 浓缩前毒液温度 15℃, 浓缩后达 31℃升温

16℃, 血凝素测定结果, 浓缩前为 1: 640, 浓缩后为 1: 2560 上升了两个滴度, 而超滤液 HA 为 1: 8, 进一步证实血凝素的丢失(表 3)。

## 2.2 免疫试验

2.2.1 试验 1 从 ND 毒液浓缩效果观察结果(表 4)可以看出, 浓缩苗及未浓缩苗免疫鸡后攻毒, 均可获 100% 的保护效力, 而用浓缩苗免疫鸡的血清 HI 抗体效价明显高于未浓缩苗。ND 超滤液乳剂免疫鸡后仍能

使 3/10 的鸡得到保护, 说明部分病毒有效成份穿过超滤膜而丢失。这与血凝素测定结果吻合。

2.2.2 试验 2 ND、IBD 混合毒液浓缩效果观察结果(表 5)显示, 结果与试验 1 相似, 无论浓缩二联苗或未浓缩二联苗, ND 攻毒均可获得 100% 的保护。浓缩苗的 HI 抗体滴度高于未浓缩苗, ND-IBD 超滤液乳剂、ND 攻毒有 6/10 保护进一步证实 ND 有效保护性抗原穿过膜而丢失。IBD 攻毒, 二联浓缩苗与未浓缩苗均为 100% 保护, IBD 中和抗体滴度浓缩苗高于未浓缩苗。ND-IBD 超滤液乳剂 IBD 攻毒, 保护率为 1/10, 对照组 4/5 发病, 说明未见有 IBDV 有效抗原成份的丢失。

表 4 NDV 超滤浓缩苗的免疫比较试验

分组	疫苗种类	免疫剂量	免疫后 HI 效价		免后 20 d ND 攻毒 (保护数/攻毒数)
			0	20	
1	ND 未浓缩苗	0.5	0	97.1	10/10
2	ND 浓缩苗	0.5	0	197	10/10
3	ND 超滤液乳剂	1.0	0	1.52	3/10
4	生理盐水乳剂	0.5	0	0	0/5

表 5 ND-IBD 浓缩与未浓缩苗的免疫比较试验

分组	疫苗种类	免疫 剂量 (mL)	免疫后(d)ND HI 效价( GMT)			免疫后 20 dND 攻毒 (保护数 /攻毒数)	免疫后(d)IBD 中和抗体滴度		免疫后 30d IBD 攻毒 (保护数 /攻毒数)
			0	20	30		0	30	
5	ND-IBD 二联苗未浓缩苗	1.0	3.03	117	107	8/8	5.28	1664	10/10
6	ND-IBD 二联苗浓缩苗	1.0	3.03	237	256	10/10	5.28	8780	10/10
7	ND-IBD 二联苗浓缩苗	0.5	3.03	128	137	10/10	5.28	5405	10/10
8	ND-IBD 超滤液乳剂	1.0	3.03	3.03	3.03	6/10	5.28	1.62	1/10
9	生理盐水乳剂	1.0	3.03	0	0	0/5	5.28	2.64	1/5

## 3 讨论

用 UF-1 型工业平板式超滤机对 NDV 及 IBDV 进行了初步的浓缩试验, 结果表明, 该设备具有良好的病毒浓缩功能, 其特点有: ①浓缩工艺简单: a. 该设备对料液预处理要求不严, 病毒液在浓缩前仅用 100 目铜纱网滤后即可进行浓缩; b. 浓缩机操作简单。②浓缩效率高, 本试验用了 20 张膜, 在 26 min 内将 36 L 病毒液浓缩了 3 倍, 如果增加超滤膜的数量(最多可装 80 张膜)浓缩速度还将加快。③浓缩过程料液升温不高, 可根据生物制品的要求控制料液温度。④该设备结构简单, 易于清洗消毒。

用 HA 试验测定浓缩液及未浓缩液的 HA 价, 浓缩液 HA 价按浓缩比率相应上升, 而在超滤液中也测出了 HA 效价, 说明病毒血凝素成份有部分丢失。丢失比率二批分别为 2/1280=

0.15625% 及  $8/640 = 1.25\%$ , 因此以血凝价来测定病毒有效成份丢失量, 看来并不高, 在 2% 以下。

将浓缩液, 未浓缩液制成灭活苗免疫鸡未出现任何不良反应, 免疫后 20 d 及 30 d 攻毒均可产生 100% 的抵抗 ND 及 IBD 的保护力, 而 ND HI 抗体滴度, 浓缩苗明显高于未浓缩苗。用超滤液制成乳剂给鸡注射仍能使部分鸡产生保护作用。证明病毒有效保护性抗原成份透过膜而丢失, 但丢失量根据攻毒保护结果推算, 低于 2% (大约 1% 左右), 这与 HA 测定结果吻合。但本试验无法得到有效保护性抗原的丢失量, 还需用其它方法<sup>[5]</sup>测定病毒成份的丢失量。另外, 因浓缩的病毒液是经过灭活处理的, 如果在灭活前进行病毒的浓缩, 我们就可通过测定浓缩前后的病毒滴度来测知该机的浓缩效果。

用超滤机浓缩病毒是属于分子水平的分离浓缩<sup>[6]</sup>, 病毒颗粒是一种高分子物质, 其分子量一般都在数千万道尔顿至数亿道尔顿以上<sup>[7]</sup>。如 NDV 的分子量为 5 亿, 在本试验中, 我们用的超滤膜孔径为 4 万 5 千、5 万以及 6 万三种, 尽管超滤膜孔径比 NDV 分子小千倍以上, 但还是出现了病毒成份的丢失。分析原因可能是: ①病毒“碎片”的存在, 在病毒液中存在有病毒“碎片”——即单独存在的病毒蛋白, 它们以单个的分子形式存在, 如 NDV 的血凝素——神经胺酶(分子量 7.2 万~ 7.5 万), 核衣壳蛋白(5.3 万~ 5.6 万)、融合蛋白(6.7 万、5.5 万、1.2 万)、IBDV 的 VP<sub>1</sub>(9.0 万), VP<sub>2</sub>(4.1 万), VP<sub>3</sub>(3.2 万), VP<sub>4</sub>(2.8 万)<sup>[8]</sup>。当这些分子小于超滤液孔径时, 必然将在浓缩中丢失。②超滤膜孔径大小分布不是绝对均匀的, 可能在超滤膜上有极少数较大的孔, 致使病毒颗粒透过。

该设备系仿具有国际先进水平的丹麦 DDS 公司同类产品结构替代进口产品, 已广泛应用于化学、食品和医药工业中高分子溶液的浓缩纯化和分离, 酒类的除菌、澄清和纯化、超纯化制备及反渗透的预处理、工业废水的深度处理等各方面。在国内用该设备进行病毒浓缩尚属首次, 试验中可能存在某些问题, 有待于今后进一步探讨。

## 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. 华北农学报, 1995, 3(10): 115~ 123
- 2 李汉秋, 周蛟. 鸡传染性囊病细胞毒油佐剂灭活苗研究. 北京农业科学, 1990: (兽医增刊): 41~ 49
- 3 Thayer S G, Eidson C V S, Klever S H. Multivalent inactivated virus oil emulsion vaccine in broiler breeder chickens. I. New castle disease virus and infectious bursal disease virus bivalent vaccines. Poultry Sci. 1983, 62: 1978~ 1983
- 4 Giambrone J J, Ronald P C. Vaccination of day-old broiler chicks against newcastle disease and infectious bursal disease using commercial live and/or inactivated vaccines. Avian Diseases, 1986, 30: 557~ 561
- 5 British Pharmacopoeia (Veterinary). HMSO. London. 1985. 180
- 6 高以恒, 叶凌碧. 膜分离技术基础. 北京: 科学出版社, 1989. 254~ 259
- 7 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1985. 19~ 20
- 8 卡尔尼克 B W 主编. 禽病学. 第 9 版. 高福, 刘文军等译. 北京: 北京农业大学出版社, 1990. 555

## Experiments of Concentrating NDV and IBDV by Using Plate-type Ultrafilter

Zheng Shilan Jiang Beiyu Liu Fuzhi Zhang Shuping

Jing Xiaodong Li Lin Yao Ying

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science,

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

**Abstract** Preliminary experiments of concentrating NDV and IBDV were carried out by using an industrial plate-type UF-1 model ultrafilter. The equipment was simple in operating process and high in efficiency of concentrating viruses. The HA titers of the concentrated virus fluids were higher than those of the unconcentrated virus fluids, and were proportional to the increase of concentration. The inactivated oil-adjuvant vaccines were prepared by using concentrated virus fluids and unconcentrated virus fluids. All chickens treated with concentrated vaccines and unconcentrated vaccines could gain 100% protection against virulent NDV and IBDV challenges. Both NDV HI and IBDV VN antibody titers of chickens treated with concentrated vaccine were much higher than those treated with unconcentrated vaccines. The experimental results indicated that the concentrated vaccine was safer and better than the unconcentrated vaccine.

**Key words:** Newcastle disease virus; Infectious bursal disease virus; Concentration; Inactivated vaccine