

禽霍乱克隆89弱毒菌苗免疫原性及免疫持续期试验

王文科 李金贡 郑成江

(天津市农业科学院畜牧兽医研究所, 天津 300112)

摘 要 禽霍乱克隆89弱毒菌苗 5×10^6 个活菌对鸡即产生免疫, 免疫剂量为 10×10^6 个活菌, 应用剂量为 30×10^6 个活菌。应用剂量免疫后, 用30个强毒菌攻击, 24h 保护率80%。免疫期125天, 100个以上强毒菌攻击, 保护率60%。

关键词 禽霍乱 克隆 菌苗 免疫

禽霍乱是由多杀性巴氏杆菌引起的禽类急性败血性传染病, 以传播快、死亡率高为其特征, 是危害养禽业的一种主要传染病。自1982年 Chabert 开始对本病研究并采用禽霍乱名词以来, 已有200多年的历史。众多学者从不同方面采用不同方法, 研究出了许多禽霍乱菌苗。但就活菌苗来讲, 由于免疫原性差的菌种毒力不稳定, 所以一些学者仍在开展此项研究工作。

作者利用从火鸡体内分离出的自然弱毒菌种, 通过挑选单一菌落, 培育出禽霍乱克隆89弱毒菌苗, 在天津地区禽霍乱流行季节只免疫一次, 即控制了该病的发生和流行。本试验目的是测定克隆89菌苗的最小免疫剂量, 应用剂量, 免疫产生时间, 不同免疫途径的免疫效果, 免疫持续期等, 以期确定最佳的免疫剂量, 免疫途径和免疫保护期。

1 材料和方法

试验动物: 来自未发生禽霍乱, 没有接种禽霍乱菌苗的健康京白蛋鸡和新浦东肉鸡。

克隆89菌种选育: 将从火鸡体内分离出的自然弱毒菌接种在血清马丁琼脂培养基上, 37℃ 恒温培养20h, 在生物显微镜45度角斜射光线下观察, 选单一菌落, 反复克隆三代做为克隆89菌种, 冻干保存备用。

强毒菌种: 中国兽药监察所提供 C₄₈₋₁系, 血清型为5:A, 对鸡致死剂量为3个菌。

培养基: 液体培养基为马丁汤, 采用增菌培养方法。固体培养基为血清马丁琼脂培养基。

生物显微镜: XT I - II 型照像体视显微镜。

保护率计算公式: 保护率 = 对照鸡死亡百分数 \times (1 - 实验鸡死亡百分数)。

2 试验结果

免疫剂量的测定: 取15只京白成鸡, 分三组, 每组5只, 分别用克隆89弱毒菌苗 5×10^6 ,

10×10⁶，30×10⁶个活菌免疫，设未免疫5只鸡为对照组。免疫5天后，用30个强毒菌攻击，试验组鸡保护率分别为40%、100%、80%，对照组鸡全部死亡。说明5×10⁶个活菌即产生免疫保护作用。确定肌注最小免疫剂量为10×10⁶个活菌；应用剂量为30×10⁶个活菌（表1）。

免疫产生时间的测定：取京白成鸡15只，用克隆89弱毒菌苗30×10⁶个活菌肌注免疫后，于24、72、120h各取5只鸡攻击30个强毒菌，设未免疫对照组5只鸡。试验组鸡免疫后24、72、120h保护率均为80%，对照组鸡全部死亡。证明免疫后24h即产生坚强保护作用（表2）。

不同免疫途径免疫效果对比试验：取30只京白蛋鸡和30只新浦东肉鸡，分肌肉注射、皮下注射、刺种、气雾和饮水五种免疫途径，每组各5只鸡，并设未免疫对照组。肌肉注射和皮下注射克隆89弱毒菌苗均为3000万个活菌；刺种免疫方法是在翼部无毛区用钢笔尖划痕刺种，菌苗稀释液含活菌数为6亿/ml；气雾免疫方法是将试验鸡置1m³密闭容器内，用手枪式气雾器免疫，雾滴颗粒80%为10μm，气雾剂量为每只鸡5ml菌苗稀释液，内含1.8亿个活菌，气雾后鸡在容器内停留30min；饮水免疫方法是免疫前停止鸡饮水4h，之后每只鸡饮8ml菌苗稀释液，内含1.8亿个活菌，保证每只鸡都能饮到菌苗。上述免疫后97天，用8个强毒菌攻击。结果证明，上述5种免疫途径均有不同程度的保护作用，其中以肌肉注射免疫剂量小，免疫持续期长，保护率高。从一次免疫角度出发，取用肌肉注射免疫途径（表3）。

表1 免疫剂量测定结果

组别	免疫 天数	免疫剂量 (万)	强毒攻击结果	
			存活数*	保护率(%)
试验组	5	500	2/5	40
		1000	5/5	100
		3000	4/5	80
对照组			0/5	0

* 存活数：分母指攻毒鸡数，分子为存活鸡数，下同。

表2 免疫产生时间测定结果

组别	免疫 剂量 (万)	免疫攻 毒时间 (h)	强毒攻击结果	
			存活数*	保护率(%)
试验组	3000	24	4/5	80
		72	4/5	80
		120	4/5	80
对照组			0/5	0

表3 不同免疫途径免疫效果统计结果

鸡品种	肌肉注射		皮下注射		刺种		气 势		饮 水		对照组 存活数
	存活	保护	存活	保护	存活	保护	存活	保护	存活	保护	
	数	率(%)	数	率(%)	数	率(%)	数	率(%)	数	率(%)	
京白蛋鸡	4/5	64	3/5	48	2/5	32	0/5	0	0/5	0	1/5
新浦东肉鸡	3/5	60	2/5	40	1/5	20	1/5	20	1/5	20	0/5

免疫持续期试验：取京白蛋鸡和新浦东肉鸡，用克隆89弱毒菌苗3000万活菌剂量肌注免疫后，分别于免疫后25、51、85、90、97、117、125、143天用平均约30个强毒菌攻击，结果是免疫后51天的保护率最高，为100%，85天仍为80%，90天到125天为60%~64%，143天下降到33.8%。以保护率60%做为标准，免疫持续期为125天（表4）。

3 讨 论

克隆89弱毒菌苗 5×10^6 活菌即产生免疫,30个强毒菌攻击保护率达40%,小于 5×10^6 活菌是否产生免疫,有待进一步探讨。

就免疫剂量来看,克隆89弱毒菌苗 10×10^6 活菌免疫5天后,30个强毒菌攻击保护率为100%,确定 10×10^6 活菌为免疫剂量。应用剂量用 30×10^6 活菌,为免疫剂量的3倍,在生产应用中具有一定的保险系数。

克隆89弱毒菌苗 30×10^6 活菌免疫后,24h 30个强毒菌攻击,保护率达80%,免疫力产生迅速。因此,在暴发禽霍乱鸡群或受威胁鸡群早期做紧急预防接种,可以控制禽霍乱疫情流行。

克隆89弱毒菌苗免疫力产生速度之快,实属罕见。文献中曾报道过禽霍乱833弱毒菌苗免疫后24小时产生免疫力^[1],B₂₆-T₁₂₀₀菌苗免疫后8小时20%鸡产生保护作用^[2]。做为禽霍乱弱毒菌苗,免疫产生如此快,这种免疫机理作用,需要从新的观念出发,开展深入细致研究工作,如能获得解决,对急性细菌性传染病免疫机制具有十分重要意义。

克隆89弱毒菌苗采用肌肉注射,从免疫持续期和保护率两个方面来看,优越于皮下注射、刺种、气雾和饮水等免疫途径。 30×10^6 活菌一次肌注,在大剂量强毒攻击下,125天保护率仍为60%,其结果和禽霍乱弱毒菌苗在3个月内免疫力明显下降,4至5个月免疫力基本消失的观点^[3]相反。由于我们基本上采用10倍致死剂量的强毒菌数攻毒,所以在一定程度上影响了人工强毒攻击的免疫持续期和保护率。如果降低强毒攻击菌数,免疫持续期还会延长,保护率也会相应提高。几年来,在天津地区应用情况证明了此点,这也是克隆89弱毒菌苗研究工作中的一个突破点。

国内各地流行的禽霍乱菌株,绝大多数是同型的,菌体抗原为5,荚膜A型,型为5:A,与C₄₈₋₁系同型^[4]。克隆89弱毒菌苗能抵抗C₄₈₋₁系强毒攻击,说明对我国禽霍乱病的预防具有推广应用价值。

表4 免疫持续期试验统计表

鸡品种	免疫天数	攻 毒 结 果		保护率 (%)
		试验组存活数	对照组存活数	
京白蛋鸡	25	4/5	0/5	80
京白蛋鸡	51	5/5	0/5	100
京白蛋鸡	85	4/5	0/5	80
京白蛋鸡	90	3/5	0/5	60
京白蛋鸡	97	4/5	1/5	64
京白蛋鸡	117	5/5	2/5	60
新浦东肉鸡	125	3/5	0/5	60
京白蛋鸡	143	2/6	0/6	33.3

说明:免疫后125天强毒攻击菌数为100个以上。

参 考 文 献

- 1 梁艳荣,李维义. 833禽霍乱弱毒菌苗对鸡的免疫产生期和免疫期试验. 中国畜禽传染病, 1989(4): 8~9
- 2 谢芝勋,刘加波,莫照兰等. 禽巴氏杆菌菌 B₂₆-T₁₂₀₀弱毒疫苗对鸡的免疫产生期和免疫期试验. 中国畜禽传染病, 1993(6): 14, 23
- 3 冷淑珍,王江,沈富兴等. 应用当地禽霍乱菌株制备油剂灭活菌苗的研究. 中国畜禽传染病, 1989(5): 3~5
- 4 沈志强,杨永福. 禽霍乱蜂乳胶菌苗的研究. 中国畜禽传染病, 1989(5): 1~3

Test on Immunogenity and Immunity Duration of an Attenuated Strain Clone89 Bacterine Against Fowl Cholera

Wang Wenke Li Jingong Zheng Chengjiang

(Institute of Animal Husbandary and Veterinary Sciences,
Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin)

Abstract Immunity was stimulated in chickens vaccinated with 5×10^6 CFU bacteria of the attenuated strain Clone89 of *pasteurella multocida*. Vaccination and application doses were 10×10^6 and 30×10^6 CFU bacteria respectively. Eighty percent chickens vaccinated with application dose were protected when challenged by 30 live bacteria of virulent strain 24 hours post — inoculation. Lasting immunity was generated 72 hours post — inoculation. When challenged by 100 live bacteria of virulent strain 125 days post — inoculation, 60 percent chickens were protected.

Key words: Fowl cholera; Clone89; Bacterine; Immunity