

鸡霍乱油乳剂甲醛灭能苗的试验研究

蔺希昌 郭秀琦 杜全德 赵河山 王友田

(河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州)

摘 要

鸡霍乱严重威胁着养鸡业的发展,但是迄今尚未有有效菌苗用于生产。我们从本省病死鸡心血中分离出了28株多杀性巴氏杆菌,经毒力及免疫原性测定从中筛选出毒力强、免疫原性好的Sy—8421作为制苗菌株。该菌株具有典型的多杀性巴氏杆菌的菌体形态,培养特性及生化特性。2个菌可致死2公斤左右的健康家兔;3—5个菌可致死6个月龄的健康敏感鸡。该菌株在改良马丁肉汤培养后,用0.3%的甲醛灭能,以7号白油为佐剂,油、水相按一定比例制成油包水乳剂苗。

该菌苗安全性好,以2倍免疫剂量接种2月龄健康鸡观察一周无任何不良反应。在实验室内用256只鸡分9批次作效力实验,其保护率为82.4%,免疫期达6个月以上。免疫后14天即可产生坚强的免疫力。该苗在0—4℃保存3.5个月仍不丧失其免疫效力,保存5个月仍保持其良好的物理性状。对3万余只鸡作中间试验获得了良好的免疫效果。

关键词 鸡霍乱 灭能苗 免疫原性 免疫效果 免疫期

鸡霍乱严重地威胁着养鸡业的发展,给养鸡业带来巨大损失。目前我国应用于预防鸡霍乱的弱毒菌苗成本低,使用方便,但生产实践证明,该苗安全性能差,对产蛋有较大的影响,免疫期短(2.5~3个月),且有潜在的散毒危险;鸡霍乱氢氧化铝灭能苗虽安全性好,但保护率低,免疫期短,影响了它的使用范围。因此,研制一种理想的菌苗十分必要。

随着免疫学的研究进展,对矿物油佐剂的应用给予了极大重视。我们经三年试验研究,研制出以本省鸡多杀性巴氏菌Sy—8421为抗原,以矿物油为佐剂的油乳剂灭能苗,通过较大面积应用取得了良好免疫效果,现将试验结果报告如下。

一、制苗菌株的筛选

从本省5个地(市)的病、死鸡心血材料中,依其菌体形态、培养性状、生化特性和菌落荧光型等综合鉴定,共分离出巴氏杆菌28株。为选择毒力强、免疫原性好的制苗菌株,对其中7株典型强毒菌作以下筛选试验。

1、毒力检查及MLD测定:用70日龄健康红鸡对7株分离菌分别作毒力测试,结果见表1。结果表明:7株分离菌对鸡均表现较强的致病力及致死能力,其中以Sy—8421、Sy—8422 Sy—8424菌株毒力最强。用平板计数法对Sy—8421菌株作MLD测定,肌注含有2个菌的马丁肉汤1毫升可致死体重2公斤左右的健康家兔;3—5个菌能致死半年以上敏感鸡。

2、抗原性测定:为筛选免疫原性好的制苗菌株,将毒力强的三株分离菌及中监所提供的C48—1强毒菌分别制成油乳剂苗,免疫4月龄郑州红鸡,经21天用2MLD C48—1强毒

菌攻击, 结果见表 2

表 1

七株分离菌对鸡毒力测定结果

菌 株	死亡时间 (小时)	平均死亡时间 (小时)
SY—8421	27, 26	26.5
SY—8422	28.5, 31.5	30.5
SY—8423	30, 45	37.5
SY—8424	29, 26	27.5
SY—8425	45, 48	46.5
SY—8426	33, 53.5	43.25
SY—8427	50, 63	56.5

注: 1、各菌株的试验动物均为 2 只 70 日龄的郑州红鸡。

2、均为肌肉接种, 剂量 10 CFU。

表 2

不同菌株抗原性测定

组 别	数量 (只)	保护数 / 攻击数	保护率 (%)
试 验 组	SY—8421	5	4 / 5
	SY—8422	5	3 / 5
	SY—8424	5	2 / 5
	C48—1	9	6 / 9
对 照 组	3	0 / 3	0

结果表明: Sy—8421 菌株的免疫原性较另外两株为优, 本菌株制备的油乳苗比 C48—1 菌株制备的油乳苗保护率高 13.3%。

经综合鉴定, 选择 Sy—8421 为本试验的制苗菌株, 该菌株具有以下特性:

(1) 具有巴氏杆菌典型菌体形态、培养性状及生化特性。

(2) 本菌在加有 0.1% 裂解血球全血和 4% 健牛血清的马丁琼脂平板上, 于 37°C 培养 16—22 小时, 菌落为 Fo 萤光型, 菌落圆形光滑, 结构细致, 边缘整齐。

(3) 接种于含有 0.1% 裂解血球全血的马丁肉汤培养 24 小时的菌液, 2—3 个菌能致死 2 公斤体重的家兔; 3—5 个菌能致死半年以上敏感鸡。

二、灭能剂的筛选与灭能试验

为选择灭能效果良好而又不影响抗原性的灭能剂, 取福尔马林和 AEI 作灭能效果对比试验。结果表明, 0.01% AEI 26 小时尚未完全灭活, 而 0.3% 福尔马林 18 小时即可完全灭能。

三、佐剂筛选试验

为选择性能良好的佐剂,以Sy—8421灭能菌液为抗原,以7号白油、花生油豆磷脂为佐剂分别制苗,其免疫效果见表3。

表3 不同佐剂苗对鸡免疫效力比较试验

菌类	苗别	试验动物		免疫方法		攻毒试验		保护数 / 攻击数	保护率 (%)
		种类	数量(只)	途径	剂量	菌株	剂量		
7号白油油乳剂苗		红鸡	10	肌肉	2ml/只	C48—1	2MLD	8/10	80
花生油豆磷脂佐剂苗		红鸡	10	肌肉	2ml/只	C48—1	2MLD	4/10	40
对照组		红鸡	3	—	—	C48—1	2MLD	0/3	0

上表表明:7号白油油乳剂苗比花生油豆磷脂佐剂苗保护率高出40%;比鸡霍乱氢氧化铝苗保护率提高26%(铝胶苗保护率一般为54%)。由此得出油乳佐剂在免疫效力上较其它佐剂为优。

四、菌苗制造

1、制苗用培养基

液体培养基为加入0.1%裂解血球全血及0.1%葡萄糖的改良马丁肉汤。固体培养基为含有0.1%裂解血球全血和4%健牛血清的改良马丁琼脂。其pH为7.2~7.4。

2、种子液制备

将真空冻干保存的Sy—8421菌种,在马丁肉汤中复苏后,通过鸡体一代复壮,然后无菌采取心血接种于上述固体培养基上,37℃培养21小时选择3个以上典型、光滑、Fo型菌落,接种在改良马丁琼脂斜面上,培养24小时作为基础种子,将其再接种于上述液体培养基内,于37℃培养24小时,经纯检合格后即可作为种子液使用。

3、菌液培养

浅层静止培养法:按液体培养基量加入上述成份后,再加入2%种子液,装成浅层,于37℃培养24小时,培养过程中振荡五次以上。

通气培养法:将含有2%种子液的上述培养基加入0.1%消泡剂,于37~38℃水箱内静止培养4小时,再行连续通气培养20小时收获。

上述方法培养的菌液经计数、纯检合格后进行灭能。

4、灭能及灭能检查

菌液检查合格后,加入0.3%福尔马林(分析纯含量36%),37℃灭能21小时,检查灭能完全后,方可制苗。

5、制苗

为了制备性状良好的油包水型乳剂苗,除对乳化剂和油类进行筛选外,又对油、水比例,混合方法,乳化速度及乳化温度作了多次试验观察,最后确定以灭能菌液96份加吐温—80 4份为水相;7号白油94份加司班—80 6份和1.5%硬脂酸铝为油相,于捣碎缸内先加入油相,再以2000转/分搅拌的同时,按1:1.5的比例缓缓加入水相,加完后以8000转/分高速乳化2分钟,最后加入万分之一硫柳汞,经无菌检验合格后备用。

五、试验结果

1、免疫剂量测定：每组用健康郑州红鸡各 9 只分别肌注同批苗 1 毫升和 2 毫升，对照组 2 只。注苗后 21 天用 2MLD C48—1 强毒攻击，结果见表 4。

表 4 免疫剂量测定

组 别	数量 (只)	免疫剂量 (毫升)	免疫时间 (天)	保护数/ 攻毒数 (只)	保护率 (%)
实验组	9	1	21	6 / 9	66.6
	9	2	21	8 / 9	88.8
对照组	2	—	—	0 / 2	0

从上表看出：2 毫升免疫量比 1 毫升提高保护率 22.2%。用来航鸡和红鸡相比较作重复试验也取得同样结果。确定鸡霍乱油乳苗一次免疫剂量为 2 毫升。

2、安全性试验：用我所动物房提供的二月龄健康来航鸡 10 只，分为两组。随机抽取两批次鸡霍乱油乳苗，每只肌注 2 个免疫剂量观察 25 天，除注苗后 24 小时内食欲减少、精神稍差外，无其它不良反应。扑杀后局部吸收良好，无残留。在多次菌苗效力及中间试验中均未引起死亡现象。表明该苗安全性良好。

3、效力试验：通过 9 批次油乳剂苗对不同月龄的育成鸡和成年鸡共 256 只进行效力试验，每只鸡肌注 2 毫升，21 天后以 2MLD C48—1 强毒攻击，结果见表 5。

表 5 效力试验结果

组 别	试验数 (只)	攻 毒 结 果		
		存活数 / 攻击数	(只)	死亡率 (%)
试验组	256	211 / 256	45	17.5
对照组	35	2 / 35	33	94.2

经检验，差异极显著 ($P < 0.01$)，表明该油乳剂苗效力可靠。

4、免疫期测定：随机抽取两个批号的鸡霍乱油乳苗用 2 月龄郑州红鸡、来航鸡进行免疫期测定，结果见表 6。

表 6 免疫期测定

组 别	品 种	数量 (只)	菌苗批号	免疫量 (ml)	免疫时间 (天)	保护数 / 攻击数	保护率 (%)
试验组	来	58	850810	2	196	47 / 58	81
对照组	航	5	—	—	—	0 / 5	0
试验组	郑	9	850115	2	185	7 / 9	77.7
对照组	州 红	2	—	—	—	0 / 2	0

注：以 2MLD C48—1 强毒菌攻击。

从上表看出，免疫后 196 天保护率为 81%；185 天为 77.7%，两者差异不显著 ($P > 0.05$)。实验结果表明，免疫半年后保护率在 80% 左右。

5、免疫力产生时间的测定：用健康育成鸡10只，分为两组，每只肌注本菌苗2毫升，3只鸡作对照。注苗后不同时间以2 MLD C48—1强毒菌攻击，结果见表7。

表7 免疫力产生时间测定

组别	数量(只)	免疫时间(天)	保护数/攻击数(只)	保护率(%)
试验组	5	7	2 / 5	40
试验组	5	14	4 / 5	80
对照组	3	—	0 / 3	0

表7表明：免疫注射后7天即可产生免疫力，而14天则可获得较好的免疫效果。

6、油乳剂苗保存试验：将同批苗分别保存于4℃冰箱3.5个月和室温28℃一个月测定其免疫保护率，前者为80%，后者降至60%。4℃冰箱保存5个月后油乳剂苗不分层，无破乳现象，仍保持其良好的物理性状。故本菌苗适于较低温度保存。

7、中间试验：从1984年7月至1986年3月，先后对郑州、商丘、焦作、济源、获加及平顶山等地养鸡场及专业养鸡户共免疫鸡3万余只。用户反映，注射油乳剂苗后除在一天内鸡群减食、精神稍差外，无其它不良反映，对产蛋没有明显影响。对中间试验鸡群随机取5批次212只鸡进行效力检测，其平均保护率为81.1%。

六、结论与讨论

1、从全省五个地(市)分离的鸡霍乱巴氏杆菌中，通过细菌学检查，毒力、免疫原性测定及与标准菌株C48—1对比，其中以Sy—8421菌株毒力最强，免疫原性最好，是较理想的制苗菌株。

2、在灭能剂的选择上，用0.01%的AEI 26小时尚不能达到灭活目的，而0.3%福尔马林于37℃经18小时即可灭能完全，又不影响其抗原性，故选用福尔马林作为灭能剂是适宜的。

3、试验表明，用油乳剂代替传统氢氧化铝佐剂，可使菌苗的保护率提高20%。我们认为用油乳剂制苗为好。在乳剂材料中，7号白油白而纯净，粘度低，乳化后剂型稳定，为良好的乳化用油。

4、用本菌苗的2倍免疫剂量接种2月龄健康鸡和对3万余只鸡的中间试验均未发现不良反应，证明本菌苗是安全的。用该苗9批次对256只育成鸡及成年鸡作效力试验，每只鸡肌注2毫升，免疫保护率为82.4%，比目前使用的氢氧化铝菌苗提高20—30%。

5、本苗每只鸡肌注2毫升，对2月龄的郑州红鸡及来航鸡进行免疫期测定，注苗后135天和196天用2 MLD C48—1强毒菌攻击，保护率为77.7—81%。免疫期显著长于铝胶苗，每年接种两次即可获得全年保护。

6、本菌苗免疫注射后7天即产生免疫力，14天则能获得较理想的免疫效果。

7、油乳剂苗免疫时间长，其主要原因是由于Sy—8421制苗菌株毒力强，免疫原性好；同时采用效能良好的油乳佐剂(储存佐剂)，延长了免疫原在体内的作用时间，并能逐渐增加抗原对机体的作用强度，提高机体免疫应答，使免疫持续期延长。

参 考 文 献

- [1] 王明俊、钱心元：乳剂疫苗用矿物油和乳化剂毒性试验及其质量标准的探讨，《兽医药品通讯》，1985（4），21—27
- [2] 马闻天：抗新城疫疫苗概述（一），《兽医药品通讯》，1985（2），32—37
- [3] M. S. Thaler, R. D. Klausner 等著，中国医学科学院肿瘤研究所免疫室译，《医学免疫学》第二版，人民卫生出版社，1981，264—280
- [4] 马闻天：鸡新城疫灭能苗研究，《兽医药品通讯》1986，（2）1—10
- [5] 刘立人、骆春阳：多杀性巴氏杆菌选择培养基的研究及制备，《兽医科技杂志》，1983（6），9—12.
- [6] H. D. Stone et al: Avian Diseases. 22（4），1978，666—667
- [7] M. Brugh et al: Am. J. Vet. Res. 44（1），1978，72—75
- [8] B. Panigrahy et al: Avian Diseases. 25（4），821—826
- [9] 农业部兽医药品监察所：《兽医生物制品检验及操作规程》第五次修订本，1985，429—431

A STUDY ON CHICKEN CHOLERA OIL-EMULSION VACCINE DEACTIVATED BY FORMALDEHYDE

Lin Xichang, Guo Xiuqi, Du Quande, Zhao Heshan, Wang Youtian
(Animal Husbandry and Veterinary Science Institute, Henan Academy of
Agricultural Sciences, Zhengzhou)

ABSTRACT

Chicken Cholera has been threatenning the development of chicken farming seriously. But up to now there are no perfect vaccine to be applied to practice. We have separated 28 strains of *Pasteurella multocida* from the heart blood of chicken died of cholera in our province. Through determining of virulence and immunogenicity we sifted out Sy-8421 as a strain for making vaccine. The strain Sy-8421 possesses the typical character of *Pasteurella multocida* in organism shape and in culture and biochemical test, and has a good nature of antigen and strong virulence. Two of the strain could cause death of healthy rabbits with two kilogram weight, three to five of this strain could cause

death of healthful chicken being six months old. After being cultured in improved Martin's Bouillo, it was deactivated by 0.3% formaldehyde. Using the white oil No. 7 as a adjuvant, the Oil-Emulsion Vaccine was produced by emulsifying the culture and adjuvant which were mixed according to certain proportion.

The Vaccine was safe, when it was inoculated to healthful chicken being two months old with diploid Imd. and no untoward effect appeared in one week. In laboratory the potency test was made for nine times using 256 chickens. The results were that the protection rate was 82.4% and the protection time lasted more than six months. The chicken would produce strong immunity after fourteen days of inoculation. Kept in 0—4°C, after 3.5 months, the vaccine would not lose its efficacy and after five months it still maintained its good physical properties. In median examination using thirty thousands chickens, the ideal result was obtained.

Key words: Chicken cholera; Deactivated vaccine; Immunogenicity; potency; Protection time

欢迎订阅《北方园艺》

《北方园艺》是我国北方唯一的一份学术研究与科学普及相结合的园艺综合性刊物。主要刊载学术论文、实用技术、致富经验等园艺专业文章，是科技人员、农村科技户、专业户和广大菜农、果农、瓜农必备的参考资料。

《北方园艺》为双月刊，16开本，48页，全年定价4.20元（含邮资）。1988年不在邮局发行，请到当地邮局直接汇款到哈尔滨市哈平路义发源《北方园艺》编辑部发行部。

《杂交水稻》杂志征订、征稿启事

《杂交水稻》1986年2月创刊，是由全国杂交水稻研究协作组和湖南杂交水稻研究中心主办的专业技术刊物。辟有杂交水稻选育选配、栽培技术、繁殖制种、基础理论、综述、新组合介绍、信息与动态、译文等栏目，是传播杂交水稻最新信息和动态的主要渠道，交流先进经验和技术的桥梁，学习新鲜知识的园地，开展学术争鸣的场所。

本刊为双月刊，16开本，48面，单价0.54元，全年3.24元，逢单月15日出版，限国内发行，全国各地邮局（所）均有订阅。邮政代号42—38。

《杂交水稻》编辑部