

# 鸡传染性支气管炎(IB)H<sub>120</sub> 细胞弱毒疫苗研究

刘文惠 胡毓骥 曹春景 肖治军 赵金旺

(河南省农科院畜牧兽医研究所, 郑州 450002)

**摘 要** 通过近三年试验, 研制出鸡传染性支气管炎毒株 IB H<sub>120</sub> 细胞弱毒苗, 经室内外近 40 万羽雏鸡免疫试验表明: 该苗以每羽 0.01ml 滴鼻、点眼或口服免疫 4~12 日龄雏鸡, 7d 后产生免疫力; 免疫后 17d、32d、60d 抗标准强毒攻击的免疫保护率分别为 88.7%、87.5%、87.5%, 免疫期可达二个月; 其最小免疫量为 0.001ml/羽; 以 10 个免疫剂量接种雏鸡无任何不良反应, 安全性能良好; -20℃ 保存半年, 4℃ 保存一个月效力不变。

**关键词** 鸡传染性支气管炎 鸡全胚细胞培养 疫苗

鸡传染性支气管炎(IB)是由冠状病毒引起的一种急性、高度接触性传染病。目前防治本病多采用荷兰弱毒株 IB H<sub>120</sub> 和 IB H<sub>52</sub> 的鸡胚组织苗进行免疫, 虽然该苗安全性能好, 免疫效果理想, 但鸡胚苗的生产, 除了劳动强度大、产量偏低外, 还面临着我国目前 SPF 鸡胚紧缺, 而采用一般鸡胚制苗, 不仅可能受鸡胚中母源抗体干扰, 使疫苗效价不够稳定, 而且胚源性病原体极易随着疫苗的研制、生产和发放使用造成某些疫病的人为传播。鉴于此, 我们探索应用细胞培养技术来制备 IB H<sub>120</sub> 弱毒苗。该苗经安全、效力试验, 取得了较理想的免疫效果。现将初步研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 种毒 IB H<sub>120</sub> 弱毒株由中监所提供, 经非免疫鸡胚复壮处理后使用, 其毒价(EID<sub>50</sub>)为 10<sup>-6.8</sup>/0.1ml。

1.1.2 鸡全胚细胞 用本所自孵的 12 日龄非免疫健康鸡胚, 按 Asilim 氏鸡胚皮肤细胞制备技术<sup>[2]</sup>, 经笔者改良制备成全胚细胞(CE)。

1.1.3 强毒 IB M<sub>41</sub> 由中监所提供, 使用前通过鸡胚复壮<sup>[1]</sup>。

1.1.4 试验鸡 室内试验用自孵自养无母源抗体的非免疫健康雏, 野外试验选用疫区鸡场或专业户的鸡群。

### 1.2 方法

1.2.1 IB H<sub>120</sub> 细胞适应毒的制备: 将复壮、处理后的 IB H<sub>120</sub> 鸡胚组织毒用细胞培养液作 10<sup>-2</sup> 稀释, 并将其按原细胞培养液 1/10 接毒量接种于倾去营养液的 CE 上, 经 37℃ 吸附 1h 后弃去病毒液, 加入原量的细胞维持液继续温室培养, 每天观察细胞病变。在细胞皱缩、变圆、形成

融合细胞时,可见胞核变暗,胞间空隙增大,进而胞膜破裂,细胞崩解,致密单层细胞形成拉网状空斑。当致细胞病变(CPE)达 75% 时即可收毒,经低温冻融、处理后继续进行细胞传代,或  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。

1.2.2 IB H<sub>120</sub> 细胞毒 EID<sub>50</sub> 测定:有选择地将不同代次细胞适应毒,用生理盐水作  $10^{-5} \sim 10^{-8}$  稀释,每个滴度(包括生理盐水对照组)以每枚 0.1ml 接种量接种于 10 日龄鸡胚尿囊腔,置  $37^{\circ}\text{C}$  培养 6d,每天照胚三次,随时收集死胚置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。6d 后取出全部鸡胚,比较、观察接种后 2~6d 的死胚及存活胚,并根据胎儿失水、卷屈、僵胚等特征性病痕数的总和,计算细胞毒的 EID<sub>50</sub>。

1.2.3 IB H<sub>120</sub> 细胞弱毒苗的制备:将 IB H<sub>120</sub> 细胞适应毒第 3 代作为种毒,按常规接种于 CE 细胞上,并在 CPE 达 70% 以上时收毒,经冻融、处理后制备成 IB H<sub>120</sub> 细胞弱毒苗。

## 2 试验结果

### 2.1 IB H<sub>120</sub> 细胞适应毒的检测

2.1.1 IB H<sub>120</sub> 细胞毒 EID<sub>50</sub> 测定 将 IB H<sub>120</sub> 鸡胚组织毒适应于 CE 培养后连续传至第 10 代,从中抽测了 5 个代次的细胞毒 EID<sub>50</sub>。结果见表 1。

表 1 IB H<sub>120</sub> 细胞毒 EID<sub>50</sub> 测定

项 目	细 胞 代 次					平均值 ( $\bar{C}$ )	鸡胚组织毒 平均值
	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>		
收毒时间(h)	36	45	48	48	52		
EID <sub>50</sub>	7.14	7.3	7.0	6.5	6.33	6.85	6.8

2.1.2 IB H<sub>120</sub> 细胞毒安全性测试 将不同代次 IB H<sub>120</sub> 细胞毒,以每羽 0.01ml、0.05ml、0.1ml 分别滴鼻、点眼、口服接种 4~12 日龄雏鸡,隔离饲养观察 15d。其结果(表 2)表明,0.01ml 和 0.05ml 试验组雏鸡无任何不良反应,0.1ml 试验组的 4 日龄和 8 日龄雏鸡分别有 1/15 和 1/10 雏鸡出现短暂的一过性轻度反应,1d 左右即恢复正常,无一死亡,12 日龄雏鸡无任何反应,表明 IB H<sub>120</sub> 细胞毒对雏鸡具有理想的安全性能。

2.1.3 IB H<sub>120</sub> 细胞毒效力测定 将 IB H<sub>120</sub> 细胞毒 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub>,均以每羽 0.001ml、0.005ml、0.01ml 三组不同剂量分别接种 4~8 日龄雏鸡,10~15d 后用标准强毒 IB M<sub>41</sub> 攻击。试验结果(表 3)表明,IB H<sub>120</sub> 细胞毒以每羽 0.001ml 接种 4~8 日龄雏鸡仍可获得 75.0%~87.5% 的抗强毒攻击保护率。

根据以上测试结果,应用 IB H<sub>120</sub> 细胞适应毒制备细胞苗应以 0.01ml/羽为雏鸡一个免疫剂量(含  $10^{5.84}$  个病毒量);最小免疫量为 0.001ml/羽;安全剂量为 0.1ml/羽。

### 2.2 IB H<sub>120</sub> 细胞苗免疫效果及有关性能指标测定

2.2.1 应用 IB H<sub>120</sub>—C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>6</sub> 三个不同代次的细胞毒制备了三批疫苗,均以 1 个免疫剂量分别饮水免疫 4~12 日龄雏鸡,且于免疫后 17d、32d、10d 以标准强毒 IB M<sub>41</sub> 攻击(均设同日龄非免疫雏为对照)。结果(表 4)表明:三个不同代次细胞苗虽然均具有较为理想的免疫效果,但随着细胞毒的传代,其免疫效果似有逐步下降趋势。

表 2 IBH<sub>120</sub>细胞毒安全性测定

项 目	细 胞 代 次								
		C <sub>3</sub>			C <sub>4</sub>			C <sub>6</sub>	
雏鸡日龄(d)		4			8			12	
接毒剂量(ml)	0.01	0.05	0.1	0.01	0.05	0.1	0.01	0.05	0.1
接毒雏数(只)	15	18	15	35	20	10	25	25	10
观察 15d 安全	15	18	14	35	20	9	25	25	10
结果 反应	0	0	1	0	0	1	0	0	0
死亡	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 3 IB H<sub>120</sub>细胞毒有效保护量测定

细胞代次 (C)	接毒剂量 (ml/羽)	接毒雏		观察时间 (d)	攻毒后发病比例		有效保护率* (%)
		日龄	数量		试验组	对照组	
C <sub>3</sub>	0.001	4	10	14	1/10	8/10	87.5
	0.005	4	15	14	2/15	8/10	83.3
	0.010	4	10	14	0/10	8/10	100.0
C <sub>4</sub>	0.001	8	10	10	2/10	8/10	75.0
	0.005	8	10	10	1/10	8/10	87.5
	0.010	8	10	10	1/10	8/10	87.5

\* 保护率=(A×B-C)/A×B,A 为试验组鸡数,B 为对照组发病比例,C 为试验组发病鸡数

表 4 IB H<sub>120</sub>细胞苗免疫效果测试

细胞代次 (C)	免疫雏		攻毒雏		发病比例		免疫保护率 (%)
	日龄	数量	日龄	免疫后天数	免疫组	对照组	
C <sub>3</sub>	4	38	21	17	3/38	7/10	88.7
C <sub>4</sub>	8	60	40	32	6/60	8/10	87.5
C <sub>6</sub>	12	60	22	10	6/60	7/10	85.7

2.2.2 将 IB H<sub>120</sub>细胞苗以一个免疫剂量口服免疫 10 日龄雏鸡,分别于免疫后 7、10、17、30、60d 随机取雏,以标准强毒攻击(均设同日龄非免疫雏为对照)。结果(表 5)表明,IB H<sub>120</sub>细胞苗在免疫后 7d 产生免疫力,10~17d 达到高峰期,免疫期可维持 2 个月。

2.2.3 将保存于 4℃1 个月和-20℃6 个月的 IB H<sub>120</sub>细胞苗,按常规免疫雏鸡各 10 只,15d 后用 IB M<sub>41</sub>强毒攻击,其结果两组免疫雏抗强毒攻击的免疫保护率均为 88.8%。表明 IB H<sub>120</sub>细胞苗在 4℃保存 1 个月或-20℃保存半年仍保持良好的免疫原性。

2.2.4 IB H<sub>120</sub>细胞苗区试效力测定 IB H<sub>120</sub>细胞苗在通过实验室安检和效力测试的基础上,先后选择在焦作市、鹤壁市、等单位鸡场免疫 5~16 日龄雏鸡约 11000 余只,免疫后仅有 1%的雏鸡出现一过性的轻度呼吸症状外,其它均无不良反应和死亡现象,免疫后 16~30d 由用户随机取雏 16 只送检攻毒,观察 10~15d,结果全部得到保护。此后,郑州市郊区、禹州等 80 多个单位推广应用此苗,共免疫雏鸡近 40 万只,均表明此细胞苗安全性能良好,免疫效果确实。

表5 IB H<sub>120</sub>细胞苗免疫产生期及免疫期测定

免疫后 天数	攻毒 鸡数	攻毒后发病比例		免疫保护率 (%)
		免疫组	对照组	
7	15	2/15	4/5	83.3
10	20	2/20	4/5	87.5
17	38	3/38	7/10	88.7
32	30	3/30	8/10	87.5
60	10	1/10	4/5	87.5

### 3 小结与讨论

IB H<sub>120</sub>鸡胚组织毒接种于鸡全胚细胞后,能明显地观察到细胞皱缩、变圆、融合等一系列细胞病变。所收获的细胞各代毒经毒价测定证实其 IB H<sub>120</sub>毒的存在,且自第3代起至第10代的细胞毒毒价均在  $10^{-6.0}/0.1\text{ml}$  以上,符合部颁规程中关于 IB H<sub>120</sub>鸡胚组织毒种毒及苗毒的毒价标准和要求。

通过 IB H<sub>120</sub>各代次细胞毒(C)的细胞病变观察及毒价测定,表明 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 细胞适应毒多在 48h 左右收毒,且细胞病变明显、稳定,毒价均在  $10^{-6.8}/0.1\text{ml}$  以上,适宜于用作 IB H<sub>120</sub>细胞苗种毒。自 C<sub>6</sub> 代起,收毒时间延长,毒价也似有下降趋势,这与用不同代次细胞毒制备成苗后的免疫试验结果基本吻合,故而细胞苗的制备以 C<sub>4</sub> 至 C<sub>5</sub> 代次为宜。

IB H<sub>120</sub>细胞苗通过室内外近 40 万头份雏鸡免疫试验表明:该苗安全性能良好,仅有极个别雏鸡在免疫后 3d 内出现一过性轻度呼吸症状,无其它任何不良反应;7d 后产生免疫力,免疫效果确切,免疫期可保持 2 个月,平均保护率在 87% 以上,最小免疫量为 0.001ml;疫苗可在 4℃ 保存 1 个月, -20℃ 保存半年;其它有关数据还有待于进一步充实。

### 参 考 文 献

- 1 中华人民共和国农牧渔业部. 兽医生物制品制造及检验规程(第五次修订本), 1985, 467~470
- 2 Silim A et al. A simple technique for preparation of chicken-embryo-skin cell cultures. Avian Diseases, 1982, 26(1): 182~185

## A Study on Attenuated Cell-culture Vaccine of Avian Infectious Bronchitis H<sub>120</sub> Virus

Liu Wenhui Hu Yuji Cao Chunjing  
Xiao Zhijun Zhao Jinwang

(Animal Science and Veterinary Medicine Institute,  
Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou)

**Abstract** The attenuated cell-culture vaccine of avian infectious bronchitis H<sub>120</sub> virus was successfully prepared. Immune trials carried out in nearly 400 thousand chicks with the vaccine in and out of the laboratory indicated that the immunity was obtained in 4 to 12 day-old chicks 7 days after vaccination at a dose of 0.01 ml each by the way of nasaldrop, eyedrop or drinking-water, and that the protection rates of 88.7%, 87.5% and 87.5% were respectively provided for the chicks, which were inoculated for 17, 32 and 60 days, while they were challenged with the standard virulent IBV. The immune protection period of the vaccine for chicken was two months. No harmful effect was observed in the 4 to 12 days-old chicks within 15 days after inoculation with 10 immune doses of the vaccine. The minimum immune dose of the vaccine is 0.001 ml per chick. The vaccine is stored at -20°C for half a year or at 4°C for one month and the effect is not weakened.

**Key words:** Avian infectious bronchitis; H<sub>120</sub> virus; Vaccine; Whole-chicken-embryo cell culture