

鸡传染性喉气管炎(ILT)病毒弱毒 G80株的免疫原性*

郭 培 宣

(牧医系)

提 要

从广州市郊鸡场分离出一株ILT病毒,暂定名为G₈₀株。经CAM(鸡胚绒毛尿膜)和CEKC(鸡胚肾单层细胞)连续传13代之后,对鸡的毒力已减弱,以此减弱毒株经鼻眼途径免疫鸡只,每鸡接种0.3ml,测得其最大安全浓度(LD—O·max)为 $10^{4.95}$ EID₅₀/0.2ml以上,获得100%保护的最小有效浓度处于 $10^{3.25}$ 和 $10^{3.75}$ EID₅₀/0.2ml之间(相当于最大安全浓度的1/28~1/15),取不致引起任何临床反应的浓度 $10^{2.25}$ EID₅₀/0.2ml(相当于最大安全浓度的1/500)对鸡免疫,保护率为16/21(76%)。免疫发生期短于4天,能产生同居感染和接触免疫,但不会引起ILT的临床症状。经鸡体连续通过5代证明毒力稳定。本弱毒株可进一步进行其它有关试验和大田试验,以评价其作为疫苗的使用价值。

引 言

鸡传染性喉气管炎(ILT)在国外流行相当广泛,对养鸡业的危害性较大。近年来,国内也相继报道发生此病。国外ILT疫苗的研究已有四十多年的历史^[2-9]。但国内研究尚少。本研究包括ILT病毒的分离、鉴定、诱变减毒,最后测定其免疫原性,作为创制弱毒疫苗的初步工作。

材 料 和 方 法

(一) 种毒的分离 从广州市郊竹料食出鸡场ILT患鸡中,采集气管分泌物,用生理盐水稀释,用五号玻璃滤器过滤除菌,然后接种于鸡胚的CAM上,孵化四天后收集出现痘斑和水肿的CAM作为种毒,继续同样传代,此种毒暂定名为G₈₀株。

(二) 种毒的鉴定

1. 将分离到的病毒在鸡胚上传代,每一代都观察CAM的病变^[14]。

*本研究是在欧守杼教授的指导下完成的。在试验过程中承蒙本系禽病教研室提供Vineland擦肛强毒疫苗;植保系冯志新副教授和稽阳火老师帮助摄制照片;广东省生物药厂协作细胞培养,一并致谢。

2. 种毒回接试验: 取第1代(指在鸡胚和CEKC上的连续代数, 下同)有痘斑出现的CAM研磨, 以生理盐水作10倍稀释, 加入青链霉素, 离心, 取上清液经眶下窦接种30天龄的白洛克鸡3只, 每只0.2ml, 观察接种后出现的症状^[14]。

3. 将第10代种毒接种于CEKC中^[1], 培养一定时间后测定病毒毒价, 同时又采用飞片法制备标本, 以Bouin液固定, HE染色, 观察病毒引起的细胞病变^[12]。

4. 保护试验: 将第10代种毒经眶下窦接种六十天龄白洛克鸡, 将出现症状后康复的鸡8只和同日龄的对照鸡8只, 同时用Vineland擦肛强毒(美国威兰大药厂Vineland Laboratories INC, New Jersey 的擦肛强毒疫苗)进行攻击(方法见6), 以测定其保护情况。

(三) 减弱毒力的方法 将分离出来的病毒以鸡胚CAM途径连续传代, 孵育温度35°C。经9代后, 转到CEKC中传2代又回到鸡胚传2代, 共13代。以下各项试验, 除特别说明者外, 所用种毒皆为G₈₀第13代。

(四) 与强毒毒力的比较 将同群的四十六天龄新汉×三黄杂交鸡16只, 分成二组, 一组接种Vineland擦肛强毒, 一组接种G₈₀株, 毒价都为 $10^{4.25}$ EID₅₀/0.2ml, 每鸡气管接种0.1ml。接种后分笼饲养。

(五) 免疫途径 本文除特别说明者外, 皆采用以下方法: 将感染ILT病毒的CAM充分研磨, 以生理盐水稀释成一定浓度, 每ml加入青链霉素各1000单位, 每鸡接种0.3ml, 平均滴于双眼和两侧鼻孔。

(六) 攻毒方法 本文除特别说明者外, 皆采用以下方法: 以Vineland公司擦肛强毒苗, 按Reed—Muech两氏法测定ID₅₀, 每鸡气管接种0.1ml毒价为 $10^{1.5}$ ID₅₀/0.1ml的稀释液, 试验鸡与同群对照鸡攻毒方法相同。接种后分笼饲养。

(七) 最大安全剂量(LD—o·max·)和最小有效剂量的测定 采用滴眼和滴鼻的途径免疫, 只能从浓度(病毒毒价)方面来测定。将四十六天龄的新汉×三黄杂交鸡分成6组, 将毒价为 $10^{5.25}$ EID₅₀/1.2ml的CAM作1:2、1:32、1:100、1:1,000、1:10,000稀释, 每一稀释度接种一组, 每组只数见表2, 于第九天攻以强毒。另将五十天龄的白洛克31只, 经鼻眼途径接种1:10的上述稀释液, 每只0.1ml, 以此作安全性试验。

(八) 免疫力的测定 采用不同品种, 不同年龄, 来自不同鸡场的鸡, 以不同浓度进行免疫和攻毒, 同时设立对照组。不同处理的鸡分笼饲养, 但都置于同一房间(见结果(四), 表3)。

(九) 稳定性试验 取健康的50天龄新汉×三黄杂交鸡2只, 按上述方法接种第13代弱毒, 第三天以棉拭子从2只鸡(活体)气管蘸取分泌物, 混合后用生理盐水作10倍稀释, 加入青链霉素(1000u/ml)接种于另2只健康鸡, 如此共传5代, 取第5代气管分泌物用青链霉素处理后以CAM途径接种于10天龄鸡胚13只, 4天后收毒, 观察鸡胚CAM上的病变。

(十) 免疫发生期试验 取五十天龄新汉×三黄杂交鸡12只, 分成三组, 每组4只, 同时接种G₈₀弱毒, 浓度为 $10^{4.25}$ EID₅₀/0.2ml。各组分别于第四、第六、第八天攻毒。

(十一) 同居感染试验和接触免疫 分二种情况进行试验:

1. 接种三十六天龄白洛克 7 只, 放入同批的不接种的鸡 3 只饲养于同一栏内, 观察二十八天后攻以 $10^{2.25} \text{ID}_{50} / 0.1 \text{ml}$ 的强毒, 并设立对照组。

2. 将接种疫苗后出现反应, 有咳嗽症状的鸡 2 只, 投入一群健康鸡中 (10 只四十六天龄白洛克) 一起饲养, 一个月内观察健康鸡是否出现 ILT 的临床症状。

结 果

(一) 种毒的鉴定

1. 在 CAM 上的病变: 天然发病的病鸡气管分泌物接种于 CAM 后, 第 1 代 7 只鸡胚的 CAM 均有 3~5 个分散的灰白色粟粒大坏死点 (痘斑), 坏死点周围的膜水肿增厚如荔枝肉状。第 2~4 代的 CAM 病变与第 1 代相似。传至第 5 代, CAM 的病变更明显。第 6 代以后, 接种的鸡胚 CAM 上痘斑融合成小岛状, 有时如蛛网状 (图 1), 以高浓度 (将 CAM 作 1:10 稀释) 接种, 可见到人工气室处的 CAM 成片状坏死, 整个 CAM 高度水肿, 病毒毒价达到 $10^{5.25} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$ 。整个传代的过程, ILT 病毒在五天内不致死鸡胚。这种病变与 Tripathy 和 Hanson 的描述基本相符^[14]。

2. 种毒回接试验: 接种第一代种毒后的 3 只鸡, 第三至四天都出现张口呼吸, 引颈短咳 (图 2), 第六天后咽喉部充血出现干酪样分泌物, 与 ILT 的症状相符^[14]。

3. 对 CEKC 的感染情况: 接种病毒后第 40 小时, 细胞与细胞之间的界限模糊 (图 3、5) 并可见到融合细胞, 在上皮样细胞核内, 可见到细胞核内包涵体。由于第 40 小时包涵体已充分发展^[12], 占据了整个细胞核, 核仁被迫到边缘。培养至 46 小时以后细胞逐渐脱落。第一批 40 小时收毒, 测得其毒价为 $10^{4.55} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$, 第二批接毒后 46 小时收毒, 毒价为 $10^{4.33} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$, 这与 Mayer 的报道相似^[10]。

4. 保护试验: 接种 G₈₀ 株出现症状后康复的鸡, 经 Vineland 强毒攻击, 8 只皆无任何可见临床反应。对照 8 只接种后四天出现张口呼吸, 引颈短咳, 第六至八天因干酪样分泌物阻塞呼吸道而窒息死亡。

(二) 本弱毒株 (第 13 代) 与强毒株毒力的比较 从表 1 可以看出, 其毒力弱于 Vineland 擦肛强毒。

(三) 最大安全剂量 (LD—o·max) 和最小有效剂量的测定 本弱毒株接种后

没发生过死亡的现象, 表 2 所指的轻度反应为偶尔见到咳嗽或张口呼吸, 但食欲正常, 反应现象一至二天就消失。从表 2 可以看出, LD—o·max 在 $10^{4.85} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$ 以上, 获得 100% 保护的最小有效浓度处于 $10^{3.25}$ 和 $10^{3.75} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$ 之间 (最大安全剂量的 1/28~1/15)。

试验的品种 (表 2) 是四十六天龄新汉×三黄杂交鸡。对于五十天龄的白洛克, 接种毒

表 1 G₈₀ 株和 Vineland 擦肛强毒株毒力的比较

毒 株	接种只数	反 应 情 况			
		轻度反应	严重反应	死亡	不见反应
G ₈₀	8	4		1	3
Vineland	8		1	7	

表 2

最大安全剂量和最小有效剂量的测定*

病 毒 稀 释 度	毒 价 (EID ₅₀ /0.2ml)	轻反应只数/ 接种只数	死亡只数/ 接种只数	发病只数/ 攻毒只数	攻毒后 发病率(%)	保护率 (%)
10 ^{-0.3} (1:2)	10 ^{4.95}	2/4	0/4	0/4	0	100
10 ^{-0.9} (1:8)	10 ^{4.35}	3/8	0/8	0/8	0	100
10 ^{-1.5} (1:32)	10 ^{3.75}	1/4	0/4	0/4	0	100
10 ⁻² (1:100)	10 ^{3.25}	2/14	0/14	1/11	9	91
10 ⁻³ (1:1000)	10 ^{2.25}	0/24	0/24	5/21	24	76
10 ⁻⁴ (1:10000)	10 ^{1.25}	0/8	0/8	2/8	25	75
对 照 组				5/6	83	17

*三次重复试验合计,各组的只数不相等。

价为10^{4.25}EID₅₀/0.2ml的溶液后,31只仅有2只发生轻度反应。

(四) 免疫力的测定 表3是G₈₀株免疫效果试验。当接种的病毒毒价为102.25 EID₅₀/0.2ml(最大安全量的1/500)时,不产生任何临床反应,其保护率为16/21(76%),当接种的病毒毒价为10^{3.25}EID₅₀/0.2ml以上时,接种后有轻度反应但不引起死亡,保护率为30/30(100%)。

(五) 稳定性试验 本病毒经鸡体连续通过5代,每代2只共10只以测定其稳定性。5代10只鸡都没有发生可见的临床反应。用第5代的气管分泌物接种鸡胚13只,第四天CAM出现了ILT病毒引起的典型病变,说明病毒已在5代鸡中通过。至少每代2只鸡中有一只受感染。

以上试验证明,ILT病毒经鸡体连续通过5代,毒力不会增强。

(六) 免疫发生期试验 右表为免疫发生期试验的结果,从表中可以看出,接种本弱毒后第四天就得到完全保护。

(七) 同居感染试验和接触免疫

1. 在本项试验中,3只没有接种过弱毒的鸡与7只接种过弱毒的鸡同笼饲养,经二十八天观察,3只没接种过的鸡没发生任何ILT症状。二十八天后攻毒100%保护,说明本毒株能引起同居感染和接触免疫,但不会导致ILT的临床症状。

2. 接种弱毒后出现反应的鸡投入健康鸡群中一起饲养,健康鸡并不会产生可见反应。

表 4 G₈₀株的免疫发生期

组 别	试验数 (只)	攻毒时间	保护只数/攻毒只数
1	4	第4天	4/4
2	4	第6天	4/4
3	4	第8天	4/4
对照组	6		1/6

表 3 弱 毒 G₈₀ 株 的 免 疫 效 果*

批 次		试验 鸡品种	日 龄	接 种 情 况		攻 毒 情 况		
				毒 价 (EID ₅₀ /0.2ml)	接种只数	接种后 天 数	保护(只)/攻毒(只)	保护率 (%)
1	试验	白 洛 克	56	10 ^{4.25}	4	12	4/4	100
	对照						3/4	75
2	试验	白 洛 克	36	10 ^{4.25}	7	28	6/6	100
	对照						0/4	0
3	试验	新 汉 × 三 黄 杂 交 鸡	56	10 ^{4.95}	4	8	4/4	100
	对照						1/6	17
4	试验		60	10 ^{4.25}	8	4—6	8/8	100
	对照						1/4	25
5	试验		56	10 ^{4.35}	4	8	4/4	100
	对照						1/6	17
6	试验		56	10 ^{3.75}	4	8	4/4	100
	对照						1/6	17
7	试验		46	10 ^{3.25}	11	8	10/11	91
	对照						1/6	17
8	试验		50	10 ^{2.25}	21	8	16/21	76
	对照						1/6	17
9	试验		50	10 ^{1.25}	8	8	6/8	75
	对照						1/6	17

* 1. 第一批的攻毒途径为滴眼滴鼻, 其余各批都是气管注射。2. 保护指不出现任何可见的临床反应。

讨 论

安全性是决定弱毒疫苗使用价值的重要因素之一。从本毒株试验的结果来看, 接种后会有一定程度的反应, 但反应极轻微, 一至二天就消失, 没发现引起死亡的现象。若用鸡胚和细胞继续传代, 毒力可能还会继续减弱。但免疫原性与毒力往往是正相关。Alls的试验表明, 接种ILT弱毒疫苗后有反应的鸡群保护率可达到100%, 而接种后没有反应的鸡群其保护率都没有超过60%^[2]。本毒株取其10^{2.25}EID₅₀/0.2ml的浓度接种, 没有发生任何临床反应, 保护率仍可达到76%。说明其安全性符合实际应用的要求。

本弱毒株的免疫性能良好。当毒价达到 $10^{3.75} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$ 或在此毒价以上, 每鸡接种 0.3ml 后可获得100%的保护, 即使以 $10^{1.25} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$ 的毒价接种, 保护率也可达到6/8 (75%)。 (本毒株在CAM上生长的毒价一般可达到 $10^{5.25} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$, $10^{1.25} \text{EID}_{50} / 0.2 \text{ml}$ 相当于将鸡胚膜作10,000倍稀释。)

“不传染性”是对合格的疫苗的基本要求之一, 但对家禽来说, 只要不会招致所要预防的那种病的明显症状, 同居感染所产生的接触免疫有时是受欢迎的, 因为可以节省免疫接种时的劳力和材料, 或者补救漏接个体。本毒株能产生接触免疫, 但不会招致ILT病的发生。故此, 这种同居感染并不会降低其作为疫苗的使用价值。其它研究者也证明ILT弱毒疫苗存在接触免疫的现象^[2]。

ILT的早期保护作用已得到多数研究者的证实。本毒株接种后四天就能得到完全保护, 这种快速的保护作用至今还未得到较为满意的解释, 单纯抗体的作用不可能那么快速。是否是与病毒的干扰作用有关, 还有待探讨。Robertson 1977年将一天龄的鸡切除腔上囊, 同时结合环磷酸胺处理, 来抑制鸡的体液免疫系统, 经过这样处理后的鸡仍能产生抗ILT免疫, 说明细胞免疫机制在鸡抗ILT免疫过程中起重要作用^[13]。不管其机制如何, 由于这种早期的保护作用的存在, 当发现本病流行时, 用弱毒疫苗作紧急预防注射, 会收到良好的效果。

本弱毒株要培育成能应用于生产的疫苗, 尚有以下项目需要进行试验: 1. 免疫期; 2. 疫苗保存期; 3. 最适免疫日龄; 4. 是否能经得起不同毒株的强毒的攻击。本试验只是实验室数据, 有待进行生产试验以评价其作为疫苗的使用价值。

参 考 文 献

- [1] 郭培宣, 1982, 鸡传染性喉气管炎 (ILT) 兔源高免血清双向琼脂扩散试验, 《中国兽医杂志》8 (7): 18。
- [2] Alls, A.A., J.R. Ipson, and W. D. Vaugham, 1969, Studies on the ocular infectious laryngotracheitis vaccine. Avian Dis., 13: 36—45.
- [3] Babkin, V.F., M.T. Prokofeva, and Z.P. Naumets, 1973, Results of aerosol immunization against avian infectious laryngotracheitis. Veterinariya, Moscow, NO. 6: 38—40 (Vet. Bull., 1973, 43: NO. 5547).
- [4] Beach, J. R., O. W. Schalm, and R. E. Lubbehusen, 1934, Immunization against infectious laryngotracheitis of chickens by intrabursal injection of virus. Poult. Sci., 13: 218—226.
- [5] Beaudette, F. R., and C.B. Hudson, 1933, Experiments on immunization against laryngotracheitis in fowls. J. Am. Vet. Med. Assoc., 82: 460—476.
- [6] Churchill, A.E., 1965, The development of a live attenuated infectious laryngotracheitis vaccine. Vet. Rec., 77: 1227—1233.
- [7] Gelenczei, E.F., and E.W. Marty, 1964, Studies on a tissue-culture-modified infectious laryngotracheitis virus. Avian Dis., 8: 105—122.

- [8] Gilchrist, P. J., 1962, Avian respiratory diseases. Aust. Vet. J., 38 : 495—499.
- [9] Hayles, L. B., 1976, Laryngotracheitis vaccine in the drinking water. Canadian J. of comparative medicine, 40(2): 129—134. (Vet. Bull. 1976, NO. 4401)
- [10] Mayer, V. M., F. M. Hetrick, W. D. Keenum, and H. M. DeVolt, 1967, Replication of infectious laryngotracheitis virus in chicken kidney culture. Am. J. Vet. Res., 28, 825—832.
- [11] Pulsford, M. F., H. V. Chamberlin, and J. Topham, 1956, A preliminary note on laryngotracheitis vaccination with virus of low virulence. Aust. Vet. J., 32: 138—141 (Vet. Bull. 1956, 26 : NO. 3503).
- [12] Reynolds, H. A., A. M. Watrach, and L. E. Hanson, 1968, Development of the nuclear inclusion bodies of infectious laryngotracheitis. Avian Dis., 12 : 332—347.
- [13] Robertson, G. M., 1977, The role of bursa-dependent responses in immunity to infectious laryngotracheitis. Res. Vet. Sci., 22(3) : 281—284.
- [14] Tripathy, D. N., and L. E. Hanson, 1975, Laryngo-tracheitis. In : "Isolation and Identification of Avian Pathogens." Am. Assoc. Avian Path., Ithaca, N. Y., P. 227.

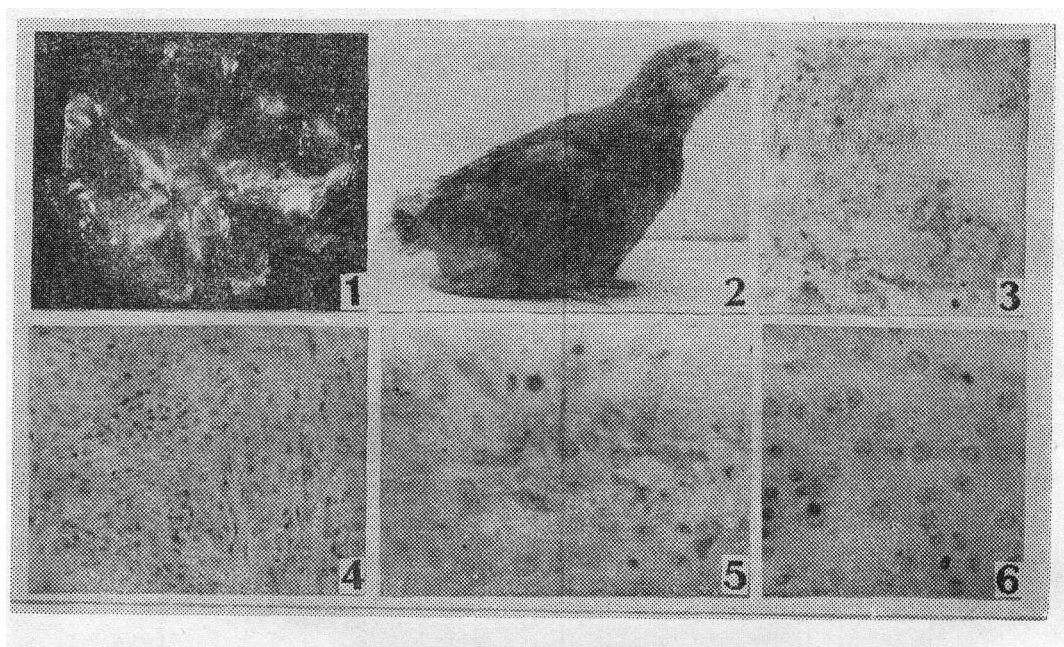
IMMUNOGENICITY OF ATTENUATED G₈₀ STRAIN OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS (ILT) VIRUS

Guo Peixuan

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine)

ABSTRACT

A strain of ILT virus, named as G₈₀ temporarily, was isolated from a farm in a Guangzhou suburb. Its virulence for chickens was reduced after 13 serial passages through CAM and CEKC. The minimum dose (0.3ml per chicken by ocular-nasal inoculation) for 100% protection was determined to be between $10^{3.25}$ and $10^{3.75}$ EID₅₀/0.2ml (1/28—1/15 maximum safety dose), and the maximum safety dose (LD_{0.05}), above $10^{4.95}$ EID₅₀/0.2ml. The dose of $10^{2.25}$ EID₅₀/0.2ml (1/500 maximum safety dose), by which no clinical reaction was induced, could induce 76% protection. After inoculation, immunity came into effect within 4 days. Contact spread and contact immunity induced by the virus took place but without any clinical symptoms of ILT. Reversion test through serial passages in chicken showed that attenuated virus was stable. However, field trials should be made in order to evaluate the virus as a vaccine.



附 图 说 明

1. G_{80} 株引起的鸡胚CAM病变,可见到白色的痘斑。
2. 种毒回鸡后表现的症状——张口呼吸、引颈短咳。
3. 接 G_{80} 株40小时后的鸡胚肾单层细胞病变,细胞间隔模糊,上皮细胞的核仁被 Cowdry type A 核内包涵体迫到核的边缘, $\times 500$ 。
4. 与图3同一批的正常鸡胚肾单层细胞对照,细胞间隔清楚, $\times 500$ 。
5. 接 G_{80} 株40小时后的鸡胚肾单层细胞上皮细胞核,由于核内包涵体的形成,核仁被迫到核的边缘, $\times 1000$ 。
6. 与图5同一批的无接毒的上皮细胞核,核仁随机分布于核内, $\times 1000$ 。