

抗鸡法氏囊病和新城疫 高免蛋黄液的研制与应用 *

刘镇明 辛朝安 邓润霞 郑十妹
(兽医系)

许江河
(广州市二商局鸡场)

摘要 本文报道了用鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV) 和新城疫病毒 (NDV) 经多次、高度免疫的健康蛋鸡, 从其所生产的蛋中, 提取蛋黄, 制成抗 IBDV 和 NDV 二联高免蛋黄液。其抗 NDV 的 HI 抗体和抗 IBDV 的中和抗体、沉淀抗体均达到较高的水平。经室内人工发病治疗试验及大田生产应用证明: 鸡只注射二联高免蛋黄液之后, 在短时间内对 IBD 及 ND 有预防作用; 对刚发病的鸡群, 及时用其注射治疗, 效果显著。

关键词 蛋黄抗体; ND-IBD 二联抗体

鸡新城疫 (ND) 和传染性法氏囊病 (IBD) 都是危害性较大的病毒性疾病^[7], 由于 (IBD) 能引起鸡的免疫抑制^[8,9], 所以鸡群在感染此病后常发生合并症或继发 ND^[4]。目前, 虽已有预防这两种病的疫苗, 但由于种种原因, 仍有不少鸡群因感染 IBD 和 ND 而造成一定的经济损失。为了更有效地预防和控制这两种疾病, 自 1988 年初开始研制了抗 IBD 和 ND 双价高免蛋黄液。现将这种蛋黄液的制备过程及使用情况的有关资料报告如下。

1 材料与方法

1.1 蛋鸡的强化免疫^[10]

将临开产的健康蛋鸡, 分别肌注 IBD 和 ND 弱毒疫苗及灭活乳化疫苗, 每隔 10 d 1 次, 共注射 3 次。每次的注射量均比上一次递增, 第 3 次则用含 IBD 强毒的组织制成的灭活乳化苗^[6]。每次注射前及第 3 次注射后 20 d 都随机采 12 只鸡血和 4 枚蛋, 作 ND 的 HI 试验和 IBDV 中和试验。

1.2 免疫鸡血清、蛋黄的 ND、HI 试验

参照《鸡新城疫血凝抑制 (HI) 抗体研究》的方法^[1]。

1.3 免疫鸡血清、蛋黄的 IBDV 中和试验

参照《鸡传染性囊病微量血清中和试验》的方法^[3]。

1.4 IBD 琼脂扩散试验

参照《琼脂扩散试验》的方法^[2]。取经第 3 次免疫后 20 d、65 d 的鸡血清各 10 份, 蛋各 10 枚, 分别以进行倍比稀释, 作琼脂扩散试验。

* 兽医专业 84 级学生甘子龙、陈廷耀; 85 级学生李培林、苏琳等均参与部分试验工作。

本文获 1990 年广东省家禽研究会第三届年会优秀论文奖

1991-04-05 收稿

1.5 病理组织材料

分别采取正常对照、攻毒对照及攻毒并经免疫蛋黄液治疗的鸡只的法氏囊, 10%甲醛溶液固定, 常规石蜡切片, 苏木精伊红染色, 镜检。

1.6 高免蛋黄液的制作

1.6.1 取经第3次免疫接种后20 d的鸡蛋, 用1%新洁而灭洗涤蛋壳, 然后打开蛋壳将蛋黄取出, 置捣碎机内, 加入青霉素和链霉素(使每毫升蛋黄液成品内各含5 000国际单位), 以12 000 r/min捣碎1 min, 然后加入等量灭菌生理盐水, 混匀。分装成每瓶500 ml即为成品。置4~8℃保存备用。

1.6.2 无菌检查 取制备好的蛋黄液成品0.5 ml分别接种普通琼脂及肉汤培养基, 置37℃培养48 h, 观察细菌生长情况。

1.6.3 安全检验 取20 d龄AA鸡15只, 分3组, 每组各注射蛋黄液成品2 ml/只, 4 ml/只和6 ml/只; 另以每只2 ml, 5 ml各注射25 d龄石岐杂鸡10只。注射后继续饲养10 d, 观察有无异常反应。

1.7 高免蛋黄液的免疫保护试验^[5]

1.7.1 体外抗IBDV中和试验

(1) 将IBD强毒(澳大利亚株, 由广州动植物检疫所提供, LD_{50} 为 $10^{-4.5} \times 0.2$ ml)稀释成每0.2 ml含3.2万 LD_{50} 。

(2) 取上述蛋黄液成品用生理盐水配成1:10, 1:20, 1:40的稀释蛋黄液。

(3) 病毒与高免蛋黄液的中和反应 取不同稀释度的蛋黄液, 按每毫升加入3.2万 LD_{50} 的IBDV配制成蛋黄—强毒液, 充分混匀后, 室温感作1 h。

(4) 对IBDV中和结果检验 取35 d龄海兰鸡(未接种任何疫苗)30只, 分成6组, 每组5只。第1组至第4组每只分别口服1:2, 1:10, 1:20, 1:40蛋黄—强毒中和液1.2 ml; 第5组每只口服3.2万 LD_{50} 强毒液, 作为对照组; 第6组不作任何处理, 隔离饲养, 作为正常对照鸡。分别观察上述各组鸡的精神状态, 并于攻毒后第60 h每组扑杀2只, 检查法氏囊的肉眼病变并作病理切片, 镜下观察组织学变化。

1.7.2 体内抗IBDV中和试验

(1) IBDV强毒和蛋黄液的稀释方法与上述体外中和试验相同。

(2) 鸡体保护试验 取35 d龄海兰鸡42只, 分7组, 每组6只。第1, 3, 5组每只肌注1:2蛋黄液1 ml; 第2, 4组每只肌注1:10蛋黄液1 ml; 第1, 2组均在注射蛋黄液时攻毒; 第3, 4组则于注射蛋黄液后24 h攻毒; 第5组于注射蛋黄液前24 h攻毒; 第6组为攻毒对照; 第7组为正常对照。攻毒后观察方法均与1.7.1.(4)相同。

1.8 注射高免蛋黄液后的免疫保护期测定

分两次进行, 第1次取30 d龄海兰鸡4只分两组, 一组注射蛋黄液成品2 ml/只, 另一组作攻毒对照。注射蛋黄液15 d后连同对照组一起攻毒, 观察10 d。第2次取30 d龄海兰鸡40只, 分成10组, 每组4只, 分别注射蛋黄液成品1 ml/只或2 ml/只, 每隔4 d注射两组, 最后, 当各组鸡于注射蛋黄液后的时间分别为2 d, 6 d, 10 d, 14 d时连同对照鸡一起攻毒; 另设正常对照组。攻毒后观察方法与体外抗IBDV中和试验相同。

1.9 抗NDV鸡体保护试验

分两批试验, 第一批取50 d龄海兰鸡25只(该鸡1 d龄时曾用ND I系疫苗滴眼免

疫),试验前逐只抽血测定其ND的HI价。随机分成3组,试验组每组9只,对照组7只。ND强毒采用中监所提供的E₆F₂强毒株,再通过鸡胚二代,稀释成1:1000,每鸡肌注1 ml。试验组1于攻毒同时每只鸡注射高免蛋黄液成品2 ml,试验组2则于攻毒后24 h注射。攻毒后观察14 d,剖检并记录死亡鸡只。第2批取30 d龄石岐杂鸡15只(未接种过任何疫苗),随机分为3组,每组5只,除攻毒量以1:10 000稀释,每只鸡肌注0.5 ml外,其余方法均与第1批相同。

1.10 生产使用情况

根据室内试验的效果,在广东省、广西等地的一些养鸡专业户及鸡场,对产品进行了大规模的大田使用检验,两年来,总共使用了1 100多万只份。

2 结果

2.1 免疫接种后蛋鸡血清、蛋黄的NDHI水平在每次免疫接种后,血清及蛋黄的NDHI价均有所升高,第3次免疫接种后第20 d,血清的HI价平均值为13.99Log₂,蛋黄为13.45log₂(详见图1)。

2.2 免疫后蛋鸡血清抗IBDV的中和抗体水平经第2次免疫接种后10 d,血清抗IBDV中和抗体滴度平均为13.98Log₂,经第3次疫后20 d,平均滴度可达15.74Log₂(详见图2)。

2.3 经3次免疫后20 d,血清及蛋黄抗IBDV的琼扩试验表明:血清沉淀抗体几何平均数为7.10Log₂;蛋黄为6.19Log₂。第3次免疫后65 d,血清沉淀抗体为6Log₂,蛋黄为5Log₂(详见图3)。

2.4 蛋黄液成品接种的培养基均无菌生长。

2.5 蛋黄液的安全检验,试验鸡在注射大剂量的蛋黄液后2~5 h见个别鸡只精神稍沉郁,但很快恢复正常,没有出现反应死亡。

2.6 体外中和试验结果,口服1:2稀释的蛋黄—强毒液试验鸡,精神状态良好,扑杀

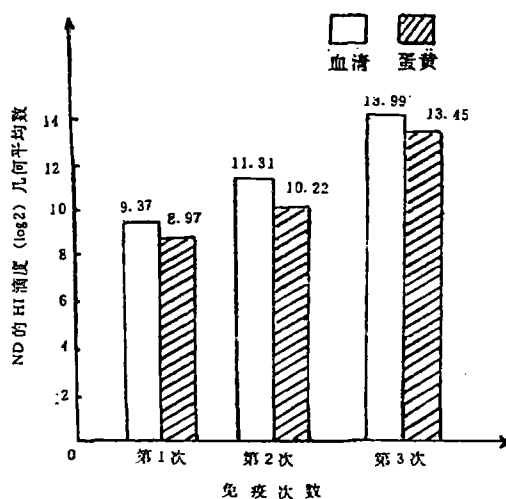


图1 免疫蛋鸡血清蛋黄的NDHI抗体水平

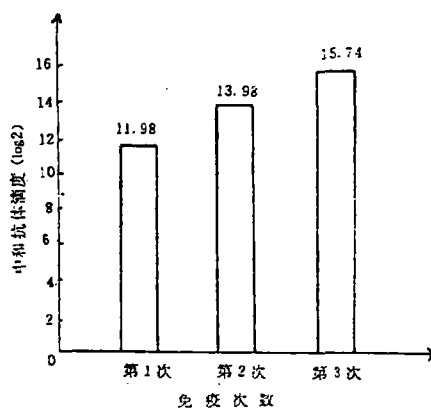


图2 免疫鸡血清抗IBDV的中和抗体水平

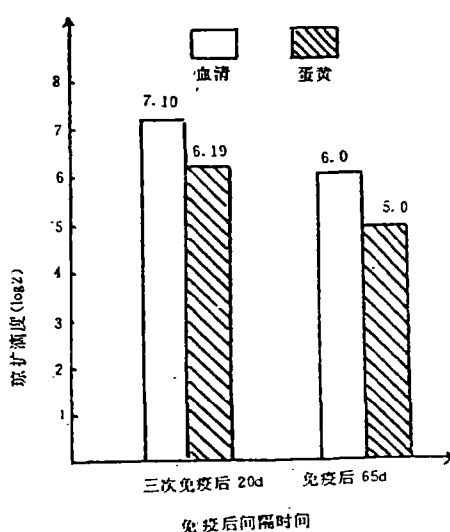


图3 IBD琼脂扩散试验

的鸡只未见肉眼及组织学变化；口服更高倍稀释的蛋黄—强毒液，部分法氏囊有肉眼及组织学病变（详见表 1 和图版 3，4）。

2.7 体内中和试验结果 攻毒对照组全部出现明显病状，死亡 2 只；健康对照组全部正常；第 1，2 组除个别精神稍差外，其余良好；第 3，4 组精神状况一直良好；第 5 组除 2 只精神稍差外，其余良好。扑杀的鸡只，攻毒对照组法氏囊病变严重，大量滤泡破坏，滤泡内细胞核破裂，核溶解，滤泡中心有均质坏死物存积，间质纤维细胞增生和多量异嗜性白细胞浸润。正常对照组及第 3，4 组鸡只其法氏囊均不见肉眼及组织病变，其余各组部分法氏囊有轻度的肉眼及组织学病变（详见表 2 和图版 1，2，5）。

表 1 抗 IBDV 体外中和试验结果

组 号	鸡 数 (只)	蛋 黄 中 和 抗 体 滴 度 (log ₂)	蛋 黄 稀 释 度	强毒处理及 攻毒方法	临 床 症 状 [*]		死 亡	扑杀 2 只法氏囊病变 ^{**}							
								肉 眼 病 变				组 织 学 病 变			
					—	+		—	+	++	+++	—	+	++	+++
一	5	13	1:2	每鸡以澳大利 亚株 IBDV	5			2					2		
二	5	13	1:10	3.2 万 LD ₅₀	4	1		1	1				2		
三	5	13	1:20	分别与各种稀 释度蛋黄液 1 ml	5			1	1				2		
四	5	13	1:40	感作 1 h 后 口服攻毒	4	1		1	1			1			1
攻 毒 对照组	5			每鸡攻澳大利 亚株 IBDV			5	1			2				2
健康 对照组	5			3.2 万 LD ₅₀	5			2				2			

^{*}临床症状：“—”无症状，精神状态良好。
“+”临床症状较明显，羽毛松、精神沉郁，白色稀粪。
^{**}肉眼病变或组织学病变：“—”无病变，法氏囊结构正常或基本正常；“+”病变轻微，法氏囊结构部分破坏。“++”可见肉眼病变，法氏囊结构破坏。“+++”见典型肉眼病变，法氏囊结构大量破坏。

2.8 注射蛋黄液后的保护期 注射蛋黄液成品 2 ml/只 14，15 d 后攻毒，除 1 只见精神稍差外，其余表现良好，法氏囊组织结构完整，无异常变化；注射 1 ml/只 14 d 后攻毒，一部分法氏囊组织结构完整，一部分滤泡体积略见缩小，间质增宽（详见表 3 和图版 6）。

2.9 抗 NDV 的保护试验结果 第 1 批试验结果是：对照鸡全部死亡，死亡率为 100%（7/7）。攻毒同时注射蛋黄液的，保护率为 88.8%（8/9）。攻毒后 24 h 注射蛋黄液的，保护率为 66.6%（6/9）。第 2 批试验的对照鸡死亡率为 80%（4/5）。同时注射蛋黄液的，保护率为 100%（5/5）。24 h 后注射蛋黄液的，保护率为 100%（5/5）（详见图 4）。

2.10 生产使用效果 据使用蛋黄液的专业户及鸡场反映，作为短时间的预防性使用，这种制剂效果很理想，它可使鸡群避过 IBD 的好发期。用于治疗时，则在 IBD 的症状刚出现时马上使用，治愈率可达 95%以上，若在出现较明显病状及病变时使用，应适当加大剂量，治愈率为 90%。若能在使用时于蛋黄液中加入适量的抗生素，对防治呼吸道的并发症及抗应激均有良好的效果。

表 2 抗 IBDV 体内中和试验

组 别	鸡 数 (只)	蛋 黄			时 间	毒 苗		死 亡	扑杀 2 只法氏囊病变**								
		中和滴度 log ₂	稀 释 度	注射量 ml/只		口服剂量			肉 眼 病 变	组 织 学 病 变							
						万 LD ₅₀	/只			-	+	++	+++	-	+	++	+++
一	6	13	1:2	1	三蛋液同时注射	3.2	6		1	1				1	1		
二	6	13	1:10	1	蛋黄液	3.2	5	1		1	1			1		1	
三	6	13	1:2	1	蛋黄液	3.2	6		2					2			
四	6	13	1:10	1	24 h 注射蛋黄液前	3.2	6		2					2			
五	6	13	1:2	1	24 h 注射蛋黄液前	3.2	4	2	1	1				1	1		
攻毒对照	6						3.2		6	2				2			2
正常对照	6						6		2					2			

* **同表 1

表 3 注射高免蛋黄液后的保护期测定*

次数	组 别	只数	注蛋黄液 量 ml/只	攻 毒 (注蛋黄液 后天数)	口服攻毒量 万 LD ₅₀	临床症状			死 亡 率	扑杀 22 只的法氏囊病变				
										肉眼病变		组织学病变		
						-	+	++		-	+	-	+	++
第一次	试 验	2	2	15	3.2	1	1		0/2					
	对 照	2			3.2			2	1/2					
第二次	试验 1	4	1	14	3.2	4			0/4	2		1	1	
	试验 2	4	2	14	3.2	4			0/4	2		2		
	试验 3	4	1	10	3.2	4			0/4	2		1	1	
	试验 4	4	2	10	3.2	4			0/4	2		2		
	试验 5	4	1	6	3.2	4			0/4	2		1	1	
	试验 6	4	2	6	3.2	4			0/4	2		2		
	试验 7	4	1	2	3.2	4			0/4	2		2		
	试验 8	4	2	2	3.2	4			0/4	2		2		
	对 照	4			3.2	2	2		0/4		2		1	1
	正常对照	4							0/4	2		2		

* “—”表示无症状及病变 “+”表示有症状，法氏囊结构部分破坏
“++”表示法氏囊结构破坏

3 讨论与结论

免疫鸡血清、蛋黄的 HI 试验, IBD 微量中和试验和琼脂扩散试验结果都证明: 随着免疫次数及剂量的增加, 免疫鸡血清、蛋黄的 NDHI 抗体及 IBD 中和抗体、沉淀抗体也随之提高, 经3次高免之后均能达到较高的水平。

体内和体外的中和试验结果表明: 高免蛋黄液对 ND 和 IBD 强毒的攻击都具有明显的中和作用。表2结果还说明, 提前24 h 注射蛋黄液再攻毒, 比注射蛋黄液同时攻毒的保护效果明显、比攻毒24 h 后注射蛋黄液更理想。研究结果提示: 在使用蛋黄液防治 IBD 时, 如能把握时机, 及时使用, 效果更加显著。

试验结果也表明, 当免疫鸡蛋黄抗 IBDV 中和抗体在 13Log_2 以上或沉淀抗体在 5Log_2 以上以及 NDHI 抗体在 14Log_2 以上时, 将该蛋黄液成品以每只小鸡肌注 $1\sim 2\text{ ml}$, 在一定时间内, 对 ND、IBD 强毒的攻击有较好的保护作用, 注射量适当增大, 保护效果更佳。因此, 在 IBD 好发期用蛋黄液作预防性注射, 可在短期内防止 IBD 的发生。

根据对高免蛋黄液的一些测试结果及生产场使用的效果来看, 我们认为: 抗 ND~IBD 高免蛋黄液可在生产上用于预防和治疗 ND 和 IBD。

在研制高免蛋黄液时, 一定要选择健康、无蛋传递性疾病的种鸡或蛋鸡。要确保抗体达到较高的水平。配制蛋黄液时, 要严格按无菌操作进行, 为稳妥起见, 最好添加适量的抗生素及防腐剂。

当然, 在研制蛋黄液过程中, 还有一些尚未完善之处, 例如, 抗 IBDV 的中和抗体和 NDHI 抗体滴度必须在哪一个水平取蛋制蛋黄液最合适, 在大群使用蛋黄液时, 是否会出现一些其他不良反应? 在注射蛋黄液之后, 机体短期内存在较高的抗 NDV 抗体, 这些抗体对再次接种 ND 疫苗有何影响? 我们目前对蛋鸡免疫接种的安排是否还需要作进一步的改进, 使其达到更好的效果, 并节省时间和降低成本, 以便有利于进一步推广使用等。这些均有待于进一步试验和探讨。

致谢 本试验得到广州市动植物检疫所检验室李树根主任, 黄生高级兽医师以及华南农业大学兽医系陈玉汉教授、刘福安教授、戚丹英讲师的支持和指导, 在此一并致谢!

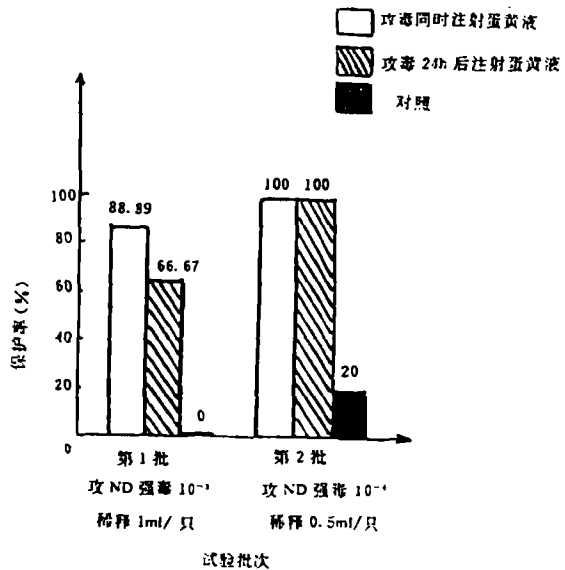


图4 抗 NDV 鸡体保护试验

参 考 文 献

- 1 王泽霖. 鸡新城疫血凝抑制 (HI) 抗体研究. 中国兽医杂志, 1983, 3:2~4
- 2 中国医学科学院流行病学研究所. 常见病毒病实验技术. 北京: 科学出版社, 1978, 58~59
- 3 刘福安. 鸡传染性囊病的微量血清中和试验. 华南农学院学报, 1984, 5 (1) 80~87
- 4 刘镇明. 鸡传染性囊病与新城疫合并感染的诊断报告. 畜牧兽医科技, 1983, 4: 6~8
- 5 农业部兽医药品监察所. 华北农业大学兽医系合译. 兽医免疫学. 北京: 科学出版社, 1978, 160~167
- 6 李汉秋. 鸡传染性法氏囊病灭活油佐剂疫苗的研究. 中国兽医杂志, 1986, 5: 50~51
- 7 胡祥辟等译. 禽病学. 北京: 农业出版社, 1981. 596~624, 753~760
- 8 Allan W H, et al. Immunosuppression by the infectious bursal agent in chickens immunised against Newcastle disease. Vet Rec, 1972, 90: 511~512
- 9 Faragher J T, et al. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. Vet Rec, 1974, 95: 385~388
- 10 Hitchnet S B. Persistence of parental infectious bursal disease antibody and its effect on susceptibility of young chickens. Avian Dis, 1972, 15: 894~900

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A HYPERIMMUNE YOLK—FLUID AGAINST
INFECTIOUS BURSAL DISEASE AND NEWCASTLE DISEASE.

Liu Zhenming Xin Chaoan Deng Runxia Zheng Shimei

(Department of Veterinary Medicine)

Xu Jianghe

(Poultry Farm of Guangzhou Second Commerce Bureau)

Abstract Yolk was separated from eggs laid by healthy hens which were inoculated with infectious bursal disease virus (IBDV) and Newcastle disease virus (NDV) several times, and a combined hyperimmune yolk—fluid against IBDV and NDV was obtained. Its haemagglutination—inhibiting (HI) antibodies to NDV as well as neutralizing and precipitating antibodies to IBDV reached a high level. The results of experimental and field trials showed that inoculation of this combined antibody product could, within a short time, allow chickens to withstand IBDV and NDV challenge. When injected into chickens early in an outbreak of these diseases, it showed marked therapeutic efficacy.

Key words Egg—yolk antibody; Combined ND—IBD antibody



- 图版 1 正常对照鸡法氏囊组织切片 法氏囊组织结构正常。
- 2 攻毒对照鸡法氏囊组织切片 法氏囊大量滤泡破坏,滤泡内细胞核破裂、核溶解,滤泡中心有均质坏死物存积,间质纤维细胞增生和多量异嗜性白细胞浸润。
- 3 口服 1:2 蛋黄—强毒液,鸡法氏囊组织切片 法氏囊正常结构基本保存。
- 4 口服 1:10 蛋黄—强毒液,鸡法氏囊组织切片 部分淋巴滤泡破坏,核碎裂和坏死,纤维细胞增生。
- 5 注射 1:10 蛋黄液同时攻毒,鸡法氏囊组织切片 部分淋巴滤泡中心细胞减量,有的见核碎裂残屑和坏死物。
- 6 注射 1:2 蛋黄液 2ml/只 14 d 后攻毒,鸡法氏囊组织切片 法氏囊组织学结构基本完整,部分滤泡间质增宽。