

鸡新城疫抗原抗体复合物疫苗的研究

李永红, 毕英佐, 曹永长

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:用中等毒力新城疫(ND)-Roakin 株病毒作为抗原,与 ND 抗体配制不同比例的复合物,并在 37 °C 感作不同的时间,分别配制复合物疫苗 1 和复合物疫苗 2,用无特定病原菌(SPF)鸡进行免疫对比试验。试验鸡随机分为 4 组,饲养在隔离器中,除对照组外,试验 1、2、3 组分别在 20 日龄接种复合物疫苗 1、复合物疫苗 2 和常规 Roakin 活疫苗。各组从免疫后第 1 周起至第 7 周,每周采血,用 HI 试验检测血清中 ND 抗体水平,70 日龄时用北京株 ND 强毒进行攻毒试验。第 1、2 组在接种疫苗后,有个别鸡出现轻微喘气或羽毛蓬松的症状,2~3 d 后好转;第 3 组接种疫苗后,鸡群 100% 发病,呈典型 ND 症状,约 1 周后康复,无鸡只死亡;对照组的鸡群一直保持健康状态。第 1、2、3 组的抗体水平分别在免疫后的 2、3、2 周达到高峰,HI 效价分别为 $1:2^9$ 、 $1:2^{8.5}$ 和 $1:2^{10}$,在第 7 周分别下降为 $1:2^{6.07}$ 、 $1:2^{6.07}$ 和 $1:2^7$,而对照组的 HI 效价一直在 $1:2^2$ 左右。攻毒后,对照组死亡率为 100%,第 1、2、3 组分别为 13.3%、6.7% 和 6.7%。试验结果提示:用中等毒力的 NDV 和 ND 抗体配制成抗原抗体复合物疫苗,可以大大减轻疫苗的毒副作用,在保持疫苗良好免疫原性的同时,提高了疫苗的安全性。

关键词:新城疫;抗原抗体复合物疫苗;疫苗接种;Roakin 毒株

中图分类号:S852.43

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)01-0088-04

Studies on newcastle disease antigen-antibody complex vaccine

LI Yong-hong, BI Ying-zuo, CAO Yong-chang

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Complexes composed of antigens of newcastle disease (ND)-Roakin strains and anti-NDV antibodies in different ratios, were respectively incubated at 37 °C for different durations of time. When inoculated with the complexes (antigen/antibody: 100/25 and 100/37.5, 10 h incubation at 37 °C), no mortality in chicken embryo was observed. SPF chicks were divided into 4 groups and raised in isolation units. Birds in group 1, 2 and 3 were vaccinated when 20-day-old with complex vaccine 1, complex vaccine 2 and Roakin live vaccine, birds in group 4 were not vaccinated with any vaccine. Blood samples were taken every week post-immunization for 7 consecutive weeks. Levels of anti-NDV antibody were tested by HI. All chickens in groups 1, 2, 3 and 4 were challenged with the velogenic NDV Beijing strain when 70-day-old. The results were: 2 or 3 chicks in group 1 and 2 showed slight respiratory distress with gasping or plumage dishevelment post-vaccination, but recovered 3 days later; all birds in group 3 showed typical ND symptoms after vaccination, and then recovered 1 week later, no chicks died; birds in group 4 remained healthy during the period before challenge. The mean HI titers of group 1, 2 and 3 was found to peak at 2, 3 and 2 weeks post-vaccination, the values being $1:2^9$, $1:2^{8.5}$ and $1:2^{10}$ respectively. After challenge, mortality in group 4 was 100%, and that in group 1, 2 and 3 respectively were 13.3%, 6.7% and 6.7%. The results suggested that mesogenic strains of NDV vaccine mixed with anti-NDV antibody could reduce vaccine virulence, vaccine prepared from this antigen-antibody complex had a good immunogenicity and safety.

Key words: newcastle disease(ND); antigen-antibody complex vaccine; vaccination; Roakin strains

鸡新城疫(ND)是由新城疫病毒(NDV)引起的一种高度接触性传染病,该病自1926年首次发现以来,至今已逐渐传播到许多国家,并成为危害养鸡业的主要疾病之一^[1]。根据我国目前的养殖现状,ND仍然是我国最具威胁的禽病之一,在禽病防治工作中,应以ND的防治作为核心^[2]。目前,对ND的防治主要是通过接种疫苗,但不论是灭活疫苗还是活疫苗都各有优缺点^[3],面对ND常规苗的缺陷,许多人都致力于新型疫苗的研制工作。20世纪90年代初,有人尝试用特异抗血清(或抗体)与病毒按一定比例混合,作为一种新的疫苗,根据这一技术发展起来的鸡传染性法氏囊病(IBD)抗原抗体复合物疫苗已成功地在家禽中获得应用^[4~8]。本试验以中等毒力的ND-Roakin株病毒作为抗原,通过试验摸索其中抗原和抗体复合的最佳比例和感作时间,在此基础上,配制ND抗原抗体复合物疫苗,并将其与常规ND活疫苗在安全性和免疫效果等方面进行比较。

1 材料与方法

1.1 制苗用毒株

鸡新城疫(ND)-Roakin株,由华南农业大学动物科学学院家禽研究室保存,经无特定病原菌(SPF)鸡胚增殖复壮后用作种毒。

1.2 SPF鸡胚、SPF鸡及普通鸡胚

由山东无特定病原鸡实验种鸡场购进SPF种蛋,在实验室自行孵化至所需胚龄或孵化出SPF小鸡饲养于隔离器中;10日龄普通鸡胚购自广东增城某育种中心。

1.3 抗原的制备

以ND-Roakin株为种毒,按常规方法经尿囊腔接种10日龄的SPF鸡胚,收集在48~60h死亡的胚蛋,死胚有明显病痕的收获其尿囊液,用HA试验^[1]测定其血凝价,血凝价大于 $1:2^8$ 的尿囊液经检验合格后保存备用,经测定尿囊液的半数鸡胚致死量(ELD_{50})为 $10^{-7.50}$ (0.1 mL)。

1.4 抗体的制备

用1.3制备的抗原免疫SPF鸡,采血分离血清,用HI试验^[1]测定血凝抑制价,血凝抑制价大于 $1:2^{10}$ 的血清经检验合格后保存备用。使用ND抗血清时,首先在56℃水浴30 min灭活补体,然后在4℃用5 000 r/min离心30 min,吸取上清液,即为已处理好的血清。

1.5 抗原抗体复合物的配制及检测

用1.3和1.4制备好的抗原和抗体按不同的体积

比例进行复合,抗原和抗体充分混合后,分别在37℃生化培养箱感作不同的时间,以未复合抗体的抗原为对照,用HA试验检测复合物的血凝价,并按常规方法测定复合物的 ELD_{50} 。

1.6 疫苗的制备

常规ND活疫苗,用1.3制备的抗原配制,测得每头份 ELD_{50} 为 $10^{-5.83}$ 。根据1.5的结果,选择2个不同的抗原抗体比例分别配制ND抗原抗体复合物疫苗。复合物疫苗1和复合物疫苗2,分别按抗原抗体的体积比为100:37.5和100:25进行配制,抗原抗体充分混合后置于37℃生化培养箱感作10 h,期间每隔2 h摇匀1次,最后取抗原抗体复合物配制成疫苗。疫苗每头份所含的抗原量与常规ND活疫苗所含的抗原量相同。

1.7 免疫试验

(1)分组与处理:将SPF鸡分成4组,每组15只,分别饲养于隔离器中,饲料、饮水和进入隔离器的物品均经过严格消毒。在免疫试验前,每组取8只鸡采血分离血清,用HI试验测定抗NDV抗体,ND抗体为阴性,在20日龄分别进行不同的免疫处理:第1组肌肉注射复合物疫苗1;第2组肌肉注射复合物疫苗2;第3组肌肉注射DN-Roakin常规活疫苗;第4组为空白对照,不接种任何疫苗。

(2)观察和测定指标:免疫接种后,观察各组鸡群的精神状况,统计发病率和死亡率。从免疫接种后的第1~7周,每周采血分离血清,用HI试验检测血清抗NDV的抗体水平。测得的HI数据以1:2表示,各组的HI效价为HI值的几何平均数。

1.8 攻毒试验

免疫接种49 d后,70日龄时,用北京株鸡新城疫强毒(F48E9)进行攻毒试验,攻毒剂量为:每只鸡 $10^5 ELD_{50}$,肌肉注射1 mL,攻毒后观察10 d,记录鸡群的发病症状和死亡情况,并剖检观察病死鸡的病理变化。

2 试验结果

2.1 抗原抗体复合物的效价检验

抗原液的 ELD_{50} 为 $10^{-7.50}$ (0.1 mL),HA效价为 $1:2^9$,分别配制不同抗原抗体比例的复合物,并在37℃感作不同的时间,经试验检测,随着复合物中抗体比例的增加,感作时间的延长,复合物的 ELD_{50} 逐步下降,HA效价也由 $1:2^9$ 变为0,当抗原抗体比例为100:25和100:37.5时,经37℃感作10 h后,接种

10 日龄鸡胚不再致死.

2.2 免疫试验的结果

(1)接种疫苗后鸡群的临床症状:试验 1 组接种复合物疫苗 1 后,第 5 d 有 2 只鸡出现轻微羽毛蓬松症状,3 d 后好转,其余鸡只正常;试验 2 组接种复合物疫苗 2 后,第 4 d 开始有个别鸡只出现伸颈喘气和羽毛蓬松的症状,3 d 后鸡群恢复正常;试验 3 组接种 ND-Roakin 活疫苗后,鸡群从第 3 d 开始发病,最后全部鸡只发病,呈缩头嗜睡、拉青绿色稀粪、伸颈呼吸、嗦囊积液等典型的 ND 症状,发病 1 周后鸡群恢复正常,试验过程无鸡只死亡;试验 4 组为空白对照组,鸡群一直保持正常,说明隔离器运转正常.

(2)免疫接种后各组的 ND 抗体水平:试验 1 组在免疫后第 2 周,ND 的 HI 抗体效价为 1:2⁹,达到高峰,以后开始下降,第 7 周后 HI 抗体效价为 1:2^{6.07};试验 2 组在免疫后第 3 周,ND 的 HI 抗体效价上升到 1:2^{8.5},达到高峰,以后开始下降,第 7 周的 HI 抗体效价为 1:2^{6.07};试验 3 组接种 Roakin 活疫苗后,鸡群反应强烈,免疫后第 2、3 周,ND 的 HI 抗体达到高峰,效价为 1:2¹⁰,以后开始下降,第 7 周的 HI 抗体效价为 1:2⁷;试验 4 组是空白对照组,ND 的 HI 抗体效价一直在很低的水平,在 1:2² 左右,说明隔离器运转正常,鸡群没有受到外来 NDV 的感染. 免疫后各组测得的 HI 抗体效价详见图 1.

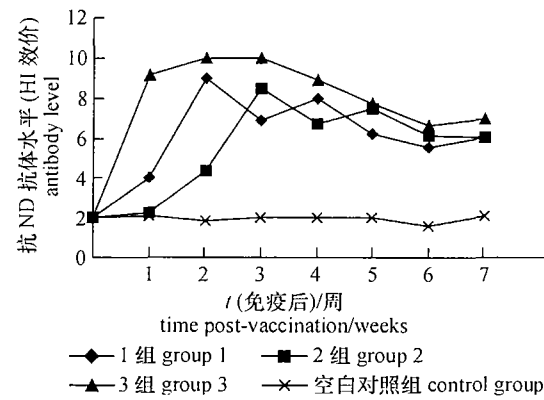


图 1 免疫后各组 ND 抗体水平的变化

Fig.1 Change in antibody level against NDV

2.3 攻毒后各组的发病和死亡情况

试验 1、2 和 3 组在攻毒后第 3 或 4 d,分别有 1 只鸡出现症状,3 组在第 3 d 死亡 1 只,2 组在第 5 d 死亡 1 只,1 组在第 6 d 死亡 2 只,其余鸡只正常,剖检死鸡,未见典型的 ND 病变;试验 4 组为空白对照组,攻毒后第 2 d,鸡群精神沉郁,有 2 只鸡站立不稳,第 4 d 出现典型的 ND 症状,第 5~6 d 为死亡高

峰,最后全部死亡,剖检死鸡,呈现为典型的 ND 病变. 结果详见表 1.

表 1 免疫后 7 周用北京株 NDV 强毒攻毒的试验结果
Tab.1 Protection against challenge with virulent NDV strain provided by vaccination with NDV – Ab vaccine and commercial vaccine at 7 weeks post-vaccination:morbidity and mortality

组别 group	攻毒鸡数 no. of challenged birds	发病率 morbidity/%	死亡率 mortality/%
1	15	13.3	13.3
2	15	6.7	6.7
3	15	6.7	6.7
4	15	100.0	100.0

3 讨论

抗原抗体复合物疫苗是一种新型的疫苗,其独特性在于抗原抗体复合后,抗体起着延缓病毒释放的作用^[4,5]. DN-Roakin 株病毒是美国分离到的自然流行毒株,属中等毒株,ICPI 为 1.45,MDT 为 68,一般作肌肉注射用于加强免疫,免疫效果良好,但由于毒力较强,毒副作用大,不能用于 4 周龄以下的鸡^[1,3]. 本试验用 ND-Roakin 株病毒来研制抗原抗体复合物疫苗,试验结果表明,本研究所配制的复合物疫苗,接种未经初次免疫的 20 日龄的 SPF 鸡后,只有个别鸡出现轻微的反应症状,尽管疫苗刺激产生的抗 ND 抗体比常规 Roakin 活疫苗的延迟了,但仍能达到较高的水平,两者的攻毒保护效率基本一致. 这一结果提示,用中等毒力的 NDV 和相应的抗体按一定比例和一定感作时间配合后,可以明显降低疫苗的毒副作用,在保持其良好免疫原性的同时,提高了疫苗的安全性.

制备抗原抗体复合物疫苗的关键是抗体和抗原间的比例要适当,要以延缓病毒释放为度^[4],所以研究抗体复合物疫苗的重点是研究抗原抗体的最佳比例. Pokric 等^[9]用 ND 的 LaSota 株病毒与抗 NDV 抗体配成抗原抗体复合物,并取抗原抗体复合形成的沉淀物配成 ND 油乳剂疫苗,取得良好的免疫效果. Pokric 等^[9]认为:抗原抗体复合物中抗原和抗体的比例对复合物的免疫刺激作用有重要的影响,复合物中抗体过量会抑制复合物对免疫淋巴细胞的刺激作用,复合物中抗原稍过量或抗原抗体等价,复合物才能产生有效的免疫刺激. 本研究通过固定抗原的量,逐步加大抗体的比例来配比不同比例的抗原抗体复合物,抗原病毒的 ELD₅₀ 原来为 10^{-7.50} (0.1 mL),随着抗体比例增加,感作时间延长,病毒的毒力逐步降

低,当抗原抗体比例为 100:25 和 100:37.5 时,经 37℃感作 10 h 后,接种 10 日龄鸡胚不致死,用此复合物来配制疫苗,可提高疫苗的安全性,并能刺激产生有效的保护性抗体。由于本试验只是首次应用中等毒力的 NDV 配制抗原抗体复合物疫苗,对复合物中抗原抗体的比例、感作温度和感作时间等只是进行了初步的探索,试验结果显示,复合物疫苗较明显降低了对鸡和鸡胚的毒副作用,但对保护性免疫没有明显的加强,所以,要进一步完善 ND 抗原抗体复合物疫苗的配比,寻找更适合的感作时间和感作温度,在降低疫苗毒副作用的同时,进一步提高疫苗的免疫效果,还有待更深入的研究。

目前,关于抗原抗体复合物对免疫应答的刺激作用有不同的报道,如单纯疱疹病毒、风疹病毒等与一定的特异抗体结合后,复合物不会抑制对免疫淋巴细胞的刺激作用,而牛鼻气管炎病毒与相应抗体结合后,复合物则会抑制对免疫淋巴细胞的刺激作用^[9]。抗原抗体复合物疫苗可刺激机体产生免疫反应,加强保护性免疫,对 IBD 抗原抗体复合物疫苗有较多成功的报道^[6~8],目前对其作用机制和方式还未完全了解清楚。Jeurissen 等^[10]认为抗原抗体复合物疫苗的作用机制与复合物能直接与滤泡树突状细胞(FDC)结合的特异能力有关,免疫复合物被捕捉到 FDC 表面,可以在脾脏诱导更多的生发中心产生;免疫复合物和 FDC 结合后,疫苗中的病毒得到保护,可以免受淋巴细胞的破坏;免疫复合物与 FDC 的结合,使得疫苗病毒复制的效率更高。本试验的结果显示,接种 ND 复合物疫苗后,机体产生的抗体有其特殊的消长规律,也提示了抗原抗体复合物疫苗有其独特

的作用机制。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社, 1997. 323-355,742-750.
- [2] 崔治中. 我国家禽新城疫流行现状[J]. 中国家禽, 2002,24(4):4-6.
- [3] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 第 10 版. 高福,苏敬良,主译. 北京:中国农业出版社, 1999. 691-726.
- [4] 马保华,毕英佐. 抗原-抗体复合物疫苗[J]. 猪与禽, 1999,4:48-50.
- [5] CRAIG E W. 病毒-抗体复合物疫苗应用研究进展[J]. 赵有编译. 国外畜牧科技,1998,25(2):41-42.
- [6] 毕英佐,曹永长,吕英姿,等. 传染性囊病抗原-抗体复合物免疫雏鸡的效果[J]. 华南农业大学学报,2000,21(1):75-77.
- [7] HADDAD E E, WHITFILL C E, RICKS C A, et al. Efficacy of novel infectious bursal disease (IBD) vaccine administered in ovo to SPF chickens[J]. Poultry Sci, 1993, 72 (suppl.1): 49.
- [8] HADDAD E E, WHITFILL C E, AVAKIAN A P, et al. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens[J]. Avian Diseases, 1997, 41: 882-889.
- [9] POKRIC B, SLADIC D, JUROS S, et al. Application of the immune complex for immune protection against viral disease[J]. Vaccine, 1993, 11 (6):655-659.
- [10] JEURISSEN S H M, JANSE E M, LEHRBACH P R, et al. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease[J]. Immunology, 1998,95:494-500.

【责任编辑 柴焰】

欢迎订阅 2004 年《华南农业大学学报(自然科学版)》

《华南农业大学学报(自然科学版)》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、文献综述等,分为农学、植物保护、生物学、动物科学与医学、农业工程与食品科学、基础科学、综述、简报等栏目。本刊附英文目录和英文摘要。读者对象是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源》及《中国学术期刊综合评价数据库》固定刊源,并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》确认为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊。为美国《化学文摘》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内所有农业文摘期刊等国内外多家著名文摘固定刊源。

国内外公开发行、季刊、大 16 开。每期 124 页,定价 5.00 元,全年 20.00 元、自办发行,参加全国非邮发报刊联合征订发行。

订阅办法:订阅款邮汇至:510642 广州 五山 华南农业大学学报(自然科学版)编辑部。

《华南农业大学学报(自然科学版)》编辑部