

## 禽脑脊髓炎活疫苗免疫持续期试验

焦铁军<sup>1</sup>, 张 浩<sup>1</sup>, 李河林<sup>1</sup>, 代创科<sup>1</sup>, 崔卓宇<sup>1</sup>, 李健强<sup>1,2\*</sup>

(1. 杨凌绿方生物工程有限公司, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:** 将200009批疫苗分三个剂量组 (I, II, III), 病毒含量分别为每羽份含500、1000、1500 EID<sub>50</sub>, 口服免疫13周龄SPF鸡, 同时设进口同类疫苗组 (IV) 和未接种空白组 (V) 作为对照。分别于免疫后7 d、14 d、17 d、21 d、28 d、42 d、56 d、70 d、84 d、105 d、126 d、149 d、169 d采血, 分离血清, 采用IDEXX禽脑脊髓炎抗体检测ELISA试剂盒检测血清中AEV抗体水平, 并通过鸡胚易感试验和后代雏鸡试验评价产蛋后鸡群的免疫状态。结果表明, 疫苗接种后14 d, 免疫鸡血清已全部阳转, 免后42 d时抗体出现第一个峰值, 此后一直保持较高水平, 并且抗体水平的高低与接种疫苗的病毒含量呈正相关关系。用AEV VR强毒进行的鸡胚易感试验, 免后6~55周免疫鸡胚的感染率在35 %以下; 后代雏鸡攻毒保护率在92.9 %以上。

**关键词:** 禽脑脊髓炎; 活疫苗; 免疫持续期; 母源抗体

中图分类号: S858.31

文献标识码: B

B文章编号: 1008-0589(2006)03-0347-04

## Immune duration test inoculated with avian encephalomyelitis living vaccine

JIAO Tie-jun<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, LI He-lin<sup>1</sup>, DAI Chuang-ke<sup>1</sup>, CUI Zhuo-yu<sup>1</sup>, LI Jian-qiang<sup>1,2\*</sup>

(1. Yangling Lvfang Bio-engineering Co. LTD, Yangling 712100, China; 2. Northwest sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Thirteen-week-old SPF chickens were divided into five groups, the group I, II, III were inoculated by oral administration with avian encephalomyelitis living vaccine (lot 200009) contained different antigen concentration (500、1000、1500 EID<sub>50</sub>/dose), respectively, meanwhile, the group IV was inoculated with imported same AE vaccine and the group V was as blank control. On the day of 7、14、17、21、28、42、56、70、84、105、126、149 and 169 post inoculation, blood samples were taken, and the titers of antibody against AEV were detected by ELISA Kit (IDEXX). The results shown that all of inoculated chickens' blood samples were antibody positive at 14th day, and antibody level would be reached the first peak on 42nd day post inoculation, then remained higher level later. There was a positive relation between the antibody titer and antigen concentration in vaccine. The challenge results of the 14-day-age progeny chickens inoculated with virulent AEV VR strain is the same as changes of Embryo-sensitivity test. The infected rate of immune chickens was below 35 %. The vaccine could offer more than 92.9 % protection at least 12 months.

**Key words:** avian encephalomyelitis; living vaccine; immune duration; maternal antibody

\*Corresponding author

禽脑脊髓炎 (Avian Encephalomyelitis, AE) 又称流行性震颤, 是由小RNA病毒科肠道病毒属的禽脑脊髓炎病毒引起的一种以侵害中枢神经系统为特征的病毒性传染病<sup>[1]</sup>。主要发生于6周龄以下雏鸡,

引起头颈震颤、腿肌麻痹、共济失调等症状, 并常引起身体衰竭死亡, 发病率40 %~60 %, 死亡率达10 %~25 %, 成鸡常呈亚临床感染, 引起产蛋量和孵化率下降, 产蛋率下降10 %~15 %。本病由Jone

收稿日期: 2005-02-13

作者简介: 焦铁军 (1978~), 男, 陕西蒲城人, 助理兽医师, 主要从事畜禽生物制品的研究开发。

\* 通讯作者: E-mail: jianqiangli2002@yahoo.com.cn

等(1932)在美国新英格兰地区首次发现,随后逐渐蔓延,世界几乎所有饲养商品鸡的地区都发生过该病<sup>[2]</sup>,我国自上世纪80年代以来各地陆续暴发此病,给养禽业带来较大的经济损失<sup>[3]</sup>。由于本病具有突然出现、难以预测持续期,可通过水平接触和垂直传播等特点,所以对养禽业的危害非常严重。唯一有效办法是通过产蛋种鸡接种疫苗来预防后代雏鸡的发病<sup>[4]</sup>。

目前,国内对禽脑脊髓炎疫苗的研究大多集中在灭活疫苗的研制<sup>[5,6]</sup>,弱毒疫苗研究的报道较少,弱毒疫苗依靠进口。而弱毒疫苗因其免疫时对鸡体应激小、操作简单、免疫后抗体水平持续期长等优点应用更广。本研究利用我公司引进的1143毒株和良好的GMP设施进行了系统研究试验,并制备出符合要求的、高效的疫苗,本文只是报道疫苗的免疫试验以及该疫苗接种SPF鸡后抗体水平的变化规律,并评价鸡群免疫后获得的免疫保护的持续时间。

## 1 材料和方法

**1.1 疫苗** 自制疫苗(批号200009)系由AEV 1143毒株制备;进口对照疫苗为Merial Italia Spa产品(批号F31621)。

**1.2 攻击用强毒** AEV VR株,本公司自国外引进,10<sup>5.6</sup>EID<sub>50</sub>/0.2 mL;攻毒时用生理盐水适当稀释为10<sup>3</sup>EID<sub>50</sub>/0.2 mL/胚(或10<sup>3</sup>EID<sub>50</sub>/0.05 mL/羽),卵黄囊内或脑内途径接种。

**1.3 免疫试验用SPF鸡** SPF种蛋购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司,自行孵化,出壳后饲养于本公司质检部负压隔离器内,13周龄备用,试验前未接种任何疫苗。

**1.4 禽脑脊髓炎病毒抗体诊断试剂盒** 美国IDEXX公司产品,序号09259-048GY。

**1.5 试验设计** 将75只13周龄SPF鸡随机分为5个组,每组15只。将疫苗用适当稀释,第I、II、III组分别接种500、1 000、1 500 EID<sub>50</sub>/羽份病毒含量的剂量,第IV组为进口疫苗对照,按说明接种,第V组为空白对照,均采用口服途径免疫。各试验组鸡均在负压隔离器中严格隔离饲养。疫苗接种后7 d、14 d、17 d、21 d、28 d、42 d、56 d、70 d、84 d、105 d、126 d、149 d、169 d各组鸡分别翅下静脉采血,分离血清,采用ELISA方法测定血清中AE抗体水平。鸡群开产后给各组人工授精,并分别收集种蛋,采用鸡胚易感试验和后代雏鸡攻毒试验评价免疫后25~55周鸡群的免疫状态。

### 1.6 疫苗免疫后AE抗体水平的监测

**1.6.1 ELISA试验:** 根据试剂盒说明测定各血清样本抗体水平高低,结果以S/P值表示, S/P比率≤0.2为阴性, S/P比率>0.2为阳性。

**1.6.2 鸡胚易感性(ES)试验:** 鸡群免疫后6~55周之间收集种蛋,孵化至6日龄,按常规<sup>[2]</sup>方法进行,每次试验至少20枚鸡胚。

**1.6.3 后代雏鸡攻毒试验:** 分别取各接种组14日龄后代雏鸡若干只,颈部皮下接种AEV VR强毒1 000 EID<sub>50</sub>/只,攻毒后观察21 d。

## 2 结果

**2.1 不同病毒剂量免疫组ELISA抗体水平** 见表1和图1。

免疫后7 d第II组和进口苗组鸡已经开始出现抗体反应,但抗体水平较低,仍为阴性。14 d时各免疫组血清均已阳转,各组之间差异不显著,只有第

表1 各组抗体水平ELISA检测S/P值  
Table 1 Antibody against AEV detected by ELISA of each group (S/P value)

组别	免疫后时间( d) Time post-inoculation												
Group	7	14	17	21	28	42	56	70	84	105	126	149	169
I	0.006±0.023	0.393±0.017	0.584±0.039	0.570±0.033	1.008±0.047	1.798±0.004	1.445±0.096	1.770±0.089	1.679±0.046	1.436±0.107	2.099±0.180	1.791±0.136	2.342±0.161
II	0.046±0.035	0.385±0.019	0.965±0.068	0.936±0.109	1.235±0.069	1.436±0.087	2.026±0.168	2.378±0.139	2.395±0.153	2.215±0.109	2.309±0.106	2.240±0.134	2.309±0.189
III	0.002±0.030	0.454±0.116	0.496±0.092	1.054±0.160	1.746±0.130	2.638±0.141	2.279±0.152	2.489±0.095	3.099±0.170	2.445±0.106	2.639±0.181	2.702±0.167	2.701±0.165
进口疫苗	0.039±0.027	0.392±0.107	0.501±0.113	0.826±0.173	1.318±0.145	1.977±0.185	1.600±0.090	1.398±0.106	2.074±0.034	1.644±0.061	2.104±0.078	1.129±0.032	1.644±0.061
Imported vaccine													
空白组	0.013±0.017	0.003±0.014	0.102±0.040	0.019±0.016	0.055±0.082	0.110±0.093	0.090±0.138	0.181±0.056	0.059±0.082	0.007±0.255	0.036±0.011	0.065±0.021	0.045±0.004
Blank Control													

III组稍高,达到 $0.454\pm 0.116$ ,而空白组血清仍为阴性。所以该苗接种后引起鸡产生免疫应答的时间出现在7 d~14 d之间。14 d后各组抗体水平开始大幅度增长,到42 d时第I、III组和进口苗组的抗体水平达到第一个峰值,S/P值分别达 $1.798\pm 0.004$ 、 $2.638\pm 0.141$ 和 $1.977\pm 0.185$ ,此后S/P值均在1.1以上。而第II组抗体水平虽然增长幅度稍小,84 d时达到第一个峰值,S/P值为 $2.395\pm 0.153$ ,但随后S/P值均在2.2以上。

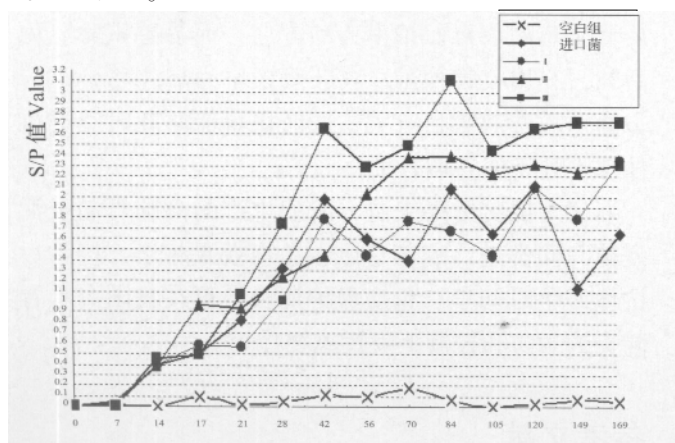


图1 AE活疫苗免疫后各组ELISA抗体水平S/P值消长规律  
Fig.1 Fluctuation of antibody against AEV after inoculation of AE vaccine

从抗体消长趋势(图1)来看:进口疫苗组的抗体水平在免后42 d、84 d、126 d S/P值分别达到3个峰值 $1.977\pm 0.185$ 、 $2.074\pm 0.034$ 、 $2.104\pm 0.078$ ,在各峰值间出现低谷,但仍远高于临界值0.2,为阳性,处于免疫保护状态下。剂量I组的抗体水平在免后42 d、70 d、126 d、169 d S/P值分别达到几个峰值 $1.798\pm 0.004$ 、 $1.770\pm 0.089$ 、 $2.099\pm 0.180$ 、 $2.342\pm 0.161$ ,并且在169 d后仍保持上升的趋势。剂量II组虽然在免疫后84 d S/P值才达到第一个峰值,但此后保持较高的水平( $2.215\sim 2.395$ 之间)。从免后56 d开始S/P值就一直高于同期进口疫苗组。剂量III组在免后42 d和84 d达到峰值,S/P值分别为 $2.638\pm 0.141$ 、 $3.099\pm 0.170$ ,该组从免后21 d开始,S/P值显著高于同期所有疫苗免疫组。空白组的S/P值一直在0.2以下。

## 2.2 鸡胚易感试验 结果见表2。

在免疫后6~55周时间内鸡群所产种蛋孵化后,接种AEV VR强毒,各免疫组的感染率均在35%以下,说明种鸡群在此期间处于免疫保护状态下,具有一定的免疫力,对AEV野毒不易感,而空白组感染率基本为100%(除免后53~55周外),说明空白

组鸡群对禽脑脊髓炎野毒感染处于易感状态。

表2 疫苗免疫后不同时间种蛋进行易感试验鸡胚感染率  
Table 2 The results of embryo susceptibility test

组别 Group	免疫后种蛋收集时间(周) Time of embryos-egg collected (weeks)									
	6~10	10~13	14~15	20~21	30~31	35~36	40~42	48~49	53~55	
I	22%(6/27)	6.2% (2/32)	0% (0/24)	14% (5/35)	28% (8/28)	6.6% (2/30)	28% (7/25)	30% (8/27)	35% (7/20)	
II	15%(4/26)	0% (0/21)	0% (0/23)	8% (3/36)	18% (4/22)	26.1% (6/23)	27% (8/29)	16% (4/25)	30% (7/23)	
III	29%(10/34)	3.8% (1/23)	8.6% (0/22)	11% (3/25)	15% (0/25)	45% (10/36)	29% (7/31)	19% (0/23)	29% (9/33)	
进口苗 Imported vaccine	33%(8/24)	100% (1/26)	100% (2/23)	100% (5/42)	100% (4/26)	100% (9/20)	100% (6/21)	100% (4/21)	82% (7/24)	
空白组 control	100%(24/24)	100% (22/22)	100% (21/21)	100% (20/20)	100% (21/21)	100% (20/20)	100% (23/23)	100% (26/26)	100% (18/22)	

注:分子为感染鸡胚数,分母为攻毒鸡胚总数

Notes: Numbers infected embryos /total numbers of challenged embryos

## 2.3 后代雏鸡攻毒试验 结果见表3。

表3 后代雏鸡攻毒保护率

Table 3 Immune protection rate of the progeny chickens inoculated after challenge

组别 Group	免后时间(周) Times after inoculation (weeks)			
	22~24	33~35	41~43	51~53
I	96.9% (31/32)	100% (14/14)	94.1% (16/17)	92.9% (13/14)
II	100% (15/15)	100% (12/12)	100% (9/9)	100% (16/16)
III	100% (17/17)	100% (9/9)	100% (11/11)	100% (9/9)
进口苗 Imported vaccine	100% (15/15)	84.6% (11/13)	100% (10/10)	100% (11/11)
空白组 Blank control	9.3% (29/32)	5.2% (1/19)	0(0/11)	0(0/9)

注:括弧内分子为正常鸡数,分母为攻毒鸡总数

Notes: Number uninfected/total numbers challenged chickens

虽然各组攻毒鸡数目有所不同,但从表中仍可以看出,免疫组后代雏鸡攻毒后保护率基本都在92.9%以上。进口对照苗组在免后33~35周时后代雏鸡攻毒后保护率(84.6%)稍低。

## 3 讨论

3.1 研究证明<sup>[2,7,8]</sup>,以IgG为主的体液免疫在抵抗AEV感染过程中起关键作用,细胞免疫虽同时存在,但只与日龄的增长存在一定的相关性,而与疫苗接种不存在相关性。Cheville、Westbury及Sinkovic的研究表明,阻止AEV感染,重要是体液免疫而不是细胞免疫<sup>[2]</sup>。成子强等通过检测免疫前后IgG、淋巴因子、沉淀抗体在鸡体内的规律,认为以IgG为主的体液免疫在抵抗AEV感染过程中起关键作用,

细胞免疫同时存在, 但只与日龄的增长存在一定的相关性, 而与疫苗接种不存在相关性<sup>[7]</sup>。顾玉芳等<sup>[8]</sup>也通过对免疫细胞类别和数量变化的分析, 发现鸡感染AEV后主要是前浆细胞和浆细胞明显增多, 机体出现活跃而持续的体液免疫应答。

用于检测鸡群中AEV抗体的方法有病毒中和试验(VN)、鸡胚易感性(ES)试验、琼脂扩散试验(AGP)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等。Tannok等、Smart等分别报道检测抗体时ELISA与VN, ELISA和ES之间有良好的相关性, 而Garrett等也发现母鸡ELISA效价与其子代胚对AEV攻击抵抗力之间具有相关性<sup>[2]</sup>。同时, 由于ELISA方法具有敏感、特异、快速、可靠、相对成本低等优点, 所以更能满足于大量鸡群的抗体筛选和免疫程序的效果评价。本研究采用进口ELISA试剂盒并结合ES两种方法来检测抗体, 应能准确地反映疫苗接种鸡群后抗体水平的动态消长规律和鸡群的免疫状态。

3.2 从ELISA试验结果可看出, SPF鸡群在免疫7 d~14 d之间产生免疫应答, 14 d时血清全部阳转, 这与Ikeda等<sup>[2]</sup>报道的“感染后4 d~10 d可检测到的抗体”时间基本一致。一般来说, 弱毒疫苗中病毒含量的多少与其产生的免疫抗体水平高低具有相关关系, 从本试验结果来看, 病毒含量为1 500 EID<sub>50</sub>/羽份组抗体水平最高, 1 000 EID<sub>50</sub>/羽份次之, 进口苗随后, 500 EID<sub>50</sub>/羽份最低, 但各组均在免疫保护水平上。市场上进口苗的病毒含量基本要求是达到1 000 EID<sub>50</sub>/羽份。美国联邦法规对AE活疫苗质量规定中要求产品的病毒滴度在有效期内不能低于10<sup>2.5</sup> EID<sub>50</sub>/羽份<sup>[9]</sup>。禽脑脊髓炎活疫苗中的病毒含量在保存期内如能保证1 000~1 500 EID<sub>50</sub>/羽份, 效果最好。赵立红等<sup>[10]</sup>的研究发现肉种鸡在14周龄翼下刺种AE弱毒疫苗, 其AE抗体阳性率呈双低谷曲线变化规律。本试验中各免疫组鸡在抗体阳转后也出现反复消长现象, 作者认为这可能与病毒对鸡体的反复刺激有关, 同时也说明鸡群的抗感染免疫过程是病毒与机体之间互相作用、此消彼长的动态过程。此外, 在对SPF鸡进行免疫试验前, 我们对非免鸡也进行了此项试验, 结果各组之间由于AEV水平传播, 免疫组中和抗体水平与对照组均为阳性, 并无明显差异。所以, 此次对SPF鸡的免疫试验均在负压隔离器中进行, 避免了相互之间的影响。

3.3 据报道, 当易感鸡经蛋被动传递母源抗体至子代, 能降低攻毒鸡群临床上的易感性, 保护力可维持4~6周, 同时肠道内中和抗体的存在能限制临床症状的发展, 降低病毒在粪中排出的机会<sup>[2]</sup>。鸡胚易感试验和后代雏鸡攻毒保护试验结果表明, SPF鸡群在接种自制疫苗后6~55周, 一直处于免疫保护状态下, 而且所产蛋中含有较高的母源抗体, 后代雏鸡(免疫后22~53周)对AEV VR强毒的攻毒保护率在92.9 %以上。进口苗组在免后33~35周时后代雏鸡的攻毒保护率为84.6 %, 而易感试验(免后35~36周收集种蛋)鸡胚感染率为15.4 %, 这一方面与攻毒鸡数目有关, 也可能与此时鸡群抗体水平处于低谷期有关。

从本试验结果来看, 我们生产的禽脑脊髓炎活疫苗与同类进口疫苗对比, 免疫效果相当, 接种后抗体产生时间早、免疫保护期长, 可在我国禽脑脊髓炎的预防和控制上发挥重要作用。

## 参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1997, 512-513. .
- [2] B W 卡尔尼克. 禽病学 [M]. 第10版, 高福, 苏敬良, 译. 北京: 中国农业出版社, 1999: 727-736. .
- [3] 黄骏明. 禽脑脊髓炎 [J]. 中国畜禽传染病, 1994, 16(4): 57-60. .
- [4] Calnek B W. Studies on avian encephalomyelitis V. Development and application of an oral vaccine [J]. Avian Dis, 1961, (5): 297-312. .
- [5] 姜北宇, 郑世兰, 刘月焕, 等. 禽脑脊髓炎佐剂灭活疫苗免疫效果观察 [J]. 中国兽医杂志, 1998, 32(3): 3-6. .
- [6] 赵振华, 李向宇, 关平原, 等. 禽脑脊髓炎油乳剂灭活疫苗的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(增刊): 160-162. .
- [7] 成子强, 赵振华, 日穆德玛. 禽脑脊髓炎油乳剂灭活疫苗免疫效果及免疫机理的研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(3): 335-339. .
- [8] 顾玉芳, 赵振华, 郝俊峰, 等. 禽脑脊髓炎免疫细胞类别和数量变化的分析 [J]. 中国兽医杂志, 1995, 21(11): 3-6. .
- [9] 王明俊. 兽医生物制品学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. .
- [10] 赵立红, 乔健, 田勇, 等. 免疫禽脑脊髓炎弱毒疫苗后肉种鸡琼扩抗体的动态变化 [J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(3): 103-106. .