

# 论鸡传染性法氏囊病 病毒细胞苗的制造和应用

## On the Production and Application of the Vaccine of the Infectious Bursal Disease Virus

张红星 吴宝成  
Zhang Hongxing Wu Baocheng

(广西农业大学牧医系 南宁市秀灵路 13号 530005)  
(The Veterina et Zootechnica Department, Guangxi Agricultural  
Univ., 13 Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

**摘要** 目前使用的多种疫苗仍未能有效控制鸡传染性法氏囊病 (IBD) 的发生, 原因是疫苗质量难以保证和免疫程序或方法不当。解决的办法: 病毒培养宜选用无特定病原 (SPF) 鸡胚或非免疫健康鸡群的鸡胚, 消化时间控制在 15 min 左右, 细胞数在 100~ 150万 /mL, 接毒量为 0.1%~ 0.2%, 小牛血清使用浓度为 3%~ 5%; 疫苗冻干过程应在不断搅拌病毒培养液的同时控制加入保护剂的速度。免疫程序: 无母源抗体或母源抗体不清雏鸡, 7日龄前首免, 14和 25日龄分别二次免疫; 有母源抗体的雏鸡, 10~ 14日龄首免, 21日龄二免; 流行严重地区, 40日龄前后加强免疫 1次。免疫方法为滴鼻、点眼。疫苗稀释用加 0.5% 脱脂奶粉的凉开水。最小免疫剂量为 10万 PFu, 常规量为 100万 PFu

**关键词** 传染性法氏囊病病毒 疫苗 制造 使用

**Abstract** At present, Infectious Bursal Disease (IBD) is widespread epidemic and results in serious damage to the poultry of China, although several kinds of vaccines are applied. It's the main reason that the quality of the vaccine and the order or method of the immunity are inappropriate. The existing problems and the effective resolving measures are put forward in the manufacturing operation and application of vaccine. Chick embryo without maternal antibody (MA) must be chosen, Time of digestion is about 15 minutes, Cell number is 1~ 1.5 million/mL, Dose of inoculated virus's seed is 0.1%~ 0.2% culture solution included 3%~ 5% serum of newborn calf, and the speed is dominated when the culture solution of virus and protective agent are mixed before freeze-dried. For young chickens without MA or little being known about MA, the immunity are executed respectively in 7, 14 and 25-old-day chickens, but for young chickens having MA in 10-14, 21 and 40-old-day respectively with nasal drops or eye drops. The dose of common practice of vaccine is one million PFu per chicken, the minimum is a hundred thousand PFu.

**Key words** Infectious Bursal Disease Virus (IBDV), vaccine, production, application

鸡传染性法氏囊病 (IBD) 是一种急性、高度接触性传染病。主要感染 3~ 6周龄的雏鸡, 发病突然, 康复迅速; 发病率有时高达 100%, 死亡率不等。病毒主要侵袭雏鸡的免疫器官, 导致免疫抑制。高死亡率的原因多为感染鸡的继发感染或混合感染。本病自 1979年在我国首次报道后, 目前已成为我国流行的

主要禽疫病之一。

鸡传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 弱毒和灭活疫苗在我国已普遍应用, 起到一定的作用, 但免疫效果并不尽如人意, 免疫失败现象普遍存在, 免疫鸡群仍有较高的发病率和死亡率, 原因是多方面的。一方面对 IBDV 在我国流行的野强毒了解很少, 而我国采用的 IBDV 疫苗株众多, 制作和生产单位条件不一, 鉴定

疫苗质量的标准难以规范;另一方面是用户对疫苗的有关特征了解甚少或疫苗使用不当,致使免疫失败。笔者根据制作 IBDV 细胞苗和实地应用的经验,以 IBDV 的遗传学及抗原相关性为基础,指出 IBDV 疫苗制作过程中应注意的问题,并提出了相应的解决办法。

## 1 病毒分类

IBDV 为双片段双链 RNA 病毒,归属于新的 Birnaviridae 病毒科<sup>[1]</sup>,病毒粒子无囊膜,单层衣壳,直径 55~65 nm,呈 20 面体立体对称。病毒对温度有较强的抵抗力,对脂溶性消毒剂不敏感,只有少数几种化合物如碘化物对它有灭活作用,这是它能够在鸡舍内长期持久存活的主要原因。

IBDV 野外血清 I 型的主要抗原具有不同程度的漂移现象<sup>[2]</sup>,使对 IBDV 的认识和预防增添了困难。目前从遗传学角度和根据相关资料,将 IBDV 暂分为 4 群(二个血清型),包括标准血清 I 型(典型血清 I 型)、变异血清 I 型(非典型血清 I 型)、超强血清 I 型(高毒力或高致病性 IBDV)和血清 II 型(火鸡囊病毒)。经过对实验室内传代致弱的标准血清 I 型的众多疫苗株进行交叉中和试验,目前 IBDV 被确认为 5 个亚型<sup>[3]</sup>。各家试验系统和病毒传代次数可能不同,致使现有疫苗株之间的抗原相关性或免疫原性很不稳定,并不能反映野外流行株的抗原谱,而只能说明疫苗株和已适应于细胞培养的野外分离株的抗原谱<sup>[4,5]</sup>,因而这种亚型分型方法及命名未得到国际上的普遍接受。变异血清 I 型与标准血清 I 型的抗原性主要区别在中和表位的改变<sup>[6]</sup>,目前将此变异型的代表株分在亚型 6<sup>[2]</sup>。超强血清 I 型的反应型与标准血清 I 型代表株完全一致<sup>[6]</sup>。血清 II 型与血清 I 型不能交叉保护,仅在低滴度表现一定程度的交叉中和性<sup>[7]</sup>。

## 2 病毒培养

IBDV 能够在多种原代或继代细胞单层和鸡胚中增殖<sup>[8]</sup>,实验室和生产单位目前普遍使用鸡胚成纤维细胞(CEF)增殖病毒,接种细胞后潜伏期 4~6 h,繁殖周期 10~36 h。病毒的效价受很多因素的影响,这些因素主要是:

(1) 母源抗体 鸡胚中的母源抗体对病毒生长有很强的抵抗力,采用 CEF 培养虽然能减少部分母源抗体干扰,但不能完全排除。因此应选用无特定病原(SPF)鸡或非免疫健康鸡群的鸡胚。

(2) 细胞质量 细胞质量直接影响病毒的繁殖

效率,而细胞质量与消化时间密切相关,一般情况下,消化时间愈短细胞形态愈完整,但细胞数较少。试验中我们采用细胞悬液和毒种同时接入培养瓶中,取代 CEF 培养 24 h 后再接毒的方法,可节约成本 30%,病毒效价可达  $10^8$  噬斑形成单位(PFU)/mL 以上,但对细胞质量要求更高。我们将消化时间控制在 15 min 左右,细胞数在 100~150 万/mL,效果较好。

(3) 毒种 毒种是影响疫苗质量的最主要因素。目前国内使用的各种疫苗株主要是由标准血清 I 型致病株经细胞传代致弱后获得,不仅形态学及抗原特性与原株存在很大变异,而且致弱后的病毒在鸡体内的繁殖能力也受到很大影响,直接决定了鸡群的免疫成败。试验表明毒种的使用代次应控制在 2~6 代<sup>[8]</sup>,否则会严重影响疫苗的免疫原性。另外,为保持高效价,毒种须用超低温保存,避免反复冻融。接种剂量依效价而定,高效价大剂量会使病变时间出现过早,收获的子代病毒中存在大量的缺陷病毒,影响病毒效价;低效价小剂量则使病变出现不一致,甚至不出现病毒高峰,因此有必要根据病毒的效价确定适当的接毒量,一般以培养液量的 0.1%~0.2% 为宜。

(4) 小牛血清 小牛血清中非特异抑制因子对病毒复制有很大影响<sup>[10]</sup>,抑制率可达 80%,其机理不明。为减轻血清对病毒侵入和复制的影响同时又保证 CEF 能够较快贴壁生长,要选择质量较好的小牛血清,并采用适当的处理方法,消除非特异抑制因子的影响,尽量降低小牛血清的使用浓度,一般以 3%~5% 为宜。

## 3 疫苗冻干

IBDV 弱毒疫苗在我国普遍应用的是冻干苗,湿苗仅在部分地区小范围使用。冻干过程对疫苗效价的影响很大,需加入适当的保护剂。保护剂的作用主要是:在冻干过程中减轻对病毒的损伤,提高存活率;延长存活期;增加疫苗的溶解性,保持适当的疫苗物理形态。我国在现阶段还未开展 IBDV 冻干保护剂的研究,IBDV 冻干苗的制备仍沿用蔗糖和明胶或脱脂奶作保护剂。为提高病毒效价,减少成品体积,常以高浓度的明胶和蔗糖保护剂与数倍体积的病毒培养液混合而成。由于病毒培养液温度一般较低,当与温度较高的保护剂相遇时,极易形成凝块导致保护剂混合不均,影响疫苗质量。如果预温病毒培养液又易造成污染,解决办法是在不断搅拌病毒培养液的同时控制加入保护剂的速度。

冻干曲线是获得合格疫苗产品的关键步骤之一。

不同微生物均有对应的冻干曲线,以保持最高的生物活性,但我国 IBDV 冻干苗的制作还没有对应的冻干曲线,仍使用其他疫苗的冻干曲线,对冻干效果还缺乏必要的研究资料。通过对疫苗冻干前后病毒效价的测定比较,冻干过程对病毒效价有比较大的影响。虽然原因是多方面的,但不排除非对应冻干曲线对病毒效价的影响。为提高产品质量,根本的解决办法是研制新型的冻干保护剂,优化工艺。

## 4 疫苗效价的测定

目前对 IBDV 效价的测定一般用噬斑技术或细胞半数感染剂量测定 (TCID<sub>50</sub>) 方法,以噬斑技术准确可靠。但应明确 PFu 与活病毒粒子数不是 1:1 的对应关系,而只是呈正相关。规范噬斑测定技术是许多实验室梦寐以求的事,但实验室内影响噬斑形成的因素很多<sup>[11]</sup>,较难作到完全规范一致。如细胞质量和密度、培养时间和温度、覆盖物(琼脂等)和培养液种类、不同的小牛血清浓度和处理方法、中性红染料的浓度和添加时间以及测定时产品的溶解程度和稀释手法等。致使同一批产品重复检测可能出现不同的结果,直接影响疫苗的免疫剂量的确定和免疫效果。所以每次测定必须设立阴性对照和已知效价的阳性对照,以校正误差。同一批产品应选 3 个以上样品,各设三个稀释度分别测定求均值。建议生产单位在确定常规免疫剂量时应考虑实地使用可能使疫苗效价降低的因素,预留出富余量。对其他项目的检查应符合《生物制品的检验规程》的要求,不合格者销毁处理。

## 5 免疫

在疫苗应用过程中,足够的免疫剂量和周密的免疫程序是建立坚强免疫力的基础。目前普遍应用的中等毒力疫苗每只雏鸡的最小免疫剂量为 10 万 PFu,常规免疫剂量为 100 万 PFu,这样才能有效地突破雏鸡母源抗体的干扰。弱毒和中等毒力疫苗产生免疫的时间从最早的 7 天到 2~3 周,强毒力、中等毒力和无毒力的病毒株突破母源中和抗体的效价分别是 1:500、1:250 和小于 1:100,用户在使用这些疫苗之前应得到有关这方面的知识,了解免疫时应该注意的事项以安排适宜的免疫程序。一般情况下,每种疫苗的销售都附有一个适合该疫苗的免疫程序。但由于雏鸡母源抗体、管理及操作条件的变化具体应用时难以作到周密、完善。一般适用于大多数鸡场的免疫程序是:对没有母源抗体或母源抗体不清的雏鸡应于 7 日龄前开始首免,在 14 和 25 日龄后再分别进行

二次免疫;对有母源抗体的雏鸡应于 10~14 日龄首免,21 日龄前后进行二免;对流行严重地区可在 40 日龄前后加强免疫 1 次。免疫方法以滴鼻、点眼为好,为保证每只鸡能获得足量的病毒,首次免疫尤为重要。另外应注意的是疫苗稀释最好选用加有 0.5% 脱脂奶粉的凉开水,容器应选用无毒塑料制品,洁净并数量充足。

## 6 讨论

IBDV 分类中各群毒株的致病力不同,标准血清 I 型首先在世界各地普遍流行,有不同程度的临床致病力和免疫抑制作用;变异血清 I 型经确认仅报道于美国,20 年来仍未遍及全美,主要致亚临床感染和严重的免疫抑制,但 3 周龄以上雏鸡再感染变异株已不再引起免疫系统广泛的损伤;超强毒血清 I 型 1987 年首发于欧洲<sup>[12]</sup>,几年后遍及世界各地,呈急性暴发,死亡率高、传播力强,导致严重的法氏囊(紫葡萄样)、胸腺及骨髓病变、全身炎性反应;血清 II 型可致雏火鸡亚急性感染,对鸡无致病性。目前在我国主要以标准血清 I 型病毒流行为主;数年前我国曾暴发超强血清 I 型病毒的流行,经普遍使用中强毒力的标准血清 I 型活苗,加倍免疫剂量,并加强免疫,已迅速控制流行,目前仅在部分地区呈散发流行;变异血清 I 型我国个别地区曾有过报道<sup>[13]</sup>,但未得到确认。实验表明高滴度的标准血清 I 型活苗也能提供对变异血清 I 型病毒的完全保护力<sup>[9]</sup>。目前在我国生产并普遍使用的 IBDV 活苗主要是血清 I 型中等毒力疫苗,包括单价、二价和三价疫苗。虽然实际应用中并不刻意强调疫苗株“亚型”的选择,但联用两个以上“亚型”,可以拓宽抗原谱及二次免疫应答时的抗体谱,一定程度上可提高免疫保护力。实验表明 SA1B D<sub>80</sub> 和 S<sub>700</sub> 等疫苗株不仅对变异血清 I 型毒株有良好的攻击保护性<sup>[9,14]</sup>,而且这些疫苗株性质较稳定,不易返祖,免疫原性较好,较易克服母源抗体的干扰,对新城疫疫苗的接种不产生免疫抑制现象<sup>[15]</sup>。另外,油佐剂灭活疫苗已广泛用于加强和延长种鸡群的免疫期。研究表明,任一亚型疫苗株制备的灭活疫苗以标准强毒 STC 效检,具有大致同等的保护力。但这种疫苗对雏鸡进行首免的效果还不确实,如果同时与活苗联合免疫能有效地突破母源抗体的干扰,较快地建立主动免疫。

综上所述,对预防 IBD 的暴发或散发流行,目前国内已具备了必要条件。从理论和实际应用上看,目前国内使用的疫苗株大多数是有效的。显然,只要能保证疫苗毒种的低代次,免疫接种时的足量病毒和适

宜方法,有能力抵抗不同类型野毒的攻击。但国内现有生产 IBDV 疫苗的条件或方法及疫苗保管或运输过程中可能存在的问题,致使有效病毒剂量严重不足,再加上可能存在的免疫程序或方法不当,最终导致免疫失败,致使 IBD 仍不断发生,形成一种 IBD 难以预防的假象。本文提出的在 IBDV 疫苗制备及应用中可能存在的问题和解决办法,希望能得到同行和使用单位的重视。

### 参考文献

- 1 Brown F. The classification and nomenclature of virus summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, Intervirology, 1986, 25: 141-143.
- 2 Snyder D B, Lana D P, Savage F S et al. Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis, 1988, 32: 535-539.
- 3 Jackwood D H, Saif Y M. Antigenic diversity of IBDV. Avian Dis. 1987, 31: 766-770.
- 4 Snyder D B. Changes in the field status of IBD Virus. Avian Pathol, 1990, 19: 419-423.
- 5 Snyder D B, Vakharia V N, Savage P K. Naturally occurring neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of IBD viruses in the United States. Arch Virol. 1992, 127: 89-101.
- 6 Vakharia V N, He J, Ahamed B et al. Molecular basis of

- antigenic variation in IBD Virus. Virus Res, 1994, 31: 265-273.
- 7 Jackwood D J, Saif Y M, Moorhead P D. Immunogenicity and antigenicity of IBDV serotypes I and II in chicken. Avian Dis, 1985, 29: 1184-1194.
  - 8 高福,刘文军主译.禽病学.第9版.北京:北京农业大学出版社,1991,554-566. ISBN 7-81002-318-7/s. 319.
  - 9 Ismail N M, Saif Y M. Immunogenicity of IBD Viruses in Chickens. Avian Dis, 1991, 35: 460-469.
  - 10 王笑梅,陈冠春,于大海.牛血清中非特异性抑制因子对几种病毒的抑制作用.中国畜禽传染病,1988,6: 48-50.
  - 11 吴宝成,陈立炎,王桂秋. HSV-1在 Vero 细胞上的噬斑形成条件.武汉大学病毒学系 1984 年毕业生论文集.
  - 12 Wyeth P J, Chettle N J. An agar diffusion test for differentiating between strains of type I IBD Virus. Vet Rec. 1988, 122: 442-443.
  - 13 李树根,黄生,林志雄等.鸡传染性法氏囊病毒血清 I 型病毒亚型毒株的分离.中国畜禽传染病,1991,5: 7-10.
  - 14 Giambrone J J, Closser J. Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of IBD virus. Avian Dis, 1990, 34: 7-11.
  - 15 Giambrone J J, Clay R P. Evaluation of the immunogenicity, stability, pathogenicity and immunodepressive potential of four commercial live IBD virus. Poultry Sci, 1986, 65: 1287-1290.

(责任编辑 蒋汉明)

(上接第 73 页 Continue from page 73)  
及水牛血清的强烈,这说明此抑制剂对 ALP 的抑制作用在一定范围内具有普遍性

致谢

本文得到黄秀英、胡曦璇老师的帮助,特表谢意。

### 参考文献

- 1 王秉栋,经荣斌.猪血清碱性磷酸酶与骨骼生长的关系.中国畜牧杂志,1984,(2): 2-3.
- 2 何谓霞,齐顺章.健康乳牛与骨病乳牛血清中碱性磷酸酶酶谱的分析.中国兽医杂志,1982,8(4): 7.

- 3 北京农业大学主编.动物生物化学.第二版.北京:农业出版社,1987.346.
- 4 全国农业生化学术会议筹备组编.中国生物化学学会全国农业生化学术会议论文摘要汇编.江苏农学院,1984.127-128.
- 5 北京农业大学主编.动物生物化学实验指导.北京:农业出版社,1986.62-63,97-100.
- 6 赵浩斌.血液生化指标与产奶性能的关系.黄牛杂志,1993,19(2): 59-60.
- 7 栾桂龙,欧阳柱,庞廷英.四种母水牛血清碱性磷酸酶的研究.广西畜牧兽医,1988,(4): 18-20.

(责任编辑 蒋汉明)