

鸡新城疫水-油-水型 活性复乳的研制和免疫研究

Preparation and Immune Effect of W/O/W Active Multiple Emulsion against Newcastle Disease Virus

张红星 吴宝成 徐振东
Zhang Hongxing Wu Baocheng Xu Zhendong

唐铃弟
Tang Lingdi

(广西农业大学牧医系 南宁市秀灵路 13 号 530005)
(Dept. of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,
Guangxi Agricultural University,
13 Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

(广西科学院 南宁市
江南路西一里 20 号 530031)
(Guangxi Academy of Sciences, 20 Xiyili,
Jiangnan Road, Nanning, Guangxi, 530031)

摘要 水-油-水 (W/O/W) 型活性复乳是将油包水初乳 (W/O) 进一步分散在水相中经过二次乳化, 使用时并配以新城疫弱毒疫苗联合制成。采用透析法测定复乳的形成率分别为 95.0%, 89.3%, 88.0% 和 84.4%, 雏鸡免疫后 4 d HI 抗体即明显升高, 并持续 2 个月以上; 对育成鸡的加强免疫持续期达 14 个月, 滴鼻或肌注攻毒全保护, 证实新城疫 W/O/W 活性复乳已达到实用要求。

关键词 新城疫 活性复乳 免疫

Abstract Newcastle disease (ND) is a serious infectious disease for the poultry industry in China, and occurs frequently though immunization of active and inactive vaccine against ND has been widespread applied. In this paper, W/O/W active multiple emulsion (multiemulsion) has been prepared at first by way of second emulsifying in exophase of water with primary oil emulsion (W/O) of inactive vaccine against ND, and active vaccine is added when immunization will be carried out. The results show: the forming percentage of the multiple emulsion are respectively 95.0, 89.3, 88.0 and 84.4 using Permeability's method. HI antibody titers against NDV raise obviously after immuned 4 day and maintain up to 2 months for young chickens, and the immune effect could maintain up to 14 months after reinforcing immune for three-month-old chickens. The protected rate of immuned chickens using W/O/W active multiple emulsion are all 100% for challenge of NDV.

Key words newcastle disease, active multiemulsion, immunity

鸡新城疫是我国家禽最主要的疫病之一, 多年来各种弱毒疫苗和油乳剂灭活苗的普遍使用虽已有效的遏制了新城疫的暴发流行, 但免疫鸡群仍不断发生新城疫, 持续周期长, 临床及病理变化出现了新的特点, 新的变化和新的规律, 表现为非典型新城疫, 发病率一般在 10%~60%, 死亡率 10%~30%, 并有逐年上升的趋势, 有效的防制非典型新城疫的发生已成为家禽养殖成败的关键。

我国禽用疫苗的剂型目前主要有两种: 水剂和油

包水 (W/O) 型乳剂。水剂一般指各种弱毒疫苗, 主要适用于雏鸡免疫, 虽能速生抗体, 但持续时间短^[1]; 油乳剂国内外基本上以液体石蜡和乳化剂乳化制成, 由于它便于制备, 免疫效果确实^[2], 受到各方喜爱, 其主要缺点就是不利于机体吸收, 诱导抗体缓慢。W/O/W 复合型乳剂是将油包水初乳进一步分散在水相中经过二次乳化而成, 在医药界已得到有限应用^[3], 在禽用疫苗还未见到研究报道。本试验拟在新城疫 W/O 型油乳剂基础上研制 W/O/W 型活性复乳, 希望能保留 W/O 型油乳剂免疫期长的特点, 又能达到速生抗体的目的, 试验取得了满意结果。

1996-02-26 收稿, 1996-05-20 修回。

1 材料与方法

1.1 种毒

新城疫 V₄ 株, 克隆-30 株, F₄₈E₇ 株由中国农科院哈尔滨兽研所提供, 种毒在 SPF 鸡胚上继代, V₄ EID₅₀ 为 10⁹/0.1 mL, HA 效价为 2¹¹; 克隆-30HA 效价为 2¹¹, 分别冻干保存。F₄₈E₇ 对雏鸡最小致死量为 10⁻⁷/0.1 mL, 分装后 -20℃ 冻存。

1.2 试验雏鸡

某种鸡场提供的伊沙维公鸡, 免疫接种前测定雏鸡母源抗体效价 (表 2)。

1.3 疫苗制备及接种

1.3.1 V₄ 疫苗采用非免疫鸡胚制备, HA 效价 2¹¹, 口服免疫 10 只 14 日龄雏鸡, 每只接种 2.5 × 10⁶ EID₅₀, 首免后 21 d 用 V₄ 和克隆-30 复合苗 (200 只/mL) 滴鼻加强免疫。此为第 I 组。

1.3.2 克隆-30 疫苗采用非免疫鸡胚制备, HA 效价 2¹¹, 滴鼻免疫 10 只 14 日龄雏鸡, 剂量 200 只/mL, 21 d 后用 V₄ 和克隆-30 复合苗 (200 只/mL) 滴鼻加强免疫。此为第 II 组。

1.3.3 新城疫 W/O 型油乳剂灭活苗采用常规方法制备, 以灭活的新城疫 V₄ (HA2¹¹) 为内水相, 浙江产液体石蜡为油相, 加以适当的乳化剂乳化而成, 颈后皮下接种 12 日龄雏鸡 25 只, 剂量 0.2 mL/只。此为第 III 组。

1.3.4 新城疫 W/O/W 型复合乳剂的制备由新城疫 W/O 型乳剂在加有适当乳化剂和稳定剂的外水相中进一步乳化而成; W/O/W 活性复乳指在免疫时加入一定剂量的新城疫弱毒疫苗混合而成, 对雏鸡的免疫剂量为 0.5 mL (含 2.5 × 10⁶ EID₅₀ V₄/只), 颈后皮下注射 12 日龄雏鸡 25 只, 此为第 IV 组。

1.3.5 第 V 组为非免疫对照鸡。各组分别饲养。

1.4 HA 和 HI 滴度的检测

采用 96 孔 V 型 (120°) 血凝板, 常规 β-微量法, 每次检测从各试验组任取 5~7 只鸡从静脉或心脏采血, 分离血清, 测定时设阴、阳性对照, 最后计算 HI Log₂ 的算术平均值 (GMT)。

1.5 攻毒试验

采用肌肉注射和滴鼻二种方式。注射剂量为 10⁻⁴ × 1 mL/只, 滴鼻剂量为 10⁵ EID₅₀ × 50 uL/只, 攻毒后观察 14 d, 统计免疫鸡和对照鸡的死亡数。

2 试验结果

2.1 W/O/W 复乳形成百分率的测定

在试制 W/O/W 复乳时, 先将一定浓度的 NaCl

溶液加入到新城疫 W/O 型乳剂的内水相中, 然后与正常尿囊液制备的 W/O 型油乳剂 (为空白对照) 分别进一步乳化制备 W/O/W 型复乳。复乳的形成百分率测定采用透析法, 将一定量的复乳装入透析袋中在定量的蒸馏水中透析, 然后采用莫尔法测定加有 NaCl 尿囊液的 [Cl⁻] 浓度 (B) 为 0.4005 mol, 滴定空白对照耗用的 0.01 mol AgNO₃ 溶液为 2.7 mL, 滴定各批次复乳透析液时耗用的 AgNO₃ 溶液量如表 1。通过公式:

$$W/O/W \text{ 复乳形成 } (\%) = \frac{100 - 100W}{V_1}$$

$$W = \frac{A(V_2 + V_3)}{B - A}$$

A —— 透析后的 [Cl⁻] 浓度

B —— 内水相的 [Cl⁻] 浓度

W —— 渗出的内水相体积 (mL)

V₁ —— 内水相体积 (mL)

V₂ —— 外水相体积 (mL)

V₃ —— 透析液体积 (mL)

表 1 W/O/W 复乳的形成百分率

Table 1 The forming percentage of the multiemulsion

批次 Expt. no.	AgNO ₃ (mL)	[Cl ⁻]	形成率 Forming percentage (%)
1	13.00	0.002060	95.0
2	13.56	0.002172	89.3
3	13.69	0.002198	88.0
4	14.04	0.002268	84.0

计算复乳的形成百分率。经过对 4 批复乳测定的结果表明该方法制备的复乳形成率较高, 具有较高的实用性和可重复性。由于测定时内水相渗透压高于外水相, 水分子可从外水相穿透油膜渗入到内水相, 导致内水相在短时间内膨胀, 部分直径较大的含内水相的油滴破裂, 因此 W/O/W 复乳的表观测定值要小于实际制备时不加 NaCl 的复乳形成率。

2.2 免疫效力试验

实验共分 5 组 (如方法 3 描述) 各组鸡免疫后均未出现任何临床症状。试验鸡的 HI 抗体滴度和攻毒结果见表 2。研究发现, W/O/W 活性复乳免疫鸡 HI 抗体效价上升很快, 免疫后 4 d 已明显升高, 与第 I、II 组弱毒疫苗免疫鸡比较, 抗体滴度增加的绝对值相当, 不仅起到了速生抗体的效果, 免疫期也能持续 2 个月以上。W/O 型免疫鸡抗体滴度上升缓慢。比 W/O/W 免疫组大约延迟了 2 周才达到相近水平。

攻毒试验表明, 各组鸡免疫后 1 周直到第 9 周, 攻毒均全保护, 对照鸡全部死亡, 剖检为典型新城疫病变。

表 2 各免疫组 NDHI 抗体效价 (Log_2) 检测和攻毒结果

Table 2 Log_2 HI titre values and challenge results of different immune groups

分组 Groups	Log_2 HI (GMT)										攻毒 Challenge				
	0 ^a	4	7	14	21	28	35	49	63	7	56	63 ^b			
I	4.5	5.5	5.0	7.0	—	5.4	4.8	4.6	5/5 ^c	—	5/5				
II	4.5	5.5	6.0	7.0	—	4.6	4.7	—	5/5	—	5/5				
III	2.75	2.25	2.75	3.75	5.13	—	5.4	—	5/5	10/10	10/10				
IV	2.75	3.5	3.75	5.0	4.8	5.3	—	5.4	5.14	5/5	10/10	10/10			
V	4.5	2.75	2.0	1.2	—	—	—	—	—	0/5	0/8	0/5			

a 免疫时的母源抗体; Titers of the maternal antibody; b 滴鼻攻毒, 其余为肌注攻毒; Drops for nasal route, the rest are intramuscular injection; a、b 表示免疫后天数, a、b were days past-inoculation; c 分母为攻毒鸡数, 分子为保护鸡数; Denominator was no. of challenged, and numerator was no. of protection.

2.3 现地试验

某鸡场伊沙蛋鸡约 2000 只, 曾于 7 日龄滴鼻, 30 日龄饮水免疫克隆-30 疫苗, 3 月龄时临床开始表现有呼吸症状, 个别鸡有神经症状, 每天死亡约 10 只, 剖检见气管充血, 有粘液, 个别鸡腺胃或盲肠扁桃体有散在出血点, 血清学检测 HI 抗体在 $2^2 \sim 2^{11}$ 之间, 初步诊断为非典型新城疫, 用含 5 倍剂量 ($12.5 \times 10^6 \text{EID}_{50}$) 新城疫 V₁ 活性复乳紧急注射 1 mL/只, 免疫后第 3 天病情得到控制, 精神明显好转, 第 6 天死亡停止, 接种后 2 周 HI 平均滴度达 $2^{10.2}$, 3 个月后为 $2^{9.2}$, 6 个月时 $2^{7.8}$, 12 个月时 $2^{5.8}$, 各免疫鸡 HI 滴度差异幅度不大, 整个产蛋期中未见新城疫发生。免疫后 14 个月取回 5 只免疫鸡肌注攻毒, 观察 14 d, 全部保护, 5 只新城疫病毒抗体阴性对照鸡全部死亡。

3 讨论

W/O/W 复乳的形成率和稳定性受多种因素的影响, 尤其是内、外水相的渗透压差和乳化剂的种类,

还有乳化时的界面张力、温度和乳化时间等。研究发现, 如何防止油膜破裂和内水相的外溢是制备高质量复乳的关键。本试验经过多次探索, 较好地解决了影响复乳形成率和稳定性的各因素之间的关系问题以及内水相中病毒灭活剂对外水相中弱毒疫苗效价的影响。经过对复乳的透析液的离子浓度、免疫原性和持续期测定, 证实本试验研制的活性复乳的形成百分率和免疫效力已达到实际应用的要求, 对育成鸡的加强免疫持续期可达 14 个月, 雏鸡为 2 个月以上。并具有独特的作用特点: 在体内分散迅速, 能速生抗体并缓释油膜内的抗原, 具备了灭活苗和弱毒疫苗的双重优点。

鸡新城疫免疫程序或方法不当可能是引发非典型新城疫的主要原因^[4,5], 广西普遍忽视对鸡新城疫免疫效果的检测, 往往根据以往经验制定新城疫的免疫程序, 致使免疫失败, 非典型新城疫时有发生, 新城疫 W/O/W 活性复乳的研制和应用可望为养殖户提供制订免疫程序上的方便, 且操作简便, 安全可靠, 尤其适用于对已发生非典型新城疫鸡群的紧急接种。至于肌肉注射免疫能否经受野毒由呼吸道的感染, 本研究特设立了滴鼻和肌注攻毒试验, 结果表明, W/O/W 活性复乳免疫鸡对强毒的呼吸道感染也能完全保护。

参考文献

- 徐振东, 吴宝成, 王万忠等. 新城疫 V₁ 株疫苗的研究. 中国兽医科技, 1993, (10): 3~4.
- 马闻天, 李慧姣, 徐翠华等. 鸡新城疫灭能苗研究. 中国畜禽传染病, 1987, (1): 9~12.
- 南京药学院主编. 药剂学. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1985, 380~400.
- 李康然. 鸡新城疫免疫中存在的一些问题. 广西畜牧兽医, 1995, (3): 20~22.
- 朱维正. 谈谈鸡新城疫免疫中的几个问题. 中国畜牧兽医学学会家畜传染病学分会第六次学术研讨会论文集. 1995, 50~54.

(责任编辑: 邓大玉 蒋汉明)