

免疫鸡群新城疫病毒检测和分离的研究*

Detection and Isolation of Newcastle Disease Virus in Immunized Chickens

吴宝成 张红星 荆汝顶 徐振东 孙建宏 李康然

Wu Baocheng Zhang Hongxing Jing Ruding Xu Zhendong Sun Jianhong Li Kangran

(广西大学动物科技学院 南宁市秀灵路 13号 530005)

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine

Guangxi University, 13 Xiulinglu, Nanning, Guangxi, 530005)

摘要 以 SPF鸡抗新城疫病毒 (NDV) IgG为包被抗体 ($5\mu\text{g}/\text{mL}$), 免抗 NDV Vero细胞培养纯化毒 IgG为第二抗体 ($1: 200\sim 600$), 酶标记羊抗兔 IgG ($1: 5000$) 为指示抗体建立间接夹心 ELISA, 检测实验免疫鸡、攻毒鸡及现地免疫鸡口腔或泄殖腔外分泌物。结果表明: 新城疫无毒力 V_4 疫苗免疫后 2 d, 口腔内病毒抗原随机检出率为 4/10, 第 10天为 10/10; 泄殖腔为 0~ 1/10, 并持续 18 d以上。滴鼻攻毒后 1 d, 口腔和泄殖腔内病毒抗原检出率分别是 8/10和 6/10。第 13天, 泄殖腔内病毒抗原检出阴性。NDV灭活疫苗免疫 60 d后攻毒, 第 2天有 7/20口腔和 8/20泄殖腔检出阳性, 并一直到攻毒后第 14天。非免疫对照鸡攻毒后第 3天直到死亡时, 口腔和泄殖腔均可检出病毒抗原。对各地临床上无任何症状的 NDV免疫鸡群检测发现, 泄殖腔 NDV抗原阳性率 0%~ 9.3%, 分离到 8株 NDV流行毒株, 生物学试验证实这些毒株的毒力属中等毒力偏强或强毒。

关键词 新城疫病毒 免疫鸡群 检测 防制

Abstract An indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (IS-ELISA) was described for detecting the viral antigens in the oral cavity or/and cloaca of NDV infected chicken by using the antibody ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) of SPF chicken against NDV as captor, the antiserum ($1: 200\sim 600$) of rabbit anti-purified NDV reproduced with Vero cell as the second antibody, and the goat anti-rabbit IgG ($1: 5000$) conjugated with peroxidase as indicator. The positive rate of the viral antigen in the cavity was 4/10; but lower (0~ 1/10) in the cloaca at the second day post-vaccination with avirulent NDV₄, and lasted 18 days. While the immunized chicken was dropped in nasal route, the protective efficiency was 100%. The viral antigens in the oral cavity and cloaca were positive at 8/10 and 6/10 respectively, but eliminated at only 13 days post-challenged in the oral cloaca. For 60-day immunized chicken with NDV oil emulsion of inactivated vaccine, the positive rate of viral antigen in the oral cavity and cloaca was 7/20 and 8/20 respectively at the second day post-challenged, and lasted 14 days. But the non-immunized chicken was positive from the first day detecting to dead. The viral antigen in the cloaca from several chicken farms in different areas was positive ranging from 0% to 9.3% by IS-ELISA, and eight strains of NDV were isolated and distinguished. The biological studies showed their virulences belonging to mesogenic or velogenic strains.

Key words new castle disease virus, immunized chicken, detection, control

中图法分类号 S858.31

鸡新城疫 (ND)始终是围绕我国养鸡业发展的一种高度接触性传染病,危害很大。对 ND的防制一直

受到各级部门及养殖者的高度重视,虽然各类型疫苗的普遍长期使用遏制了 ND的爆发流行,但在全国范围的免疫鸡群内仍不断发生非典型 ND,临床表现及病理变化与早期的 ND典型症状明显不同,出现了新的特点,新的规律和新的变化,持续周期长,发病率

1997-05-28收稿

* 广西区科委资助课题

及死亡率并有逐年上升的趋势。

对非典型 ND 的发生原因,国内专家学者有不同的看法。在排除疫苗本身质量,保管运输环节可能存在的偶发因素外,概括起来还有:雏鸡高母源抗体的干扰;免疫接种程序和方法不当;其它疫病或疾病的干扰;营养不良;恶劣的环境因素等。但对引发非典型 ND 的根本原因——ND 流行野毒本身却缺乏应有的认识和研究。本文通过对实验免疫和攻毒鸡,以及现地免疫鸡群外分泌物中病毒抗原的检测,旨在说明新城疫流行野毒能够在免疫鸡群长期持续存在这一事实,并提出新的防制方法供同行商榷。

1 材料和方法

1.1 种毒和疫苗

NDV₄ 冻干疫苗由哈尔滨兽医研究所制备, EID₅₀ 为 10^9 /0.1 mL, HA 效价为 2^2 ; ND 油乳剂灭活疫苗采用常规方法制备,内水相 NDV₄ HA 效价为 2^2 ; F₄₈ E₇ 强毒由中国兽药监察所提供,对雏鸡最小致死量为 10^7 /0.1 mL,分装后于 -20°C 冻存。

1.2 试验材料

某种鸡场提供的伊沙维公鸡,饲养于负压隔离器中,免疫时和攻毒前后分别测定 HI 抗体效价。非免疫鸡胚由郊区鸡场提供。SPF 鸡抗 NDV 标准阳性血清的制备参阅文献 [1]。

1.3 试验鸡外分泌物的采集和处理

1.3.1 新城疫 V₄ 免疫组 NDV₄ 冻干疫苗经灭菌生理盐水适当稀释,用定量滴管直接送入鸡食道下部 0.5 mL,免疫接种 35 只母源抗体为零的 50 日龄鸡,每只鸡接种常规免疫剂量 2.5×10^6 EID₅₀。免疫后第 2 天开始采样,隔日随机采样 10 只鸡,直到第 18 d,共 9 次。此为第 I 组。

1.3.2 NDV₄ 免疫鸡攻毒组 NDV₄ 免疫后第 21 天,使用 NDV F₄₈ E₇ 滴鼻攻毒,每只鸡剂量为 10^5 ELD₅₀ \times 50% L。攻毒后第 1 d 开始,隔日随机取 10 只鸡采样,直到第 13 天,共 7 次。此为第 II 组。

1.3.3 NDV 灭活苗免疫鸡攻毒组 取 12 日龄雏鸡 40 只,每只皮下注射 NDV 灭活苗 0.2 mL,免疫后 2 个月,用强毒 F₄₈ E₇ 滴鼻攻毒,剂量同上。在攻毒后第 1 天开始,隔日取 20 只鸡采样,直到第 13 天,共 7 次,此为第 III 组。

1.3.4 非免疫鸡攻毒对照组 取 12 只 35 日龄抗体阴性雏鸡,用上述剂量滴鼻攻毒后作为对照。在攻毒后第 1 天开始,隔日逐只鸡采样,直到死亡,共采 4 次。此为第 IV 组。

1.3.5 样品处理 每次采样用无菌棉拭子分别沾取

口腔和泄殖腔样品放入 1 mL 盐水内,测定前至少冻融 1 次,离心取上清待测。口腔和泄殖腔阴性对照样品在免疫前采集,各 35 份。

1.4 现地鸡群泄殖腔样品的采集和处理

泄殖腔样品取自国内不同地区的 9 个鸡场的蛋种鸡,共 1 056 份,直接放入灭菌的小瓶中低温保存并立即送往实验室,然后加入含有青霉素 1000 IU/mL 和链霉素 $1000 \mu\text{G}/\text{mL}$ 的生理盐水 1 mL, -20°C 冻存。测定前融化,离心取上清。采样的同时,随机采血分离血清,采用 β -微量法测定各鸡群的 HI 抗体。

1.5 检测方法

采用双抗体间接夹心 ELISA,以方阵法测定各抗体的最佳使用浓度,SPF 鸡抗 NDV IgG 为 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$,兔抗 Vero 细胞培养提纯病毒阳性血清为 1:200~600 稀释,酶标记羊抗兔 IgG 为 1:5 000 稀释,具体的操作程序参阅文献 [1]。ELISA 阳性临界值的确定参阅文献 [2]。

1.6 现地鸡群 NDV 的分离和鉴定

选出 ELISA 阳性的泄殖腔上清样品,于 4°C 放置 6 h,每个样品接种 5 只 9 日龄非免疫鸡胚,逐只收集接种 24 h 后的死胚尿囊液,无菌检验,用 β -微量法测定血凝价 (HA) 用 SPF 鸡抗 NDV 标准阳性血清进行病毒的特异性鉴定。病毒对鸡胚的最小致死剂量 (MLD) 和平均致死时间 (MDT) 测定采用常规方法 [3]。

2 结果

2.1 免疫感染鸡血清 HI 抗体的变化

NDV₄ 免疫后 7 d,雏鸡开始产生抗体,滴鼻攻毒时 HI 抗体平均值为 $2^{4.8}$,攻毒后 7 d HI 升至 $2^{9.75}$,第 14 天时达 2^{10} 以上,全部健活。第 III 组灭活苗免疫时 HI 抗体为 $2^{2.75}$,7 d 后 HI 抗体开始上升,第 60 天攻毒时 HI 抗体分布在 2^{3-7} 之间,滴鼻攻毒后 12 d HI 抗体升至 2^{7-11} ,免疫鸡全部健活。12 只非免疫对照鸡攻毒后第 3 天死亡 2 只,第 6 天死亡 6 只,第 8 天死亡 4 只。剖检为典型 ND 病变。

2.2 试验鸡外分泌物中病毒抗原的检测

首先以免疫前采集的口腔、泄殖腔样品各 35 份为阴性对照,确定阳性结果临界值。以待检样品平均 OD 值 \geq 阴性对照平均 OD 值 + 2.2 标准差者判为阳性。

检测结果见表 1,NDV₄ 免疫后第 2 天就从鸡口腔检出 4/10 的病毒抗原,第 6 天、第 8 天时分别下降至 1/10 和 2/10,到第 10 天又升至 10/10,并一直

持续到第 18 天。表明 NDV₄ 在雏鸡气管处增殖有一个过程,当饲养环境充满 NDV₄ 时, V₄ 就可在鸡气管处长期持续存在。造成这种现象的原因可能与封闭式隔离器饲养,较高的鸡群密度和 V₄ 病毒的耐热特性使病毒长期存活于隔离器内有关,使病毒反复感染免疫鸡的呼吸系统。相反,泄殖腔中病毒抗原检出率一直较低,仅为 1/10,这可能 与免疫鸡一次性接受的病毒量较低有关,这已得到有关试验证实^[4]。V₄ 免疫鸡在攻毒后第 1 天就可从 8/10 口腔和 6/10 泄殖腔中查到病毒抗原,至第 7 天达到高峰后逐渐降低。在第 13 天时泄殖腔中即查不到病毒抗原,但仍能从 7/10 口腔中查到。说明 V₄ 免疫鸡能很快清除强毒在鸡肠道中的存在,但不能完全抑制强毒的复制。口腔中较高的病毒抗原检出率可能与鸡群中普通存在的 V₄ 病毒有关。第 III 组灭活苗免疫鸡攻毒后第 1 天 7/20 口腔和 8/20 泄殖腔检出阳性,并一直持续到攻毒后第 14 天,仍能检出病毒抗原。说明灭活苗免疫鸡不能有效的清除强毒在鸡口腔和泄殖腔内的存在,非免疫对照鸡攻毒后第 1 天就可从口腔、泄殖腔中查到病毒抗原,并一直持续到死亡。

2.3 现地鸡群泄殖腔中病毒抗原的检测

据调查,各采样鸡群在临床上表现正常,全期未曾发生非典型 ND,并已分别有 2~ 10 个月的正常产蛋记录,种蛋孵化率正常。在开产前 2 周~ 4 周均用 NDV 油乳苗注射免疫,其中除 E 鸡场为新建场地,从未使用过 NDVI 系疫苗外,其它鸡场均已具有数年以上的养鸡和曾发生非典型 ND 的历史,并多年使用 NDVI 系疫苗。本研究从 9 个鸡场共采集泄殖腔样品 1 056 份,病毒抗原阳性总检出率约为 4.0%。各鸡场的阳性检出率如表 2,从表 2 可看出,各鸡群的 HI 抗体滴度随鸡龄增加呈明显下降趋势,离散度也

Table 2 Detection and isolation of newcastle disease virus (NDV) from nine chicken farms

鸡场 Chicken farm	周龄 Age (week)	HI (log 2)	样品数 No. samples	阳性数 No. positive chickens	检出率 Rate of NDV of chickens (%)	HA (log 2)	MLD (lg 10)	MDT
A	20	8~ 11	100	6	6	8	6.8	68.6
B	75	3~ 8	90	4	4.4	4	7.5	54.0
C	70	2~ 8	150	14	9.3	6	6.5	61.6
D	43	7~ 10	225	5	2.2	5	7.0	64.8
E	61	5~ 10	135	0	0	*	-	-
F	26	7~ 11	60	5	8.3	7	7.2	60.8
G	31	7~ 11	100	3	3	6	7.6	41.9
H	62	4~ 8	100	3	3	6	7.0	51.2
I	52	4~ 10	96	2	2.1	6	7.2	54.6

* 未进行病毒分离 The isolation of virus hasn't been done.

增加,但与病毒抗原的阳性检出率无明显相关性。而阳性检出率却与饲养方式直接相关,平养的 C 和 F 鸡群阳性率明显偏高,而其他笼养鸡群却较低。

表 1 试验鸡外分泌物中病毒抗原的检测结果

Table 1 Number of viral antigens in the oral and cloaca of chickens used in the trials

采样次数 No. Sampling	病毒抗原阳性数* Number of chickens with viral antigens positive							
	口腔 Oral cavity				泄殖腔 Cloaca			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	4/10	8/10	7/20	3/12	0/10	6/10	8/20	11/12
2	6/10	6/10	20/20	8/10	1/10	7/10	20/20	10/10
3	1/10	8/10	20/20	10/10	0/10	5/10	15/20	10/10
4	2/10	9/10	11/20	4/4	0/10	10/10	18/20	4/4
5	10/10	4/10	10/20	-	1/10	5/10	16/20	-
6	9/10	4/10	14/20	-	0/10	3/10	19/20	-
7	9/10	7/10	9/20	-	1/10	0/10	12/20	-
8	10/10	-	-	-	1/10	-	-	-
9	10/10	-	-	-	1/10	-	-	-

* 分母为试验鸡数 The denominators are number of chickens used in the trials.

2.4 病毒的分离和鉴定

基于本研究目的是分离代表各免疫鸡群的病毒并测定它的毒力,因此为提高病毒分离的成功率,本试验将 ELISA 检测的阳性样品等量混合后再接种敏感鸡胚,结果如表 2,除 E 鸡群未进行病毒分离外,其他鸡群均分离到病毒,SPF 鸡抗 NDV 标准阳性血清能特异抑制各病毒分离物的血凝性,证实各分离物为 NDV。各分离病毒对敏感鸡胚的平均致死时间处于 41.9 h~ 68.6 h 之间,根据 NDV 的毒力标准 (30 h~ 60 h 为强毒株,60 h~ 90 h 为中等毒力株)判定,这些毒力主要为中等毒力偏强和强毒株。

3 讨论

目前在我国非典型 ND 的发生已是普遍现象,有关非典型 ND 发生的流行病学研究也时有报道^[5,6]。

对实验室内 NDV 弱毒苗免疫鸡和攻毒鸡、NDV 油乳苗免疫攻毒鸡以及非免疫攻毒鸡外分泌物中病毒抗原的检测表明,NDV 强毒可以在免疫鸡体内长期持续存在,此为非典型 ND 的发生提供了必备的条件。同时也能看到,NDV 弱毒苗免疫鸡能很快清除强毒感染,而灭活苗却不能,充

分说明了局部免疫在消除和防制非典型 ND中具有重要的作用

选择临床上 NDV 灭活苗免疫的蛋种鸡开展流行野毒的流行病学调查有其内在的原因,在目前尚无可靠的快速鉴定 NDV 强弱毒的有效办法条件下^[7],主要目的还是为了尽量避免疫苗病毒对检测和分离结果的干扰。已有报告^[8]指出,NDV 弱毒苗免疫鸡泄殖腔不会检测到病毒抗原,我们的结果也说明 NDV 弱毒苗免疫鸡泄殖腔即使有病毒抗原存在,其检出率也很低(1/10),而 NDV 强毒实验感染鸡泄殖腔却有 100% 的病毒抗原检出率,因此,对现地蛋种鸡群泄殖腔的阳性检出结果,客观上可以认为是 NDV 流行野毒所致

本研究从 9 个临床上健康的免疫鸡群分离出 8 株 NDV 流行野毒,说明 NDV 野毒在各地免疫鸡群内的污染已相当严重。毒力测定表明,这些分离株对鸡胚的平均致死时间为 41.9 h~ 68.6 h,属于中等毒力偏强,而又比标准强毒偏弱的毒株。出现如此毒力,数量又众多的 NDV 野毒源的原因?可能是一 NDV 自身的特性,它众多的自然宿主使 NDV 能够快速扩散;二是饲养管理体制的问题,对饲养环境的保护重视不够,缺乏有效的防疫隔离措施,致使 NDV 野毒污染日益严重;三是本文提出的有关 NDVI 系疫苗的使用问题,这也是长期被人们忽视的一个问题。NDVI 系疫苗株为中等毒力,在我国大规模应用已达 20 年。从生物进化的角度讲,所有生物都是在与外界环境相互作用过程中向着适于自己生存的方向不断演变,以求与环境或宿主达到某种平衡,长期存在,NDV 也不例外。早在 1984 年以前已有报告^[9]指出,NDV 病毒株是一个异质性群体,通过蚀斑技术发现同一病毒株可以形成大小不一,蚀斑类型不同的新病毒株,表现出对宿主的致病力差异很大,并处于不断的演变之中。可以预料,在国内 NDV 免疫普遍且强大的免疫压力下,由异质性群体构成的 NDV I 系疫苗,在机体内会向着不同的方向演变,那些毒力较弱且繁殖能力差的个体在免疫压力下很快被机体清除,临床上表现出疫苗免疫效力下降和持续期明显缩短。其余那些毒力较强且繁殖能力也强的个体在与免疫压力的斗争中会有部分能够突破机体的防御得以生存,继续进化,表现出更能适于机体生存,毒力较原始毒株也有所增强且更具多变性,最终达到与较高免疫水平相平衡的状态,使这些毒株能长期持久地存在于免疫鸡群中,而一旦鸡群受到应激或其他因素干扰致使鸡群体质或免疫水平下降时,这些潜伏的

毒株就会大量增殖,突破机体的防御系统,临床上表现出非典型 ND 如此循环,必然导致饲养和自然环境中这些新毒株在数量上和毒力上都有明显的提高逐步演变成流行野毒,此时也相应要求免疫鸡群的免疫水平也要不断提高,才能抵御这些毒株的侵袭,否则非典型 ND 的发生就不可避免。可以说目前国内非典型 ND 的不断发生,强度不断增大的根本原因主要源于此。当然,如能在核苷酸水平上阐明 NDVI 系疫苗株与目前免疫鸡群流行野毒的遗传相关性,将对非典型 ND 的防制具有重大的现实意义。

根据研究结果和推断,对非典型 ND 的防制需要制订一个长远的规划和全国协调一致,具体来讲就是分二步走。首先就是停止使用 NDV 中等毒力疫苗,用缓发性疫苗和油乳苗联合应用,或寻找免疫效果相当的替代疫苗,虽然这样作会增加防疫费用,但从长远来看是值得的。目前我们正在这方面做有益的尝试,也获得了较好的结果。其次视国内非典型 ND 防制现状,即根据采取第一步措施的效果,决定何时停止使用缓发性疫苗,用无毒力疫苗取而代之。彻底杜绝任何可演变成野毒的疫苗株的使用,最终达到净化环境的目的。

参考文献

- 1 吴宝成,徐振东,孙建宏等.间接夹心 ELISA 检测新城疫病毒抗原.黑龙江畜牧兽医,1994,(9):7-9.
- 2 吴宝成,荆汝顶.确定 ELISA 试验阳性临界值的探讨.中国动物检疫,1994,11(5):15-16.
- 3 蔡宝祥,殷震,谢三星等.新城疫.动物传染病诊断学.南京:江苏科学技术出版社,1993.177-181.
- 4 Spradbrow P B, Samuel J L, Ibrahim A L. Serological response of chickens to oral vaccination with NDV. Vet Microbiol, 1988, 16: 255-262.
- 5 赵学良,李建玲,吴军生等.几起鸡 ND 疫情流行病学调查报告.见:中国畜牧兽医学会禽病学分会第八次学术讨论会论文集.青岛:中国畜牧兽医学会禽病学分会,1996,139.
- 6 张慎行.农村散养鸡群感染 ND 的调查及原因浅析.见:中国畜牧兽医学会禽病学分会第八次学术讨论会论文集.青岛:中国畜牧兽医学会禽病学分会,1996,139-140.
- 7 曹殿军,卢景良,王莉林等.应用单克隆抗体鉴别新城疫病毒强、弱毒株的研究.中国畜禽传染病,1996,(5):36-38.
- 8 陈昌海,张如宽,刘秀梵.用单夹心 ELISA 自免疫鸡群检测新城疫病毒.中国畜禽传染病,1993,(4):28-31.
- 9 李德山,李维义.新城疫病毒红旗株的蚀斑形态及其生物学特性的研究.家畜传染病,1984,(1):15-19.

(责任编辑:蒋汉明)