

鸭坦布苏病毒冻干高免卵黄抗体的研制

王红琳 卢 琴 罗青平 张蓉蓉 温国元 商 雨 邵华斌*

湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/农业农村部畜禽细菌病防治制剂创制重点实验室,武汉 430064

摘要 本研究用鸭坦布苏病毒病灭活苗三次免疫 SPF 蛋鸡,收取高免鸡蛋,制备成冻干高免卵黄抗体;用鸡胚中和试验和间接 ELISA 方法进行效价检测。试验结果显示,第 3 次免疫后 2 周,卵黄抗体中和效价为 1:103.5,4、5 周达到最高值 1:104.5;间接 ELISA 方法检测冻干前后的抗体效价结果均为阳性;对鸭坦布苏病毒强毒的攻毒保护率达 100%,可为鸭坦布苏病毒的防控提供一种有效的冻干高免卵黄抗体制剂。

关键词 鸭;坦布苏病毒;卵黄抗体;冻干制剂;抗体效价

鸭坦布苏病毒病是由黄病毒科、黄病毒属的坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)引起的以产蛋鸭产蛋量骤降和雏鸭或育成鸭出现神经症状为主要特征的一种新型急性传染病,又称为鸭出血性卵巢炎、鸭黄病毒病。以种鸭、蛋鸭产蛋量急剧下降,产蛋率从产蛋高峰 90%左右下降至 10%不等;雏鸭发生神经系统症状甚至死亡为主要特征^[1-2]。自 2010 年暴发以来,该病在我国大陆地区广泛传播,给国内的家禽养殖业造成了严重的经济损失。该病传播迅速,蔓延范围广,给养鸭业造成了严重的经济损失^[3-4]。卵黄抗体(IgY)是预防和紧急治疗该病的有效防制剂^[5],由于常规卵黄抗体一般为液体,质量不稳定、副作用大、体积大运输不便。因此,本试验通过用鸭坦布

苏病毒灭活疫苗免疫 SPF 蛋鸡后,收集卵黄进行 IgY 的提纯和冻干研究,旨在克服常规卵黄抗体的缺陷,达到有效预防和治疗该病的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1)毒种:鸭坦布苏病毒(DTMUV)JL2011 株,由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所兽医研究室分离、保存。

2)鸭坦布苏病毒病灭活苗:由本实验室制备,将 DTMUV JL2011 株接种 SPF 鸡胚,按常规方法^[6]制备成油乳剂灭活苗,每毫升疫苗至少含灭活前的鸭坦布苏病毒 106.0 EID₅₀,质量检验合格,备用。

收稿日期:2020-11-16

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0500800,2017YFD0500803);国家水禽产业技术体系(CRAS-42-47);湖北省农业科技创新中心项目(2016-620-000-001-025)

* 通讯作者

王红琳,女,1966 年生,副研究员。



及免疫器官指数的影响 [J]. 中国畜牧杂志,2016,52 (13):73-76,100.

[9] 郝丹丹,张旭,陈嘉,等.牛至油对成年蛋鸡生长性能和免疫功能的影响[J].中国兽医学报,2017,37(6):1121-1127.

[10] 早克然·司马义,于洋,麦合苏木·艾克木,等.牛至草水提物的抗炎、止咳、祛痰及体外抗氧化作用研究[J].新疆医科大学学报,2017,40(12):1580-1584.

[11] 李定刚,韩愈杰,刘亚川,等.不同工艺来源的牛至提取物对小鼠大肠杆菌性腹泻防治作用的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医,2020

(16):130-133,166.

[12] 窦茂鑫,赵迪,侯水清,等.饲料添加剂牛至油中香芹酚和百里香酚含量的测定[J].饲料工业,2013,34(20):12-14.

[13] 孙丽娟,刘红兵,许汉林,等.湖北产牛至药材中香荆芥酚和麝香草酚的含量测定[J].中药材,2005(7):562-563.

[14] 王怡童,王沙沙,方芳,等.环糊精辅助提取原理及其在天然产物分离中的应用[J].机电信息,2017(8):36-41.

【责任编辑:胡 敏】

3)SPF 鸡胚: 由北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司提供的 SPF 种蛋, 在实验室孵育至 9 日龄, 备用。

4)SPF 蛋鸡: 由北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司提供的 SPF 种蛋, 在实验室孵育至所需日龄, 隔离饲养备用。

5)雏鸭: 由湖北宜城某养殖场提供种蛋, 在实验室孵育至 7 日龄, 且鸭坦布苏病毒抗体为阴性者用于试验。

1.2 试验方法

1)蛋鸡的免疫及高免鸡蛋的收集。用 DTMUV 灭活苗免疫接种 90 日龄 SPF 蛋鸡 50 只。首免, 每只鸡肌肉注射灭活苗 1.5 mL; 间隔 14 d 后进行第 2 次免疫, 每只鸡 2.0 mL; 二免后间隔 14 d 进行第 3 次加强免疫, 每只鸡 2.0 mL。第 3 次加强免疫后第 14 天开始收集鸡蛋。做好记录和标记, 置于 4~8 °C 储存备用。

2)卵黄抗体(IgY)的提取。将收集的鸡蛋用清水冲洗干净后, 浸入水温 42 °C 的 0.1% 新洁尔灭水溶液中消毒 15~20 min, 随后将鸡蛋用福尔马林密闭熏蒸消毒 30 min。采取手工打蛋, 充分除去蛋清、胚盘和系带, 收集卵黄于一洁净容器内, 充分搅拌使蛋黄呈均匀膏状, 然后加入等体积经 65 °C 30 min 消毒并冷却的蒸馏水, 搅拌混匀后, 60~65 °C 加热灭活 8~15 min。先加入相当于原卵黄体积 4 倍, 用盐酸调 pH 为 4.2 的蒸馏水, 将水温降至 1~4 °C, 加入灭活的蛋黄液, 边加边搅拌, 之后 4~8 °C 保温静置 4 h, 离心分离上清液; 加入辛酸至终浓度为 0.02%, 搅拌混匀, 室温静置 2~4 h。用尼龙滤布粗滤, 再用超滤膜过滤浓缩, 备用, 取样待检。

3)鸡胚中和试验。用灭菌生理盐水将萃提的 IgY 做 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 倍稀释, 分别与 100 倍 ELD₅₀ 的鸭坦布苏病毒等比混合, 37 °C 作用 1 h,

接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 0.2 mL/枚, 各 5 枚, 同时设病毒对照组和 10² 倍稀释的未免疫的 SPF 鸡蛋卵黄对照组, 7 d 内观察鸡胚死亡情况, 用 Reed-Muench 法计算卵黄抗体中和效价。

4)冻干。取萃提后无菌检验合格的 IgY 溶液加入脱脂牛奶、蔗糖等作为稳定剂, 充分摇匀, 定量分装, 迅速进行冷冻真空干燥(按《中华人民共和国兽用生物制品规程》2000 年版附录进行)。

5)IgY 冻干前后的效价检测。随机抽取冻干前后各 3 瓶样品, 采用间接 ELISA 方法^[7]检测其效价, 同时设非免疫鸡蛋的卵黄作为对照。

6)攻毒保护试验。将 20 只健康 7 日龄雏鸭随机分成 2 组, IgY 免疫组 10 只, 对照组 10 只, 免疫组每只雏鸭皮下接种制备的冻干卵黄抗体 0.5 mL, 24 h 后免疫组和对照组均肌肉注射 DTMUV 强毒株, 隔离饲养, 观察 14 d。

2 结果与分析

2.1 鸡胚中和试验

将第 2 次免疫后 2 周到第 3 次免疫后 8 周收集的鸡蛋分为 9 组, 分别取样进行鸡胚中和试验。结果表明, 第 3 次免疫后 2 周 IgY 溶液的鸡胚中和效价达到 1:103.5, 与邹晓娟^[8]研究结果高度一致; 三免后 4 周、5 周达到最高(1:104.5), 有效中和效价一直持续到三免后 7 周, 8 周下降至 1:103.0(图 1)。

2.2 IgY 冻干前后的效价检测

间接 ELISA 方法检测结果如图 2, 冻干前(免疫组 1~3)、冻干后(冻干卵黄组 1~3)的特异性明显高于非免疫组, 判定标准为 S/N ≥ 2.1 为阳性。说明 IgY 冻干前、后效价保持一致, 冻干对效价没有影响。

2.3 攻毒保护试验

IgY 免疫组 10 只鸭免疫卵黄抗体 24 h 后, 肌

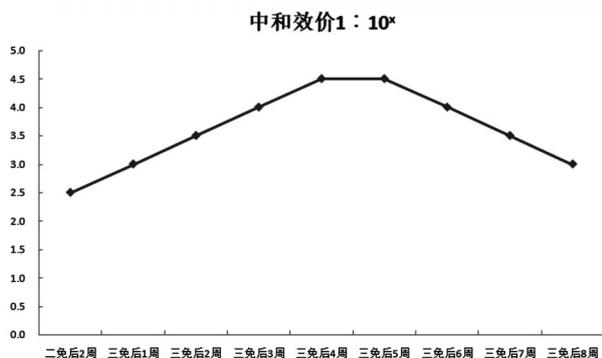


图 1 DTMUV 灭活苗免疫蛋鸡后 IgY 抗体消长规律

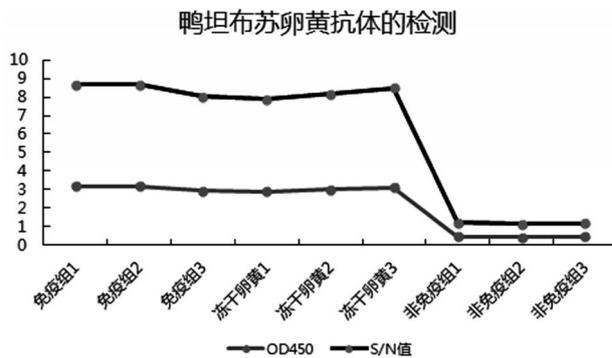


图 2 鸭坦布苏病毒卵黄抗体冻干前后的效价检测结果

肉注射 DTMU 毒株后第 3 天有 2 只鸭出现减食、精神萎靡、腹泻等症状,持续 2~3 d 后逐渐恢复正常,未出现死亡,保护率达 100%,观察 14 d 后对鸭进行剖检,均无肉眼可见的病理变化;对照组的 10 只雏鸭在攻毒后 3 d 开始出现减食、精神萎靡、腹泻

等症状,并有部分鸭出现转圈、运动失调等神经症状,随后陆续死亡 8 只,死亡鸭剖检均可见肝脏肿大、淤血、坏死、脾脏肿大、心肌出血等病理变化,观察 14 d 后,剖检发病未死亡的 2 只鸭,可见肝脏、脾脏肿大等病理变化,保护率 20%(表 1)。

表 1 冻干卵黄抗体的攻毒保护试验结果

组别	攻毒数/只	发病数/只	死亡数/只	发病率/%	死亡率/%	保护率/%
免疫组	10	2	0	20	0	100
对照组	10	10	8	100	80	20

3 讨论

1)本研究用鸭坦布苏病毒病灭活苗三次免疫产蛋鸡,收取高免鸡蛋,将萃提的 IgY 溶液制成冻干制剂后,其效价没有发生改变,克服了常规水剂卵黄抗体的缺陷,具有质量稳定、副作用小、无残留、易于保存、运输方便等优点,为鸭坦布苏病毒的防控提供了一种有效的冻干高免卵黄抗体制剂。

2)间接 ELISA 方法是血清学中较常用的检测方法之一,具有特异性强、灵敏度高及检测速度快等特点,目前广泛应用于动物的疾病诊断及疫苗效果的评价方面,本试验证明也可用于卵黄抗体的免疫效价评价,与施少华等^[7]研究结果相吻合。

3)本研究制备的冻干卵黄抗体对 7 日龄雏鸭的免疫攻毒保护试验结果表明,未免疫卵黄抗体健康雏鸭的发病率达 100%,死亡率达 80%;而卵黄抗体免疫组的死亡率为 0%,保护率达 100%,说明卵黄抗体能够有效保护鸭坦布苏病毒强毒的攻击。冻干卵黄抗体对产蛋鸭的免疫攻毒保护试验及临床应用效果有待于下一步研究。

4)鸭坦布苏病毒病一年四季均可发生,在防控中使用高免卵黄抗体时应注意以下几点:①早发

现、早诊断、早治疗;②疫苗免疫失败后可用高免卵黄抗体紧急预防接种加以控制,减少死亡;③注射高免卵黄抗体时为防止局部感染,可同时投喂 2~3 d 的广谱抗生素效果更好。

参考文献

- [1] 王彩霞,冯春燕,林祥梅,等.鸭坦布苏病毒病的研究进展[J].畜牧与兽医,2019,51(11):137-142.
- [2] 韩青,赵丽青,许美玲,等.鸭坦布苏病毒病研究进展[J].动物医学进展,2015,36(5):103-106.
- [3] 刘志刚,孙青松,姚蓉,等.鸭坦布苏病毒研究进展[J].中国动物传染病学报,2013,21(1):81-86.
- [4] 朱丽萍,颜世敢.鸭坦布苏病毒研究进展[J].中国预防兽医学报,2012,34(1):79-82.
- [5] 胡紫霞,王汉清,王立,等.抗鸭坦布苏病毒病卵黄抗体的制备及应用试验[J].中国动物检疫,2013,30(7):49-51.
- [6] 李振华,李小康,郭香玲,等.鸭坦布苏病毒灭活油乳苗的制备及免疫效力测定[J].中国预防兽医学报,2013,35(5):388-391.
- [7] 施少华,傅光华,万春和,等.检测鸭坦布苏病毒卵黄抗体间接 ELISA 方法的建立[J].养禽与禽病防治,2012(2):2-4.
- [8] 邹晓娟.鸭坦布苏病毒高免卵黄抗体的研制[J].山东畜牧兽医,2013,34(11):15-16.

【责任编辑:胡 敏】