

鸡致病性大肠杆菌油乳剂灭活苗的制备

卫春晓¹ 刘俊玲²

1.河南省济源市动物卫生监督所,河南济源 459000;

2.河南省洛阳高新区畜牧兽医防疫检疫中心,河南洛阳 471000

摘要 从一鸡场患病鸡体内分离出 1 株鸡致病性大肠杆菌,将分离的菌株扩增、灭活,制备成油乳剂灭活苗。对灭活苗进行物理性状、安全性、保护力等检验,确认合格后,对鸡场进行免疫,效果良好。该油乳剂灭活苗对本场鸡有较好的保护作用。

关键词 鸡;大肠杆菌;致病性;灭活苗

禽大肠杆菌病是由致病性大肠杆菌引起的急性或慢性传染病。各种禽类均易感,各个品种、日龄的鸡均可发病。随着养殖场户防疫意识的不断提高,诸如新城疫等病毒性疫病基本得到有效控制。与此同时,细菌性疫病却往往被忽略,特别是大肠杆菌病的发生和流行有越发严重的趋势,给养禽业带来巨大损失,而大肠杆菌的血清型极多,我国已报道的鸡致病性血清型已有 50 个,且各血清型之间没有或很少有交叉保护,给疫苗免疫带来一定困难,相比之下,利用本场病死禽制备灭活苗针对性强,能得到较满意效果。

1 材料与方法

1.1 致病菌株

某鸡场病死禽,典型包心、包肝变化。无菌采取病鸡肝脏,37℃麦康凯琼脂培养基上进行分离培养 16 h 后,挑取单个紫红色菌落,再次接种于麦康凯琼脂培养基上,经 3 次纯化。

1.2 菌种鉴定

1)形态特征。对分离到的菌株进行革兰氏染色镜检。

2)生化试验。对分离到的菌株进行生化试验,包括五糖(葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇和蔗糖)发酵试验、M-R/V-P 试验、吲哚试验和三糖铁试验。

3)致病性试验。将分离的菌株用普通肉汤培养基培养 24 h,培养物接种于 5 只成年小白鼠(腹腔注射,0.5 mL/只)。同时,另取 5 只成年小白鼠注射无菌生理盐水作对照,观察菌株对小白鼠的致病性。

1.3 大肠杆菌油乳剂灭活疫苗的制备

1)菌株的培养。将分离的菌株接种于普通肉汤,37℃培养 24 h,计数板菌落计数,菌液含菌量为 10^{12} 个/mL,用灭菌生理盐水菌液做 10 倍稀释,使含菌量为百个每毫升。

2)水相制备。取上述菌液 192 mL,逐级加入甲醛,使甲醛终浓度达到 0.4%,37℃灭活 48 h,经无菌检查合格后,加入吐温-80 8 mL,混匀即为水相。

收稿日期:2015-04-28

卫春晓,男,1987 年生,助理兽医师。

地区放牧。严格做好检疫和消毒工作,定期用 10% 石灰乳或 5% 漂白粉液对鸭舍、饲养场地、污染物及粪便等进行喷洒消毒。

2)加强饲养管理。在日粮中添加多种维生素和矿物质,以增强机体的免疫力。适度调整鸭群的饲养密度,保持鸭舍通风换气良好,避免骤冷骤热,以

减少各种疫病的诱发因素。

3)制定科学的免疫程序,预防疫病发生。根据当地疫病流行情况,科学制定免疫程序,定期进行免疫接种,预防疫病发生。

4)鸭群发病时,对病鸭及时隔离,同时对病死鸭集中深埋或焚烧作无害化处理。

3)油相制备。分别称取 10 号白油 376 mL、司班 -80 24 mL、硬脂酸铝 8 g。先取少量白油,将硬脂酸铝加入其中,充分混匀并加热溶解,再与剩余白油及全部司班 -80 混合均匀。121.5 P 116 ℃高压灭菌 30 min,即得到油相。

4) 菌苗配制。按照 1:2 的比例量取水相与油相,先将油相放入搅拌机,然后加入水相,10 000 r/min 搅拌乳化 5 min,即为油乳剂灭活苗。

1.4 疫苗质量检测

1)无菌试验。取 1 mL 灭活苗用涂布棒均匀涂布于血清琼脂平板上,37 ℃培养 48 h。观察是否有菌落生长。

2)物理性状的检测。

①稳定性检测。取灭活苗 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min,观察有无分层或破乳;

②乳化度检测。取 1 滴灭活苗滴于蒸馏水表面,观察是否扩散、消失。

3)安全性试验。随机选取 5 只成年小白鼠,于背部皮下分别注射灭活苗 0.5 mL;同时设灭菌生理盐水对照组 5 只。观察实验动物 1 周内的生长状况。

4)保护力试验。选 15 只成年小白鼠分为免疫组、生理盐水对照组、感染对照组,每组 5 只。免疫组于第 1 天每只经背部皮下免疫接种灭活苗(0.5 mL/只),感染对照组接种等量生理盐水,接种后第 14 天,免疫组、感染组小白鼠用 24 h 培养物攻击,生理盐水对照组经背部皮下每只注射 0.5 mL 灭菌生理盐水,观察 1 周内实验动物生长情况。

2 结果

2.1 菌种

培养物经 3 次纯化传代后,获得 1 株菌株,革兰氏染色呈阴性、中等大小杆菌;该菌株能够分解葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇并产酸产气,但不能利用蔗糖。M-R 试验和吲哚实验均为阳性,V-P 试验阴性、不产生硫化氢。综合判定,该菌株为大肠杆菌。

2.2 致病性实验

3 h 后实验组小白鼠精神开始萎靡,24 h 内全

部死亡。对照组全部健康存活。对小白鼠进行解剖,对比发现实验组小白鼠肝脏、脾脏出现出血坏死,呈暗红色,肠壁变薄,有出血点。取实验组小鼠肝脏做涂片,染色镜检,分离培养得到大肠杆菌。

2.3 油乳剂灭活疫苗的质量检测

1)疫苗的无菌检验。油乳苗种于血清平板后,37 ℃培养 48 h 未见细菌生长。

2)疫苗的物理性状。

①稳定性检测。疫苗经 3 000 r/min 离心 10 min 后,为均质乳白色液体。

②乳化度检测。点 1 滴灭活苗于蒸馏水表面,不向四周扩散,为油包水型。

3)疫苗的安全性。实验小白鼠注射疫苗后,短时间内(6 h)表现精神沉郁,随后观察均无不良反应,采食、饮水正常。剖检其注射部位也无异常,说明该剂量的油乳剂疫苗对试验小白鼠是安全的。实验小白鼠无异常反应。

4)免疫效力试验。感染对照组小白鼠于 24 h 后全部死亡(死亡率为 100%),免疫组于 24 h 后死亡 1 只,其余存活(死亡率为 20%)。结果表明疫苗具有免疫保护作用。

2.4 临床应用效果观察

该鸡场 1 500 只产蛋鸡经该疫苗免疫 10 日后,病鸡死亡数量由每天 10 只以上,逐渐下降至零死亡,但产蛋率未恢复至发病前水平,考虑为病程久,对输卵管损害较大的缘故。

3 讨论

致病性大肠杆菌是集约化养殖场的重要致病菌,且因其血清型多,型间交叉保护力差,使得疫苗免疫往往难以得到好的效果;采用抗生素预防与治疗容易造成药物残留,并有产生耐药菌株的情况。相比而言,该灭活苗有针对性强、保护力强、无残留和低成本等优势。但也应注意定期对鸡场致病性大肠菌进行病原血检测,不断调整灭活苗中菌株的血清型,才能使疫苗免疫发挥更好的效果。