

编 号：0162

内 部

科学技术成果报告

鸡马立克氏病冻干疫苗的研究

科学技术文献出版社

刊登国内、外广告启事

我社出版的科技刊物，学科较全，专业较广。为给国内、外各厂矿、企业、科研单位、大专院校等刊登广告提供方便，决定从即日起开辟广告栏，欢迎选用。

有关刊登广告的具体手续、价目及刊物，详见我社的“承办国内广告业务暂行办法”及“承办国外广告业务暂行办法”。此项业务请直接与我社广告组联系，统一办理。

(社址：北京和平街北口 电话：46局4504)

科学技术文献出版社

一九八〇年四月十日

科学技术成果报告

鸡马立克氏病冻干疫苗的研究

(内部发行)

编辑者：中国科学技术情报研究所

出版者：科学技术文献出版社

印刷者：中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

※

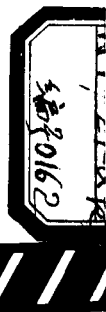
开本：787×1092¹/₁₆ 印张：1 字数：27.2千字

1980年7月北京第一版第一次印刷

印数：1—1,850册

科技新书目：165—31

统一书号：14176·48 定价：0.20元



目 录

一、研究概况	(1)
二、鸡马立克氏病疫苗株的鉴定试验	(1)
三、鸡马立克氏病强毒株的研究	(3)
四、鸡马立克氏病病理判定标准	(6)
五、鸡马立克氏病冻干疫苗的试制	(8)
六、鸡马立克氏病冻干苗的实验室内安全试验	(10)
七、鸡马立克氏病冻干苗的实验室内免疫效力试验	(11)
八、鸡马立克氏病冻干苗的野外免疫试验	(13)
九、小结	(15)

鸡马立克氏病冻干疫苗的研究

鸡马立克氏病会战小组*

一、研究概况

鸡的马立克氏病(简称MD)是由马立克氏病疱疹病毒引起的传染性肿瘤病,是鸡的主要疫病之一,在国外已存在和流行达七十年之久,尤其是自五十年代以来,随着肉用仔鸡饲养业的发展而扩大蔓延,使养鸡业遭受几乎是毁灭性的打击。自七十年代开始,国外成功地研制出火鸡疱疹病毒(简称HVT)FC-126株的冻干苗,对MD有良好的预防作用,经过近年来的广泛使用,国外一些国家的MD流行已基本受到了控制,效果非常显著。

我国自1973年在北京、上海等大城市的养鸡场中发现有MD流行以来,至今全国已有不少地方证实有此病存在,对于正在蓬勃兴起的养鸡业威胁很大,所以尽快研制出有效的预防此病的疫苗,已成为刻不容缓的事。

自1975年起,由农林部科教局和中国农林科学院组织六个科研、教学和生产单位(即哈尔滨兽医研究所、北京市农科院畜牧兽医研究所、上海市农科院畜牧兽医研究所、华北农业大学兽医系、农林部兽医药品监察所和南京兽医生物药品厂)进行MD疫苗研制的科研会战,本着“洋为中用”的原则首先解决研制国外已用之有效的HVT苗,以适应生产上的急需。会战组成立以来,在各会战单位领导的关怀和支持下,开展了一系列的试验研究工作,从引进法国的HVT FC-126株起,历经①种毒的分离培养;②种毒的特性鉴定;③冷冻苗的试制;④冻干苗的试制等阶段,在冻干苗的试制阶段中,又经历由小瓶静止培养过渡到大瓶旋转培养,以及裂解、冻干、效价测定、物理性状测定、实验室免疫效力试验、野外免疫效力试验、生产试用效果的观察等过程,不断积累试验数据。为了测定疫苗的免疫效力,必须拥有马立克氏病的强毒株和制订出一整套的病理学判定标准,所以我们也实验室中培育出两株我国自己的自然强毒株和开展了大量的病理学研究。尽管我们缺乏必要的技术资料,设备条件也相当落后,但我们发扬独立自主、自力更生的精神,终于克服了重重困难,不断取得进展。经过三年多的试验研究,至今已基本完成会战任务,并根据获得的各项试验数据,草拟出《鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒(HVT)冻干疫苗制造及检验试行规程》(草案),报请农业部审批。

现将试验资料归纳整理报告如下。

二、鸡马立克氏病疫苗株的鉴定试验

(一)疫苗株的来源:鸡马立克氏病疫苗株种毒,系用1975年进口的法国Merieux研究所生产的冻干疫苗中火鸡疱疹病毒(HVT)FC-126株~~接种于~~并以接种鸡的肾细胞二

注: *参加会战的主要人员有胡祥璧、王树信、吴志达、周俊、李定法、

代培养物再接种在鸡胚成纤维细胞（简称CEF）单层上，在CEF中传代7代后做为制造疫苗的种毒，代号为CK₂CEF₇，在-196℃保存。又把在CEF上传代9、12代的CK₂CEF₉和CK₂CEF₁₂进行冻干，保存于-10~-15℃。

（二）种毒特性：

1. 种毒CK₂CEF₇在CEF细胞培养物中的生长：细胞生长液用含5%犊牛血清的乳汉液（简称LH）。在38~39℃培养24小时的CEF单层（制备单层的细胞接种量为80~180万/毫升），接毒后48~72小时出现细胞病变（简称CPE）。CPE起初由小的折光性强的变圆细胞组成灶状病变，散发，以后小圆细胞逐渐增多，灶中心出现小空洞，细胞沿空洞的边缘积聚，随着空洞的扩大，细胞亦纷纷脱落，形成空斑，细胞老化，许多斑联成一片。此时融合细胞占优势。当CPE达到60~75%时（约在接种病毒后48~72小时）即收毒保存。接毒后换液时在细胞生长液中添加10%的199。

2. 种毒的鸡胚接种试验

（1）绒毛尿囊膜变化：用CK₂CEF_{7、8、11}代细胞毒经10倍稀释后接种于鸡胚尿囊腔、绒毛尿囊膜（10日龄胚）或卵黄囊内（6日龄胚），并设不接种的对照组。绒毛尿囊膜及尿囊腔的接种量为10⁻¹0.1毫升，卵黄囊为0.2毫升。孵化到18日龄。结果前两种接种途径的绒毛尿囊膜的痘斑出现率为14~70%，平均为40%左右，经卵黄囊途径接种的为18%。接种后的鸡胚死亡率为50~60%。对照组有2个胚出现典型痘斑，在另一次试验中接种后的鸡胚则无死亡现象。说明这次试验的鸡胚死亡原因可能与所用的有精卵不纯净有关。

（2）胚的变化：接种种毒后的鸡胚病变阳性率为14~70%，平均为43%左右。肉眼可见肝、脾肿大，肝呈绿色，有灰白色坏死灶，符合于HVT FC-126株的特征。但对对照组的胚，肝也有类似变化，可能与有精卵不健康有关。

3. 蚀斑形态：用CK₂CEF_{7、8、11、20}代种毒作蚀斑测定，各代毒在复盖琼脂后第三天出现蚀斑，第7天可肉眼计数。各代毒的蚀斑大小、形态基本是一致的。

4. 种毒电子显微镜检查：用CK₂CEF_{7、9、12、13、20}代细胞毒72小时培养物作电子显微镜检查，可见到大部分为大封套病毒粒子。有的培养物除见有疱疹病毒粒子外，并见有少量C型病毒粒子，但作为其对照的健康细胞培养物的C型粒子数量，远比接种种毒培养物的数量为多。C型粒子的出现与所用的有精卵有关，但接种毒后C型粒子反比对照的少得多的原因尚不清楚，而且还未发现用这个种毒制成的疫苗注射大量的雏鸡后有不安全的问题。

（三）种毒的稳定性：种毒在鸡胚连续传代最少12代，在安全性、免疫原性方面都未见变化（具体试验结果见实验室内免疫部分），说明法系HVTFC-126疫苗毒株是稳定的。

（四）种毒的纯检：将CK₂CEF_{7、8、9、11}代毒分别接种普通肉汤、普通斜面、沙布罗斜面、庆气肉肝汤、马血清牛心肝汤、血斜、马丁汤三角瓶培养基。除三角瓶接种1毫升外，其余接种0.2毫升，培养观察8~10天。仅第7代毒接种的马血清牛心肝汤三角瓶发生杂菌，接种小白鼠未见发病，可能系接种时污染所致。其余培养物均为阴性结果。

（五）种毒的保存期：CK₂CEF₇细胞毒在液氮中保存至少可达2年以上。CK₂CEF₉、CK₂CEF₁₂冻干毒在-10℃以下保存1~1.5年以上，免疫原性未见变化。

（六）免疫剂量：以1,000蚀斑产生单位（简称PFU）—7,000PFU的剂量免疫雏鸡的效果未见差异，而500PFU的效果不如1,000PFU的，100PFU的又不如500PFU的。说明对1日雏鸡的合适的免疫剂量是每只雏肌肉注射1,000PFU。

(七) 强毒攻毒剂量: 北京强毒京—1株第30代血毒 10^{-0} 到 10^{-3} 0.2毫升ip注射21日龄白洛克品种鸡, MD阳性率可达80~95%。对白洛克品种试验鸡, 攻毒剂量则可用 10^{-1} ~ 10^{-3} 0.2毫升, 而以 10^{-1} 0.2毫升的攻毒量所引起的MD阳性率较为稳定。

上海强毒株沪—1株血毒1毫升ip注射后的MD阳性率为55~66%以上, 故合适的攻毒量为血毒1毫升ip。

三、鸡马立克氏病强毒株的研究

(一) 京—1株的研究

1. 种毒来源: 京—1株强毒是1974年从北京郊区密云县患急性马立克氏病的白洛克肉鸡中分离出来的。病毒已适应于在1日龄农大黄雏鸡体内连续传代, 目前已传到第32代。

2. 种毒鉴定: 对传代鸡、测毒鸡的血毒及细胞毒进行了如下鉴定:

(1) 病理组织学检查: 对1,000多只传代鸡、500多只测毒鸡采取性腺、肝、肾、法氏囊、神经等进行检查, 均见到典型的MD病理组织学病变。

(2) 在传代鸡的肾细胞培养物中见到MD病毒所致的含有折光性强的圆形细胞的典型细胞病变, 有病变的细胞回归1日龄鸡, 仍能产生MD肉眼病变。

(3) MD病鸡的肾细胞培养物可在鸭胚成纤维细胞上繁殖, 有病变的细胞培养物回归1日龄鸡, 能产生典型的MD病变。

(4) 痘斑检查: 传代鸡的血浆、白细胞和鸭胚细胞培养物经卵黄囊接种于鸡胚, 可在绒毛尿囊膜上产生MD病毒所致的典型痘斑, 痘斑的出现率为80~100%。

(5) 电子显微镜检查: 电子显微镜对在鸭胚细胞上培养的MD病毒的检查表明, 这些病毒是典型B型疱疹病毒粒子, 多存在于细胞核的空泡内。

3. 毒力测定

(1) 对1日龄雏鸡的毒力测定

对1日龄农大黄雏鸡腹腔接种0.2毫升全血, 从原液到 10^{-3} 均可使80~88%的鸡发生MD。对1日龄油鸡, 10^{-2} 使93%、 10^{-4} 使46%的鸡发生MD。观察期40天。第一只鸡的致死天数为16~21日龄。

(2) 对21日龄鸡的毒力测定

①第19代全血毒对21日龄来航鸡毒力测定: 经肌肉注射0.2毫升血毒, 原液至 10^{-4} 使45~56%的鸡在82日龄内发生MD。第一只鸡的致死天数是在注毒后21~30天。

②液氮保存的京—1株第30代冻血毒对21日龄白洛克鸡腹腔注射的第一、第二次毒力测定。结果见表1A、1B。

4. 冻血保存期测定: 冻血在液氮中可保存485天。经液氮保存的冻血复壮2代后可恢复到原代毒力。

5. 免疫鸡的攻毒剂量: 对白洛克肉鸡于1日龄免疫并于21日龄攻毒的剂量, 根据测毒的情况, 可用经液氮保存三个月内的第30代冻血毒的 10^{-1} 稀释液腹腔注射0.2毫升, 这样可使对照的鸡产生80%以上的MD阳性率。

(二) 沪—1株的研究

1. 种毒来源: 1973年在沪—1鸡场发现自然感染发病并在临床上出现疑似MD症状的60~70日龄白洛克肉鸡二只, 取病鸡血液和肝、脾1:5组织混悬液接种1日龄小鸡10~15只。

表1A. 京—1株第30代冻血对21日龄白洛克鸡的第一次毒力测定

组 别	鸡 数	MD致死第一只鸡的天数	MD 阳性率 (%) *
原 液	20	16	90
10^{-1}	20	17	85
10^{-2}	21	21	90
10^{-3}	20	20	80

注：在北京所测定，冻血在液氮中保存三天。

* MD阳性判定标准：肉眼或组织学检查均需在肝、性腺、神经见到典型的肉眼或组织学的病变，并以组织学的判定为准。

表1B. 京—1株第30代冻血对21日龄白洛克鸡的第二次毒力测定

组 别	鸡 数	MD致死第一只鸡的天数	MD 阳性率 (%)
原 液	20	16	95
10^{-1}	20	20	95
10^{-2}	20	21	90
10^{-3}	20	22	89
10^{-4}	20	25	50

注：在哈兽研所测定。

第一代传代鸡的MD发病率为60~70%。目前此种毒在鸡体传递到第30代。

2. 血毒的毒力测定：进行过CF₂₂~CF₂₅代血毒的毒力测定，结果列表（表2）如下：

表2. 沪—1株CF₂₂—CF₂₅代血毒的毒力测定

稀 释 度	接 种 剂 量 (毫升)	MD阳性率 (%)
原 液	0.5	68
10^{-1}	0.5	53
10^{-2}	0.5	69
10^{-3}	0.5	61

3. 血毒保存试验

①血毒在-70℃保存75天，进行五次回鸡试验，结果是：MD阳性率平均可达67.5%。

②用在液氮-196℃保存24—406天的血毒进行五次试验，回鸡后MD阳性率达到55~69.6%。

4. 不同品种鸡的易感性试验：结果列表（表3）如下：

表3. 不同品种鸡对沪—1株的易感性比较

项 目	油 鸡	洛 浦 红	来 航	白 洛 克
鸡 数	15	15	15	15
发病日期(天)	33	33	40	56
肉眼MD	10/15	10/15	7/15	9/15
病理切片MD	11/15	12/15	11/15	9/15
易感性判定(MD%)	73	80	73	60

上表结果表明, 洛浦红品种鸡对沪—1株较为易感。

5. 接触感染试验结果列表如表4。

表4. 沪—1株接种鸡的接触感染力试验

种毒代数	强 毒 接 种 观 察			接 触 感 染			
	鸡 数	肉眼MD%	切片MD%	鸡 数	天 数	肉眼MD%	切片MD%
CF ₁₅	22	77.3	95.4	3	41	67	67
CF ₁₆	18	66	72	4	45	—	50
CF ₁₉	38	43.5	69.5	7	54	39.5	51.5
CF ₂₂	21	31	64	13	53	46	70
CF ₂₆	18	50	—	10	40	30	—

试验证明沪—1株具有高度接触感染性。

6. 沪—1株的组织培养: 在CEF和鸭胚成纤维细胞(简称DEF)单层上交替传代使之增殖, 适应后出现CPE, 初期呈圆形折光亮细胞, 成小簇, 第七天后形成葡萄串状。如经常换液, 单层可维持20天左右。以CEF₂DEF₄和CEF₆DEF₅代组织培养毒回归鸡时, MD阳性率与鸡体传代血毒的毒力相同。CEF直线传代至第18代回归鸡时, 毒力有减低趋势, MD阳性率仅达12%。

7. 沪—1株的鉴定

(1) 在小鸡体内连续传代30代, 出现规律性的MD肉眼和组织学病理变化。

(2) 在接种的鸡胚绒毛尿囊膜上, 能产生增生性病灶“痘斑”。

(3) 在组织培养物上产生典型的CPE。

8.5—碘去氧脲嘧啶(IUDR)蚀斑抑制试验: 进行了二次试验, 均取得一致的结果, 证明25微克IUDR对1:128~1:512的沪—1株的蚀斑抑制率平均达到96.35%; 50~100微克对沪—1株达到100%抑制。用新城疫病毒做对照, 对蚀斑则无抑制作用, 证明沪—1株是去氧核糖核酸(DNA)病毒。

9. 细胞结合性试验：试验结果如表 5。

表 5. 沪-1株的细胞结合性试验

组 别	接 种 材 料	中方瓶接种量	CPE的出现				备 注
			24	48	72	96小时	
试验 1	137CEF ₁₆ 2,000转30分上清	5 毫 升	—	—	—	±	发现二处有CPE 4 ~ 5 个亮细胞
试验 2	137CEF ₁₆ 3,000转离心上清	5 毫 升	—	—	—	±	发现一处有 3 ~ 4 个亮细胞
对照	137CEF ₁₆	1:10 0.5毫升	—	++	++	++	

试验结果表明，细胞培养液中不含有病毒，沪-1株是细胞结合性的疱疹病毒。

10. 鸡红细胞吸附试验：将沪-1株和新城疫病毒分别接种于GEF上，培养48~72小时，取出用1%鸡红细胞作吸附试验，结果如表 6。

表 6. 沪-1株对鸡红细胞的吸附试验

组 别	吸附条件	病 毒 滴 度			
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
新城疫病毒	室温20分	++	++	++	
	冰箱90分	++	+	-	
沪-1株	室温20分	-	-	-	
	冰箱90分	-	-	-	

试验表明，沪-1株无吸附鸡红细胞作用。

11. 电子显微镜下病毒形态的观察：曾将沪-1株的鸡胚肾细胞培养物作电子显微镜检查，观察病毒形态。在细胞核和胞浆内观察到大量的裸体病毒粒子和有核衣壳（即有封套的病毒粒子），浆内裸体的病毒粒子的直径约为100~120毫微米，在细胞核和浆内的有大封套的病毒粒子的大小约为170~200毫微米。

以上各项试验结果证明，1973年在上海分离的沪-1株强毒是马立克氏病疱疹病毒，是B群疱疹病毒。

四、鸡马立克氏病病理判定标准

京-1株和沪-1株强毒感染的试验鸡有农大黄、油鸡、白来航、白洛克等品种，用作强毒继代、测毒，和HVT冻干苗的室内、野外免疫效力试验。在这些试验鸡中可见到性腺（卵巢的病变出现率较睾丸为高）、肝、肾、法氏囊及周围神经等器官出现多形态淋巴瘤。该肿瘤由成淋巴细胞、淋巴细胞及网状细胞所组成。这两个强毒株侵害周围神经的病变率最高。

(一) 巨 检

性腺：在雏鸡的卵巢一端见有质软、致密和闪光的灰白区，或整个卵巢变成大而硬的分叶菜花样或脑样肿瘤，卵巢组织全部消失。接近性成熟的卵巢可见散在的孤立瘤块，一侧睾丸肿大呈黄色。

法氏囊有较特征性的病变。囊体显著萎缩，囊皱褶大小、厚薄不均匀。

肝、肾：幼龄小鸡的肝、肾均呈中等度肿大，育成鸡则明显肿大。在各该器官表面或/和实质中见有孤立的、较大的肿瘤结节，呈灰白色，切面平整。

腺胃：胃壁增厚，浆膜下可见白色瘤块。

心：心外膜、心肌可见孤立的灰白结节。

周围神经：腰荐神经丛、坐骨神经、臂神经、颈部迷走神经等常受侵害。病变多为单侧弥漫性或灶性粗肿，粗达正常2~3倍或更高。横纹消失，呈黄白色。发生水肿时则呈白色。

皮肤：在试验鸡中仅有个别病例显有病变。肿瘤常侵及羽毛囊，呈孤立或融合的白色结节，个别病例可见鳞片样棕色硬痂。

眼：一般在病程晚期出现眼睛异常，瞳孔边缘不整齐，虹膜色素消失，鱼眼样。

(二) 镜 检

卵巢：在皮质和髓质中见有结节性和弥散性网状细胞、淋巴细胞集聚，核呈分裂相。在免疫试验鸡中曾见淋巴样滤泡，重者可见全部初级卵泡被淋巴细胞所替代。

肝、肾的病灶位于间质中，沿血管壁向实质中呈浸润性扩张。

睾丸：在白膜或/和白膜下、精细管间见有灶性淋巴细胞浸润。

腺胃：在腺体之间、粘膜固有层中、浆膜下、肌层中可见散在的淋巴细胞浸润，并见核分裂相。

法氏囊：滤泡萎缩，皮质细胞减少或完全消失，髓质细胞坏死、液化或囊腔形成。最突出的变化为在滤泡间出现淋巴细胞浸润或淋巴细胞瘤。

心：在心肌纤维间、心外膜上见有灶性或弥漫性多形态淋巴细胞浸润。严重病例可见大面积的心肌被瘤性淋巴细胞所替代。

皮肤：呈炎症反应。有时围绕羽毛囊见有大量单核细胞集聚。常在其皮内血管周围见有浆细胞及组织细胞。病变轻者皮肤结构完整；大面积增生时，可见真皮剥脱，形成溃疡。

眼：视神经无变化。神经纤维之间可见轻度淋巴细胞浸润，并见核分裂相。在睫状肌、巩膜、脉络膜中可见淋巴细胞及浆细胞浸润。虹膜中色素颗粒减量或消失，并见单核细胞浸润。

周围神经：根据病变的特点分为A、B和C型。

A型：在不同神经干或神经丛的神经纤维间见有极致密的淋巴细胞浸润。这种细胞包括原始成淋巴细胞、成熟淋巴细胞、肿胀和增生的雪旺氏细胞。髓鞘退变，轴索很少见有变化。A型的病变率在用京-1株强毒接种的鸡中约为30%。

B型：神经纤维间的水肿最为突出，在水肿液中散在小淋巴细胞、浆细胞，还可见变质的成淋巴细胞（即所谓“MD细胞”）。此型最常发生于病程较长的病例，在内脏型马立克氏病病例中的阳性率约为40~80%。

C型：水肿极轻，散在少量灶性小淋巴细胞或/和浆细胞，多见于无临床症状病鸡，约占10~30%。

病理分型：

神经型（慢性）——以周围神经病变为主。在性腺、肝、肾、心、脾、肺中，也可见淋

巴细胞肿瘤。亦可见眼型病变。

内脏型(急性)——多在性腺、肝、肾、心、脾、肺,偶在皮肤、骨骼肌中见有淋巴细胞瘤,同时在周围神经亦见有淋巴细胞浸润病变。

两型的法氏囊都见萎缩,其滤泡间的淋巴细胞增生,可作为本病的可靠诊断指标之一。

五、鸡马立克氏病冻干疫苗的试制

在HVT FC—126疫苗株能在CEF上大量繁殖的基础上,我们于1976年6月开始在南京兽医生物药品厂试制冻干苗。至1977年12月底共试制成冻干苗38批,其中第1至第27批是结合现有生产条件用不同的方法进行比较以探索冻干苗的生产工艺的。在获得了各种数据的基础上确定了全过程的生产方法。从第28批至第38批共11批冻干苗,共试制出8,800,000多头份,平均每一个1万毫升容量转瓶可收获441,299头份。除5批由于冻干过程中发生各种原因的故障造成残余水份超过4%外,其他各批的质量均比较稳定。

(一) 单层细胞的制备

取9~10日龄发育良好的鸡胚,卵壳经消毒后,以无菌手术取出胎儿,用Hanks液洗胚体,剪弃头、四肢、内脏后,剪碎,用Hanks液浸洗2~3次后,用少量0.25%胰酶液轻洗一次,倒尽,再加0.25%胰酶液(每胚约加2~4毫升),在37.5~38.5℃水浴中消化20~30分钟,然后吸弃胰酶液,用Hanks液洗2~3次,再加入适量的营养液(含5%血清的0.5%乳汉液)吹打,用4~6层纱布过滤,制成每毫升含120~150万活细胞的细胞悬液。一般每个培养瓶用25~30只胚,分装于1万毫升容量的培养瓶中,每瓶装细胞悬液1,000毫升。在37.5~38.5℃和转速10转/小时的条件下培养,24小时内即形成良好的单层。细胞悬液作细菌培养,无菌生长时才可接种疫苗株感染的细胞。

生长液为含5%牛血清的0.5%乳汉液, pH7.0。

(二) 接 种

倒弃生长液,以新鲜消化分散的感染细胞(细胞病变达70%以上)接种,每个培养瓶加入1,000~2,500万个感染细胞。接种时将感染细胞与新制备的、每毫升含40~70万个健康细胞的悬液混合。营养液为含3~3.7%牛血清的MEM, pH7.2。接种后在同样条件下继续培养60~72小时,细胞病变达70%以上时即可收获。

(三) 收 获

倒弃营养液,每培养瓶加入25毫升的pH7.2~7.4的胰酶分散液,在室温中手工旋转约10分钟左右,细胞单层出现疏松易脱壁现象时,加入25毫升含10%牛血清的营养液,轻轻摇动,使细胞全部脱壁,倒入烧杯中,轻轻吹打后吸入离心管,用1,000~1,200转/分离心10分钟,收集沉淀感染细胞。

在每瓶收获的感染细胞中加入SPGA稳定剂100~150毫升,充分摇匀后用超声波进行裂解。

(四) 裂 解

用上海超声波仪器厂CSF—IA型超声波发生器对感染细胞进行裂解,每次裂解100~150毫升,用功率330毫安的声波处理60秒。在清洗槽内放冰水,以免溶液升温。

(五) 配 苗

每瓶感染细胞经声波处理后,再加入100~150毫升的SPGA进行稀释,充分摇匀后分装于

表 7. 十一批冻干苗试验资料 (1977年10月至12月)

疫苗批组	转 瓶		接 种	配苗量 (ml)	分装量 (ml)	裂 解		分装后存放	冻 干		备 注
	数 量	细胞数 万/ml				mA	时 间 (秒)		水份 (%)	干后PFU 万/ml	
28-1	一万瓶一个	155+502,200		250	5	330	60	-70℃10天	6.22	100	250,000
2	一万瓶一个	105+501,600		250	5	330	60	-70℃10天	5.88	95	237,500
29-1	一万瓶一个	170+702,500		250	5	330	60	未	6.10	275	687,500
2	一万瓶一个	135+703,700		200	5	330	60	未	6.50	222.5	556,250
30-1	一万瓶一个	103+5110中方瓶未计数		150	3	330	60	-70℃11天	4.31	215	430,000
2	一万瓶一个	93+5110中方瓶未计数		200	3	330	60	未	3.94	270	405,000
31-2	一万瓶一个	170+84 850		210	3	330	60	-70℃6天	4.29	405	810,000
32-1	一万瓶一个	95+52未计数		210	2.5	330	60	未	4.29	405	850,500
2	一万瓶一个	115+52未计数		200	2.5	330	60	未	4.17	402	844,200
33-1	一万瓶一个	138+773,000		210	2	330	60	-70℃7天	3.76	166	332,000
34-1	一万瓶一个	104+772,000		210	2	330	60	未	2.01	145	304,500
2	一万瓶一个	101+772,000		200	2	330	60	未	2.32	123.3	258,930
35-1	一万瓶一个	87+411,000		200	2	330	60	-70℃7天	3.30	155	310,000
2	一万瓶一个	128+411,500		200	2	330	60	-70℃7天	3.38	219	438,000
36-1	一万瓶一个	158+53未计数		200	2	330	60	未	3.14	208.5	417,000
2	一万瓶一个	105+53未计数		200	2	330	60	未	3.49	228.5	457,000
37-1	一万瓶一个	102+503,000		200	2	330	60	-70℃7天	3.29	133.8	267,600
2	一万瓶一个	97+503,000		200	2	330	60	-70℃7天	3.10	239.7	479,400
38-1	一万瓶一个	144+431,000		200	2	330	60	未	3.59	124.9	249,800
2	一万瓶一个	144+431,500		200	2	330	30'60'90'	未	3.39	120.4	240,800

说明: (1) 转瓶转速为每小时10转;

(2) 对第38-2批苗进行了裂解试验, 裂解前PFU为105万/ml, 裂30°为109.5万/ml, 提高4.3%; 裂60°为138.5万/ml, 提高31.9%; 裂90°为170.5万/ml, 提高了62.4%。

疫苗瓶（小青霉素瓶或20毫升疫苗瓶）同时作无菌检验。装量2~5毫升不等。分装后即冻干或保存于-70℃冰箱，7~10天内直接移入冻干箱冻干。

（六）冻干

用南京厂制造的中型冻干机冻干。采用慢升温、长时间的冻干曲线，-40~-48℃预冻3~4小时。在-29℃共融点以下升华9~10小时，20~25℃12~24小时，25~29℃维持3~4小时。全过程需30~32小时。

（七）冻干苗的保存期

用第17批冻干苗在-10~-15℃条件下保存1.5年，经实验室效力试验证明免疫原性未有变化。故冻干苗保存期至少一年。冻干苗应用时稀释后在室温条件下2小时毒价无变化。

1977年10月至12月采取上述工艺共试制11批冻干苗。其详细结果见表7。

六、鸡马立克氏病冻干苗的实验室内安全试验

我们对从法国引进的毒株分离出的种毒CK₂CEF_{7~12}进行了特性鉴定之后，在南京兽医生物制品厂制成了冷冻苗和冻干苗。对冷冻苗和冻干苗的实验室内安全试验分别在北京、上海和哈尔滨进行。注射剂量由1,500PFU—10,000PFU，注射方法为肌肉注射或腹腔注射。试验结果见表8。

表8. 我国用从法国引进的火鸡疱疹病毒FC-126株制造的冻干疫苗的安全试验
(在北京、上海和哈尔滨的试验结果)

试验次数	疫苗批号	雏鸡数**	剂量和方法	观察天数	MD阳性数
1	CK ₂ CEF ₁ (冷)+	20	10,000PFU/ip	81	0
2	CEF ₉ (冷)	29	10,000PFU/ip	90	0
3	H7510 (冷)	23	1,500PFU/ip	85	0
4	H7510 (冷)	10	10,000PFU/ip	77	0
5	H7510 (冷)	26	10,000PFU/ip	105	0
6	S75127 (冷)	30	10,000PFU/ip	86	0
7	第2批 (干) ++	30	10,000PFU/ip	90	0*
8	第4批 (干)	30	10,000PFU/ip	90	0*
9	第8批 (干)	18	10,000PFU/ip	91	0
10	第8批 (干)	30	10,000PFU/ip	90	0*
11	第17批 (干)	33	5,400PFU/im	81	0
12	第26—3D (干)	34	9,280PFU/im	81	0
13	第27—2D (干)	35	11,200PFU/im	81	0

* 病理组织切片MD (-)

+ (冷) 冷冻苗

** 总计348只。

++ (干) 冻干苗

从表8的结果看出，法系种毒不论是冷冻的细胞毒，还是冻干的种毒，以1,500~10,000PFU，大多数是1万PFU，即比国外实际应用的免疫剂量1,000PFU大10倍的剂量，肌肉或腹腔注射1日龄雏鸡，观察77~105天，剖检作肉眼检查，其中有一部分作病理组织学检查，总计共做了13组，用雏鸡348只，结果都未见到鸡马立克氏病病变，说明本疫苗是安全的。

七、鸡马立克氏病冻干苗的实验室内免疫效力试验

(1) 实验室内的免疫效力试验分别在北京、上海和哈尔滨三个地方进行。在上海的试验是用沪—1株强毒攻击的。

在北京和哈尔滨的试验是用京—1株强毒来攻击的。北京用的试验鸡品种为来航鸡，上海和哈尔滨用的均是白洛克鸡。试验方法：在北京和哈尔滨的试验用肌肉注射方法免疫，在上海用皮下或腹腔注射方法免疫。在上海和哈尔滨用腹腔注射方法攻毒，在北京用肌肉注射方法攻毒。试验结果见表9A、9B、9C、9D。

从表9A、9B、9C、9D中可以看出，在上海试验的5个免疫组中，除其中一个500 PFU免疫组的MD减少率为54.6%稍低外，其余达80~91%，说明免疫效力良好。

在北京试验的2个免疫组，MD减少率虽然较低一些，但仍说明是有保护力的。其免疫效力稍低的原因可能与使用鸡的品种为来航鸡有关。国外有的免疫试验报导的MD减少率也有只达30%左右的。

在哈尔滨试验的15个组的MD减少率平均为70.2%，与进口的法国原苗3个试验组的MD减少率66.9%相比，不相上下。如以同等剂量的国产苗3个组的MD减少率71.06%和法国原苗3个组的MD减少率66.9%相比，也不相上下，说明我国自制的冻干疫苗的免疫效力基本达到了国际水平。

表9A. 我国用从法国引进的火鸡疱疹病毒FC-126株制造的冻干疫苗的免疫效力试验在上海的试验结果

试 验 别	冻干苗批号	鸡数	免疫剂量 (PFU)	强毒攻击剂量(ip)	MD阳性率 (%)	MD减少率 (%)
I	7617	20	1,000 (620)	沪-1株血肝混合毒1ml	5	91
	7617	20	500 (310)			
	对 照	20		肝毒1.5ml 肝毒1.5ml	10 55	81.9
II	27	20	1,000 (900)	血毒1ml	10	81.8
	27	20	500 (450)	血毒1ml	25	54.6
	对 照	20		血毒1ml	55	
III (野外抽回攻毒组)	17	23	1,000	血毒1ml	13	80.5
	对 照	18		血毒1ml	66.6	

注：() 中为实际注入鸡体的PFU数

表9B. 在 北 京 的 试 验 结 果

冻干苗批号	鸡 数	免疫剂量 (PFU)	强毒剂量 (im)	MD阳性率 (%)	MD减少率 (%)
24-1	31	1,000	京-1株血毒 10^{-2} 0.2ml	35.5	31.7
24-1	13	500	0.2ml	38.5	26.3
对 照	23		0.2ml	52	

表9C. 在哈尔滨的试验结果 (1)

试验别	冻干苗批号	鸡数	免疫剂量 (PFU) im	强毒攻击剂量 (ip)	MD阳性率 (%)	MD减少率 (%)
I	法原苗-1	20	1,555	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	25	70.5
	17-1	20	2,340	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	35	58.8
	26-1	20	950	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	40	53
	27-1	20	1,080	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	35	58.8
	17-1	20	7,020	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	40	53
	27-1	20	3,240	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	35	58.8
	对照-1	20		京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	85	
II	法原苗-2	20	1,555	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	20	76.5
	17-2	20	2,580	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	25	70.5
	26-2	19	833	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	36.8	56.7
	27-2	20	1,562	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	25	70.5
	17-1	20	7,740	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	20	76.5
	27-2	20	4,686	京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	20	76.5
	对照-2	20		京-1株血毒 $10^{-1}0.2\text{ml}$	85	
III	法原苗-(1+2)	20	1,555	京-1株血毒 $10^{-3}0.2\text{ml}$	30	53.3
	17 (1+2)	19	2,460	京-1株血毒 $10^{-3}0.2\text{ml}$	10.5	83.8
	26 (1+2)	20	869	京-1株血毒 $10^{-3}0.2\text{ml}$	20	69.2
	27 (1+2)	18	1,321	京-1株血毒 $10^{-3}0.2\text{ml}$	11	83.8
	17 (1+2)	20	7,380	京-1株血毒 $10^{-3}0.2\text{ml}$	0	100.0
	27 (1+2)	19	3,963	京-1株血毒 $10^{-3}0.2\text{ml}$	10.5	83.8
	对照-3	20		京-1株血毒 $10^{-3}0.2\text{ml}$	65	

表9D. 在哈尔滨的试验结果
国产、法制马立克氏病冻干苗接种同等
免疫剂量的免疫效力比较试验

疫苗别	组别	免疫剂量 (PFU)	鸡数	MD减少率 (%)	平均MD减少率 (%)
法国苗	1	1555	20	70.5	66.9
	2	1555	20	76.5	
	3	1555	20	53.8	
国产苗	1 (27-1)	1080	20	58.8	71.06
	2 (27-2)	1562	20	70.5	
	3 (27-[1+2])	1321	20	83.9	
	3组平均	1321			
国产苗	15个组		295		70.2

在哈尔滨试验用 10^{-1} 血毒攻毒的第一个试验中,国产苗的MD减少率稍低于法苗,而重复试验(即第二个试验)时,国产苗的效力和法苗是相近的。在用 10^{-3} 攻毒试验中,国产苗则优于法苗。强毒接种量 10^{-1} 的对照组的MD阳性率可达80%,而 10^{-3} 的只达65%,而且MD病变较轻,故强毒攻击量可用 $10^{-1} \sim 10^{-3} 0.2\text{ml ip}$ 。但如对照组的MD阳性率以不低于50%为标准,则攻毒量大于 10^{-3} 似较为稳定。

(2) 最小免疫量试验:用第26批冻干苗分别以1,000、500、100PFU的不同免疫剂量对1日龄白洛克雏鸡做实验室免疫力试验,试验方法同上。结果见表10。

表10. 鸡马立克氏病疫苗最小免疫量试验结果

冻干苗批号	鸡 数	免疫剂量(PFU)	攻 毒 量 (ip)	MD阳性率 (%)	MD阳性减少率 (%)
26 批	20	1,000(950)	京-1株血毒 10^{-1} 0.2ml	40	53
26 批	20	500(450)	京-1株血毒 10^{-1} 0.2ml	50	41.1
26 批	20	100(95)	京-1株血毒 10^{-1} 0.2ml	55	35.3
对 照	20		京-1株血毒 10^{-1} 0.2ml	85	

注: () 中为实际注入鸡体的PFU数。

从表10可以看出,免疫剂量为500PFU的免疫力不如1,000PFU的,而100PFU的又不如500PFU的,说明最小有效免疫量不应小于1,000PFU。表9 C结果说明免疫剂量1,000~7,000PFU左右的免疫力则不见差异,这个结果和国外报导的一致。说明实际免疫剂量以1,000PFU较为合适。

八、鸡马立克氏病冻干苗的野外免疫试验

使用我们试制的火鸡疱疹病毒冻干疫苗第2~38批冻干苗,先后在北京、上海、黑龙江、广州等地区进行野外免疫试验,共免疫鸡2,433,350只。通过对重点鸡场观察的结果,得悉一般均未发生异常反应,说明疫苗的安全性是可靠的。在发生鸡马立克氏病的鸡场注射HVT冻干疫苗后MD的流行基本上得到了控制。现将上海、北京、广州地区重点野外免疫试验结果和一般防疫效果调查资料分述如下。

(一) 上海地区野外免疫试验

1. 野外免疫试验鸡场的重点观察结果:选择鸡马立克氏病正在暴发的几个鸡场注射一日龄雏鸡,剂量是1,000个PFU。观察期从注射日起至上市屠宰加工为止,检查并统计MD发生率,对病死鸡和屠宰加工鸡的MD病变材料均进行病理组织切片检查以确定MD的阳性率。先后进行了三批重点观察,试验鸡为7,357只,对照鸡为1,919只。详细结果见表11。

表11. 上海地区野外免疫试验重点观察结果

批 次	组 别	观 察 鸡 数	上市加工鸡数	组织切片MD数	MD减少率 (%)
第 一 次	试 验	1,168	894	1	97.93
	对 照	506	394	21	—
第 二 次	试 验	3,188	2,303	9	92.2
	对 照	462	220	11	—
第 三 次	试 验	3,009	2,734	2	95.63
	对 照	451	239	4	—

上表结果证明野外免疫试验的MD减少率平均达到95.25%，效果显著。

2. 生产上实际使用HVT冻干苗的效果调查

用我们试制的第17~44批HVT冻干苗于1977~78年在上海地区的禽蛋公司鸡场、牛奶公司红旗鸡场、星火机械化鸡场、新杨种畜场、上海畜牧所鸡场、上海县种畜场、北新泾公社鸡场、加定县娄塘种畜场、宝山县彭浦公社鸡场、青浦县徐泾大队鸡场、金山县干巷公社鸡场、崇明长征、前进、新海农场等39个单位，用疫苗共注射鸡1,343,350只。重点调查了六个鸡场使用疫苗的实际效果。详细结果见表12。

表12. 上海地区冻干苗的实际使用效果

使 用 单 位	组 别	鸡 数	平均上市日龄	成活率 (%)	合格率 (%)	淘汰率 (%)
上海县种畜场	试 验	5,352	79	92.9	85.0	15.0
	对 照	1,000	90	72.5	82.2	17.8
梅陇公社畜牧场	试 验	4,235	85	87.0	83.0	17.0
	对 照	4,573	90	54.1	71.5	28.5
曙光生产队	试 验	3,009	84.0	90.8	82.2	17.8
	对 照	5,090	90.0	70.7	71.6	28.4
宝山县白遗大队	试 验	3,650	93.0	80.0	80.7	19.3
	对 照	3,000	95.0	70.9	27.3	72.7
彭浦公社鸡场	试 验	4,460	85.0	86.8	88.0	12.0
	对 照	242	85.0	73.6	88.0	12.0
青浦县徐泾大队	试 验	1,520	92.0	99.0	91.2	8.8
	对 照	1,200	120	61.5	65.0	35.0

表12结果表明：1. 疫苗注射鸡的平均成活率比对照提高22.2%。

2. 疫苗注射鸡的平均合格率比对照提高17.41%。

3. 疫苗注射鸡的平均上市日龄比对照提早8.7天。

4. 疫苗注射鸡的平均淘汰率比对照减少54%。

证明疫苗在生产上的使用效果也是显著的，深受使用单位的欢迎。