

内 部

科学技术成果报告

猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗和
新城疫 HB-1 株及 Lasota 株弱毒疫苗
免疫程序和免疫方法的研究

科学技术文献出版社

目 录

第一部分 猪瘟免化弱毒细胞培养冻干疫苗免疫程序的研究	(1)
一、主要试验材料和基本试验方法	(1)
1. 主要试验材料	(2)
2. 基本试验方法	(2)
二、试验内容和试验结果	(3)
1. 常规免疫母猪的亲代仔猪抗猪瘟母源传递性免疫动态的检测	(3)
2. 常规免疫母猪, 在孕期再追加免疫对其仔猪母源传递性免疫力的影响	(5)
3. 常规免疫母猪的亲代仔猪首次免疫日龄的选择	(6)
4. 免疫剂量对仔猪首次免疫效力的影响	(6)
5. 20-55、20-65 和 20-75 三种免疫程序的免疫效力比较	(7)
三、讨论	(8)
四、主要参考文献	(10)
第二部分 新城疫 HB-1 株和 Lasota 株弱毒疫苗免疫程序和免疫方法的研究	(11)
一、主要试验材料和基本试验方法	(13)
1. 主要试验材料	(13)
2. 基本试验方法	(14)
二、试验内容和试验结果	(15)
1. 雏鸡抗新城疫母源传递性免疫动态的检测	(15)
2. 新城疫 HB-1 株弱毒苗与 Lasota 株弱毒苗的免疫效力比较试验	(17)
3. 新城疫 HB-1 株弱毒苗和 Lasota 株弱毒苗饮水免疫和气雾免疫的效力试验	(17)
4. 工厂化养鸡场新城疫 HB-1 型弱毒疫苗免疫程序和免疫方法的扩大区域试验	(19)
三、讨论	(23)
四、主要参考文献	(25)

猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗和 新城疫HB-1株及Lasota株弱毒疫苗 免疫程序和免疫方法的研究

农业部兽医药品监察所

北京市畜牧兽医站

第 一 部 分

猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗 免疫程序的研究*

猪瘟兔化弱毒是我国兽医生物药品科研的重要成果。多方面的实验数据和多年的免疫实践，均证明猪瘟兔化弱毒具有极好的免疫原性和生物稳定性，在各种类型的猪群中应用，极为安全可靠。因此，猪瘟兔化弱毒疫苗在控制猪瘟的流行上发挥了巨大的作用。

但是品质优良的疫苗，能否最大限度地发挥其免疫效力，要受多方面因素的影响，其中一个重要的因素就是伴随时间和条件的变化，根据疫源分布情况、猪群免疫状态以及疫苗所致免疫应答的一般规律，来制定和实施合理的免疫程序。

长期以来，由于猪瘟的威胁，有些地方片面地追求“春防”和“秋防”的免疫密度，甚至盲目地增加免疫次数和加大免疫剂量，结果不仅造成人力物力和疫苗的浪费，而且未能控制猪瘟的流行。出现这种现象，主要由于对猪瘟兔化弱毒疫苗所致哺乳仔猪和成年猪免疫应答的发生、发展和衰减的一般规律缺乏深入的了解，因此缺少制定免疫程序的依据。

随着大型工厂化养猪业的兴起，免疫程序已成为迫在眉睫急待解决的问题。本项研究旨在通过必要的实验，力争揭示猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗所致免疫应答的一般规律，为养猪场制定该苗的免疫程序，为进一步修订《兽医生物药品制造及检验规程》提供依据。

一、主要试验材料和基本试验方法

1977年8月至1981年2月先后在三个大型工厂化养猪场，根据试验设计进行检测、免

* 参加该课题的研究人员：

门常平 项大实 薛民权 王世虎

疫和监测。基本试验方法是血清中和抗体效价的测定和保护力测定。根据所获试验数据,提出免疫程序比较试验的设计方案、再经过较大规模的区域试验,检验所获试验结果的真伪。

1. 主要试验材料

- ① 实验猪: 进行试验的三个猪场约有猪近两万头, 比较试验中所用猪要求猪龄、饲养管理条件和免疫状态等状况要基本相同。根据试验设计, 随机取猪 400 余头进行中和抗体效价测定和强毒攻击试验。
该三个猪场在试验以前, 仔猪于 7—10 日龄时首次免疫, 断奶时二次免疫, 以后参加“春防”和“秋防”的免疫, 每头猪一年要免疫 3—4 次。尽管如此, 仍有猪瘟发生, 特别是哺乳仔猪多于断奶前后至第二次免疫前发生猪瘟。
- ② 实验兔: 体重 1.5—2 公斤的健康敏感家兔。试验前观察测温两天、选择体温恒定者参加试验。
- ③ 猪瘟兔化弱毒: 系农业部兽医药品监察所鉴定冻干保存的 480 代种毒。使用前经敏感家兔滴定其对家兔的最小感染量 (ID) 或称最小发热量 (HD) 为 10^{-5} —一毫升。
- ④ 猪瘟强毒: 系农业部兽医药品监察所鉴定冻干保存的石门系 118 代和 119 代血毒。对敏感猪的最小致死量 (LD) 约为 10^{-6} —一毫升。
- ⑤ 免疫用疫苗: 系江西、湖南和北京兽医生物药品厂生产的合格猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗。使用前经敏感家兔检验, 达到五万倍稀释一毫升为一个家兔感染量 (ID) 符合《规程》标准。
- ⑥ 稀释液: 实验室试验均采用 pH 7.2 的灭菌磷酸盐缓冲生理盐水 (简称 P.B.S.)。猪场免疫采用灭菌生理盐水。

2. 基本试验方法

- ① 血清抗猪瘟中和抗体效价的测定: 采用固定兔毒量——稀释血清的方法, 利用敏感家兔进行中和试验。根据预备试验的结果, 猪瘟兔毒固定在 20ID 为宜。将每毫升含 20ID 的兔毒与等量倍比稀释的各份血清混合, 置 4℃, 作用 1.5—2 小时后, 每份兔毒——稀释血清的混合液注射两只家兔, 每兔耳静脉注射一毫升 (其中实含兔毒为 10ID)。同时另设 10ID 兔毒对照家兔两只。注射后每 6 小时观察测温一次, 连续观察测温五天。

表 1

组 别	第一次注射 的反应	第二次注射 的反应	判 定 说 明
猪瘟兔毒 对 照	+	-	第一次注射10ID猪瘟兔毒, 体温应该升高。第二次注射1000ID 兔毒不应该有体温反应。只有这样的结果, 试验才能成立。
* 中 和 试 验	+	-	中和不完全, 残存的猪瘟兔毒使家兔获得免疫, 故第二次注射无体温反应, 为负结果。
	+	+	第二次注射体温升高, 表示无残存兔毒(未免疫), 中和比较完全。第一次注射的体温反应, 可能为非特异性因素所致, 为正结果。
	-	+	中和完全, 无残存兔毒(未免疫), 故第二次注射出现体温反应, 为正结果。
	-	-	试验前家兔已获得对兔毒的免疫, 该种不敏感的家兔不能用于试验。此种试验结果无意义。

* 中和试验中“+, +”和“- , +”为正结果, 试验可以成立。“+, -”为负结果, 试验可以成立。“-, -”为无意义结果, 试验不能成立。

为了验证中和试验所获结果的正确性，中和试验五天后，连同对照家兔每兔再次耳静脉注射 1000ID 的猪瘟兔毒，二次注射后再继续观察测温五天。根据两次注射所表现的体温反应判定被检血清的抗猪瘟中和抗体效价。判定时参考表 1。

- ② 免疫效力的测定：采用猪瘟强毒的攻击试验检验免疫效力。按照试验设计，定期随机取猪，先测定基础体温，然后每猪肌肉注射大约 10,000—100,000LD 的猪瘟强毒（冻干血毒用 pH7.2 P·B·S. 做 10 倍稀释后，每猪肌注一毫升）。同时另设非免疫敏感猪两头做为强毒对照。攻毒后每 12 小时观察测温一次，连续观察测温 10—15 天。未断奶仔猪攻击强毒后要精心管理，每日人工哺乳四次，要保暖防风避免环境因素对试验的影响。

攻击强毒后，对照猪应于 4—6 天发病，并在观察期内死亡，应具有猪瘟样临床症状和病理变化。试验猪应根据临床反应和病理变化综合判定和统计保护率。强毒攻击试验结果的判定参考表 2。

表 2

试验结果	判 定 参 考 依 据
不 保 护	1. 在观察期内死亡，并具有猪瘟样临床症状和剖检病变。 2. 在观察期内未死并逐渐康复，但出现较为重剧的临床症状或剖检发现较典型的病变。
保 护	1. 在观察期内不现临床症状。 2. 在观察期内仅出现轻微反应或体温短暂升高，淘汰后剖检无猪瘟样病变。
除 名*	1. 在观察期死亡，死前不具猪瘟样症状，剖检亦无猪瘟样病变。 2. 出现与猪瘟无关的临床症状或剖检变化。 3. 死因或病因明显与攻毒无关。

* 除名者即从攻毒猪总数中除掉，不做为统计保护率的基数。

- ③ 区域试验：根据试验结果，提出免疫程序的设计方案，并在几个大型养猪场进行区域试验。试验过程中定期随机取猪，攻击强毒测定免疫效力，评价各免疫程序的优劣，最后提出较为理想的免疫程序。

二、试验内容和试验结果

本项研究有五项试验内容，现将所获试验结果简报如下：

1. 常规免疫母猪的亲代仔猪抗猪瘟母源传递性免疫动态的检测

母源传递性免疫即母源被动性免疫效应，人们通称母源抗体的作用。该种免疫机制是高等脊椎动物在长期生物进化过程中，逐步形成和不断完善的天然免疫机制，对保护那些免疫功能尚未发育完善的新生动物免遭致病微生物的侵染具有积极的生物学意义。鉴于目前对仔猪实现抗猪瘟天然免疫的全部机理尚不完全清楚，因此可否对这种天然免疫效应暂称为抗猪瘟母源传递性免疫。

免疫母猪的亲代仔猪，在哺乳期内不能像成年猪那样能够建立起坚强的主动免疫力，这已是人所共知的事实。对这种现象解释为，一方面由于哺乳仔猪的免疫机制尚未发育完善，因此免疫原的刺激不能激发十分活跃的免疫应答；另一方面由于免疫母猪的亲代仔猪，在出生不久能够通过吸吮初乳而获得丰富的免疫球蛋白（其中主要是 IgA 和 IgG）。这种抗猪瘟抗体通过初乳传递给仔猪，将影响仔猪主动免疫的建立。一些试验已经从某个侧面表明，上

述两方面的因素是影响仔猪建立坚强主动免疫的主要原因。

在哺乳仔猪的免疫实践中，会遇到这样矛盾着的问题，如果早些时候给仔猪接种疫苗，似乎可以使仔猪早些建立主动免疫力，但这样做的免疫效力极差。如果待仔猪体内的抗猪瘟母源中和抗体衰减到较低水平时免疫，则往往在免疫前有一段时间，仔猪已不具备抵御猪瘟病毒侵染的抵抗力。欲解决二者的矛盾，就必须揭示仔猪抗猪瘟母源传递性免疫动态的一般规律，以此做为制定能够兼顾两方面的合理首次免疫时机的依据。

本试验先后在三个大型猪场，选择条件相同的健康母猪若干头，同期配种并于配种前后同期接种猪瘟兔化弱毒疫苗一头份。待分娩后，将其同龄仔猪混合编号，连续定期抽测不同日龄仔猪的母源抗猪瘟中和抗体效价，并从15日龄开始定期攻击猪瘟强毒，测定不同日龄仔猪的抗猪瘟母源传递性保护力。两批试验所获数据见表3。

表3

检测 批组	检测日龄 检测结果	16—20		25		27—31		39—43	
		N _{Ab}	P/C (%)	N _{Ab}	P/C (%)	N _{Ab}	P/C (%)	N _{Ab}	P/C (%)
一次 实验	实 验 组	1 : 32 1 : 64	6/6 (100)	1 : 16 1 : 32	4/5 (80)	1 : 16 1 : 32	5/6 (83)	1 : 8	0/4 (0)
	强 毒 对 照	1 : 0	0/2 (0)	1 : 0	0/2 (0)	—	0/2 (0)	—	0/2 (0)
重复 实验	实 验 组	—	6/6 (100)			—	3/6 (50)		
	强 毒 对 照	1 : 0	0/2 (0)			—	0/2 (0)		
总保护数(率)		12/12 (100)		4/5 (80)		8/12 (67)		0/4 (0)	

注：N_{Ab} = 仔猪抗猪瘟母源中和抗体效价的近似值。

P/C = 保护数/攻毒数 % = 保护率

鉴于两批试验结果基本接近，故一并统计并绘制成曲线图像见图1。

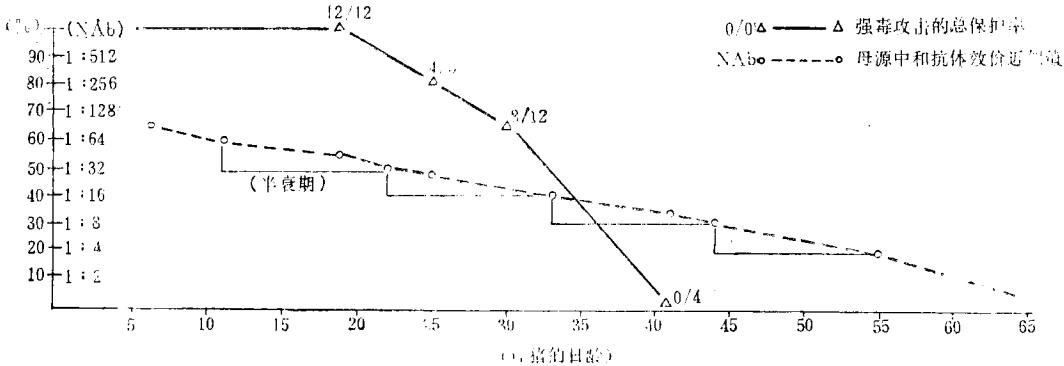


图 1 免疫母猪的亲代仔猪抗猪瘟母源传递性免疫动态的检测结果显示图

分析两批试验所获的结果，对仔猪抗猪瘟母源传递性免疫动态的一般规律，可以得到如下印象：

- ① 常规免疫母猪的亲代仔猪，在 20—25 日龄以前，依赖抗猪瘟母源传递性免疫力能够坚强地抵御猪瘟强毒的攻击。25 日龄以后保护力逐渐下降，至 30 日龄以后保护力急剧衰减，至 40 日龄时已完全丧失对强毒攻击的保护力。
- ② 常规免疫母猪的亲代仔猪，体内的抗猪瘟母源中和抗体效价，伴随仔猪日龄的增长而较规律的衰减，其半衰期大约 10 天左右。
- ③ 常规免疫母猪的亲代仔猪，抗猪瘟母源中和抗体效价在 1:32 以上者（实含 10ID 兔毒的兔体中和试验），绝大多数能够抵御猪瘟强毒的攻击。1:8 至 1:32 者，在强毒攻击下有程度不同的保护力。1:8 以下者，几乎完全丧失对强毒攻击的抵抗力。一般常规免疫的母猪，其亲代仔猪一日龄时母源抗体效价大约在 1:128 左右，这样的仔猪大约需长至 60 日龄或 60 日龄以后，母源抗体才能完全消失。在 25—60 日龄之间，虽有母源抗体存在，但已不能坚强地抵御强毒的侵袭。

2. 常规免疫母猪，在孕期再追加免疫对其仔猪母源传递性免疫力的影响

近年来，在一些地区不断有仔猪发生猪瘟。据调查，发病仔猪多在 7—10 日龄时接种过疫苗，于 40—70 日龄前后，也就是在接种第二次疫苗以前发病。这种现象表明仔猪于 7—10 日龄时首次免疫的效力极差。能否通过对常规免疫母猪在孕期再追加免疫一次，来提高仔猪的抗猪瘟母源传递性免疫力，使仔猪在哺乳期内不免疫而安全度过哺乳期。

为此，选择同样条件下饲养的母猪，同期配种，并于配种前后同期免疫。再将其分为三个试验组合：

甲组：孕猪于预产期前 30 天，再追加接种疫苗一头份。

乙组：孕猪于预产期前 15 天，再追加接种疫苗一头份。

丙组：孕猪在怀孕期内不追加接种疫苗。

三组孕猪分娩后，各组同龄仔猪定期攻击猪瘟强毒，比较其母源传递性免疫力。试验结果见表 4。

表 4

实 验 组 别	攻毒日龄		检测结果							
	20		30		40		50			
	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%
预产期前 30 天追加免疫组	4/4	100	3/4	75	0/4*	0	1/4	25		
预产期前 15 天追加免疫组	4/4	100	3/4	75	0/4	0	0/4	0		
孕期不再追加免疫组	12/12	100	8/12	83	0/4	0	—	—		
强毒对照组	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0		

注：P/C = 保护数/攻毒数。

% = 保护率

* 其中一头虽耐过，但临床反应重剧，具有猪瘟样病变故仍判为不保护。

分析上述试验结果，可以认为常规免疫母猪，于预产期前 30 天或 15 天再追加接种疫苗一头份，并不能有效地提高和延长仔猪的抗猪瘟母源传递性免疫力。

3. 常规免疫母猪的亲代仔猪首次免疫日龄的选择

在猪瘟流行的地区，欲保护仔猪安全度过哺乳期（主要是 25 日龄至断奶这段时间），有必要对哺乳仔猪接种疫苗。试验表明，常规免疫母猪的亲代仔猪，在 20—25 日龄以前对猪瘟具有坚强的抵抗力。因此在考虑首免时机的时候，即要考虑主动免疫效力与母源免疫效力的连续性，又要照顾到使主动免疫避开母源抗体的干扰。不难看出，很难找到绝对理想的首免时机，只能通过比较试验，全衡利弊，因地制宜地确定一个相对合理的首免时机。

本试验对仔猪 15 日龄、20 日龄和 25 日龄时，施行首次疫苗接种的免疫效力进行比较。三个试验组合所获试验结果见表 5。

表 5

实验组别	攻毒日龄 检测结果	45 日龄		55 日龄		65 日龄		75 日龄	
		P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%
15 日龄时 首次免疫组	实验组					1/8	13		
	对照组					0/2	0		
20 日龄时 首次免疫组	实验组	5/5	100	3/5	60			2/6	30
	对照组	0/2	0	0/2	0			0/2	0
25 日龄时 首次免疫组	实验组							0/5	0
	对照组							0/2	0

注：P/C = 保护数/攻毒数。

% = 保护率

• 该批实验猪体质较差。

各对照组皆为同批猪(非免疫)。

分析上述试验结果，可以看出常规免疫母猪的亲代仔猪，于 15 日龄时首次免疫，其免疫效力不好。20 日龄时首免，能保持免疫效力的连续性，免疫期可达 1—1.5 个月。25 日龄时首免，其免疫效力并不优于 20 日龄首免组，而且在免疫前尚有令人担心的数天危险期。因此，全衡利弊，对常规免疫母猪的亲代仔猪还是在 20 日龄左右施行首次免疫为宜。

4. 免疫剂量对仔猪首次免疫效力的影响

哺乳仔猪由于抗猪瘟母源抗体的存在而影响主动免疫效力，这是难以改变的客观事实。对不同日龄的仔猪，如果适当加大免疫剂量，能否有效地克服母源抗体的干扰而改善主动免疫效力呢？

本试验选择同批仔猪，于 7 日龄、11 日龄和 22 日龄时，各用猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗一头份、二头份和五头份施行首次免疫。然后于 44 日龄时攻击猪瘟强毒检验其免疫力。并于免疫时和攻毒时分别抽测血清的中和抗体效价，了解免疫后中和抗体效价的生长情况。试验中同时设同批非免疫猪做为对照。试验所获结果见表 6。

分析上述试验结果，可以认为无论在 7 日龄、11 日龄或 22 日龄时，用一头份、两头份或五头份疫苗施行首次免疫，其免疫效力均无显著差异。也就是说，影响仔猪首免效力的主要因素是免疫日龄，而不是免疫剂量。如果再加大免疫剂量，即使有希望提高一些免疫效力，

恐在免疫实践中的应用意义不大。

表 6

免疫剂量 检测 结果	7 日 龄			11 日 龄			22 日 龄		
	IN _{Ab}	CN _{Ab}	攻毒反应	IN _{Ab}	CN _{Ab}	攻毒反应	IN _{Ab}	CN _{Ab}	攻毒反应
一头份 (150 ID)	1:64 1:28	1:8 1:16	四头均出 现严重反应	1:64	1:32	四头均有反映 并死一头	1:32	1:128	四头均无 任何反应
二头份 (300 ID)	1:64 1:128	1:8 1:16	四头均出现 严重反应	1:64	1:32	四头均有反应	1:32	1:128	四头均无 任何反应
五头份 (750 ID)	1:64 1:128	1:8 1:16	四头均有严重 反应并死二头	1:64	1:32	四头均有反应	1:32	1:128	四头均无 任何反应
同批非免疫仔猪	CNAAb 为 1:8			P/C = 0/4					

注: IN_{Ab} = 免疫时母源中和抗体效价近似值 CN_{Ab} = 攻毒时中和抗体效价近似值
P/C = 存活数/攻毒数

5. 20—55、20—65 和 20—75 三种免疫程序的免疫效力比较

常规免疫母猪的亲代仔猪, 于 20 日龄前后首次免疫, 其免疫期为 1—1.5 个月。在确定第二次免疫时机时, 同样遇到前边的矛盾问题。为了在全衡利弊的基础上, 确定一个相对合理的免疫程序, 本试验设计了三种免疫程序, 在条件基本相同的三个大型养猪场的近两万头猪的范围内进行比较试验。

甲组——20—55 程序: 20 日龄时首免, 55 日龄时二免。

乙组——20—65 程序: 20 日龄时首免, 65 日龄时二免。

丙组——20—75 程序: 20 日龄时首免, 75 日龄时二免。

三组定期随机取猪攻击强毒, 并同时设非免疫猪对照。试验结果见表 7。

表 7

实验组别	各次免疫后 检测 结果	首次免疫后攻毒试验的结果								第二次免疫后攻毒试验的结果													
		25 天		35 天		45 天		55 天		两个月		四个月		六个月		七个月		八个月		九个月		十个月	
		P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%	P/C	%
20 ↓ 55 组	实验组	5/5	100	3/5	60					6/6	100	3/4	75			0/2	0						
	对照组	0/2	0	0/2	0					0/2	0	0/2	0			0/2	0						
20 ↓ 65 组	实验组					9/12	75					8/8	100	8/8	100			7/8	88			7/8	88
	对照组					0/2	0					0/2	0	0/2	0			0/2	0			0/2	0
20 ↓ 75 组	实验组							2/6	30			4/4	100	5/6	82	6/6	100	3/6*	50	6/10*	60	1/6*	17
	对照组							0/2	0			0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0	0/2	0

注: P/C = 保护数/攻毒数。 % = 保护率。(1)(2)表示有体温反应的猪数, 但没有典型临床症状和病变, 故仍判保护。
* 表示耐过猪均有程度不同的体温反应。 20—75 组的实验猪体质略差。

为了更清楚地展示三种免疫程序的免疫效力，根据试验所获数据绘制曲线图像见图 2。

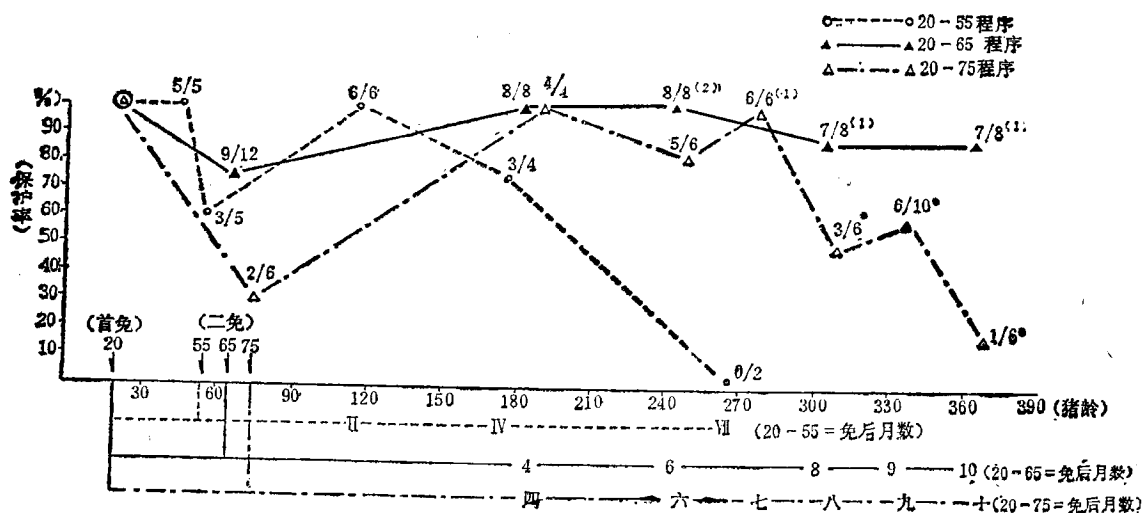


图 2 20—55、20—65、20—75 三种免疫程序的免疫效力比较试验检测结果示意曲线图

分析上述试验结果，可以获得如下印象：

- ①20—55 程序虽能保持免疫效力的连续性，但第二次免疫的免疫持续期仅有四个月，此时猪才六个月龄，尚未达到出栏体重，因此尚需施行第三次免疫。
- ②20—65 程序从免疫效力的连续性分析并不比 20—55 程序差，在第二次免疫时猪群尚有 75% 的保护率。但第二次免疫后的免疫持续期却可达 10 个月之久，此时猪已达一年以上，绝大多数猪场的肥猪已够出栏体重，无需再做第三次免疫。
- ③20—75 程序不能保持免疫效力的连续性，在第二次免疫时，猪群仅有 30% 保护率，在疫源威胁下是十分危险的。从第二次免疫后的免疫持续期分析，其免疫效力并不优于 20—65 程序（该批猪体质较差，会影响免疫效力，在分析问题时要考虑这一因素）。

综合分析不难看出，三种免疫程序的免疫效力比较，以 20—65 程序最佳。

三. 讨 论

猪瘟是一个比较古老的传染病，在 150 多年的时间里，国内外的研究者从事了多方面卓有成效的工作，他们所取得的科学成果不仅指导了防制猪瘟的实践，而且也是我们研究工作的重要基础。我们的试验由于受到多种因素和条件的影响，加之水平所限，因此试验所获结果难免有误差，所提及的看法难免带有一定的片面性。但是从一定数量的试验结果中，尚可获得一些带有规律性的印象，愿提出与同行商榷讨论以求不断完善：

1. 母猪于配种前后施行确实的常规免疫，其仔猪在 20 日龄以前具有坚强的抗猪瘟母源传递性免疫力，因此在 20 日龄以前不必要接种疫苗。为了保证仔猪获得可靠的母源性保护力，在母猪分娩后要照顾每头仔猪都能尽快吃到初乳。为了使仔猪具有相同的母源性免疫水平，从而方便仔猪的免疫工作，大型养猪场应创造条件，实行同期发情，同期配种并于配种前后对母猪同期施行疫苗接种。

2. 常规免疫母猪的亲代仔猪, 在严格隔离防护的条件下饲养, 最理想的首次免疫时间应该待体内母源抗体基本消失以后 (大约需到 60 日龄左右) 接种疫苗, 做为育肥猪一次免疫即可维持至出栏, 这种免疫程序是我们努力的方向。但是, 根据目前我国猪瘟疫源的分布情况和多数猪场的综合防疫水平, 待仔猪长至 60 日龄免疫恐难控制仔猪猪瘟的发生。因此, 对多数猪场来讲, 建议在 20 日龄左右施行首次免疫接种。至 65 日龄左右第二次接种疫苗。

母猪要求在配种前后做常规免疫。种公猪每年免疫一次即可。

对长期以来免疫实践中采取“春防”“秋防”一刀切的免疫办法和单纯追求免疫密度的倾向, 是否具有充分的科学依据, 是否能够最有效地发挥疫苗的免疫效力, 以此做为控制和消灭猪瘟的战略指导思想 and 战术上的行动步骤, 很有必要进一步研讨。

3. 要遵循疫苗所致仔猪和成猪免疫应答的发生、发展和衰减的一般规律, 适时接种疫苗才能使猪群获得可靠的免疫力。在免疫实践中要考虑不同日龄猪的免疫生理学特点和影响免疫效力的诸种因素。要避免或减少免疫实践中的盲目性, 例如无根据地增加免疫次数或加大免疫剂量; 不考虑诸种应激因素 (如断奶、去势、分群、饲养条件的突变以及多种菌、疫苗的同时接种等) 对免疫效力的影响等。

此外, 对疫苗的贮存运送、稀释和具体操作都应严格按照有关规定执行。

4. 任何一种免疫程序均有其适用范围的局限性, 因此各猪场必须遵循疫苗所致免疫应答的一般规律, 结合本场的实际情况, 制定相应的免疫程序。

执行合理的免疫程序固然能够更充分发挥疫苗的免疫效力, 但是还应该清醒地看到, 免疫程序在防制猪瘟中的作用受到多方面因素的影响, 彻底消灭猪瘟还需要多方面防疫灭病措施的配合, 其中有些措施可能是更重要的环节。这里特别应该强调加强综合防疫措施和改善饲养管理的重要性, 养猪场应严格执行检疫制度, 及时清除可疑病猪; 要严格施行防疫隔离和清扫消毒措施, 从而堵绝和消灭病原; 要改善饲养管理增强猪只体质和抗病力, 在试验中也表明体质瘦弱的猪, 即使在同样条件下免疫, 往往不能产生和健壮猪同样的免疫力。

5. 猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗是一种有前途的疫苗, 这正是我们以该苗做为研究对象的主要原因。然而, 我们的另一些试验和一些地区免疫实践所暴露出来的问题, 说明猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗尚存在一些潜在性危险和急待完善的问题。

首先应该注意到目前猪瘟细胞苗是应用仔猪肾原代细胞生产。因此选择绝对健康的仔猪就成为生产细胞苗的重要前提, 我国目前条件下保证为制苗提供绝对不带猪瘟病毒的仔猪尚有一定困难, 为了保证生产绝对安全的细胞苗, 应该开展用异源细胞制苗的研究工作和对疫苗安全性的准确快速检验方法的研究。

关于猪瘟细胞苗的免疫效力尚有必要进一步验证, 在我们的另一次试验中, 在同样条件下, 将同窝仔猪分为两组 (试验中选用 10 窝仔猪), 分别用猪瘟兔化淋脾毒 (对家兔的毒价为 10^{-5} 一毫升) 和猪瘟细胞苗 (对家兔的毒价为五万倍以上一毫升), 按照 20—55 程序施行免疫。然后定期同时攻毒比较其免疫效力, 试验结果表明第二次免疫后, 猪瘟细胞苗的免疫期约比猪瘟兔化淋脾毒少三个月。当然仅仅一次试验很难结论, 但所获结果应引起重视。如果重复试验仍出现类似现象, 有必要进一步搞清这种现象是疫苗的本质问题, 还是生产工艺和检验的问题。

为了在猪瘟细胞苗的生产上, 掌握更多主动权, 有必要较深入地研究猪瘟兔毒在细胞培养中的复制条件和复制规律。

6. 在人们认识猪瘟的进程中, 虽然已经从事了大量的试验研究工作, 有些国家或地区已经控制或消灭了猪瘟。但是对猪瘟的深入研究和警惕性始终没有放松, 仍然密切注视着猪瘟的流行动向, 并做为主要检疫对象对待, 国际兽医局的国际动物卫生法规中已将猪瘟列入A类的十六种法定传染病之一。

我国在猪瘟研究方面虽然做出过重大贡献, 但是迄今疫源仍然分布较为广泛, 仍然成为养猪业的严重威胁。改变目前这种局面, 要着重从两个方面进行艰巨的工作, 其一, 要早日制定和执行具有法律效能的兽医法规和检疫条例, 及早结束这种有权无法的状况。其二, 要尽快制定控制和消灭猪瘟的计划和行动步骤, 组织力量去揭示迄今尚不了解的秘密。例如猪瘟免疫应答的机理、条件性病原对猪瘟免疫的影响、不同猪瘟毒株间的关系、所谓“慢性猪瘟”的本质、我国是否存在猪瘟病毒的亚型或变异毒株、多种菌(疫)苗之间的相互关系以及猪瘟免疫途径和免疫效力监测手段的研究等等。上述问题的逐步解决将会能动地指导防制猪瘟的实践。

我们在猪瘟的防制工作中从事了一点点研究工作, 通过一定范围的区域试验和在推广过程中的初步考验, 表明所获试验结果基本符合客观规律。一些曾经受猪瘟之苦的猪场, 采用20—65程序以来, 猪群安全无恙, 未见猪瘟迹象, 收到显著的免疫效果和经济效益。竟管如此, 我们认为全国各地的情况比较复杂, 我们的科研成果尚需在更大的范围内考验和推广, 在伴随逐步推广的过程中, 一定还会出现新的情况和问题, 这正是进一步研究工作的新课题。

让我们振奋革命精神, 努力工作加强交流, 为尽早在我国控制和消灭猪瘟多做贡献。

本项课题的试验, 得到北京市苇沟猪场、长阳农场四队和双桥门猪场的大力支持和配合, 在此一并致谢!

四. 主要参考文献

- 1、农业部兽医药品监察所, “猪瘟兔化弱毒的研究——I. 猪瘟兔化弱毒对家兔的感染性”, 畜牧兽医学报 5(1)。
- 2、农业部兽医药品监察所, “猪瘟兔化弱毒的研究——II. 猪瘟兔化弱毒对猪的免疫性”。
- 3、农业部兽医药品监察所, “猪瘟兔化弱毒的研究——IV. 利用猪瘟兔化弱毒在兔体诊断猪瘟的试验”
- 4、日本北里研究所, “动物のククチン”, P. 88、
- 5、H.W.Dumen, “Diseases of Swine”, Third Edition P. 212-226.
- 6、J.M.Aynaud and G.Corthier, “Recent developments in classical Swine fever Vaccination”, World Animal Review 1976 20: 16-21.
- 7、Leroy Coggins etc., “Standardization of Hog Cholera neutralization test”, Am.J.Vet.Res. 1964. 25: 105 P. 408-402.
- 8、“Study of Hog Cholera Colostral antibody and its effect on active Hog Cholera immunization”, Am.J.Vet.Res. 25: 106 1964 P. 613-617.

- 9、“Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals”, Sixth Edition 1973. P. 1266-1283.
- 10、Commission of the Eyrieab Communities- Directorate General for Agriculture Directorate E Agricultural economics and Structure Division 3 “Properties of the virus of classical swine fever and differemtil diagnosis of classical and African swine fever”, October 1971. P.8-55 P.72-76.
- 11、I.A.Merchawt and R.A.Packer, “Veterinary Bacteriology and Virology”, Seventh Edition P.699-702.
- 12、A.Buxton and Fraser, “Animal microbiology”, 1977. Vol.2. P.652-657.
- 13、Scientific mission of Institut Me'rieux France, “Swine Fever and its prophylaxis”, April. 1978.
- 14、农业部兽医药品监察所, 猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗制造及检验试行规程。

第 二 部 分

新城疫 HB—1 株和 Lasota 株弱毒疫苗*

免疫程序和免疫方法的研究

新城疫 (Newcastle disease) 作为世界性的禽类传染病已有 50 多年的历史, 半个世纪以来国内外从事禽病研究的工作者对本病进行了大量卓有成效的工作, 他们在多方面所取得的研究成果, 不仅指导了防制新城疫的实践, 而且也为我们的研究工作提供了重要的理论基础。

近年来, 虽然有些国家和地区基本控制了新城疫的流行, 但就世界范围讲, 新城疫至今仍然严重地威胁着养鸡业的发展。各国都高度警惕和密切注视新城疫的动向, 仍然将新城疫列为主要的防制和检疫对象。

经验证明, 在防制新城疫的计划中, 除加强综合防疫措施和严格执行检疫制度以外, 施行合理的疫苗接种, 使之在鸡群中建立可靠的抗新城疫免疫, 是预防新城疫普遍采用和行之有效的重要手段。鉴于各国各地养鸡业生产的方式和经营特点不同, 加之疫源的分布情况、综合防疫水平和检疫制度等方面存在程度不同的差异。因此所用疫苗的种类、免疫程序和免疫方法也不尽一致, 根据制苗用种毒、制苗工艺和免疫方法的不同, 可将新城疫疫苗归纳为五种类型:

- 1、中等毒力的活苗 (Live mesogenic Vaccines): 用于制苗的种毒主要有 Roakin 株 (Beaudette 等人于 1949 年)、Komarov 株或称 Haifa 株 (Komarov 和 Goldsmit

* 参加该课题的研究人员

门常平 刘贵滨 丁成宝 薛民权 王书文 金振珍 李秀敏

于1946年)、Hertfordshire株或称Herts株(Iyer和Dobson于1940年)和Mukteswar株或称I系(Haddow和Idnani于1946年)等。该类疫苗多采用肌肉注射或刺种的方法接种,经两次弱毒力性活苗免疫后的鸡或60日龄以上的鸡。

2、弱毒力的活苗(Live lentogenic Vaccines):

用于制苗的种毒主要有HB-1株或和Ⅱ系(Hitchner和Johnson于1948年)、F株或称Ⅲ系(Asplin于1952年)和Lasota株或称Ⅳ系(Winterfield等人于1957年)等。该类疫苗又统称为HB-1型疫苗。该类疫苗多采用点眼、滴鼻、饮水或气雾免疫的方法接种各种日龄的鸡。但是一周龄以前的雏鸡最好采用HB-1株疫苗免疫。雏鸡一般不宜采用气雾免疫。

3、组织培养活苗(Live tissue Culture Vaccines):

曾培育了一些能适应于单层细胞培养的毒株,如Call-11914株通过细胞培养致弱并已适应于猪肾细胞的单层培养;Komarov株已能适应于牛肾细胞的单层培养(Huygelen和Pectermans于1963年),Mukteswar株已能适应于猪肾细胞的单层培养(Vasic'于1965年)等。该类疫苗多采用肌肉注射或刺种的方法接种,经过HB-1型疫苗免疫过的鸡或两个月龄以上的鸡。

4、加佐剂的活苗(Live Vaccines With adjuvants):

用HB-1株或Lasota株弱毒,配加氢氧化铝胶制成佐剂活苗。该类疫苗只适于肌肉注射。

5、灭活疫苗(Inactivated Vaccines):

将接种毒的鸡胚绒毛尿囊液(AAF),经0.1%福尔马林(Liquor Formaldehydi)或 β -丙内酯(β -Propiolacton简称BPL)灭活后,配加矿物油或植物油制成油乳剂灭活疫苗。该苗只适于肌肉注射,多用于蛋鸡,有时和HB-1型弱毒苗配合应用。

我国目前生产和使用的新城疫疫苗主要是中等毒力的I系弱毒苗和弱毒力的Ⅱ系弱毒苗。此外弱毒力的Ⅲ系和Ⅳ系弱毒苗也开始小批量生产和小范围内应用。

新城疫I系弱毒疫苗,固然具有产生免疫迅速和免疫持续期长的优点,但是在大型工厂化养鸡场使用时,I系苗那些人所共知的弊病将更明显地暴露出来,事实上已经给养鸡生产带来不少的麻烦和损失。因此,从控制和消灭新城疫的战略意义上考虑,应该根据鸡场的经营方式,全衡各类疫苗的利弊,选择适合本场使用的疫苗种类。为此,我们针对大型工厂化养鸡场的生产特点,从1979年初至1981年初选择HB-1株和Lasota株弱毒疫苗,主要在两个大型工厂化养鸡场进行免疫程序和免疫方法的试验研究。

多方面的试验数据和多年的免疫实践,都证明HB-1株和Lasota株弱毒疫苗,在各种类型的鸡群应用,均具有较好的免疫效力和极可靠的安全性。但是一些地方曾反映HB-1型弱毒疫苗免疫后的免疫效力不够坚强,甚至有些地方免疫后仍不能堵绝新城疫的流行。应该看到疫苗的免疫效力受多种因素的影响,其中一个极重要的因素是选择合适的免疫时机,因此有必要通过试验揭示新城疫HB-1型弱毒疫苗对不同日龄鸡所致免疫应答的发生、发展和衰减的一般规律,以此作为制定免疫程序的依据。

鉴于HB-1型弱毒疫苗的免疫期较短,在整个饲养周期中需要多次免疫才能保持鸡群始终处于有效的免疫状态。因此,在大规模工厂化养鸡场还必须在适应机械化半机械化生产特

点的基础上,采用省力有效的免疫方法。

本项研究旨在针对工厂化养鸡场的需要,通过必要的实验。逐步探索新城疫 HB-1 株和 Lasota 株弱毒疫苗采用饮水免疫和气雾免疫的免疫应答一般规律,为工厂化养鸡场制定 HB-1 型疫苗的免疫程序和免疫方法提供依据,同时也为进一步修订《兽医生物药品的制造和检验规程》提供参考数据。

一、主要试验材料和基本试验方法

首先进行数批小规模试验,然后在两个大型工厂化养鸡场进行区域试验。在初步肯定效果的基础上,在更大范围内考验推广。

1. 主要试验材料

- ①雏鸡:由北京市种鸡场和红星科技站鸡场提供数批免疫母鸡的亲代雏鸡 2500 余只。用非免疫种卵单独孵化获得非免疫母鸡的亲代雏鸡 200 余只,做为非免疫对照。
- ②免疫鸡:北京市峪口养鸡场和泗上养鸡场的 30 余万只鸡均按试验设计施行免疫,定期随机取鸡约 6000 余只参加试验。
- ③非免疫鸡:本课题组在隔离条件下专人饲养的非免疫鸡。抽测 HI 抗体效价一般不超过 1:4 ($\log_2 < 2$),用做强毒对照。
- ④免疫用疫苗:新城疫 HB-1 株弱毒疫苗由北京市兽医生物药品厂提供检验合格的鸡胚苗,血凝价均在 1:320 以上。Lasota 株弱毒疫苗只是应用农业部兽医药品监察所鉴定冻干保存的 Lasota 株 F₀ 种毒,本课题组用非免疫鸡胚自制的鸡胚苗,血凝价均在 1:640 以上。
- ⑤红细胞凝集抑制试验 (HAT) 所用抗原:系采用新城疫 Lasota 株 F₀ 种毒,接种非免疫鸡胚后收获的绒毛尿囊液 (AAF),血凝价在 1:640 以上。分装置 -20℃ 保存,使用前低速离心弃沉淀物。
- ⑥新城疫强毒:系农业部兽医药品监察所鉴定冻干保存的 F₄₈E₈ 强毒,对敏感鸡的最小致死量 (LD) 约为 10^{-7} 一毫升。
- ⑦稀释液:红细胞凝集试验 (HAT) 和红细胞凝集抑制试验 (HIT) 以及强毒攻击试验所用的稀释液均为 pH 7.2 的灭菌磷酸缓冲生理盐水 (简称 P.B.S.)。饮水免疫和气雾免疫时采用蒸馏水做为疫苗稀释液。
- ⑧红细胞悬液:非免疫公鸡 (6—12 个月龄),心脏采血后置 Alsever 氏液中,将 3—4 只公鸡的心血混合后,置 1500r.p.m. 离心 15 分钟,弃上清液,再加 P.B.S. 混匀后再以同样方法离心,再弃上清液。如此反复将红细胞洗涤离心 3 次直至上清液透明无色为止。然后吸取定量的红细胞,用 P.B.S 配制成 0.5% 的红细胞悬液 (按 V/V 配制) 备用。
- ⑨红细胞保存液:配制通用的 Alsever 氏液。配方如下:

葡萄糖	20.5 克	依次全溶后,分装并经 10 磅/10 分钟高压灭菌后备用。
柠檬酸钠	8.0 克	
氯化钠	4.2 克	
蒸馏水	1000.0 毫升	

- ⑩HAT 和 HIT 的微量法试验器具：选用标准型 96 穴 V 型有机玻璃反应板、0.025 毫升微量滴管和 0.025 毫升定量稀释棒以及专用的微型震荡器。
- ⑪气雾免疫器具：将上海生产的荷花牌 2A 型或 2B 型喷雾枪，接耐压胶管并联在自控空压机上，在 3—4 公斤/厘米²的气压下喷雾，气雾粒子直径约为 10 微米 (μ) 左右。

2. 基本试验方法

- ①新城疫 Lasota 株弱毒疫苗和 HIT 抗原的制备方法：将 Lasota 株种毒用 P.B.S. 做 10 倍稀释后，接种于 9—10 日龄的非免疫鸡胚，每胚绒毛尿囊腔接种 0.1 毫升。继续置 37℃，孵育并每日照蛋，在接种后 24 小时以内死亡的鸡胚淘汰，将 24—120 小时内死亡的鸡胚置 4℃ 过夜。再经无菌手术收获绒毛尿囊液 (AAF)，经无菌检验和血凝价测定，合格者分装置 -20℃ 结冻保存。
- ②红细胞凝集试验 (HAT) 和红细胞凝集抑制试验 (HIT) 的试验方法：参照 Buxton, G. Fraser 合著的《Anemal Microbiology》1977 年版第二卷 496—498 页中的 β -法 (Beta-Methed)。微量试验根据试管法原理，总反应物数量缩小 10 倍，在同样条件下试验，微量法测得的 HI 抗体效价约较试管法迟顿半个至一个血清滴度，判定时以试管法为准，微量法检验在判定结果时要考虑本身略为迟顿这个情况。
- ③免疫方法：饮水免疫按每克疫苗免疫 80 羽鸡计算，每鸡约获得大约 100 个免疫剂量。根据不同日龄鸡的饮水量，按鸡数将疫苗混入一定量的蒸馏水中。不同日龄鸡饮水量参考表 1。

表 1

鸡 的 日 龄	蛋用型鸡 (ml/羽)	肉用型鸡 (ml/羽)
5—15	5—10	5—10
16—30	10—20	10—20
31—60	20—30	20—40
61—120	30—40	40—50
120日龄以上	40—45	50—55

配苗后立即饮用不可久置，饮水容器要冲洗干净。为保证饮水免疫的效力，应在饮水免疫前，根据气温的高低给鸡群停水 3—5 小时；在饮水免疫前后 24 小时以内不得投药或饮用高锰酸钾溶液。

气雾免疫的用苗量和饮水免疫相同。每 1000 头份疫苗混入 250 毫升蒸馏水中供大约 800 只鸡使用。在高密度全舍饲的工厂

化养鸡场施行气雾免疫，可根据车间内总鸡数计算用苗量，可以忽略车间空间容积，但在房大鸡少的车间免疫，应适当增加疫苗量。气雾免疫实际上是雾化局部空间的免疫，因此在喷雾时只需关闭排风机，喷雾枪距离鸡 1—1.5 米对鸡喷射，使鸡体周围形成一个良好的雾化区，要求雾状粒子不立即沉降而在空间悬浮片刻。喷雾完毕后 10 分钟开动排风机。从事气雾免疫的操作人员要注意防护。为避免诱发呼吸系统疾病，故 60 日龄以前的雏鸡不宜采用气雾免疫。

- ④免疫效力的检验方法：各次免疫前随机抽测 HI 抗体的基础效价，并进行强毒攻击试验。各次免疫后定期抽测 HI 抗体效价并定期攻毒检验其免疫力。各次抽检数不少于鸡群总数的 0.05—0.1%。

五个月龄以内鸡进行强毒攻击试验时每鸡胸肌注射强毒约 500LD (即 2×10^{-4} —毫升)；五个月龄以上的鸡胸肌注射约 5000LD (即 2×10^{-3} —毫升)。每批攻毒同时设非免疫敏感鸡两只做强毒对照。攻毒后 24 小时以内死亡者从总数中除名，不做统计基数，从 24 小时以后连续观察 10 天，对照鸡应于攻毒后 4—6 天发病死亡，剖检应具新城疫病变。根据试验

鸡的临床反应、死亡情况和剖检病变统计保护率,凡在观察期内病死的鸡均判为不保护。

二、试验内容和试验结果

本项研究包括四项试验内容,现将试验结果简报如下:

1. 雏鸡抗新城疫母源传递性免疫动态的检测

免疫种鸡可以通过种卵将免疫活性物质传递给亲代雏鸡。这种天然的免疫机制对保护那些免疫功能尚未发育完善的雏鸡免遭病原微生物的侵染,具有积极的生物学意义。迄今对新城疫这种天然免疫效应的全部机理,尚未完全了解,因此对该免疫效应可否暂称为雏鸡抗新城疫母源传递性免疫。

由于雏鸡免疫生理学的特点和母源传递性免疫的存在,致使雏鸡在出壳以后的一段时间内,对疫苗的刺激不能引起十分活跃的免疫应答,不能建立起坚强的主动免疫力。伴随雏鸡日龄的增长,主动免疫效力也随之逐渐改善。因此,在确定雏鸡首次免疫时机的时候,既要考虑到雏鸡母源传递性免疫对主动免疫的影响,又要照顾到免疫效力的连续性。所以有必要通过试验揭示免疫母鸡的亲代雏鸡抗新城疫母源传递性免疫的动态。

本试验先后对 10 余批免疫母鸡的亲代雏鸡约 2500 余只以及一批非免疫母鸡的亲代雏鸡 100 余只,从出壳日起连续测定血清的母源 HI 抗体效价,并从 3 日龄起定期连续进行强毒攻击试验。分析所获试验结果,找到雏鸡日龄、雏鸡母源 HI 抗体效价与保护力三者之间的对应关系。10 余批检测的结果虽然略有差异,但雏鸡抗新城疫母源传递性免疫动态的总趋势是规律的。现将其中四批在一日龄时母源 HI 抗体效价接近的雏鸡检测结果简报见表 2。

表 2 四批免疫母鸡的亲代雏鸡抗新城疫母源传递性免疫动态的检测结果

检测 批 次	雏 鸡 日 龄 检 测 结 果	1		3		5	
		HI 均值	P/C	HI 均值	P/C	HI 均值	P/C
北京市种鸡场一批		1:96		1:32		1:62	24/24(100%)
北京市种鸡场二批		1:103		1:72	11/17(65%)	1:101	16/19(84%)
北京市种鸡场三批		1:66		1:60	13/19(68%)	1:114	16/20(80%)
北京市种鸡场四批		1:59		1:58	15/20(75%)	1:36	14/18(78%)
四 批 总 计		1:81		1:56	39/56(70%)	1:78	70/81(86%)

10		15		20		25	
HI 均值	P/C	HI 均值	P/C	HI 均值	P/C	HI 均值	P/C
1:8	3/15(20%)	1:5	2/20(10%)	1:4	2/20(10%)		
1:15	9/19(47%)	1:6	1/19(5%)	1:6	2/20(10%)	1:6	1/12(8%)
1:12	12/20(60%)	1:6	9/20(45%)	1:3	3/19(16%)	1:5	1/17(6%)
1:12	24/54(44%)	1:6	12/59(20%)	1:4	7/59(12%)	1:6	2/29(7%)

注: HI 为每次抽测鸡的平均值。每次抽测不少于 15—20 羽。随机取样。抽样率为鸡群总鸡数的 0.15%。P/C 保护数/致毒数。