

# 狐貉犬瘟热 细小病毒性肠炎和脑 (肝)炎三联疫苗研制

程世鹏, 吴 威, 聂金珍, 丛 丽, 赵 军

(中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109)

**摘 要:**用 CDV 弱毒、FPV 弱毒和 CAV-2 型弱毒研制成功了狐貉三联疫苗。该三联疫苗安全可靠, 免疫原性强, 免疫期 6 个月以上, 室温可保存 3 d, 4℃可保存 2 周, -20℃可保存 6 个月, 该三联疫苗免疫剂量为 3 ml/只, CDV、FPV 和 CAV-2 型弱毒疫苗滴度分别为  $10^{6.0} \sim 10^{8.0}$ , 现场应用 100 余万只狐貉, 抗体阳转率 93%。

**关键词:**狐; 貉; 犬瘟热; 细小病毒性肠炎; 脑炎; 三联疫苗

**中图分类号:** S865.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0366-6964(2001)06-0576-04

狐貉是珍贵的毛皮动物, 我国狐貉存栏数已达 300 多万只, 形成了一大产业。据我们调查分析目前危害狐貉养殖业最大的传染病有犬瘟热、细小病毒性肠炎和腺病毒病(即狐狸脑炎和貉肝炎)。为了更好的控制狐貉三大传染病, 我们开展了狐貉犬瘟热、细小病毒性肠炎和脑(肝)炎三联疫苗的研制, 经过几年的系统研究, 现已研制出狐貉犬瘟热、细小病毒性肠炎和脑(肝)炎三联疫苗, 该三联疫苗安全可靠, 保护率在 93% 以上, 免疫期 6 个月以上, 并进行了大面积应用, 取得了满意的效果。

## 1 材料和方法

**1.1 犬瘟热鸡胚成纤维细胞弱毒疫苗** 疫苗毒种采用法国鸡胚成纤维细胞弱毒经中国农科院特产研究所<sup>[1]</sup>培育, 使毒株滴度达到  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/0.3 ml, 经毒种鉴定符合兽用生物制品要求, 在制造疫苗中我们采用浓缩培养方法, 使病毒滴度保持  $10^{6.0} \sim 10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>/0.3 ml。

**1.2 细小病毒性肠炎弱毒疫苗** 根据芬兰学者 P. Veijalainen 等<sup>[2]</sup>的报道, 蓝狐肠炎细小病毒与水貂肠炎细小病毒和猫泛白细胞减少症病毒相一致结论, 我们采用猫泛白细胞减少症病毒(FPV-A)作为毒种, 毒种与疫苗制备见文献<sup>[3]</sup>, 在培养该病毒采用浓缩培养方法使该病毒滴度达到  $10^{7.0} \sim 10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/0.03 ml。

**1.3 狐貉脑(肝)炎弱毒疫苗** 该疫苗采用犬腺病毒-2 型弱毒作为毒种, 毒种和疫苗的制备及检定方法见文献<sup>[4]</sup>。

**1.4 犬瘟热强毒** 由中国农科院特产研究所分离鉴定保存, 犬瘟热强毒半数感染量为  $10^{-2}$ /ml。

**1.5 犬腺病毒-1 型(CAV-1)强毒** 为中国农科院特产研究所保存复壮的, 方法为取健康狐狸 3 只, 采血进行中和试验, 确定为 CAV 阴性后, 分笼隔离饲养, 其中 2 只狐皮下接种

CAV-1 强毒原液 2 ml, 另 1 只做对照。在接种后 7 d 出现脑炎症状时, 将被接种狐迫害, 无菌采脑组织, 用 pH 7.4 15 mmol/L PBS 制成 10% 悬液, -70℃ 冻存备用, 对照狐一切正常。试验确定半数感染量为  $10^{-1}$ /ml。

**1.6 抗体检测方法** (1) 犬瘟热抗体检测方法: 采用体外中和试验检测抗体, 具体方法见文献<sup>[5]</sup>。(2) 细小病毒抗体检测方法: 采用对流免疫电泳(CIPE)方法检测抗体, 具体方法见文献<sup>[6]</sup>。(3) 腺病毒抗体检测方法: 采用酶联免疫组化法, 具体方法为, 取制备好的快诊板, 在其上加入含有 5% 正常兔血清的 PBS 阻断 20 min, 然后去掉阻断液, 加第一抗体(待检狐血清), 在室温下感作 2 h, 用含 5% 兔血清 PBS 清洗 5~7 次, 加第二抗体既酶标记兔抗狐 IgG, 室温下感作 1 h, 用清洗液清洗 5~7 次, 加入四氯萘酚底物, 在暗室内感作 20 min, 充分洗涤, 加入甘油 PBS 缓冲液, 镜检, 阳性细胞成黑色。

**1.7 实验动物** 中国农科院特产研究所毛皮动物试验基地提供, 均为无三种感染病史的健康狐和貉。

**1.8 三联疫苗的配制** 根据三种疫病的轻重缓急, 制定配苗原则为首先刺激机体产生抗犬瘟热抗体, 次之为产生抗细小病毒抗体, 最后为产生抗腺病毒抗体的原则, 根据这个原则在配备三种疫苗制定相应比例, 再加入适当的保护剂充分混合。

**1.9 三联疫苗的各项检测** 按兽用生物制品的要求, 每批取样做无菌试验, 安全试验, 效力和免疫剂量试验, 免疫期试验和保存期及现场应用试验等。

## 2 试验结果

**2.1 三联疫苗研制结果** 我们共批量研制 73 批疫苗, 100 多万头份, 每批疫苗的无菌试验均为阴性, 其中各单苗滴度无明显差异, 分别为犬瘟热弱毒  $10^{6.0} \sim 10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/0.3 ml, FPV-A  $10^{6.5} \sim 10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.03 ml, 犬腺病毒  $10^{7.0} \sim 10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml。

**2.2 三联疫苗安全试验结果** 选取 5 批三联疫苗, 批号为 9601、9602、9603、9604、9605, 每个批号疫苗接种 3 只狐狸, 3 只貉, 每只 8 ml, 分点注射, 经 30 d 观察未发现过敏反应和任何临床症状, 而且局部吸收良好。

**2.3 三联疫苗效力及剂量试验** 取 5 批疫苗即 9601、9602、9603、9604、9605 批号三联疫苗, 每批疫苗用 1.5 ml 和 3.0 ml 分别接种 5 只狐狸, 设对照组 10 只狐狸, 在免疫 21 d 后全部采血分离血清检测抗细小病毒抗体, 然后分别用 100 个半数感染量的犬腺病毒-1 型和 100 个半数感染量犬瘟热强毒对免疫狐和对照狐进行攻毒, 观察 30 d 结果见表 1。

从表 1 结果可以看出, 该三联疫苗免疫剂量为 3 ml/只, 保护率可达 100%。

**2.4 三联疫苗免疫期试验结果** 选取 100 只健康无三种病毒抗体的狐狸, 用上述五批三联疫苗免疫, 分别在第 1 d、21 d、2 个月、6 个月采血分离血清, 测定抗体情况, 结果见表 2。

从表 2 中结果可以看出, 在 2 个月中抗体上升较快而且幅度大, 以后抗体逐步回落, 在 6 个月时仍能保持较高的抗体滴度, 因此可以确定该三联疫苗免疫期为 6 个月。

**2.5 三联疫苗保存期试验结果** 该三联疫苗在不同温度下, 保存期明显不同。经 5 批次疫苗的测试证明, 该三联疫苗在室温条件下保存 3 d 滴度不变, 6 d 后滴度降低  $10^{2-1}$  左右, 在 4℃ 条件下保存 2 周滴度下降较为缓慢平均  $10^{1.0}$  左右, 在 -20℃ 条件下保存 4 个月滴度不便, 但在 6 个月时疫苗滴度均有下降, 平均下降 0.3~0.5 个滴度, 特别是犬瘟热疫苗下降幅度较大, 因此

表1 三联疫苗免疫效力试验结果

Table 1 Immune efficacy test of three combination vaccine

疫苗批号 Vaccine NO.	免疫剂量(ml) Immune dosages	免疫动物(只) Immune animals	攻毒后犬瘟热 Challenge of distemper		攻毒后狐脑炎 Challenge of encephalitis		细小病毒 CIEP 结果 Parvovirus CIEP results
			发病数 Incidence	保护率 Protection ratio(%)	发病数 Incidence	保护率 Protection ratio(%)	
960519	1.5	10	1/5	80	0/5	100	—
	3.0	10	0/5	100	0/5	100	卅
960607	1.5	10	2/5	60	1/5	80	±
	3.0	10	0/5	100	0/5	100	卅
960608	1.5	10	0/5	100	1/5	80	—
	3.0	10	0/5	100	0/5	100	卅
960710	1.5	10	1/5	80	1/5	80	+
	3.0	10	0/5	100	0/5	100	卅
960715	1.5	10	0/5	100	0/5	100	+
	3.0	10	0/5	100	0/5	100	卅
对照组 Control	NT	10	5/5	0	5/5	0	—

表2 三联疫苗免疫期试验结果

Table 2 Immune period test of three combination vaccine

免疫时间 Immune time		1 d First day	21 d Twenty days	2 个月 Two months	6 个月 Six months
犬瘟热抗体 Anti canine distemper antibody		1: 2	1: 80	1: 160	1: 80
脑炎抗体 Anti enteritis antibody		1: 4	1: 20	1: 40	1: 20
肠炎抗体 Anti encephalitis antibody		—	+	+	+

我们确立三联疫苗保存期,可根据各批疫苗的滴度注明不同温度的保存期,一般为-20℃条件下保存6个月。

**2.6 三联疫苗保护率的测定结果** 在应用三联疫苗的养狐貉场,分别在接种后3个月、6个月随机选30只狐狸采血做抗体检测,结果表明在3个月犬瘟热抗体阳性率96%,腺病毒抗体阳性率94%,细小病毒性肠炎病毒抗体阳性率97%,6个月犬瘟热抗体阳性率93%,腺病毒抗体阳性率94%,细小病毒性肠炎病毒抗体阳性率95%,从以上结果我们可以得出结论,该三联疫苗免疫后6个月保护率在93%左右。

**2.7 三联疫苗中试结果** 我们批量研制73批该三联疫苗,100多万头份,分别应用于吉林、黑龙江、河北、辽宁、山东、宁夏等地狐貉,经几年的现场应用,用户反映效果良好,随机抽检几个兽场抗体阳性率均在93%以上,凡是应用该三联疫苗的养狐貉场几年来从未发生三种传染病,证明该三联疫苗具有方便、廉价、省时、省力等优点。

### 3 讨论与小结

犬瘟热、细小病毒性肠炎和脑(肝)炎是狐貉养殖业三大疫病,只有控制好三种传染病,该

产业才能顺利发展, 以往主要采用单价疫苗预防三种疫病, 不仅费工费时, 而且由于狐貉饲养密度大而野性强, 多次捕抓易造成各种传染病流行爆发, 该三联疫苗克服了这些弱点, 以 1 次性注射控制三大疫病。

该三联疫苗中细小病毒部分采用了猫泛白细胞减少症弱毒, 是依据芬兰学者 P. Veijalainen<sup>[2]</sup>用狐细小病毒单克隆抗体, 分析证明狐细小病毒与猫泛白细胞减少症病毒相一致, 通过我们几年应用该三联疫苗也证明了这一点。

经系统试验建立了先进的生产工艺和三种疫苗的配比, 改进了以往培养病毒的方法使三种病毒的滴度提高 2~ 3 个滴度, 单位容积内病毒含量增高, 使免疫剂量减少。

该三联疫苗在国内外首次研制成功, 克服应用单苗的许多不便。

用 3.0 ml 三联疫苗, 免疫 21 d 后, 用强毒攻击可获得 100% 保护, 疫苗保存期为 -20℃ 条件下保存 6 个月。

经大面积的现场应用证明该三联疫苗安全可靠, 免疫原性强, 免疫期可达 6 个月, 该苗具有省时、省力、一针多能等优点, 深受广大用户的欢迎, 是一种具有广泛应用前景的疫苗。

#### 参考文献:

- [1] 钱国成, 郭淳久, 王 斌, 等. 水貂犬瘟热弱毒鸡胚细胞疫苗[J]. 中国兽医杂志, 1981, 7(8): 7~ 10.
- [2] P. Veijalainen. Characterization of biological and antigenic properties of raccoon dog and blue fox parvoviruses: a monoclonal antibody study[J]. Veterinary Microbiology, 1988, 16(2): 219~ 230.
- [3] 吴 威, 聂金珍, 程世鹏, 等. 水貂细小病毒性肠炎弱毒疫苗的研究[J]. 兽医大学学报, 1992, 24(2): 165~ 169.
- [4] 聂金珍, 郑海发, 吴 威, 等. 犬腺病毒 II 型病毒株的致弱及狐狸弱毒疫苗的研究[J]. 中国农业科学, 1992, 25(2): 14~ 22.
- [5] 沈 广, 等. 经济动物群发病学[M]. 北京农业大学出版社, 1993, 170~ 174.
- [6] 聂金珍, 吴 威, 等. 对流免疫电泳法诊断水貂病毒性肠炎[J]. 中国兽医杂志, 1992, 18(2): 11~ 12.

### STUDIES ON FOX & RACCOON DOG DISTEMPER, PARVOVIRUS ENTERITIS AND ENCEPHALITIS (HEPATITIS) TRIPLE VACCINE

CHENG Shi-peng, WU Wei, NIE Jin-zhen, CONG Li, ZHAO Jun

(Institute of Special Wild Economic  
Animal and Plant, CAAS Jilin 132109, China)

**Abstract:** Modified CDV, FPV and CAV —1 were used to prepare fox and raccoon dog triple vaccine. Vaccination experiments showed that the vaccine was safety, its immunogenicity was high, the immune period was up to six months. The vaccine could be stored at 4℃ for 2 weeks, at -20℃ for six months, the immune dosage of the vaccine was 3 ml. The titers of modified vaccine CDV, FPV and CAV —2 were  $10^{6.0}$ — $10^{8.0}$ , the vaccine was used in over one million foxes and raccoon dogs, the antibody converting ratio was up to 93 percent.

**Key words:** Fox; Raccoon dog; Distemper; Parvovirus enteritis; Encephalitis; Triple vaccine