

水貂犬瘟热、病毒性肠炎和肉毒梭菌 中毒三联疫苗的研究*

吴威 聂金珍 程世鹏 吴玉林 牛景华 苗丽

(中国农业科学院特产研究所)

屠伟英

(中国兽药监察所)

摘 要

用 FPV 弱毒、CDV 弱毒和肉毒梭菌 C 型疫苗研制成功了水貂三联疫苗。该苗安全可靠、免疫原性强、免疫期达 6 个月以上, 同各单苗相比抗体产生期及效价相近, 室温可保存 3 天; 4°C 可保存 2 周; -20°C 可保存 6 个月。该苗的免疫剂量为 2 ml, 其中 CDV 和 FPV 弱毒滴度分别为 $10^{3.0}$, 肉毒梭菌 C 型疫苗为 2 mg/ml。现场应用 26000 余只水貂, 抗体阳转率达 90% 以上。

关键词 水貂, 犬瘟热, 病毒性肠炎, 肉毒梭菌中毒, 三联疫苗

水貂犬瘟热, 病毒性肠炎和肉毒梭菌中毒症是由犬瘟热病毒 (CDV)、水貂肠炎细小病毒 (MEV) 和肉毒梭菌 C 型引起的三种烈性传染病。每年给水貂养殖业造成巨大的经济损失, 严重阻碍了养貂业的发展。目前仍无特效药物治疗三种疾病^[1], 只有采用预防免疫接种疫苗来控制三种疾病的流行蔓延。国外自 70 年代已研制出水貂犬瘟热、病毒性肠炎和肉毒梭菌中毒三联疫苗, 这大大节省了人力、物力、减小了劳动强度, 更重要的是减少了疾病的传播机会。我国自 80 年代以来先后研制成功了水貂犬瘟热^[2,3]、病毒性肠炎和肉毒梭菌 C 型单价疫苗, 但尚无水貂三联疫苗研制成功的报道, 为了满足生产实践需要, 赶上世界先进水平, 我们利用水貂犬瘟热弱毒疫苗^[2]、水貂病毒性肠炎弱毒疫苗^[4]和肉毒梭菌 C 型干粉疫苗研制成功了水貂三联疫苗。经系统研究后进行了大面积应用, 取得满意效果。现将试验结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、水貂病毒性肠炎弱毒疫苗、犬瘟热弱毒疫苗和肉毒梭菌 C 型干粉疫苗, 前二种疫苗系利用猫泛白细胞减少症弱毒 (FPV) 和法国犬瘟热弱毒按文献^[4,2]报道的方法研制而成, 其滴度分别为 $10^{4.25} - 10^{5.0}$ TCID_{50/0.03ml} 和 $10^{4.0} - 10^{5.0}$ TCID_{50/0.01ml}; 后者系中国兽药监察所提供。

三、MEV 强毒和肉毒梭菌毒素, 前者系特产所分离鉴定的, 其最小感染量为 10^{-3} /

* 魏绪忠、崔连久、于盛仿、初义刚参加了该项研究。

** 于 1991 年 7 月 8 日收到修改稿。

10ml^[5]；后者系中国兽药监察所提供，其对水貂和小白鼠的最小致死量分别为 $10^{-3}/1\text{ml}$ 和 $10^{-3}/0.1\text{ml}$ 。

三、试验水貂，系 MEV 抗体和 CDV 抗体阴性无肉毒梭菌中毒病史的成年水貂和断乳后21天幼貂。

四、高免血清：

(一)、水貂病毒性肠炎阳性血清，系“左MEV”强毒感染发病耐过后血清，效价为 16^{\times} 以上。(二)、水貂犬瘟热阳性血清，系用犬瘟热弱毒免疫水貂制备而成，中和效价为 320^{\times} 以上。(三)、肉毒梭菌毒素阳性血清，系用肉毒梭菌毒素攻击肉毒梭菌疫苗免疫的水貂制备而成，其中和效价为10个小白鼠最小致死量毒素。

五、三联苗研制及其各项试验：根据水貂犬瘟热弱毒疫苗、水貂肠炎弱毒疫苗和肉毒梭菌C型干粉疫苗的试验结果^[2,4]，将犬瘟热弱毒疫苗 1ml、肠炎弱毒疫苗 1ml 和肉毒梭菌C型干粉疫苗 4mg 在无菌条件下充分混合，然后取样作无菌试验、疫苗滴度测定、安全试验、效力和免疫剂量试验、免疫期试验和疫苗保存期试验及现场应用试验^[3]。

试验结果

一、三联疫苗研制结果：我们批量研制了15批三联疫苗，计 26978 头份疫苗。每批疫苗的无菌试验全为阴性，其中各成份的滴度与各单苗的滴度无明显差异，分别为 FPV $10^{4.0} - 10^{5.0}$ TCID₅₀/0.03ml，CDV $10^{4.0} - 10^{5.0}$ TCID₅₀/0.01ml 和肉毒梭菌C型疫苗 2mg/ml。

二、三联疫苗安全试验结果：用三联疫苗对水貂进行超剂量 (8ml) 皮下接种，经30天观察未发现过敏反应和任何临床症状，而且局部吸收良好。

表 1 小群水貂免疫后抗体水平的调查

Table 1 Investigation on antibody level of mink in small group post-immunization

免疫时间 Immune time	犬瘟热抗体 Anti-canine distemper antibody			肠炎抗体 Anti-enteritis antibody			肉毒中毒抗体 Anti-botulism antibody		
	貂数 (只) Mink no.	阳性数 (只) Positive no.	阳性率 (%) Positive ratio(%)	貂数 (只) Mink no.	阳性数 (只) Positive no.	阳性率 (%) Positive ratio(%)	貂数 (只) Mink no.	阳性数 (只) Positive no.	阳性率 (%) Positive ratio(%)
2 个月 Two monthes	10	9	90	10	10	100	10	10	100
4 个月 Four monthes	10	9	90	10	9	90	10	10	100
6 个月 Six monthes	10	9	90	10	9	90	10	10	100

三、三联苗效力和免疫剂量试验结果：用 1ml 和 2ml 三联苗皮下接种水貂，接种后14天和21天采血测其抗体水平，接种后21天用100个最小感染量的 EMV 强毒和100个最小致死量的肉毒梭菌毒素攻击水貂，攻毒后逐日观察临床症状。结果表明接种2ml疫苗的水貂在免

疫后14天均产生中和抗体。免疫后21天用100个最小感染量的 MEV 强毒和100个最小致死量的肉毒梭菌毒素攻击, 保护率为100%, 犬瘟热中和抗体滴度平均为1:160, 而接种 1ml 疫苗的水貂保护率为66.7%, 因此该苗的免疫剂量为 2ml。免疫后14天即可产生免疫力。

根据上述结果, 把 FPV 弱毒疫苗和犬瘟热弱毒疫苗均稀释成 $10^{-3.0}$, 肉毒梭菌 C 型干粉疫苗含量不变, 再测定疫苗的免疫剂量。试验得知, 三联苗中的 FPV 和 CDV 滴度为 $10^{3.0}$, 剂量 2ml, 水貂可获得100%保护, 因此三联苗中的 CDV 和 FPV 滴度不能低于 $10^{3.0}$ 。

四、三联疫苗与水貂犬瘟热弱毒疫苗、水貂肠炎弱毒疫苗和肉毒梭菌 C 型干粉疫苗免疫效果比较, 用 2ml 三联苗、1ml 水貂肠炎弱毒疫苗、1ml 犬瘟热弱毒疫苗和 4mg/ml 肉毒梭菌 C 型干粉疫苗 1ml 分别皮下接种水貂, 在免疫后 7 天、14 天、21 天、30 天和 60 天采血测其抗体水平, 从而比较三联苗与单苗的免疫效果。试验证明单苗和联苗抗体最早产生时间和抗体水平相似 (图 1~2)。经小白鼠中和试验证明, 免疫30天后肉毒梭菌 C 型干粉疫苗和三联苗均可中和 1 个最小致死量的肉毒梭菌毒素。联苗和单苗的抗体水平十分相近, 这证明三种疫苗之间的拮抗作用很小, 而貂体可同时对三种抗原产生免疫应答。

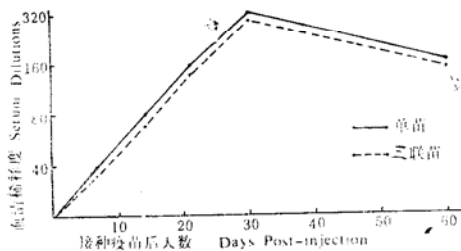


图 1 三联苗和犬瘟热单苗抗体消长的比较

Fig. 1 Comparison between antibody levels of three-combination vaccine and canine distemper vaccine

—: 单苗 Monovaccine ---- 联苗 Combination vaccine

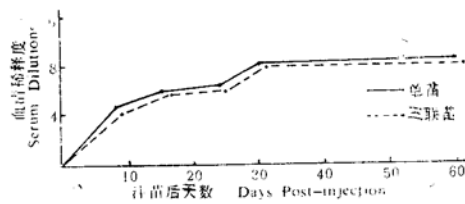


图 2 三联苗与 FPV 弱毒苗抗体消长的比较

Fig. 2 Comparison between antibody levels of three-combination vaccine and modified FPV vaccine

—: 单苗 Monovaccine ---- 联苗 Combination vaccine

五、三联疫苗免疫期试验结果, 分别在免疫后 3 个月、6 个月随机从免疫的 100 只水貂中选 6 只水貂, 分别用 100 个最小感染量的 MEV 强毒和 10 个最小致死量的肉毒梭菌毒素攻击, 同时测犬瘟热中和抗体水平, 从未免疫貂群取 6 只水貂作对照, 来确定三联苗的免疫期。试验得知, 免疫水貂在 6 个月时中和抗体水平仍然很高, 而对照水貂抗体水平很低, 只在 10 倍左右, 这可能是非特异性中和作用, 此时能耐受上述强毒和毒素的攻击, 因此该苗的免疫期为 6 个月。

六、三联苗保存期试验结果, 该苗在不同温度下, 保存期明显不同。经过多次试验证明, 该苗在室温条件下保存 3 天滴度不变, 6 天后滴度下降到 $10^{1.0}$ 左右; 在 4°C 条件下保存 2 周, 但在 2 周后滴度均有下降, 下降幅度缓慢; -20°C 条件下, 保存 4 个月滴度不变, 但

在6个月时疫苗滴度均有下降,平均下降0.3个滴度。因此我们在确定疫苗保存期时可根据各批疫苗的滴度注明不同温度条件下的保存期。

七、三联苗现场应用试验结果:

(一)小区域试验结果,在吉林某貂场(种兽286只,仔兽792只)进行现场小群免疫试验。在全群免疫接种前,分别接种30只成年貂和30只仔貂(2ml/只)。观察21天免疫水貂无任何临床症状,局部吸收良好,无过敏反应。全群免疫接种后定期观察和中和抗体水平测定得知,全群水貂在免疫后6个月内未发生上述三种疾病,收到了良好的免疫效果。犬瘟热抗体阳转率为90%;肠炎阳转率达90%以上;肉毒梭菌抗体阳转率为100%,这充分说明该三联苗免疫效果确实。

(二)中间试验结果,在吉林、山东等省14个貂场,用三联苗免疫接种25000余只水貂,其中有犬瘟热、病毒性肠炎病史的5个貂场9000余只水貂。经半年观察未发生犬瘟热、病毒性肠炎和肉毒梭菌中毒。经4个貂场160只水貂抗体临测表明,平均阳转率为90%以上。从而证明,该苗安全、免疫确实,深受用户的欢迎。

讨 论 和 小 结

一、水貂三联苗是用FPV弱毒疫苗、犬瘟热弱毒疫苗和肉毒梭菌C型干粉苗混合而成。系统试验表明,三种疫苗混合后不影响其各自的免疫效果。联苗和单苗比较试验已充分说明了这一点。肉毒梭菌C型疫苗是通过透析去掉残余甲醛冻干而成的。试验证明该苗对犬瘟热弱毒和FPV弱毒无影响,这说明该疫苗经透析后甲醛含量甚微。

二、用CDV弱毒疫苗、FPV弱毒疫苗和肉毒梭菌C型干粉苗研制的三联苗,国外报道甚少。我们首次应用两种弱毒疫苗研制成功水貂三联苗,这为今后免疫研究奠定了理论基础。

三、水貂三联苗抗体产生最早时间为免疫后7天。免疫后21天用强毒攻击可获得100%保护。

四、经系统试验建立了较为先进的生产工艺和三种疫苗的配比。我们首次创建了水貂犬瘟热、病毒性肠炎和肉毒梭菌三联疫苗的生产工艺。

五、效力试验证明,该三联疫苗能使水貂获得坚强免疫力,能耐受100个最小感染量MEV强毒和100个最小致死量肉毒梭菌毒素的攻击,犬瘟热中和抗体滴度可达 320^{\times} 以上。

六、经现场应用试验证明,该三联疫苗安全可靠、免疫原性强、免疫6个月时抗体阳转率达90%以上。该苗具有省时、省力、一针多能等优点,深受用户的欢迎,是一种大有应用前途的疫苗。

参 考 文 献

- [1] 聂金珍等. 水貂病毒性肠炎. 中国兽医杂志, 1989, 15(8):46~48.
- [2] 王斌等. 犬瘟热猴肾传代细胞化弱毒苗的研究. 中国农学通报, 1989, 5(3):25~28.
- [3] 钱国成等. 水貂犬瘟热弱毒鸡胚细胞疫苗. 中国兽医杂志, 1981, 7(8):7~10.
- [4] 吴玉林等. 水貂弱毒二联疫苗的研制. 特产研究, 1990, 47(1):9~12.
- [5] 于永仁等. 水貂病毒性肠炎的防制研究. 病毒学报, 1985, 1(2):147~151.
- [6] 农业渔业部. 兽医生物制品及检验规程第 5 次修订本. 农业渔业部, 313~321.

STUDIES ON MINK DISTEMPER, VIRUS ENTERITIS AND BOTULISM COMBINATION VACCINE

Wu Wei, Nie Jinzhen et al.

(Special Products Research Institute of CAAS)

Abstract

Modified FPV, CDV and botulism Type C vaccines were used to prepare mink three combination vaccine. Vaccination experiments show that the vaccine is safety, its immunogenicity is high, the immune period is up to six months. Compared with mink distemper modified virus vaccine, mink enteritis modified virus vaccine and botulism vaccine respectively, the combination vaccine has a similar antibody production period and titers. The vaccine can be stored at room temperature for 3 days; at 4°C for 2 weeks; at -20°C for six months. The immune dosage of the vaccine is 2ml. The titers of modified CDV and FPV are $10^{3.0}$; that of botulism Type C vaccine is 2mg/ml. The vaccine was used in above 26000 minks in the field. The antibody converting ratio is up to 90 percent.

Key words Mink distemper, Virus enteritis, Botulism, Three combination vaccine.