

鸡减蛋综合征灭活抗原不同保存方式的分析比较

王 嘉¹,顾庆云²,金红岩²,毛娅卿¹,吴 涛¹,王 哲¹,孔冬妮¹,李 岭¹

(1. 中国兽医药品监察所,北京 100081;2. 西藏职业技术学院,拉萨 850030)

[收稿日期] 2016-10-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 01-0012-03 [中图分类号] S858.31

[摘 要] 为比较不同保存方式对鸡减蛋综合征灭活抗原的影响,采用禽腺病毒京 911 株 (CVCC AV70) 经尿囊腔接种易感鸭胚,收获感染鸭胚液,经 β -丙内酯灭活后,对该抗原的保存条件及其稳定性等方面进行优化。冻干抗原与未冻干抗原在相同温度下,冻干抗原 HA 效价下降较慢。冻干抗原在 2~8℃ 和 -15℃ 以下保存,HA 效价没有明显差异。因此,生产的鸡减蛋综合征灭活抗原要在冻干后保存在 2~8℃ 最佳。保存条件的优化不仅可以减少经济损失,而且还有助于更好的控制禽腺病毒疫情的暴发。

[关键词] 鸡减蛋综合征;禽腺病毒;HA 效价;保存方式

Analysis and Comparison of Different Preservation Methods of Inactivated Antigen of Chicken Egg Drop Syndrome

WANG Jia¹, GU Qing-yun², JIN Hong-yan², MAO Ya-qing¹, WU Tao¹, WANG Zhe¹, KONG Dong-ni¹, LI Ling¹

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Tibet Vocational Technical College, Lhasa 850030, China)

Abstract: In order to compare the effects of different preservation methods on the inactivated antigen of chicken egg drop syndrome, avian adenovirus Beijing 911 strain (CVCC AV70) was inoculated in duck embryo allantoic cavity. Optimizing the preservation conditions and stability of antigen after the harvested virus was inactivated by β propiolactone. Comparison of the freeze dried antigen and the non freeze dried antigen at the same temperature, the titer of freeze-dried antigen HA decreased slowly, and there was no significant difference in HA titer at different temperatures. Therefore, the freeze dried and inactivated antigen of the chicken egg drop syndrome should be kept at 2~8℃. Optimization of preservation conditions can not only reduce economic losses, but also contribute to a better control of the outbreak of avian adenovirus.

Key words: egg drop syndrome; avian adenovirus; HA titer; preservation method

鸡减蛋综合征 (Egg Drop Syndrome, EDS) 是由腺病毒科禽病毒属第三群具有血凝性的腺病毒引起的一种急性传染病^[1]。其临床症状表现为:产出软壳蛋、无壳蛋、薄壳蛋等畸形蛋,蛋的破损率明显增高,整个病

程持续 5~6 周,以后产蛋率逐渐回升,但很难达到下降前水平,严重影响养禽业的经济效益^[2-3]。

目前对其预防措施为疫苗免疫,虽然有其他方法进行诊断^[4-5],但其临床诊断的主要方法是血凝抑制

试验。根据现行《中国兽药典》三部规定,含 EDS 部分效力检验必须进行血凝抑制试验^[6]。因此,鸡减蛋综合征血凝抑制抗原的研究极具实际意义,易于保存和效价稳定的抗原更具经济效益。目前使用的抗原存在保存时间短和 HA 效价不稳定等问题,本研究对其进行优化,保证临床诊断的准确性。

1 材料与方法

1.1 材料 禽腺病毒京 911 株(CVCC AV70)、鸡新城疫阳性血清、鸡减蛋综合征血凝抑制阳性血清购自中国兽医药品监察所,置 -70 ℃ 保存;鸭胚购自北京平谷养殖场;β - 丙内酯购自 Alfa Aesar 公司;灭菌生理盐水、阿氏液、PBS 均由中海公司提供;SPF 鸡红细胞由中监所基础保障处提供;禽流感(H5、H7、H9 亚型)阳性血清均购自哈尔滨兽医研究所。

1.2 方法

1.2.1 抗原制备

1.2.1.1 抗原繁殖 将禽腺病毒京 911 株(CVCC AV70)用灭菌生理盐水进行 10 倍稀释,经尿囊腔接种 10~11 日龄鸭胚,每胚 0.1 mL^[7-8]。置 37 ℃ 孵育 120 h 后,将所有活胚取出,在 2~8 ℃ 条件下冷蛋 10 h 以上。收获鸭胚尿囊液,经 10000 r/min 离心 30 min 去除杂质。

1.2.1.2 抗原灭活 将收获的鸭胚尿囊液加入 1/4000~1/8000 体积的 β - 丙内酯,置于 2~8 ℃

灭活 10 h 以上,再置于 37 ℃ 作用 1 h 失活。

1.2.1.3 分装及冻干 将灭活后的抗原分为 4 组,第一组:分装后 -15 ℃ 以下保存;第二组:加入 20% 甘油混匀分装后 2~8 ℃ 保存;第三组:分装冻干后 -15 ℃ 以下保存;第四组:分装冻干后 2~8 ℃ 保存。

1.2.2 常规检验 将所有抗原按现行《中国兽药典》^[6]进行无菌检验、性状检验,应符合现行《中国兽药典》^[6]规定。

1.2.3 效价测定 按现行《中国兽药典》^[6]进行红细胞凝集试验,HA 效价应不低于 1:512。

1.2.4 保存期试验 按现行《中国兽药典》^[6]红细胞凝集试验方法,将所有抗原分别保存至 1 个月、6 个月、9 个月、12 个月、18 个月、24 个月检测其 HA 效价,以确定其保存时间及温度。

1.2.5 特异性检验 将长时间保存 HA 效价稳定的抗原与鸡减蛋综合征病毒阳性血清、禽流感病毒阳性血清(H5、H7、H9 亚型)、新城疫病毒阳性血清以及 SPF 鸡血清按《中国兽药典》^[6]进行血凝抑制试验。

2 结果

2.1 无菌检验 经 25 ℃ TG、GA、GP 三种培养基和 37 ℃ TG、GA 两种培养基检测,判定每组抗原均无菌生长,符合现行《中国兽药典》^[6]规定。

2.2 性状检验 结果如表 1 所示,均符合现行《中国兽药典》^[6]规定。

表 1 不同保存条件下抗原性状检验结果

组别	保存条件	恢复至室温,观察结果
第一组	未冻干, -15 ℃ 以下	呈微黄色澄明液体
第二组	未冻干, 2~8 ℃	呈微黄色澄明液体
第三组	冻干, -15 ℃ 以下	微黄色疏松团块,易于瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解。
第四组	冻干, 2~8 ℃	微黄色疏松团块,易于瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解。

2.3 效价测定 将各组抗原恢复至室温,冻干抗原恢复至原体积,按现行《中国兽药典》^[6]三部进

行红细胞凝集试验,每组重复进行三次试验,HA 效价均一致,结果如表 2 所示。

表 2 不同保存条件下抗原 HA 效价测定结果

组别	保存条件	HA 效价	HA 效价
第一组	未冻干, -15 ℃ 以下	1: 10240	1: 10240
第二组	未冻干, 2~8 ℃	1: 10240	1: 10240
第三组	冻干, -15 ℃ 以下	1: 4096	1: 4096
第四组	冻干, 2~8 ℃	1: 4096	1: 4096

2.4 保存期试验 将每组抗原分别保存至3个月、6个月、9个月、12个月、18个月、24个月后,按现行《中国兽药典》^[6]三部进行红细胞凝集试验,结果如表3所示。由表中数据可知:未冻干的抗原

(第一组、第二组)随保存时间变长而HA效价变低;冻干毒的抗原(第三组、第四组)尽管保存温度不同,在保存期内HA效价没有明显差异。

表3 不同保存时间HA效价

保存期	第一组	第二组	第三组	第四组
3个月	1:1024	1:1024	1:4096	1:4096
6个月	1:512	1:1024	1:4096	1:4096
9个月	1:256	1:256	1:4096	1:4096
12个月	1:256	1:256	1:4096	1:4096
18个月	1:64	1:64	1:4096	1:4096
24个月	1:64	1:64	1:4096	1:4096

2.5 特异性检验 将保存24个月的冻干抗原(第三组、第四组)与鸡减蛋综合征病毒阳性血清、禽流感病毒阳性血清(H5、H7、H9亚型)、新城疫病毒阳性血清及SPF鸡血清按现行《中国兽药典》^[6]进行血凝抑制试验,结果如表4所示。由表中数据可知,冻干的抗原仅与鸡减蛋综合征病毒阳性血清有血凝抑制反应HI效价为1:1024,与禽流感病毒阳性血清(H5、H7、H9亚型)、新城疫病毒阳性血清及SPF鸡血清HI效价均小于1:2,判为阴性。

表4 特异性试验结果

HI效价	第三组抗原	第四组抗原
EDS 阳性血清	1:1024	1:1024
ND 阳性血清	<1:2	<1:2
AI H5 亚型阳性血清	<1:2	<1:2
AI H7 亚型阳性血清	<1:2	<1:2
AI H7 亚型阳性血清	<1:2	<1:2

3 讨论与小结

鸡减蛋综合征对我国养禽业威胁巨大^[9-10],目前国内外均采用油乳剂灭活疫苗预防本病。其疫苗的效力检验要求用本抗原进行,因此对本抗原的稳定性、保存温度及时间有较高的要求。目前制备工艺未冻干的抗原在2~8℃和-15℃以下保存均在1~6个月内HA效价下降,尽管未冻干的抗原加入甘油作为保护剂,但在2~8℃保存6个月后,HA效价也下降明显,并影响正常使用。

本研究对现有的鸡减蛋综合征血凝抑制抗原制备工艺进行优化,可以看出冻干的抗原比未冻干的抗原保存时间长,HA效价可长期保持较高的水平。尽管未冻干的抗原加入甘油作为保护剂,但在2~8℃保存6个月后,HA效价下降明显,并影响

正常使用。灭活的抗原冻保存会后使HA效价显著下降,建议灭活抗原要在2~8℃保存。冻干后的抗原在2~8℃和-15℃以下保存HA效价没有明显差异,从运输、节电等方面考虑,冻干后的灭活抗原在2~8℃保存,这不仅可以减少经济损失,而且还有助于更好的控制禽腺病毒疫情的暴发。

参考文献:

[1] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 第9版. 北京:农业大学出版社, 1991.

[2] Su J, Li S, Hu X, *et al.* Duck egg – drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu – related flavivirus[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18106.

[3] Cao Z, Zhang C, Liu Y, *et al.* Tembusu virus in ducks, China [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1873 – 1875.

[4] 文艳玲. 禽腺病毒 hexon 基因克隆表达及间接 ELISA 和荧光 PCR 检测方法的建立[D]. 广西大学, 2008.

[5] 林洪强, 孙刚, 潘兴广, 等. 间接法 Dot – ELISA 检测鸡减蛋综合征抗体的建立及应用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1997, 10: 3 – 5.

[6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2010年版三部.

[7] 郭慧琳, 贺奋义, 陈伯祥. 鸡减蛋综合症病毒在鸭胚尿囊液中增殖动态试验研究[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2010, 2: 76 – 77.

[8] 张家好, 马伏泉. 鸡减蛋综合症病毒在鸭胚中增殖规律的研究[J]. 安徽农业科学, 2001, 01:114.

[9] Liu P, Lu H, Li S, *et al.* Duck egg drop syndrome virus: an emerging Tembusu – related flavivirus in China[J]. Sci China Life Sci, 2013, 56(8): 701 – 710.

[10] Chen S, Wang S, Li Z, *et al.* Isolation and characterization of a Chinese strain of Tembusu virus from Hy – Line Brown layers with acute egg – drop syndrome in Fujian, China [J]. Arch Virol, 2014, 159(5): 1099 – 1107.

(编辑:李文平)