



EGGS
PROGRAM

总第18期/2014年12月

如何克服母源抗体消失与自身抗体产生之间存在的免疫空档期

Roni Yosipovich¹, Elina Aizenshteina¹, Roy Shadmona, Simcha Krispela, Efrat Shustera, Jacob Pitcovskia^{b,}*

摘要 在雏鸡出生后的 10 到 14 天里，母源抗体可对其产生保护。随后，肉鸡的保护力主要来源于主动免疫接种。然而，在日龄较小时，高水平的母源抗体会对疫苗接种诱导的有效免疫应答产生干扰。其结果是，在保护性母体抗体逐渐降低和主动免疫接种诱导的自身抗体上升之间，存在一个免疫空档期。本研究的主要目的是，对一种包含被动和主动免疫接种的免疫方案进行研究，以克服该免疫空档期，并在肉鸡的生长期能够持续性的抵抗感染性病毒疾病。新城疫病毒（NDV）是世界范围内家禽中最普遍的传染病之一，本研究中将其作为模式病毒进行研究。对 1 日龄雏鸡皮下注射 18 个血凝抑制（HI）单位的抗 NDV 免疫球蛋白 Y，最晚在 17 日龄便可检测到高于 4 log₂ 的保护性抗体滴度。在 1 日龄进行被动免疫，随后在 10 日龄接种减毒活疫苗，该组合可以在整个生长期诱导高水平的保护滴度，并一直持续到 41 日龄。此外，与仅免疫活病毒疫苗的鸡群相比，联合免疫两种疫苗的鸡群的 HI 抗体滴度更均匀。因此，通过联合进行被动免疫和主动免疫的免疫方案，可以在肉鸡的整个生长期提供对 NDV 的充分的免疫保护。

1. 简介

传染性疾病是困扰家禽养殖业的一大难题。对于病毒性疾病来说，主要是通过免疫接种来预防。在雏鸡出生后的最初几天内，母源抗体为其提供保护。然而，鸡群母源抗体的半衰期相对较短。对于一些主要的传染性病毒来说，母源抗体只能在雏鸡出生后的 10-14 天提供充分保护，随后这些保护性抗体显著减少，鸡群开始易感。通过主动免疫可以实现对肉鸡的持续保护。然而，高水平的母源抗体会干扰 1 日龄疫苗的免疫效果。在无茵猪中已发现，母源抗体会干扰有效免疫应答的产生，包括抑制 B 和 T 辅助细胞以及抗原加工，并且激活抑制性 T 细胞。在保护性母源抗体逐渐减少，自身保护性抗体尚未建立之前的这段时期是鸡群对病毒最易感的时期。其中一种解决方案是接种毒力较强的病毒活疫苗，即使存在母源抗体也可以诱导免疫应答。然而，这种疫苗对于接种疫苗的鸡只会产生负面影响，如，接种传染性法氏囊病强毒这类免疫抑制病毒会损害免疫系统，或者接种新城疫病毒强毒（NDV）会造成鸡的体重减轻。



EGGS PROGRAM

新城疫是家禽最普遍的传染病之一。它在全球范围内流行，并可能给家禽养殖者带来巨大的经济损失。本病由新城疫病毒引起，可感染超过 240 余种鸟类，主要通过感染鸡只和健康鸡只之间的直接接触传播。NDV 属于副粘病毒科，是一种有囊膜不分节段的负链 RNA 病毒。所有 NDV 被认为属于同一种血清型，进而可分为两类。不同国家的 NDV 疫苗接种方案各不相同，有的国家不进行疫苗接种，而有的国家在鸡的生长期内免疫 3 到 4 次疫苗。进行 NDV 免疫接种的目的是刺激中和抗体的产生。根据血凝抑制（HI）试验和中和抗体滴度与保护力之间的相关性，HI 滴度 $\geq 4 \log_2$ 被认为具有保护性。

鸡胚和新生雏鸡通过从蛋黄转移到血清的母源免疫球蛋白 Y（IgY 抗体）获得被动免疫。抗原特异性 IgY 可以从特异性免疫某一抗原的母鸡所产的鸡蛋中大规模提取。因此，关于使用 IgY 进行被动免疫已被广泛研究，并已显示，其在预防或治疗感染性疾病方面存在效果，尤其是那些通过肠道感染的病原。

在过去的几十年中，由于大规模的遗传选择，肉鸡生长速率有所增加，其生长期已经降低到 35-40 天。疫苗接种的目的是持续保护此期间的鸡只。

本研究的主要目的是建立一个能够使较小日龄鸡群持续抵抗感染性病毒疾病的接种方案，从而克服母源抗体下降与主动免疫接种产生自身抗体之间存在的时间差。

2、材料与方法

2.1 田间鸡群新城疫抗体水平的测定

在同一商品鸡群中提取 50 只来亨产蛋鸡血清（Yavne 孵化场 Kvuzat Yavne，以色列），50 枚蛋内的卵黄免疫球蛋白（IgY 抗体），以及 50 只雏鸡（1 日龄）的血清，根据 OIE（世界动物卫生组织）陆生动物疫病诊断手册 2012 版，通过 HI 试验分别测定其抗 NDV 抗体水平。简言之，将血清或卵黄 IgY 进行 2 倍梯度稀释，使用 4 血凝单位（HAU）灭活新城疫商品疫苗在室温下孵育 30 分钟。在每次实验当天制备 4 单位病毒。加入鸡红细胞（使用 PBS 稀释至 1%）孵育 30 分钟后进行 HI 测定。以完全抑制 4HAU 抗原的血清最高稀释倍数的 \log_2 作为 HI 滴度。每个实验中都包含了阴性和阳性对照。

2.2 抗体的生产和纯化

为了获得包含滴度高而持久的抗 NDV 抗体的卵黄，疫苗接种程序如下：本实验中所用的 5 月龄来亨蛋鸡，在实验之前，就根据以色列农业卫生部的推荐免疫程序，从 1 日龄到 3 月龄进行了免疫接种，另外在本实验中还对这些鸡只进行了加强免疫，每隔 3 周进行 1 次灭活 NDV 加强免疫，共 3 次，随后在两个月后进行第 4 次免疫。每次免疫后 2 周收集鸡蛋。分别在第



EGGS PROGRAM

3 次和第 4 次免疫后 2 周，以及第 4 次免疫后 4 个月采集血液样本。所有实验采集的全部血清和鸡蛋提取的卵黄抗体在-20℃条件下保存，直到进行检测。

提取 IgY 前将鸡蛋在 4℃放置 10 天以上。简言之，将双蒸水（DDW）加入到蛋黄中（9: 1），将混合溶液在室温下孵育 30 分钟（RT）。用 10%乙酸将 pH 调节至 5.2，并将该溶液在室温孵育 2.5 小时。然后将溶液通过 Whatman 滤纸过滤，直到液体变得透明。缓慢加入硫酸铵（40%，Sigma 公司，比利时），随后 4℃轻微混合 3 小时。然后将溶液 15500g 离心 20 分钟，收集沉淀，称重并使用 40 %的硫酸铵重悬（1:1w/v）。每次实验之前将溶液 15500g 离心 20 分钟。使用 DDW 将沉淀重悬，并使用 3.5 kD 试剂盒（Thermo, USA）在 PBS 中透析过夜。通过 HI 试验来测定特异性抗体的滴度。

2.3 IgY 使用途径的确定

本研究中的所有实验肉鸡均来自商品种鸡，携带高水平的 NDV 抗体。在实验过程中，将肉鸡饲养于独立的房间中，自由采食和饮水。

1 日龄肉鸡通过点眼（ED）、肌注（IM）或皮下（SC）途径分别给予 18 个 HI 单位的抗新城疫 IgY。每组 15 只鸡。接种后 27 天每隔 4-6 天采集一次血液。通过 HI 试验检测是否存在特异性抗 NDV 抗体。

2.4 肉鸡免疫

2.4.1 肉鸡被动免疫

肉鸡在 1 日龄或 10 日龄皮下注射 200ul 包含 15 或 18 HI 单位的抗新城疫 IgY 的 PBS。每组 10 只鸡。被动免疫后 1 周采集血液，其后每 4 天采集一次。

2.4.2 被动免疫与灭活 NDV 疫苗联合免疫

肉鸡在 1 日龄或 10 日龄皮下注射 200ul 包含 18 HI 单位的抗新城疫 IgY 的 PBS，并在 10 日龄根据制造商的说明，肌注接种灭活 NDV 疫苗。每组 10 只鸡。免疫后 1 周采集血液，其后每 4 天采集一次。

2.4.3 被动免疫与 NDV 活疫苗联合免疫

肉鸡在 1 日龄皮下注射 200ul 包含 18 HI 单位的抗新城疫 IgY 的 PBS，并在 1 日龄或 10 日龄，根据制造商的说明，点眼接种 NDV 活疫苗。每组 15 只鸡。每周采血 1 次。

2.4.4 动物伦理要求

所有的动物研究均被以色列动物管理和使用委员会批准。



EGGS PROGRAM

所有结果采用单因素方差分析(ANOVA)和 q 检验(newman-Keuls)进行分析。用 Graphpad Prism 5 Windows 版统计软件进行分析。

3.1 田间鸡群新城疫抗体水平的测定

在不同阶段,通过 HI 试验测定 50 只代表鸡只的特异性 NDV 抗体从产蛋鸡向卵黄再向孵出的肉雏鸡转移的比率。50 只蛋鸡中有 48 只的 HI 效价在 8-10 之间(平均滴度为 9)。卵黄中的 HI 滴度均在 6-12(平均滴度为 8.5),1 日龄雏鸡的血清 HI 滴度在 5 到 10 之间(平均滴度为 7.5)。蛋鸡血清和其所产鸡蛋中的特异性抗体水平类似,但与雏鸡的血清水平差异显著($P < 0.0001$)。在卵黄和雏鸡血清中的 HI 效价均匀度要低于其母源产蛋鸡群的 HI 效价均匀度(标准差分别为 1.1, 1.0 和 0.85)(图 1)。

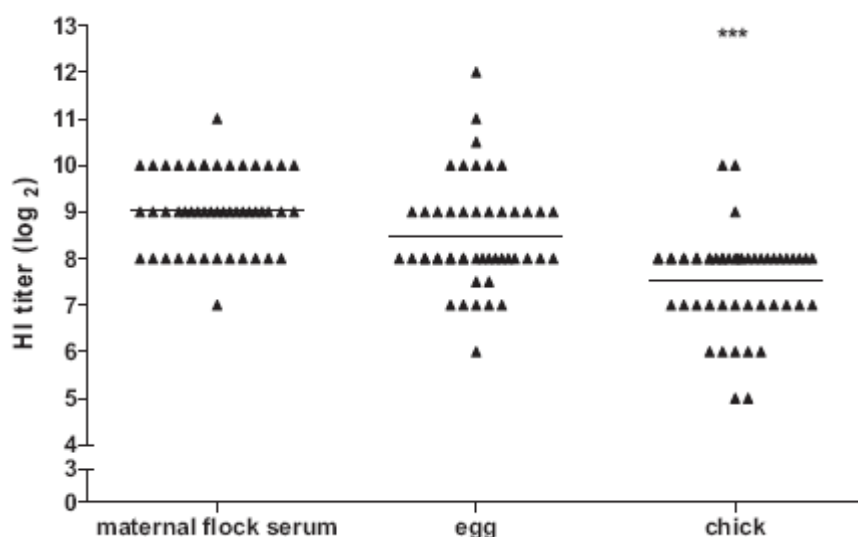


图 1. 某蛋鸡群、其卵黄及其后代 1 日龄雏鸡的新城疫 HI 抗体滴度 (log2)。个体的滴度以三角形表示。每一组中的线代表平均水平。母源鸡群 & 卵黄抗体 HI 滴度与 1 日龄雏鸡血清 HI 滴度比较, 差异显著, *** $P < 0.0001$ 。



EGGS PROGRAM

3.2 蛋鸡接种后的抗体产生情况

为制备从卵黄中提取的用于被动免疫试验的 IgY，对发育成熟的产蛋鸡进行了四次灭活 NDV 疫苗免疫。从第 2 次接种后两周开始，一直到第 4 次接种后两个月，卵黄中的抗 NDV IgY 的 HI 滴度为 12。卵黄中特异性抗体的效价与母鸡的血清抗体水平类似。

3.3 被动免疫最佳途径的确定

为了确定 1 日龄肉鸡最佳被动免疫途径，将 18 个 HI 单位的抗 NDV 纯化免疫球蛋白通过点眼、肌注或皮下途径进行接种。免疫后的 27 天内，每隔 4-6 天采集血液样本。通过 HI 试验测定肉鸡血清中的特异性抗 NDV 抗体滴度（图 2）。

1 日龄肉鸡皮下途径进行被动免疫后，可以在长达 13-17 天内诱导至少为 4（该抗体水平被认为可以起到保护作用）的 HI 抗体滴度，而且相对比较均匀，其特征是每只鸡的 HI 效价分布相对集中，离散度较小。在接种后 27 天，与未接种组和肌注接种组相比（两组的 HI 抗体滴度仅在 8-13 日龄 ≥ 4 ），皮下注射组的 NDV 抗体水平显著较高（ $P < 0.01$ ），且离散度较小（图 2）。点眼接种的结果类似于未接种组（数据未显示）。因此，我们将皮下注射确定为最佳的被动免疫接种途径，并在随后的实验中使用。

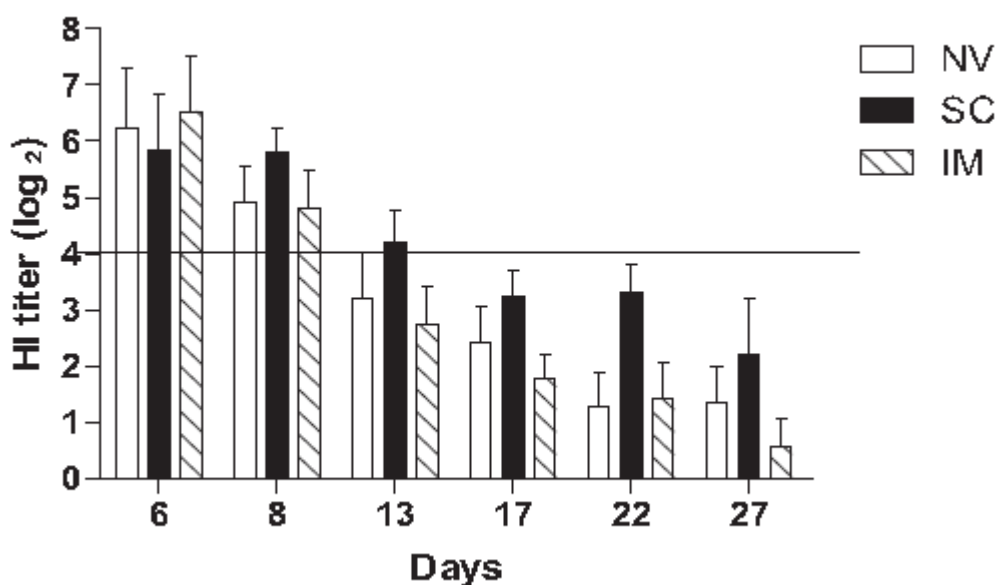


图 2. 1 日龄肉鸡皮下(SC) 或肌注(IM) 途径进行被动免疫后血清内的 NDV 病毒 HI 中和抗体滴度随时间产生的变化。NV-未免疫肉鸡。



EGGS
PROGRAM

3.4 为肉鸡提供抵抗 NDV 的长期保护，被动免疫所需抗体剂量的测定

肉鸡在 1 日龄或 10 日龄皮下注射 15 或 18 HI 单位的抗新城疫抗体。通过 HI 试验测定被动免疫后血清 NDV 抗体提供的保护水平，结果总结在表 1 中。所有未免疫肉鸡在 15 日龄时均易感。在 1 日龄时使用抗 NDV 抗体进行被动免疫可以延长肉鸡血清中保护性抗体存在的时间。每只鸡注射 15 个 HI 单位的抗体后，HI 效价 > 4 的时间为 8-15 日龄，而每只鸡注射 18 个 HI 单位的抗体可将这一期限延长至 15-19 天。在 10 日龄时每只鸡接种 18 HI 单位的抗体的保护期（HI 滴度 > 4 的持续时间可达 22-26 日龄）要比 1 日龄注射相同剂量的抗体保护期要长。相比于接种 15 个 HI 单位抗体的鸡只，接种 18 个 HI 单位抗体的鸡只的 HI 抗体滴度大于 4 的时期要相对更长，并在所有随后的实验中被使用。

3.5 被动免疫和主动免疫联合免疫

3.5.1 被动免疫和灭活 NDV 疫苗联合免疫

我们对被动和主动免疫联用时的抗新城疫病毒抗体水平随时间变化的效果进行了检测。肉鸡在 1 日龄或 10 日龄皮下注射 18 HI 单位的抗新城疫 IgY，并在 10 日龄肌注接种灭活 NDV 疫苗。

在 1 日龄进行被动免疫后，HI 滴度在 17 天后降低到 4 以下。在被动免疫后第 10 天加强免疫灭活 NDV 疫苗并没有延长保护期。仅在 10 日龄免疫灭活病毒疫苗的鸡只的 HI 滴度在整个实验期间均小于 4，与没有接种疫苗的阴性对照鸡只情况类似（图 3A）。未接种疫苗的鸡只的 HI 效价代表了所有实验中的雏鸡的母源抗体水平。

在 10 日龄进行被动免疫可以诱导高滴度的 HI (> 4)，并可持续至 22 日龄。与仅进行被动免疫相比，在 10 日龄进行联合疫苗免疫的鸡只的 HI 效价 > 4 的时间并没有延长（图 3B）。尽管在 10 日龄单独进行被动免疫或与灭活疫苗联合接种可以诱导具有保护性的抗体滴度 (> 4)，并可持续至 22 日龄，但并没有获得预期的保护。被动免疫与主动免疫（灭活 NDV 疫苗）联合免疫并没有延长高水平 NDV 中和抗体的持续时间。

3.5.2 被动免疫和 NDV 活疫苗联合免疫

为了检测被动免疫和 NDV 活疫苗联合免疫的效果，肉鸡在 1 日龄皮下注射 18 HI 单位的抗新城疫 IgY，并在 1 日龄或 10 日龄点眼接种 NDV 活疫苗。我们在这两个独立的实验组中观察到了类似的结果。



EGGS PROGRAM

表 1 肉鸡血清中 NDV HI log2 抗体滴度（平均值±不同时间段各组 SD 值）。

日龄（天）	1 日龄/15 HI ^a	1 日龄/18 HI ^b	10 日龄/18 HI ^c	NV ^d
8	4.8 (±0.6)	6.7 (±0.5)	NT	NT
15	2.5 (±0.8)	4.4 (±0.5) ***	5.4 (±0.5) ***	1.8 (±0.9)
19	1.9 (±0.7)	3.4 (±0.5) ***	4.8 (±0.4) **	1.7 (±0.7)
22	1.7 (±0.7)	3.5 (±0.5) **	4.2 (±0.6) **	2 (±0.8)
26	1.2 (±0.4)	2.9 (±0.3) ***	2.5 (±0.8) ***	< 1
31	< 1	< 1	2.2 (±0.6) ***	< 1
33	< 1	1 (±0.5)	1.7 (±0.5) ***	< 1
39	< 1	1 (±0)	1.7 (±0.5)	1.1 (±0.4)

a 1 日龄/15 HI - 1 日龄肉鸡免疫15个HI单位的抗NDV IgY抗体

b 1 日龄/18 HI - 1 日龄肉鸡免疫18个HI单位的抗NDV IgY抗体.

c 10 日龄/18 HI - 10 日龄肉鸡免疫18个HI单位的抗NDV IgY抗体.

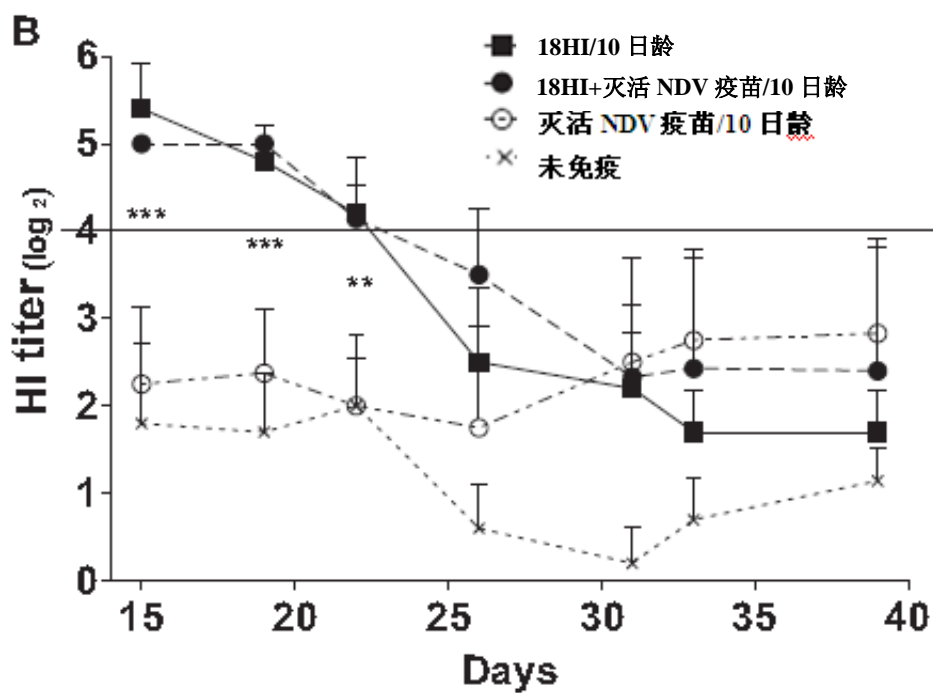
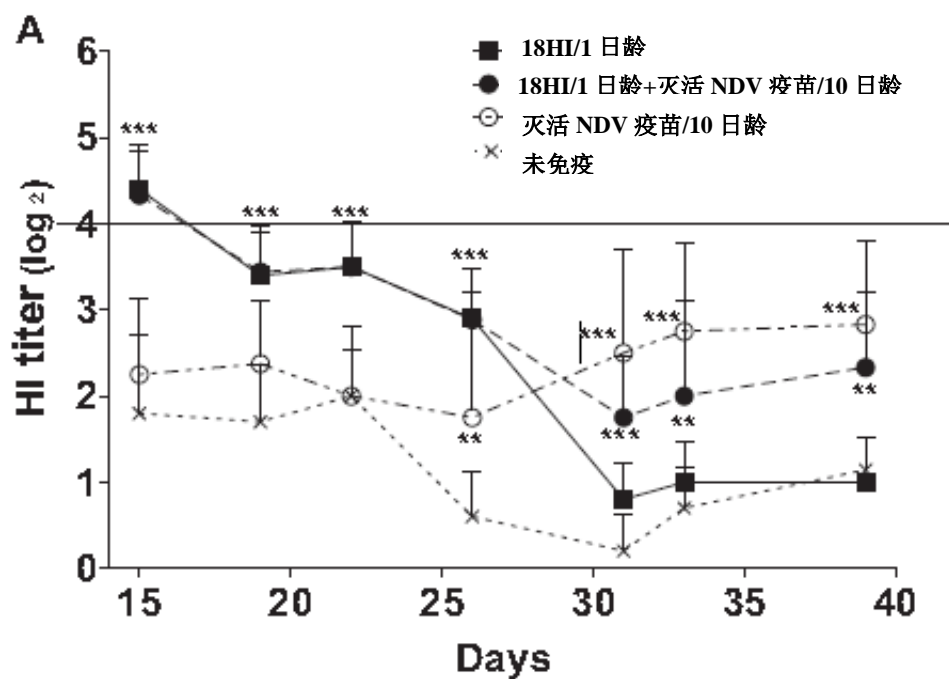
d NV-未免疫肉鸡

所有免疫均以皮下接种途径接种。NT-未检测

***免疫组与未免疫组之间的 HI 滴度存在显著性差异，P<0.0001。



EGGS PROGRAM

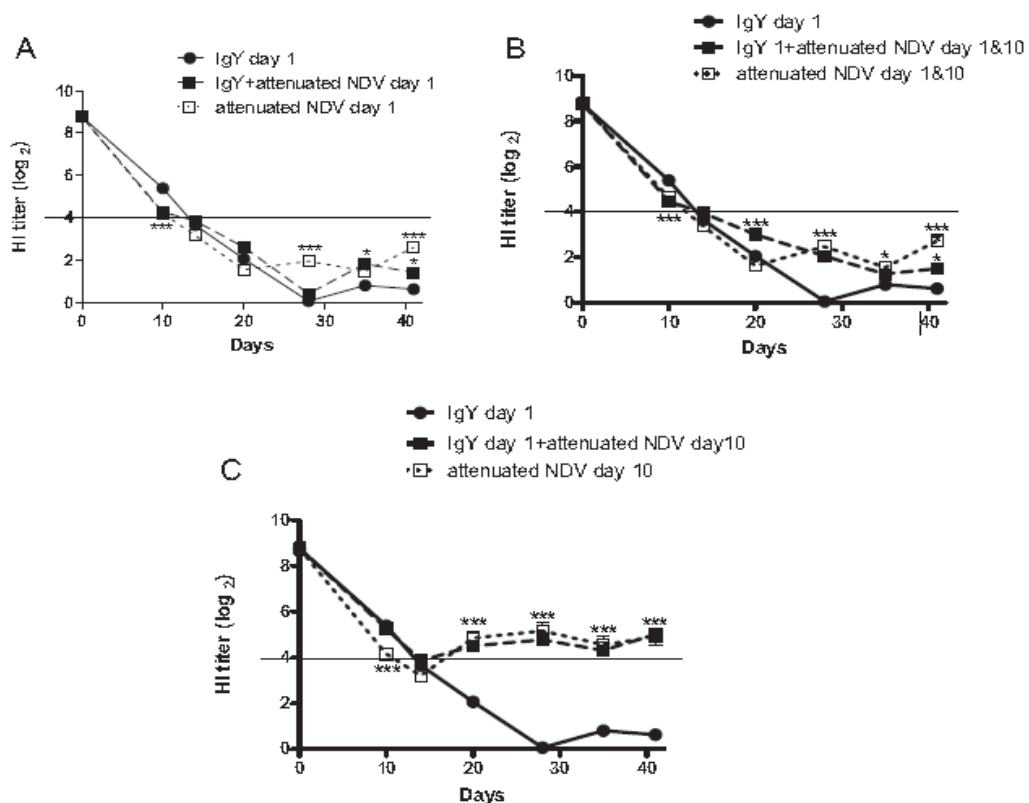




EGGS PROGRAM

图3 新城疫 IgY 抗体与灭活 NDV 疫苗联合免疫后的 NDV HI 抗体滴度 (log₂)。(A) 1 日龄肉鸡皮下接种 18 HI 单位的抗 NDV IgY 抗体, 和/或 10 日龄肌注射接种灭活 NDV 疫苗后的 NDV 血清中和抗体 HI log₂ 滴度。NV-未免疫肉鸡。(B) 肉鸡在 10 日龄皮下接种 18 HI 单位的抗 NDV IgY 抗体, 和/或 10 日龄肌注射接种灭活 NDV 疫苗后的 NDV 血清中和抗体 HI log₂ 滴度。NV-未免疫肉鸡, **, ***代表处理组与 NV 组之间存在显著差异, P 值分别为 P < 0.001 和 0.0001。

在 1 日龄联合进行被动免疫接种和 NDV 活疫苗接种时, HI 滴度在整个期间都很低 (从第 12 天开始 <4), 与在 1 日龄单独进行被动免疫或活疫苗免疫接种的结果类似 (图 4A)。与 1 日龄单独进行被动免疫相比, 在 1 日龄和 10 日龄联合免疫 NDV 活疫苗接种并没有使 HI 滴度有所增加, 两组的 HI 滴度在 12 日龄以后均 <4 (图 4B)。在 1 日龄进行被动免疫, 并在 10 日龄联合免疫 NDV 活疫苗时, HI 效价在整个试验期间均大于 4, 而且在 12 日龄至 20 日龄之间有所增长 (图 4C)。与单独进行被动免疫相比, 这种组合不仅诱导了更高的 HI 效价水平, 而且与 10 日龄单独免疫 NDV 活疫苗组 (在 14 日龄以后, 组内的 HI 抗体差异为 6-7 个滴度) 相比, 抗体水平更均匀一致, 表现为离散度减小 (在整个实验期间, 组内的 HI 抗体差异 3-4 个滴度)。在 10 日龄和 14 日龄, 离散度的减少也是显著的 (分别为 P < 0.0001 和 0.01) (图 5)。





EGGS PROGRAM

图4 肉鸡血清中的抗新城疫病毒抗体的 HI log₂ 滴度。(A) 1 日龄肉鸡皮下接种 18 HI 单位的抗 NDV IgY 抗体, 和/或 1 日龄点眼接种 NDV 减毒活疫苗 (B) 1 日龄肉鸡皮下接种 18 HI 单位的抗 NDV IgY 抗体, 和/或 1 日龄及 10 日龄点眼接种 NDV 减毒活疫苗 (C) 1 日龄肉鸡皮下接种 18 HI 单位的抗 NDV IgY 抗体, 和/或 10 日龄点眼接种 NDV 减毒活疫苗。*, **, *** 表示各组与单独被动免疫组相比差异显著, 其 P 值分别为 P < 0.01, 0.001 和 0.0001。

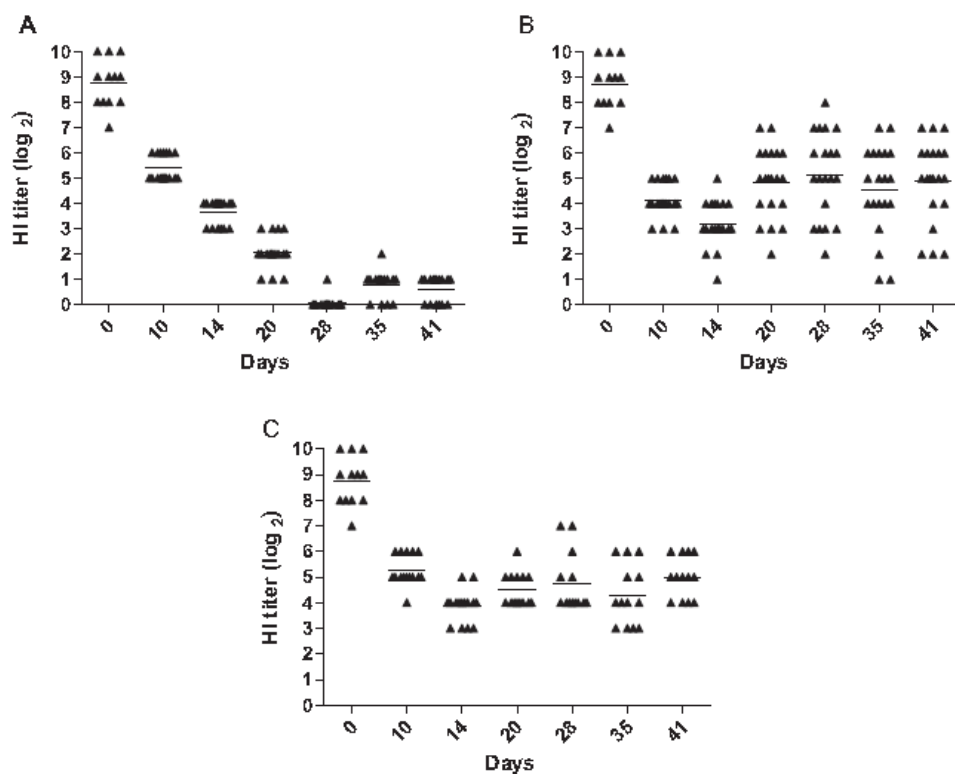


图5 肉鸡血清中抗新城疫病毒抗体 HI log₂ 滴度随着时间的推移的变化情况。(A) 肉鸡在 1 日龄皮下免疫 18 HI 单位的抗 NDV IgY (B) 肉鸡在 10 日龄点眼免疫 NDV 减毒活疫苗。(C) 肉鸡在 1 日龄皮下免疫 18 HI 单位的抗 NDV IgY, 并在 10 日龄点眼免疫 NDV 减毒活疫苗。单个鸡只的滴度以三角形表示。横线表示每一天的 HI 平均效价。



EGGS PROGRAM

4. 讨论

雏鸡主要是在早期比较易感，因为它们的免疫系统在 10-14 日龄才能发育完全。在此期间，对于刚刚孵出的雏鸡的保护主要来自母源抗体。为了使子代鸡群获得针对主要致病病毒（新城疫，流感，传染性法氏囊病病毒，禽传染性支气管炎病毒）的有效保护，父母代鸡群往往需要进行繁多的免疫接种，以诱导产生高水平的抗体，并通过鸡蛋转移至胚胎。然而，绝大多数情况下母源抗体在 10-14 日龄时会下降到保护水平以下（NDV 抗体效价的半衰期为 6.3 天）。父母代鸡群以及随后的子代鸡群的抗体水平可能是差异大的，其结果是，雏鸡的保护水平差异很大，有可能完全保护，也有可能保护效果很差。未受保护的鸡可能会被感染，并将病毒传播给其他鸡只，在某些疾病条件下可能会造成全群的扑杀，如 NDV 和流感。

为了在母源抗体下降到保护水平以下时能够持续保护雏鸡，在雏鸡日龄较小时要进行主动免疫。各个国家的疫苗接种计划各不相同，这取决于生物安全和地方疾病流行情况。蛋内接种或 1 日龄免疫后，在 10 日龄使用活疫苗进行加强免疫是某些病毒疫苗的常规免疫策略。然而，这样的疫苗接种方法只是部分有效，而且在许多情况下保护不足，原因如下：（i）母源抗体会干扰免疫应答的激活；（ii）出孵后的雏鸡免疫系统尚不完全成熟；（iii）接种存在部分毒力的活病毒会引起免疫抑制；（iv）免疫应答水平与基因存在密切关系，尤其是在日龄较小时。结果是，在 1 日龄进行免疫接种诱导的鸡群的保护性抗体水平高度可变（在本研究中的图 1，以及与 Leandro 的研究相一致）。此外，在母源抗体下降到保护水平以下，疫苗诱导的自身抗体出现之前的这段时期内，鸡群可能会感染传染性疾病。这一时期可以通过接种高滴度的相关致病病毒的被动免疫抗体来消除。肉鸡在 1 日龄时使用特异性抗体进行被动免疫具有以下优点：（i）可以产生直接保护，没有滞后期；（ii）在现有母源抗体基础上添加 IgY，有助于提高鸡群抗体水平的均匀性；（iii）它不需要使敏感的 1 日龄雏鸡接触活病毒；（iv）可通过高滴度的 IgY 抗体延长其保护期；（v）因为 IgY 是从超免母鸡中纯化得到的，它是抗病毒的高亲和性抗体；（vi）可以通过接种特定抗体的混合物来同时提供针对多种病原体的保护。

蛋黄 IgY 是一种来源方便的抗体。鸡舍价格低廉，鸡蛋的采集对鸡群没有伤害，IgY 的分离快速，简单。许多研究已经检测了使用卵黄抗体来控制动物疾病的方法。卵黄抗体的产量依赖于产蛋鸡的抗体滴度，其与鸡蛋中特异性 IgY 的浓度及提取效率密切相关。

刚孵化的雏鸡的 NDV 疫苗接种计划主要依赖于母源抗体和主动免疫接种。母源抗体和疫苗接种后的自身抗体存在重叠对于实现持续的保护至关重要。问题在于，母源抗体消退和疫苗接种后自身抗体的上升之间存在免疫空窗期。在此期间，鸡群对于病原体高度敏感，并可威胁雏鸡和整个鸡群的安全。本研究的目的是建立一个预防接种方法，通过将被动和主动免疫接种相结合，可以在整个生长期（最长 40 天）保护鸡群中的所有肉鸡。



EGGS PROGRAM

被动免疫所用抗体是从超免蛋鸡所产蛋中有效提取出来的。本研究中使用 HI 滴度作为 NDV 中和抗体与保护水平之间的相关指数。我们并没有使用强毒 NDV 进行攻毒实验，来验证 HI 抗体滴度在 4 以上的保护水平。然而，文献中已经报道了 HI 效价与攻毒实验的保护水平之间存在直接联系。在本研究中，根据 OIE 的建议，我们将 HI 抗体滴度 ≥ 4 认为是可以提供针对 NDV 毒株的保护，尽管最近的一些研究已经显示，HI 滴度 ≥ 3 就可以产生保护。

我们对进行被动免疫的最佳接种途径和 IgY 的量进行了测定。皮下注射可以产生最高和最均一的 HI 滴度（图 2），因此在所有随后的实验中使用。1 日龄免疫 18 个 HI 的 IgY 的保护期比免疫 15 个 HI 的 IgY 的保护期要长（表 1）。用 18 个 HI 单位的抗 NDV IgY 进行被动免疫可以将保护期延长到至少 17 日龄。尽管这一延长仍然不能在整个生长期内提供保护，但可以避免母源抗体在 8-10 日龄时下降到保护水平以下。这样我们就将主动免疫日龄延长到免疫系统发育成熟的日龄，并且可以在被动免疫的 IgY 仍然提供保护的情况下产生自身免疫应答。

为了获得整个生长期的保护，我们对被动免疫和灭活疫苗或减毒活病毒的联合免疫效果进行了检测。单独或联合使用 NDV 灭活疫苗进行免疫，与单独通过被动免疫诱导的保护时间相比并没有延长（图 3）。在 1 日龄进行被动免疫，联合进行一次（1 日龄）或两次（10 日龄）活疫苗免疫，并不能提供保护，这可能是由于雏鸡中的母源抗体处在较高水平，这可能会干扰活疫苗的复制，减少免疫力的产生（分别为图 4A 和 B）。然而，在 1 日龄进行被动免疫，并在 10 日龄联合进行一次活疫苗免疫，在整个生长期内诱导的 HI 滴度均 > 4 ，最高可延长至 41 天（图 4C），离散度也有所减少（图 5）。只有该种免疫组合实现了疫苗滴度的均一性，这意味着所有的雏鸡均可以在整个期间获得保护，包括母源抗体消退和疫苗接种后自身抗体的上升之间的免疫敏感期。在此期间，联合免疫产生的保护性抗体水平显著高于使用活疫苗单独免疫的抗体水平（图 5B 和 C）。

本研究中实验是在靶动物-肉鸡中进行的，可以使结论更加切合实际。通过将被动免疫和减毒活疫苗主动免疫相结合的免疫方案，可以在整个生长期内（约 41 日龄）提供针对 NDV 的充分保护。在本实验中建立的针对 NDV 的免疫方法，可能也适用于其它禽类病毒病原体，如传染性法氏囊病病毒和呼肠孤病毒。