

传染性法氏囊病免疫保护试验中3种评定指标的比较

程太平¹, 蒋桃珍², 胡建兵³, 荣俊⁴ (1. 长江大学 动物科学学院, 湖北 荆州 434025; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 3. 荆州市妇幼保健院, 湖北 荆州 434020; 4. 长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

摘要:100只SPF鸡均分为5组,A、B、C 3组免疫后攻毒,接种3批次自制的IBD基因工程重组亚单位油乳剂疫苗;D组不免疫不攻毒,E组不免疫而攻毒。免疫后第22天,感染IBDV强毒株BC-6/85。攻毒后第4天,将所有存活的鸡只以颈脱臼致死,收集法氏囊,以3种方法和指标(法氏囊眼观病变;法氏囊显微病变;法氏囊中IBDV抗原检测)进行分析,以评定免疫保护率。结果显示,以这3种方法和指标评定,A组免疫保护率为90%,B、C组免疫保护率均为95%;试验鸡A3、A14、B7、C16、E1~E20,法氏囊眼观病变明显,法氏囊显微病理损伤评分为3~5分,琼脂免疫扩散试验检测法氏囊中IBDV抗原均为阳性;其他试验鸡,法氏囊眼观无明显异常,法氏囊显微病理损伤评分在3分以下,琼脂免疫扩散试验检测法氏囊中IBDV抗原均为阴性。结果表明,这3种方法和指标在IBD疫苗免疫保护试验评定中具有很好的 consistency。

关键词:传染性法氏囊病;免疫效力;病理组织学损伤;琼脂免疫扩散试验

中图分类号:S855;S858.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-4545(2007)03-0307-04

Comparison of three judging indices in immune protective test for infectious bursal disease

CHENG Tai-ping¹, JIANG Tao-zhen², HU Jian-bing³, RONG Jun⁴ (1. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 3. Jingzhou Hospital of Mother and Child Health Care, Jingzhou, Hubei 434020, China; 4. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract:One hundred SPF chickens were divided equally into 5 groups. The chickens of 3 groups (A, B, C) were infected after being immunized with infectious bursal disease (IBD) recombinant subunit double emulsion vaccine. The group D were not vaccinated and infected. The group E were neither vaccinated nor infected. The chickens were infected with IBDV virulent strain BC-6/85 at 22 days after vaccination, and at 4 days post infection, the surviving chickens were killed by cervical dislocation. Their bursal were collected and examined, and immune protection rate were evaluated with the three judging indices (the macro pathological changes; micropathological changes; IBDV antigen at bursal). The results showed that the immune protection rate is 90% in group A and 95% in group B and C. IBDV antigen is positive in all their bursal by the agar gel immunodiffusion test (AGID).

Key words: IBD; immune effect; micropathological damage; AGID

传染性法氏囊病(infectious bursal disease, IBD)是强毒力IBDV引起的一类免疫抑制性传染病,主要侵害幼龄鸡。为防制IBD,已经开发出了多种弱毒疫苗、中等毒力疫苗及灭活疫苗,还在研制和开发活病毒载体疫苗^[1-3]、DNA疫苗^[4]及基因工程亚单位疫苗^[5]。在各种疫苗研制过程中,要确定某种疫苗的免疫效力高低,必须进行免疫攻毒试验。免疫攻毒试验是选用SPF鸡,以某一种疫苗进行免疫,间隔一段时间,以IBDV标准强毒株感染试验鸡。判

定试验鸡受到免疫保护的方法和指标有:(1)依据法氏囊的眼观病理变化,出现明显的肿大、变黄、胶冻样渗出物等眼观病理变化的,为未受到免疫保护;无明显眼观病理变化的,为受到免疫保护;(2)Shaw等^[6]制定的法氏囊显微病理损伤程度评定系统。上述2种判定方法和指标对IBD疫苗的免疫保护试验的分析具有很好的客观性和实用性。我们在做IBD基因工程重组亚单位油乳剂疫苗的免疫保护试验时,采用了这2种判定方法和指标,同时还采用了另外一种判定方法和指标,即以琼脂免疫扩散试验(AGID)检测鸡法氏囊中的IBDV抗原,将这3种判定方法和指标结合起来对IBD疫苗的免疫保护试

收稿日期:2005-09-08

基金项目:湖北省科技厅重点科技发展项目(992P0706)

作者简介:程太平(1962-),男,副教授,学士。

验进行综合分析。本试验旨在比较这3种判定方法和指标对IBD疫苗的免疫保护试验评价的差异性。

1 材料与方 法

1.1 疫苗和IBDV强毒株 IBD基因工程重组亚单位油乳剂疫苗实验室试制品,由我们课题组研制。IBDV强毒株BC-6/85,购自中国兽医药品监察所。

1.2 试验动物及处理 100只SPF鸡,白来航品种,购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。分为A、B、C、D、E5个组,每组20只。A、B、C3组为免疫攻毒组,在21日龄时,分别接种批号为040410、040420、040521的试验疫苗,肌肉注射0.25 mL/只;D组,不免疫不攻毒;E组,不免疫攻毒。同样条件下分隔饲养。免疫后第22天,将A、B、C、E组的鸡移至强毒舍,以灭菌PBS稀释IBDV强毒株BC-6/85至10 mL,每只鸡经点眼接种0.1 mL毒液,接种量为100个法氏囊感染剂量(bursal infective dose, BID)。攻毒后,每天观察鸡的临床表现和死亡情况。攻毒后第4天,将所有存活的鸡致死,进行剖检,观察并记录法氏囊眼观病变。将每只鸡的法氏囊组织剪成2部分,1份放入盛有组织保存液的小玻璃瓶中,供做组织切片,另1份放入空的小玻璃瓶中, -20℃保存,供作AGID。

1.3 以法氏囊眼观病变评定免疫保护的标准 攻毒后第4天,剖检所有试验鸡,以肉眼仔细观察法氏囊。法氏囊明显肿大、变黄、外表有胶冻样渗出物或有出血,则判定为未受到免疫保护,鸡受到感染;法氏囊不肿大、色泽正常或淡黄、外表无胶冻样渗出物或出血,则判定为受到免疫保护,或鸡没受到感染。

1.4 法氏囊病理切片制作及法氏囊显微病理损伤的评分标准 按文献[7]制作石蜡切片,采用苏木素-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察每只试验鸡的法氏囊显微病理损伤情况,按表1进行评分。法氏

囊显微病理损伤程度评分依据来自文献[6],分为6级,由轻至重分别记为0、1、2、3、4、5分。得3分以下的鸡记为受到免疫保护,得3分的鸡记为未受免疫保护。

1.5 法氏囊中IBDV抗原的检测 AGID诊断抗原和阳性血清,购自中国兽医药品监察所。

将每只鸡的法氏囊组织进行研磨,加2倍灭菌PBS或生理盐水,注入离心管,冻融3次。6 000 r/min离心15 min,取上清液作AGID,按文献[8]进行,中心孔加阳性血清,周围6个孔中,1、4孔加诊断抗原,2、3、5、6孔加待测抗原。

判断标准为待测抗原孔和阳性血清之间形成的沉淀线与诊断抗原孔和阳性血清孔之间形成的沉淀线发生融合,判为阳性;其他情形均判为阴性。

表1 鸡感染IBDV强毒株后法氏囊显微病理损伤的评分标准

损伤记分	病理组织学特征
0	滤泡没有任何损伤,皮质和髓质间界限清晰
1	整个法氏囊结构正常,偶见滤泡的轻微坏死
2	<50% 滤泡有严重的淋巴细胞缺失
3	≥50% 滤泡有严重的淋巴细胞缺失
4	仅残留滤泡的轮廓,结缔组织增生,包囊形成
5	所有的滤泡结构消失,纤维组织形成

2 结 果

2.1 依据法氏囊眼观病变的评定标准对疫苗免疫效力的评定结果 见表2。

2.2 法氏囊显微病理损伤的评定结果及显微病理变化 见图1和表3。

2.3 法氏囊组织中IBDV抗原的检测结果 见表4。

表2 法氏囊眼观病变的评定结果

组别	临床表现	法氏囊眼观病变	免疫保护率/%
A	全组鸡只精神、食欲均正常,无异常反应	有2只鸡的法氏囊出现明显的肿大、变黄、胶冻样渗出物	90
B	全组鸡只精神、食欲均正常,无异常反应	有1只鸡的法氏囊出现明显的肿大、变黄、胶冻样渗出物	95
C	全组鸡只精神、食欲均正常,无异常反应	有1只鸡的法氏囊出现明显的肿大、变黄、胶冻样渗出物	95
D	全组鸡只精神、食欲均正常,无异常反应	本组鸡的法氏囊均正常,未见肿大、变黄、胶冻样渗出物	—
E	部分鸡只精神差、食欲减少,死亡1只	本组鸡的法氏囊均出现明显的肿大、变黄、胶冻样渗出物	0

表3 法氏囊显微病理损伤的评分结果和疫苗的免疫保护率

组别	法氏囊显微病理损伤各级						死亡	免疫保 护率/%
	得分的鸡累计数/只							
	0分	1分	2分	3分	4分	5分		
A	18	0	0	0	1	1	0	90
B	18	1	0	0	1	0	0	95
C	18	0	1	0	0	1	0	95
D	20	0	0	0	0	0	0	—
E	0	0	0	3	12	5	1	0

表4 法氏囊组织中IBDV抗原的琼脂免疫扩散试验的检测结果

组别	检测结果		免疫保护率/%
	阳性	阴性	
A	2	18	90
B	1	19	95
C	1	19	95
D	0	20	—
E	20	0	0

2.4 依据3种评定方法和指标对每只试验鸡进行评定所获全部结果的比较 见表5。

表5 3种评定指标评定每只试验鸡所得结果的比较

鸡只编号	I	II	III	鸡只编号	I	II	III
A3	Y	5	阳性	E11	Y	5	阳性
A14	Y	4	阳性	E13	Y	3	阳性
B7	Y	5	阳性	E17	Y	5	阳性
B15	Z	1	阴性	E18	Y	5	阳性
C4	Z	2	阴性	其他鸡只			
C16	Y	5	阳性	A组	Z	0	阴性
E1	Y	3	阳性	B组	Z	0	阴性
E4	Y	5	阳性	C组	Z	0	阴性
E6	Y	3	阳性	D组	Z	0	阴性
E9	Y	5	阳性	E组	Y	4	阳性

注：I表示法氏囊眼观病变；II表示法氏囊显微病理损伤评分；III表示法氏囊组织中IBDV抗原的检测；Y表示法氏囊肿大、色泽变黄、外表面有胶冻样炎性渗出物；Z表示法氏囊眼观变化正常

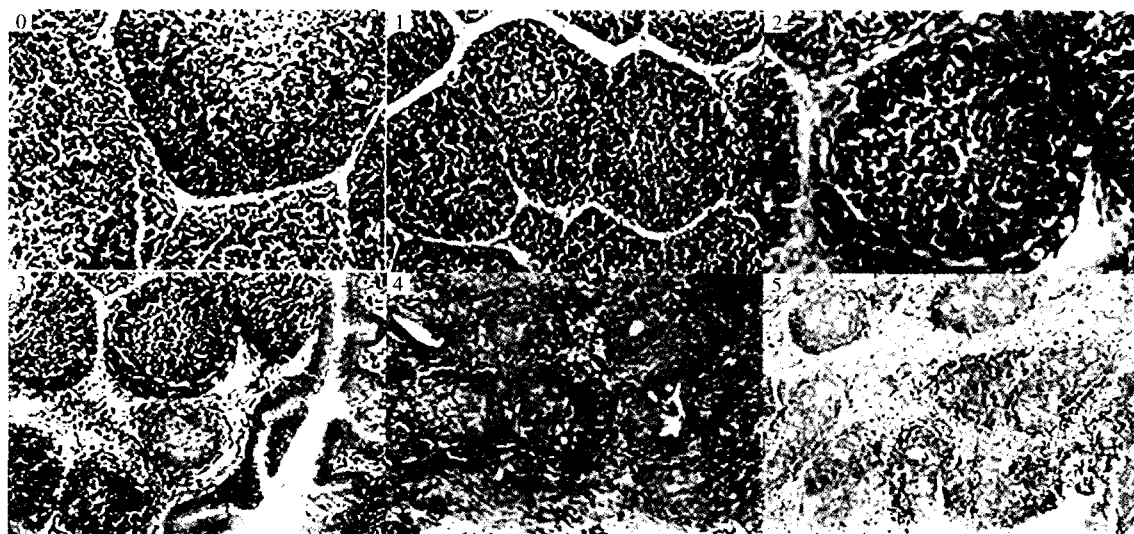


图1 法氏囊组织学变化(100×) 图中数字表示组织学损伤评分,0分(D组)、1分(B组)、2分(C组)、3分(E组)、4分(A组)、5分(E组)

3 讨论

在表2中,D组鸡只法氏囊均正常,未见到肿大、变黄、胶冻样渗出物;而E组,部分鸡只精神差、食欲减少,死亡1只,每只鸡的法氏囊都出现肿大、变黄、胶冻样渗出物。这一结果表明,对试验鸡的攻毒剂量适当,免疫保护试验可成立。因此,依据法氏囊眼观病变的评定标准,得到A、B、C3组的免疫保护率分别为90%、95%、95%,结果是真实的。从D组和E组的显微病理损伤的评分结果看,本次试验对鸡的攻毒剂量是适当的,免疫保护试验也可成立。

那么,由此得到的A、B、C3组的免疫保护率也是真实的。但从得分情况看,法氏囊的显微病理损伤程度是不同的。在表4中,D组阴性20只,E组阳性20只,表明本次试验对鸡的攻毒剂量是适当的,免疫保护试验也可成立。那么,由此得到的A、B、C3组的免疫保护率也是真实的。

试验鸡A3、A14、B7、C16、E1~E20法氏囊眼观病变明显肿大、变黄、外表有胶冻样渗出物,显微病理损伤评分为3~5分,以AGID检测法氏囊中IBDV抗原均为阳性;其他试验鸡,法氏囊无明显眼观异常病变,显微病理损伤评分均在3分以下,以

AGID 检测法氏囊中 IBDV 抗原均为阴性。结果表明,①这 3 种评定方法和指标在本次 IBD 疫苗的免疫保护试验评定上具有很好的一致性;②这 3 种评定方法和指标在本次 IBD 疫苗的免疫保护试验评定上同时应用,相互印证,都具有很高的真实性。

以这 3 种方法和指标来评定 IBD 疫苗免疫保护试验,至关重要是 IBDV 毒株毒力和攻毒剂量及试验鸡只。应选用 IBDV 强毒株,不可选用超强毒株,因为超强毒株的致病性和感染鸡出现的病变与强毒株的有显著差异。攻毒剂量不适宜,偏高或偏低,会导致试验结果失真及试验失败。在该试验中,我们选用 IBDV 强毒株 BC-6/85,使用由中国兽医药品监察所推荐的攻毒剂量(100 BID),而 Shaw 等^[6]在他们的试验中选用 IBDV 强毒株 F52/70,攻毒剂量为 $10^{1.1} \sim 10^{1.8} \text{EID}_{50}$ 。试验鸡只应当选择 SPF 鸡,非 SPF 鸡由于带有 IBD 母源抗体及其他不明的病原体或非病原体,这些因素会干扰疫苗在鸡体内的免疫应答反应,会导致空白对照组鸡只对 IBDV 强毒株敏感性的异常变化(增高或降低),最终导致试验结果失真及试验失败。

参考文献:

- [1] Bayliss C D, Peters R W, Cook J K, et al. A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus[J]. *Arch Virol*, 1991, 120: 193-205.
- [2] Dartail R, Bublot M, Laplace E, et al. Herpesvirus of turkey recombinant virus expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens [J]. *Virology*, 1995, 211: 481-490.
- [3] Tsukamoto K, Kojima C, Komori Y, et al. Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2 [J]. *Virology*, 1999, 257: 352-362.
- [4] Chang H C, Lin T L, Wu C C. DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens [J]. *Vaccine*, 2001, 20: 328-335.
- [5] Pitcovski J, Gutter B, Gallili G, et al. Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 4736-4743.
- [6] Shaw I, Davison T F. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype [J]. *Vaccine*, 2000, 18: 3230-3241.
- [7] 王伯, 李玉松, 黄高昇. 病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 61-134.
- [8] 白文彬, 于康震. 动物传染病诊断学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 237-242.
- [5] Hooper C C, Van Alstine W G, Stevenson G W, et al. Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1994, 6(1): 13-15.
- [6] Otake S, Dee S A, Rossow K D, et al. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen) [J]. *Can J Vet Res*, 2002, 66(3): 191-195.
- [7] Schurrer J A, Dee S A, Moon R D, et al. Spatial dispersal of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated flies after contact with experimentally infected pigs [J]. *Am J Vet Res*, 2004, 65(9): 1284-1292.
- [8] Otake S, Dee S A, Moon R D, et al. Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies [J]. *Vet Rec*, 2004, 154(3): 80-85.
- [9] Zimmerman J J, Yoon K J, Pirtle E C, et al. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 329-336.

(上接 306 页)