

种鸡接种网状内皮组织增生病毒弱毒疫苗的安全性和免疫效果观察

曲立新^{1,2}, 邱洪凯¹, 祝永华¹, 郭龙宗¹, 崔治中^{2*}, 孙淑红² (1. 山东益生畜禽疾病研究院, 山东烟台 265508; 2. 山东农业大学 动物科技学院, 山东泰安 271018)

摘要:在正常饲养条件下, 在肉种鸡鸡群中试用网状内皮增生病毒(reticuloendotheliosis virus, REV)的弱毒疫苗, 观察其对体重增长、产蛋生产性能、对其他疫苗应答有无影响。同时连续定期测定种鸡血清 REV 抗体, 并测试抗体阳性鸡的后代有无病毒垂直传播。结果表明, 该疫苗接种 18 周龄种鸡后, 对生长、产蛋率、受精率和孵化率等生产性能均无不良影响, 对正常疫苗免疫的抗体应答也无影响。经免疫接种 REV 弱毒疫苗的种鸡, 在开产后及产蛋高峰期, 均不表现病毒的垂直传播。免疫种鸡后, 其激发的抗体可持续 280 d 以上, 且雏鸡血清中母源抗体可持续至少 7 d。结果表明, 该 REV 弱毒在开产前种鸡应用时有很高的安全性, 并能为雏鸡提供足够的特异性母源抗体。

关键词:网状内皮增生病毒; 免疫; 安全性; 母源抗体

中图分类号: S852. 65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-4545(2007)04-0455-05

Observations of safety and antibody response in meat-type parent breeders inoculated with an attenuated reticuloendotheliosis virus

QU Li-xin^{1,2}, QIU Hong-kai¹, ZHU Yong-hua¹, GUO Long-zong¹, CUI Zhi-zhong^{2*}, SUN Shu-hong²

(1. Shandong Yisheng Livestock Health Institute, Yantai, Shandong 265508, China;

2. College of Animals Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: A group of meat-type parent breeders in a commercial farm was vaccinated with an attenuated reticuloendotheliosis virus (REV), and its influence on growth, egg production and immune reactions to other inactivated vaccines was studied. At the same time, antibody to REV in chicken sera at different intervals after vaccination was measured and vertical transmission of the virus was checked in chicks from vaccinated breeders. The results indicated that vaccination of 18-week-old parent breeders with the attenuated REV did not give any negative influence on growth rate, egg-productivity, egg fertility and hatchability. Antibody titers against Newcastle disease virus (NDV) and avian influenza virus (AIV) was also not affected after re-vaccination with inactivated vaccines to NDV, AIV-H5 or H9 in REV vaccinated birds as compared to the control. No vertical transmission of REV was detected in eggs or their chicks during the early period of laying or at the peak for egg production from REV-vaccinated breeders. REV-antibody in breeder sera could last at least for 280 days post vaccination. And the maternal antibody to REV provided by vaccination of breeders lasted at least for 7 days.

Key words: reticuloendotheliosis virus (REV); vaccination; safety; maternal antibody

* Corresponding author

网状内皮组织增生病毒(reticuloendotheliosis virus, REV)是以禽类为宿主的一类反转录病毒。临床上可引起急性网状细胞肿瘤、矮小综合征和淋巴组织与其他组织形成慢性肿瘤的一系列病理综合征。作为一种蛋传病毒, REV 在鸡群以亚临床感染为主, 并引起一定比例感染鸡的免疫抑

制^[1]。

目前, REV 在我国的一些地方呈流行增加的态势。何勇群等^[2]在北京地区的调查表明, 在呈现免疫抑制的鸡群, 有 48%(21%~71%)的血清样品对 REV 呈现抗体阳性反应。此外, 在不同临床表现的鸡群中, 分别分离到 REV, 并发现了 REV 和其他病毒的共感染, 如马立克病毒, J 亚群白血病病毒或传染性贫血病毒^[3-7]。在用斑点分子杂交作检测试验时, 国内 11 个省 42 个鸡群来源的 828 份病料中 REV 的检出率达到 57.25%^[8-9]。REV 既可通过种蛋垂直传播, 也能横向传播。此外, 还通过污染的弱

收稿日期: 2005-09-28

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(30030450)

作者简介: 曲立新(1969-), 男, 硕士。

* 通讯作者

毒疫苗而传播^[10-13]。

鉴于 REV 主要引起雏鸡早期感染并造成免疫抑制,而母源抗体可提供保护,人们试图开发 REV 疫苗免疫种鸡来提供相应的母源抗体,并切断 REV 垂直传播途径。本试验拟对在肉用型父母代种鸡群中接种并在细胞培养上连续传代致弱的 REV-C99 株病毒的安全性和免疫效果进行系统观察。

1 材料与方法

1.1 REV 弱毒疫苗 种毒为从鸭分离到的 SNV 株病毒,为经反向遗传操作技术完成的分子克隆化病毒^[14],代号为 REV-C99,已在鸡胚成纤维细胞上连续传代 30 代,用以进一步致弱。应用时病毒滴度 10^7 TCID₅₀/mL。

1.2 试验鸡群 随机挑选 18 周龄 AA 父母代种母鸡 600 只,做 REV 免疫用。选取其中的 60 只随机分成 3 组,分别编号标记,在注射前采血清并保存于 -20°C 。每组分别肌肉注射病毒培养原液、5 倍稀释液、25 倍稀释液各 0.3 mL。其余 420 只鸡逐只注射 5 倍稀释液 0.3 mL。

免疫接种 REV 活毒疫苗后 10、30、80、154、276 d 分别采血清并保存备检。在此同时,按通常生产规程观察记录各种生产性能。同一群的其余近 6 000 只作为对照鸡隔墙饲养在完全同等条件下,按同一生产规程观察记录各种生产性能。

注射 REV 活毒疫苗后 15 d, REV 免疫组和对照鸡群,按同一程序继续作其他疫苗的免疫。这包括肌肉注射新城疫-传染性支气管炎-法氏囊病-病毒性关节炎四联灭活疫苗(英特威产品),同时使用新城疫-支气管炎二联活苗(Clone30-Ma5,英特威产品)进行气雾免疫。注射 REV 活毒疫苗后 25 d,进行禽流感 H5-H9 二价灭活油苗(青岛易邦产品)的肌肉注射接种。禽流感油苗免疫后 15 d 采血清测定对 NDV、H5 和 H9 3 种病毒抗原的 HI 抗体效价。以后每隔 1 个月采血检测 1 次,共 3 次。

1.3 抗 REV 血清抗体的检测 REV 抗体间接 ELISA 诊断试剂盒为 IDEXX 公司产品。根据试剂盒内附的说明进行操作,在 620 nm 波长下读取光密度(D)值。阴性、阳性判断以及 ELISA 抗体效价计算均按照试剂盒所附说明书的方法进行。

1.4 鸡群生产性能的比较观察 按 AA 公司的标准生产程序分别对 2 群鸡定期观察和记录与生产性能相关指标。

1.5 接种 REV 致弱毒的种鸡在开产后对种蛋的

垂直感染状态的检测 从受试鸡群收集种蛋,在孵化至 9~11 日胚龄时,从每个发育鸡胚分别制备鸡胚成纤维细胞,并接种到 96 孔细胞培养板上。在 37.5°C 培养箱中连续培养 8 d,再用抗 REV 单克隆抗体 11B118(山东农业大学动物科技学院崔治中教授提供)进行间接荧光抗体反应试验^[15],检测鸡胚中有无 REV 感染,以此确定有无病毒的垂直传播。分别在开产时(24 周龄)、产蛋高峰期(33 周龄和 36 周龄)、高峰后期的 45 周龄采集种蛋,每次收集 36 枚孵化。

1.6 免疫鸡群所产雏鸡中母源抗体的检测

1.6.1 鸡胚卵黄囊中抗 REV 抗体的检测 经免疫的种鸡在 28 周龄时收集种蛋 8 枚,用生理盐水 2:1 稀释,制成蛋黄液 8 份,用 IDEXX 公司的 ELISA 抗体检测试剂盒检测卵黄液中的 REV 抗体。

1.6.2 雏鸡血清中 REV 抗体检测 经免疫的种鸡在 30 周龄采集种蛋并孵出雏鸡,3 日龄心脏采血制备雏鸡血清 17 份,用 IDEXX 公司的 ELISA 抗体检测试剂盒检测抗 REV 的母源抗体。并在 11、18 日龄时再次采血制备血清。

1.6.3 雏鸡血清中 REV 抗体持续时间的检测 经免疫的种鸡在 35 周龄采集种蛋并孵出雏鸡进行饲养,3、7、10、15、20 日龄分别心脏采血,制备血清。用 IDEXX 公司的 ELISA 抗体检测试剂盒检测抗 REV 的母源抗体持续时间。雏鸡在烟台实验室自行孵化。与 1.6.2 的血清同时检测。

2 结果

2.1 REV 弱毒疫苗免疫对种鸡生产性能的影响

2.1.1 对鸡生长发育的影响 疫苗注射组与对照组种鸡在 16~24 周龄期间的平均体质量曲线见图 1。从图 1 可以看出,注射 REV 疫苗后在 18 周龄,除注射应激引起 1 周内体质量增长稍慢之外,其体质量增长模式与对照鸡群无差异,完全达到了 AA 肉鸡生产手册中规定的限饲条件下父母代肉种鸡的标准。这表明,注射疫苗对肉种鸡生长无不良影响。

2.1.2 对产蛋性能的影响 在 18 周龄注射 REV 弱毒后,对产蛋期各种与种蛋相关的生产性能进行了比较,诸如种鸡产蛋率、孵化率、受精率等指标。由图 2 可见,接种 REV 弱毒对种鸡的产蛋性能完全没有任何不良影响,从开产直至种鸡淘汰时,REV 接种鸡均与同批对照鸡处在同等水平上。

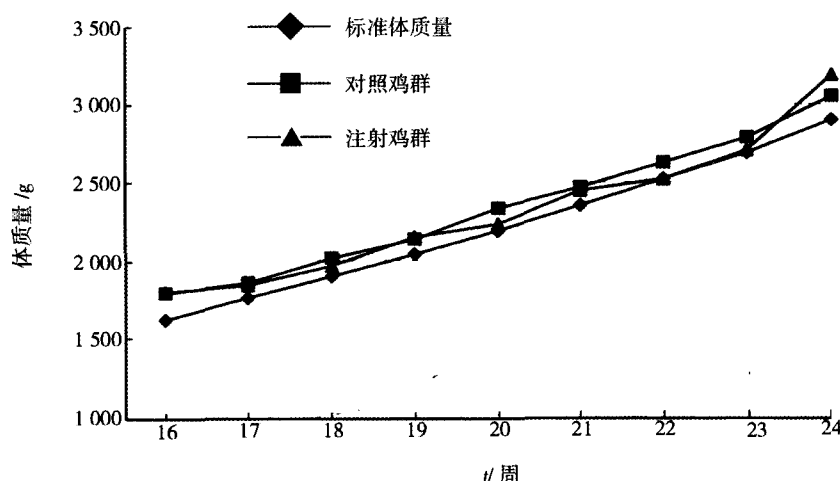


图 1 疫苗注射组与对照组种鸡生长动态比较 标准体质量是指 AA 父母代肉种鸡饲养手册规定的生长指标

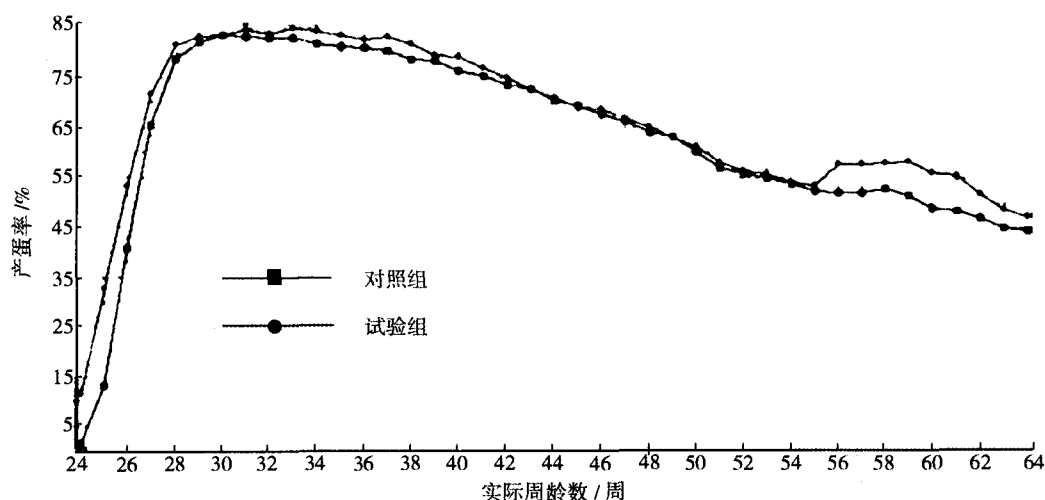


图 2 免疫及对照组种鸡在 24~64 周龄期间产蛋曲线比较

2.2 REV 弱毒疫苗免疫对种鸡产蛋性能的影响

见表 1 和表 2。18 周龄注射 REV 弱毒在整个产蛋期对种鸡的死淘率、平均产蛋率、高峰产蛋率、日产蛋高峰等指标均没有任何不良影响。对所产的种蛋的受精率、孵化率和受精蛋健雏率也均无不良影响。

2.3 接种 REV 弱毒疫苗对自然肿瘤发生率的影响

注射 REV 弱毒后对鸡群进行持续观察,无任何异常。注射 REV 疫苗后 20 d 剖杀 3 只,内脏肉眼观察未见异常。在整个产蛋期,经 REV 弱毒接种的 598 只种鸡自然死亡 32 只(死亡率 2.56%),对照组 5 973 只中死亡 295 只,死亡率 2.83%,免疫组的自然死亡率与对照鸡群相比差异不显著。死亡鸡剖解后肉眼观察均无肿瘤病变,这说明注射 REV 活毒疫苗不会引起明显临床肿瘤的发生。

2.4 接种 REV 弱毒疫苗对其他疫苗免疫反应的影响

由表 3 可见,在 18 周龄注射 REV 弱毒疫苗

后,对随后再次用鸡新城疫病毒(NDV)疫苗重复免疫后的抗体反应无影响。在用禽流感病毒(AIV)H5 和 H9 疫苗再次重复免疫后 2 周,虽然经 REV 弱毒疫苗免疫鸡的 HI 抗体效价略低于未经 REV 免疫的鸡,但在 6 周后(28 周龄)又高于后者。显然,REV 弱毒疫苗免疫对禽流感病毒(AIV)H5 和 H9 疫苗再次重复免疫也没有产生不良影响。

表 1 REV 疫苗接种和对照种鸡在 24~64 周龄种蛋相关生产性能比较

项 目	疫苗接种组	对照组
入舍鸡数/只	598	5 870
母鸡死亡数/只	32	295
死淘率/%	2.56	2.83
平均产蛋率/%	66.13	62.94
周高峰产蛋率/%	84.99	83.48
日产蛋高峰/(日龄)	85.42(211 d)	84.33(209 d)

表2 疫苗接种和对照种鸡种蛋的受精率和孵化性能比较

项 目	疫苗接种组	对照组
孵化批次	57	74
受精率/%	94.84	94.47
上孵蛋孵化率/%	88.28	87.26
受精蛋孵化率/%	93.08	92.36
死胎率/%	2.56	2.83
受精蛋健雏率/%	89.07	88.61

表3 REV免疫对NDV和AIV灭活疫苗再免疫后HI抗体反应的影响($\bar{x} \pm s$)

鸡群	周 龄	血凝抑制试验抗体效价		
		NDV	AIV-H5	AIV-H9
REV-Vac ⁻		8.88±0.5(24) [*]	NT	6.5±1.2(24)
REV-Vac ⁺	18	8.57±0.6(30)	NT	6.43±0.9(30)
REV-Vac ⁻		8.81±0.86(40)	5.39±1.6(40)	6.0±2.0(40)
REV-Vac ⁺	24	8.99±1.0(96)	4.13±1.6(96)	4.45±1.5(96)
REV-Vac ⁻		7.72±1.1(18)	4.89±1.1(18)	4.78±1.6(18)
REV-Vac ⁺	28	8.26±1.1(50)	5.05±1.3(48)	6.04±1.5(48)
REV-Vac ⁻		8.28±1.1(80)	3.95±0.9(80)	4.9±1.4(40)
REV-Vac ⁺	32	7.97±1.6(78)	4.2±1.1(40)	5.2±1.7(40)

注:1. REV-Vac⁻为未经REV免疫鸡;2. REV-Vac⁺为经REV免疫鸡;3. 在18周龄注射REV弱毒疫苗。在20周龄时,2组鸡均肌肉再次注射新城疫-传染性支气管炎-法氏囊病-病毒性关节炎四联灭活疫苗(英特威产品),同时使用新城疫-支气管炎二联活苗(Clone30-Ma5,英特威产品)进行气雾免疫。在22周龄时,再次用禽流感H5-H9二价灭活油苗(青岛易邦产品)肌肉注射接种。然后分别再24、28、32周龄时采血清测定对NDV、H5和H9 3种病毒抗原的HI抗体效价

2.5 REV疫苗免疫种鸡垂直传染性的检测。在烟台实验室,于24、33、36、45周龄时分别收集36个鸡胚孵化至11日胚龄时,分别制备成CEF。在将CEF培养8d后用REV特异性单克隆抗体作IFA检测REV,共计144枚胚所制CEF经IFA检测均为阴性。

在山东农业大学实验室,对在23、31、35周龄时收集的种蛋孵化至11日胚龄时制备CEF培养8d,进行IFA检测。从24、17、12个鸡胚制备的CEF也全部是REV阴性。

这几批试验都表明,在用REV疫苗免疫18周

龄育成种鸡后,对种蛋因而对雏鸡都不会发生垂直传播。

2.6 REV疫苗注射后的特异性抗体反应

2.6.1 种鸡血清抗体反应 在18周龄注射REV疫苗后,种鸡能够很快产生免疫应答,在10d后100%的个体的血清抗体已呈现阳性(表4)。而同批同舍饲养的对照鸡,在80d内仍然全部为阴性。结果还表明,用REV弱毒接种的鸡,很难对同舍鸡产生横向感染。

对用不同剂量REV接种的鸡的比较表明,在所用的3个不同剂量范围内,3组试验鸡的REV抗体反应,在出现的时间、抗体效价的平均水平和持续期几方面都没有明显差异(表5)。而且,注射REV疫苗后,种鸡血清中REV抗体至少可持续280d以上。

2.6.2 鸡胚卵黄和雏鸡血清中REV母源抗体 经免疫的种鸡群,从28周龄时取种蛋8枚将蛋黄液用生理盐水2:1稀释,用ELISA检测试剂盒检测,均为REV抗体阳性。

30周龄采集种蛋孵出雏鸡,3日龄心脏采血制备雏鸡血清17份,用ELISA检测试剂盒检测,REV抗体均为阳性。这表明,疫苗在种鸡所激发的REV抗体可以经卵传递给下一代。

2.6.3 雏鸡血清中REV母源抗体持续时间 对不同日龄雏鸡的血清中REV母源抗体连续检测表明,REV的母源抗体在第7天仍保持100%的阳性。但到第10d时阳性率下降至20%~30%,2周后已没有母源抗体保护。

表4 免疫组和对照组种鸡血清REV抗体阳性率比较

组 别	REV疫苗 免疫前	免疫REV 后10d	免疫REV 后80d
注射REV疫苗组	3/60 [*]	60/60	60/60
同舍饲养未注射疫苗组	0/10	0/10	0/20

注: * 示3只阳性鸡,测定时D值分别为0.174、0.205和0.174,仅能勉强判为阳性(该试验中可判为阳性的最低值为0.165)

表5 接种不同剂量REV对抗体反应的影响

REV 剂量 (TCID ₅₀)	阳性率						ELISA 效价(log10)					
	免疫前	免疫后 10d	免疫后 30d	免疫后 80d	免疫后 154d	免疫后 276d	免疫前	免疫后 10d	免疫后 30d	免疫后 80d	免疫后 154d	免疫后 276d
3×10 ⁶	1/20	20/20	20/20	20/20	4/4	3/3	1.079 (n=60)	3.87 (n=20)	4.34 (n=20)	4.09 (n=20)	4.10 (n=4)	4.35 (n=3)
6×10 ⁵	2/20	20/20	20/20	20/20	4/4	4/4	1.079 (n=60)	3.86 (n=20)	4.36 (n=20)	4.40 (n=20)	4.15 (n=4)	4.43 (n=4)
1.2×10 ⁵	0/20	20/20	20/20	20/20	6/6	4/4	1.079 (n=60)	3.81 (n=20)	4.22 (n=20)	4.28 (n=20)	4.17 (n=6)	4.38 (n=4)

注:1. * 为同时测定REV疫苗注射前60只试验鸡的血清平均D值为0.1124,效价值>3.032(log10)判读为阳性;2. 此表中的效价是根据试剂盒所提供的公式计算而来

3 讨论

近几年来,我国鸡群中的免疫抑制性病毒感染的问题逐渐被引起重视。其中,REV 与其他病毒的共感染使情况变得更为复杂和严重^[4-9]。在常见的引起免疫抑制的疾病中,除了 REV 和淋巴白血病毒(ALV)以外,都已有相应的商品化疫苗来预防和控制。对 ALV 感染,可通过对种鸡的净化来有效地预防和控制。但对 REV,目前还缺乏对种鸡的有效净化措施,也没有商品化疫苗。本次试验验证了我们研制的 REV 弱毒对育成种鸡的安全性和有效性,为进一步将其开发为弱毒疫苗提供了安全性方面的依据。本试验从多方面的生产性能和免疫反应的比较结果显示,注射 REV 弱毒疫苗,对父母代肉种鸡的生长、产蛋性能、受精率和孵化率和免疫应答均无不良影响。它不会引起网状内皮淋巴肿瘤,也几乎不引起种鸡间的直接横向感染或对雏鸡的垂直感染。利用我们过去检测鸡胚中是否有 REV 感染的方法^[12],本试验所有经 REV 免疫的种鸡所产的蛋,都没有 REV 感染。因此,对接种的种鸡是一种安全的生物制剂。

本试验中我们还发现,即使在 18 周龄接种了弱毒 REV 的鸡与对照鸡在同一鸡舍中饲养,但在 80 d 内,检测的 20 只对照鸡中没有 1 只出现抗体。这表明,该弱毒横向传播能力也很弱,因此也不会污染环境。

垂直感染是 REV 的一个重要的传播途径,而且垂直感染的雏鸡多易发生耐受性病毒血症,即长期不产生抗体但保持持续的病毒血症。这些雏鸡最容易发生典型的 REV 病变,并成为鸡群的传染源^[1]。本研究结果可见,注射 REV 弱毒疫苗后,能够很快激发免疫应答,在 10 d 内就都已产生抗体,这种抗体可以持续 280 d 以上(仍在继续跟踪检测)。当种鸡在开产前对 REV 抗体阳性后,就能完全抵抗随后可能的感染,不会发生病毒血症,因而就不可能引发垂直感染。显然,在 18~19 周龄时用弱毒 REV 接种后在 10 d 内产生抗体,是足以保证在 22 周龄开产后所产的蛋不会有 REV 垂直感染。REV 也能横向传染,但是 REV 感染后的致病作用的严重程度有很强的年龄依赖性^[1]。一般来说,只有 1 周龄内的雏鸡感染 REV,才有可能发生耐受性病毒血症,并显现明显的病理作用。本试验结果表明,免疫的种鸡在雏鸡提供的母源抗体至少可维持 7 d,这也足以保护雏鸡免于早期容易发生的横向感染。这一

点是极为重要的,因为在雏鸡运输过程中,往往几十只雏鸡堆积在一个盒子里。如果没有母源抗体,那么只要有 1 只雏鸡有垂直感染,就很容易横向传染至其他雏鸡。试验已证明,与 REV 非常类似的 J 亚群 ALV 就可以通过这样的方式造成了很高比例的横向感染^[13]。

参考文献:

- [1] Saif Y M. Diseases of Poultry[M]. 11th Edition. Ames USA: Iowa State Press, 2003:517-536.
- [2] 何勇群,张中直,杨汉春. 北京地区鸡群网状内皮组织增殖病感染的血清学调查研究[M]. 畜牧兽医学报,1998,29:71-78.
- [3] 杜元钊,吴延功,朱万光. 从表现腺胃炎的病鸡分离到 1 株网状内皮增殖症病毒[J]. 中国兽医学报,1999,19:434-436.
- [4] 崔治中,杜岩,赵文明,等. 网状内皮增生病毒感染和鸡群的免疫抑制[J]. 中国兽药杂志,2000,34:(1)1-3.
- [5] 张志,崔治中. 鸡肿瘤病料中马立克氏病病毒和禽网状内皮组织增生症病毒共感染的研究[J]. 中国预防兽医学报,2003,23:274-278.
- [6] 张志,崔治中,姜世金,等. 从 J 亚群禽白血肿瘤中检测出禽网状内皮组织增生症病毒[J]. 中国兽医学报,2004,24(1):10-13.
- [7] 张志,王锡乐,庄国庆,等. 商品代肉鸡群中禽网状内皮组织增生病病毒和马立克氏病病毒的混合感染[J]. 中国预防兽医学报,2005,27(1):39-41.
- [8] 金文杰,崔治中,刘岳龙,等. 传染性法氏囊病病料中 MDV、CAV、REV 的共感染检测[J]. 中国兽医学报,2001,21(1):6-9.
- [9] 姜世金,孟珊珊,崔治中,等. 我国自然发病鸡中 MDV、REV 和 CAV 共感染的检测[J]. 中国病毒学,2005,20(2):164-167.
- [10] Yuasa N, Yoshida I, Taniguchi T. Isolation of a reticuloendotheliosis virus from chickens inoculated with Marek's disease vaccine[J]. Natl Inst Anim Health Q, 1976, 16:141-151.
- [11] Jackson C A W, Dunn S E, Smith D I. Proventriculitis, "Nakanuke" and reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys (HVT)[J]. Aust Vet J, 1977, 53:457-458.
- [12] Bagust T J, Grimes T M, Dennett D P. Infection studies on a reticuloendotheliosis virus contaminant of a commercial Marek's disease vaccine[J]. Aust Vet J, 1979, 55:153-157.
- [13] Fadly A M, Witter R L, Smith E J. An outbreak of lymphomas in commercial broiler chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus[J]. Avian Pathol, 1996, 25:35-47.
- [14] 吉荣,崔治中,王锡乐,等. 分子克隆化禽网状内皮增生症病毒传染性及其前病毒全基因组序列研究[J]. 病毒学报,2005,21(6):448-454.
- [15] 吴永平,崔治中. 鸡胚中人工感染网状内皮增殖病病毒的检测[J]. 中国预防兽医学报,2004,26(1):55-57.