

网状内皮增生病病毒感染 SPF 鸡对疫苗免疫反应的抑制作用*

孙淑红, 崔治中**, 邱玉玉

(山东农业大学动物科技学院 山东泰安 271018)

Immuno-Suppression of Reticuloendotheliosis Virus Infection on Antibody Responses to Different Vaccines in SPF chickens

SUN Shu-hong, CUI Zhi-zhong**, QIU Yu-Yu

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract :Avian reticuloendotheliosis virus (REV) infection was reported to be very common in chicken flocks in China, but its economic impact on the poultry industry was not clear. The results in this study indicated that REV infection in 1-day-old SPF chickens could severely suppress immune reactions to inactivated vaccines against Newcastle disease virus (NDV) and Avian influenza virus (AIV). Hemagglutination inhibition (HI) antibody titers to NDV, AIV-H9 and AIV-H5 in REV-infected birds were significantly lower than that in the control group 3, 4, and 5 weeks after vaccination at the age of 7 days. REV infection of high doses caused more severely immuno-suppression than that with low doses, but the difference between high and low doses was not significant. REV infection also caused severe atrophy of central immune organs, the ratios of thymus and the Bursa to body weight in REV-infected birds were significantly lower than that in the control birds. This study demonstrated that the early REV-infection interfered vaccinations to NDV and AIV.

Key words : Reticuloendotheliosis virus ; Newcastle disease virus ; Avian influenza virus ; Immuno-suppression

摘要 :我国鸡群中网状内皮增生病病毒 (REV) 感染已相当普遍, 但对其造成的实际危害却不太清楚。本研究结果表明, 1 日龄 SPF 鸡感染 REV 会显著抑制对新城疫病毒 (NDV) 和禽流感病毒 (AIV, H5 和 H9) 疫苗的免疫反应。1 周龄用相应灭活疫苗免疫后 3 周、4 周和 5 周, REV 感染组对不同病毒疫苗免疫后的 HI 效价显著低于对照组。高剂量 REV 感染组的抑制作用大于低剂量感染组, 但统计学差异不显著。REV 感染可造成中枢免疫器官萎缩, REV 感染组的胸腺、法氏囊与体重比显著低于对照组。本研究证明了, REV 早期感染会干扰鸡群对 NDV、AIV 的免疫效果, 特别是会严重干扰对 AIV 疫苗的免疫效果。

关键词 : 禽网状内皮增生病病毒; 新城疫病毒; 禽流感病毒; 免疫抑制;

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0034-04

禽网状内皮增生病病毒 (Reticuloendotheliosis Virus, REV) 被列为鸡群中除马立克氏病病毒 (Marek's disease virus, MDV) 和鸡白血病毒 (Avian Leukosis virus, ALV) 以外的第三类致肿瘤病毒。可引起从亚临床感染到生长迟缓、免疫抑制

和肿瘤等不同的临床和病理变化, 但对其自然感染造成的经济损失还一直估计不足。

在八十年代, REV 感染在我国仅偶见报道^[1,2]。但近来发现, 在一些鸡群中对 REV 抗体阳性率已相当高。何勇群等^[3]所作的调查表明, 在北京郊区

收稿日期: 2005-06-13, 修回日期: 2005-07-29

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (#30030450); "十五" 国家科技攻关计划项目 (#2004BA514A18C)

作者简介: 孙淑红 (1968-) 女, 汉, 山东高密籍, 讲师, 博士研究生, 专业方向为禽病学。

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 0538-8241560, E-mail: zzcui@sdau.edu.cn

7 个有不同症状的鸡场,对 REV 抗体阳性率可能高达 21.4%~71.0%。其中,出现免疫抑制状态的鸡群对 REV 抗体阳性率要比正常鸡群高得多。在一个有所谓传染性腺胃病并发生生长迟缓的鸡群,杜元钊等^[4]也分离到 REV。我们用对 REV 的核酸探针作点杂交从全国各地采集的 65 个随机法氏囊样品中检测出对这种病毒的感染率为 23.1%^[5]。在江苏和山东二个表现出明显免疫抑制状态的父母代种鸡场的 50 日龄的后备种鸡群的病原学研究发现,对 REV 的病毒血症分别是 4/4 和 2/4^[6]。

为了阐明 REV 感染 SPF 鸡是否会影响鸡新城疫病毒(*Newcastle disease virus*, NDV)疫苗和禽流感病毒(*Avian influenza virus*, AIV)疫苗(H5、H9)的免疫效果,同时也为了研究不同剂量 REV 感染是否对其免疫抑制作用有所不同,本研究分别在 1 日龄 SPF 鸡比较了两个不同剂量的 REV 感染对疫苗免疫效果的影响。

1 材料与方 法

1.1 病毒

所用的 REV-C99 株病毒,系用 SNV 株 REV 经反向遗传操作,从带有 SNV 全基因前病毒 cDNA 的质粒克隆 DNA 转染 SPF 来源的鸡胚成纤维细胞而来^[7]。与原始 SNV 株病毒相比,只是用分子克隆技术将其在分子水平纯化,未作任何基因修饰。

REV-C99 在 CEF 上的第三代 REV-C99-C3(10^6 TCID₅₀/mL)用作对 1 日龄 SPF 鸡的人工攻毒。

实验动物来自山东斯帕法斯(SPAFS)的 1 日龄 SPF 鸡。

1.2 REV 人工攻毒

1 日龄 SPF 鸡用 NDV 的 LaSota 株弱毒疫苗点眼滴鼻免疫。取出 30 只不接种 REV 作为对照,另 40 只每只腹腔接种 0.2mL 3 代 REV-C99-C3 (1:20 稀释,相当于 10^4 TCID₅₀/只)和 40 只每只腹腔接种 0.2 mL 3 代 REV-C99-C3 (1:200 稀释,相当于 10^3 TCID₅₀/只),分别于三个带有正压过滤空气的 SPF 动物饲养隔离罩内隔离饲养。

1.3 NDV 和 AIV 油乳灭活疫苗的免疫和免疫反应的测定

饲养 9d 后,所有鸡分别接种 ND 灭活油乳苗(因特威公司生产)、AIV(H5 和 H9)灭活油乳苗(齐鲁动物保健品厂生产)各 0.25mL。其中对 AIV-H5 和 H9 均为抗原浓缩型疫苗。

免疫后 21d、28d、35d,分别采集血清,用常规方法分别测定对 NDV(LaSota 株)、H9 和 H5 血

凝抑制(HI)抗体的滴度。所用抗原为齐鲁动物保健品厂提供的经福尔马林灭活的鸡胚尿囊液,包括 LaSota 株 NDV、H9N2 和 H5N2 亚型的 AIV。

1.4 REV 感染对体重的影响

分别在 23d、30d、37d、45d 称重,以比较不同剂量的 REV 感染对 SPF 鸡生长性能的影响。

1.5 对 IBDV 疫苗免疫后特异性抗体的测定

18d 后,用 B87 株 IBDV 弱毒疫苗(齐鲁动物保健品厂生产)饮水免疫,在免疫后 21d、28d、35d,分别采集血清,用 IDEXX 提供的试剂盒测定抗 IBDV 抗体。

1.6 统计学分析

不同组别的所有数据用 student's test 分析来确定差异显著性。

2 结果

2.1 不同剂量 REV 感染对鸡生长性能的影响

1 日龄 SPF 鸡接种第 3 代分子克隆化 REV-C99-C3 后,从第 23d 开始显示生长滞缓,而且日趋明显,见表 1。45d,经高剂量 REV-C99-C3 攻毒鸡的平均体重只相当于未攻毒对照鸡的 53%左右(264.6±66.0 g vs 492.9 ± 59.3 g, $P<0.01$);低剂量 REV-C99-C3 攻毒鸡的平均体重只相当于未攻毒对照鸡的 60%(294.3±108.5 g vs 492.9±59.3 g, $P<0.01$)。

表 1 REV 感染对 SPF 鸡生长的抑制作用

Table 1 Inhibitory influence of REV infection on growth rates in broilers

Ages of chicken (days)	REV (10^4 TCID ₅₀ /0.2mL)	REV (10^3 TCID ₅₀ /0.2mL)	Control
23	110.0±19.3(13) ^{A*}	120.4±34.0(24) ^A	195.4±35.4(17) ^B
30	160.8±32.6(12) ^A	175.9±52.8(22) ^A	287.0±47.9(17) ^B
37	202.7±63.0(11) ^A	217.0±76.9(22) ^A	390.3±58.3(17) ^B
45	264.6±66.0(11) ^A	294.3±108.5(21) ^A	492.9±59.3(17) ^B

The numbers in the table indicate: mean ± SD (sample size). Different capital letters indicate that the differences were very significant ($P<0.01$, one capital letter). The same letters indicate the differences were not significant ($P>0.05$).

2.2 不同剂量 REV 感染对 NDV 疫苗免疫后抗体反应的抑制作用

如表 2 所示,1 日龄感染 REV 可显著抑制对 NDV 疫苗免疫后 HI 抗体反应, 10^3 TCID₅₀ 和 10^4 TCID₅₀ 的 REV 感染均造成对 NDV 疫苗免疫反应的抑制作用,与对照组相比较,差异均非常显著($P<0.01$)。高剂量 REV 感染诱发的免疫抑制作用比低剂量更大,但差异不显著($P>0.05$)。

表 2 不同剂量 REV 感染对 NDV HI 抗体滴度的影响 (Log₂)Table 2 Influence of REV infection with different doses on HI antibody titers to NDV after vaccination (log₂)

After vaccination (Weeks)	REV (10 ⁴ TCID ₅₀ /sample)	REV (10 ³ TCID ₅₀ /sample)	Control
3	4.27±1.49 (11) ^A	4.86±2.53 (22) ^A	8.59±1.12 (17) ^B
4	4.55±1.63 (11) ^A	5.36±2.74 (22) ^A	9.35±1.17 (17) ^B
5	4.83±2.86 (11) ^A	6.22±2.86 (18) ^A	9.06±1.64 (17) ^B

The numbers in the table indicate: mean±SD (sample size). Different capital letters indicate that the differences were very significant ($P < 0.01$, one capital letter). The same letters indicate the differences were not significant ($P > 0.05$).

2.3 REV 感染对 AIV-H9 疫苗免疫后 HI 抗体反应的抑制作用

1 日龄感染 REV-C99-C3 可显著抑制对 AIV-H9 疫苗免疫后 HI 抗体反应, 差异极显著 ($P < 0.01$)。而且, 抑制的程度与 REV 感染的剂量相关。高剂量感染鸡的抗 AIV-H9 抗体滴度在免疫后 3 周、4 周和 5 周都显著低于低剂量 REV 感染组。如免疫后 5 周, 不同剂量 REV 感染组与对照组的 HI 滴度分别为 0.91±1.45 和 2.22±3.35, vs 9.35±1.27 ($P < 0.01$), 结果见表 3。

表 3 不同剂量 REV 感染对免疫鸡 AIV-H9 HI 抗体滴度的影响 (Log₂)Table 3 Influence of REV infection on HI antibody titers to AIV-H9 after vaccination (log₂)

After vaccination Weeks	REV (10 ⁴ TCID ₅₀ /sample)	REV (10 ³ TCID ₅₀ /sample)	Control
3	0(11) ^A	0.86±2.34(22) ^A	7.18±1.85(17) ^B
4	0.55±1.04(11) ^A	1.91±3.44(22) ^A	8.47±1.23(17) ^B
5	0.91±1.45(11) ^A	2.22±3.35(18) ^A	9.35±1.27(17) ^B

The notes is as Table 1.

2.4 不同剂量 REV 感染对 AIV-H5 疫苗免疫后 HI 抗体反应抑制作用

1 日龄感染 REV 可显著抑制对 AIV-H5 疫苗免疫后 HI 抗体反应, ($P < 0.01$)。如免疫后 5 周, 高剂量 REV 感染组、低剂量 REV 感染组与对照组的 HI 滴度分别为 0.91±1.04、1.06±1.40 vs 3.82±0.53 ($P < 0.01$)。这表明, REV 感染可对 AIV-H5 产生非常显著的抑制作用。用不同剂量 REV-C99-C3 感染后的抗体水平有差异, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 结果见表 4。

2.5 不同剂量 REV 感染对 SPF 鸡中枢免疫器官的影响

如表 5 所示, 1 日龄 SPF 鸡感染 REV 后, 45d

表 4 REV 感染对免疫鸡 AIV-H5 HI 抗体滴度的影响 (Log₂)Table 4 Influence of different dilution of REV infection on HI antibody titers to AIV-H5 after vaccination (log₂)

After vaccination Weeks	REV (10 ⁴ TCID ₅₀ /sample)	REV (10 ³ TCID ₅₀ /sample)	Control
3	0(11) ^A	0.91±1.57(22) ^A	435±0.93(17) ^B
4	0.36±0.81(11) ^{Aa}	1.59±1.89(22) ^{Ab}	482±0.64(17) ^B
5	0.91±1.04(11) ^A	1.06±1.40(18) ^A	382±0.53(17) ^B

Different capital letters indicate that the differences were very significant ($P < 0.01$), the different small letters indicate the differences were significant ($P < 0.05$). The same letters indicate the differences were not significant ($P > 0.05$).

剖检各免疫器官, 结果发现, 与对照组相比, 感染高剂量 REV 的 SPF 鸡的胸腺、法氏囊均有明显的萎缩, 差异极显著 ($P < 0.01$)。感染低剂量 REV 的 SPF 鸡的胸腺、法氏囊均有明显的萎缩, 差异显著 ($P < 0.05$)。高剂量 REV 感染组的器官萎缩比低剂量组更严重, 但二者之间的差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 5 REV 感染对 SPF 鸡中枢免疫器官的影响

Table 5 Influence of REV infection on the ratios of thymus and Bursa to body weight

Groups	Thymus/body weight(%)	Bursal/body weight(%)
REV(10 ⁴ TCID ₅₀)	0.337±0.188(7) ^{Aa}	0.098±0.021(7) ^{Aa}
REV(10 ³ TCID ₅₀)	0.395±0.219(7) ^a	0.127±0.074(7) ^a
Control	0.619±0.08(5) ^{Bb}	0.341±0.161(5) ^{Bb}

The notes is as table 4.

3 讨论

REV 是一群不同于禽白血病病毒的反转录病毒, 是反转录病毒的 C 型肿瘤病毒亚属的一个成员。第一个 REV 分离株 T 株是 1958 年从患内脏肿瘤的火鸡分离到的, 随后, 又分别从其鸡、鸭、鹅、鹌鹑等家禽和其它野鸟分离到^[8]。近几年来, 血清学的流行病学调查和现场病例实验室诊断发现, REV 感染在我国各地已非常普遍。在表现为生长迟缓或免疫抑制或肿瘤的现场病例中, 检出 REV 共感染的比例也越来越高^[1,3-10]。然而, 对其在鸡群中感染造成的具体危害还没有被充分认识。

本研究用动物试验证明了, REV 的早期感染造成的免疫抑制, 不仅可干扰鸡群在用 NDV 灭活疫苗免疫后的抗体反应 (表 2), 对 AIV 疫苗免疫也显示明显的抑制作用 (表 3, 4)。特别值得关注的是, REV 早期感染对 AIV 疫苗免疫的干扰作用要比对 NDV 疫苗的更为严重。多年来, 我国的鸡群

中,为预防 NDV 普遍采取了非常强化的免疫程度,但仍有少数鸡群发病,更清除不掉 NDV 感染。根据本研究的结果,我们可以推测,一些免疫抑制性病毒包括 REV 感染在一定比例鸡造成的免疫抑制状态可能是其中的一个重要原因。REV 早期感染对 AIV 疫苗的干扰作用甚至大于对 NDV 疫苗的干扰作用。不久前,我们曾提出了鸡群中的免疫抑制性病毒的多重感染造成一部分个体处于“不完全免疫状态”这一新概念^[11]。这种“不完全免疫状态”可能使许多已经多次强化免疫的鸡场中仍有部分个体不能达到理想的免疫水平,因而成为 A 类病毒侵袭的对象并成为鸡群中的难以消除的传染源。本研究结果进一步证明了,REV 感染不仅使免疫后鸡群对 NDV 和 H5-及 H9-AIV 的平均抗体水平显著下降,而且群体中抗体反应的个体差异也显著加大。例如,在免疫后 5 周,高剂量 REV 感染组及对照组对 NDV 和 H5-及 H9-AIV 的 HI 平均抗体滴度分别是 4.83 ± 2.86 vs 9.06 ± 1.64 ; 0.91 ± 1.45 vs 9.35 ± 1.27 和 0.91 ± 1.04 vs 3.82 ± 0.53 (表 2、3、4),而变异系数分别是 59.2% vs 18.1%; 159.3% vs 13.8% 和 114.3% vs 13.9%。显然,REV 感染组与对照组相比,不仅平均抗体水平很低,而且个体差异更大。在 REV 感染组还存在着一些抗体反应极低或完全不反应的个体,它们可能成为危险的易感鸡或传染源。显然,为了控制我国鸡群中的 NDV 和 AIV 等 A 类病毒感染,除了继续改进疫苗和强化对这些病的免疫程序外,还必须进一步考虑如何控制鸡群中的多种免疫抑制性病毒的感染,其中包括 REV。

本研究通过 REV 人工感染 SPF 鸡显示了 REV 感染可对几种不同疫苗免疫反应呈现显著的抑制作用。在此同时,我们还分别在对 REV 母源抗体呈阳性和阴性的 1 日龄商品代肉鸡,在常规的试验条件下做了类似试验并得到了非常类似的结果。但还同时证明了母源抗体可有效预防 REV 人工感染造成的不良影响(孙淑红等,待发表资料)。

References

- [1] Cui Z Z, Zhu C R, Sun H C (崔治中,朱承如,孙怀昌). Investigation of avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus infections[J].

Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Disease (中国禽畜传染病), 1987, 1:37-38.

- [2] He H H, Chen F Y, Cai B X (何宏虎,陈溥言,蔡宝祥). Isolation and identification of avian reticuloendotheliosis viruses[J]. Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Disease (中国禽畜传染病). 1988, 2:1-3.
- [3] He Q Y, Chen F Y, Cai B X, (何勇群,张直中,杨汉春). A Serological Survey of the Reticuloendotheliosis Virus Infection In Beijing Chicken Flocks[J]. Acta Veterina et Zootechnical Sinica (畜牧兽医学报), 1998, 29(1): 71-78.
- [4] Du Y Z, Wu Y G, Zhu W G, (杜元钊,吴延功,朱万光) *et al.* A Reticuloendotheliosis Virus Isolated from Transmissible Proventriculitis in Chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Science(中国兽医学报), 1999, 19:434-436.
- [5] Jin W J, Cui Z Z, Liu Y L, (金文杰,崔治中,刘岳龙) *et al.* Co infection of MDV, CAV and REV in Infectious Bursal Disease Sample [J]. Chinese Journal of Veterinary Science (中国兽医学报), 2001, 21: 6-9.
- [6] Cui Z Z, Du Y, Zhao W M, (崔治中,杜岩,赵文明) *et al.* Reticuloendotheliosis Virus Infection and Immunodepression of Chicken Flocks [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug(中国兽药杂志), 2000, 34(1): 1-3.
- [7] Ji R, Cui Z Z, Wang X L (吉荣,崔治中,王锡乐) *et al.* Study of Infectivity if the Molecular Cloned Reticuloendotheliosis Virus and Its Genome[J]. Chinese Journal of Virology(病毒学报), 2005, 21(6): 448-455.
- [8] Saif Y M, Disease of Poultry [M]. 11th edition, Ames, USA: Ipwat Strate Press, 2003.
- [9] Zhang Z, Cui Z Z, Jiang S J, (张志,崔治中,姜世金) *et al.* Dual-infection of marke's disease virus and reticuloendotheliosis virus from tumors in chickens[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine (中国预防兽医学报). 2003, 25(4): 275-278.
- [10] Jiang S R, Zhang Z, Sun S H, (姜世金,张志,孙淑红) *et al.* Detection of CAV MDV and REV from broiler by Dot Blotting [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine (中国兽医杂志), 2003, 39 (5): 6-8.
- [11] Cui Z Z (崔治中). Effect of Multiple Immunosuppressive Viral Infections on Pathogenesis and Epidemiology in Chicken Flocks [J]. Acta Veterinaria et Zootechnical Sinica(畜牧兽医学报), 2003, 34(5): 417-421.