

陈翠腾, 傅光华, 黄瑜, 等. 鸭坦布苏病毒感染对鸭免疫器官指数和体液免疫的影响 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (7): 613-617.
CHEN C-T, FU G-H, HUANG Y, et al. Effects on Immune Organ Index and Humoral Immunity in Duck Infected With Duck Tembusu Virus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 29 (7): 613-617.

鸭坦布苏病毒感染对鸭免疫器官指数和体液免疫的影响

陈翠腾^{1,2}, 傅光华¹, 黄瑜^{1*}, 程龙飞¹, 陈红梅¹, 万春和¹, 傅秋玲¹,
施少华¹, 林建生¹

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;
2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 鸭坦布苏病毒是近年来在我国发现的可引起种(蛋)鸭高热、采食量和产蛋量骤降的新病毒。本研究以麻鸭为动物模型, 测定麻鸭感染鸭坦布苏病毒后, 其免疫器官指数、重组H5亚型禽流感病毒灭活疫苗和鸡新城疫病毒弱毒活疫苗诱导产生的抗体水平。结果表明, 鸭坦布苏病毒感染会侵害麻鸭的免疫器官, 第1~3 d脾脏明显肿大, 第7~10 d试验组胸腺指数极显著低于对照组, 第1~14 d法氏囊出现萎缩; 与仅免疫疫苗的对照组鸭相比, 感染鸭坦布苏病毒后再注射疫苗的试验组鸭产生抗体的时间延迟、抗体的峰值降低, 抗体下降加快, 且在整个试验期内产生的抗体水平均低于对照组鸭的抗体水平, 表明鸭坦布苏病毒感染可抑制鸭对灭活疫苗和弱毒疫苗的体液免疫应答能力。

关键词: 鸭坦布苏病毒; 免疫器官指数; 抗体; 体液免疫

中图分类号: S 858.3

文献标识码: A

Effects on Immune Organ Index and Humoral Immunity in Duck Infected With Duck Tembusu Virus

CHEN Cui-teng^{1,2}, FU Guang-hua¹, HUANG Yu^{1*}, CHENG Long-fei¹, CHEN Hong-mei¹,
WAN Chun-he¹, FU Qiu-ling¹, SHI Shao-hua¹, LIN Jian-sheng¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fuzhou, Fujian 350013, China; 2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry
University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Duck Tembusu virus is a newly discovered virus in recent years, which caused duck high fever, egg-laying and feed intake decreased. In this study, we used Sheldrake as animal model, and infected with duck Tembusu virus. Then we determined the immune organ indices and the antibody levels in ducks induced by recombinant H5 avian influenza inactivated vaccine and Newcastle disease virus attenuated live vaccine, respectively. The results showed that the duck immune organs were violated after infected with duck Tembusu virus, resulting in spleen enlargement (1 dpi to 3 dpi), bursa atrophy (1 dpi to 14 dpi), and the test group thymus index was significantly lower than the control group from 7 dpi to 10 dpi. Compared with immunized-group, the antibodies level of the infected-immunized-group were delayed and low, and reduction in peaks and declined accelerate throughout the test period. The above results indicated that duck Tembusu virus can affect the humor immune response to inactivated vaccine and attenuated vaccine in duck.

Key words: duck Tembusu virus; immune organ index; antibody; humoral immunity

鸭坦布苏病毒是近年来新发现的可引起种(蛋)鸭高热、采食量和产蛋量骤降的新型病毒, 对我国养鸭业造成了巨大经济损失。病原学分析表明其病原为黄病毒科的坦布苏病毒 (Tembusu

收稿日期: 2014-04-18 初稿; 2014-05-18 修改稿

作者简介: 陈翠腾 (1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事动物病原与分子生物学研究 (E-mail: 973900245@qq.com)

* 通讯作者: 黄瑜 (1966-), 男, 研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: huangyu_815@163.com)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201936); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-43); 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2011R1025-8)

virus)^[1-3]。该病毒对蛋鸭及肉鸭均有致病力, 感染鸭中以麻鸭最多, 其次是樱桃谷种鸭, 番鸭最少, 肉鸭和鹅也有感染报道^[4-8]。临床症状主要表现为食欲下降甚至废绝, 产蛋下降甚至停止, 发病后期有神经症状, 出现运动障碍^[9-10], 严重可导致死亡, 除此之外, 部分病鸭还表现为体温升高, 排绿色粪便。剖检可见卵巢发生出血、萎缩、破裂, 输卵管有黏液, 脾脏明显肿大; 肝脏出血严重, 并伴有针尖状白色坏死点^[11]。

目前, 关于该病毒理化特性、培养特点、致病性、基因组及其编码蛋白质等均有报道, 但该病毒的致病机理尚不清楚, 关于该病毒对鸭体液免疫的影响的研究未见报道。本研究以麻鸭为动物模型, 通过测定麻鸭感染鸭坦布苏病毒后, 其免疫器官指数、重组禽流感病毒灭活疫苗和鸡新城疫病毒弱毒活疫苗诱导的抗体水平, 明确鸭坦布苏病毒感染对鸭免疫器官指数和体液免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 试验所用鸭坦布苏病毒为 FJMH220 株, 由福建省农业科学院畜牧兽医研究所分离、鉴定并保存, 病毒滴度为 $1 \times 10^{-4.35}$ ELD₅₀ • 0.1 mL⁻¹。

1.1.2 疫苗 重组禽流感病毒灭活疫苗 (H5N1 亚型, Re-6 株) 购自肇庆大华农生物药品有限公司 (批号 012180); 鸡新城疫活疫苗 (La Sota 株) 购自杨凌绿方生物工程有限公司, 批号 (2011) 270022007。

1.1.3 试剂 禽流感病毒 H5 亚型血凝抑制试验抗原 (批号 2013001) 与阳性血清、鸡新城疫血凝抑制试验抗原 (批号 20120517) 与阳性血清, 均购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

1.1.4 试验用动物 80 日龄后备麻鸭共 95 只 (鸭坦布苏病毒、H5N1 和 NDV 抗体检测均为阴性)。

1.1.5 主要器材 FA1604 电子天平购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 微孔板快速振荡器, 型号: OB-9001, 购自 QILINBEIER。

1.2 方法

1.2.1 测定免疫器官指数 80 日龄健康麻鸭 60 只, 随机分为 2 组, 每组 30 只, 一组为试验组, 一组为对照组。试验组攻鸭坦布苏病毒, 肌注, 0.5 mL • 只⁻¹, 对照组每只以相同的方法注射等量的灭菌生理盐水。于攻毒后 1、3、5、7、10、14、21、28、35 d 每组随机取 3 只麻鸭空腹称重后

处死, 解剖, 取胸腺、脾脏、法氏囊, 去除表面的脂肪, 分别称重, 记录数据, 计算免疫器官指数, 其计算公式如下:

$$\text{免疫器官指数} = \frac{\text{免疫器官重 (mg)}}{\text{宰前空腹体重 (g)}}$$

1.2.2 测定疫苗抗体水平

(1) 试验设计: 80 日龄健康麻鸭 35 只, 随机分为 A、B、C、D、E 五组, 每组 7 只。A 组鸭肌注鸭坦布苏病毒 (0.5 mL • 只⁻¹), 攻毒后 3 d 免疫接种鸡新城疫活疫苗 (滴鼻点眼, 0.05 mL • 只⁻¹, 2 倍量); B 组不攻毒, 注射等量灭菌生理盐水, 3 d 后免疫鸡新城疫活疫苗; C 组肌注鸭坦布苏病毒 (0.5 mL • 只⁻¹), 攻毒后 3 d 免疫接种 H5 亚型重组禽流感病毒灭活疫苗 (胸部肌肉注射, 1.0 mL • 只⁻¹); D 组不攻毒, 注射等量灭菌生理盐水 (表 1), 3 d 后免疫 H5 亚型重组禽流感病毒灭活疫苗; E 组既不攻毒也不免疫疫苗, 注射等量灭菌生理盐水。分别于免疫疫苗后第 1、3、5、7、9、11、14、17、21 d 采集血清, 第 21 d 以后每周采集 1 次血清, 测定免疫机体血清中 H5 亚型禽流感和新城疫抗体的血凝抑制效价 (HI), 观察禽流感和新城疫抗体的消长规律。

(2) 血凝 (HA) 试验和血凝抑制 (HI) 试验 (微量法): 参照动物免疫学实验教程^[12]。

表 1 试验分组与处理

Table 1 The test groups and treatments

分组	鸭坦布苏病毒	鸡新城疫活疫苗	重组 AIV 灭活疫苗
A 组	+	+	-
B 组	-	+	-
C 组	+	-	+
D 组	-	-	+
E 组	-	-	-

注: “+”表示作相应处理; “-”表示不作相应处理, 仅注射等量灭菌生理盐水。

2 结果与分析

2.1 免疫器官指数

2.1.1 胸腺指数 由图 1 可知, 攻毒后第 1~5 d, 试验组的胸腺指数与对照组相比未见差异, 于第 7 d、第 10 d 试验组胸腺指数极显著 ($P < 0.01$) 低于对照组, 于第 14 d, 试验组的胸腺指数恢复至与对照组相近水平, 两组之间未见差异, 之后一直维持该趋势。

2.1.2 脾脏指数 由图2可知, 试验组脾脏指数于攻毒后的第1~3 d高于对照组, 第1 d差异显著 ($P<0.05$), 第3 d差异极显著 ($P<0.01$), 于第5 d, 试验组脾脏指数下降至与对照组相近水平, 两组之间未见差异, 之后一直维持该趋势。

2.1.3 法氏囊指数 由图3可知, 试验组法氏囊指数于攻毒后的第1~14 d均低于对照组, 其中第1、3、5、10和14 d差异显著 ($P<0.05$), 第21 d, 试验组法氏囊指数恢复至与对照组相近水平, 两组之间未见差异, 之后一直维持该趋势。

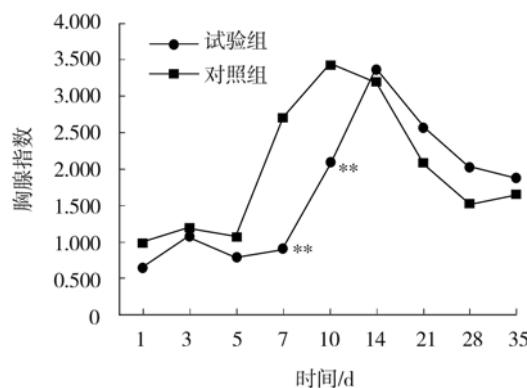


图1 麻鸭胸腺指数的变化

Fig. 1 Changes of the index of thymus

注: *表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$)。图2~3同。

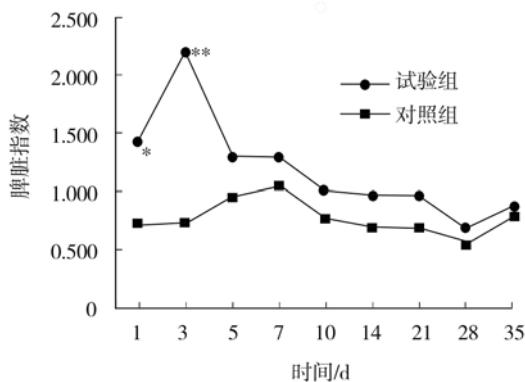


图2 麻鸭脾脏指数的变化

Fig. 2 Changes of the index of spleen

2.2 疫苗抗体水平

2.2.1 新城疫抗体消长规律 如图4所示, 疫苗免疫组(B组)于鸡新城疫活疫苗免疫后第5 d, 就能检测到新城疫抗体, 抗体于第11 d左右达到峰值 ($6.1\log_2$), 于第77 d左右检测不到抗体。攻毒后疫苗免疫组(A组), 于鸡新城疫活疫苗免疫后第11 d才检测到抗体, 抗体于第14 d左右达

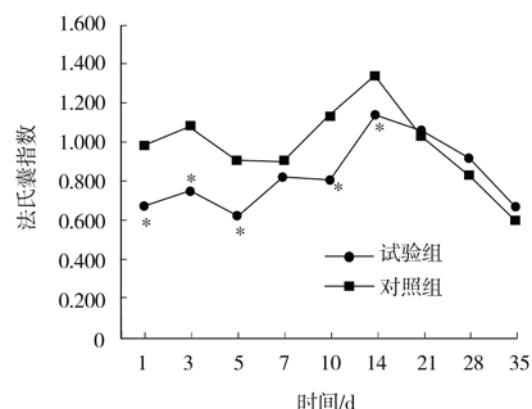


图3 麻鸭法氏囊指数的变化

Fig. 3 Changes of the index of bursa

到峰值 ($4.2\log_2$), 此后一直维持较低的抗体水平, 于第70 d左右检测不到抗体。总体上来看, 攻毒后疫苗免疫组, 其新城疫抗体产生的峰值比疫苗免疫组晚, 抗体下降比疫苗免疫组快, 抗体的峰值降低, 且在整个试验期, 攻毒后疫苗免疫组产生的新城疫抗体的水平一直低于疫苗免疫组产生的新城疫抗体的水平。

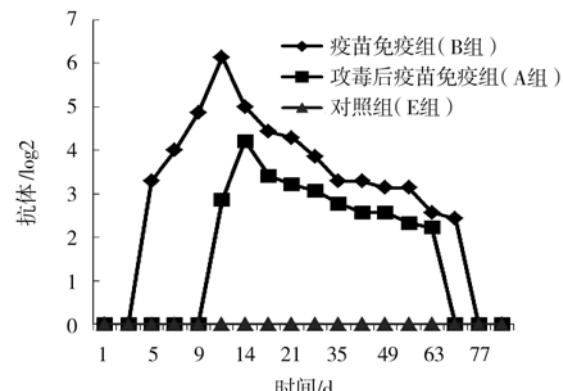


图4 新城疫抗体消长规律

Fig. 4 Dynamic of Newcastle disease antibodies

2.2.2 H5禽流感抗体消长规律 如图5所示, 疫苗免疫组(D组)于H5重组禽流感病毒灭活疫苗免疫后第7 d就能检测到抗体, 于第6~7周抗体达到峰值 ($7.3\log_2$), 此后抗体较长时间维持在较高水平, 后缓慢下降, 于第203 d还能检测到抗体水平为 $4.3\log_2$ 。攻毒后疫苗免疫组(C组), 于H5重组禽流感病毒灭活疫苗免疫后第9 d开始检测到抗体, 于第7周抗体达到峰值 ($6.3\log_2$), 于第203 d检测到抗体水平为 $3\log_2$ 。总体上看, 攻毒后疫苗免疫组, 其禽流感抗体产生的峰值比疫苗免疫组晚, 抗体下降比疫苗免疫组快, 抗体的峰值

降低,且在整个试验期,攻毒后疫苗免疫组产生的禽流感抗体的水平一直低于疫苗免疫组产生的禽流感抗体的水平。

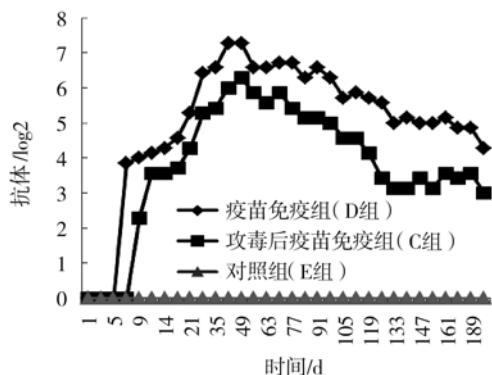


图 5 H5 禽流感抗体消长规律

Fig. 5 Dynamic of bird flu antibodies

3 讨论与结论

免疫器官指数是免疫器官与动物宰前空腹体重的质量比值,是反应病毒感染后动物免疫器官宏观变化趋势的指标,它与机体的免疫功能有一定的相关性。胸腺是 T 细胞分化成熟的中枢免疫器官,法氏囊是禽类特有的淋巴器官,它是诱导分化 B 细胞成熟的场所,而脾脏是体内最大的淋巴器官,是产生免疫应答的重要场所^[13]。不同的抗原免疫后引起动物免疫器官指数变化不一。禽网状内皮组织增生症病毒 (REV) 感染鸡后,其脾脏指数、胸腺指数和法氏囊指数在一定时间范围内均有不同程度的降低^[14]; 鸭出血症弱毒疫苗免疫雏番鸭,番鸭的脾脏指数和胸腺指数在一定时间范围内均有不同程度的升高^[15]; J 亚群禽白血病病毒 (ALV-J) 感染肉鸡后,鸡胸腺指数和法氏囊指数显著或极显著低于对照组,而脾脏指数没有发现显著性差异^[16]; 鸭源呼肠孤病毒感染樱桃谷雏鸭后,鸭的脾脏指数、法氏囊指数降低^[17]。

本研究结果显示,鸭坦布苏病毒感染会侵害麻鸭的免疫器官,第 1~3 d 脾脏明显肿大,第 7~10 d 试验组胸腺指数极显著低于对照组,第 1~14 d 法氏囊出现萎缩;与仅免疫疫苗的对照组鸭相比,感染鸭坦布苏病毒后再免疫疫苗的试验组鸭产生抗体的时间延迟、抗体的峰值降低,抗体下降加快,且在整个试验期内产生的抗体水平均低于对照组鸭的抗体水平,该结果与法氏囊指数的变化趋势存在一定的相关性,表明鸭坦布苏病毒感染可抑制鸭对灭活疫苗和弱毒疫苗的体液免疫应答能力。虽

然第 7~10 d 试验组胸腺指数极显著低于对照组,但该时间段内试验组和对照组的胸腺指数均有大幅度上升的趋势,分析原因可能是外界环境条件和动物机体发育阶段性变化共同作用的结果。

众所周知,抗体产生的整个生物学过程的任一环节受到干扰,最终都会影响抗体的水平。如马立克氏病病毒 (MDV) 通过引起淋巴细胞发生变性坏死、溶解和转化,或在胸腺、脾脏、法氏囊等免疫器官组织的淋巴细胞中增殖,以降低其机能活动,从而造成感染机体发生免疫抑制,而 B 淋巴细胞是发生溶细胞感染的主要靶细胞^[18]。网状内皮组织增生症病毒 (REV) 和禽白血病病毒 (ALV) 都是使 B 淋巴细胞转化成肿瘤细胞,进而影响 IgG 的合成,而 IgG 是体液免疫抗感染的主力,所以 B 细胞的肿瘤转化使机体体液免疫受到抑制^[18~19]。传染性法氏囊病毒 (IBDV) 主要引起法氏囊 B 淋巴细胞的凋亡,被认为是此病造成免疫抑制的主要原因^[20]。鸡传染性贫血病毒 (CIAV) 可以引起免疫器官及其他淋巴样器官中淋巴细胞严重缺失,直接降低机体的免疫反应能力而引起免疫抑制^[21]。还有研究发现,鸭圆环病毒 (DuCV) 感染后鸭法氏囊内的淋巴细胞减少并出现坏死和组织细胞增多症^[22]。关于鸭坦布苏病毒对麻鸭机体的体液免疫所产生的抑制作用,其机理是否与以上这些病毒有相同或相似之处,还是有其独特的作用方式都有待深入研究。

参考文献:

- [1] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46 (12): 3~6.
- [2] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 一种引起种(蛋) 鸭产蛋骤降新病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (6): 663~666.
- [3] 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.
- [4] 万春和, 黄瑜. 坦布苏病毒致病特性及其流行病学 [J]. 动物医学进展, 2011, 32 (12): 116~118.
- [5] 刘友生, 彭春香, 黄瑜, 等. 2010~2011 年中国部分地区禽坦布苏病毒感染调查及分子变异分析 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20 (1): 47~53.
- [6] 施少华, 傅光华, 万春和, 等. 鹅源坦布苏病毒的分离及初步鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2012, (12): 37~40.
- [7] 袁生, 李金平, 张浩吉, 等. 鹅源黄病毒的分离和初步鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39 (9): 47~49.
- [8] 傅光华, 黄瑜, 施少华, 等. 鸡黄病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33 (3): 1.
- [9] 赵圆圆, 李传峰, 王桂军, 等. 鸭产蛋下降—死亡综合征的临

床诊断与病原的初步鉴定 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2011, 32 (3): 11—14.

[10] 张大丙. 鸭出血性卵巢炎的研究进展 [J]. 中国家禽, 2011, 33 (14): 37—38.

[11] 刘志刚, 孙青松, 姚蓉, 等. 鸭坦布苏病毒研究进展 [J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21 (1): 81—86.

[12] 郭鑫. 动物免疫学实验教程 [M], 北京: 中国农业大学出版社, 2007: 30—50.

[13] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学 [M], 北京: 中国农业出版社, 2009: 13—19.

[14] 陈雪锋. REV 感染 SPF 鸡中 IL-6、IL-18 和 IFN γ 的定量检测 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.

[15] 朱海侠. 鸭出血症弱毒活疫苗免疫功能研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.

[16] 王建新. J 亚群禽白血病病毒感染对肉鸡生长和免疫功能的影响及其 env 基因的克隆 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2003.

[17] 李爽, 谷长勤, 白家媛, 等. 鸭源呼肠弧病毒感染引起雏鸭免疫损伤的观察 [J]. 中国农业科学, 2010, 43 (21): 4514—4520.

[18] 商营利. 鸡混合感染 J 亚群白血病病毒与网状内皮增殖病病毒免疫抑制机理研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2003, 25—30.

[19] 刘应鹏, 刘兴友, 王艳林, 等. 鸡病毒性免疫抑制病的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32 (5): 57—60.

[20] 曹宗喜, 潘全会, 黄伟胜, 等. 鸡免疫抑制性疾病的免疫抑制机理研究 [J]. 中国家禽, 2008, 30 (18): 34—37.

[21] 王学理, 李向阳, 龚团莲. 鸡传染性贫血病研究进展 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2005, 4 (183): 40—44.

[22] SOIKE D, ALBRECHT K, HATTERMANN K, et al. Novel circovirus in Mulard ducks with developmental and feathering disorders [J], Vet Rec, 2004, 154: 792—793.

(责任编辑: 林海清)