

胸腺制剂对鸡马立克氏病疫苗 免疫增强作用的研究

何 洁 毕英佐 曹永长

(华南农业大学动物科学系, 广州, 510642)

摘要 将一日龄 SPF 来航鸡分成 4 组, 饲养在隔离器中。第 1 组 1 日龄接种 MD 疫苗, 同时皮下注射 0.5 mL 胸腺制剂; 第 2 组 1 日龄接种 MD 疫苗时不加免疫增强剂; 第 3 组、第 4 组均不接种 MD 疫苗, 也不注射免疫增强剂。第 1、2、3 组于 13 日龄时用 BJMDV-1 强毒株攻毒。结果显示: 第 1 组、第 2 组、第 3 组分别于攻毒后 28、24、17 d 开始出现死亡, 第 4 组没有死亡。第 1 组的攻毒保护率为 40.0%, 比第 2 组保护率 15.0% 有明显提高。此外, 于 11、28、56 日龄时检测了外周血液中 T 淋巴细胞百分率。28 日龄和 56 日龄时第 1 组的外周血 T 淋巴细胞活性高于第 2 组。试验结果表明胸腺制剂对鸡马立克氏病疫苗有免疫增强作用。

关键词 免疫增强剂; 胸腺制剂; MD 疫苗免疫

中图分类号 S858.31

鸡马立克氏病 (Marek's disease MD) 是由马立克氏病病毒 (MDV) 感染引起的鸡淋巴细胞增生性疾病, 严重危害全球的养鸡生产 (Simon, 1992)。1970 年起开始应用火鸡疱疹病毒疫苗 (HVT) 后, 大大地降低了 MD 的发病率。但 1977 年发现了一种超强毒马立克氏病病毒 (vvMDV), 这种病毒使 HVT 无法提供有效的保护。科学家们虽然已将疫苗从单价转向了多价, 但免疫效果仍不够理想 (Witter, 1993)。使用免疫增强剂目的是增强免疫反应, 并使免疫应答提前产生。目前, 美国苏威 (Solvay) 公司已研制出甘露聚糖, 能有效地增强 MD 疫苗免疫效果, 但进口药品价格昂贵。本研究将探讨胸腺制剂对鸡 MD 免疫的增强作用, 以研制出一种高效低成本的免疫增强剂, 提高鸡对 MD 的免疫力, 填补国内生产空白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 胸腺制剂的制备 取冰冻胸腺, 融化后用冷蒸馏水洗 2 次, 除去血污, 分离并弃去脂肪及结缔组织, 高速匀浆。按 W:V=1:3 的比例加入 PBS。60℃ 煮 30 min 再煮沸 2 min, 过滤后所得滤液装瓶, 灭菌, 冰箱保存。参照刘玉斌等 (1989) 的方法测定胸腺多肽含量。

1.1.2 试验动物 由山东家禽研究所购入的无 17 种特定病原的 SPF (Specific-pathogen-free) 来航种蛋, 在北京农业大学实验动物中心 SPF 孵化室孵化的混合初生雏鸡。

1.1.3 疫苗 南京生物药厂有效期内的 MD 冻干疫苗。

1995-09-12 收稿

1.1.4 攻毒用强毒株 MD 强毒 BJMDV-1 株 37 代冷冻全血,由北京市农林科学院畜牧兽医研究所惠赠。保存于-196℃液氮罐中备用。

1.2 方法

将 77 只 SPF 鸡初生混合雏鸡随机分为 4 组:加胸腺制剂 MD 免疫组 22 只(第 1 组)、MD 免疫组 22 只(第 2 组)、攻毒对照组 21 只(第 3 组)、空白对照组 12 只(第 4 组)。每组分别饲养在单独的隔离器中。饲料及饮水均经高压灭菌。1~3 组初生雏鸡在超净工作台内经颈部皮下注射接种 MD 疫苗,每只鸡均为 0.2 mL,含 2 000 PFU;胸腺制剂均为 0.5 mL/只,含胸腺多肽 3.3 g/L。在 13 日龄时 1~3 组攻毒。每只雏鸡经腹腔注射 10⁻¹ 稀释的 BJMDV-1 强毒 0.5 mL。在试验期间每日观察鸡的精神、健康状况,对死亡鸡只逐一剖检。在 56 日龄时结束试验并将鸡只全部扑杀,剖检后记录肉眼 MD 病变。出现以下任何一种病变均判定为 MD 阳性。

卵巢肿大,严重时呈菜花样肿瘤或分页状肿瘤;肝脏肿大,有弥散性针尖大小灰白点,或粟粒大小白色结节;腺胃增大变厚,切面上可见大小不一的坏死结节;在心外膜或心肌可见灰白色小结节;脾脏肿大,有时可见粟粒大小灰白斑;睾丸两侧肿大灰白,或一侧比另一侧肿大;单侧坐骨神经水肿,横纹消失。法氏囊萎缩,偶尔也有肿瘤。

肉眼未出现病变的鸡只取腺胃、生殖器官、坐骨神经、心、肝、肾等组织块,用 10% 福尔马林液固定,石蜡包埋切片,H.E 染色,镜检。如出现以下任何一种现象均判定为 MD 阳性:卵泡萎缩,间质网状内皮细胞增生;睾丸精小管萎缩,网状淋巴样细胞增生;坐骨神经膜细胞增生;肝脏淋巴样细胞增生灶,腺胃在粘膜下层、胃腺腺管之间、腺小叶与腺小叶之间以及粘膜固有层有多形态细胞增生;心肌纤维周围有散在或灶性细胞增生,增生的为成纤维细胞、淋巴样细胞。肾脏残存的肾小管上皮细胞核呈现坏死变化。

试验期间于 11 日龄、28 日龄、56 日龄时用酸性-α-醋酸萘酯染色法(ANAE)检测外周血液中淋巴细胞(张凌志等,1985)。试验结束后计算保护率。

2 试验结果

2.1 雏鸡攻毒后第一只致死日龄

由表 1 可见,第 3 组在攻毒后 17 日龄出现死亡,说明了 BJMDV-1 株有一定的致病力。第 2 组比第 3 组稍迟几天,在 24 日龄开始死亡。加了胸腺制剂的第 1 组 28 日龄才开始死亡,表明加免疫增强剂能延迟鸡的死亡日期。

表 1 攻毒后第一只鸡致死日龄

组别	攻毒鸡数	攻毒后第一只鸡致死日龄	致死鸡数
Thy.MD 免疫组(1)	20	28	2
MD 免疫(2)	20	24	3
攻毒对照(3)	14	17	3
空白对照	0	—	0

2.2 胸腺制剂对鸡 MD 死亡率、发病率与攻毒保护率的影响

表 2 为试验各组死亡率与攻毒保护率。其中第 4 组是空白对照组。攻毒对照组死亡率最高,21.4% 其发病率 85.7%,比免疫对照组的发病率高。加胸腺制剂的试验组死亡率最低,仅 10.0%,其发病率也仅为 60.0%,二者均低于免疫对照组。

表2 攻毒后死亡率、发病率⁽¹⁾与攻毒保护率

组别	初始 鸡数	弱雏 死淘数	攻毒 鸡数	攻毒后 存活鸡数	MD 死 亡数	总死 亡数	MD 阳 性数	MD 致 死率	MD 阳 性率	发病 率	MD 保 护率
1	22	2	20	18	2	4	10	10.0	50.0	60.0	40.0
2	22	2	20	17	3	5	14	15.0	70.0	85.0	15.0
3	21	7	14	11	3	10	9	21.4	64.3	85.7	14.3
4	12	2	10	10	0	2	0.0	0.0	0.0	0.0	—

⁽¹⁾发病率 =MD致死率+MD阳性率

2.3 胸腺制剂对外周血 T 细胞数量的影响

表3 各时期外周血液 ANAE+ 细胞数变化 (/100)

组别	11 日龄	28 日龄	56 日龄
1	36.80±5.493(n=10)	64.6±13.583(n=10)	63.4±16.935(n=5)
2	35.4±10.834(n=10)	56.6±13.858(n=10)	46.6±7.3(n=5)
3	25.143±9.191(n=7)	36.6±18.676(n=5)	34.2±13.274(n=5)
4	—	32.8±10.035(n=5)	45.0±8.124(n=5)

由表 3 可见,免疫后攻毒前(11 日龄)试验组的 ANAE+ 细胞数比未免疫组的数量多,但加胸腺制剂的试验组与免疫对照组无明显差异。由于尚未攻毒,也未注射疫苗,因而第 3,4 组条件一样,只采第 4 组作为对照组。由对照组可知,攻毒两周后(28 日龄)T 细胞随年龄增长而自然增多。而攻毒后鸡只 ANAE+ 细胞亦有所增加;但加胸腺制剂的试验组比免疫组升高快。攻毒 6 周后(56 日龄)加胸腺制剂的试验组持续在较高水平,免疫对照组则略有降低。攻毒对照组基本不变。总的来说,攻毒后免疫组的 ANAE+ 细胞数量较高,未免疫组 ANAE+ 不多,相对显示免疫抑制状态。

3 讨论与结论

3.1 胸腺制剂对雏鸡的免疫增强作用

1966 年发现胸腺具有免疫功能,以后大量研究表明胸腺因子、胸腺素等能提高畜禽机体的免疫反应,增强淋巴细胞分化过程,快速诱导分化抗原在淋巴细胞表面上表达(区大卫,1988),而 MD 免疫是以细胞免疫为主,因此,本试验用胸腺提取液皮下注射 1 日龄雏鸡,研究其对 MD 的免疫增强作用。结果发现,13 日龄免疫雏鸡感染 vMDV24 日龄开始死亡,而加了胸腺制剂的试验组则推迟到 28 日龄开始死亡,并且死亡率明显低于免疫对照。我们曾在接种马立克疫苗的同时,注入胸腺提取物,于小鸡 15 日龄时用 BJMDV-1 攻毒,其保护率比试验对照组有明显提高,与本试验结果一致(另文发表)。表明胸腺制剂对雏鸡具有明显的免疫增强效果,其结果优于单独应用 MD 疫苗,是提高鸡马力克氏病免疫能力的比较理想的免疫剂。胸腺制剂制作工艺简单,成本低廉,使用方便,对动物无过敏及诱变反应(Nikolai,1991),值得应用和推广。

3.2 胸腺制剂对鸡外周血液 T 淋巴细胞数量的影响

禽类的淋巴结发育不良,其 T 淋巴细胞来自胸腺。T 淋巴细胞的功能是通过生物活性分子,如巨噬细胞移动抑制因子和淋巴细胞毒素而表现出细胞免疫现象,在肿瘤免疫上认为 T 淋巴细胞占有重要作用。酸性- α -醋酸奈酯酶 (ANAE) 染色法是一种简便易行的 T 淋巴细胞组织化学标记法。ANAE 阳性细胞代表静止、成熟的 T 淋巴细胞。本试验应用该法对血液中 T 淋巴细胞的标记结果显示,免疫鸡外周血液中淋巴细胞数比未免疫组的明显增多;用强毒攻击后,免疫鸡呈现良好的免疫保护,其 T 淋巴细胞水平较高。加了胸腺制剂的试验组 T 淋巴细胞活性明显高于免疫对照组。未免疫对照组鸡绝大部分发病,部分死亡,其血液 T 细胞活性明显低于免疫组。表明胸腺制剂能有效地促进 T 淋巴细胞的诱导,协同免疫刺激作用。Murthy 等 (1992) 也认为胸腺肽可提高外周血 T 淋巴细胞百分率。

刘忠贵等 (1995) 报道了雏鸡感染 vMDV 后外周血细胞免疫及体液免疫功能显著降低或呈现抑制,认为是全身免疫功能降低的重要标志,Ariel(1988) 也作过类似的报道。Witter 等 (1980) 用不同的 MD 毒株攻击鸡只后,发现感染鸡只会出现免疫抑制。本试验也发现感染鸡外周血液的 ANAE 阳性细胞数量明显减少。血液中 T 细胞数量减少与免疫器官相应细胞数量减少及其迁移入血液减少密切相关。而感染鸡免疫器官的免疫功能降低,不仅与细胞因子的免疫调节障碍相关,而且是 MD 引起免疫抑制的重要机制和 MD 发病学的重要基础。我们希望能在今后的研究中阐明 MD 的发病学和免疫防治。

3.3 攻毒剂量对保护率的影响

据任文陟等 (1991) 报道,用 BJMDV-1 毒株 10^{-2} 稀释后仅用 0.2 mL 攻毒 7 日龄 HVT 免疫鸡,保护率为 72.2%。本试验免疫对照组保护率较低,仅 15.0%,略高于攻毒对照组 14.3%,我们认为这是由于攻毒量过大,致使疫苗保护效果不理想。而加了胸腺制剂能减轻这种不良影响。

参 考 文 献

区大卫. 1988. 胸腺激素与肿瘤免疫. 国外医学——免疫学, 7(1):23~29
任文陟, 朱维正. 1991. 马立克氏病病毒的分离和鉴定. 兽医大学学报, 11(1):262~265
刘玉斌, 苟仕金. 1989. 动物免疫学实验技术. 长春: 吉林科学技术出版社, 321
刘忠贵, 高 荣, 李庆章. 1995. 鸡免疫抑制机理的研究. 中国畜禽传染病, (1): 19~23
张凌志, 李福生, 薛文志, 等. 1985. 应用酯酶标记染色法检查鸡血液 T 淋巴细胞. 家畜传染病, 1:37~39
Ariel L, Rivas J F. 1988. Indications of immunodepression in chickens infected with virious strains of Marek's Disease virus. Avian Dis, 32: 1~8
Murthy K K, Ragland W L. 1992. Effect of thymic extract on blastogenic esponses of chickens. Poultry Sci, 71(2): 311 ~ 315
Nikolai P. 1991. Thymus extract enhances vaccination effectiveness. Poultry International, (7): 30~34
Simon M S. 1992. New Marek's vaccine offers improved protection. World poultry, 8(6): 91~95
Witter R L, Sharman J M, Fadly A M. 1980. Pathogenicity of variant Marek's Disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. Avian Dis, 24: 210~232
Witter R L. 1993. Current over view of Marek's disease. Poultry Digest, 52(1): 40~41

STUDIES ON THE THYMUS EXTRACT AS AN IMMUNOLOGIC ENHANCER AGAINST MAREK'S DISEASE IN CHICKEN

He Jie Bi Yingzuo Cao Yongchang

(Dept. of Anim. Sci., South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Day-old SPF leghorn chicks were divided into four groups and raised separately in isolators. Group 1 chicks were inoculated s.c. with 0.2 mL MD vaccine and 0.5 mL thymus extract in the neck; group 2 chicks were inoculated with 0.2 mL MD vaccine (immunized control) only; group 3 and 4 chicks were not injected with any vaccine or other substance. Group 1 to 3 birds were challenged with the virulent BJMDV-1 strain on day 13. Death occurred on day 17 and 24 post-infection for groups 3 and 2 birds respectively. For the groups that received thymus extract, death occurred on 28 days P.I.. No death occurred in group 4. Group 1 showed 40% protection rate against MDV whereas the protection rate in group 2 was only 15.0%. In addition, the group that received immunenhancement had higher T lymphocyte level in the peripheral blood than group 2. Results of this experiment indicated that the thymus extract had the potential for improving immunization against MD.

Key words immunoenhancer; thymus extract; MD vaccine immunization