



罗六龙, 马春全, 梁梓森. 3 种高致病性猪蓝耳病疫苗对仔猪免疫器官的损伤作用[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(4): 76-79.

3 种高致病性猪蓝耳病疫苗对 仔猪免疫器官的损伤作用

罗六龙^{1,2}, 马春全², 梁梓森¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 佛山科学技术学院, 广东 佛山 528231)

摘要:【目的】研究 3 种高致病性猪蓝耳病 (PRRS) 疫苗 (MLV、TJM92、JXA-1R) 对仔猪免疫器官的损伤作用。【方法】选取 50 头初生健康仔猪, 分为 4 组进行免疫: 未免疫空白对照组 (CK 组)、MLV 疫苗免疫组 (A 组)、TJM92 疫苗免疫组 (B 组)、JXA-1R 疫苗免疫组 (C 组)。病理剖检后, 制作石蜡切片, 通过优化的酯酶染色 (α -ANE 染色)、甲基绿-派洛宁染色 (MG-P) 方法统计各免疫器官的酯酶阳性 T 淋巴细胞和浆细胞 (效应 B 淋巴细胞) 比率变化。【结果】各免疫组的免疫器官酯酶阳性 T 淋巴细胞和浆细胞所占百分比与对照组存在显著或极显著差异。【结论】3 种疫苗对仔猪免疫器官均有不同程度的损伤作用, 具体表现为 JXA-1R 疫苗损伤作用最强, TJM92 疫苗次之, MLV 疫苗最弱。

关键词:猪蓝耳病; 疫苗; 损伤; 酯酶染色; 甲基绿-派洛宁染色; 仔猪; 免疫器官
中图分类号:S853.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)04-0076-04

Injury to immune organs of piglets from three kinds of PRRS vaccine

LUO Liulong^{1,2}, MA Chunquan², LIANG Zisen¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Foshan University, Foshan 528231, China)

Abstract:【Objective】To study the injury to immune organs of piglets from three kinds of PRRS vaccine (MLV, TJM 92 and JXA-1R vaccines). 【Method】Fifty new-born healthy piglets were divided into four groups: non-immunized control group (CK group), MLV vaccine group (A group), TJM 92 vaccine group (B group), JXA-1R vaccine group (C group). Every piglet in the experimental group were vaccinated. Then paraffin sections were prepared after pathological anatomy. Changes in percentages of esterase-positive T cells and plasma cells (effector B cells) of different immune organs were summarized by using optimized esterase (α -NAE) and methyl green-pyronin (MG-P) staining. 【Result】There were significant or highly significant differences in the percentages of esterase-positive T cells and plasma cells of immune organs between each immunized group and CK group. 【Conclusion】Three kinds of vaccine all have injuries to immune organs of piglets. Injury from JXA-1R vaccine is the strongest, followed by TJM92 vaccine and then MLV vaccine.

Key words:porcine reproductive and respiratory syndrome; vaccine; injury; esterase staining; methyl green-pyronin staining; piglet; immune organ

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 俗名蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种接触性和急性高致病性传染病^[1-2]。PRRS 引起妊娠母猪的早产、流产、死胎和木乃伊胎等繁殖障碍, 以及各种年龄猪 (特别是仔猪) 的呼吸系统症状、高死亡率和育成猪呼吸困难、发育迟缓等^[3]。对蓝耳病的防控, 世界各国做法不一, 欧美等国家主要采取生物安全的方法, 我国主要采用疫苗进行防控^[4], 由于蓝耳病毒容易变异, 疫苗种类繁多, 质量良莠不齐, 使得我国蓝耳病防控效果不尽理想, 因此是否使用疫苗、如何选择疫苗进行防控, 专家学者们意见不一。蓝耳病是一种免疫抑制性疾病, 蓝耳病的疫苗是否对免疫器官有损伤作用, 鲜有报道。因此, 开展不同 PRRS 疫苗株对仔猪免疫系统的免疫损伤的研究对于指导 PRRS 的防控及防控中 PRRS 疫苗的选用具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 21 d 断奶的健康保育猪 50 头, PRRSV 抗原及抗体均为阴性, CSFV 及 PRV 抗原阴性 (-), PCV-2 核酸检测阴性, 在华南农业大学标准化试验动物中心饲养。

1.1.2 疫苗及试剂 Ingelvac MycoFLEX®、Ingelvac CircoFLEX® 疫苗、Ingelvac® PRRS MLV、TJM92 疫苗, 硕腾公司生产; JXA-1R 疫苗, 普莱柯公司生产。ANAE 萘乙酸染色液 (酯酶染色)、甲基绿 - 派洛宁染色液、ANAE 萘乙酸 (粉末)、盐酸付玫瑰苯胺 (品红, 粉末) 等, 购自广州鼎国生物科技有限公司。

无水乙醇、无水丙酮、二甲苯 (分析纯)、三氯甲烷、亚硝酸钠 (晶体)、中性树胶、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾等, 购自佛山安洋化玻有限公司。

1.1.3 试验仪器 LEICA® RM-2016 生物切片机、KD-BM 生物组织包埋机, 徕卡显微系统 (上海) 有限公司生产; KD-T 生物组织摊烤片机, 金华科迪仪器有限公司生产; DK-8D 恒温水浴锅, 上海一恒科技有限公司生产; 恒温干燥箱, 广州博造机械设备有限公司生产; 美的电冰箱, 合肥美的荣事达电器有限公司生产; 显微镜、研究及荧光倒置显微系统、CX-31 显微成像装置, Olympus (中国) 有限公司生产; 电子分析天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 试验动物分组及免疫攻毒 选取 50 头新生健康仔猪, 1 ~ 2 日龄疫苗滴鼻, 14 日龄注射 Ingelvac MycoFLEX® 和 Ingelvac CircoFLEX® 疫苗。21 日龄断奶后, 分组运送至华南农业大学试验动物中心, 饲养至 24 日龄。

50 头健康仔猪分为 4 组。未免疫空白对照组 (CK 组): 生理盐水肌肉注射, 每头 2 mL, 共 5 头; MLV 疫苗免疫组 (A 组): 15 头, 每头 MLV 疫苗肌肉注射 2 mL; TJM92 疫苗免疫组 (B 组): 15 头, 每头 TJM92 疫苗肌肉注射 2 mL; JXA-1R 疫苗免疫组 (C 组): 15 头, 每头 JXA-1R 疫苗肌肉注射 2 mL。

饲养至 24 日龄进行疫苗免疫, 免疫 14 d 后剖杀部分猪。

1.2.2 病理剖检及标本采集 接种疫苗后 14 d, 即 38 日龄, 剖杀部分猪。解剖后采集脾脏、淋巴结、扁桃体等免疫器官的组织样本。

1.2.3 病料组织处理 蒸馏水洗净组织块上的血渍, 用 100 mL · L⁻¹ 的甲醛溶液固定组织, 置于标本瓶中保存, 储藏于干燥、室温环境中, 处理 24 h 后, 制作石蜡切片, 室温下保存备用。

1.2.4 病料染色及镜检 通过优化方法筛选出的最适条件 (酯酶染色: 脾、淋巴结和扁桃体的酯酶染色最适条件不尽相同——脾采用丙酮脱蜡, 而淋巴结和扁桃体则适用乙醇脱蜡, 三者都无需固定; 均使用自配孵育液孵育, 时间分别为 1、1 和 2 h; 均使用甲基绿作为复染液, 时间分别为 10、5 和 10 min。甲基绿 - 派洛宁染色的最适条件: 脾、淋巴结和扁桃体均为丙酮脱蜡 + 染色 80 min + 分化脱水), 对采集的脾脏、扁桃体和淋巴结等组织分别进行酯酶染色和甲基绿 - 派洛宁染色。制作石蜡切片, 镜检: 脾选取动脉周围淋巴鞘和小梁周围各 2 个视野, 统计酯酶阳性 T 淋巴细胞数量, 取平均值, 试验组与对照组比对; 选取脾小体 2 个视野, 统计效应 B 淋巴细胞 (浆细胞) 数量, 取平均值, 试验组与对照组比对; 淋巴结选取淋巴小结生发中心 2 个视野, 统计 B 淋巴细胞数量, 选取胸腺依赖区 2 个视野, 统计酯酶阳性 T 淋巴细胞数量, 均计算平均值, 试验组和对照组比对; 扁桃体取 2 个视野, 统计酯酶阳性 T 细胞、效应 B 淋巴细胞数量, 各取平均值, 试验组和对照组比对。综合各器官数据, 评价免疫器官免疫后损伤情况。

酯酶染色后应为胞核染成红棕色或暗红色, 胞质为绿色, 而阳性 T 淋巴细胞胞浆内有界限清晰的

红棕色(橘红色)颗粒,颗粒的形态、数目、大小均不一。甲基绿-派洛宁染色后应为阳性浆细胞(效应B细胞)胞核绿色或蓝绿色,胞质为红色或红紫色。

2 结果与分析

2.1 剖检病变

接种疫苗后 14 d,即 38 日龄,剖杀部分猪,发现对照组胸腔、腹腔内有大量黄色积液和纤维性渗出物,呈现多发性浆液纤维素性胸膜炎和腹膜炎,肺脏大面积充血水肿,腹股沟淋巴结和肺门淋巴结明显肿大。部分病死猪肾脏肿大,呈褐色或土黄色,质地较脆,有淤血现象,脾脏肿大、质脆;膀胱内尿液浑浊呈茶色;个别猪有消化道病变,主要表现为胃黏膜大面积充血、出血。

2.2 试验猪免疫器官酯酶及甲基绿-派洛宁染色结果

将统计的免疫后试验组(A、B、C组)和对照组(CK组)脾脏、淋巴结及扁桃体的酯酶阳性T淋巴细胞和浆细胞的数量百分比数据代入统计学分析软件SPSS20.0 for Windows中的相关分析公式中,试验组之间不做比较,而各试验组与对照组两两比较,分析结果如图1、图2所示。

从图1可以看出,免疫后B组、C组脾动脉周围淋巴鞘的酯酶阳性T淋巴细胞数量比与CK组存在极显著差异,A组差异不显著;免疫后A、B、C组脾小梁的酯酶阳性T淋巴细胞数量比与CK组均存在极显著差异;免疫后,A组淋巴结胸腺依赖区的酯酶阳性T淋巴细胞数量比与CK组存在显著差异,B、C组与CK组存在极显著差异;免疫后B组扁桃体的酯酶阳性T淋巴细胞数量比与CK组存在显著差异,A、C组与CK组存在极显著差异。

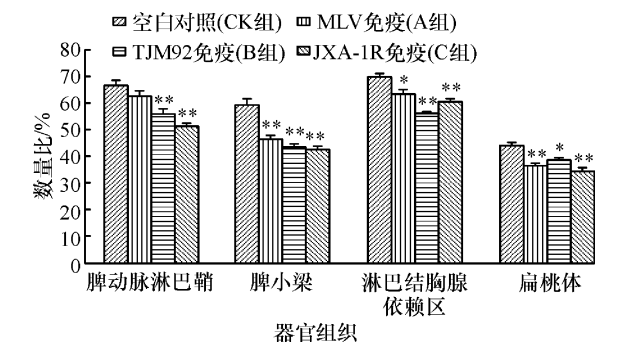


图1 免疫后各免疫器官组织的酯酶阳性T淋巴细胞数量比
Fig.1 Percentages of esterase positive T-cells in different immune organs after immunization

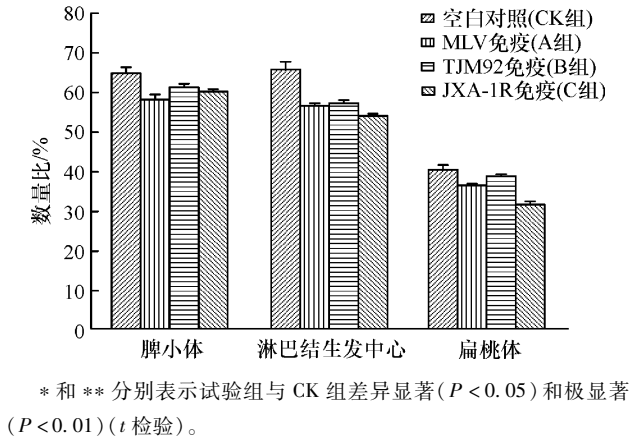


图2 免疫后各免疫器官组织的浆细胞数量比
Fig.2 Percentages of plasma cells in different immune organs after immunization

从图2可以看出,A组脾小体浆细胞数量比与CK组差异显著,B组与CK组差异不显著,C组与CK组差异极显著;A、B、C组淋巴结生发中心浆细胞数量比与CK组均存在极显著差异;A组扁桃体浆细胞数量比与CK组存在显著差异,C组扁桃体浆细胞数量比与CK组存在极显著差异,B组与CK组差异不显著。

图1、图2表明,脾的损伤C组>B组>A组;淋巴的损伤B组>C组>A组;扁桃体的损伤C组>A组>B组。综合来看,JXA-1R疫苗的损伤作用最强,TJM92疫苗次之,MLV疫苗最弱。

3 讨论与结论

李华等^[5]采用流式细胞仪,对淋巴组织的细胞进行了分析;聂立欣等^[6]通过酯酶染色和甲基绿-派洛宁染色统计分析了T、B淋巴细胞的变化;本研究得到的数据与李华、聂立欣等的结果基本相符。王建等^[7]、胡守萍等^[8]通过分子生物学方法研究了PRRSV变异株(JXA1-R)弱毒疫苗、经典PRRSV(VR2332)弱毒疫苗、变异株(JXA1)灭活疫苗对仔猪肺和免疫器官的保护作用(疫苗效价),弱毒苗的保护作用之间差异不显著,而灭活苗保护效果不佳。然而,不论是何种疫苗,关于疫苗本身对仔猪免疫器官有无损伤及损伤程度却鲜有研究报道。本研究通过对仔猪脾、淋巴结、扁桃体组织样品做酯酶染色及甲基绿-派洛宁染色,得出酯酶阳性T淋巴细胞的变化,结合脾、淋巴结、扁桃体肉眼观察病变和剖检大体病变,以及试验组和对照组的比较,证实PRRS弱毒疫苗对免疫器官有一定的损伤作用。Morgan等^[9]研究表明,组织病理变化严重程度与PRRSV感染细胞的数量呈正相关,佐证了本文的研究。

目前,PRRS没有可供治疗的特效药物,已有的

疫苗效果也不尽理想。加之流行病毒毒株的不断变异,以及混合感染、继发感染、交叉感染的频繁发生,使得PRRS的防控面临着更大的挑战。人们一开始关注的是,PRRS对繁殖功能以及呼吸道产生的影响,如今,人们将更多的目光投向PRRS的免疫抑制作用上。本研究用的弱毒疫苗分别是经典株(MLV疫苗,A组)、天津变异株(TJM92疫苗,B组)、江西变异株(JXA-1R疫苗,C组),C组攻毒后的淋巴细胞变化与王建等^[7]的试验结果相吻合。邓博文等^[10]通过流行病学调查等认为,PRRS防治不能只采取特异性免疫,应当因地制宜开展综合性措施。疫苗的作用与当地的病毒株型、饲养环境、传染病史等密切相关^[11],所以本研究得到的数据能为疫苗的选用提供依据,而具体的防控措施以及应对PRRS的办法还需继续探究。

本研究在对猪繁殖与呼吸综合征疫苗免疫后及强毒攻击后猪的临床表现、裸眼观察病理变化和剖检病理变化的基础上,通过 α -NAE染色法以及甲基绿-派洛宁染色法系统地分析与评价了疫苗对仔猪免疫器官的损伤作用。利用病理变化、阳性T淋巴细胞,效应B淋巴细胞的变化及其和对照组的差异性情况分析评价了PRRS疫苗本身对机体免疫器官(脾、淋巴、扁桃体等)的损伤作用,证实了疫苗本身对仔猪免疫器官有不同程度的损伤作用。不足之处在于,本研究选用的疫苗均为弱毒苗,无法和其他种类疫苗进行比较。试验结果表明,疫苗本身对免疫器官和肺的损伤作用可成为今后疫苗研制和猪场疫苗选用的重要依据指标,国内外的各种疫苗都可以做这方面研究,研究的方法和思路都有待拓宽,得出综合全面的数据。

参考文献:

[1] 宣长和,马春全,陈志宝,等. 猪病学[M]. 3版. 北

京: 中国农业大学出版社, 2010: 146-170.

[2] ZIMMERMAN J J, KARRIKER L A, RAMIRES A, 等. 猪病学[M]. 赵德明, 张仲秋, 周向梅, 等, 译. 10版, 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 477-504.

[3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 613-628.

[4] LIU Y, SHI W, ZHOU E, et al. Dynamic changes in inflammatory cytokines in pigs infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(9): 1439-1445.

[5] 李华, 杨汉春, 张晓梅, 等. 猪血液和淋巴组织中淋巴细胞亚群表型分布[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(1): 37-40.

[6] 聂立欣, 孔小明, 于博, 等. 广东省PCV-2感染的病理组织学观察[J]. 内蒙古农业大学学报, 2005, 27(S2): 13.

[7] 王建, 齐新永, 李凯航, 等. 三种猪繁殖与呼吸综合征疫苗免疫效果评价[J]. 动物医学进展, 2012, 33(4): 107-113.

[8] 胡守萍, 张卓, 蔡雪辉, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒弱毒疫苗和变异株灭活疫苗的免疫效果评价[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(5): 392-396.

[9] MORGAN S B, 吴艳. 接种3株不同致病性的1型猪繁殖与呼吸综合征病毒分离株后猪肺脏和淋巴组织的病理学观察及病毒分布研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(12): 6.

[10] 邓博文, 黎江. PRRS引起猪免疫抑制的作用机理及其防制[J]. 畜禽业, 2007(1): 62-63.

[11] HOLTkamp D J, POLSON D D, TORREMORELL M, et al. Terminology for classifying the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) status of swine herds[J]. Tierärztl Prax Ausg G, Grosstiere Nutztiere, 2011, 39(2): 101-112.

【责任编辑 李晓卉】