

鸡对传染性囊病疫苗免疫应答的 病理形态学研究

宋廷华 陈玉汉

(华南农业大学兽医系, 510642, 广州)

摘要 本研究除采用巨检和病理组织学常规染色外,并应用组织化学和扫描电镜等检测手段,比较细致地观察了IBD免疫过程中所出现的一系列形态学变化,加深了对本病的认识。研究结果阐明,在鸡群可能受IBDV野毒威胁的情况下,宜选用中强毒力的IBD疫苗。受损的法氏囊组织要得到再生的两个基本条件是:1,淋巴滤泡受损后尚残存部分淋巴组织;2,囊组织再生必须在法氏囊发生生理性萎缩之前。

关键词 鸡;传染性囊病;疫苗;酸性 α 醋酸萘酯酶;扫描电镜观察

中图分类号 S852.31

鸡传染性囊病(Infectious bursal disease, IBD)是由传染性囊病病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)引起的一种急性接触性传染病。自本病发现后,国内外一些作者对本病的病理形态学进行了研究,但在病理组织学方面,检查方法比较单一,应用扫描电镜也不多。免疫是控制本病的主要方法,但生产实践表明有些疫苗的免疫保护率不高,就疫苗本身来分析,鸡的免疫器官(主要指法氏囊)对IBD疫苗能产生不同的效应,而IBD疫苗对法氏囊的影响与其免疫性之间有一定关系,国外不少学者对这一现象进行了研究(Edwards et al, 1982; Muskett et al, 1979; Reece et al, 1982; Thornton et al, 1975; Winterfield et al, 1978; Yadin et al, 1980),国内目前还缺乏这方面的研究报道。

本文作者根据广州地区当前的养鸡生产实际情况,选用具有代表性IBD疫苗,按此地区现行的免疫程序给鸡免疫,然后采用病理组织学方法、扫描电镜检查接种疫苗后不同时期机体免疫器官以及其它一些组织的形态学变化,据此对所选用的疫苗进行比较分析,从理论上阐明免疫器官形态学改变的本质,并为生产实践合理使用疫苗提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 健康1日龄海兰(Hy-Line)雏鸡30只,由广州市力康公司提供,未接种任何疫苗。

1.1.2 疫苗 疫苗A,由美国 Delaware Sterwin 实验公司生产, Bursa-Vac™, 中强毒型;疫苗B,由北京市农林畜牧兽医研究所生产,中毒型。

1993-03-09收稿

1.2 方法

试验鸡饲养至10日龄,随机分成3组,每组10只。14日龄时,用生理盐水稀释疫苗A、B,第1组(A)口服疫苗A 0.2 mL/只,第2组(B)口服疫苗B 0.2 mL/只,并依同样方法在24日龄时进行第2次免疫,这两组鸡在同一个动物房内饲养;第3组鸡不接种疫苗作为对照,与疫苗组远距离隔开饲养。于第2次免疫后13天(37日龄时)和28天(52日龄时)每组随机取样4只。

1.2.1 法氏囊:体重指数(B:BW-指数) 按 Lucio 和 Hitcher(1979)的方法,称取采样鸡的体重和法氏囊重,求出每组的法氏囊:体重指数。

1.2.2 石蜡切片的制作和观察 切取法氏囊、胸腺、脾、盲肠扁桃腺、腺胃、肝、肾、肺等组织块,分别以10%中性甲醛液和10%甲醛钙液固定。

经10%中性甲醛液固定的组织,按常规方法制备石蜡切片,H. E. 染色,并用改良的 Gomori 氏氢氧化银氨液浸染法(凌启波,1989)对组织中的胶原纤维和网状纤维染色;用爱先蓝-高碘酸-无色品红法(凌启波,1989)显示组织中的粘液;用 Macchiavello 氏改良亚甲蓝碱性品红法(卡林 C. F. A. 1982)显示组织中的包涵体。

参照 Yadin 等(1980)和 Rosales 等(1989)所描述的标准,将法氏囊(H. E.)的组织损伤程度分为1~4级。

经10%甲醛钙固定的组织采用酸性乙酸- α -萘酯-六偶氮对品红法(凌启波,1989),显示组织中的酸性 α 醋酸萘酯酶(Acid- α -naphthyl acetate esterase, ANAE)。酶活性部位呈红棕至深棕色,根据其着色范围不同区分出3型不同细胞:M型 ANAE⁺细胞、颗粒型 ANAE⁺细胞、ANAE⁻细胞。

1.2.3 电镜样品的制备和观察 每次采样每组随机取2只鸡的法氏囊组织,分别用戊二醛和锇酸固定,脱水后进行干燥和表面导电处理,最后用 JSM-25S 扫描电镜观察和照相,加速电压15 kV。

1.2.4 标准检验 用 Duncan 多范围检验方法检验各试验组与对照组 B:BW-指数的差异显著性。

2 结果

2.1 法氏囊:体重指数

结果见表1。

表1 两次采样各组的 B:BW-指数¹⁾和法氏囊的组织损伤程度

组别	B:BW-指数平均值 ²⁾		法氏囊的组织损伤程度	
	37日龄	52日龄	37日龄	52日龄
A	0.46 ^b	0.63 ^b	3.1	2.2
B ³⁾	0.95 ^a	0.30 ^c	1.0	3.4
对照	1.00 ^a	1.00 ^a	1.0	1.0

1) B:BW-指数=(免疫鸡的法氏囊:体重比)/(对照组法氏囊:体重比平均值)

2) 带有不同小写字母的 B:BW-指数示差异显著, $P < 0.05$ 。

3) B组在39,40日龄时有3只试验鸡发病(发病率50%),其中2只死亡(死亡率33.3%),经病理检查证实3例病鸡发生IBD。

2.2 病理组织学检查

2.2.1 苏木素-伊红(H.E)染色 除法氏囊外,试验组的胸腺、脾、盲肠扁桃体、肾脏、腺胃、肝、肺等组织与对照组比较,均无明显改变。法氏囊的病理组织学损伤程度见表1。

2.2.2 酸性 α 醋酸萘酯酶(ANAE)染色 试验组鸡的脾脏、胸腺、盲肠扁桃体等组织与在对照组所见的基本相似,试验组发生显著改变的是法氏囊。37日龄时,A组鸡的法氏囊淋巴滤泡中的M型ANAE⁺细胞相对增多,颗粒型ANAE⁺细胞和ANAE⁻细胞均见减少,“空泡”ANAE染色呈阳性(图版1);52日龄时,恢复较好的法氏囊(75%)淋巴滤泡内M型ANAE⁺细胞、“空泡”数量较37日龄时明显减少,颗粒型ANAE⁺细胞和ANAE⁻细胞增生。B组鸡的法氏囊组织形态在37日龄时与对照组相似,但在52日龄时,囊淋巴滤泡内的“空泡”ANAE染色也显阳性,M型ANAE⁺细胞相对增多,颗粒型ANAE⁺细胞、ANAE⁻细胞显著减少,其中ANAE⁻细胞减少尤其明显,有些滤泡中的ANAE⁻细胞则几乎消失。

2.2.3 法氏囊内胶原纤维和网状纤维变化 经氢氧化银氨液浸染法染色,网状纤维呈黑色,胶原纤维为黄色。囊组织受损时,网状纤维和胶原纤维也出现相应变化。A组鸡在37日龄时,淋巴滤泡皮质区网状纤维支架遭到破坏,滤泡间质网状纤维增生,并见多量胶原纤维增生(图版2~4);52日龄时,恢复较好的法氏囊中,网状纤维和胶原纤维均少见,而恢复较差的法氏囊(25%)内则多见。B组鸡在52日龄时,法氏囊淋巴滤泡的网状纤维支架受到破坏,间质内网状纤维和胶原纤维呈现增生。

2.2.4 法氏囊组织粘液物质的产生 经爱先蓝-高碘酸-无色品红法染色,酸性粘液呈蓝色。对照组法氏囊粘膜上皮层很少见有酸性粘液,而A、B两组鸡的法氏囊在受到损伤的情况下,其增生的粘膜上皮在局部可见酸性粘液。

2.2.5 Macchiavello氏改良亚甲蓝碱性品红法 以此法染色法氏囊等组织,试验组和对照组均为阴性,未见包涵体或其类似结构。

2.3 法氏囊粘膜表面扫描电镜观察

扫描电镜显示囊粘膜上皮由两种细胞构成:一种是附着滤泡上皮(follicle-associated epithelium,FAE),另一种是滤泡间表面上皮(interfollicular surface epithelium,ISE),FAE和ISE之间有明显的凹沟(图版5)。37日龄时A组鸡法氏囊粘膜FAE多见不同程度的下陷,部分FAE甚至陷入间质中,有的FAE表面覆有破碎的细胞残骸,ISE也形成深浅不一的凹陷(图版6);52日龄时,A组鸡的囊粘膜表面接近正常(图版7)。B组鸡在37日龄时,其法氏囊粘膜表面与对照组相似,52日龄时,局部囊粘膜上皮脱落,裸露出下面的淋巴组织,有些滤泡由于淋巴细胞大量消失而出现空洞(图版8)。

3 讨论与结论

3.1 B:BW-指数与法氏囊组织损伤程度动态变化的分析

B:BW-指数和法氏囊的组织学损伤程度是分析和评价IBD疫苗的两个重要参数(Lucio et al,1979;Thorntonetal,1989)。疫苗A和B对试验鸡的B:BW-指数与法氏囊组织形态的影响不同。疫苗A所引起的损伤是暂时性的,这一结果与Edwards(1982)的发现基本一致。受损的淋巴滤泡能够再生恢复,我们认为与以下两个因素有关:(1)淋巴滤泡受损后尚残存部分淋巴组织,这是再生的生物学基础,如果淋巴滤泡完全被摧毁,则这种再

基本一致。受损的淋巴滤泡能够再生恢复,我们认为与以下两个因素有关:(1)淋巴滤泡受损后尚残存部分淋巴组织,这是再生的生物学基础,如果淋巴滤泡完全被摧毁,则这种再生将不可能发生;(2)囊组织的再生必须在法氏囊发生生理性萎缩之前。

B组鸡在第1次采样后发生IBD,这提示由环境中的IBDV野毒感染引起。然而,与B组同舍饲养的A组鸡则未受影响,A组鸡显然也会遭到IBDV野毒的侵袭。这说明疫苗B的免疫效果不好,而疫苗A则能保护鸡不发病。

37日龄时B组的B:BW-指数与对照组极为接近,同时法氏囊的组织形态与对照组一样无异常变化,据此推断,尽管经过2次免疫,疫苗B对鸡免疫器官刺激仍然很弱。Winterfield等(1978)和Naqi等(1980)发现毒力较强的疫苗能刺激机体产生持久而较高水平的抗体,毒力弱的疫苗刺激机体产生的抗体水平低;Yadin等(1980)进一步认为IBD疫苗的免疫应答水平与疫苗对法氏囊的影响(B:BW-指数和组织损伤程度)存在相关性。因此,疫苗B毒力较弱可能是造成其免疫效果不佳的一个重要因素。试验表明,在鸡群可能受到IBDV野毒威胁的情况下,宜选用中强毒力的IBD疫苗给鸡群免疫。

3.2 关于法氏囊的病理组织学特点

法氏囊组织在H.E.染色条件下,滤泡中见有“空泡”,文献中有描述,但未能准确地阐明其性质。本试验证实,在感染IBDV野毒以及接种疫苗A的鸡法氏囊淋巴滤泡内均存在这类“空泡”。鉴于具有吞噬功能的单核-巨噬细胞ANAE染色呈阳性(Muller et al, 1975),我们认为“空泡”来自单核-巨噬细胞,并提示淋巴滤泡中存在吞噬现象。单核-巨噬细胞对遭受IBDV感染而变性坏死的淋巴细胞不断吞噬处理,自身体积随之增大。T淋巴细胞ANAE染色虽然也呈阳性,但T细胞无吞噬功能,因而可以排除“空泡”来自T细胞的可能性。ANAE染色呈强阳性的“空泡”说明其吞噬作用比较活跃,反之则表明其吞噬作用下降。

法氏囊受损时,间质内胶原纤维和网状纤维发生一系列病理性改变,值得注意的是,对照组法氏囊滤泡间质没有胶原纤维存在。

3.3 关于法氏囊粘膜表面变化的特点

法氏囊组织发生损伤时,在扫描电镜下,其粘膜表面也出现相应改变。37日龄时A组鸡法氏囊FAE下陷,是由于此时淋巴组织受到破坏,FAE下面的滤泡萎缩引起的,52日龄时,大部分滤泡修复较好,相应的法氏囊FAE排列也趋整齐,这与病理组织学观察结果一致。B组鸡在试验结束时,法氏囊粘膜上皮坏死脱落,这可能是粘膜上皮也受IBDV野毒的感染(Naqi et al, 1979)。

本试验结果还表明:疫苗A、B对胸腺、脾、盲肠扁桃体、腺胃等组织均无明显形态学影响,或即便有轻微损伤也被迅速修复。

参 考 文 献

- 卡林 C. F. A. 著. 1982. 组织病理学和细胞化学技术手册. 孔庆雷译. 北京: 科技出版社, 407
- 凌启波. 1989. 实用病理特殊染色和组织化学技术. 广州: 广东高等教育出版社, 13~18; 194~197; 214~216
- Edwards K R, Muskett J C, Thornton D H. 1982. Duration of immunosuppression caused by a vaccine strain of infectious bursal disease virus. *Research in Vet Sci*, 32: 79~83

- Lucio B, Hitchner S B. 1979. Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. *Avian Dis*, 23: 466~478
- Muller J, Brun del Re G, Buerki H, et al. 1975. Nonspecific acid esterase activity; a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur J Immunol*, 5: 270~274
- Muskett J C, Hopkin J G, Edwards K R, et al. 1979. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains; Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet Rec*, 104: 332~334
- Naqi S A, Millar D L. 1979. Morphologic changes in the bursa of Fabricius of chickens after inoculation with infectious bursal disease virus. *Am J Vet Res*, 40: 1134~1139
- Naqi S A, Millar D L, Grumbles L C. 1980. An evaluation of three commercially available infectious bursal disease vaccines. *Avian Dis*, 24: 233~241
- Reece R L, Gould J A, Hindmarsh M. 1982. Studies on a vaccine against infectious bursal disease. *Aust Vet J*, 59: 27~29
- Rosales A G, Villegas P, Lukert P D. et al. 1989. Isolation, identification, and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 33: 35~41
- Thornton D H, Pattison M. 1975. Comparison of vaccines against infectious bursal disease. *J. Comp Path*, 85(4): 597~610
- Winterfield R W, Thaker H L. 1978. Immune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease virus applied as vaccines. *Avian Dis*, 22: 721~731
- Yadin H, Hoekstra J, Oei H L et al. 1980. Investigation on live vaccines against infectious bursal disease of chicks. *The Veterinary Quarterly*, 2: 48~57

THE PATHOMORPHOLOGICAL STUDY ON IMMUNE RESPONSE CAUSED BY INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD) VACCINES

Song Yanhua Chen Yuhan

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., 510642, Guangzhou)

Abstract In addition to macroscopic inspection and conventional staining, histochemical technology and scanning electron microscopy were used to observe sequential morphologic changes in the IBD immune process and further our knowledge of IBD. The results showed that IBD vaccines of medium virulence should preferably be selected for use in areas where IBD was prevalent. Whether the damaged bursa would be repaired depended on the following two factors: portion of lymphoid tissue remaining after damage to the bursal lymphfolliculi, and whether or not the regeneration of the bursa occurred before bursa involution.

Key words Chicken; Infectious bursal disease; Vaccine; Acid- α -naphthyl acetate esterase; Scanning electron microscopy observation

