

禽呼肠孤病毒感染对鸡法氏囊及免疫应答的影响

王 蕾^{1,2} 崔治中^{1*} 孙爱军¹ 孙淑红¹

(¹ 山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

(² 齐鲁动物保健品有限公司 济南 250100)

摘 要 研究 LY 株禽呼肠孤病毒(ARV)感染 1 日龄 SPF 鸡后对法氏囊发育影响,对传染性法氏囊病毒(IBDV)、禽流感病毒(AIV)、新城疫病毒(NDV)疫苗免疫诱发的抗体的影响,及对强毒株 IBDV 致病作用的影响。结果表明,LY 株 ARV 感染 1 日龄 SPF 鸡可引起法氏囊萎缩和部分淋巴细胞减少,但对增重及 AIV 和 NDV 疫苗免疫后抗体滴度却没有显著影响。ARV 感染可降低弱毒 IBDV 疫苗免疫后的抗体反应,但对随后 IBDV 强毒株攻毒的抵抗力却与对照鸡无显著差异。经 IBDV 弱毒疫苗免疫后,再接种强毒株 IBDV 不会引起死亡,但却仍能显著抑制对 AIV、NDV 疫苗免疫后的抗体滴度。然而,对于 1~7 日龄经 ARV 感染的鸡,IBDV 强毒的这种免疫抑制作用又显著低于未经 ARV 感染的对照鸡。

关键词: 呼肠孤病毒; 传染性法氏囊病毒; 法氏囊; 抗体反应

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2007)03-0492-06

禽呼肠孤病毒(Avian reovirus, ARV)属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)正呼肠孤病毒属(Orthoreovirus)的成员之一,是 10 节段的双链 RAN 病毒^[1]。1954 年,ARV 首先从患病鸡的消化道和呼吸道中分离到,随后从患关节炎的病鸡中分离到^[2]。ARV 可引起多种疾病,常见的有病毒性关节炎/腱鞘炎、吸收障碍综合征、免疫抑制等^[3~9],同时 ARV 可以增加其他疾病的易感性和致病性^[10,11]。ARV 在世界范围内广泛存在,流行于鸡、火鸡、鸭和其他禽类。国内自王锡坤(1985)首次证实我国存在本病以来^[12],相继分离到多株 ARV。现在国内各鸡场中本病的感染已经相当普遍^[13]。

ARV 血清型众多,致病性各异^[5,7,14],但对免疫抑制方面的报道不多。为对 ARV 在免疫抑制方面的作用有进一步的了解,我们进行了 ARV LY 株对鸡法氏囊及免疫应答的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒: 鸡呼肠孤病毒 LY 株,2004 年从山东临沂某种鸡场分离,患病鸡有明显的关节炎症状。病毒从患关节炎病鸡的关节囊中分离。所用病毒已经无限稀释法 3 次纯化。

1.1.2 试验鸡: 1 日龄京白 SPF 鸡 259 只,购自济南 SPAFAS 公司。饲养在 SPF 动物房带过滤空气的隔离罩中。SPF 鸡胚购自济南 SPAFAS 公司,由本实验室孵化。

1.1.3 免疫用疫苗: IBDV 中等毒力活疫苗(B87 株,批号:0510042),齐鲁动物保健品有限公司生产;NDV 灭活疫苗(批号:049218),因特威生产;AIV 灭活疫苗(H5、H9 亚型,批号分别为 0506002,0506001),齐鲁动物保健品有限公司生产。NDV、AIV 灭活抗原由齐鲁动物保健品有限公司提供。

1.1.4 试剂和仪器: 测抗 IBDV 抗体试剂盒购自 IDEXX 公司;RT-PCR 反应试剂盒,TRIzol RNA 抽提试剂盒,凝胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司;连接试剂盒,氨苄青霉素、低分子量蛋白 Marker 为美国 Promega 公司产品;限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 购自上海生工生物工程有限公司;其它试剂均为分析纯试剂;ARV(S1133 株)单因子血清由中国农业大学赵继助教授惠赠。

1.1.5 引物设计: 参照 GenBank 中 ARV S1133 株的 S1 基因序列(序列号 AF330703),利用 Primer 设计一对引物,用于扩增 LY 株 ARV 的 σ C 基因。引物由上海 Sangon 公司合成,序列为: F: 5'-CAAGAATTTCGGTCTCAATCCATCGCAG-3', R: 5'-TTAGTCGACTTAGGT

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30330450)

* 通讯作者。Tel 86-538-8241560; Fax 86-538-8241419; E-mail: zczui@sdau.edu.cn

作者简介: 王 蕾(1967-),女,山东海阳人,高级工程师,在读博士生,主要从事禽病和分子病毒学研究。E-mail: jily6385@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-19; 接受日期: 2006-10-20; 修回日期: 2006-11-04

GTCGATGCCCGTA-3'.

1.2 病毒的分离和培养

1.2.1 病料处理 取病鸡的关节囊内液体及组织,用剪刀剪碎,加入少量 PBS 研磨,将研磨液 12000r/min 离心 10min。取上清,用 0.22 μ m 的滤膜过滤,无菌收取滤过液,备用。

1.2.2 病毒培养 用 9~10 日龄 SPF 鸡胚制备鸡胚成纤维细胞(CEF),生长液为含 5% 小牛血清的 M199 培养基,维持液含 1% 小牛血清的 M199 培养基。细胞长成单层后,换维持液,将 1.2.1 中的无菌滤液加入到细胞上,连续传代。待细胞出现 60%~80% 病变时,将病毒液冻融 3 次,12000r/min 离心 5min,取上清,-20℃ 保存。

1.2.3 病毒纯化 在 96 孔细胞培养板上制备 CEF 单层。将 10 倍系列稀释的毒液分别接种到 CEF 上,每个稀释度接种 8 个孔,不接毒的 8 个孔用于对照。37℃、2% CO₂ 培养箱培养 7d,对照孔细胞形态应良好。取最高稀释度病变孔,收取上清,即为第一次纯化病毒。按照上述方法将病毒连续纯化 3 次,所得到的纯化病毒,用抗 ARV(S1133 株)单因子血清作间接免疫荧光试验(IFA)为阳性。同时用 RT-PCR 试剂盒扩增 LY 株 ARV 中的基因片断,经对扩增出的目的基因克隆、测序,表明纯化的病毒为禽呼肠孤病毒。

1.2.4 病毒定量 将病毒 10 倍系列稀释。用 96 孔细胞培养板制备 CEF 单层,将 10 倍系列稀释的毒液分别接种到 CEF 上,每个稀释度接种 8 个孔,不接毒细胞 8 个孔作为阴性对照。37℃ 下 2% CO₂ 培养箱培养 7d,对照孔细胞形态应良好。记录所有的阳性病变孔,用 Reed-Muench 法计算毒液的 TCID₅₀。

1.3 ARV 感染对鸡法氏囊的影响

12 只 1 日龄 SPF 鸡,对照组 5 只,试验组 7 只。试验组经皮下注射感染 LY 株 ARV,10⁶TCID₅₀/只,对照组仅注射同量的磷酸盐缓冲液(PBS)。30 日龄时将所有鸡称体重,剖杀取法氏囊称重,计算法氏囊指数(BBWR)(法氏囊指数=法氏囊重/体重×100)。然后将法氏囊用 10% 的福尔马林固定,按标准操作方法在山东农业大学动物科技学院病理实验室作组织切片,H&E 染色,对病变计分。计分标准如下:0 为正常(淋巴滤泡发育良好,皮、髓质分界明显,淋巴细胞密集);1 分为轻度病变(淋巴滤泡发育不良,皮、髓质分界清);2 分为中度病变(皮、髓质淋巴滤泡减少,皮、髓质分界不清);3 分为严重病变(滤泡缺失严重,核浓缩或崩解,皮质不明显)。为了保证制定的客观性和可靠性,选取正常滤泡及表现不同

程度萎缩的淋巴滤泡照相后,作为判定其它样品或滤泡的参照标准。

1.4 ARV 感染对 NDV 和 AIV 疫苗诱发抗体反应的影响

1 日龄 SPF 鸡 40 只鸡,20 只经皮下注射感染 LY 株 ARV,10⁶TCID₅₀/只,对照组 20 只,经皮下注射 PBS 0.1mL/只。7 日龄时,对两组鸡均免疫 NDV、AIV(H9、H5 亚型)灭活油乳剂疫苗。经皮下注射 AIV(H5、H9 亚型)灭活疫苗各 0.2mL/只鸡,经肌肉注射 NDV 疫苗 0.3mL/只鸡。免疫后 3、4、5 周时采血,分离血清,用血凝抑制法(HI)测抗 NDV、AIV 抗体^[16],比较试验组与对照组之间的差异。

1.5 ARV 感染对 IBDV 疫苗诱发抗体反应的影响

1 日龄 SPF 鸡 90 只,共分为 3 组。第 1 组于 1 日龄时经皮下注射感染 ARV,10⁶TCID₅₀/只;第 2 组于 7 日龄时经皮下注射感染 ARV,10⁶TCID₅₀/只;第 3 组为对照组,1、7 日龄时经皮下注射 PBS 0.1mL/只。所有鸡在 8 日龄时经饮水免疫 IBDV 弱毒疫苗。在鸡 30 日龄时对所有鸡称重并对所有鸡静脉采血,分离血清,用间接 ELISA 法测抗 IBDV 抗体试剂盒按照盒内说明书操作,比较各组之间的差异。

1.6 ARV 感染对 IBDV 强毒致病作用的影响

试验共 87 只鸡,分为 3 组,1 组 29 只鸡,1 日龄时经皮下注射感染 LY 株 ARV,10⁶TCID₅₀/只;2 组 27 只鸡,7 日龄时经皮下注射感染 ARV,10⁶TCID₅₀/只;3 组 31 只鸡作为对照组。30 日龄时对所有鸡经点眼、滴鼻感染野毒株 IBDV(JL 株,尿囊液毒 1:20 稀释)0.3mL/只鸡。攻毒后观察各组鸡精神状态,记录 7d 内死亡数,若死亡,解剖死亡鸡,观察病理变化,比较 BBWR。

1.7 ARV 感染对 IBDV 强毒诱发的免疫抑制作用的影响

本试验共 120 只鸡,分为 4 组。第 1 组 32 只鸡,1 日龄时经皮下注射感染 ARV,10⁶TCID₅₀/只;30 日龄时经点眼、滴鼻攻 IBDV 野毒株(JL 株,尿囊液毒 1:20 稀释,0.3mL/只);第 2 组 32 只鸡,7 日龄时经皮下注射感染 ARV,10⁶TCID₅₀/只;30 日龄时经点眼、滴鼻攻 IBDV 野毒株 JL 株;第 3 组 34 只鸡不感染 ARV,30 日龄时经点眼、滴鼻攻击野毒株 IBDV;第 4 组 22 只鸡作为空白对照。所有鸡在 8 日龄时经饮水免疫 IBDV 弱毒疫苗。30 日龄时对所有鸡免疫 NDV、AIV(H9、H5 亚型)灭活疫苗,肌肉注射 AIV(H5、H9 亚型)疫苗各 0.2mL/只鸡;皮下注射 NDV 疫苗 0.3mL/只鸡。攻 IBDV 强毒后观察各组鸡精神状

态,记录攻毒后 7d 内死亡数,若有死亡,解剖死亡鸡,观察病理变化。免疫后 3 周时采血,分离血清,用血凝抑制法(HI)测抗 NDV、AIV-H9 及 AIV-H5 抗体^[16]。

2 结果

2.1 ARV 对鸡法氏囊的影响

1 日龄感染 LY 株 ARV 对鸡体重无显著影响(表 1)。30 日龄时解剖发现 ARV 感染组鸡法氏囊萎缩明显,BBWR 平均值为 0.353,对照组 BBWR 为 0.579,两组相比差异极显著($P \leq 0.01$)(表 1)。

表 1 1 日龄 SPF 鸡感染 ARV 对法氏囊的致病作用

Table 1 Pathogenesis of the bursa in SPF chickens infected with ARV at age of 1 day						
Group	Body Weight/g	Mean of B. W. \pm SD	Bursa weight/g	BBWR ^A	Mean of BBWR \pm SD	Lesion Scores ^B
ARV-infected	171.0	200.7 \pm 25.6	0.89	0.5210	0.353 \pm 0.095 *	2
	179.0		0.47	0.263		3
	210.0		0.54	0.257		3
	240.2		0.73	0.304		3
	177.0		0.69	0.390		1
	210.0		0.92	0.414		1
Control	217.8	197.9 \pm 18.2	0.71	0.326	0.578 \pm 0.060	2
	178.0		0.97	0.545		0
	205.6		1.26	0.613		0
	220.0		1.43	0.650		0
	180.0		0.89	0.494		0
	205.6		1.21	0.589		0

^A BBWR=(the bursa wight/the body weight) \times 100, SD = standard deviations. The lesion scores were judged by comparing to A, B, C, D in Fig.1. * Value followed by asterisks is significantly different from control chickens($P < 0.01$).

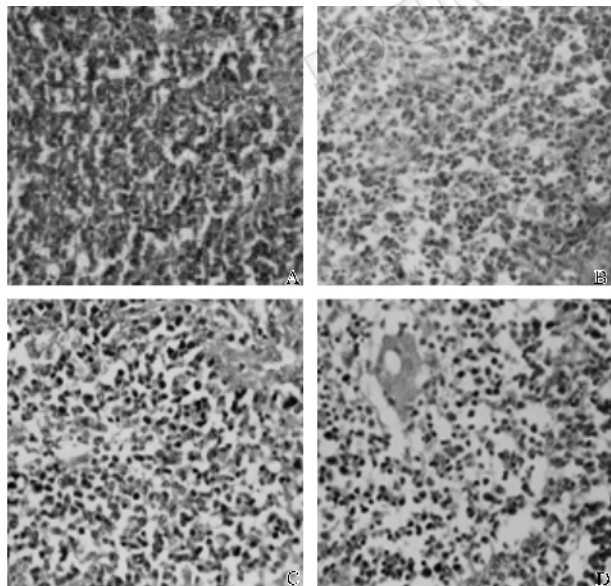


图 1 感染 ARV 鸡及未感染鸡法氏囊组织切片(400 \times)
Fig.1 Histological sections of the bursa (H. E. stained \times 400 \times). A: Normal bursa from an uninfected chicken, scored as 0; B: Bursa from a chicken infected with ARV, lymphocyte number was slightly decreased, scored as 1; C: Bursa from a chicken infected with ARV, scored as 2; D: Bursa from chicken infected with ARV, lymphocyte number was decreased apparently, scored as 3.

经对法氏囊组织切片可以看出,1 日龄感染 LY 株 ARV 的鸡在 30 日龄时其法氏囊部分滤泡骨髓质淋巴细胞发育不良、缺失,皮、髓质分界不明显,部分淋巴细胞坏死,核浓缩或崩解,网状内皮细胞增生;而对照鸡的法氏囊淋巴滤泡发育良好,皮、髓质分界明显,淋巴细胞密集,在判定其他个体的法氏囊样品发育状态时,均以此为参照。图 1 分别显示正常的淋巴滤泡(A)和代表不同程度萎缩的淋巴滤泡 B、C、D。

2.2 ARV 感染对 NDV 和 AIV 疫苗诱发抗体反应的影响

ARV 感染对 NDV 疫苗、AIV 疫苗免疫应答的影响结果见表 2。结果表明,与对照鸡相比,1 日龄感染 ARV 的鸡,在 1 周龄时经 NDV 和 AIV 疫苗免疫后,其抗体滴度均有一定程度的降低,但这种差异只是一过性的,如免疫后 4W 时抗 NDV 的 HI 滴度及 6W 时抗 AIV-H9 的 HI 抗体滴度($P < 0.05$)。在整个 4~6W 的观察期间,这种差异不明显($P > 0.05$)。

表 2 1 日龄 ARV 感染对 NDV 疫苗、AIV 疫苗免疫后抗体滴度的影响

Antibody to		Groups	Mean titers \pm SD at different weeks after vaccination(Log ₂)		
			3W	4W ^A	6W ^A
AIV-H9	ARV		8.94 \pm 1.25 (n = 17)	10.00 \pm 1.41 (n = 16)	9.44 \pm 1.09 * (n = 16)
	PBS		9.29 \pm 1.12 (n = 20)	10.53 \pm 1.26 (n = 19)	10.41 \pm 1.44 (n = 19)
AIV-H5	ARV		9.29 \pm 1.05 (n = 17)	10.94 \pm 1.34 (n = 16)	11.09 \pm 1.90 (n = 19)
	PBS		9.09 \pm 1.15 (n = 20)	11.05 \pm 1.27 (n = 19)	10.93 \pm 1.53 (n = 16)
NDV	ARV		5.71 \pm 1.72 (n = 17)	6.88 \pm 1.71 * (n = 16)	6.86 \pm 1.08 (n = 19)
	PBS		6.09 \pm 0.85 (n = 20)	7.76 \pm 0.97 (n = 19)	7.00 \pm 1.41 (n = 16)

^A Values followed by asterisks is significantly different from control chickens($P < 0.05$). SD = standard deviations. Birds were inoculated with or without ARV at age of 1 day and vaccinated at age of 1W with inactivated vaccines against NDV, H5- and H9-AIV.

2.2.1 ARV 感染对 IBDV 疫苗诱发抗体反应的影响:分别在 1 日龄或 7 日龄感染 ARV 后,再在 8 日龄经口服免疫 IBDV 弱毒苗,ARV 感染鸡仍能产生明显的 IBDV 抗体反应,但是均比对照组低。其中 1

表 3 ARV 感染对 IBDV 疫苗免疫后抗体应答的影响

Table 3 Influence of ARV-infection on antibody titers to IBDV after vaccination with B87					
Group	Inoculated age in days	Virus	Sample size	Body weight/g (Mean \pm SD)	Antibody titers to IBDV (Mean \pm SD)
1	1	ARV	29	252.2 \pm 28.5	2303 \pm 1310 ^A
	7	no			
2	1	no	26	262.8 \pm 36.3	2884 \pm 1479 ^{AB}
	7	ARV			
control	1	no	35	253.1 \pm 25.7	3288 \pm 1451 ^{BC}
	7	no			

^A Value followed by different characters completely is significantly different($P < 0.01$) and followed by either same characters is not significantly different($P > 0.05$). Birds were inoculated with or without ARV at age of 1 day or 7 days and vaccinated at age of 1w with IBD live vaccine B87 strain orally.

日龄感染 ARV 组 , 在 30 日龄时 IBDV 的抗体滴度为 2303.7 , 日龄感染 ARV 组对 IBDV 的抗体滴度为 2884 , 而对照组为 3288。经统计表明 , 1 日龄感染 ARV 组的抗体滴度与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$) , 7 日龄感染组抗体滴度虽然低于对照组 , 但统计表明差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

2.2.2 ARV 感染对 IBDV 强毒致病作用的影响 : 未经 LY 株 ARV 感染的对照组鸡用 IBDV 强毒攻毒后死亡率为 12.9%。1 日龄、7 日龄分别感染 ARV 再攻 IBDV 强毒后死亡率分别为 6.9%、7.4%。ARV 感染鸡死亡率低于对照组 , 但统计学差异不显著。有趣的是 , 解剖死亡鸡发现 , 未感染 ARV 鸡在接种野毒株 IBDV 后 , 鸡法氏囊肿胀严重 , 呈紫葡萄样 , 肝脏肿胀、出血 , 胸肌出血严重 , 法氏囊指数明显高于 ARV 感染组 (表 4)。而感染 ARV 后再攻 IBDV 强毒的鸡仅可见肝脏、胸肌轻微出血 , 法氏囊外观未见有出血等明显病变。而且未感染 ARV 鸡仅接种 IBDV 强毒株死亡鸡均为体壮者 , 死亡鸡平均体重为 $258.3 \pm 40.27\text{g}$, 感染 ARV 后再接种 IBDV 强毒株的死亡鸡均为体弱者 , 平均体重为 $192.6 \pm 23.2\text{g}$, 显著低于前者。

表 5 ARV 感染与未感染鸡后 IBDV 强毒感染对 NDV 和 AIV 疫苗诱发抗体的抑制作用的比较

Table 5 Comparison of immunosuppressive effects of v-IBDV challenge on antibody responses to NDV and AIV vaccines between chickens infected with and without ARV at age of 1 day

Group		ARV infection at age(days)	IBDV(B97) vaccination at age/days	Field IBDV challenge age/ days	Antibody HI titers(Mean \pm SD)4w PV *		
					AIV-H9	AIV-H5	NDV
ARV-infected	1	1	8	30	7.30 \pm 1.02 ^A (n = 29)	6.35 \pm 1.70 ^A (n = 29)	8.91 \pm 1.60 ^A (n = 29)
	2	7	8	30	7.56 \pm 1.75 ^A (n = 28)	6.06 \pm 1.98 ^A (n = 28)	7.94 \pm 1.65 ^A (n = 28)
Control	3	None	8	30	6.52 \pm 1.20 ^B (n = 32)	4.61 \pm 1.41 ^B (n = 32)	7.22 \pm 1.68 ^B (n = 32)
	4	None	8	None	10.0 \pm 1.42 ^C (n = 20)	8.65 \pm 1.31 ^C (n = 20)	10.65 \pm 0.88 ^C (n = 20)

Values followed by different letter is significantly different from each other ($P < 0.05$). Birds were inoculated with or without ARV at age of 1 day or 7 days , vaccinated at age of 8 days with IBD live vaccine B87 strain , challenged with v-IBDV at age of 30 days and then vaccinated with inactivated vaccines at the same time . HI titers were measured 4W after vaccinations .

3 讨论

鸡呼肠孤病毒(ARV)的致病性多种多样性 , 不同分离株的致病性程度差异比较大。有报道表明 , 80% 以上的 ARV 分离株不具有致病性 , 因此对分离到的 ARV 必需一一测试其对鸡的致病性。本实验室从国内不同地区分离到 10 株 ARV , 其中 8 株来自患关节炎的鸡 , 两株来自生长不良的鸡。经前期所有毒株的致病性试验发现 , 这些毒株均属温和型 , 在对 SPF 鸡体重、对 NDV 及 AIV 抗体水平等均无显著影响 , 因此我们选用来自关节炎鸡的 LY 株作为代

表 4 ARV 感染对 IBDV 强毒致病作用的影响

Table 4 Influence of ARV-infection on pathogenicity of IBDV

Group	Infected with ARV	Inoculated at age(days)	Challenged with vIBDV at the age of 30 days	
			No. dead/total(%)	BBWR of dead
1	+	1	2/29(6.9%)	0.272 \pm 0.028(n = 2)
2	+	7	2/27(7.4%)	0.271 \pm 0.012(n = 2)
3	-	no	4/31(12.9%)	0.514 \pm 0.135(n = 4)

2.2.3 ARV 感染对 IBDV 强毒诱发的免疫抑制作用的影响 : 试验表明 , 用 IBDV 弱毒疫苗 B87 株免疫后 , 虽可预防 IBDV 强毒攻毒引起的死亡 , 但仍不能预防由其造成的免疫抑制。如表 5 所示 , 接种 IBDV 强毒的试验 1 组、试验 2 组及 3 组的鸡抗 NDV、AIV-H9、AIV-H5 抗体水平均明显低于对照组 , 且差异极显著 ($P < 0.01$)。然而出乎意料的是 , 感染 LY 株 ARV 后再攻击 IBDV 强毒的试验 1 组、2 组鸡的抗 NDV、AIV-H9、AIV-H5 抗体水平却明显高于未感染 ARV 仅接种 IBDV 强毒组 , 除 2 组的抗 NDV 抗体差异不显著外 , 其它组的抗 NDV、AIV-H9、AIV-H5 均差异显著 ($P < 0.05$) (表 5)。这似乎表明 , ARV 感染造成的法氏囊萎缩可减缓强毒 IBDV 的致病作用。

表株进行了进一步的研究工作。

Montgomery 等^[4]报道 , 某些 ARV 毒株感染 1 日龄 SPF 鸡可以引起鸡法氏囊的萎缩或一过性发育不良。在本试验中 , 1 日龄感染 ARV(LY 株) , 至 30 日龄时引起鸡法氏囊组织中淋巴细胞明显发育不良、法氏囊萎缩 (图 1 , 表 1) , 说明 LY 株 ARV 感染对鸡法氏囊有明显致病作用。

Montgomery 等研究显示某些 ARV 株不会干扰 NDV 抗体反应 , 但 ARV S1133 株可以显著干扰 NDV 抗体 (HI) 滴度^[4]。从本研究中可以看出 , LY 株 ARV 感染后 AIV-H9、NDV 疫苗诱发的抗体水平呈现一

过性减低(表2),但整体趋势来看没有显著影响。本试验室前期试验表明国内分离的其他7株ARV对AIV-H5、ARV-H9、NDV抗体均未表现出明显的抑制现象(未发表资料)。显然,不同的ARV分离株对AIV和NDV疫苗免疫反应的影响也是各不相同的。

1日龄感染ARV,可以显著减低IBDV疫苗诱发的抗体反应(表3),7日龄感染ARV组对IBDV疫苗诱发的抗体反应影响不明显。说明ARV对IBDV抗体反应的影响与ARV感染的日龄有关。这与Rosenberger等^[4,5]报道的ARV的致病性与感染日龄有关的报道相一致。尽管如此,ARV感染却并不显著影响IBDV疫苗免疫后对强毒株IBDV攻击后的保护作用。

Giambrone^[16]的研究结果显示,IBDV强毒感染28日龄SPF鸡可显著抑制NDV疫苗诱发的抗体反应。本研究又进一步显示,IBDV弱毒疫苗接种后,虽然有效地保护了鸡免于由强毒攻击引起的死亡,但强毒IBDV攻毒仍能造成免疫抑制,特别是抑制NDV和AIV灭活疫苗的HI抗体反应。然而在本试验中,与其它病毒共感染的结果不同,早期感染LY株ARV却没有像预想的那样增强随后IBDV强毒攻毒造成的免疫抑制作用。相反,在1周龄内经LY株ARV感染的鸡,虽然在IBDV弱毒疫苗免疫后对IBDV的抗体水平较低,但在用IBDV强毒攻毒后,未经ARV感染的鸡(表5试验组3)对NDV和AIV的HI抗体滴度不仅极显著低于对照组,也还显著低于ARV早期感染的鸡(表5试验组1和2)。就是说,LY株ARV早期感染减弱了强毒IBDV的免疫抑制作用。对ARV和IBDV这种复杂的相互作用的结果可能的解释是:由于LY株ARV早期感染造成法氏囊及淋巴滤泡部分萎缩,导致疫苗病毒复制量的减少从而降低了IBDV抗体水平(表2),而且也会减弱强毒IBDV在法氏囊的复制量,从而减弱了强毒IBDV对全身的免疫抑制作用。当然这一假设需要今后对法氏囊中的IBDV作病毒定量研究来验证。在我们的动物试验中发现,在未经IBDV疫苗免疫的鸡,早期感染ARV与否并不显著影响强毒IBDV攻毒的死亡率。但未经ARV感染的鸡在用强毒IBDV接种后死亡鸡的法氏囊呈现显著肿大和出血,呈紫葡萄样,而经ARV早期感染再用强毒IBDV攻毒死亡的鸡,其法氏囊均未见明显肿胀和出血。这一现象可部分验证LY株ARV感染造成的法氏囊

萎缩可减弱IBDV强毒在法氏囊中复制水平从而减弱其免疫抑制作用的假设。Ilse Kaufer等报道,IBDV强毒感染经手术摘除法氏囊的鸡时,IBDV的致病作用显著降低,死亡率由感染正常鸡的100%降为0^[17]。Fadly等^[18]也报道通过注射环磷酰胺造成雏鸡法氏囊萎缩可影响IBDV在法氏囊的繁殖,从而减弱了IBDV的致病作用。这些都与我们关于ARV感染诱发的法氏囊萎缩可能减弱强毒IBDV致病作用的假设相一致。

对于ARV的免疫抑制作用,国内未见相关的报道。本研究通过ARV与IBDV间的相互作用,探讨ARV与宿主及其它病毒的间的相互作用机制,对进一步揭示ARV的免疫抑制作用及生产中该病毒的防制,具有实际意义。

参 考 文 献

- [1] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy. VIIIth. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [2] Roberts MD, Wilcox GE, Sc BV. Avian reovirus. *Veterinary Bulletin*, 1986, 56(3): 155-174.
- [3] Fstermer SJ, Rosenberger JK, Margolin A, et al. Clinical evaluation of chickens infected with two Avian reovirus pathotypes. *Avian Dis*, 1989, 33(3): 545-554.
- [4] Montgomery RD, Villegas P, Dawe DL, et al. Effect of Avian reoviruses on lymphoid organ weights and antibody response in chickens. *Avian Dis*, 1985, 29(3): 552-560.
- [5] Rosenberger JK, Sterner FJ, Botts S, et al. Pathogenicity and antigenic relatedness of several Avian reovirus isolates. *Avian Dis*, 1989, 33(3): 535-544.
- [6] Montgomery RD, Villegas P, Kleven SH. Role of route of exposure, age, sex and type of chicken on the pathogenicity of Avian reovirus strain 81-176. *Avian Dis*, 1986, 30(3): 460-467.
- [7] Hieronymous DRK, Villegas P, Kleven SH. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. *Avian Dis*, 1983, 27(1): 246-254.
- [8] Kouwenhoven B, Davelaar FG, VanWalsum J. Infectious proventriculitis causing runting in broilers. *Avian Pathol*, 1978, 7(1): 183-187.
- [9] Yawei Ni, Maurice CK. A comparative study of Avian reovirus pathogenicity: Virus spread and replication and induction of lesions. *Avian Dis*, 1995, 39(3): 554-566.
- [10] McNeilly F, Smyth JA, Adair BM, et al. Synergism between chicken Anemia virus reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis*, 1995, 39(3): 532-537.
- [11] Moradian A, Thorsen J, Jullian RJ. Single and combined infections of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus and an intestinal isolate of reovirus. *Avian Dis*, 1990, 34(2): 304-

- [12] 王锡坤,唐秀英,张庆祥,等.应用琼扩试验检查鸡病毒性关节炎.家畜传染病,1985,20(3):26-27.
- [13] 谢明星,李云峰,陈如明,等.鲁豫地区鸡病毒性关节炎血清流行病学调查.中兽医科技,1990,12:15-16.
- [14] Giambrone JJ,Solano W. Serologic comparison of avian reovirus isolates using virus neutralization and an enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis*,1988,32(4):678-680.
- [15] 世界动物卫生组织著.农业部畜牧兽医局译.哺乳动物、禽和蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册.第一版.北京:中国农业科学技术出版社,2002.
- [16] Giambrone JJ. Effects of early infectious bursal disease virus infection on immunity to Newcastle disease in adult chickens. *Poult Sci*,1979,58(4):794-798.
- [17] Kauter I,Weiss E. Significance of bursa of fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infection and Immunity*,1980,27(2):364-367.
- [18] Fadly AM,Winterfield RW,Olander HJ. Role of the bursa of fabricius in the pathogenicity of inclusion body hepatitis and infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*,1975,20(3):467-477.

Influence of avian reovirus infection on the Bursa and immune-reactions in chickens

WANG Lei^{1,2}, CUI Zhi-zhong^{1*}, SUN Ai-jun¹, SUN Shu-hong¹

(¹ College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

(² Qilu Animal Health Products Co., LTD, Jinan 250100, China)

Abstract The influences of avian reovirus (ARV) infection at 1 day of age on bursa development, antibody responses after vaccinations to avian influenza virus (AIV), Newcastle disease virus (NDV) and infectious bursal disease virus (IBDV), and pathogenicity of virulent IBDV (v-IBDV) were studied in chickens of SPF-origin. The results indicated that LY strain ARV infection in 1-day-old chickens caused atrophy of the Bursa and decreased lymphocyte numbers in the bursa, but it gave no significant negative effects on growth rates and antibody titers to AIV and NDV after vaccination. LY strain ARV infection decreased antibody titers to IBDV in B87 vaccinated birds but all vaccinated birds infected with ARV were still full protected from death or clinical syndromes after v-IBDV challenge. Although all B87-vaccinated birds were full protected from death after v-IBDV challenges, the antibody titers to AIV or NDV after vaccinations with inactivated vaccines were significantly lower in v-IBDV challenged birds than controls. Surprisingly, ARV infection at ages of 1~7 days could compromise the immune suppression induced by v-IBDV in B87-vaccinated birds as HI antibody titers to AIV and NDV in ARV-infected groups were significantly higher than chickens with no ARV infection. A discussion was made on the interactions between ARV infection and vaccine IBDV or v-IBDV to explain such sophisticated phenomena in the bird experiments.

Keywords Avian reovirus; Infectious bursal disease virus; Bursa of Fabricius; Antibody titers