



EGGS
PROGRAM

总第23期/2015年10月

SPF鸡同时免疫新城疫、传染性支气管炎和禽偏肺病毒活疫苗后的免疫反应和相互作用

摘要:

我们评估了1日龄无特定病原体（SPF）雏鸡同时接种鸡新城疫病毒（NDV）疫苗、禽偏肺病毒（aMPV）疫苗和传染性支气管炎病毒（IBV）疫苗后三者之间的相互作用。雏鸡被分成八个组:7组接种NDV疫苗, aMPV疫苗和IBV疫苗(单独, 两种或三种), 另一组作为未接种疫苗的对照组。各组之间的NDV血细胞凝集抑制(HI)抗体滴度相似, 但均在保护临界值以上。当与其他活疫苗联合使用时, 通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定的aMPV抗体水平受到了抑制。当(单独或同时)接种NDV、aMPV或IBV疫苗时显示, 与未接种疫苗组相比, 气管中CD4⁺, CD8⁺细胞和IgA生成B细胞的数量显著增加。免疫组之间的差异并不显著。同时接种NDV、aMPV以及IBV活疫苗并不影响aMPV或IBV的保护效果。

1. 概述

鸡新城疫病毒(NDV)、禽偏肺病毒(aMPV)和传染性支气管炎病毒(IBV)是引起鸡呼吸道疾病的重要常见病原体。随着全球范围内活疫苗和灭活疫苗, 包括二者联合的广泛使用, 这些病原体造成的损失明显减少。这3种病毒初期在呼吸道上皮细胞进行复制, 因此如果需要同时应用这3种活疫苗的话, 其诱导保护性免疫的能力可能会下降。之前的体内研究表明, IBV会干扰鸡体内强毒力NDV、NDV活疫苗和aMPV疫苗的复制。Ganapathy 等人(2005)表明, NDV免疫延迟了aMPV活疫苗的复制, 同时降低了体液抗体反应。这些研究是通过血清抗体滴度的测定, 使用ELISA或HI试验显示疫苗同时免疫对雏鸡的影响。已经表明全身性免疫反应与抵抗IBV和aMPV感染的保护能力没有太大关联。通过研究NDV、IBV和aMPV疫苗活病毒, 一些作者认为, 这些病毒的抵抗能力可能是由细胞介导的免疫反应和局部免疫反应引起的, 但在文章中并没有对其进行研究。

据报道, 细胞免疫和局部免疫反应在雏鸡NDV、aMPV和IBV感染中起关键保护作用。已经对单独接种NDV活疫苗或IBV活疫苗后细胞介导免疫的诱导和作用进行了大量的研究。在联合接种疫苗的研究中, Ganapathy等人(2005)报道, 单独免疫NDV或与aMPV同时进行免疫对于雏鸡泪液中的IgA含量没有影响。尽管在雏鸡中进行呼吸道病毒活疫苗联合免疫的方法应用十分广泛,



EGGS PROGRAM

但很少有人了解同时免疫NDV, aMPV或IBV病毒活疫苗后的细胞和局部免疫反应。本研究的目的是评估SPF雏鸡体内NDV、aMPV和IBV病毒活疫苗之间的相互作用。除了体液抗体反应之外,还评估了气管局部免疫反应和细胞介导的免疫反应。此外,还评价了疫苗免疫对于IBV和aMPV强毒株攻毒的保护能力。

2. 材料和方法

2.1 鸡胚和雏鸡

将SPF白来亨鸡受精胚(罗曼动保, Cuxhaven, 德国)在孵化设施中进行孵育(利物浦大学)。根据动物福利指南,将雏鸡放置在单独的隔离和饲养装置内,遵循严格的生物安全措施。自由采食和饮水。

2.2 疫苗

NDV (VG/GA株), aMPV (B亚型), IBV (H120株)活疫苗由梅里亚SAS (法国里昂)惠赠。疫苗按照制造商的说明进行稀释。NDV和aMPV疫苗,每1000羽份溶解于2mL的冷冻无菌水(SW)中,随后使用98mLSW彻底混合。5000羽份IBV疫苗溶解于5mL的SW中,然后吸出1mL与99mL的SW混合。在进行联合免疫时,首先溶解NDV疫苗,然后紧接着是aMPV或IBV疫苗,方法如前所述。随后将二者在100毫升SW中混合。三种疫苗联合接种时,使用上述方法溶解NDV aMPV和IBV疫苗,随后将三者全部稀释在100毫升SW中。

2.3 攻毒毒株

2.3.1 IBV

Massachusetts (M41)株在鸡胚(ECE)中进行繁殖并在气管组织培养物(TOC)中进行滴定。滴度表示为使半数纤毛停滞的病毒剂量(CD₅₀),并使用Reed and Muench方法进行计算(1938)。病毒滴度为10⁵CD₅₀/毫升。

2.3.2 aMPV

如前所述在TOC上进行B亚型aMPV的病毒传代和滴定。如前所述计算纤毛停滞的病毒剂量(CD₅₀)。获得的滴度是10^{4.5}CD₅₀/毫升。

3. 实验设计

320只1日龄小鸡被随机分为8个组,每组包含40只雏鸡,放置在不同的隔离器中。疫苗接种程序包括单独NDV、aMPV、IBV疫苗接种或三种疫苗组合接种(双重或三重)(表1),每只雏鸡通过接种疫苗通过滴鼻(50 μl)点眼(50 μl)途径接种。根据生产商的推荐剂量对每只鸡进行免疫(表1)。疫苗接种后,每天观察雏鸡临床症状。在接种疫苗之前以及接种疫苗后第3、7、14、



EGGS PROGRAM

21、26、35天（dpv）随机采集每组10只雏鸡的口咽拭子（OP），进行逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）分析。血清学方面，接种疫苗之前及免疫后第21和35天每组随机采集8只雏鸡的血液。在21dpv，每组人道处死5只雏鸡，从每只鸡采集气管样品，立即放入含有冰冻切片包埋剂（OCT）的铝箔杯中并在液氮中冷冻（-190° C）。使用免疫组织化学方法检测气管中的CD4+、CD8+和IgA生成B细胞。所有样品储存在-70° C直到处理。在21dpv，每组随机选取10只鸡，转移到一个不同的隔离器中，使用0.1毫升高致病性B亚型aMPV ($10^{3.5} \text{CD}_{50}/\text{只}$) 进行滴鼻点眼攻毒。通过相同途径对每组另外10只鸡进行高致病性IBV M41株攻毒，剂量为0.1毫升 ($10^4 \text{CD}_{50}/\text{只鸡}$)。剩下的每组15只鸡不进行攻毒。

表1

SPF鸡单独或同时（两种或三种）免疫NDV，aMPV和IBV活疫苗的试验设计

组别	疫苗免疫种类	滴鼻点眼途径免疫剂量
1	NDV	$5.5 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{只}$
2	aMPV	$2.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{只}$
3	IBV	$5.0 \log_{10} \text{EID}_{50}/\text{只}$
4	NDV+aMPV	同上
5	NDV+IBV	同上
6	aMPV+IBV	同上
7	NDV+aMPV+IBV	同上
8	未免疫对照组	灭菌水

3.1 通过RT-PCR检测疫苗病毒

将每组在同一天采集的拭子作为一个样本，共同浸泡于包含的guanidium异硫氰酸酯（溶液D）的1.5毫升离心管中。使用胍盐硫氰酸盐-苯酚氯仿法提取RNA。如前所述进行NDV，aMPV和IBV的RT-PCR。

3.2 血清学

通过血细胞凝集抑制试验（HI）检测NDV抗体。通过商品化酶联免疫吸附检测（ELISA）试剂盒检测aMPV和IBV血清抗体。

3.3 气管切片中细胞介导免疫反应的免疫组织化学分析

如前所述，使用间接免疫组织化学染色对CD4+、CD8 +或IgA生成免疫B细胞进行计数，并对方法进行了一定的修改。简



EGGS PROGRAM

单地说, 使用低温恒温器将气管样本切成5 μm 厚的切片, 固定于聚赖氨酸包被的载玻片上。将切片在冰冷的丙酮中浸泡10分钟, 在室温下风干。

PBS稀释的0.03%过氧化氢(H_2O_2)孵育切片20分钟, 并用PBS洗涤三次。马血清孵育20分钟后, 将组织切片用1:1000, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 特异性单克隆抗体(Mabs) [鼠抗鸡CD4(克隆CT-4); 1:2000, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鼠抗CD8 α (克隆CT-8); 1:1000, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鼠抗鸡IgA(克隆A-1)]孵育。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。切片在孵育一抗之后, 用PBS洗涤并孵育二抗(抗鼠IgG)30分钟。PBS洗涤三次后, 切片用1%抗生物素蛋白DH和1%亲和辣根过氧化物酶(ABC试剂)孵育。通过加入含有2%过氧化氢和2%的缓冲液的4% 3, 3'-二氨基(DAB)基质显色。在使用超纯水进一步洗涤后, 使用苏木精负染1分钟。最后, 将切片脱水, 滴加固定介质, 覆盖盖玻片。在5个随机选择的显微镜视野内(400 \times 放大)进行CD4 $^{+}$ 、CD8 $^{+}$ 和IgA生成B细胞计数。每个400 \times 显微镜视野内阳性细胞的平均数量计为该样品中的该种细胞的数量。

3.4 aMPV攻毒保护效果评估

进行aMPV攻毒后, 每天观察雏鸡临床表现并进行记录直到攻毒后第13天。对每组的每只雏鸡都进行个体检查; 对鼻孔后方的喙轻轻挤压来检查是否存在鼻腔分泌物, 临床症状打分如前所述(琼斯等人, 1992); 没有临床症状=0, 清澈鼻腔分泌物=1, 浑浊的鼻腔分泌物=2, 泡沫状眼睛和/或眶下窦肿胀, 同时存在鼻腔分泌物=3。基于每天观察鸡的总数的平均分计算每组得分。

3.5 IBV攻毒保护效果评估

IBV M41株攻毒后, 每天都观察所有雏鸡因IBV感染造成的临床症状。在5dpc, 对雏鸡人道处死进行剖检, 并如前所述进行气管纤毛停滞试验确定保护水平(库克等, 1999)。纤毛活动评分如下: 所有纤毛均活动=0, 超过75%纤毛活动=1, 超过50%纤毛活动=2, 超过25%纤毛活动=3, 没有纤毛活动(100%纤毛停滞)=4。纤毛运动的百分比越低(因此得分越高), 疫苗接种提供的保护水平越低

3.6 统计分析

使用方差分析(ANOVA)来统计分析血清学反应, 细胞介导免疫反应(CMI)和aMPV临床症状的数据, 随后进行Tukey's检验。 $P \leq 0.05$ 被认为差异显著。所有分析都使用GraphPad Prism软件6.0.1进行。

4 结果

4.1 临床症状

所有免疫组均未观察到任何临床症状。



EGGS PROGRAM

4.2 通过RT-PCR检测疫苗病毒

接种疫苗之前, 在所有组采集的拭子中均没有检测到病毒。免疫后第3天仅在单独免疫和双重免疫NDV组检测到NDV病毒, 在7dpv之后可以在三重疫苗接种组检测到NDV (表2)。在7dpv后可以从单独免疫aMPV组检测到病毒的存在, 14dpv后可以从共同免疫NDV和aMPV疫苗的鸡只中检测到aMPV。相比之下, 在aMPV与IBV共同免疫组和三者共同免疫组中可以检测到aMPV的持续时间更长(21dpv)。在所有IBV免疫组中, 在实验的最后仍能检测到IBV病毒的存在。

表2

SPF鸡免疫NDV, aMPV和IBV活疫苗后的RT-PCR检测结果

疫苗			免疫后天数					
NDV	aMPV	IBV	3	7	14	21	26	35
+			N	-	-	-	-	-
	+		M	M	-	-	-	-
		+	B	B	B	B	B	B
+	+		NM	-M	-M	-	-	-
+		+	NB	-B	-B	-B	-B	-B
	+	+	MB	-B	-B	MB	-B	-B
+	+	+	NMB	NMB	-B	-MB	-B	-B
未免疫对照组			-	-	-	-	-	-

+, 疫苗免疫组; -, 阴性; N, NDV疫苗阳性; M, aMPV疫苗阳性; B, IBV疫苗阳性。

4.3 NDV HI抗体检测

未接种NDV疫苗的免疫组的HI滴度始终低于检测水平。单独或者联合免疫NDV的雏鸡的抗体滴度要明显高于未免疫NDV疫苗的雏鸡 (图1)。NDV疫苗免疫组之间的HI抗体滴度水平没有明显差异。



EGGS PROGRAM

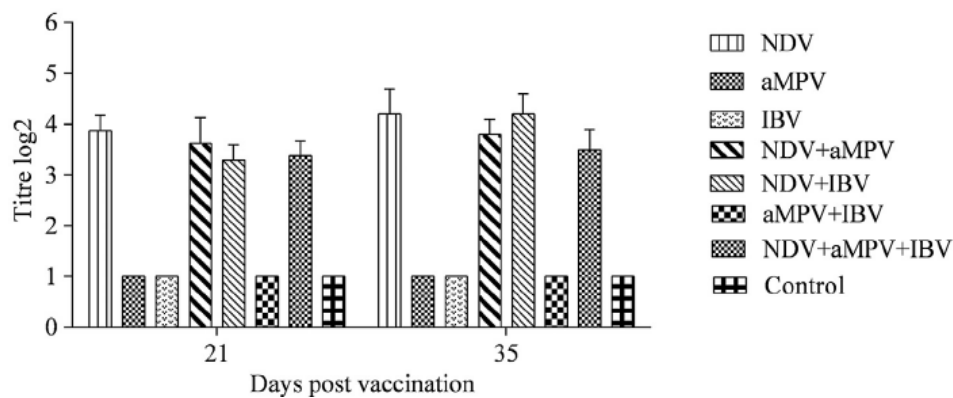


图1 单独接种 NDV 疫苗或与其他疫苗联合接种组鸡只的 NDVHI 抗体滴度。没有标注字母表明接种组之间无显著差异。竖线代表平均值的标准差 (n = 8)。

4.4 aMPV抗体ELISA检测

接种疫苗之前,或从未接种aMPV组采集的血清中没有检测到aMPV抗体。21dpv时,与联合接种NDV和/或IBV疫苗的免疫组相比,单独接种aMPV疫苗的免疫组明显表现出更高水平的抗体滴度(图2)。35dpv时,单独免疫aMPV的鸡只的抗体滴度仍高于双重或三重疫苗接种鸡只(图2)。

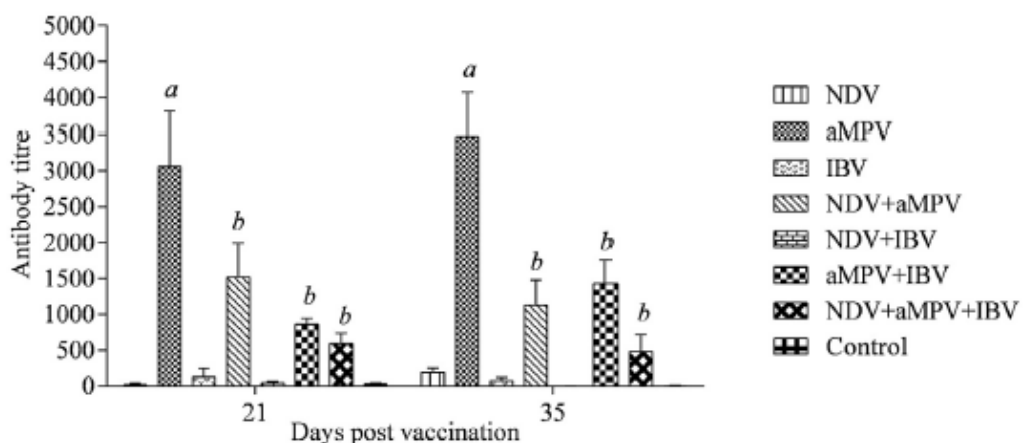


图2 单独接种 aMPV 疫苗或与 NDV 和/或 IBV 疫苗联合接种组鸡只的 aMPV ELISA 抗体滴度。上标字母不同表示抗体反应存在显著差异。竖线代表平均值的标准差 (n = 8)。

4.5 IBV抗体ELISA检测

接种疫苗之前,或从未接种IBV组采集的血清中没有检测到IBV抗体。21dpv时,单独接种H120疫苗的免疫组与联合接种其他疫苗的免疫组均表现出高水平的IBV抗体滴度(图3)。然而,接种H120疫苗的免疫组之间未观察到显著的IBV抗体滴度差异。



EGGS PROGRAM

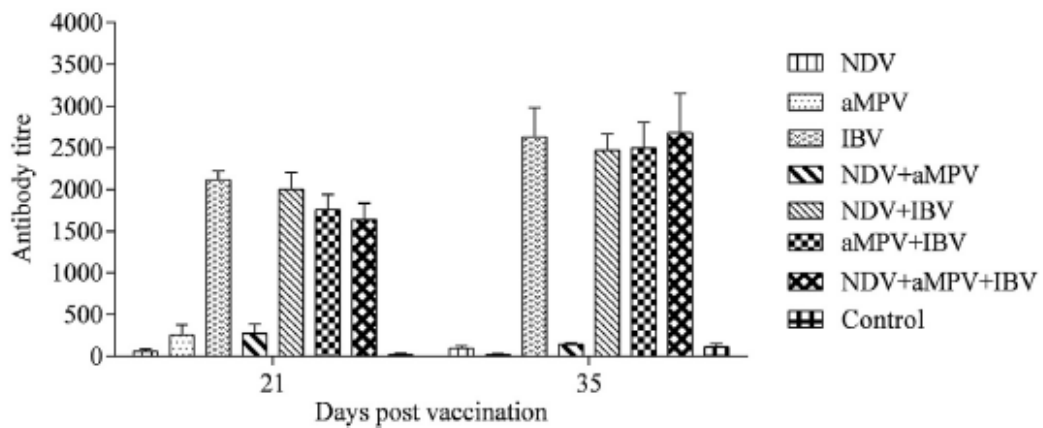


图3 单独接种 IBV 疫苗或与 NDV 和/或 aMPV 疫苗联合接种组鸡只的 IBV ELISA 抗体滴度。没有标注字母表明接种组之间无显著差异。竖线代表平均值的标准差 (n = 8)。

4.6 气管中的CD4+、CD8+T细胞和IgA生成B细胞

通过免疫组织化学评估气管中CD4+、CD8+和IgA生成B细胞的平均数量。与未接种疫苗的对照组相比，单独、双重或三重疫苗接种组显示气管中CD4+、CD8+和IgA生成B细胞的表达大大增强(表3)。然而在21dpv，各免疫接种组之间无显著差异。

表3

21dpv气管切片Mab免疫染色检测CD4+、CD8+T细胞和IgA生成B细胞的存在

Mab	NDV	aMPV	IBV	NDV+aMPV	NDV+IBV	aMPV+IBV	NDV+aMPV+IBV	对照组
CD4+	99±16	70±15	70±12	61±12	70±10	84±9	60±11	7±1
CD8+	66±12	43±10	47±11	63±10	66±12	53±7	44±10	6±2
IgA	89±13	80±8	74±12	68±12	70±9	69±10	62±12	10±3

结果表现为平均值和平均值标准差。免疫组的CD4+，CD8+或IgA生成B细胞的表达量要显著高于对照组。

4.7 NDV和IBV疫苗免疫对于aMPV攻毒保护效果的影响

4.7.1 临床症状

强毒aMPV攻毒后，单独接种aMPV和联合免疫NDV和/或IBV的免疫组没有观察到任何临床症状 (图4)。相比之下，未免疫aMPV疫苗的鸡表现出了临床症状，例如3dpc可观察到清澈或浑浊的鼻腔分泌物，在11dpc完全恢复。没有免疫aMPV疫苗的组之间临床症状无显著差异。



EGGS PROGRAM

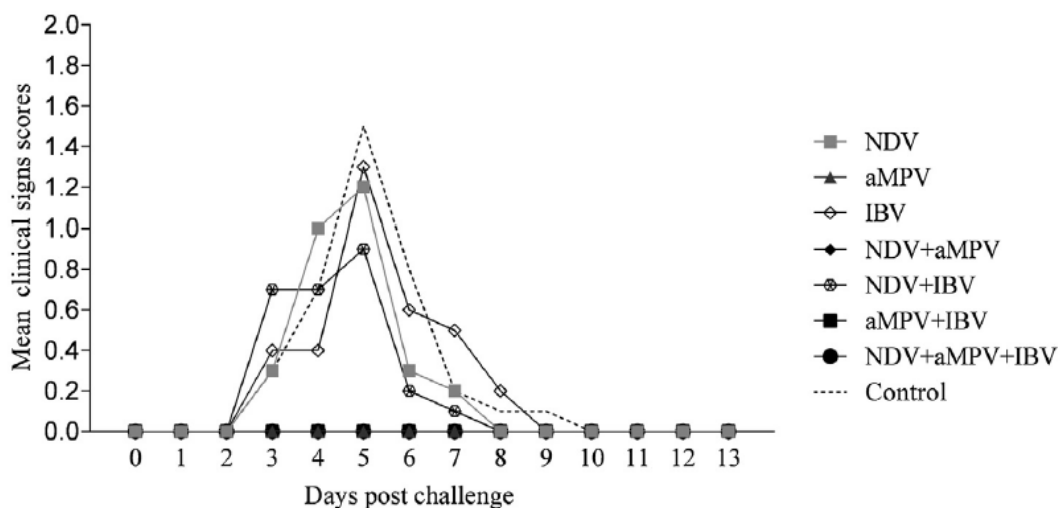


图4 免疫组或未免疫组鸡只在 aMPV 攻毒后的平均临床症状评分。单独接种 aMPV 和联合免疫 NDV 和/或 IBV 的免疫组没有观察到任何临床症状。

4.8 NDV和aMPV疫苗接种对于IBV攻毒保护效果的影响

4.8.1 临床症状和大体病变

IBV攻毒后,单独接种H120疫苗或与其他疫苗联合接种组没有观察到任何临床症状。未接种H120疫苗的鸡只在1dpc表现出了呼吸症状,包括气管啰音、咳嗽、打喷嚏和甩头。在5dpc进行剖检发现,接种H120疫苗的雏鸡未观察到病变,而未接种疫苗的雏鸡有轻微气管堵塞和肾脏轻度苍白肿胀。

4.8.2 IBV攻毒保护效果TOC评估

强毒IBV M41株对未免疫H120的鸡只气管上皮细胞造成了广泛的损伤。H120疫苗免疫组则显示出95-98%的保护率。在未攻毒组,纤毛保护率几乎为100%。

5 讨论

我们评估了SPF雏鸡同时免疫NDV, aMPV和IBV病毒活疫苗造成的影响。之前的报道已经研究了在雏鸡中同时应用NDV和aMPV, aMPV和IBV, 或NDV、aMPV和IBV疫苗的试验。上述研究显示NDV或IBV疫苗免疫会降低强毒aMPV引起的体液抗体反应,但雏鸡仍具有抵抗感染的保护力。作者推测很有可能是细胞介导免疫在抵抗NDV, aMPV或IBV感染中发挥了重要作用,但并没有进行调查。在本综合性试验中,为了生成可比较的数据,相同的NDV, aMPV和IBV活疫苗病毒株在SPF雏鸡中进行了单独、双重或三重疫苗联合免疫。除了体液抗体反应,我们还通过免疫组化的方法检测了雏鸡气管中细胞介导免疫反应和局部免疫反应。



EGGS PROGRAM

在1日龄SPF雏鸡进行单独或联合(双重和三重)活疫苗病毒接种后,没有观察到任何呼吸症状或其他临床症状。这与其他研究中SPF雏鸡同时免疫NDV和aMPV(Ganapathy et al., 2007), aMPV和IBV(库克et al., 2001)和NDV+IBV+aMPV(Tarpey et al., 2007)后所观察到的结果相类似。在之前研究中,还对不同组织口咽拭子中活疫苗病毒的分布和持续时间进行了监测。在我们的研究中,我们使用RT-PCR来跟踪口咽拭子中的疫苗病毒,并发现在整个实验期间均能检测到IBV疫苗活病毒的存在。这一结果显示出了IBV的持久性,同时也有可能IBV比其他呼吸道病毒更具优势的能力有关。库克等人(2001)报道,这可能是由于IBV的复制十分迅速。在我们的经验中,在实验室和野外条件下,我们能够在接种疫苗若干周后仍通过RT-PCR检测到IBV疫苗病毒。

对于NDV疫苗来说,当单独接种或与IBV或aMPV同时接种时NDV病毒会很快消失,但三种疫苗同时接种时持续时间会稍微长一点(7dpv)。当与IBV疫苗联用或与IBV和NDV疫苗共同使用时,口咽拭子中的aMPV疫苗病毒可能会持续时间更长(21dpv)。之前的研究已经表明aMPV与NDV联合免疫时检测到的持续时间会延长(Ganapathy 等, 2005)。当与IBV疫苗联用时,NDV或aMPV病毒的检测可能会发生延迟,可能表明IBV病毒占主导地位。尽管如此,显然NDV或aMPV疫苗病毒并没有被完全清除,而是在与IBV同时免疫时,可以在稍迟时间里进行复制。

疫苗免疫成功的一个重要指标就是血清学应答,因为这表明了疫苗的附着,复制和诱导免疫反应以及体液抗体的能力。在这项研究中,使用商业ELISA试剂盒检测IBV和aMPV体液抗体,HI试验则用于检测NDV抗体。对于IBV和NDV来说,结果表明同时进行双重或三重疫苗免疫并不影响诱导抗体的水平。这对于NDV来说至关重要,因为通常用HI抗体水平来显示保护水平的高低。而对aMPV来说,进行双重免疫或三重免疫组的体液抗体水平会略低,与之前报道中的抗体滴度类似。

尽管世界上双重或三重疫苗联合接种的方法在家禽养殖业中的应用越来越广泛,目前尚未有关于细胞介导免疫反应的公开数据。我们试图衡量单独、双重或三重疫苗免疫后气管中的CD4⁺和CD8⁺细胞数量,此外,我们还评估了气管中IgA生成B细胞的数量,作为局部免疫反应的指标。反应评估在21dpv进行,之后对鸡群分群进行IBV或aMPV攻毒。我们发现与未接种疫苗组相比,免疫组气管的CD4⁺, CD8⁺或IgA生成B细胞表达显著增加。接种组之间没有显著差异,单一,双重和三重疫苗免疫在气管中可以诱导相同强度的IgA生成B细胞、CD4⁺和CD8⁺(α)细胞应答。在这项研究中,仅仅对CD8⁺ α 细胞进行了评估,但是其他T细胞亚型也可能在诱导保护性免疫中发挥了重要作用。在之前的报道中已经表明,NDV,支原体和沙门氏菌Enteritidis感染后,其他T细胞亚型如TCR γ δ , TCR α β 1和TCR α β 2会起到刺激和保护作用。

作为这项研究的一部分,本研究对单一疫苗免疫和联合(双重或三重)疫苗免疫的效果进行了比较。我们对IBV和aMPV的攻毒保护效果进行了评估。而由于地方法规的限制,我们没有进行NDV攻毒保护试验;而是评估了疫苗接种后的NDV HI滴度。我们的研究结果表明,无论是



EGGS PROGRAM

否与其他活疫苗联合应用, 对于IBV的保护效果没有影响, 所有IBV免疫组均达到了95-98%的纤毛保护。之前的其他体内研究也显示出了类似的发现。NDV免疫组的平均HI滴度为 $2-5\log_2$, 可以认为能够提供临床保护。在这项研究中, 同时免疫aMPV, IBV或者三者同时使用均不会对NDV的免疫应答或保护力造成影响。

随着aMPV感染在肉鸡、蛋鸡和种鸡造成的损失逐渐增加, 生产中开始使用aMPV活疫苗, 经常和IBV, NDV或两者同时使用。之前的研究表明, aMPV活疫苗与IBV, NDV和NDV + IBV活疫苗联合使用时, 不会对aMPV疫苗的效果产生影响。本研究结果证明aMPV疫苗单独或联合使用时其保护力并没有损失。这种保护力与体液抗体水平无关。这一发现支持了先前的报道: 体液抗体在抵抗aMPV感染中并没有重要作用。在长期的实验研究中, 火鸡在12日龄免疫aMPV活病毒疫苗, 尽管在攻毒时ELISA抗体水平并不显著, 在22周龄时仍能抵抗攻毒病毒的感染。这表明抗体检测在评估aMPV疫苗接种家禽的保护力时并不能提供足够的参考意义。我们的研究证实了先前的推论, aMPV的保护力是由细胞介导免疫和局部免疫反应引起的, 因为在所有aMPV免疫组中细胞介导免疫水平和IgA生成B细胞数量类似。

6. 结论

根据这项研究中的研究结果, 似乎SPF雏鸡同时免疫双重或三重活疫苗时, NDV, aMPV或IBV疫苗的保护效力并没有受到影响。aMPV的体液抗体反应受到了抑制, 但IBV和NDV的反应没有受到影响。在气管水平上, 接种组之间的细胞介导免疫水平或IgA生成B细胞没有受到影响。