

# 中药免疫增强剂对鸡 ILT 疫苗免疫和强毒攻击的影响

张继东<sup>1</sup>, 李淑芳<sup>1</sup>, 杨润德<sup>2</sup>, 杨淑亚<sup>1</sup>, 薛宗丽<sup>1</sup>, 李坤武<sup>3</sup>

(1. 河北省畜牧兽医研究所, 保定 071000; 2. 河北农业大学, 保定 071000; 3. 河北师范大学, 石家庄 050016)

**摘要:** 选择健康仔鸡 70 只, 随机分为 7 组, 每组 10 只。1 组为健康对照组(不免疫、不攻毒), 2~4 组为不同处理的免疫试验组。在试验仔鸡 45 日龄时, 2 组免疫传染性喉气管炎(ILT)疫苗, 3 组免疫 ILT 疫苗同时肌肉注射中药免疫增强剂 I, 4 组免疫 ILT 疫苗同时肌肉注射中药免疫增强剂 II。5、6 组为非免疫试验组。在仔鸡 52 日龄时, 5 组肌肉注射中药免疫增强 I, 6 组肌肉注射中药免疫增强 II。7 组为单纯强毒攻击组。55 日龄时, 2~7 组全部用 ILT 强毒( $EID_{50} = 10^{-5.33}/0.1 \text{ ml}$ )攻击。结果显示: 试验 2 组在免疫后 3 d, RBC-CRI 和 RBC-IC 花环率显著降低, 免疫后第 9 d, 上述两个花环率恢复到正常值。试验 3、4 组, RBC-CRI 和 RBC-IC 花环率在免疫后升高, 且高于 1 组和 2 组。强毒攻击后 5 d、10 d, 试验 2~6 组, RBC-CRI、RBC-IC 花环率仍然保持在攻毒前的水平。7 组的 RBC-CRI 和 RBC-IC 花环率显著降低, 与其他各组比较差异极显著( $P < 0.01$ ), 在攻毒后第 10 d(试验 2、3、4 组免疫后 20 d), 体内 ILT 抗体检测结果为, 试验 1 组 ILT 抗体全部阴性, 其他试验组的 ILT 抗体效价为: 2 组、3 组、7 组为 1:8; 4 组、5 组为 1:32; 6 组为 1:256。说明 ILT 疫苗免疫或强毒攻击, 均会引起机体红细胞免疫功能降低; 中药免疫增强剂能够消除 ILT 疫苗免疫和强毒攻击引起红细胞免疫功能的降低, 维持红细胞的正常免疫活性; 两种中药免疫增强剂在提高红细胞免疫功能和体液免疫功能方面均显示出良好的效果, 但中药免疫增强剂 I 在提高红细胞免疫功能方面效果突出, 中药免疫增强剂 II 提高体液免疫功能方面效果显著。

**关键词:** 鸡; 传染性喉气管炎; 疫苗; 强毒; 红细胞免疫; 中药免疫增强剂

**中图分类号:** S853.76

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0366-6964(2003)02-0168-04

随着养鸡业的规模化发展, 鸡传染性喉气管炎的发病率越来越高, 但对本病的免疫预防效果一直不甚理想, 疫苗免疫后导致鸡群发病的现象时常发生<sup>[1,2]</sup>。认为主要原因是疫苗毒株至弱不完全或疫苗毒在免疫鸡体内毒力返强所致。1981 年美国生殖免疫学家 I·Siegel 提出了“红细胞免疫系统”的新概念, 现已证实, 红细胞膜上存在许多与免疫有关的物质, 如 CRI、CR3、CD58、CD59 等, 使红细胞具有识别、粘附、杀伤抗原、清除免疫复合物等功能<sup>[3]</sup>。由于红细胞的数目巨大, 因此红细胞免疫功能在机体免疫系统中起着重要作用。研究在 ILT 疫苗免疫的同时应用中药免疫增强剂, 通过检测机体红细胞免疫功能状态和特异性抗体效价的变化, 揭示了中药免疫增强剂对鸡 ILT 疫苗免疫和强毒攻击的影响, 以期找到提高疫苗免疫效果、降低疫苗副反应的全新的免疫方法。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料** ILT 琼扩抗原、抗体(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供); ILT 强毒(河北畜牧兽医研究所提供); ILT 疫苗(购自河北省畜牧兽医站, 以色列生产); 中药免疫增强剂 I、II(河北畜牧兽医研究所动物临床医学研究中心研制); 补体致敏酵母菌、未致敏酵母菌(第二军医大学长海医院提供); 1% 琼脂糖; pH7.2PBS; 3.8% 枸橼酸钠抗凝剂; 0.25% 戊二醛; 甲醇; 瑞氏-姬姆萨染液; 80-2 离心机(上海手术机械厂); SK-1 型高速混匀器(江苏金坛医疗仪器厂); CH20B1MF200 OLYMPUS 显微镜; 微量移液器(上海求精仪器厂); 载玻片; 培养皿; 试管等。

**1.2 试验动物** 1 日龄京白 939 小公鸡(购自保定市某孵化场), 用正大饲料公司雏鸡颗粒料饲喂, 室内隔离笼养。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 动物分组:** 选择体重相似的健康试验仔鸡 70 只, 随机分为 7 组, 每组 10 只。

**1.3.2 免疫试验处理:** 在试验仔鸡 45 日龄时, 设 1

收稿日期: 2001-10-15

作者简介: 张继东(1961-), 男, 河北省张北县人, 大学, 副教授, 主要从事中兽医医药学研究。

组为健康对照组, 不免疫、不攻毒, 单独一室, 隔离饲养。2 组免疫传染性喉气管炎(ILT)疫苗, 3 组免疫 ILT 疫苗同时肌肉注射中药免疫增强剂 I (0.5 mg/kg), 4 组免疫 ILT 疫苗同时肌肉注射中药免疫增强剂 II (0.5 mg/kg)。ILT 疫苗免疫后仔细观察鸡的临床症状。分别在免疫后第 3 d、9 d 对 1~4 组试验仔鸡采血, 测定红细胞免疫功能状态, 在免疫后第 9 d 测定血清 ILT 抗体效价。52 日龄时, 5 组肌肉注射中药免疫增强剂 I (0.5 mg/kg), 6 组肌肉注射中药免疫增强剂 II (0.5 mg/kg)。55 日龄时 2~7 组全部用 ILT 强毒(鸡胚半数致死量  $EID_{50}=10^{-5.33}/0.1$  ml, 攻毒剂量为  $200EID_{50}$ ) 攻击, 气管注射, 每只鸡 0.2 ml, 仔细观察攻毒后鸡的临床症状。攻毒后第 5 d、第 10 d, 分别采血测定机体的红细胞免疫功能, 攻毒后 10 d 测定血清 ILT 抗体效价。

1.3.3 机体红细胞免疫功能状态检测: 按郭峰法<sup>[3,4]</sup>分别采血(枸橼酸钠抗凝)测定机体的红细胞免疫功能状态, 计算 200 个红细胞形成花环的数量, 折算成红细胞 CRI(BRC-CRI)花环百分率和红细胞免疫复合物(BRC-IC)花环百分率。

1.3.4 ILT 抗体检测: 采用琼脂双向扩散试验测定体内 ILT 抗体效价<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 临床症状

ILT 疫苗免疫后第 2 d, 试验 2 组有 2 只鸡出现张口呼吸、甩头症状, 第 3 d 症状消失, 其他各组无异常症状出现。ILT 强毒攻击 36 h 后, 5 组有 2 只鸡出现张口呼吸、甩头等呼吸困难症状, 精神萎靡, 食欲不振, 症状持续 2 d 后消失。7 组鸡在强毒攻击 48 h 后, 10 只陆续全部出现典型呼吸异常症状, 甩头、张嘴呼吸, 个别鸡表现咳出带血粘液, 精神萎靡, 流泪、食欲废绝等症状, 攻毒后第 6 d 症状减轻, 第 7 d 症状消失; 其他各组未见异常症状出现。

### 2.2 红细胞免疫功能状态检测结果

2.2.1 ILT 疫苗免疫前后 RBC-CRI、RBC-IC 花环百分率: 红细胞免疫粘附两个以上酵母菌为一个花环。经九点法两次重复阅片记录, 1 组在试验期间 RBC-CRI 花环率未见显著变化( $P > 0.05$ ); 2 组在 ILT 弱毒疫苗免疫后 3 d, RBC-CRI 花环率显著降低, 与其他各组比较呈现极显著差异( $P < 0.01$ ), 到第 9 d RBC-CRI 花环率升高到 1 组同等水平; 而 ILT 弱毒疫苗免疫同时应用中药免疫增强剂 I 的 3

组, 免疫后第 3 d、9 d, RBC-CRI 花环率显著高于对照组和试验 2 组( $P < 0.01$ ), 且高于 4 组( $P < 0.05$ ); ILT 疫苗免疫同时应用中药免疫增强剂 II 的 4 组与试验 1、2 组比较差异极显著( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 ILT 免疫前后 RBC-CRI 花环率(%)测定结果

Table 1 Results of RBC-IC rosette rates(%) pre- and post-immunization with ILT vaccine

组 Group	1	2	3	4
免疫前 1 d 1 d pre-immunization	6.7±1.16	6.8±2.86	6.0±1.10	6.5±1.86
免疫后 3 d 3 days post-immunization	6.2±1.30	4.9±0.83**	9.7±1.82**	7.5±1.73*
免疫后 9 d 9 days post-immunization	5.8±1.68	5.4±1.47	8.6±0.89**	7.6±1.29*

Note: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

ILT 疫苗不同免疫处理后 3 d, 试验 2 组 RBC-IC 花环率显著降低, 与其他各组比较差异极显著( $P < 0.01$ ), 试验 3、4 组 RBC-IC 花环率升高, 与对照组比较差异极显著和显著( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 免疫后第 9 d, 3 组高于其他各组, 其他各组观察值均未见显著变化( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 ILT 免疫前后 RBC-IC 花环率(%)测定结果

Table 2 Results of RBC-IC rosette rates(%) pre- and post-immunization with ILT vaccine

组 Group	1	2	3	4
免疫前 1 d 1 d pre-immunization	8.7±1.79	8.0±1.50	8.1±2.19	8.8±1.15
免疫后 3 d 3 days post-immunization	8.1±1.60	5.0±1.06**	10.6±1.38**	9.3±0.84*
免疫后 9 d 9 days post-immunization	7.4±1.14	7.0±1.20	8.8±0.76*	7.9±1.93

Note: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

2.2.2 ILT 强毒攻击前后 RBC-CRI、RBC-IC 花环率测定结果: ILT 强毒攻击后 5 d, 试验 2~4 组, 红细胞 CRI 花环率仍然保持在攻毒前水平, 3、4 组花环率显著高于其他试验组( $P < 0.01$ ), 7 组红细胞 CRI 花环率显著降低( $P < 0.01$ ), 攻毒后 10 d, 3、4、6 组高于 1 组, 呈现极显著或显著差异( $P < 0.01$ ,  $P$

< 0.05); 7 组, RBC- CRI 花环率显著降低, 与其他各组比较均呈现极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。

ILT 强毒攻击后第 5 d, 2、3、5、6 组 RBC- IC 花环率高于 1 组 ( $P < 0.05$ ), 7 组 RBC- IC 花环率

明显降低, 与其他各组比较呈现极显著差异 ( $P < 0.01$ )。攻毒后 10 d, 2~ 6 组趋于正常, 与 1 组比较差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 7 组 RBC- IC 花环率仍处于低水平 ( $P < 0.01$ ), 见表 4。

表 3 ILTV 强毒攻击前后 RBC- CRI 花环率  
Table 3 The RBC- CRI rosette rates(%) pre- and post- virulent strains challenge

组 Group	1	2	3	4	5	6	7
攻毒前 1 d 1 d pre- challenge	5.8 ± 1.68	5.4 ± 1.47	8.6 ± 0.89	7.6 ± 1.29	6.7 ± 1.34	6.3 ± 1.26	6.6 ± 1.34
攻毒后 5 d 5 days post- challenge	6.1 ± 0.44	6.4 ± 0.64	8.6 ± 2.34**	8.2 ± 1.2**	6.1 ± 1.80	6.3 ± 1.06	3.9 ± 1.3**
攻毒后 10 d 10 days post- challenge	5.9 ± 0.34	6.3 ± 1.79	7.9 ± 1.54**	7.4 ± 2.11**	6.2 ± 1.86	6.9 ± 0.69*	4.9 ± 1.57**

Note: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

表 4 ILTV 强毒攻击前后 RBC- IC 花环率  
Table 4 The RBC- IC rosette rates(%) pre- and post- virulent strains challenge

组 Group	1	2	3	4	5	6	7
攻毒前 1 d 1 d pre- challenge	7.4 ± 1.14	7.0 ± 1.20	8.8 ± 0.76	7.9 ± 1.93	7.4 ± 2.31	6.9 ± 0.94	7.9 ± 2.44
攻毒后 5 d 5 days post- challenge	7.3 ± 1.25	8.5 ± 0.7*	8.6 ± 1.9*	7.4 ± 1.04	8.6 ± 0.74**	8.9 ± 1.64*	5.1 ± 2.14**
攻毒后 10 d 10 days post- challenge	7.9 ± 0.46	7.3 ± 0.87	8.8 ± 1.69	7.2 ± 1.8	8.7 ± 2.75	8.6 ± 0.94	5.0 ± 2.75**

Note: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

2.2.3 体液免疫检测结果: 在 ILT 疫苗免疫后第 9 d, 经 ILT 疫苗免疫的 2~ 4 组均产生抗体, 但抗体效价较低, 为 1: 2, 其他各组 ILT 抗体检测阴性。在攻毒后第 10 d(免疫试验组免疫后 20 d), 体内抗体检测结果为, 1 组为阴性; 2、3、7 组 ILT 抗体效价为 1: 8; 4、5 组 ILT 抗体效价为 1: 32; 6 组 ILT 抗体效价为 1: 256。组内个体未见明显差异, 重现性好。

### 3 讨论

3.1 试验结果表明, ILT 疫苗免疫和强毒攻击均能使鸡 RBC- CRI 和 RBC- IC 花环率降低。说明 ILT 疫苗毒株和自然强毒株一样<sup>[5]</sup>, 在侵入血液后可能破坏红细胞膜上的 CRI 分子, 进而破坏了红细胞的免疫功能, 直接或间接地影响到机体整个免疫系统功能的协调。机体红细胞免疫功能在 ILT 疫苗免疫后短暂性降低可能成为 ILT 弱毒株在体内毒力返强和引起继发感染的免疫学理论依据, 提示在单纯 ILT 疫苗免疫后 5 d 之内避免进行其他疫苗

免疫, 以防免疫失败。如果此时能够提高机体免疫系统的功能, 即可抵抗和抑制 ILT 疫苗毒株在体内毒力返强, 防止继发感染, 提高疫苗的免疫效果。

3.2 中药免疫增强剂能够提高 RBC- CRI 花环率和 RBC- IC 花环率, 并可激发机体在免疫后很快产生较高浓度的抗体。中药免疫增强剂与 ILT 疫苗同时应用, 能够消除 ILT 疫苗免疫引起红细胞免疫功能降低的过程, 提高疫苗的免疫效果。提高细胞免疫功能的中草药来源广泛, 提纯较容易, 在治疗人与动物的肿瘤病、免疫抑制性传染病、寄生虫病方面有很好的研究价值和开发前景, 应加速开发和应用。

3.3 两种中药免疫增强剂在提高红细胞免疫功能和体液免疫功能方面均显示出良好的效果, 但中药免疫增强剂 I 在提高红细胞免疫功能方面效果突出; 中药免疫增强剂 II 提高体液免疫功能的效果较为显著。因此, 有针对性地筛选免疫增强剂协同疫苗免疫来提高免疫效果, 具有很好的研究价值与应用前景。

3.4 试验中体液免疫检测结果显示, 经 ILT 疫苗免疫的试验 2~3 组的抗体水平与未采用任何保护措施、单纯强毒攻击组的抗体水平相似, 低于未经疫苗免疫只应用了中药免疫增强剂的 5、6 组的抗体水平。其可能原因一是由于在疫苗免疫后短时间内, 再次接受高浓度病毒, 使机体的淋巴细胞对自身蛋白产生免疫耐受; 二是 ILT 疫苗的毒株与攻击用强毒的抗原性或免疫原性存在差异。如果是前者, 提示在 ILT 疫苗免疫后 10 d 之内进行二次强化免疫没有实际意义。

#### 参考文献:

- [1] 甘孟侯, 郑世军, 张中直, 等. 使用鸡传染性喉气管炎疫苗引起鸡群发生强烈反应的观察[J]. 中国兽医杂志, 1993, 19(3): 18~19.
- [2] 陈任重. 合理使用鸡传染性喉气管炎疫苗. 禽业科技[J], 1993, 9(6): 44.
- [3] 刘景田, 张洁. 红细胞免疫学[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1995, 22.
- [4] 刘玉斌, 苟仕金. 动物免疫学实验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989, 57~300.
- [5] 张德成, 陈恩义, 吴润培, 等. 鸡传染性喉气管炎红细胞 C<sub>3b</sub> 受体的变化研究[J]. 中国兽医杂志, 1992, 18(1): 16~17.
- [6] 阴天榜, 刘兴友, 王杨伟, 等. 家禽免疫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999, 202~209.

## Effects of the Chinese Herbal Medicine Immunopotentiator on the Immunity with ILT Vaccine and Virulent Strains in Chickens

ZHANG Jīdong<sup>1</sup>, LI Shūfang<sup>1</sup>, YANG Rūrude<sup>2</sup>, YANG Shūya<sup>1</sup>, XUE Zongli<sup>1</sup>, LI Kurwu<sup>3</sup>  
 (1. Hebei Provincial Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Baoding 071000, China;  
 2. The Agricultural University of Hebei, Baoding 071001;  
 3. Hebei Normal University, Shijiazhang 050016)

**Abstract:** Seventy clinical healthy cockers were selected and divided into 7 groups randomly, 10 chicks in every group at 45 days of age. Group 1 was set as control. The birds of group 2 were inoculated with ILT vaccine; Group 3 was inoculated with ILT vaccine and injected with Chinese herbal medicine immunopotentiator I simultaneously; Group 4 was injected with Chinese herbal medicine immunopotentiator II along with the ILT vaccination. For 52 days-old birds, group 5 was injected with the Chinese herbal medicine immunopotentiator I; Group 6 was injected with Chinese herbal medicine immunopotentiator II; At 55 days of age, group 2 to 7 were attacked with ILT virulent strain ( $EID_{50} = 10^{-5.33}/0.1 \text{ ml}$ ). The results of this treatment protocol show that the RBC-CRI and RBC-IC rosette rates were greatly decreased 3 days post immunization with ILT vaccines in group 2, significantly lower than the other groups ( $P < 0.01$ ). The rates got to normal level 9 days post vaccination. The RBC-CRI and RBC-IC rates in group 3, 4 were higher than in groups 1 and 2. On day 5 and day 9 post attack with ILT virulent strains in all birds of groups 2~7, the RBC-CRI and RBC-IC rates in group 2~6 were retaining at higher levels relatively compared with that of pre-treatment birds. However, the RBC-CRI and RBC-IC rates in group 7 were decreased significantly ( $P < 0.01$ ). ILT antibody titer was detected as in the following: 1:8 in group 2, group 3, group 7; 1:32 in group 4 and group 5; 1:256 in group 6 suggesting ILT vaccine and virulent strains are capable of lowering down the RBC immune function of the birds; Chinese herbal medicine immunopotentiators I or II can enhance the RBC and antibody production, and destroy the decrease by ILT vaccine and virulent strain. The Chinese herbal medicine immunopotentiator II is better in promoting antibody production than the immunopotentiator I.

**Key words:** Chicken; ILT; Vaccine; Virulent strain; Red blood cell(RBC) immunity; Chinese herbal medicine immunopotentiator