

## 传染性法氏囊病病毒变异株弱毒的免疫原性研究\*

李建荣,周继勇\*\*

(浙江大学动物预防医学研究所,杭州 310029)

**摘要** 传染性法氏囊病病毒 (IBDV) JD<sub>1</sub>、JD<sub>2</sub>、NB 变异株和 HZ<sub>1</sub>、SC 经典株弱毒分别以 3000 TCID<sub>50</sub>、5000 TCID<sub>50</sub>、10000 TCID<sub>50</sub>、5000 TCID<sub>50</sub> 剂量免疫 SPF 鸡后的攻毒试验结果表明:IBDV-NB、JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub> 弱毒株可诱导 SPF 鸡产生很高的血清中和抗体,具有优良的免疫原性,强毒攻击保护率均达 100%。IBDV-NB 毒株的最佳免疫剂量为 3000 TCID<sub>50</sub>,IBDV-JD<sub>1</sub> 和 HZ<sub>1</sub> 毒株的最佳免疫剂量为 5000 TCID<sub>50</sub>。抗体消长规律表明 NB 毒株一次免疫的有效保护期可达 274 天,JD<sub>1</sub> 和 HZ<sub>1</sub> 毒株为 214 天。

**关键词** 传染性法氏囊病病毒; 变异株; 弱毒疫苗; 免疫原性

**中图分类号** S852.659.1;S852.4

**文献标识码** A

**文章编号** 1008-0589(2000)05-0347-05

### Immunogenicity of Attenuated Variant Strains of Infectious Bursal Disease Virus

LI Jianrong, ZHOU Jiyong

(Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, 310029)

**Abstract** 14-day-old SPF chickens were vaccinated with three attenuated variant strains (JD<sub>1</sub>, JD<sub>2</sub>, NB) and two classic strains (HZ<sub>1</sub>, SC) of infectious bursal disease virus (IBDV) at four different doses (3000TCID<sub>50</sub>, 5000TCID<sub>50</sub>, 10000TCID<sub>50</sub>, 15000TCID<sub>50</sub>) for exploring the immunogenicity of these attenuated IBDVs. The results show that the attenuated IBDV-JD<sub>1</sub>, NB and HZ<sub>1</sub> can induce SPF chickens to produce better immune responses, and the protection ratio of the vaccinated chickens was 100% after challenging with the virulent IBDV-BC6/85. The optimal vaccination dose was 5000TCID<sub>50</sub> for IBDV strains JD<sub>1</sub> and HZ<sub>1</sub>, while 3000TCID<sub>50</sub> for IBDV strain NB. The effective protection time of the vaccine was 274 days with IBDV strain NB, 214 days for both JD<sub>1</sub> and HZ<sub>1</sub> strains of IBDV after primary immunization.

**Key words** Infectious bursal disease virus; variant; Attenuated vaccine; Immunogenicity

传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 所引起的一种急性接触性传染病。近年来由于变异株和超强毒的不断出现,免疫失败时有发生,给 IBD 的防制带来了极大困难<sup>[1,2]</sup>。为了探讨 IBDV 变异毒株弱毒的免疫原性, Rosenberger<sup>[3]</sup>、Kibenge<sup>[4]</sup>、Tsai<sup>[5]</sup> 等先后进行了变异毒株弱毒的培育。国内尚无系统关于 IBDV 变异毒株疫苗研究的报道,我们在鉴定 IBDV 变异株的基础上,开展了 IBD 变异株弱毒的免疫原性研究,现将试验结果报告于后。

#### 1 材料和方法

1.1 弱毒株 IBDV-JD<sub>1</sub>、JD<sub>2</sub>、NB 变异株弱毒, IBDV-HZ<sub>1</sub>、SC 经典株弱毒, 浙江大学动物预防医学研究所

培育并保存<sup>[5]</sup>。

1.2 标准强毒株 IBDV-BC6/85 株 (毒价为 10<sup>5.833</sup> BLD<sub>50</sub>/0.25ml, 攻毒剂量为 100 BLD<sub>50</sub>), 购自中国兽药监察所。

1.3 SPF 种蛋及 SPF 鸡 购自山东家禽研究所 SPF 鸡试验场。

1.4 病毒 TCID<sub>50</sub> 滴定 按《动物病毒学》<sup>[9]</sup>记载的方法测定 JD<sub>1</sub>35 代、JD<sub>2</sub>37 代、NB38 代、HZ<sub>1</sub>41 代、SC38 代细胞适应毒的 TCID<sub>50</sub>。

1.5 弱毒株的免疫原性试验 试验共分 JD<sub>1</sub>、NB、JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub>、SC 五组, 每个毒株组内设 3000、5000、10000、15000 TCID<sub>50</sub> 四个剂量。所有免疫组于 14 日龄首免, 每个剂量免疫 30 只, 至 28 日龄每组分别各取 15 只进行二免。所有免疫组于一次免疫后 14 天、21 天, 二免后 12 天, 各组分别取 5 只鸡用 IBDV-BC6/85 强毒株攻击, 并设健康对照组, 非免疫攻毒对照组, 攻毒后 5 天扑杀, 检查法氏囊病变, 计算保护率。

1.6 法氏囊病理组织学观察 IBDV-JD<sub>1</sub>、NB、JD<sub>2</sub>、

\*浙江省九五攻关项目 (批准号: 961102174-001)

\*\* 通讯作者

收稿日期: 2000-02-14

HZ<sub>1</sub>、SC 免疫原性试验所有雏鸡的法氏囊用 10% 甲醛固定,常规法石蜡切片, H. E 染色、观察法氏囊的病理组织学变化。

1.7 弱毒株免疫后抗体消长规律的测定 JD<sub>1</sub> 免疫组 3000、5000、10000 TCID<sub>50</sub> 的免疫剂量、NB、JD<sub>2</sub>、HZ<sub>1</sub>、SC 免疫组的 5000 TCID<sub>50</sub> 剂量于一免后 7、10、14、17、21、26、32、36、66、94、124、154、184、214、244、274 天,二免后 3、7、12、18、22、28、36、66、80、110、140、170、200、230、260、290 天分别随机心脏采血 5 只鸡,分离血清,56℃ 灭活 30 分钟,用固定病毒稀释血清法测定血清中和抗体效价,然后根据中和抗体效价的 GMT 值,描绘抗体消长规律曲线,计算疫苗的免疫保护期。

## 2 结果

2.1 不同 IBDV 变异株细胞适应毒的 TCID<sub>50</sub> 测定结果 JD<sub>1</sub>35 代、JD<sub>2</sub>37 代、NB38 代、HZ<sub>1</sub>41 代、SC38 代细胞毒的 TCID<sub>50</sub> 分别为 10<sup>6.167</sup> TCID<sub>50</sub>/0.02ml、10<sup>5.0</sup>

TCID<sub>50</sub>/0.02ml、10<sup>5.833</sup> TCID<sub>50</sub>/0.02ml、10<sup>5.625</sup> TCID<sub>50</sub>/0.02ml、10<sup>5.50</sup> TCID<sub>50</sub>/0.02ml。

2.2 弱毒株的免疫原性及最佳免疫剂量 JD<sub>1</sub>、JD<sub>2</sub>、NB、HZ<sub>1</sub>、SC 弱毒株一免后 14 天、21 天和二免后 12 天,分别用 IBDV-BC6/85 强毒株攻击,取法氏囊作病理组织学检查,其结果如下:IBDV-NB 株 3000 TCID<sub>50</sub> 的免疫剂量可使免疫鸡得到 100% 的保护; JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub> 弱毒株 3000 TCID<sub>50</sub> 的免疫剂量仅能使鸡得到 60%~80%,只有 5000 TCID<sub>50</sub> 的免疫剂量才能使免疫鸡得到 100% 的保护;而 JD<sub>2</sub>、SC 弱毒株的 3000 TCID<sub>50</sub>、5000 TCID<sub>50</sub> 的免疫剂量的攻击保护率不理想,唯有 10000 TCID<sub>50</sub> 才能提供 100% 的保护,说明 JD<sub>2</sub>、SC 的最佳免疫剂量为 10000 TCID<sub>50</sub>。综合上述分析表明五个毒株中以 NB、JD<sub>1</sub> 的免疫原性最好, HZ<sub>1</sub> 次之, JD<sub>2</sub>、SC 较差,同时也说明病毒株疫苗的免疫原性并不因免疫剂量的增加而增大,存在一个最佳的免疫剂量。

表 1 弱毒苗一次免疫后 14 天、21 天,二免后 12 天攻击 BC6/85 的病理保护率

Table 1 protection of chickens vaccinated by the attenuated vaccines against IBDV-BC6/85 as evaluated by histopathological changes

组别 Group	剂量 (TCID <sub>50</sub> ) Dose	鸡数(只) Chicken number	强毒 Virulent IBDV	病理保护率(%) Protection		
				一免后 14 天 Primary immunization 14 day	二免后 21 天 Secondary immunization 21 day	一免后 12 天 Primary immunization 12 day
HZ <sub>1</sub>	3000	5	BC6/85	60	100	80
	5000	5	BC6/85	100	100	100
	10000	5	BC6/85	60	80	40
	15000	5	BC6/85	100	60	80
SC	3000	5	BC6/85	0	60	80
	5000	5	BC6/85	100	60	80
	10000	5	BC6/85	80	100	100
	15000	5	BC6/85	6	100	80
JD <sub>1</sub>	3000	5	BC6/85	60	80	80
	5000	5	BC6/85	100	100	100
	10000	5	BC6/85	100	80	100
	15000	5	BC6/85	80	100	100
NB	3000	5	BC6/85	100	100	100
	5000	5	BC6/85	80	100	100
	10000	5	BC6/85	100	80	100
	15000	5	BC6/85	80	100	100
JD <sub>2</sub>	3000	5	BC6/85	40	80	80
	5000	5	BC6/85	40	80	100
	10000	5	BC6/85	80	100	100
	15000	5	BC6/85	60	100	100

2.3 疫苗免疫后抗体消长规律及免疫保护期

2.3.1 JD<sub>1</sub> 株不同免疫剂量免疫后抗体消长规律及免疫保护期:采用固定病毒稀释血清法跟踪检测疫苗免疫后的中和抗体效价,结果表明 3000,5000,10000 TCID<sub>50</sub>的免疫剂量分别点眼接种 14 日龄雏鸡后,雏鸡于免疫后 7 天便可检出较高的中和抗体,10 天后中和抗体效价迅速上升,至 32 天达到高峰,免疫后 66 天中和抗体效价开始下降。3000 TCID<sub>50</sub>剂量

至 94 天、5000 TCID<sub>50</sub>剂量至 214 天,10000 TCID<sub>50</sub>剂量至 244 天的中和效价均在最低保护效价(4071)之上(图 1)。二次免疫后 3 天抗体水平稍有下降,7 天后又迅速上升,抗体水平远远高于一次免疫,且抗体维持时间长,至 140 天左右开始下降,至二免后 290 天的中和抗体水平均还在最低保护效价以上(三个剂量分别为 4417、7716、8771),说明 IBDV-JD<sub>1</sub> 弱毒株二次免疫后的有效保护期至少可达 290 天(图 2)。

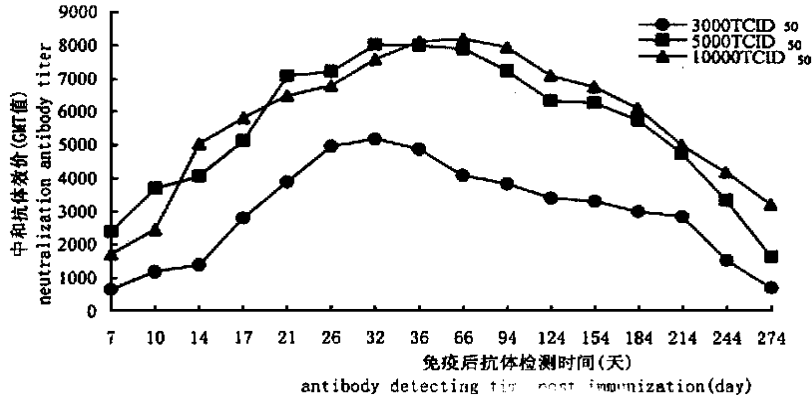


图 1 IBDV-JD<sub>1</sub> 株弱毒疫苗一次免疫后的抗体消长规律

Fig. 1 Neutralization antibody changes of IBDV-JD<sub>1</sub> vaccine post-primary immunization

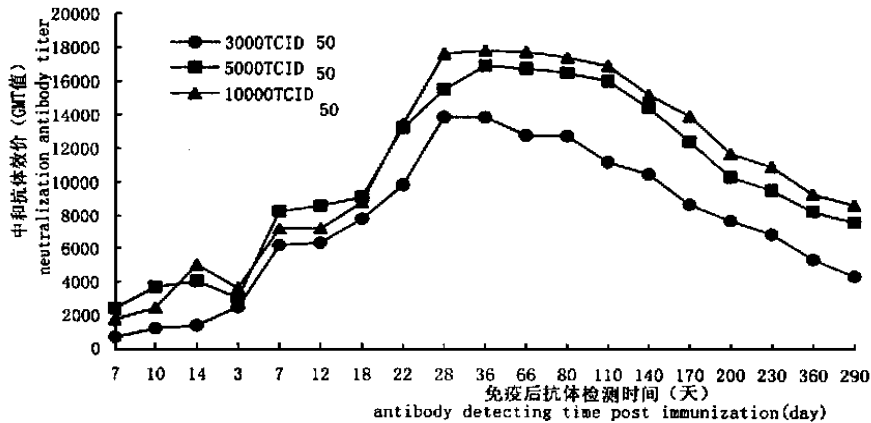


图 2 IBDV-JD<sub>1</sub> 株弱毒疫苗二次免疫的抗体消长规律

Fig. 2 Neutralization antibody changes of IBDV-JD<sub>1</sub> vaccine post-Secondary immunization

2.3.2 五个毒株 5000 TCID<sub>50</sub> 剂量免疫后抗体消长规律及免疫保护期:从图 3 看出,五个弱毒株 5000 TCID<sub>50</sub>的免疫剂量一次免疫后的抗体消长规律基本相似,其中以 NB 株产生的抗体效价最高,JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub>次之,雏鸡于免疫后 10 天中和抗体效价迅速上升,26~32 天达到高峰,NB 毒株免疫后 124 天中和抗体效价开始下降,其余毒株免疫后 66 天开始下降,NB 于免疫后 274 天抗体水平为 5530,仍在保护效价之上,JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub> 一次免疫后也可维持 214 天之久(分别为 4768、4315),SC 和 JD<sub>2</sub> 诱导的中和抗体相对较低,

至免疫后 154 天的效价已下降到 4474、4048,以上结果说明一次免疫后 NB 的免疫保护期最长,可达 274 天,JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub> 可达 214 天,而 JD<sub>2</sub>、SC 仅达 154 天。

从图 4 可知,五个毒株二免后 3 天抗体均有不同程度下降,7 天后抗体又迅速上升,二次免疫抗体水平远远高于一次免疫,于二免后 26~28 天达到高峰,但高峰期抗体维持时间长,至二免后 290 天,NB 的抗体还远远高于保护滴度,其次为 JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub>,但 JD<sub>2</sub>、SC 已接近最低保护滴度,不管从抗体水平的高低,还是从免疫保护期的长短来看,NB > JD<sub>1</sub> > HZ<sub>1</sub> > JD<sub>2</sub> > SC。

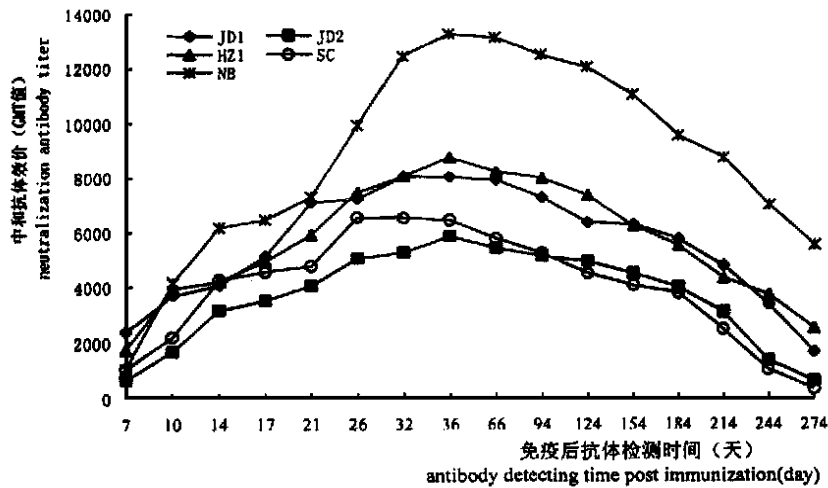


图3 五个毒株 5000TCID<sub>50</sub>一次免疫后的抗体消长规律

Fig.3 Neutralization antibody changes of the different attenuated vaccines with 5000TCID<sub>50</sub> dose post-primary immunization

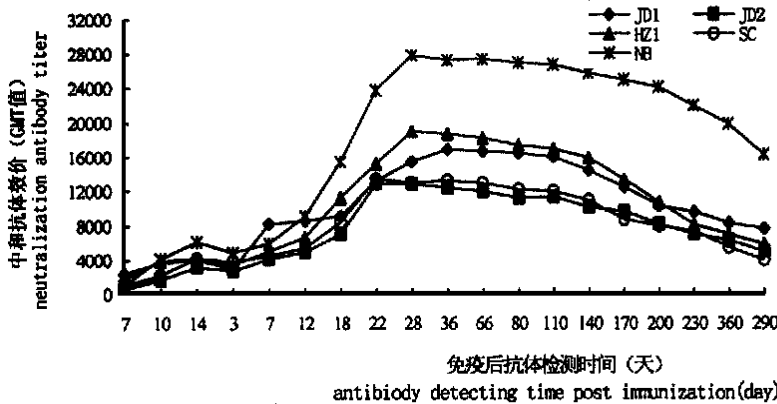


图4 五个毒株 5000TCID<sub>50</sub>二次免疫后的抗体消长规律

Fig.4 Neutralization antibody changes of the different attenuated vaccines with 5000TCID<sub>50</sub> dose post-primary immunization

### 3 小结和讨论

3.1 弱毒株的免疫原性 毒株的免疫原性与毒株本身的特点、毒株的致弱途径以及毒株在细胞上的传代次数等因素紧密相关。本试验三个变异毒株(JD<sub>1</sub>、JD<sub>2</sub>、NB)和二一个标准株(HZ<sub>1</sub>、SC)经鸡胚成纤维细胞致弱后,对强毒IBDV-BC6/85株保持良好的抵抗力,其中以NB毒株免疫原性最好,JD<sub>1</sub>、HZ<sub>1</sub>次之,而JD<sub>2</sub>、SC的免疫原性较差。Rosenberger(1987)首次将变异株E经CEF传代获得弱毒株,用该弱毒株制备的疫苗可抵抗经典株和变异株的攻击<sup>[2]</sup>。Tsai, H.J等<sup>[5]</sup>曾将变异株IN株和E株,分别在BGM-70细胞上传30代和40代获得致弱,但缺乏免疫原性,该学者认为高代次传毒可能降低了变异毒株弱毒株在鸡体内的自我复制能力,从而影响免疫原性,而Hassan等<sup>[12,13]</sup>将变异株IN株在CEF传6代,便发现已失去了致病性,用细胞毒制成的弱毒苗和灭活苗都能抵抗同源毒株(IN株)和异源毒株(STC)的攻击,显示了强大的免疫原性。

3.2 免疫剂量对免疫原性的影响 本试验中每个弱毒

株均设置了四个不同的免疫剂量,从攻毒结果来看,NB株3000 TCID<sub>50</sub>、JD<sub>1</sub>株和HZ<sub>1</sub>株5000 TCID<sub>50</sub>、均可对BC6/85的攻击提供完全的保护,但10000 TCID<sub>50</sub>、15000 TCID<sub>50</sub>的免疫剂量却只能使免疫鸡得到80%~100%的保护,这一结果说明免疫效果并不随着免疫剂量的增加而增大。疫苗的免疫效果与免疫剂量密切相关,提示在生产上使用疫苗时必须严格掌握疫苗的免疫接种剂量,否则同样会导致免疫失败。

3.3 疫苗的免疫保护期 JD<sub>1</sub>变异株疫苗于14日龄首免,5000 TCID<sub>50</sub>、10000 TCID<sub>50</sub>首免后14天诱导雏鸡产生中和抗体平均效价(GMT值)分别为4071、5035,IBDV-BC6/85强毒株攻击后的病理保护率可达100%,说明该疫苗的最低中和抗体保护效价为4071;同时说明该疫苗可在免疫后14天产生坚强的保护力。为此在生产上使用应注意鸡群免疫隐蔽期的饲养管理和消毒,以防止IBDV野毒的早期感染。从JD<sub>1</sub>疫苗不同免疫剂量的抗体变化规律来看,5000、10000 TCID<sub>50</sub>的免疫剂量的抗体水平、免疫保护期均高于3000 TCID<sub>50</sub>的剂量,免疫保护期最低可达

## 西北地区新城疫病毒分离株 F 基因的克隆与序列分析

梁 荣<sup>1,2</sup>, 曹殿军<sup>1\*</sup>, 陈 杰<sup>1,2</sup>, 李健强<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001;

2. 西北农林科技大学动物科学与动物医学学院, 杨凌 712100)

**摘要** 从西北地区(陕西、甘肃、青海和新疆)1979~1999年发生新城疫鸡群中共分离和收集了15个毒株,经蚀斑纯化、SPF鸡胚增殖得到9株NDV分离株。致病力测定结果表明,除2株为中强毒外,其余均为强毒株。以异硫氰酸胍法提取病毒基因组RNA,RT-PCR扩增其融合蛋白(F)基因N端908bp的片段,经回收、鉴定后,克隆到pGEM-T载体上进行核苷酸序列测定。对各毒株核苷酸及推导的氨基酸进行序列和同源性的比较,结果表明所有毒株在该区段没有缺失和插入,但有多处碱基置换。各分离毒株之间同源性很高(平均96.8%),与疫苗毒株同源性较低(82.5%~85.8%),而分离自青海省的3个毒株与其他毒株的同源性均较低(平均88.0%)。以389bp核苷酸绘制系统发育树,证实西北地区的新城疫是由基因型c和一个新发现的基因型引起的。

**关键词** NDV; F基因; 克隆测序; 系统发育树

**中图分类号** Q524; S852.65

**文献标识码** A

**文章编号** 1008-0589(2000)05-0351-04

## Cloning and Sequencing of Fusion Glycoprotein Gene of Newcastle Disease Virus Isolated from Northwest of China

LIANG Rong<sup>1,2</sup>, CAO Dianjun<sup>1\*</sup>, CHEN Jie<sup>1,2</sup>, LI Jianqiang<sup>2</sup>

(1. National key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin, 150001;

2. The College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi, 712100)

**Abstract** 15 NDV strains isolated from chickens of Northwest of China (Shaanxi, Gansu, Xiangjiang and Qinhai) between 1979 and 1999, 9 of them were gotten by plaque cloning. Pathogenicity test showed that 2 of them were mesogenic, the others were velogenic. For preparation of RNA, the acid guanidinium-thiocyanate method was used, cDNA of 908bp from F gene N terminal were amplified by RT-PCR and cloned into pGEM-T vector. The cDNA was sequenced by Sanger's method. 15 NDV strains were compared by nucleotides acid sequences analysis between 519bp F gene (from ATG). There were no deletion and insertion in all strains, but many substitutions. All strains except three strains from Qinghai appeared higher homology each other, and lower compared with La Sota, V4, B1. Phylogenetic tree of NDV strains were constructed by nucleotide acid sequences of a 389bp region of F gene. 64 NDV strains were classified into 9 genotypes (a~i) and 3 sub genotypes (a~c). 9 NDV isolates of Northwest belonged to genotype c and a novel genotype.

**Key words** Newcastle Disease Virus; Fusion glycoprotein gene; Sequence; Phylogenetic tree

\* corresponding author

\* 通讯作者

基金项目: 自然科学基金重大项目(39893290-4)和兽医生物技术国家重点实验室开放课题资助

收稿日期: 2000-01-07

290天。五个毒株的免疫后抗体水平变化规律基本一致,其中以NB毒株产生的抗体水平最高,其次为JD<sub>1</sub>和HZ<sub>1</sub>两个毒株,JD<sub>2</sub>与SC两个毒株相对较低,五个毒株二次免疫的有效保护期均超过290天,并远远长于一次免疫,不论是一次免疫还是二次免疫,五个毒株免疫保护期长短分别NB>JD<sub>1</sub>>HZ<sub>1</sub>>JD<sub>2</sub>>SC,这一结果与实验室的攻毒结果基本吻合。

### 参考文献

[1] Saif Y M, Ismail N M. Gross protective properties of infectious bursal disease virus. Proc. 38<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference. Temple, Ariz. 1988, 95~98.

[2] Gambrone J J, Closser J. Avian Dis., 1990(34): 7~11.  
[3] Rosenberger J K, Cloud S S, Metz A, et al. Proc. 36<sup>th</sup> Western Poultry Disease Conference, Davis, Calif., 1987, 105~109.  
[4] Kibenge F S B, Dhillion A S, Russel R G, et al. Avian Dis., 1988(32): 298~303.  
[5] Tsai H J, Saif Y M. Avian Dis., 1992(36): 415-422.  
[6] 周继勇, 叶伟成, 于涟, 等. 畜牧兽医学报. 1999, 30(6): 567~573.  
[7] 周继勇, 叶伟成, 于涟. 浙江农业大学学报. 1999, 25(1): 99-102.  
[8] 周继勇, 于涟, 叶伟成. 中国预防兽医学报, 1999, 21(1): 53~55.  
[9] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1996.  
[10] Ismail N M, Saif Y M, Wigle W L, et al. Avi. Dis., 1990(34): 141~145.  
[11] Ismail N M, Saif Y M. Avi. Dis., 1991(35): 460-469.  
[12] Hassan M K, AL-Natour M Q, Ward L W, et al. P. Avi. Dis., 1996, (40): 567~571.  
[13] Hassan M K, Nielsen C K, Ward L A, et al. Avi. Dis., 1996(40): 832~846.