

鸡马立克氏病(MD)的特异性诊断

Ⅱ、使用皮肤抗原作免疫扩散试验 诊断 MD 的研究

胡祥璧 徐宜为 付德霞
童昆周 林英华 刘春萱

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所)

(1980年7月14日收稿)

摘 要

使用从鸡马立克氏病病毒(MDV)实验感染鸡的主要羽毛区的皮肤制备的MD沉淀抗原,共检查了1,495只鸡。其中未感染MDV的健康鸡104只(全部阴性),实验感染MDV的鸡127只(72只阳性,占56.7%),火鸡疱疹病毒(HVT)免疫的鸡81只(全部阴性),实验感染鸡成髓细胞增生性白血病病毒(AMV)的鸡67只(全部阴性),实验感染鸡新城疫(ND)、传染性支气管炎(IB)和传染性喉气管炎(ILT)病毒的鸡各60只(全部阴性),未见MD发病鸡场的鸡624只(119只阳性,占19.1%),MD发病鸡场的鸡312只(168只阳性,占53.8%)。另外,还与英国的MD沉淀抗原对84份被检血清作了比较试验,皮肤抗原的反应强度较弱,但检出率与英国抗原完全一致。

试验证明,用MDV实验感染鸡的皮肤制备的MD沉淀抗原检查被检鸡的血清对MD的反应是特异性的。这种抗原不仅具有实际应用于MD诊断的价值,而且也可以应用于MD的流行病学调查。

Chubb和Churchill^[1](1968)用MDV严重感染的鸡肾细胞培养物制备抗原,研究了MDV实验感染鸡血清中的沉淀抗体,证明反应是特异性的,不与鸡的其它疱疹病毒(如ILTV等)发生交叉反应。Carrozzaetal^[2](1972)研究了从MDV实验感染鸡的皮肤中浸提可溶性抗原的方法。Sharma^[3](1975)认为这两种抗原都可以使用。我们考虑到从感染鸡的皮肤中浸提可溶性抗原的方法比较简单,不需要什么特殊设备,所以首先研究了应用这种抗原作免疫扩散试验诊断MD的可能性。

材 料 和 方 法

皮肤抗原:基本上参照Sharma^[3](1975)的方法,但有所改进,具体过程如下:1日龄白洛克鸡雏经腹腔接种0.3毫升冻存的MDV京-1株血浆毒(采自1978年做HVT疫苗的室内免疫试验前京-1株血毒测毒鸡)或0.2毫升新鲜全血毒,经观察一个半月以后,迫杀临床上发病的鸡,剪去主要羽毛区的羽毛,然后取下皮肤,剔除皮下结缔组

织和脂肪,称重,按1:1~1:1.5(重量/体积)的比例加入磷酸盐缓冲液(0.01M, pH 7.2),先用剪子剪碎后,用高速组织捣碎机(马力200W,周波50,每分钟速率8,000转)捣碎3~4分钟,然后将捣碎的皮肤组织在-30℃左右冻结,在室温融化,反复冻融4次。然后,以每分钟3,000转的速率离心20分钟,吸出中间层的液体作抗原使用。

病毒、鸡、已知阳性血清、凝胶平板及免疫扩散试验,都同前一报告。不同的地方是,在凝胶平板的中心孔中不是加已知的阳性血清而是加皮肤抗原,周围孔中交替地加已知阳性血清和被检血清,或全加被检血清。

结 果

皮肤抗原的抗原性强度:对先后制备的三批皮肤抗原制剂作了MDV抗原性强度测定,结果列于表1。从表1中可以看到,三批皮肤抗原制剂的抗原性强度基本上是一致的,没有明显区别。与羽髓抗原相比,皮肤抗原的抗原性强度显然弱得多;然而,根据对部分被检血清的检查结果来看,两种抗原的检出率却是一致的,只是羽髓抗原的反应较强,沉淀线更为清晰而已。我们还与英国MD沉淀抗原*作了对比试验,虽然英国制剂的抗原性强度明显地高于皮肤抗原,但检出率也完全一致(见表3),说明我们的皮肤抗原是可以应用的。

表1 皮肤抗原的抗原性强度测定结果

凝胶中的血清 浓度(%)	皮 肤 抗 原						羽髓抗原小孔
	1		2		3		
	小孔 ^A	大孔 ^B	小孔	大孔	小孔	大孔	
3	7.0 ^C	11.1	6.5	10.0		10.0	7.0
5	6.5	10.0	6.5	11.1	7.0	12.0	
10	6.0	10.0	6.0	10.0	6.0	10.0	7.0
15	5.5	10.0	5.0	10.0	5.0	9.0	7.0
20	5.0	8.0	4.5	8.5	4.0	9.0	8.0
30	4.0	7.0	4.0	7.0	4.0	7.0	10.5

A: 小孔直径3.0毫米。

B: 大孔直径6.0毫米。

C: 沉淀环的直径以毫米为单位。

皮肤抗原的特异性:用皮肤抗原先后检查了实验室的健康鸡、MDV感染鸡、HVT免疫鸡以及AMV、NDV、IBV和ILTV人工感染鸡。除MDV感染鸡外,其它各种受检鸡全部是阴性(表2)。为了进一步确定皮肤抗原的特异性,特与英国的细胞培养抗原对84只鸡的血清样品作了对比试验,结果列于表3。从表3中可以看出,两种抗原的特异性是很一致的。

MDV感染鸡的血清沉淀抗体的产生:

在试验过程中发现,MDV实验感染鸡在抗原检查呈阳性反应后,血清沉淀抗体检查却全都是阴性。为了明确血清沉淀抗体的产生动态,做了系统测定,结果列于表4。其中11只是接触感染鸡,其余20只鸡在1日龄经腹腔途径每只接种全血毒0.2毫升。从表

*由英国豪顿禽病研究所(Houghton poultry Research Station)赠送。

4 中可以看到, 直到41天才部份鸡产生可检的沉淀抗体, 51天时有 1/3 鸡呈阴性反应, 少数鸡直到 3 个月龄仍然是阴性, 说明在 MDV 实验感染鸡中, 沉淀抗体的产生是不很规律的。

应用于野外鸡群抽样检查的结果: 在实验室试验的基础上, 应用皮肤抗原对野外部份鸡群作了抽样检查, 结果列于表 5。各鸡场的不同鸡群其阳性反应率很不一致 (0~75%), 但也可以说明, MDV 在受检地区的鸡群中的传播十分广泛。

表 3 皮肤抗原与英国 MD 沉淀抗原的对比试验

受检鸡类型	受检鸡数	受检鸡血清在免疫扩散试验中的反应			
		皮肤抗原		英国抗原	
		阳性	阴性	阳性	阴性
实验感染鸡	14	5	9	5	9
野外发病鸡 (1)	11	1	10	1	10
野外发病鸡 (2)	59	43	16	43	16
总 计	84	49	35	49	35

表 2 对实验室各种类型鸡血清中 MDV 沉淀抗体的检查结果

类 别	鸡数 (只)	接毒途径/日龄	受检日龄	阳性反应数 (只)	阳性率 (%)
MDV 感染鸡	127	腹腔*/1~2	36~102	72	56.7
健康鸡	104		40	0	0
HVT 免疫鸡	81	腹腔/1~3	20~38	0	0
AMV 感染鸡	67	皮下或肌肉/2	22~31	0	0
NDV-IV 系免疫鸡	60	滴鼻/14**	28	0	0
IBV 感染鸡	58	气管/14	28	0	0
ILTV 感染鸡	39	气管/14	28	0	0

* 其中有 10 只是 1 日龄同居接触感染鸡。

** 在 14 日龄前已作过一次饮水免疫。

表 4 MDV 实验感染鸡血清沉淀抗体定期检测结果

反应类型	时间 鸡数(只)	感染后的天数							
		21	31	41	51	61	71	81	91
阴 性	31	27	17	12	10	11	12	5	2
阳 性	0	0	6	11	10	7	5	9	6
死 亡	0	4	4	0	3	2	1	3 ^a	6 ^b

a. 其中自然死亡 2 只, 迫杀 1 只。

b. 其中自然死亡 3 只, 迫杀 3 只。

表 5 对野外部份鸡群抽样检查的结果

类 别	鸡数(只)	鸡 龄	品 种	阳性反应数(只)	阳性率(%)
未见发生 MD 的鸡群	378	约 30 天	白洛克	0	0
	196	87 天	白洛克	93	47.4
	50	5~6 个月	白洛克	26	52.0
流行过 MD 的鸡群	20	6~7 个月	白洛克	15	75.0
	49	约 70 天	白洛克	5	10.0
	195	约 70 天	白洛克	123	68.2
	48*	约 12 个月	二八八	25	52.0

* 这 48 只鸡是由黑龙江八一农垦大学牧医系的张桂香等同志检查的。

讨 论

到目前为止,国外关于MD的特异性诊断虽然报告了许多种方法^[4-10],然而应用于现地MD诊断的主要是检查血清沉淀抗体的免疫扩散试验。虽然有人认为细胞表面肿瘤特异性抗原是诊断MD的最有价值的标准,但据Calnek和Witter^[11](1978)介绍,由于该抗原的特异性抗血清难于制备,加之在肿瘤细胞上这种抗原出现的频率既低而又变化不定,所以目前尚难实际应用。

在MDV感染鸡中,虽可产生特异性沉淀抗体,但似乎不很规律。在Chubb和Churchill^[1](1968)的报告中,一次接种的9只试验鸡在4周龄检查时,死亡2只,2只阳性,4只阴性;到第5周龄(试验期结束),在存活的3只鸡中,也只有1只阳性,2只仍为阴性。他们认为这是由于MDV急性毒株感染使淋巴器官产生早期病理变化,而引起无免疫反应所致。在我们的大量试验中,也同样是这种情况。正如表4所示,在4周龄以后(31天)尽管已发病死亡4只,但没有1只鸡出现可检出的沉淀抗体,直到41天检查时才有部份鸡出现此抗体,少数鸡甚至直到91天仍未产生。这种情况除可能与我们所用的毒株及感染剂量有关外,是否有其它因素干扰还不清楚。

在MDV实验感染鸡中,沉淀抗体的检出率是如此之低(38.5—75.0%),以致使我们对皮肤抗原的抗原性产生了怀疑。然而,用同样的抗原检查野外未见发生MD的鸡群时,阳性反应率却相当高(47.4~52.0%),这说明不是皮肤抗原本身的问题(特别是后来与英国的MD沉淀抗原所作的对比试验更证实了这一点),而是有的严重感染鸡的确无可检出的沉淀抗体。不仅在实验感染MDV的鸡中是这样,而且在野外的MD病鸡中也存在这个问题。例如,我们在外检鸡中就遇到过临床上严重发病的鸡,MDV抗原检查呈阳性反应,而血清沉淀抗体检查却是阴性。另一方面,在MDV隐性感染鸡中,血清沉淀抗体的检出率却很好。例如,在未见发生MD的某鸡场,抽检201只87日龄的鸡中,抗原检查仅有17只阳性(占8.45%),其中有196只做了抗体检查,呈阳性反应的就有93只(占47.4%)。所以我们认为,检查沉淀抗体的方法除可应用于MD发病鸡群的定性诊断外,更适合于MDV隐性感染鸡群的流行病学调查。

参 考 文 献

- [1] Chubb, R.C. and Churchill, A.E. (1968). Precipitating antibodies associated with Marek's disease. *Vet. Rec.*, 83 (1): 4~7.
- [2] Carrozza, J.H. et al. (1972). Transmission of Marek's disease by shedder chickens: Extraction of virus and soluble antigen from skin. *Am. J. Vet. Res.*, 33 (7): 1499~1506.
- [3] Sharma, J.M. (1975). Marek's disease, In «Isolation and identification of avian pathogens», Edited by Stephen B. Hitchner (edit.). *Am. Assoc. Avian pathol.*, PP.235~250.
- [4] Purchase, H.G. and Burgoyne, M.S. (1970). Immunofluorescence in the study of Marek's disease: Detection of antibody. *Am. J. Vet. Res.*, 31: 117~123.
- [5] Marquardt, W. W. et al. (1972). Radial immunodiffusion: A simple and rapid method for detection of Marek's disease antigen(s). *Appl. Microbiol.*, 23 (5): 942~945.
- [6] Eidson, C.S. and Schmittle, S.C. (1969). Studies on acute Marek's disease. II. Detection of antibodies with a tannic acid indirect hemagglutination test. *Avian Dis.*, 13 (4): 774~782.
- [7] Marquardt, W.W. and Newman, J.A. (1972). A modified direct complement-fixation test for detection of Marek's disease antibodies in chicken serum. *Avian Dis.*, 16 (5): 986~996.
- [8] Ramachandra, R.N. and Reghavan, R. (1977). Detection of MDV antigens in blood smears by immuno-peroxidase test. *Indian Vet. J.*, 54 (6): 428~430.
- [9] Haider, S.A. et al. (1970). Use of feathers in a gel precipitation test for Marek's disease. *Poultry Sci.*, 49 (6): 1654~1656.
- [10] Schat, K.A. and Calnek, B.W. (1978). Demonstration of Marek's disease tumor-associated surface antigen in chickens infected with nononcogenic Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys. *J. Nat. Cancer Institute*, 61 (3): 855~857.
- [11] Calnek, B.W. and Witter, R.L. (1978). Marek's disease, in «Disease of Poultry», 7th edition, Edited by M.S. Hofstad, et al., Iowa state University Press. PP.385~418.

注: 李春风、朴钟洙、徐泉兴等同志参加了部分工作。广东省兽医防疫站张泽纪、陈兆珍等同志以及广州市郊区防疫站苏继联同志参加了采集部分正在发生MD的鸡群的血清。

IMMUNODIFFUSION TEST FOR THE SPECIFIC
DIAGNOSIS OF MAREK'S DISEASE
IN CHICKENS

II. THE USE OF SKIN EXTRACTS AS ANTIGENS

Hu Hsiang-Pih Siu Yi-Way Fu Te-Shia

Tong Kwen-Chiao Lin Yin-Hua Liu Chuen-Suen

(*Harbin Veterinary Research Institute, Chinese*

Academy of Agricultural Sciences, Harbin, China)

Summary

Sera from 1,447 chickens were examined by the immunodiffusion (ID) tests with the skin extracts from chickens artificially infected with Marek's disease virus (MDV) as the precipitating antigens. The results of the experiments showed that sera from 104 healthy chickens were all negative to the test; of 127 chickens artificially infected with MDV, 72 (56.70%) were positive; 81 chickens immunized with the herpesvirus of turkeys (HVT) were all negative; 67 chickens infected with avian myeloblastosis virus were also all negative; of a total of 180 chickens, 60 were artificially infected with New castle disease virus, 60 with avian infectious bronchitis virus and 60 with laryngotracheitis virus, and they all gave negative results; of the 624 chickens from farms without Marek's disease (MD) occurring, 119 (19.10%) were positive; and of the 264 chickens from farms suffering from outbreaks of MD, 143 (54.20%) were positive.

In order to compare the sensibility of our antigen with the one kindly supplied to us by the Houghton Poultry Research Station, U.K., 84 serum samples were examined simultaneously with these two antigens. The results showed that the intensity of reaction induced by our antigen was weaker than the British one, but the percentages of positive reactions given by both antigens were the same.

The results of above-mentioned experiments proved that the MD precipitating antigen prepared from the skin extracts of chickens experimentally infected with MDV gave specific reactions against MD antiserum in the ID test for the diagnosis of MD. The simplicity and reliability of the test render it suitable for the survey of latent MD infections in chickens under field conditions.