

鸡马立克氏病 (MD) 的 特异性诊断

I、使用已知阳性血清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

使用已知抗马立克氏病病毒 (MDV) 血清进行免疫扩散试验, 共检查了1,933只鸡的羽髓材料, 其中未感染MDV的健康鸡104只 (全部阴性), 实验感染MDV的鸡475只 (469只阳性, 占98.73%), 火鸡疱疹病毒 (HVT) 免疫的鸡56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107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), 非MD发病鸡场的鸡545只 (19只阳性, 占3.48%), MD发病鸡场的鸡466只 (252只阳性, 占54.08%)。在实验感染鸡中, MDV羽髓抗原的最早检出时间大约在感染后的第13~14天, 最适检出时间大约在20~30天。临床耐过鸡的羽髓抗原检出率随时间的延长而降低。

另外, 把在非MD发病鸡场检出的羽髓抗原阳性鸡的抗凝全血接种于5日龄的鸡胚卵黄囊, 接种后14天检查绒毛尿囊膜, 在大多数接种胚中可见典型的病毒痘斑, 说明羽髓抗原阳性鸡的血流中确实含有MDV; 也就是说, 用已知MDV阳性血清检查羽髓抗原来诊断MD的免疫扩散试验是特异而可靠的。

近年来, 许多研究者就MD的特异性诊断已进行了广泛的研究, 其中有琼脂凝胶免疫扩散试验^[1-4]、间接红细胞凝集试验^[5]、补体结合试验^[6]、免疫荧光试验^[7]以及免疫过氧化物酶技术^[8]等。在这些方法中, 显然以第一种方法最为简便, 且易于推广使用。我们在实验室条件下进行了这一技术应用于MD诊断的研究。本文仅报告使用已知抗MDV血清检查MDV抗原以诊断MD的结果。

材 料 和 方 法

病毒: MDV—在液态氮中冻存六个半月的京-1株强毒第31代血浆毒*, 复归1日龄白洛克鸡雏后, 在鸡体保毒并供试验用。AMV—由我所第十一研究室遗传工程课题

* 采自1978年做HVT疫苗的室内免疫试验前京-1株血毒测毒鸡。

组提供, 从中国科学院上海生物化学研究所引进后在鸡体传 2 代的血浆毒, 使用时 2 倍稀释。NDV—由我所第三研究室新城疫课题组提供, 系 IV 系疫苗毒, 使用时 15 倍稀释。IBV—由我所第三研究室传染性支气管炎课题组提供, 系上海鸡胚强毒第 17 代 (SE17)。ILT—由我所第四研究室提供, 系从哈尔滨王岗分离的鸡胚强毒 (王 ILTEV), 使用时 10 倍稀释。HVT 系从法国引进的 FC—126 株, 由本课题组制备的冻干的疫苗种毒。

鸡: 实验室用鸡全部是白洛克品种, 来源于哈尔滨市甲鸡场和乙鸡场。

阳性血清: 用实验感染 MDV 京—1 株强毒鸡的血清作已知阳性血清。

琼脂凝胶平板: 使用从日本进口分装的琼脂粉, 先用蒸馏水配制成 0.2~0.3% 的稀琼脂溶液, 把用于制备凝胶板的培养皿覆盖一层薄薄的琼脂膜 (对 85 毫米左右直径的培养皿, 每个加 3 毫升), 放 37°C 温箱使充分干燥。然后, 用含 8% NaCl 的磷酸盐缓冲液配制的 1% 琼脂溶液制备琼脂凝胶平板; 每个覆盖了琼脂膜的培养皿可加 18 毫升左右的 1% 琼脂, 在室温平放静置使之冷凝。然后, 按所需图型打孔。每组 7 个孔: 一个中心孔 (加已知阳性血清), 直径约 6 毫米; 周围 6 个加样孔, 直径约 3 毫米, 孔距约 3 毫米; 每个平板可打 4~5 组孔。

免疫扩散试验: 采集被检鸡的羽毛并制备被检的羽髓材料, 用巴氏滴管加到加样孔中, 以加满为度。中心孔加入已知阳性血清。每组孔全加完后, 把培养皿放在一个湿盒内, 35°C 左右孵育 12 小时至 3 天判定结果。

鸡胚卵黄囊接种试验: 种卵购自哈尔滨市某鸡场未接种过任何疫苗的专供试验用种卵的鸡群。任选 12 只来自某鸡场的外观健康 (事后剖检未见 MD 肉眼病变) 但 MDV 抗原检查呈阳性反应的鸡, 无菌采集枸橼酸钠抗凝全血, 分别接种于 5 日龄鸡胚的卵黄囊。每份血样接种 6 个胚, 每胚接种全血 0.4 毫升。对照组包括强毒对照组 (接种实验感染 MDV 京—1 株强毒并在临床上发病鸡的全血)、试剂对照组 (接种抗凝剂) 和空白对照组。除空白对照组外, 每组接种的胚数、途径和剂量同上。接种后 14 天检查绒毛尿囊膜上有无 MDV 引起的痘斑。

结 果

一、特异性试验: 先后做了两批实验室隔离饲养的健康鸡, 计 104 只, 全部呈阴性反应 (图 1)。先后做了六批实验接种 MDV 京—1 株强毒的感染鸡, 计 480 只, 几乎全部呈阳性反应, 阳性反应率平均为 98.73%。两者的详细结果见表 1。

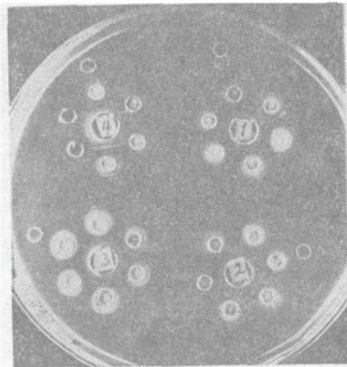


图 1 MDV 抗原检查部分健康鸡的结果。每组孔旁边附加的小孔表示开始加样孔。第四组中从开始加样孔起顺时针数第 3、4 加样孔中是实验感染 MDV 鸡的抗原材料。

表1 MDV感染鸡和未感染鸡的羽髓材料检查结果

组别	试验序号	鸡数 (只)	接种强毒* 日龄/剂量(毫升)	受检日龄	阳性反应数 (只)	阳性率 (%)
未感染鸡	1	57		40	0	0
	2	47		40	0	0
	合计	104			0	0
感染鸡	1	20	1/0.2	41	15**	100.00
	2	69	1/0.2	26—40	66	95.65
	3	47	43/0.2	57	46	97.87
	4	110	30/0.2	50	110	100.00
	5	117	31/0.2	51	117	100.00
	6	117	32/0.2	52	115	98.29
	合计	480			469	平均 98.73

* 新鲜全毒, 经腹腔接种。

** 在检查前已死亡5只。

另外, 我们还对 AMV、NDV、IBV、ILTV 感染鸡及 HVT 免疫鸡进行了试验。先后共检查了 107 只实验感染 AMV 的鸡, 180 只分别实验感染 NDV、IBV 和 ILTV 的鸡。结果见表 2 和图 2。

表2 抗MDV血清与AMV、NDV、IBV和ILTV实验感染鸡及HVT免疫鸡的羽髓的反应结果

组别	鸡数 (只)	鸡龄 (天)	接毒剂量 (毫升)	接毒途径	受检时间 (天)	结果
AMV	47	2	0.1	皮下或腹腔 皮下或肌肉	14	—*
	60	2	0.1—0.2		22	—
NDV	60	14	2滴**	滴鼻	7	—
					16	—
IBV	60	14	0.3	气管	7	—
ILTV	60	14	0.2/10 ⁻¹	气管	7	—
HVT	18	1	0.3†	腹腔 腹腔	24	—
	38	8	0.2		21	—

* “—”表示呈阴性反应。

** 用1毫升注射器和6号针头滴鼻, 每侧鼻孔1滴。

† 每毫升含蚀斑形成单位(PFU)在10,000~40,000以上, 即每只鸡的接种剂量在2,000~12,000PFU以上。

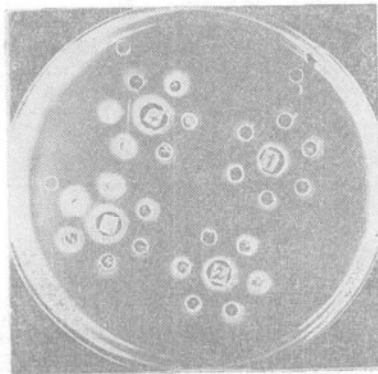


图2 部分实验感染 AMV 的鸡的羽髓材料检查结果。第四组中从开始加样孔起顺时针数第6加样孔中是实验感染 MDV 鸡的抗原材料。

鸡胚接种试验由于在接种后4天部分胚胎发生早期死亡,结果不够理想,但仍可以说明问题。在接种后14天所观察到的结果见表3。从表中可见,在最后受检的七个试验组的鸡胚中,除第4和第10组各剩一个早死胚的绒毛尿囊膜上无肉眼可见的痘斑外,在其它五个试验组的鸡胚中,大多数在绒毛尿囊膜上有典型的MDV病毒引起的痘斑(图3)。

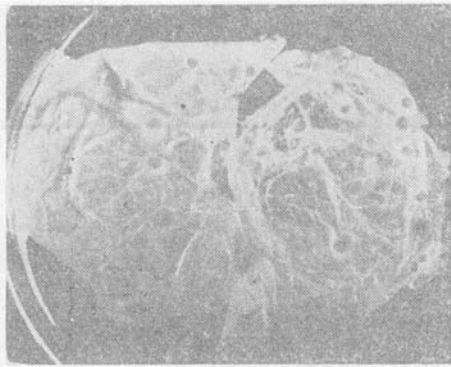


图3 鸡胚卵黄囊接种MDV抗原阳性鸡的全血后14天,在绒毛尿囊膜上形成的典型病毒痘斑。

表3 MDV抗原阳性鸡的全血接种鸡胚卵黄囊的结果

鸡号	接种物/剂量(毫升)	胚龄(天)	接种后4天胚死亡数(只)	接种后14天痘斑出现数(只)
1	全血/0.4	5	8	2/3*
2	全血/0.4	5	6	—
3	全血/0.4	5	4	2/2
4	全血/0.4	5	5	0/1
5	全血/0.4	5	1	5/5
6	全血/0.4	5	6	—
7	全血/0.4	5	6	—
8	全血/0.4	5	1	4/5
9	全血/0.4	5	6	—
10	全血/0.4	5	5	0/1
11	全血/0.4	5	2	3/4
12	全血/0.4	5	6	—
强毒对照	全血/0.4	5	6	—
抗凝剂对照	阿氏液/0.4	5	1	1/5**
空白对照	—	5	0	0/6

- * 分母为受检的胚数,分子为有病毒痘斑的胚数。
- ** 这只胚的痘斑都是针尖大小,灰白色,而试验组的痘斑大小不一,有的中间有小空洞。

二、敏感性试验:在上述实验感染并受检的475只鸡中,MDV抗原的平均检出率是98.73%(95.65—100.00%),各次试验鸡的检出率见表1。感染后,经过一定时间,可见MDV抗原的检出率有所降低。我们将最后一批实验感染鸡在做过MDV抗原检查后,留下一部分鸡作跟踪检查,其结果见表4。

表4 实验感染MDV后的天数与MDV抗原检出率的关系

项 目	感 染 后 的 天 数											
	20	36	39	42	47	52	55	58	61	66	72	80
阳性鸡数(只)	10	10	10	8	9	6	8	9	10	8	6	6
受检鸡数(只)	10	10	10	10	10	9	10	10	11	10	10	10
阳性率(%)	100	100	100	80	90	66.7	80	90	90.9	80	60	60

三、MDV抗原检出的最早时间:

在1日龄经腹腔接种MDV全血毒0.2毫升后,从第10天开始分组(每组6只鸡)进行检查,结果见表5。从表中可见,在实验感染鸡中,MDV抗原可检出的最早时间,是在接毒后的第13~14天,尽管这时仍有少数鸡可能呈阴性反应。所以,后来实验感染

鸡的 MDV 抗原检查时间, 适当延至接毒后的第20天进行。正如在表 1 中所看到的, 连续检查了三批试验鸡, 共计 344 只, 除一批中有 2 只呈阴性反应外, 其余 342 只全呈阳性反应, 说明选定这个检查时间是恰当的。

四、应用于野外鸡群的抽样检查

被检鸡选自未见爆发 MD 的鸡场和有 MD 流行的鸡场。在未见爆发 MD 的某鸡场中, 连续检查了三批大约一个月龄的幼鸡, 计 378 只, 其中发现 2 只呈阳性反应, 其余 376 只均呈阴性反应。接近 3 个月龄 (87 日龄) 的青年鸡, 共抽检了 201 只, 其中也只有 17 只呈阳性反应 (占受检鸡的 8.45%)。在曾发生过 MD 的某鸡场检查了 58 只大约四个多月龄的黄毛鸡、65 只大约 6—7 个月龄的黑毛鸡、20 只一年以上的老母鸡和 76 只其它各群的当年鸡。阳性反应率分别是: 79.3%, 15.4%, 0% 和 75.0%。在 MD 正流行的另两个鸡场中, 共抽检了 223 只, 阳性反应率平均为 54.08%。这些结果详见表 6。从表 6 中可以清楚地看到, 在不同类型的鸡场和鸡群中, 受检鸡的阳性率是显然不同的。

表 6 应用于野外鸡群抽样检查的结果

类别	组别	鸡数 (只)	鸡龄	品种	阳性数 (只)	阳性率 (%)	
未见发生 MD 的鸡场	1	110	30天	白洛克	0	0.00	
	2	117	31天	白洛克	1	0.85	
	3	117	32天	白洛克	1	0.85	
	4	201	87天	白洛克	17	8.45	
	合计	545			19	平均 3.48	
发生过 MD 的鸡场	甲	1	4 个多月	黄毛鸡	46	79.30	
		2	6—7 个月	黑毛鸡	10	15.40	
		3	4—7 个月	黄、黑、白	57	75.00	
		4	1—2 年	黄、黑	0	0.00	
		5	6—7 个月	白洛克	11	45.80	
	合计	243			124	平均 51.03	
	乙	1	47	71—74 天	白洛克	19	40.42
		2	176	76 天	白洛克	109	61.93
		合计	223			128	平均 57.40
		总计	466			252	总平均 54.08

• 此场在七、八月份发生 MD, 十月底采的病料。当时黄毛鸡发病较为严重, 而黑毛鸡发病较少, 外观也较好。

讨 论

根据以上试验结果, 我们认为琼脂凝胶免疫扩散试验检查 MDV 抗原是诊断 MD 的一个简单、易行而且可靠的方法。对实验室隔离饲养的健康鸡, 在 40 日龄时未检出 MDV 抗原, 而同群鸡在接毒后 14 天再检查时, 几乎全部转成阳性反应。从某鸡场买来的 30 日龄左右的 378 只鸡中, 接毒前检查有 2 只鸡呈阳性反应, 而在接毒后 20 天再检查时, 受检的 344 只鸡除 2 只仍是阴性反应外, 其余 342 只也全都转成阳性反应。另外, 由某鸡场

表 5 在实验感染鸡中 MDV 抗原检出的最早时间

接毒后天数	10	11	12	13	14
分组检查结果	0/6*	0/6	0/6	4/6	14/18

* 分母为受检鸡数, 分子为阳性反应数。

买来的87日龄的201只鸡,从17只阳性反应鸡中任取12只,宰杀剖检未见肉眼病变,而在生前采其抗凝全血接种5日龄鸡胚卵黄囊并在接种后14天检查时,绒毛尿囊膜上大多有典型痘斑(在形态上与Calnek和Witter^[9]所介绍的很一致)。尽管接种抗凝剂的对照组也有1只胚在绒毛尿囊膜上有大小均一的、针尖大小的灰白色病变,但它与试验组基本上呈圆形、大小不等的痘斑相比,有明显不同。这一情况的出现可能是由于该胚本身有问题,并不足以干扰对试验结果的解释。所以,试验表明,MDV抗原为阳性反应的鸡,在其外周血流中确实含有MDV;也就是说,通过本试验方法检查MDV抗原来诊断MD是可靠的。

在通常情况下,免疫扩散试验与其它免疫学方法相比,敏感性是较低的;然而,根据检查实验感染MDV的鸡的结果来看,这个问题并不明显。在我们统计的475只实验感染鸡中,MDV抗原的阳性检出率高达98.73%;而且在野外MD流行过的或正在流行的鸡场试验时,受检鸡群的平均阳性检出率也达到54.08%,证明该试验方法具有较高的敏感性。另外,从表6中还可以看到,两种不同类型鸡场的不同鸡群,其MDV抗原阳性率有明显的不同。这也在一定程度上反映了该试验方法的特异性,同时也说明,该试验方法不仅可用于MD急性流行时或急性流行后鸡群的定性诊断,而且也可以检出外观健康、但MDV严重感染的带毒鸡,这对减少鸡群环境中MDV的污染,无疑是十分有益的。

据Calnek和Witter^[9](1978)介绍,MDV进入鸡体后首先侵害脾、法氏囊和胸腺,在5~7天达高峰,在第二周期间产生持续的病毒血症,从而使感染扩散到各内脏器官和皮肤,并在羽毛囊上皮细胞中完成病毒复制。我们的试验结果与此很一致。我们在实验感染后的第13天检查,部分鸡已开始可检出MDV抗原,到第20天,几乎所有感染鸡都可检出这种抗原。

就目前所知,羽毛囊是MDV成熟并向外释放的主要场所。在Haider^[8](1970)的研究中,发现胫和股外侧的羽毛材料所含病毒抗原的量最高。可是要利用这两个部位羽毛作被检材料,在日龄上将受到很大限制,因为小鸡若不到一定日龄时,则这两个部位无可用的羽毛。我们所用的材料克服了困难,基本上不受日龄的限制。所以,这就大大提前了应用本方法诊断MD的有效时间,并扩大了它的使用范围,不论是半个月龄以上的雏鸡还是幼鸡或青年鸡,都可以使用此技术,而且检出率较高。这样,此试验不仅可以应用于MD的定性诊断,而且也可以用于实验鸡及HVT疫苗安检鸡的检查,从而大大缩短了这些鸡的观察期。

在鉴别诊断方面,我们先后对鸡的AM、ND、IB、ILT和HVT免疫鸡进行了试验,计343只鸡,全部呈阴性反应。IB和ILT的鸡在受检时虽只有7天,但这些鸡在实验感染后3天已大部分表现出各自的临床症状,如果这些病鸡的羽髓材料与抗MDV血清有交叉反应,这时应是反应的适期;然而,正如所预料的那样,这些鸡的羽髓材料均呈阴性反应。所以,试验证明,抗MDV血清对MD病鸡的羽髓抗原的反应是特异的,不与鸡的其它常见病毒病发生交叉反应,HVT免疫接种也不干扰MD的诊断。

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] 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.
- [3] Haider, S. A. et al. (1970). Use of feathers in a gel precipitation test for Marek's disease. *Poultry Sci.*, 49(6):1654~1656.
- [4] 藤川勇治等。(1979)。七面鳥ヘルペスウイルスによる凍結乾燥ワクチンの野外および実験室内接種試験: 接種鶏における抗体産生。日本兽医学杂志, 41(2):167~176。
- [5] Eidson, C. S. and Schmittle, S.C. (1969). Studies on acute Marek's disease. Ⅷ. Detection of antibodies with a tannic acid indirect hemagglutination test. *Avian Dis.*, 13(4):774~782.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Ramachandra, R. N. and Raghavan, R. (1977). Detection of MDV antigens in blood smears by immuno-peroxidase test. *Indian Vet. J.*, 54(6):428~430.
- [9] Calnek, B. W. and Witter, R. L. (1978). Marek's Disease. In «Diseases of poultry», 7th edition, pp. 385~418. Edited by M. S. Hafstad et al., Iowa State University press.

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的鸡群的材料。

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

I. THE USE OF MAREK'S DISEASE SPECIFIC ANTISERUM

Hu Hsiangpih Siu Yiway Fu Teshia

Tong Kwenchiao Lin Yinhua Liu Chuensuen

(*Harbin Veterinary Research Institute,*

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin, China)

Summary

The pulp of feathers from 1,933 chickens was collected and used to detect the Marek's disease (MD) antigen by the immunodiffusion (ID) test with MD specific antiserum. The results of the experiments showed that 104 healthy chickens all gave negative reactions; of the 475 chickens infected experimentally with Marek's disease virus (MDV), 469 (98.73%) were positive; the 56 chickens inoculated with the herpesvirus of turkeys (HVT) were all negative; the 107 chickens infected with avian myeloblastosis virus (AMV) were also negative; a total of 180 chickens in which 60 were infected with Newcastle disease virus (NDV), 60 with avian infectious bronchitis virus (IBV) and 60 with laryngotracheitis virus (LTV) all gave negative reactions; and of the 466 chickens from farms with outbreaks of MD, 252 (54.08%) gave positive reactions. MDV antigens could be detected from the feather tips as early as the 13th or 14th day PI, and most of them were detected 20-30 days PI which appeared to be the optimum time for running the ID tests. It has been found, however, that the percentage of MD detection in clinically convalescent chickens was reduced as the time of running the test was delayed.

In addition, when the blood from a positively reacted chicken to the ID test was inoculated into the yolk sacs of 5-day-old chick embryos, typical MDV pocks occurred on the chorioallantoic membranes of most of the embryos 14 days PI. It is thus suggested that the blood of chickens reacted positively to the ID test does contain MDV, and the ID test using MD antiserum to detect the MDV antigens in the pulps of feathers is specific and reliable for the diagnosis of MD in chickens.