

贵州鸡马立克氏病(MD)调查和诊断

吕昌琳 高登慧
(贵州农学院)

摘 要

通过琼脂凝胶免疫扩散试验(AGD)对贵州省八个地、州、市与外来鸡有接触的17个鸡场94群1905只鸡进行MD流行病学调查, 结果为阳性鸡场100%, 阳性鸡群90.42%, 阳性鸡25.72%。另对与外来鸡无接触来往的偏僻村寨7群148只鸡进行同样方法调查, 结果却全为阴性, 初步认为贵州的MD是由外来病鸡传入。

对AGD阳性鸡病料作了鸡胚、雏鸡接种, 细胞培养、荧光抗体试验、反向间接血球凝集试验(RIHA), 以确诊贵州的MD病鸡和带毒鸡。作者还提出RIHA是一种诊断MD特异、敏感、简便、快速的血清学检验方法, 在国内值得推广。

鸡MD是由马立克氏病疱疹病毒引起的一种具有高度传染性的肿瘤性疾病, 对养禽业危害极大。鉴于我省很多鸡场多次从死亡鸡只中发现内脏肿瘤病例, 而国内尚未见到用RIHA诊断MD的报导和对MD病鸡来源问题调查, 故我们对该病在贵州的分布进行了调查和综合性诊断, 并对RIHA及其它诊断方法进行了比较。

材 料 和 方 法

一、材料

- (一) 试验鸡群来自贵阳、遵义等地17个鸡场和偏僻村寨土鸡群。品种包括来航、白洛克、中原红、康立西、贵农黄、贵州黄和本地鸡等。
- (二) MD阳性抗原和血清(购自哈尔滨兽研所)。
- (三) 鸡胚和雏鸡(由本院鸡场提供)。
- (四) MD免疫血清: 本地MD耐过鸡血清。
- (五) 灭能犊牛血清: 贵阳医学院赠送。
- (六) 199: 日本制药株式会社产。
- (七) 胰酶: 新疆伊犁地区肉联厂生化制药厂。
- (八) 异硫氢酸荧光黄(FITC): 购自上海。
- (九) Sephadex G-25: 上海市兽科所赠送。
- (十) BMDF37: 中监所种毒, 购自北京兽研所。
- (十一) 鸡新城疫种毒(NDVF₄₈), 鸡传染性喉气管炎强毒(ILTA96E₂), 鸡巴氏杆

* 本研究得到贵阳医学院黄降珠、董熙昌副教授、贵州省兽医研究所韦瑞祥副研究员, 贵阳医学院祝家乃老师指导, 贵州农学院何仲光, 许乐仁老师协助进行病理组织学检查, 陶玉顺同志参加部分工作, 特此致谢。

** 本文于1986年3月3日收稿。

菌C₄₈₋₁，购自中监所。

二、方法

(一)流行病学调查：用常规羽囊和血清琼扩方法进行。

(二)感染试验：三只双阳性鸡采血致死剖检，并制备白细胞液、组织悬液、羽根浸液，加双抗(500单位和0.5mg/ml)作用后常规细菌学检查为阴性。用此三液分别接种鸡胚和一日龄雏鸡，并设对照组。

(三)病理学检查：三只双阳性鸡和感染试验死亡雏鸡作常规大体及病理组织学检查。

(四)细胞培养：用感染试验雏鸡(GMDF₂贵州毒第二代)、阳性对照雏鸡(BMDF₃₉)，阴性对照雏鸡的肾进行冷消化法、细胞培养，观察其生长及病变情况。

(五)荧光抗体试验：自制MD荧光抗体对GMDF₂、BMDF₃₉、自然病鸡，阴性对照鸡各内脏器官冰冻切片和白细胞层抹片染色镜检。

(六)RIHA及血球凝集抑制试验：用玻珠脱纤法获取绵羊红血球后，按常规法制备10%双醛化绵羊红血球。测定致敏红血球的最适MD免疫球蛋白浓度。再按常规微量术式进行RIHA，以测定GMDF₂、自然病鸡、BMDF₃₉、阴性对照鸡及人工接种NDVF₄₈、ILTA96E₂、鸡巴氏杆菌C₄₈₋₁发病鸡羽根浸液、白细胞冻融裂解液的血凝价，并用MD免疫血清和提取的MD蛋白液参与血凝抑制试验。

结 果

一、流行病学调查 八个地区17个鸡场94群1905只鸡，结果为：MD阳性鸡场100%，阳性鸡群90.42%，阳性鸡25.72%，其中血清阳性率24.3%，羽囊阳性率7.0%，双阳性率3.51%，(表1)。

MD来源的调查：调查了基本上与外来鸡无接触来往的5个偏僻村寨土鸡群7群148只，结果羽扩、血扩全部阴性，结合琼扩调查与外来鸡密切接触的城镇鸡群MD阳性率较高，初步认为我省的MD由外来病鸡传入。

二、感染试验 接种73个鸡胚，存活的28个中有63%的绒毛尿囊膜上出现均匀分散针头大至2毫米大的、数量不等的(1~1224个)灰白色痘斑，其中有10个以上的占32%。对照胚(4只)绒毛膜上均无痘斑，表明被检鸡感染MDV(图1、2)。

接种的43只一日龄雏鸡两周后陆续发病死亡。临床出现精神沉郁，肢体麻痹等症状。45日龄血清琼扩阳性率为75%。死亡雏鸡常规细菌学检查未见致病菌。25天后的病、死鸡内脏器官出现MD早期组织学病变。经检查的13只中有9只的肝(6例)、心(4例)、肾(2例)、肺(1例)、见有肿瘤性淋巴细胞浸润或灶状聚集(图3、4、5)。肿瘤细胞多为小型淋巴细胞，也有少数中型及大型淋巴细胞。一例法氏囊可见少数滤泡中心坏死(图6)。10只同龄对照鸡健活，琼扩阴性。未见组织学病变。

三、病理学检查 三只双阳性鸡中有两只内脏器官出现类似感染试验雏鸡的组织学病变(图7)。

四、细胞培养 GMDF₂雏鸡肾细胞培养24小时长成单层，四天开始见疏散的折光性强的细胞及灶病细胞病变，10~16天左右见有葡萄状病变细胞，与阳性对照(BMDF₃₉)

传代鸡肾病变一致。健康对照鸡肾细胞24小时长成致密单层,以后未见细胞病变。

五、荧光抗体试验 用荧光抗体技术检查 GMDF₂ 和自然病鸡冰冻切片,见羽囊上皮细胞浆和羽根角化上皮及白细胞浆内出现明显黄绿色荧光。与阳性对照鸡(BMDF₃₉)所见荧光一致。其它脏器及阴性对照鸡各脏器切片和人工接种 NDVF₄₈, ILTA96E₂、鸡巴氏杆菌C₄₃₋₁发病鸡的白细胞层抹片均未见特异性黄绿色荧光。

表1 贵州省鸡群MD流行病学检查结果

鸡场名	检查鸡群	检查鸡数	MD血扩+		MD羽扩+		总阳性		双阳性	
			羽数	%	羽数	%	羽数	%	羽数	%
鸡场一	6	139	10	7.19	检10	全-	10	7.20	0	0
鸡场二	4	85	31	36.47	检73	全-	31	36.47	0	0
鸡场三	2	70	7	10.00	检40	全-	7	10.00	0	0
鸡场四	12	320	97	30.31	检207	11只+ 5.31	101/320	31.56	7	3.38
鸡场五	1(8000多只)	40	11	27.50	未检	-	11	27.50	-	-
鸡场六	25	204	65	31.86	检146 5	3.42	67	32.84	3	2.05
鸡场七	1	20	14	70.00	检20 1	5.00	14	70.00	0	0
鸡场八	11	287	20	6.97	检18	全-	20	6.97	0	0
鸡场九	2	125	1	0.80	检125	全-	1	0.80	0	0
鸡场十	1	46	9	19.50	检46	全-	9	19.50	0	0
鸡场十一	2	37	9	24.32	检37	全-	9	24.32	0	0
鸡场十二	1	71	7	9.85	检71	全-	7	9.85	0	0
鸡场十三	5	45	23	51.11	检45 12	26.70	23	51.11	0	0
鸡场十四	5	64	30	46.87	检64 7	10.93	30	46.87	7	10.93
鸡场十五	15	347	128	34.00	检252 44	17.46	149	43.00	23	9.12
鸡场十六										
鸡场十七	1	5	1	20.00	检5	全-	1	20.00	0	0
合计	94	1905	463	24.30	检1139 80	7.02	490	25.72	检1139 40	3.51

注: 一个鸡血清琼扩阳性或羽扩阳性或双阳性均算作一个阳性。

六、RIHA及血凝抑制试验 致敏1%绵羊红血球的MD免疫球蛋白最适浓度为20mg/ml,该致敏血球均能凝集BMDF₃₉、GMDF₂、自然MD病鸡阳性羽浸液及白细胞裂解液,凝集价分别为2~32X,32~512X,2~512X。健康鸡羽浸液及白细胞裂解液不凝集致敏血球(表2)。

该阳性羽浸液及白细胞裂解液(均为2~1024X稀释)的血凝分别被MD免疫血清(琼扩效价16~32X)和每毫升含45.63mg的MD免疫球蛋白抑制。对照孔不抑制。人工接种鸡巴氏杆菌C₄₃₋₁、NDVF₄₈、ILTA96E₂发病鸡羽浸液和白细胞裂解液RIHA全部阴性,说明RIHA诊断MD有特异性。

表2 RIHA 检查 MD 结果

被 检 鸡	羽根浸液		白细胞裂解液		双 阳 性		总 阳 性		阴 性	
	阳性数	%	阳性数	%	数	%	数	%	数	%
2 (BMDF ₃₉)	1 (32x)	50	1 (2x)	50	0	0	2	100	0	0
3 (GMDF ₂)	3 (32~512x)	100	未 做				3	100		
2 ⁵ (自然病鸡)	10 (2~512x)	40	11 (2~16x)	46	2 (2/25)	8.0	21	84	2	8
合 计 30只	14	46.6	12	40	2 (2/27)	7.4	26(26/30)	86.6	2 (2/30)	6.6
4 (健康对照)	0	0	0	0						

RIHA诊断MD敏感性试验: RIHA和AGD两种方法同时检查36份病料, 其中34份结果一致, 两者符合率达94.4%, RIHA检出率为77.7%(28/36), AGD为72.2%(26/36), RIHA比AGD检出率高5.5%(表3)。从表3看出, RIHA比AGD敏感32~512X。另外, BMDF₃₉和GMDF₂阳性羽浸液置普通冰箱112天后AGD已转为阴性, 而RIHA仍为阳性。又AGD双阴性的4只鸡中RIHA检出1只阳性。以上说明RIHA诊断MD具有高度的敏感性。

表3 RIHA和AGD同时检查鸡羽浸结果

被 检 鸡 数	AGD	RIHA	结 果 比 较
3 (GMDF ₂)	3 +	3 + (32~512x)	一 致
2 (BMDF ₃₉)	1 +	1 + (32x)	一 致
GMDF ₂ 和BMDF ₃₉ 阳性羽浸液在冰箱112天	全 部 -	全部 + (32x)	R比A敏感32x
9 (自然病鸡)	9 + (原液~16x)	9 + (256~512x)	R比A敏感32~512x
12 (自然病鸡)	12 - (血扩12+)	12 -	一 致
4 (随机抽检)	4 -	3 -, 1 + (2x)	3/4一致, 1/4R比A敏感2x
2 (鸡巴氏杆菌C ₄₈₋₁ 人工接种病鸡)	2 -	2 -	一 致
2 (NDVF ₄₈ 人工接种病鸡)	2 -	2 -	一 致
2 (ILTA96E ₂ 人工接种病鸡)	2 -	2 -	一 致
合 计 36	26 + 检出率72.2%	28 + 检出率77.7%	R比A检出率高5.5% R比A敏感32~512x

小 结 与 讨 论

一、本研究以琼扩进行MD流行病学调查, 人工感染试验(鸡胚、雏鸡接种)、病理组织学检查、细胞培养、荧光抗体试验, RIHA等阳性结果, 结合我省鸡场有内脏肿瘤病例, 综合确诊贵州省有MD病鸡和MD带毒鸡, 感染率在0.8~72%。

二、用以上几种方法同时诊断MD其结果相互吻合。经过比较, 首次提出RIHA是检查MD的一种特异、敏感、简快的血清学方法, 可用于鸡群检疫。但一般认为致敏血球制作方法复杂, 要求条件也较为严格, 因此不易推广。我们认为RIHA是免疫学历史上的一种新技术, 只要将致敏血球冻干保存, 不要使用者自己制备, 此法是能够和值得在生产实践中推广应用的。

三、在国内首次用调查数据提出MD由外来病鸡传入问题, 为国内建立SPF鸡群提供了线索和依据。但数据还不够充分, 有待进一步补充。

四、从血清效价高的耐过病鸡中提取标记FITC和致敏1%红血球用的免疫球蛋白比从人工高免的血清中提取方便适用。因为人工免疫原(即鸡胚绒毛尿囊膜上的MD痘斑)量少而不易获纯,用它作免疫原费时费材费力,效价也不易提高。而在阳性鸡场中,特别在老疫场中挑选琼扩效价高的鸡是较易的。

参 考 文 献

- [1] 区宝珩, 1984, 国内外禽病研究的现状与展望, 农牧情报研究(中国农业科学院情报研究所), 5页。
 [2] 胡祥璧, 1979, 鸡马立克氏病, 科学出版社, 北京。
 [3] 鸡马立克氏病会战小组, 1979, 鸡马立克氏病一科研会战资料汇编, 哈兽研所出版。
 [4] 胡祥璧等译, 1980, 禽病学, 第七版上册 477~487。
 [5] 王殿瀛, 鸡马立克氏病的诊断与防制, 中国人民解放军兽医大学编印, 19页。
 [6] 朱维正, 免疫荧光技术的进展及应用, 中国人民解放军兽医大学印刷厂。
 [7] K. Nazarian, 1977. Marek's disease Lymphoma of chicken and its Causative herpesvirus. Biochimica et Biophysica Acta, 560: 375~395。
 [8] 吕昌琳, 1986, 鸡马立克氏病的诊断与防制(综述)。山东畜牧兽医, 30页。

中国畜牧兽医学会第七届理事会名单

理 事 长

陈凌风

副 理 事 长

刘 江 陈耀春 胡祥璧 徐 矶 蒋次升 于 船 冯仰康 杨 凤 梁克用 陈永侗

常 务 理 事: (按姓氏笔划为序)(32人)

于 船 王树信 王伟琪 王 前 刘 江 刘 恒 刘土珍 安 民 冯仰康 冯洪辉 任继周
 陈凌风 陈耀春 陈永侗 何家栋 吴兆麟 邱振远 沈启新 张峨生 杨忠源 杨 凤 胡祥璧
 赵鸿森 徐 矶 崔砚林 袁庆志 徐文光 梁克用 常景奋 龚成润 董 伟 蒋次升

秘 书 长:

王 前

副 秘 书 长:

刘 恒 杨忠源 阎汉平

理 事: (按姓氏笔划为序)(125人, 另台湾省保留2人)

于 船 于文蕴(满族) 门常平 王守清 王庆镐 王永康 王丕建 王 前 王德镛 王伟琪
 王之琦 王树信 王兆琨(女) 王洪章 王无怠 王玉嵩 方德罗 方国玺 尤 珩 尹凤阁
 尹德华 孔繁瑞 刘丙权 刘兴汉 刘学尧 刘瑞三 刘振乾 刘昌谋 刘 江 刘土珍 刘 恒
 刘身庆 刘守仁 甘永祥 冯洪辉 冯广仁 冯仰康 石惠英(女) 司马义·伊布拉音(维族)
 史振心 关亚农 朱维正 阮德成 孙 英 朱宜人 安 民 任继周 吴富融 吴兆麟 吴 英(女)
 沙 里(蒙族) 余世俊 杨继宗 杨兴业 杨忠源 杨凤(纳西族) 陈海云 陈凌风 陈万芳(女)
 陈幼春 陈永侗 陈耀春 陈正伦 陈才兴 李永禄 李振清 李兰香(女) 李志农 李震钟
 李希斌 张九如 张峨生 张中行 张 岳 张法颜 沈启新 何家栋 邱振远 汪世昌 沈正达
 宋征祥 杜希孔 林藩平 金大轮 费恩阁 金光钧 周凤禄 拉巴多吉(藏族) 姜殿武 姜云观
 洪廷范 施启顺 赵鸿森 骆承庠 祝寿康 胡祥璧 郭宗一 郭传甲 袁庆志 袁光达 阎汉平
 徐文光 徐 矶 贾大瀛 郭玉璞(满族) 崔砚林 湛业勤 黄金顺 黄昌炳 梁克用 盛志廉
 常景奋 黄焕深 黄树连(壮族) 龚成润 谢三星 蒋次升 童碧泉 彭宏泽 傅寅生 董 伟
 霍澍田 赖家凯 严若愚 冀锡霖

(下接第47页)

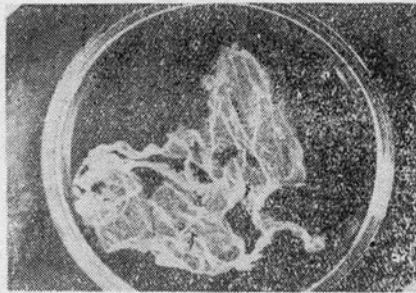


图1 接种鸡胚绒毛尿囊膜上出现灰白色痘斑

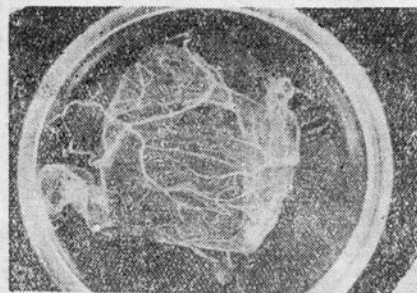


图2 未接种的鸡胚绒毛尿囊膜上无灰白色痘斑

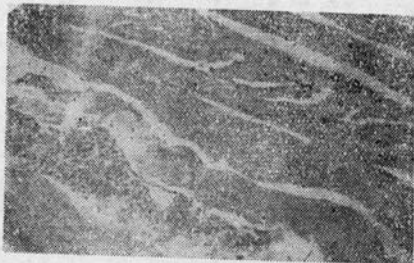


图3 接种GMDF25天后死亡的雏鸡心肌纤维间大量肿瘤性淋巴细胞灶状集聚

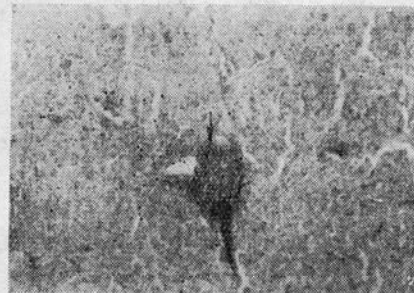


图4 MD琼扩阳性的自然病鸡肝小叶内或汇管区淋巴细胞增生呈结节状

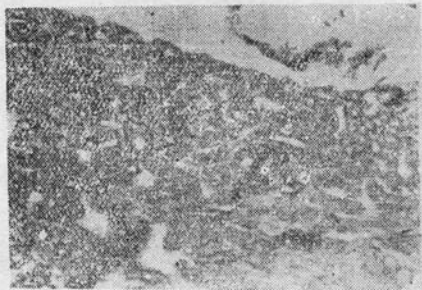


图5 MD琼扩阳性自然病鸡肾小管间淋巴样细胞增生呈结节状

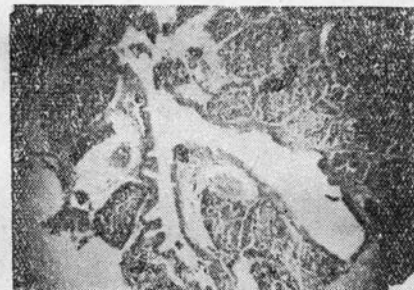


图6 接种GMDF₁₂₅日后死亡雏鸡法氏囊示淋巴滤泡坏死

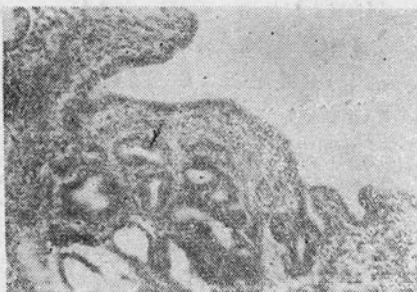


图7 MD琼扩阳性的自然病鸡法氏囊间质内淋巴细胞增生淋巴滤泡萎缩形成单层上皮的囊腔

INVESTIGATION AND DIAGNOSIS OF MAREK'S DISEASE IN GUIZHOU CHICKEN

Lu Changlin, Gao Denghui

(*Guizhou Agricultural College Guiyang, Guizhou Province*)

Summary

The epidemiological investigation of Marek's disease(MD) in 8 districts of Guizhou province have been undergone by the method of agar gel diffusion of immuno-diffusion(AGD). 1995 chickens of 94 flock on 17 chicken farms were examined. The percentage of positive reaction of farms, flocks and total numbers of chickens were 100%, 90.42% and 25.72% respectively. 148 chickens of 7 flocks which are keeping at the out-of-the-way suburban area were also examined and all chickens reacted negatively. This study indicates that the Marek's disease of fowl in Guizhou was contaminated from exterior resource.

The diagnosis of MD of chickens and its carrier by means of inoculation of chickens embryo and embryonic chicken, culture cell, fluorescent antibody (FA) and reversed indirect hemagglutination test (RIHA) have been done.

We have found that RIHA is a simple, quick and sensitive serological method for diagnosis of MD.

名譽理事長: (按姓氏筆劃為序)

許振英 陳之長 盛彤笙 程紹邇 熊大仕

榮譽會員: (按姓氏筆劃為序)

馬聞天 王煥之 王宗佑 邴榮祿 劉震乙 劉文秀 還振舉 許綏泰 任持九 李秉權 李東都
吳仲賢 吳紀榮 吳信法 何正禮 陳志平 陳漢程 邱 懷 鄒萬榮 楊本升 楊詩興 張永昌
張繼先 張榮臻 張 照 張松蔭 張仲葛 鄭丕留 林 群 倪有煌 秦禮讓 俞渭江 章道彬
黃和瓚 謝成俠 薩 音

(王前供稿)