

北京地区鸡群网状内皮组织 增殖病感染的血清学调查研究

何勇群 张中直 杨汉春

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要 本文通过制备纯化的禽网状内皮组织增殖病病毒(REV)和 SPF 鸡抗 REV 的特异血清,成功地建立了间接酶联免疫吸附试验(ELISA),首次对北京地区种鸡群 REV 的感染情况进行了血清学调查。对有疑似临床症状的鸡作重点采样,从 7 个鸡场 112 份血清样品中检出 54 只阳性鸡,阳性率为 48.2%。从 11 个鸡场随机抽样 204 份,检出阳性鸡 28 只,阳性率为 13.7%。结果发现,雏鸡、中鸡的感染率较成鸡低,祖代鸡的感染率较父母代低。感染情况似乎与鸡的品种无关。大多数感染鸡群显示不出该病的临床症状或明显的生产障碍。试验结果表明,间接 ELISA 方法检测 REV 血清抗体,具有简便易行、敏感性高、特异性强、重复性好等优点,可作为检测 REV 血清抗体的比较理想的方法。

关键词 血清学调查,禽网状内皮组织增殖病(RE),间接酶联免疫吸附试验(ELISA)

禽网状内皮组织增殖病(Reticuloendotheliosis,简称 RE)是指由反转录病毒科的网状内皮组织增殖病病毒(REV)引起鸡、鸭、鹅、火鸡和其它禽类发生的一群病理综合征,包括急性网状细胞肿瘤形成、矮小病综合征、淋巴组织和和其它组织的慢性肿瘤形成^[1]。该病能引起鸡体的免疫抑制,且可导致严重的疫苗污染。Robinson 等于 1958 年首次在美国分离到病毒(REV-T 株)^[2],以后在澳大利亚、匈牙利、英国、德国、以色列、日本和尼日利亚等国及台湾地区等相继报道。我国,何宏虎^[3]等于 1986 年在南京首次从鸡分离到 REV,经鉴定属于非缺陷型 REV,并定名为 REV-C45。在我国北方,未见有此病流行情况的报道。本文成功地建立了间接 ELISA 方法,首次对北京地区种鸡群 REV 的感染情况作了血清学调查。

1 材料和方法

1.1 REV 毒株

REV-S 株,以以色列农业部 Kimron 兽医研究所惠赠。

1.2 REV 抗原的制备

1.2.1 病毒增殖:按常规方法制备 SPF 鸡胚成纤维细胞(CEF)单层。按毒后培养 6d,收集细胞单层和上清液,冻融 3 次后备用。

1.2.2 病毒的浓缩和提纯^[4]:将收获的病毒细胞培养液于 4℃,12 000g 离心 10min,收取上清液。装入处理好的透析袋中,用固体聚乙二醇(PEG,分子量 6000)包埋,进行反渗透,16h 后体积浓缩到原液的 1/10。将浓缩的细胞病毒培养液于 4℃,45 000g 下超速离心 90min,沉淀用少

量 0.01M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 悬浮。按比例 (W/W) 称取蔗糖, 配成 5 个浓度 20%、30%、43%、50%、60%, 在离心管上形成蔗糖密度梯度, 对病毒样品在 4℃, 88 000g 超速离心 3h。可见 30% 与 43% 液面间形成明显的沉淀带。把各沉淀带取出, 加入 Tris-HCl 缓冲液, 4℃ 下 46 000g 离心去蔗糖。再经悬浮后, 在透射电镜下负染观察, 用常规紫外吸收法测定病毒蛋白含量。

1.3 SPF 鸡抗 REV 血清的制备

取 3 只 2 月龄 SPF 鸡, 置于 SPF 隔离器中饲养, 按常规免疫程序用纯化的 REV 抗原免疫制备 REV 抗血清。

1.4 SPF 鸡血清 12 份, 本校实验动物研究所提供。

1.5 间接 ELISA 试验所用溶液

1.5.1 包被液: 0.05mol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液。

1.5.2 洗涤液: 0.05mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液 - 0.05% Tween 20。

1.5.3 稀释液: 含有 10% 驴血清的洗涤液。

1.5.4 底物溶液: 邻苯二胺 (OPD) 4mg 溶于 10ml pH 5.0 磷酸盐 - 柠檬酸缓冲液中, 再加 30% H_2O_2 15 μ l, 该液现配现用。

1.5.5 终止液: 2mol/L H_2SO_4 溶液。

1.6 血清样品

1.6.1 重点采样^[1,3]: 本病临床上表现为全身衰弱、精神沉郁、消瘦矮小、羽毛消乱、蛋鸡鸡冠发白、不产蛋等症状。从北京地区 7 个鸡场中挑选有上述临床症状的鸡 112 只, 采集血清作 ELISA。

1.6.2 随机抽样: 选择 11 个鸡场, 随机采集鸡血清 204 份, 用 ELISA 方法检测血清抗体。

1.7 间接 ELISA 方法的操作程序

1.7.1 包被: 将经蔗糖梯度离心的 REV 抗原液用包被液稀释到 20 μ g/ml, 加入 40 孔酶联反应板, 100 μ l/孔, 4℃ 冰箱过夜。

1.7.2 洗涤: 用洗涤液洗涤反应板, 3×3min。

1.7.3 加血清样品: 将待检血清用稀释液作 1:100 稀释, 同时设阳性、阴性对照, 100 μ l/孔, 37℃ 作用 1h。洗涤同 2。

1.7.4 加 HRP-兔抗鸡 IgG: 用稀释液作 1:100 稀释, 100 μ l/孔, 37℃ 作用 1h。洗涤同 2。

1.7.5 加底物溶液: 150 μ l/孔, 37℃ 作用 25min。

1.7.6 终止: 加入 2mol/L H_2SO_4 溶液, 50 μ l/孔。

1.7.7 测定: 在酶联检测仪上测定每孔的 OD₄₉₂ 值。

1.7.8 结果判定: OD₄₉₂ > 0.22 时, 判为阳性; 否则判为阴性。

2 结果与分析

2.1 病毒的增殖与纯化

REV-S 株在 CEF 上共传 10 代, 结果均无明显的致细胞病变效应 (CPE)。在透射电镜上负染观察, REV 病毒颗粒呈球形, 有囊膜, 其中央拟核位于病毒颗粒的中心, 直径 100nm 左右, 为典型的 C 型肿瘤病毒颗粒。

2.2 鸡抗 REV 血清的制备

用纯化的 REV 免疫 3 只 SPF 鸡,用琼扩测得血清琼扩效价分别为 1:2,2:4,1:8。

2.3 间接 ELISA 法的建立^[4-7]

2.3.1 包被 REV 抗原与 HRP-兔抗鸡 IgG 最适工作浓度的确定:将 REV 抗原稀释成 1 μ g/ml,5 μ g/ml,10 μ g/ml,20 μ g/ml,40 μ g/ml,各包被一板,洗涤。将鸡抗 REV 血清作 1:100 稀释,37 $^{\circ}$ C 作用 1h 洗涤。然后将 HRP-兔抗鸡 IgG 作 1:50,1:100,1:200,1:400 稀释。进行方阵试验,ELISA 测定,结果见表 1。

表 1 包被 REV 抗原与 HRP-兔抗鸡 IgG 工作浓度的方阵测定
Table 1 Checkboard titration for the optimal dilution of
REV antigen coating and HRP-Rabbit anti-chicken IgG

抗原稀释度 Antigen concentration		1 μ g/ml		5 μ g/ml		10 μ g/ml		20 μ g/ml		40 μ g/ml	
酶标抗体稀释度 HRP-Rabbit OD anti-chicken IgG values		2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1:50	A	0.597	0.881	1.110	1.055	1.283	1.308	1.584	1.530	1.707	
1:100	B	0.479	0.421	0.507	0.565	0.772	0.835	1.038	1.068	1.263	
1:200	C	0.210	0.214	0.275	0.317	0.487	0.438	0.564	0.547	0.685	
1:400	D	0.109	0.110	0.164	0.199	0.239	0.193	0.234	0.274	0.353	

从表中可以看出,随着包被抗原浓度越来越大,酶标抗体稀释倍数越小,所得到的 OD 值也相应地越来越大。一般酶联免疫检测仪在 OD 值为 1.0 左右时误差最小,反应最敏感。据此,将 REV 抗原的包被浓度确定为 20 μ g/ml,酶标(HRP)兔抗鸡 IgG 的工作浓度确定为 1:100。

2.3.2 最佳血清稀释度的测定:用 20 μ g/ml REV 抗原包被反应板。然后把鸡抗 REV 血清和阴性血清分别作 1:25,1:50,1:100,1:200,1:400,1:800,1:1600 倍比稀释,37 $^{\circ}$ C 作用 1h。酶标兔抗鸡 IgG 作 1:100 稀释,作 ELISA 测定,结果见表 2。

表 2 最佳血清稀释度的测定
Table 2 Determination of optimal dilution of serum

血清稀释 Dilution of serum OD		1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
阳、阴性血清 Positive and negative serum		2	3	4	5	6	7	8
阳性血清 Positive serum	A	0.745	0.732	0.671	0.561	0.429	0.300	0.195
	B	0.752	0.720	0.660	0.524	0.395	0.278	0.215
阴性血清 Negative serum	C	0.121	0.122	0.051	0.046	0.032	0.017	0.017
	D	0.117	0.131	0.065	0.039	0.028	0.009	0.006
$\frac{A+B}{2}$	$\frac{C+D}{2}$	0.630	0.599	0.608	0.500	0.382	0.276	0.193

从表2中可以看出,阳性血清与阴性血清所得结果差异极显著。把二者的OD值的差值进行比较,发现血清稀释度为1:100时,差值较1:50,1:200等为小,而1:25的OD差值虽大,但稀释倍数显得太小,易引起非特异性结果。结果认为1:100的血清稀释度最佳。因此,在检测中对血清样本采用1:100稀释。

2.3.3 规定吸收值的测定:取SPF鸡阴性血清12份,作1:100稀释,按前述操作方法进行ELISA测定。结果见表5。

表3 规定吸收值的测定结果

Table 3 Determination of threshold for positive and negative serum

	1	2	3	4	5	6	7	
OD值 Values	0.166	0.104	0.125	0.121	0.085	0.083	0.088	
	8	9	10	11	12	X	SD	X+3SD
OD值 Values	0.050	0.017	0.010	0.083	0.029	0.080	0.0486	0.22

X+3SD为规定吸收值。根据统计学原则,当 $OD_{492} > X + 3SD$ 时,可以在99.9%的水准上判定为属于阳性结果。故可得出实验结果判定标准:在规定的实验条件下,血清样本作1:100稀释,其 OD_{492} 值 $>$ 规定吸收值(0.22)时,结果判为阳性,否则判为阴性。

2.3.4 间接ELISA特异性实验:

2.3.4.1 阻断实验:将REV阳性血清作1:25,1:50,1:100,1:200,1:400,1:800,1:1600,1:3200,1:6400倍比稀释,各加入等量的 $20\mu\text{g/ml}$ 的REV抗原, 37°C 作用1.5h,每一稀释度重复二孔,结果取平均值。同时设未阻断对照,即不加REV抗原,而以稀释液代替,进行ELISA测定。结果表明,阻断后REV血清各稀释度的OD值明显下降,随着稀释倍数的增大,逐渐接近阴性的水平。

2.3.4.2 交叉实验:用REV抗原包被,分别将SPF鸡抗禽马立克氏病病毒(MDV)、白血病病毒(ALIV)、传染性法氏囊病毒(IBDV)、新城疫病毒(NDV)、产蛋下降综合征病毒(EDSV)、传染性支气管炎病毒(IBV-H52与IBV-H120)的特异血清作1:100稀释,各加入二孔, $100\mu\text{l/孔}$, 37°C 作用1h。作ELISA,测定OD值。

结果显示:除阳性对照为阳性外,其余均为阴性,这表明建立的ELISA用于检测REV血清抗体,具有很强的特异性,提纯的REV抗原与其它病毒的特异血清无交叉反应。

2.3.5 间接ELISA检测样品的重复性试验:对8份检测样品进行4次重复检测,结果变异系数在10%以下的有3份,在10%~13%的有3份,在13%~18%的有2份,平均变异系数10.99%。第二天对这8份样品在各条件相同情况下,再重复做一次ELISA检测,得到相似的结果,其平均变异系数为9.55%。一般认为,变异系数小于20%时,实验结果是可以接受的。试验表明,该方法具有较好的重复性,结果可靠。

2.3.6 敏感性比较:取50份血清样品,作间接ELISA检测。结果发现阳性鸡31只,阳性率为62%。用琼脂凝胶扩散试验(AGP)检验血清原液,同样的50份血清内发现阳性鸡8只,阳性率为16%。同时发现,AGP试验的阳性鸡用间接ELISA检测均为阳性。

可见,即使作 ELISA 检测时鸡血清作了 100 倍稀释,而作 AGP 时鸡血清未作稀释,但其检出阳性率仍高于 AGP。所以,间接 ELISA 方法较 AGP 法具有更高的敏感性。

2.4 北京地区鸡群 REV 感染的血清学调查

从北京地区调查 18 个鸡场中取 316 只鸡血清样本,其中包括采集有疑似症状的鸡 112 只和随机采样 204 只。血清作 1:100 稀释。用间接 ELISA 方法测 REV 抗体,结果见表 4、表 5。

表 4 北京地区 7 个鸡场中抗 REV 血清的检测情况(重点采样)

Table 4 Detection of REV antibody in sera from 7 chicken farms of Beijing area (destined collection)

鸡场 Farms No.	品种 Breeds of chickens	日龄 Days	血清样品数 Number of serum	抗体阳性数 Number of positive serum	阳性率 Positive rate (%)
1	海赛父母代	200	17	5	29.4
2	京白祖代	594	14	3	21.4
3	伊莎父母代	370	16	6	37.5
4	油鸡祖代	378	11	3	27.3
5	海赛父母代	370	31	22	71.0
6	海赛父母代	250	14	9	64.3
7	艾维茵父母代	147	9	6	66.7
合计 Total			112	54	48.2

表 5 北京地区 11 个鸡场中抗 REV 血清的检测情况(随机抽样)

Table 5 Detection of REV antibody in sera from 11 chicken farms (random collection)

鸡场 Farms No.	品种 Breeds of chickens	日龄 Days	血清样品数 Number of serum	抗体阳性数 Number of positive serum	阳性率 Positive rate (%)
1	罗曼父母代	41	13	1	7.7
2	海赛父母代	41	10	1	10.0
3	海兰父母代	290	14	2	14.3
4	不详(父母代)	成鸡	14	1	7.1
5	农大褐父母代	410	15	0	0
6	京白父母代	378	16	7	43.8
7	AA 祖代	成鸡	28	2	7.1
8	AA 父母代	成鸡	29	8	27.6
9	海兰父母代	78	14	1	7.1
10	不详(父母代)	成鸡	23	2	18.7
11	北京红父母代	成鸡	28	3	10.7
合计 Total			204	28	13.7

从表4可以看见,共检测7个鸡场,4个品种,共112份成年种鸡血样,阳性率在21.4%~71.0%之间,平均阳性率为48.2%。同时发现2个祖代鸡场阳性率较低。第7鸡场9份血样为本校兽医诊断室提供,其余血样为笔者自己所采。采样时发现第5、6鸡场鸡群生长状态差,有疑似临床症状的鸡多。其产蛋率最高时只有85%,而且只持续1个月,以后一直在60~80%徘徊,死淘率也较大。据介绍,这2个鸡场近5年来马立克氏病不断,防制效果差。

从表5可以看出,共检测了11个鸡场,至少7个品种,共204份种鸡血样,阳性率在0~43.8%之间,平均阳性率为13.7%。

第1、2鸡场饲养的是41日龄的父母代雏鸡,第9鸡场为78日龄的青年鸡,这3个鸡场阳性率较低,可能与日龄较低有关。

第7、8鸡场同属一个公司的AA鸡,可见其祖代鸡场的阳性率大大低于父母代。11个鸡场中,只有第5鸡场未检出阳性鸡。而第6鸡场抽样阳性率43.8%。据调查,该鸡场鸡群由于产蛋率不高,正面临淘汰。

表4与表5比较可知,随机抽样所得到的阳性率大大低于重点采样。

3 讨论

REV各病毒株只有一个血清型,抗原性方面有极大的一致性。故采用一个REV病毒株的抗原即可检测其余各株刺激所产生的抗体。

为了防止非特异性影响和抗体的顺利制备,采用了SPF鸡。且SPF鸡的饲养和免疫均在隔离器中进行,避免了与外界环境的接触,达到了理想的效果。

间接ELISA是一个高敏感度的试验。但敏感性越高的试验往往也越容易引起非特异性。常常在包被完后,用含1~3%牛血清白蛋白(BSA),或10%小牛血清,或10%其它异种动物血清的封闭液37℃作用1h,来封闭非特异性吸附。经过封闭,以后的稀释液中可不加BSA或异种动物血清。本实验未采用这种方法,而是采用在各步稀释液中加入10%驴血清的办法,结果证明可同样有效地减少非特异性反应,而且避免了封闭一步,节省了时间,提高了效率。

对表现临床症状的鸡的重点抽样和各鸡场的随机采样,用自己建立的间接ELISA作了血清学调查,结果发现,北京地区的种鸡中普遍存在着REV抗体阳性现象。比较而言,雏鸡、青年鸡中抗体阳性率较低,随机采样37只中出现3只,占8.1%,这可能与RE主要是水平传播,而垂直传播率较低有关。因雏鸡、青年鸡与外界接触时间较成年鸡为低,从而导致感染率较低。而成鸡中抗体阳性率较高,重点抽样112只,出现54只阳性,占48.2%;随机抽样167只,出现25只,占15.0%。总体可说明北京地区RE的感染是较严重的。调查的鸡群都是种鸡,试验发现祖代鸡的感染率明显低于父母代,推测商品鸡中的阳性率应该更高。

试验发现REV的感染似乎与鸡的品种无关。共检测了至少10个品种,除1个品种未检测到阳性鸡(可能与检样量太少有关)外,其余都检测到阳性结果。

调查中也发现,有二群阳性率较高的父母代种鸡(指重点采样的第5、6鸡场)产蛋率一直不高,生长情况不好。一直认为马立克氏病(MD)较严重,且常见有MD的病变,包括肿瘤、神经肿大等。此两鸡场对MD的防制效果一直不佳。笔者通过调查分析,认为这与REV的高感染率有一定关系,可能是MD与RE的诊断上的混淆,也可能是二者的混合感染,有待进一步研究。另外,随机抽样的第6鸡场的产蛋率不高也可能与REV的感染率较高有关。而其余检

测的抗体阳性的鸡场未见较大经济损失的报道。目前从国内外的资料来看,对 REV 引起的危害报道各说不一^[1,8,9]。但近年来陆续发现 RE 引起严重经济损失的报道,不能不引起人们的注意。且其对免疫抑制、疫苗污染等方面造成的危害,也应值得进一步研究和探讨。

4 结 论

4.1 建立了间接 ELISA 方法监测 REV 血清抗体的操作程序,其抗原包被浓度为 $20\mu\text{g/ml}$,血清稀释度为 1:100,HRP-兔抗鸡 IgG 最适工作浓度为 1:100。

4.2 首次对北京地区鸡群 REV 的感染情况作了血清学调查,发现北京地区确实存在着本病的感染。这为以后在北京地区进一步对 RE 进行研究提供了条件。

参 考 文 献

- [1] Witter R L. Reticuloendotheliosis. in: Disease of poultry, 9th Edition, 1991, 439~455
- [2] Robinson F R, Twiehou M J. Isolation of the avian reticuloendotheliosis virus (Strain T). Avian Diseases, 1974, 18: 278~288
- [3] 何宏虎 等. 禽网状内皮组织增殖病病毒的分离鉴定. 中国畜禽传染病, 1988, 2: 1~3
- [4] Eugene J. Smith and Richard L. Witter. Detection of antibodies against reticuloendotheliosis viruses by an Enzyme-linked Immunosorbent assay. Avian Diseases, 1983, 27: 225~234
- [5] Cui Z Z et al. Monoclonal antibodies against avian reticuloendotheliosis virus: Identification of strain-specific and strain-common epitopes. The Journal of Immunology, 1986, 136: 4237~4242
- [6] 庄景新 等. ABC-ELISA 技术在禽网状内皮组织增殖病抗体检测上的应用. 中国畜禽传染病, 1990, 1: 25~27
- [7] 杨汉春主编. 动物免疫学. 北京农业大学出版社, 1996, 167~171
- [8] Witter R L, Johnson D C. Epidemiology of reticuloendotheliosis virus in broiler breeder flocks. Avian Diseases, 1985, 29: 1140~1154
- [9] J. O. A. Okoye et al. Naturally occurring clinical reticuloendotheliosis in turkeys and chickens. Avian Pathology, 1993, 22: 237~244

A SEROLOGICAL SURVEY OF THE RETICULOENDOTHELIOSIS VIRUS INFECTION IN BEIJING CHICKEN FLOCKS

He Yongqun, Zhang Zhongzhi, Yang Hanchun

(College of Veterinary Medicine, China

Agricultural University Beijing, 100094)

Abstract

Anti-reticuloendotheliosis virus (REV) serum was produced with SPF chickens inoculated with the REV strain S obtained from Israel and cultured in SPF chicken embryo fibroblast (CEF) cells culture. With this antiserum an indirect enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) was established for serological survey of the REV infection in Beijing chicken flocks. 112 serum samples were obtained from chickens sharing some clinical signs of reticuloendotheliosis (RE) in 7 breeder flocks. 54 of them were detected as seropositive that made an infection rate 48.2% for these flocks. 28 of another 204 serum samples collected randomly from other 11 breeder flocks were found to be seropositive with the infection rate of 13.7%. Infections were somewhat lesser in young chicken flocks than those in adult flocks and also lesser in grandparent breeder flocks than in parent breeder flocks. There seems no relationship between the infection profile and chicken breeds. And no obvious clinical signs suspected of RE in the last 11 breeder flocks were observed. The authors suggested that the indirect ELISA is a specific sensitive, rapid and reproducible assay and may be used practically for detecting the REV infection in chickens.

Key words Serological survey, Reticuloendotheliosis (RE), Indirect ELISA

下 期 目 录 预 告

- 1 日粮类型和干草细度对肉牛瘤胃挥发性脂肪酸比例及能量转化效率的影响
- 2 雏鸡肠道底物肽与血液循环中肽的关系研究
- 3 持续日变高温对猪的铬代谢及血液生化指标的影响
- 4 0~4 周龄肉鸡不同锰源锰需要量的研究
- 5 多位点基因型遗传距离的估测精度
- 6 藏绵羊线粒体 DNA 遗传多样性研究
- 7 禽传染性支气管炎病毒免疫原基因 cDNA 的构建与鉴定
- 8 MD 疫苗免疫雏鸡 vMDV 攻击后免疫器官组织抗体生成细胞的变化
- 9 犬瘟热病毒强毒株的分离与鉴定
- 10 猪伪狂犬病毒鄂 A 株的分离鉴定
- 11 几种住肉孢子虫包囊可溶性蛋白的抗原特性分析
- 12 应用 PCR 扩增法检测伊氏锥虫的研究
- 13 控制包虫病的缓释剂型研究
- 14 山羊内毒素休克诱发脂质过氧化作用及山萘砒碱对其影响的研究
- 15 阿维菌素口服液体药剂的稳定性测定