

病毒性关节炎的研究*

辛朝安 古飞霞 丘振芳 劳惠源

(兽医系)

(江门市食品公司)

提 要

作者根据广东省江门市某鸡场以跛行鸡为主的鸡病流行情况,临床症状及病理变化等,作出鸡病毒性关节炎的假定性诊断。

从病鸡的关节滑液中分离到一种病毒,该病毒能在鸡胚卵黄囊内、尿囊腔内和绒毛尿囊膜上生长并致死鸡胚,使鸡胚皮肤呈暗红色。病毒也能在鸡胚肾细胞、鸡胚成纤维细胞上生长并引起细胞病变。病毒对鸡红细胞无凝集作用,用含病毒的鸡胚尿囊液接种敏感鸡后,可复制出与临床所见相类似的疾病。

在电镜下观察,病毒直径为63~74nm,在感染的鸡胚绒毛尿囊膜上可见到胞浆内的包涵体,经测定,病毒含有双股RNA,对氯仿、乙醚、60°C 1小时有抵抗力,对胰酶敏感。

实验结果表明:被分离到的病毒为传染性关节炎病毒,因此江门市某鸡场所发生的以跛行为主要特征的疾病可以确诊为鸡病毒性关节炎。

关键词 鸡病毒性关节炎; 呼肠孤病毒

引 言

病毒性关节炎是一种由呼肠孤病毒引起的重要鸡病,该病由Olson等于1957年首次发现于美国^[1]、此后相继报道发生于世界上很多国家和地区。

1987年,我们对广东省8个市16个鸡场作禽流感、鸡滑膜炎霉形体、鸡败血霉形体、鸡腺病毒感染、鸡传染性法氏囊病和鸡白痢的血清学调查及部分的病原分离工作。在这期间,从江门市某鸡场疑似患鸡滑膜炎霉形体病的病鸡关节中分离到鸡病毒性关节炎病毒,现将此次鸡病毒性关节炎的诊断过程报告如下。

一、流行情况

江门市某鸡场主要饲养AA肉鸡,自1986年起,多批鸡群在40~50日龄时,出现数量不等的跛行鸡,曾多次试验提早在饲料中添加较大剂量多种维生素、矿物质添加剂和

*本文承蒙华南农业大学兽医系欧守抒、刘福安教授和林维庆副教授审阅修改,谨致以深切的谢意。

1988年7月14日收稿

抗菌药物，但跛行鸡到时仍继续出现。

1986~1987年，此类病鸡约占发病鸡群饲养量的8~9%，由于未找到有效的防治方法，只能在40日龄起，由饲养员加强对鸡群的观察，一旦发现跛行鸡，就及时淘汰。

从几年来的经验和资料来看，此种病鸡的多少似乎与进鸡前鸡舍空置时间的长短有关，凡栏舍空置时间较长时，病例也随之减少。

二、临床症状和病理变化

（一）临床症状

临床症状明显的病鸡，大多数出现在40日龄至上市前这段时间，发病率一般约为3~5%，最高达20%。早期病鸡营养不良，喜欢伏地而不愿站立和行走，继而跛行，或因不能站立而卧地不起。病鸡因得不到足够的饲料和饮水而逐渐消瘦衰竭。仔细检查时，可见跗关节单侧或双侧肿胀，有热感和波动感。

（二）病理变化

曾系统剖检病鸡10例，病理变化较一致，主要病变在跗关节。关节明显肿胀，关节囊内含有较多的粉红色粘性液体，滑膜上有点状出血或斑状出血，趾屈肌腱和趾伸肌腱肿胀，其中2例关节囊内充满脓性渗出物并带恶臭味。其它脏器未见明显的病变。

三、细菌的分离培养

取送检4只病鸡的心血及关节内滑液作细菌分离，从其中一例分离到大肠杆菌，其它三例未能分离到任何细菌

四、病毒的分离

1. 取送检病鸡跗关节内的渗出物及腱鞘碎片，加10倍生理盐水反复研磨后，以3000转/分离心30分钟，吸取中层混悬液，每毫升加入青霉素5千单位，庆大霉素3千单位，4℃作用4小时，然后接种7日龄的试验组鸡胚6只，接种途径为卵黄囊内，接种量为每胚0.2毫升，同日龄对照组鸡胚4只，每胚接种灭菌生理盐水0.2毫升（鸡胚来自广东省生物制品厂的非免疫鸡）。接种后置37.5℃温箱内继续孵化。

试验组鸡胚于接种后第72小时死亡1只，第96小时死亡2只，对照组鸡胚未见异常。收取死胚一部分卵黄液和尿囊液，经无菌检验后作进一步试验用。剖检死亡鸡胚，见胚体广泛充血、出血，整个胚体呈暗红色。

2. 分离物的继代培养：取上述鸡胚分离物作 10^{-1} 稀释，分别经卵黄囊内、尿囊腔内、绒毛尿囊膜途径，接种7日龄、9日龄、10日龄鸡胚各6只。

经卵黄囊接种的鸡胚于接种后第4天死亡5只, 胚体明显出血。

经尿囊腔接种的鸡胚, 于接种后第3天死亡4只, 胚体明显出血, 肝脏可见少量白色坏死点。

经尿囊膜接种的鸡胚, 于接种后4~5天死亡5只, 胚体明显出血。

取上述经尿囊腔接种后死亡的鸡胚的尿囊液为材料, 经尿囊腔接种, 继续传代, 现已传到第52代。

3. 分离物的红细胞凝集试验: 用微量法和试管法, 对上述第一代、第二代鸡胚分离物作鸡红细胞凝集试验, 结果分离物对鸡红细胞无凝集作用。

4. 分离物的人工发病试验: 对上述鸡胚分离物进行了三次人工发病试验。

(1) 第一次人工发病试验: 攻毒组为14日龄的AA雏鸡60只, 接种材料为第一代鸡胚分离物的鸡胚尿囊液及卵黄液的混合物, 生理盐水作1:5稀释, 接种途径为鸡脚掌内注射, 接种量每只0.2毫升, 接种后离地笼养观察到56日龄, 每星期在饮水中加入4/万的利高霉素3天, 预防细菌性感染。

空白对照组为同日龄AA雏鸡20只, 每只于脚掌内注射经稀释的正常鸡胚尿囊液0.2毫升。

对照组于接种后第2天, 有一只雏鸡于接种部位出现红肿, 第4天起开始逐渐消退。在31日龄时, 死亡1只, 经检验确诊为球虫病。其余鸡只未见明显的异常。

攻毒组于攻毒后第48小时检查时, 接种一侧脚掌出现轻度肿胀者37只, 第72小时检查时, 上述患部的肿胀更为明显, 掌部红、肿、有热感、皮肤高度紧张, 其中有3只肿胀蔓延到跗关节, 明显跛行, 直至56日龄也未能恢复正常。在留下继续观察的攻毒组中, 分别在43日龄、49日龄时各出现一只跛行鸡, 其中一只跛行2天后即常常蹲伏不起, 借助双翼辅助才能走动, 检查时见一侧跗关节肿胀。这两只病鸡直至56日龄试验结束时, 仍存活, 但较消瘦。

于攻毒后第7天扑杀攻毒组病鸡2只, 从跗关节的关节液中分离到性质相同的病毒。

(2) 第二次与第三次人工发病试验均复制出与自然病例相似的疾病。

五、病毒的形态和理化特性

1. 电镜观察: 将感染了病毒的鸡胚尿囊液, 用差速离心法(8000rpm45分钟, 30000rpm 1小时)制成提纯的浓病毒悬液, 然后用2%磷钨酸染液负染, 马上置于电镜下观察(图略)。可见病毒是无囊膜、圆形、直径介于63~74nm之间。

取感染了病毒的鸡胚绒毛尿囊膜上的痘斑, 制成超薄切片后进行电镜观察, 见病毒存在于鸡胚绒毛尿囊膜细胞浆内, 聚集成晶格状。病毒粒子具有致密的芯髓(图略)。

2. 细胞培养特性: 将含病毒的鸡胚尿囊液, 接种于生长成单层的19~21天龄鸡胚肾细胞(CEK), 接种后24小时可见合胞体形成, 72小时可见细胞发生皱缩、团聚、脱

落。CEK传至第4代，接毒后24~36小时，便能出现明显的细胞病变（CPE）。

含毒的鸡胚尿囊液，初次接种于单层的鸡胚成纤维细胞（CEF），不出现可见的细胞病变，但盲传至第4代，接毒后48~72小时，便出现类似于病毒感染CEK的细胞病变，第9代的CEF收获液的TCID₅₀效价为10⁻⁷。

3. 病毒的理化特性

（1）吡啶橙染色：按殷震主编的《动物病毒学》介绍的方法试验^[1]，在接毒后6小时的飞片上，染成桔红色的CEF单层细胞的胞浆内，看到黄绿色着染的包涵体，每个细胞内可见2~8个不等。这表明细胞感染了能在胞浆内复制的具有双链核糖核酸的病毒。

（2）PH试验：取0.5ml病毒液，加入4.5ml“199”细胞营养液，然后适量滴加0.1N HCl（或5.6% NaHCO₃）用酸度计测pH，置4℃感作1小时后，用5.6% NaHCO₃（或0.1N HCl溶液）将PH调回7.2左右，并用“199”营养液调节对照组及各组病毒液量，使总量相等。然后在单层的CEF细胞上测定感染力。结果，病毒在pH8.3，4℃，1小时后，对细胞感染力不变，在pH4.98，4℃1小时后，感染力下降2个对数滴度以上，但接种9日龄鸡胚，鸡胚的死亡时间较对照组胚推迟24~36小时。另外，病毒液经pH2.98，4℃1小时后，对CEF的感染力下降4个对数滴度。

（3）氯仿试验：含5% AR级氯仿的病毒液，室温下振荡混合20分钟，然后在CEF上测定，TCID₅₀效价不变。

（4）乙醚试验：0.8ml病毒液与0.2ml麻醉用乙醚混合，振荡60分钟后，对单层CEF细胞的感染力下降1个对数滴度。

（5）胰酶试验：胰酶用量为病毒液的0.5%，置37℃1小时，然后加入灭活犊牛血清终止胰酶作用，在CEF上测定病毒的感染力，结果TCID₅₀效价下降2个对数滴度。

（6）耐热试验：将病毒液置于62~63℃水浴2小时，然后在生长成单层的CEF上测定感染力，结果TCID₅₀效价下降一个对数滴度。

（7）氯化镁试验：病毒在1M的氯化镁中，于55~60℃处理30分钟后，对CEF细胞的感染力升高2个对数滴度，而置于-28℃1小时，TCID₅₀效价下降2个对数滴度以上。

六、讨论和结论

1. 江门市某鸡场跛行鸡的疾病流行情况、临床症状及病理变化与文献中描述的鸡病毒性关节炎较为相似^[2]，曾添加多种维生素、矿物质和抗菌药物防治无效，从关节滑液中未能分离到与该病有关的细菌等，我们曾作出鸡病毒性关节炎的假定性诊断。

2. 经鸡胚卵黄囊途径，从病鸡关节滑液中分离到病毒，能致死鸡胚并使鸡胚胚体充血出血而呈暗红色，病毒对鸡红细胞无凝集作用，经过体内接种敏感鸡三批，能复制

出与临床所见相似的疾病;在电镜下观察,病毒无囊膜,直径63~74nm,在感染的鸡胚绒毛尿囊膜上,可见到胞浆内的包涵体;经鸡胚尿囊液培养的病毒,能在单层鸡肾细胞上继代,传至第4代时可产生细胞病变。经测定该病毒含双股RNA,对氯仿、乙醚、60°C 1小时有抵抗力,对胰酶敏感。以上有关病毒的形态大小、核酸型与理化性质等与禽类呼肠孤病毒是基本一致的,可以肯定,被分离到的病毒为鸡传染性关节炎病毒,江门市某鸡场所发生的以跛行为主的疾病可以确诊为鸡病毒性关节炎^{[3][5]}。

3. 据一般资料介绍,呼肠孤病毒在PH2~8范围内是稳定的,但根据我们的测试结果,该病毒对PH8.3有抵抗力,但不能耐受PH4.98,1小时,此点与文献报道不完全一致,原因何在,正在进一步探索中^{3 5}。

4. 鸡病毒性关节炎在国外已流行多年,国内则尚未引起足够的重视,如不进行细致的鉴别,易误诊为葡萄球菌病,滑膜炎霉形体病或营养缺乏病,为了正确做好该病的诊断和预防工作,有必要对该病的流行情况作进一步的广泛的调查并尽快研制出有效的疫苗。目前,我们已将分离到的野毒作52代的鸡胚传代,并开始着手对抗原性等进行逐项的测定。

引用文献

- [1] 殷震. 动物病毒学. 1985;281—285, 422—433
- [2] Hofstad, M. S., 1979, Diseases of Poultry, 641—647
- [3] Kibenge, F. S. B., 1983, Veterinary Bulletin, No. 5, 431—444
- [4] Olson, N.O., 1957, Am. J. Vet. Res. 18, 735—739
- [5] Robertson, M.D., 1986, Veterinary Bulletin, No. 8, 155—174

STUDIES ON VIRAL ARTHRITIS

Xin Chaoan Gu Feixia Qiu Zhenfang
(Department of Veterinary Medicine)

Lao Huiyuan
(Jiangmen Food Company)

ABSTRACT

A presumptive diagnosis of Viral Arthritis for a disease presenting primarily symptoms of lameness and occurring on a farm in Jiangmen City of Guangdong Province was made based on the epizootiology, clinical signs and necropsy findings.

The virus isolated from the arthrosynovia of infected chicken, could grow in the embryonating chicken egg and was lethal to embryos following inoculation via the yolk sac, the chorioallantoic membrane (CAM) or the allantoic sac, with the skin of the embryos showing a dull red colour. The virus could also multiply in chicken embryo kidney (CEK) cells and chicken embryo fibroblasts (CEF), and cytopathic effect (CPE) seen.

The virus showed no hemagglutinating activity with chicken red blood cells. A similar disease as seen clinically could be duplicated by inoculating chicken embryo allantoic fluid containing the virus into susceptible chickens. Electron microscopy proved that the virus particles had a diameter of approximately 63 nm to 74 nm, and that there were cytoplasmic inclusions in the cells of infected CAM.

Characterization of the virus showed that it had a double stranded RNA, was resistant to chloroform, ether, 60°C for 1 hour, but was sensitive to trypsin.

The results of the study indicated that the isolated virus was infectious arthritis virus, so the definite diagnosis of the disease characterized by lameness which occurred on the Jiangmen City farm was viral arthritis.

Key words: Viral arthritis; Reovirus.