

鸡病防治中网状内皮组织增殖病病毒 (REV) 的有害作用

薛义山* 刘福安
(兽医系)

摘要 本文报道对禽网状内皮组织增殖病病毒 (REV) 进行的一些研究。电镜观察表明 REV 是典型的 RNA 肿瘤 C 型病毒, 具有“苯环状结构”。动物感染试验表明 REV 与火鸡疱疹病毒 (HVT) 之间可产生协同作用来危害鸡群。作者采用了冰冻切片结合荧光抗体或酶标抗体技术来检测组织中的 REV 抗原。采用间接荧光抗体试验对广东 10 个鸡场进行了血清学调查, 结果表明只有 2 个鸡场是 REV 抗体阴性的, 其余 8 个场均呈不同程度的抗体阳性。特别值得提到的是, 其中 1 个场两批鸡因注射不同来源的 HVT 疫苗而表现出 REV 抗体阳性率的显著差异, 这显示了“HVT 疫苗失效”一个很可能的原因是 REV 污染了 HVT 疫苗。

关键词 禽网状内皮组织增殖病病毒 (REV); 火鸡疱疹病毒 (HVT); 免疫抑制; 病毒分布

禽网状内皮组织增殖病 (Reticuloendotheliosis, RE) 是由网状内皮增殖病病毒 (REV) 引起的, 主要侵害火鸡和鸡, 引起以淋巴~网状细胞增生为特征的肿瘤性疾病。

国外对 REV 的研究较多, 其中包括血清学、形态学、免疫学和生物学等方面的研究^[12]。何宏虎等^[3] (1988) 首次在国内分离到 REV, 命名为 REV-C45 毒株, 证实我国也存在此病。国外的一些学者认为接种了污染 REV 的马立克氏病疫苗或喉气管炎疫苗的鸡群会引起免疫失败^[8,11,15]并导致 REV 的人工传播。由于使用 REV 污染的 HVT 疫苗曾对日本养鸡业带来严重的经济损失^[2]。澳大利亚^[4]美国^[13]匈牙利^[1]等国关于马立克氏病疫苗污染了 REV 的事故也有报道。进一两年来, 广东的一些鸡场也曾出现类似的情况。在这个基础上开展本研究工作。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 REV 病毒—70℃保存的鸡成纤维细胞 (CEF) 毒, 由南京农业大学陈溥言副教授提供

1.1.2 试验动物

1.1.2.1 9~10 d 龄的鸡胚、鸭胚, 由华南农业大学养禽实验场提供。

1.1.2.2 试验鸡 100 只, 由广州力康公司提供, 为 1 d 龄未注射过马立克氏病疫苗的海兰小公鸡, 经荧光抗体试验检测证明血清中无 REV 母源抗体。

1.1.2.3 试验兔, 广州暨南大学实验动物场提供的 2 只新西兰兔, 体重 2.5 kg 左右。

* 1990 年硕士毕业生, 已分配到深圳养鸡公司工作
1991-06-10 收稿

1.1.2.4 试验鸭, 华南农业大学养禽实验场提供。

1.1.3 血清样品 REV 阳性血清, REV 阴性血清及待检血清。

1.1.4 REV 单克隆抗体, 由陈溥言副教授惠赠。

1.1.5 羊抗鼠酶标记物, 南京农业大学陈士友提供。

1.1.6 HVT 疫苗, 由 Tri-Bio Laboratories Inc. USA 生产。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡抗 REV 阳、阴性血清的制备, 按何宏虎^[3]方法进行。

1.2.2 兔抗鸡 IgG 荧光抗体制备, 按殷震等^[6]方法进行。

1.2.3 病毒的纯化与浓缩, 按何宏虎^[3]方法繁殖病毒, 按层析法纯化浓缩病毒。

1.2.4 病毒的电镜观察 按常规方法进行浓缩病毒的电镜负染观察和含 REV 的 CEF 细胞培养物的超薄切片的电镜观察。

1.2.5 REV 阳性细胞板的制备以及广东部分鸡场 REV 抗体的检测 按陈溥言等^[4]方法制备阳性细胞板, 以后用所介绍的间接荧光抗体试验来检测待检血清并用自制的标准 REV 阳、阴性血清作对照。

1.2.6 REV, HVT, REV+HVT 对鸡群的免疫抑制作用比较和造成鸡群临床病理变化的比较基本按威丹英等^[7]方法进行。将 1 d 龄海兰小公鸡随机分成 A, B, C, D 四组, A 组为对照组, 1 d 龄时不注射任何东西, 然后平均分成 A₁ 和 A₂ 两组。B 组为 REV 组, 1 d 龄时颈部皮下接种含 REV 的细胞上清液 0.5 ml/只, 以后同样分成 B₁, B₂ 两组。C 组为 HVT 组, 1 d 龄时颈部皮下注射进口马立克氏病 HVT 疫苗 0.5 ml/只, 以后一样分成 C₁, C₂ 两组。D 组为 REV+HVT 组, 1 d 龄时颈部皮下接种含 REV 的细胞上清液 0.5 ml/只加 0.5 ml/只上述 HVT 疫苗液, 以后也分成 D₁, D₂ 两组。在第 7 d 龄时 A₁, B₁, C₁, D₁ 组的鸡皮下各注射 50% 鸭红细胞 (DRBC) 0.5 ml, 注射 10 d 后测定这些鸡的抗 DRBC 的抗体水平。在第 32 d 龄时, A₂, B₂, C₂, D₂ 组的鸡皮下各注射 50% DRBC 0.5 ml, 10 d 后也测定这些鸡的抗 DRBC 抗体水平。

1.2.7 各脏器中 REV 抗原分布的检测 免疫抑制试验中每周剖杀的鸡中, 取 A, B 组的鸡的肝、肾、脾、胸腺、法氏囊进行冰冻切片。切片吹干后, 用丙酮固定 10 min, 然后 PBS 浸洗, 蒸馏水脱盐脱脂, 吹干后 -20℃ 密封保存。最后分别采用酶组化染色法和间接荧光抗体染色法来检测各脏器中的 REV 抗原所在部位。

2 结果

2.1 病毒的层析提纯

经 Sephadex G-200 提纯的 REV 病毒, 用 Beckman Du-7 分光光度计在波长 220~300 nm 间进行扫描, 可得以下有规则的曲线, 曲线平滑下降, 在 260 nm 及 280 nm 处无明显的吸收峰, 且 $O.D._{260}/O.D._{280}=1.19$ 。由于 REV 提纯物的电镜检查表明病毒较纯, 所以此曲线图可作为 REV 的紫外线吸收特征图谱 (图 1)。

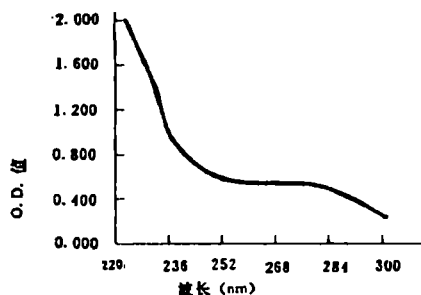


图 1 REV 的紫外线吸收曲线

2.2 病毒的电镜观察

2.2.1 在接种 REV 的 CEF 超薄切片中, 可见细胞浆中有大量病毒粒子存在 (图版 1)。可见类核体电子致密, 位于病毒粒子的中心位置, 属于典型的 C 型肿瘤病毒。大小约 80~100 nm 之间 (图版 2)。

2.2.2 层析提纯的 REV, 负染后电镜观察可见病毒呈以下结构: 内层为不能被磷钨酸染料穿透的部分, 是类核体所在位置。中层为可被磷钨酸染料穿透的部分, 内层和中层构成了病毒的核心, 是由二十面体对称的核蛋白组成, 呈“苯环样结构”, 外层为囊膜所在部位 (图版 2)。

2.3 广东省部分养鸡场的血清学调查结果

1989 年 5, 6 月间, 作者对广东省深圳和广州地区 10 个鸡场进行的 REV 抗体检测结果如下表:

表 1 广东省养鸡场 REV 血清学调查 (1989 年 5~6 月)

鸡 场	被检样品数	阳性血清数	阳性率 (%)
广州 1 场	E 组 (MD 严重) 33	19	57.5
	F 组 (对照) 33	3	9.0
广州 2 场	40	0	0.0
广州 3 场	40	1	2.5
深圳 1 场	30	4	13.3
深圳 2 场	55	6	10.9
深圳 3 场	30	4	13.3
深圳 4 场	30	2	6.6
深圳 5 场	30	3	10.0
深圳 6 场	33	0	0.0
南海 1 场	108	14	13.0

2.4 REV, HVT, REV+HVT 对鸡群的免疫抑制以及各组鸡群的临床病理变化结果

试验表明各组鸡群对 DRBC 的免疫应答能力是不同的。REV 组鸡在 1~4 周龄时表现出轻微的免疫抑制, HVT 组在 1~4 周龄时表现出一定的免疫抑制, 而 REV+HVT 组鸡则表现出强烈的免疫抑制。

从剖检的情况来看, 1~3 周龄时, A, B, C, D 四组的鸡从外观大小来看未表现出不同, 胸腺、法氏囊也未见有什么异常。但第 4 周开始慢慢就发现 REV+HVT 组的鸡的法氏囊和胸腺的大小与其他 3 组相对地发生了萎缩现象, 第 5 周开始可用肉眼观察到 REV+HVT 组的鸡比其他 3 组的鸡相对小, 且法氏囊和胸腺发生更严重的萎缩 (图版 3)。

2.5 REV 在鸡的一些器官中的分布情况

采用冰冻切片结合荧光抗体技术或酶标抗体技术来检测鸡内脏组织中的 REV 抗原, 结果表明 REV 可感染脾、肝、肾、法氏囊、胸腺, 其中脾、肝被感染的程度最大, 可形成大小不同的阳性灶 (图版 4)。荧光抗体与酶标抗体方法取得了一致的试验结果表明本研究采用的检

测组织内 REV 抗原的方法可行。

2.6 某一鸡场由于接种不同的 HVT 疫苗,结果马立克氏病发生率差异甚大

广东某一鸡场于 1989 年 5 月 9 日(E 组)和 5 月 25 日(F 组)分别从杭州某一鸡场引进“伊沙”鸡 7 500 余苗和 7900 余苗。除 1 d 龄时注射的马立克氏病疫苗不同以外(E 组用国内某厂生产的马立克氏病 HVT 疫苗,F 组用美国沙氏公司的 HVT 疫苗),在同一鸡舍相同的条件下饲养这两批鸡,结果 E 组 14 周龄开始发病,每日死 15~20 只鸡,尸体剖检和组织病理学检查证实死于马立克氏病(MD)。至作者前往采学血时(第 30 周龄),E 组已死 4 000 多鸡,死亡率达 60%以上,而 F 组的鸡至 30 周龄时的基本上无 MD 而死的鸡。

3 讨论与结论

3.1 本研究所用的 REV 属于典型的 RNA 肿瘤 C 型病毒,与文献^[7,9,10]描述的一致。

3.2 进行的试验表明 REV 与 HVT 之间有协同作用,共同使鸡群产生免疫抑制和出现“矮小综合征”现象。试验支持了“当鸡群接种污染有 REV 的马立克氏病疫苗将造成疫苗失效”的提法。这个结论表明使用 SPF 鸡胚、鸭胚生产疫苗是十分重要的。

3.3 广东某一鸡场的“疫苗失效”事故很可能是因为接种污染了 REV 的 HVT 疫苗而引起的。表 1 中 E 组 REV 抗体阳性率与 F 组的差异极显著的现象进一步支持了这个论点。

3.4 冰冻切片结合荧光抗体技术或酶标抗体技术用于检测组织中的 REV 抗原是一种很好的实验手段。冰冻切片可使组织中的抗原所处位点以及抗原性得以保存,另一个优点是快。荧光抗体或酶标抗体技术则具有快速、敏感、特异的优点。本试验采用的这些技术达到了快速、特异和敏感的要求。

致谢 本论文的试验过程中得到了陈博言、辛朝安副教授,刘镇明、孔德迎、戚丹英讲师,李惠颜、李岩、易水生、林旭野等同志的大力帮助,在此作者表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 小山弘之(黄荣生译),关于网状内皮组织增殖病病毒(REV)的研究,国外兽医学—畜禽传染病,1980,2(2):14~16
- 2 吉村昌武. 马立克氏病的现状及对其的相应措施. 国外兽医学—畜禽传染病,1987,7(4):5~7
- 3 何宏虎等. 禽网状内皮组织增殖病病毒的分离与鉴定. 中国畜禽传染病,1988(2):1~3
- 4 陈博言,杜念兴. 微量双板荧光法——一种新的病毒克隆的简易方法. 南京农业大学学报,1988,11(1):120~125
- 5 殷震,刘景华. 动物病毒学. 北京:科学出版社,1982,575~622
- 6 戚丹英,刘福安. 一种小鸡体液免疫应答能力指示系统的建立. 华南农业大学学报,1988,9(4):1~8
- 7 Dren C N et al, Isolation of Reticuloendotheliosis - like Virus from Naturally Occurring Lymphoreticular Tumors of the Domestic Goose. Avian Pathology, 1988, 17, 259~277
- 8 Jackson C A W et al. Proventriculitis, 'Nakanuke' and Reticuloendotheliosis in Chicks Following Vaccination with Herpesvirus of Turkeys. Aus Vet J, 1977, 53, 451~459
- 9 Koyama H et al. Reticuloendotheliosis Group Virus Pathogenic to Chicken Isolated from Material Infected with Turkey Herpesvirus(HVT). Avian Diseases, 1976, 20, 427~434
- 10 Koyama H et al. Continuous Cell Culture from Chick Embryos Inoculated with Reticuloendotheliosis Strain T. Avian Pathology, 1981, 10, 152~162

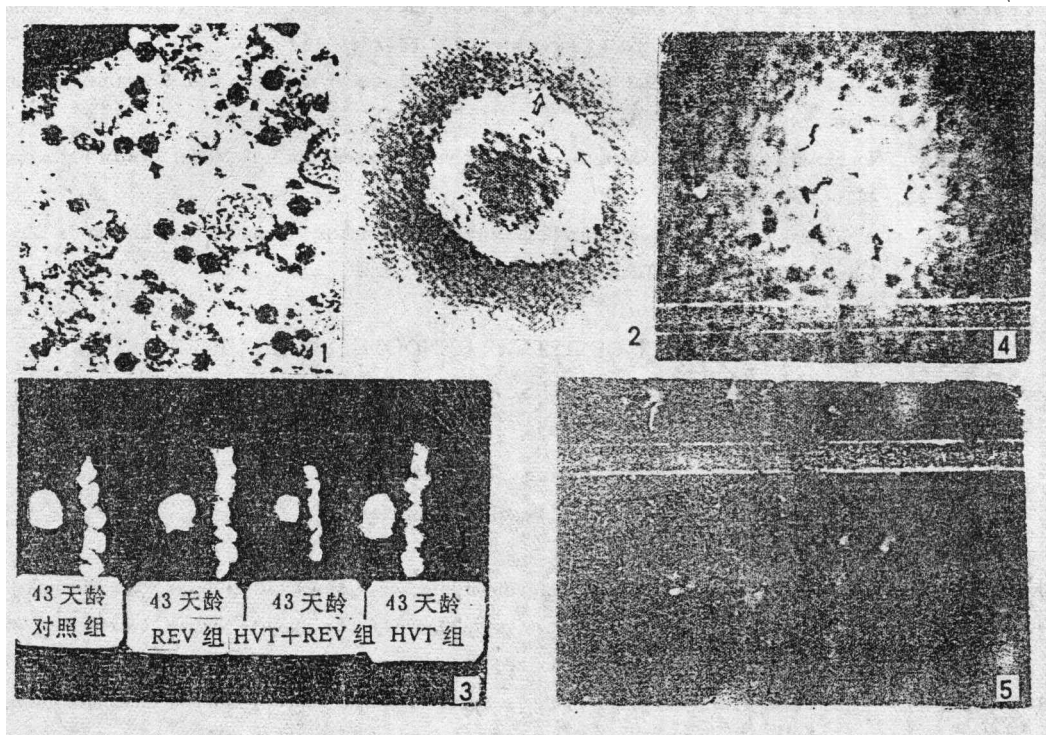
- 11 Motha M X J. Effects of Reticuloendotheliosis on the Response of Chicks to Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Pathology*, 1981, 11: 475~486
- 12 Purchase H G. A New Group of Oncogenic Virus, Reticuloendotheliosis, Chick Syncytial, Duck Infectious Anemia and Spleen Necrosis Virus. *J Natl Cancer Inst*, 1973, 51: 489~499
- 13 Witter R L et al. Depression of Vaccinal Immunity to Marek's Disease by Infection with Reticuloendotheliosis Virus. *Infect Immun*, 1979, 26: 90~98
- 14 Witter R L. Nonbursal Lymphomas Induced by Nondefective Reticuloendotheliosis Virus. *Avian Pathology*, 1986, 15: 467~486
- 15 Yuasa N et al. Isolation of Reticuloendotheliosis Virus from Chicken Inoculated with Marek's Disease Vaccine. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 1976, 16: 141~151

THE UNDESIRABLE EFFECT OF RETICULOENDOTHELIOSIS VIRUS (REV) IN CHICKEN DISEASE CONTROL

Xue Yishan Liu Fuan
(Department of Veterinary Medicine)

Abstract This paper reports studies on the morphology, animal infection, serological diagnosis and epidemiological survey of REV. Electron microscopy showed that REV was a typical type C oncornavirus with a "benzene ring-like" structure. Animal infection demonstrated that there existed synergism between REV and Herpesvirus of Turkey (HVT), and their combined action was dangerous to chicks. Using fluorescent antibody and enzyme-linked antibody techniques on frozen sections, two methods were established for determining REV distribution in the body of infected chicks. Serological survey of 10 chicken farms in Guangdong Province revealed positive reactors in 8 out of 10 farms, and suggested that the possible reason for HVT vaccine failure at one chicken farm was that the HVT vaccine used had been contaminated with REV.

Key words REV; HVT; Synergism; Immunosuppression; Virus distribution



图版 1 CEF 超薄切片细胞包浆中有许多 C 型 REV 存在 (箭头所示) (64 500 X)

- 2 REV 负染电镜照片 (760 000X), “苯环样结构”为核衣壳部分 (实心箭头), 核衣壳上有亚单位 (空心箭头)
- 3 各试验组鸡的法氏囊、胸腺大小比较
- 4 鸡感染 REV 后肝脏冰冻切片荧光染色结果 (400 X)
- 5 盖玻片细胞荧光染色阴性对照 (400 X)