

鸭肝炎病毒形态及接种鸡胚引起的病理变化观察

谢毅 邝荣禄 林维庆

(兽医系)

提 要

本文研究应用免疫电镜技术观察DHV形态,并对DHV接种鸡胚引起的病理变化进行观察。DHV颗粒为球形,无囊膜,直径约为15~20毫微米。

将DHV接种10天龄鸡胚,接种后于一定的时间间隔,直至鸡胚死亡,取鸡胚的肝和脑分别制样,用光学显微镜和电子显微镜观察其病理变化。在光镜下,可见肝窦淋巴细胞浸润,肝细胞变性和坏死,肝脏充血出血,大脑脑软膜淋巴细胞浸润和大脑毛细血管充血。肝脏的电镜检查,可见肝细胞间隙有很多泡囊,肝细胞胞浆出现电子密度很高的颗粒状物和空泡,核固缩,最后,核膜皱曲和破裂,细胞膜裂开,细胞器减少或消失。脑的电镜观察,可见脑神经细胞的内质网扩张形成小圆泡,核膜皱曲和破裂,细胞膜也破裂,细胞器溢出。

在肝组织的狄斯隙中可见病毒样颗粒,在靠近细胞膜的胞浆中发现病毒样颗粒被包在由膜围成的泡囊中。

关键词 鸭肝炎病毒;形态学;鸡胚;病理组织学变化

引 言

关于DHV形态的观察,Reuss, U.^[1]用DHV感染的鸡胚传代的鸡胚尿囊液,经离心沉淀后作电镜观察,看到DHV颗粒呈球形,直径为20~40毫微米。吴城等^[2]用相似的方法,在电镜下看到DHV颗粒呈球形,直径为30~35毫微米。Hanson等^[3]曾用免疫电镜技术观察DHV形态,但未发现DHV颗粒。

有关DHV接种鸡胚所引起的病理组织学变化前人已做了一些研究工作。例如,Rao等^[4]发现,接毒后48小时鸡胚的主要组织学变化是肝窦充血、单核细胞(mononuclear cell)浸润及肝细胞变性。接毒后72小时,血管周围组织成淋巴细胞(lymphoblast)浸润,肝实质坏死,偶有淋巴细胞(lymphocyte)灶性浸润。接毒后96~120小时,肝灶性凝固性坏死,脂肪样变(fatty change)和异嗜性粒细胞(neutrophil)浸润。

Fitzgerald等^[4]将DHV尿囊液接种10天龄鸡胚,接毒后每隔12小时,取鸡胚的肝、肾、脾、心、肺和脑做组织学检查,到第10天止,发现各种器官都有粒性白细胞(granu-

1987年12月7日收稿。

locytic leukocyte) 浸润, 肝实质灶性变性和坏死, 胆管增生。其中, 接毒后96小时首先看到肝细胞变性和坏死, 在多数鸡胚中, 这种变化是局灶性的, 并呈不规则分布。肝细胞胞浆出现颗粒或固缩, 对伊红的亲和力下降。常可看到核固缩, 核或整个细胞溶解, 坏死区域常有粒性白细胞浸润, 肝窦常充血。接毒后5~7天可见不同程度的胆管增生, 并伴有周围结缔组织增生。

但是, 用光学显微镜和电子显微镜同时观察人工感染DHV鸡胚肝和脑的病理变化方面尚未有报道。

本试验的目的是探讨应用免疫电镜技术观察DHV形态的可能性。并用光镜和电镜对人工感染DHV10天龄鸡胚肝和脑的病理变化进行观察。

材料和方法

1. 鸭肝炎病毒: 该毒株从法国进口, 简称E₂DHV, 深圳动植物检疫所提供。

2. DHV抗原的制备: 将E₂DHV尿囊腔接种10天龄来航鸡胚(华南农业大学实验禽场提供)60只, 每只0.1毫升。继续放37℃温箱中孵化, 连续照蛋观察6天, 接种后24小时内死亡的鸡胚弃去, 第2~6天死亡的鸡胚放4℃冰箱中过夜后, 收取鸡胚尿囊液。并取样接种肉汤琼脂斜面, 检查无菌后, 将感染DHV的鸡胚尿囊液差速离心处理, 提纯DHV抗原。具体方法是, 先将感染DHV的鸡胚尿囊液4,000g低速离心30分钟。然后取上清液30,000g, 4℃, 高速离心60分钟, 上清液即为经高速离心处理的DHV抗原。该DHV抗原毒力为10^{-6.23}CELD₅₀/0.1毫升。另外, 将经高速离心处理的DHV抗原180,000g, 4℃, 超速离心4小时, 吸去上层液体, 酌情留少量液体, 用吸管将管底沉淀充分打散后, 制成经超速离心处理的DHV抗原。

3. 兔抗DHV免疫球蛋白(IgG)的制备: 本地健康白兔二只, 体重为1.8公斤/只, 按王世中^[1]介绍的方法制备加弗氏完全佐剂的DHV抗原(油脂混合液1.73毫升, 活卡介苗0.23毫升, 经超速离心处理的DHV抗原1.5毫升), 然后用此抗原免疫兔。免疫步骤如下: 第一次于两后足掌和腹股沟皮下多点注射加弗氏完全佐剂的DHV抗原, 总量1毫升/只。第二次(在第一次注射后的第21天), 腹部、腹股沟和颈部皮下多点注射不加佐剂的经高速离心处理的DHV抗原, 总量为5毫升/只。第三次(在第二次注射后的第7天), 耳静脉注射不加佐剂的经高速离心处理的DHV抗原, 2毫升/只。末次注射后第7天于耳静脉处采少量血, 分离血清后按Murty等^[2]介绍的方法做琼脂双扩散试验, 测知抗血清效价为1:16。4天后用切开耳缘静脉滴血的方法采血, 分离血清。用硫酸铵盐析法粗提兔抗DHVIgG。再经葡聚糖(Sephadex)G200凝胶过滤进一步提纯兔抗DHVIgG。用日本岛津(Shimadzu)UV-120-02分光光度计测知提纯物中IgG含量为20毫克/毫升。用醋酸纤维素薄膜电泳法鉴定IgG的纯度, 结果只出现一条区带, 表明IgG的纯度较高。

4. 免疫电镜样品的制备: 将感染E₂DHV的鸡胚尿囊液4,000g, 30分钟处理, 取上清液再作30,000g, 1小时高速离心, 取上清液0.5毫升与1.5毫升经1:16稀释的兔抗E₂DHVIgG(20毫克/毫升)混合, 室温感作2小时后, 移入4℃冰箱过夜, 第二天以

20,000g, 30分钟离心, 沉淀加2滴生理盐水(双蒸水配制)将沉淀悬浮起来, 然后滴于敷有Formvar膜的载网上, 2%磷钨酸染色1分钟, 自然干燥后, 立即进行电镜观察。

5. 石蜡切片样品的制备: 感染E₂₂DHV的鸡胚尿囊液加入青、链霉素(各1,000单位/毫升), 作用2小时后, 尿囊腔接种10天龄来航鸡胚, 每只0.1毫升, 共30只, 继续放37℃温箱中孵化, 分别于接毒后第4、8、16、19、23、27、31和41小时, 各取鸡胚3只, 分别取鸡胚的肝和脑, 放入10%福尔马林溶液中固定1周。石蜡包埋, 切成厚度为4~6μ的切片, 行苏木素—伊红(H.E)染色。

6. 超薄切片样品的制备: 与制备石蜡切片样品同样的材料和方法, 将E₂₂DHV毒株接种鸡胚, 并于相同的各时段分别取3只鸡胚的肝和脑, 放入4%戊二醛(4℃)固定24小时, 再用1%饿酸双固定, 经酒精系列脱水, Epon 812包埋。LKBV型超薄切片机切片, 醋酸双氧铀与柠檬酸铅双重染色。

7. 对照石蜡切片和超薄切片样品的制备: 将正常鸡胚尿囊液加入青、链霉素(各1,000单位/毫升), 作用2小时后, 尿囊腔接种10天龄来航鸡胚, 每只0.1毫升, 共20只。分别于接种后第8、16、31和41小时, 各取2只鸡胚的肝和脑, 与制备DHV感染的石蜡切片和超薄切片同样的材料和方法制成对照样品。

石蜡切片样品于光学显微镜下观察和拍照。负染样品和超薄切片样品于Philips EM-400电子显微镜下观察和拍照。

试验结果

1. 免疫电镜样品观察: 可见样品中散布着较均一的球形DHV颗粒, 无囊膜。中间电子密度较高, 为核芯。外包围一层衣壳, 清晰可见。DHV颗粒直径约15~20毫微米(图版1)。

2. 感染DHV鸡胚的肉眼病理变化: 可见胚胎发育不良, 胚体较小, 体表充血出血, 腹部及股部水肿。肝脏有出血斑点和细小坏死灶。

3. 石蜡切片样品观察: 接毒后16小时, 可见肝局部毛细血管扩张充血, 局部肝窦出现淋巴细胞浸润。接毒后19小时, 局部肝窦充血出血, 并有淋巴细胞浸润(图版2)。肝被膜下淋巴细胞浸润特别明显。接毒后23小时, 肝组织局部出现渐进性坏死灶, 表现为肝细胞索结构模糊, 细胞着色变淡, 有些肝细胞核溶解或整个细胞溶解消失。坏死灶周围有淋巴细胞浸润(图版3)。接毒后31小时, 肝窦充血出血, 肝细胞颗粒变性。大脑脑软膜淋巴细胞浸润和红细胞渗出(图版4)。接毒后41小时, 肝脏充血和大片出血。肝细胞肿胀, 颗粒变性, 有些脂肪变性, 并可见肝细胞坏死。淋巴细胞灶性浸润。大脑毛细血管充血。

4. 超薄切片样品观察: 接毒后4小时, 可见肝细胞质膜向胞浆内陷入, 吞饮细胞间隙中的小颗粒。接毒后8小时, 肝细胞吞饮活动更为活跃, 形成很多吞饮泡。肝细胞间隙有很多泡囊样物。接毒后16小时, 狄斯隙中可见多量的病毒样颗粒, 病毒样颗粒成堆存在, 呈刚从小管中释放样(图版5)。肝细胞胞浆中可见电子密度很高的颗粒状物, 可能是正在装配或已装配的子代病毒颗粒。此外, 肝细胞胞浆中见包围有中空病毒衣壳和个别

正在脱壳的病毒样颗粒的泡囊,附近有溶酶体。接毒后23小时,肝细胞胞浆中内质网扩张形成空泡。接毒后27小时,肝细胞膜附近见有多个病毒样颗粒包在由膜围成的泡囊中,泡囊中病毒样颗粒呈向外释放样(图版6)。接毒后31小时,肝细胞核固缩,与胞质分离,形成空隙,胞浆结构模糊,呈均质一片。脑神经细胞淡染,核膜皱曲,有些部位形成凸泡,细胞核中出现泡囊,胞浆中内质网扩张,形成小圆泡。接毒后41小时,肝细胞核膜皱曲、破裂。部分肝细胞的细胞膜裂开,相邻肝细胞的胞浆互相融合,胞浆中细胞器减少或消失(图版7)。脑神经细胞核膜也皱曲、破裂。细胞膜裂开,细胞器溢出,胞浆中细胞器消失(图版8)。

讨 论

用免疫电镜技术制作的负染样品在电镜下看到的球形病毒颗粒,与Reuss, U.^[6]和吴城^[2]的报道相似。但是所见到病毒样颗粒较小,直径均15~20毫微米。

接毒后16小时,石蜡切片样品在光镜下观察,开始看到肝组织局部毛细血管充血,肝窦出现淋巴细胞浸润。而超薄切片样品在电镜下观察,也开始看到有病毒样颗粒出现。这可能是病毒在肝细胞中增殖(复制),病毒颗粒释出细胞外,产生炎症反应,导致淋巴细胞在肝窦的出现,说明光镜下发现淋巴细胞出现与电镜下看到病毒样颗粒两种情况之间是有联系的。

石蜡切片样品光镜下观察,从接毒后16小时起直至鸡胚死亡,可以看到肝组织发生一系列的病理变化,而脑组织只是在接毒31小时后,才出现大脑脑软膜淋巴细胞浸润,大脑毛细血管充血的病理变化。超薄切片样品电镜下观察,同样从接毒后至鸡胚死亡,肝组织明显地出现一系列病理变化,并可看到病毒在肝细胞中繁殖(复制)。而脑组织也只是在接毒31小时后,才开始出现病理变化。说明肝脏是DHV侵害的靶器官,病毒在肝细胞中繁殖(复制)。而脑组织只是在感染后期才受到一定程度的病理损伤。

石蜡切片样品光镜下的观察结果与Rao^[7]和Fitzgerald^[4]等人所报道的相似。但是,由于不同DHV毒株对鸡胚的毒力有所不同,各种病变开始出现的时间有所差异。本试验中没有发现嗜嗜性细胞浸润,也没有发现胆管增生现象。但发现大脑脑软膜淋巴细胞浸润和红细胞渗出。大脑毛细血管扩张充血。说明在感染后期脑膜发生炎症变化。而电镜下的观察结果也显示感染后期脑神经细胞发生了病理损害。

根据超薄切片样品观察结果提示病毒的脱壳可能是在泡囊样结构中进行的。在病毒侵染循环的早期,病毒颗粒可能积累在泡囊中,其中有一些通过小管与细胞外界相连,病毒可能通过这些小管释出,因此, DHV可能通过两种机制从侵染细胞中释放出来,一种是上面假设的在一长段时间内通过小管的释放,另一种是从死亡细胞最终破裂释放出来。脊髓灰质炎病毒可能也是通过这两种机制释出细胞外的^[8]。

结 论

应用免疫电镜技术可以观察到DHV的形态,病毒颗粒呈球形,直径约为15~20毫微

米。

DHV接种鸡胚引起的病理变化的观察结果表明,肝和脑在接毒后的不同时间分别出现各种病理变化。石蜡切片样品可见肝窦充血出血,淋巴细胞浸润。肝细胞变性和坏死。大脑脑软膜淋巴细胞浸润和红细胞渗出,大脑毛细血管充血。超薄切片样品可见肝细胞间隙出现多量泡囊样物。肝细胞胞浆中出现电子密度很高的颗粒状物和空泡。核固缩,核膜皱曲,破裂。细胞膜裂开。在感染后期,脑神经细胞的核膜和细胞膜也破裂。

肝脏是DHV侵害的靶器官。

在肝组织的狄斯隙和肝细胞胞浆中的泡囊内可见病毒样颗粒。

引用文献

- (1) 王世中.免疫化学技术.北京:科学出版社,1980:158-161
- (2) 吴城等.中国兽医杂志,1982;(11):7-8
- (3) C. A. 奈特著,方荣祥译.分子病毒学,北京:科学出版社,1980:131
- (4) Fitzgerald L. E., et al, Avian Dis., 1969, 13:147-157
- (5) Hanson L. E., et al, Avian Dis., 1964, 8:196-202
- (6) Murty D. K., et al, Am. J. Vet. Res., 1961, 22:274-278
- (7) Rao S. B., et al, Indian Vet. J., 1958, 35:534-539
- (8) Reuss U. Zentr. Veterinaermed, 1959, 6:209-248

MORPHOLOGY OF DUCK HEPATITIS VIRUS(DHV) AND HISTOPATHOLOGIC CHANGES INDUCED WITH DHV IN THE DEVELOPING CHICKEN EMBRYO

Xie Yi Kuang Ronglu Lin Weiqing
(Department of Veterinary Medicine)

ABSTRACT

This paper deals with observation of the morphology of DHV, applying immune electron microscopy, and histopathologic changes of embryonating chicken eggs inoculated with DHV.

DHV particles were spherical, without envelope and 15-20 nm in diameter.

Ten-day old embryonating chicken eggs inoculated with DHV were killed and examined histologically under the light microscope and electron microscope at regular intervals up to the death of the infected embryos.

Histopathologic changes seen under the light microscope included lymphocyte infiltration of the liver sinusoids, degeneration and necrosis of the hepatic cell, congestion and hemorrhage of the liver, lymphocyte infiltration of the pia mater encephali and capillary blood congestion of the cerebrum.

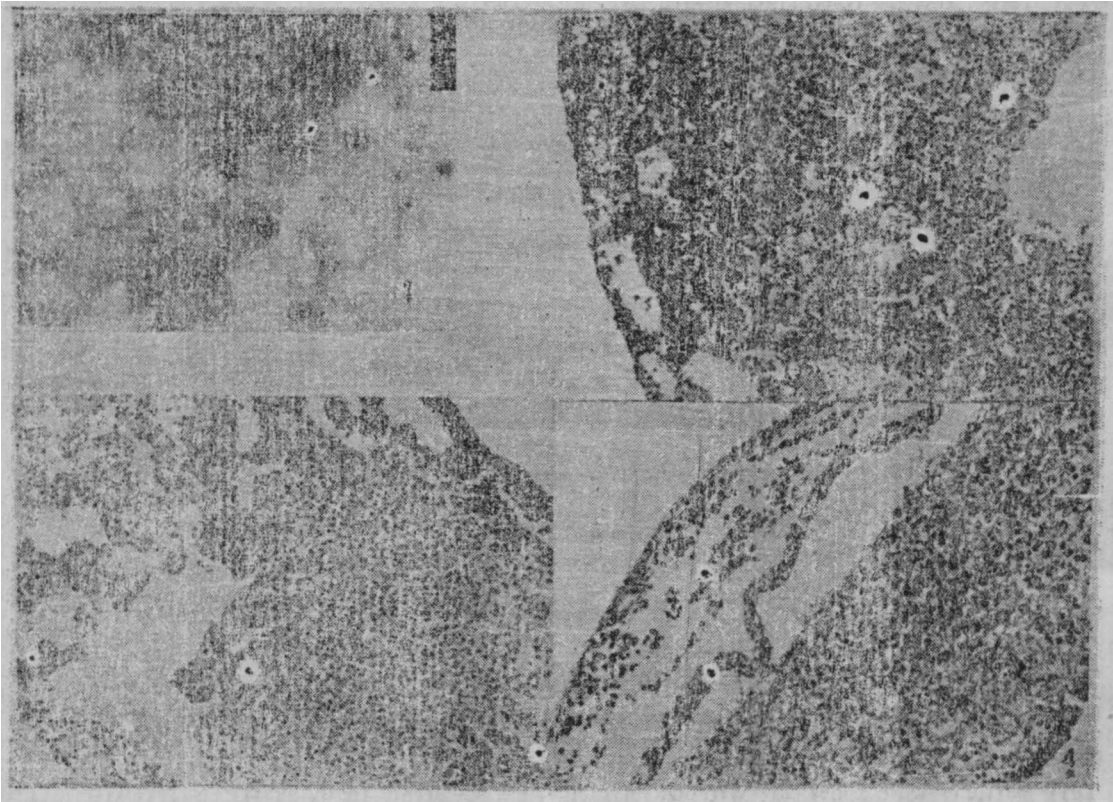
Electron microscope examination of the liver revealed many vesicles in the intracellular

space of the hepatocytes, high electron dense particles in the cytoplasm, cytoplasmic vacuoles and shrunken nuclei. Finally, the nuclear membranes wrinkled and ruptured. The plasma membranes burst and organelles spilled or disappeared.

Brain cells observed under the electron microscope showed that the endoplasmic reticulum dilated and formed small vesicles. The nuclear membrane also ruptured and organelles were released.

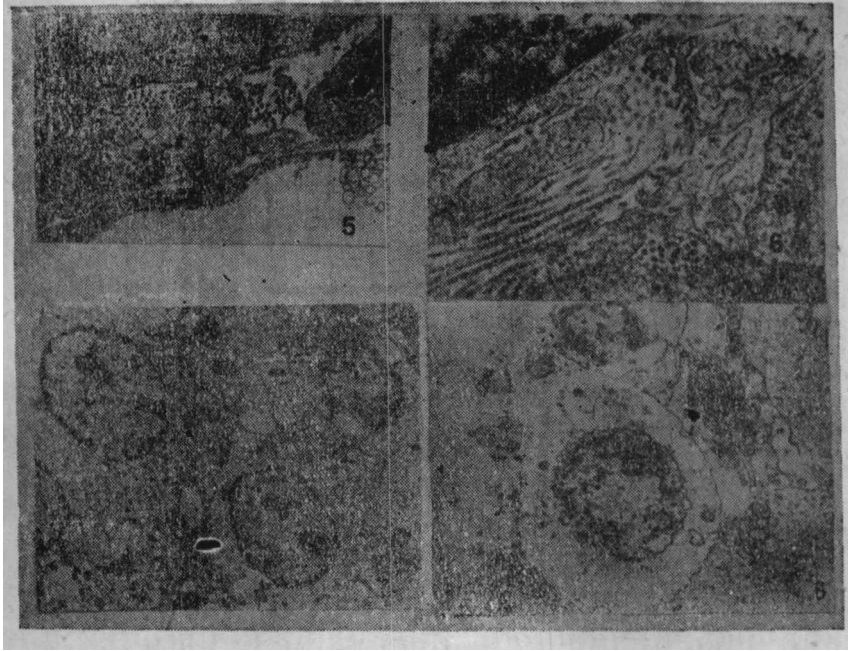
Viruslike particles were found in Disse's space and in the membrane-limited vesicles in the cytoplasm near the cell membrane.

Key words: DHV; Morphology; Chicken embryo; Histopathologic changes



图版

1. DHV颗粒的电镜照片。×390,000
2. 局部肝窦充血出血(◀), 并有淋巴细胞浸润(◁)。×50
3. 肝局部形成渐进性坏死灶(◁)。其中肝细胞索结构模糊, 细胞着色变淡, 有些细胞核或整个细胞溶解。病灶周围淋巴细胞浸润(◀)。×50
4. 大脑脑软膜淋巴细胞浸润和红细胞渗出。×100



5. 狄斯隙中见病毒性颗粒。×18,000

6. 肝细胞膜附近见有多个病毒样颗粒包在由膜围成的泡囊中，并呈向外释放样。
×21,810

7. 肝细胞核膜皱曲、破裂。细胞膜裂开，相邻肝细胞界限不清，细胞器减少或消失
×4,695

8. 脑神经细胞核膜皱曲、破裂。细胞膜裂开，胞浆中细胞器消失。×6,171