

## 鹅源鸭瘟病毒和小鹅瘟病毒 在同一宿主系统增殖的观察\*

洪 锋 黄引贤

(华南农业大学兽医系, 广州)

### 提 要

本文首次报道了鹅源鸭瘟病毒(DPV-I)和鸭胚化小鹅瘟病毒(GPV-I)能同时  
在同一鸭胚内复制增殖,未发现干扰作用。在理论上说明某些不相关的两种病毒可在同一  
宿主增殖,实践上为利用同一鸭胚研制二联疫苗提供了依据。研究结果表明: 1. DPV-I  
和GPV-I联合感染同一鸭胚后,其尿囊液在电镜下见两种病毒,DPV-I呈圆形或椭圆形,  
有囊膜,直径为88—109nm,GPV-I呈圆形,无囊膜,直径为18—25nm; 2. 含毒尿囊  
液使鸭胚成纤维细胞(DEF)单层发生细胞病变作用(CPE),证实存在DPV-I,而用  
小鹅瘟微量免疫扩散(MID)试验,又能检出GPV-I抗原; 3. 含毒尿囊液免疫鹅的血清中  
存在抗两种病毒的中和抗体和GPV沉淀抗体; 4. 含毒尿囊液免疫的成鹅对DPV强毒攻  
击有相当免疫力,免疫鹅血清能中和GPV,使其失去对鸭胚的致病力; 5. GPV-I单独  
或与DPV-I联合感染DEF单层后,均未见在细胞上复制。

**关键词:** 鹅源鸭瘟病毒 小鹅瘟病毒 联合感染

一般认为,两种病毒感染同一细胞可能产生干扰作用,干扰现象的机理可能是干扰  
素的产生、宿主表面受体的改变或者病毒对复制部位或酶的竞争<sup>[2,3]</sup>。但有些病毒  
如腺病毒、呼肠孤病毒诱导干扰素产生的能力差,且对干扰素的作用几乎不敏感<sup>[8]</sup>。  
YUROV(1967)<sup>[9]</sup>报道,两种病毒感染的鸡胚成纤维细胞(CEF)产生的干扰素较用  
单种病毒的细胞少。Chang等(1983)<sup>[7]</sup>报道,马立克氏病病毒(MDV)和传染性囊  
膜病毒(IBDV)能在同一CEF上增殖。鹅源鸭瘟病毒(DPV-I)属疱疹病毒,而小鹅  
瘟病毒(GPV-I)则属细小病毒,这两种不同的病毒能否在同一宿主系统增殖,迄今未  
见报道。

本研究试图在同一宿主系统增殖DPV-I和GPV-I,为利用同一宿主系统生产二联  
弱毒疫苗提供依据。

## 材 料 与 方 法

### 一、试验病毒

(一) DPV-I: 系鹅源鸭瘟弱毒,其半数组织培养感染量(TCID<sub>50</sub>)为 $10^{8.0}/0.1\text{ml}$

本文于1989年1月25日收到

\*本文为硕士学位论文一部分

(二) DPV-II: 系鹅源鸭瘟强毒, 其  $TCID_{50}$  为  $10^8/0.1ml$ 。

(三) GPV-I: 系鸭胚化小鹅瘟弱毒, 其鸭胚半数致死量 ( $ELD_{50}$ ) 为  $10^{7.2}/0.2ml$ 。

## 二、禽胚、鹅及鸭胚成纤维细胞 (DEF)

鸭胚系 9 日龄本地鸭胚; 成鹅系本地鸭瘟及小鹅瘟非免疫健康成鹅, 血清检测鸭瘟和小鹅瘟抗体均为阴性; DEF 参照常规方法制备<sup>[1]</sup>, 立方瓶或 96 孔微量组织培养板上培养备用。

## 三、DPV 的感染力及其中和抗体的测定

参照 Wolf 等<sup>[2]</sup>介绍的方法, 在 DEF 微量培养系统滴定 DPV, 并用微量中和试验测定待检血清的中和抗体, 计算病毒的  $TCID_{50}$  和 50% 中和抗体效价。

## 四、病毒提纯浓缩及回胚试验

根据两种病毒的理化特性差速离心法对样品提纯和浓缩<sup>[1]</sup>; 将病毒细胞培养液经尿囊腔接种鸭胚, 每只为 0.2 和 0.4ml, 孵育 10 天后观察死胚的病理变化。

## 五、两种病毒混合液接种鸭胚的情况

GPV-I 和 DPV-I 以不同比例混合, 分别以每只 0.4ml 接种鸭胚, 计算各组鸭胚平均死亡时间 (MDT), 观察死胚病变。收获的鸭胚尿囊液提纯浓缩, 沉淀物用电镜检查 (样品按常规方法负染<sup>[1]</sup>, 在 PHILIPS EM<sub>100</sub> 电镜下观察), 并配成原量 1/20 浓缩物, 用小鹅瘟 MID 试验测定 GPV 滴度。测定 DPV 感染力。

## 六、GPV 抗原抗体、感染力和中和指数的测定

参照小鹅瘟微量免疫扩散 (MID) 试验检测抗原和抗体; 参照常规方法<sup>[1]</sup>, 测定 GPV 对鸭胚的  $LD_{50}$  及待检血清的中和指数, 待检血清为  $10^{-1}$  病毒液免疫鹅所得。

## 七、血清及免疫力测定

DPV-I 和 GPV-I 等量混合液以每只 0.2ml 接种一代鸭胚, 收获的死胚尿囊液作  $10^{-1}$  和  $10^{-4}$  稀释, 各肌注 4 只成鹅, 每只 1ml, 第 6 天后采血分离血清备用。  $10^{-1}$  组免疫鹅于第 21 天用 DPV-II 攻毒并观察 16 天, 计算其保护率。

# 结果与讨论

## 一、两种弱毒分别在 DEF 复制的适应性测定

1. DPV-I: 将病毒液 0.4ml 接种方瓶内 DEF 单层上培养, 24 小时后见少量细胞变圆, 72 小时后大部分细胞变圆、萎缩和脱落并聚集成细小葡萄串样。病毒传至第 10 代 (DPVC<sub>10</sub>), CPE 产生的时间、程度和特点均稳定。

回胚试验接种 DPVC<sub>10</sub> 的 5 只鸭胚全部死亡, 胚体充血, 肝均有针尖样坏死及出血。

DPVC<sub>10</sub> 经提纯浓缩, 电镜检查见圆形或椭圆形具囊膜的病毒颗粒, 直径为 90—120nm。

2. GPV-I: 病毒液按每瓶 0.4ml 分别加入不同生长时期 (0、6、9、11、18、22 小时) 的 DEF 上培养 96 小时并收获, 分别盲传第 5 代 (GPVC<sub>5</sub>), 均未见细胞发生 CPE。GPVC<sub>5</sub> 回胚后, 各组鸭胚未见死亡, 剖检仅见用 GPVC<sub>5</sub>-18 小时组接种的 3 只胚充血, 其余正常。该组继续于生长 18 小时的 DEF 上培养至第 10 代 (GPVC<sub>10</sub>) 仍未见 CPE。GPVC<sub>10</sub> 回胚 5 只均无死亡, 剖检正常。GPVC<sub>5</sub> 和 GPVC<sub>10</sub> 经电镜检查未见

病毒样颗粒。1/20浓缩物经小鹅瘟 MID 试验为阴性。

## 二、两种弱毒在同一 DEF 上复制的观察

在生长18小时的 DEF 上接种 DPV-I 和 GPV-I 的等量混合液 0.4ml, 培养 24 小时后逐渐出现上述 DPV 引起的 CPE。细胞培养物经电镜检查, 发现经 20000r/m 离心的沉淀物有圆形或椭圆形具囊膜的病毒颗粒, 大小为 90—120nm, 而 20000r/m 离心后的上清液再经 45000r/m 离心, 其沉淀物则未见病毒样颗粒, 同时, 小鹅瘟 MID 试验也为阴性。

据报道, GPV 能在鹅胚、番鸭胚及其细胞培养上增殖<sup>[6]</sup>。细小病毒较易感染处于有丝分裂期的细胞<sup>[1,5,4]</sup>。本试验用的 GPV 为鸭胚适应毒, 并用它反复感染 DEF 单层形成前各个时期的细胞, 同时, 将它和 DPV 等量混合后联合感染 DEF, 结果表明细胞内均无 GPV 增殖。究竟是病毒的某些毒株对不同宿主细胞的适应性差异抑或另有其特定的感染条件, 有待今后探讨。

## 三、两种弱毒在同一鸭胚增殖的观察

### 1. 不同比例混合的病毒液接种鸭胚后的情况, 结果如表 1:

表1. 不同比例混合的病毒液接种鸭胚后的情况  
Table 1. Status of the duck embryos vaccinated  
with virus fluids in different mixed proportion

组别	GPV 滴度 (MID 试验)	TCID <sub>50</sub> (DPV 的感染力)	鸭胚的 MDT (b)	鸭胚病变率 (%)		电镜检查
				肝坏死出血	CAM 增厚	
一组 (G:D)	4*	10 <sup>8.58</sup> /0.1ml	90.7	100 (24/24)	54 (13/24)	见两种病毒颗粒, 一种呈圆形或椭圆形, 有囊膜, 直径 88-109nm, 另一种为圆形, 无囊膜, 直径 88-25nm。
二组 (G:D)	4	10 <sup>8.38</sup> /0.1ml	96	100 (24/24)	20.8 (5/24)	
三组 (G:D)	未	测	94	87.5 (7/8)	25 (2/8)	
四组 (G:D)	未	测	111.7	82.5 (5/8)	75 (6/8)	未测

\*. GPV 滴度的倒数

从表 1 可见, 两种弱毒可同时同一鸭胚增殖, 电镜检查其尿囊液见两种病毒, 一种为 DPV, 呈圆形或椭圆形, 具囊膜, 直径为 88—109nm, 另一种为 GPV, 呈圆形无囊膜, 直径为 18—25nm。尿囊液使 DEF 单层产生 CPE, 其浓缩物经小鹅瘟 MID 试验为阳性。死胚具有两种病毒特有的组织学变化——肝针尖样坏死出血及绒毛尿囊膜 (CAM) 增厚。

不同比例病毒混合液接种鸭胚后, 一、二组 MDT 和 CAM 有差异, 其他相同, 三、四组有一些项目未做, 但鸭胚出现相应病变, 证实四组胚均有两种病毒增殖。

### 2. 免疫鹅抗两种病毒抗体及对鸭瘟强毒攻击的保护率测定

两种病毒等量混合液  $10^{-4}$  组免疫鹅血清, 第一周已出现 DPV 中和抗体, 其 50% 中和抗体效价为 1:22, 对照组血清为阴性反应。在小鹅瘟 MID 试验中, 第一周已检出 GPV 沉淀抗体, 其效价 1:8, 对照组血清为阴性反应。

小鹅瘟中和指数的测定结果如表 2。

表2.小鹅瘟中和指数(NI)的测定  
Table 2. Detection of neutral Index(NI) for gosling plague

组 别	GPV + 阴性血清组					GPV + 小鹅瘟和鸭瘟病毒免疫鹅血清组				
病毒稀释度	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
接种胚结果	3/3*	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	2/3	0/3
病毒稀释度	$10^{-3}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-5}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$
接种胚结果	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
LD <sub>50</sub>	$10^{7.85}/0.2\text{ml}$					$10^{3.88}/0.2\text{ml}$				

\*.分母为鸭胚数, 分子为死亡数

从表 2 可见, GPV 加阴性血清组对鸭胚的 LD<sub>50</sub> 为  $10^{7.85}/0.2\text{ml}$ , 而 GPV 加病毒液  $10^{-1}$  免疫鹅血清组的 LD<sub>50</sub> 为  $10^{3.88}/0.2\text{ml}$ , 后者的中和指数等于 3.88, 其反对数为 7585。

病毒液  $10^{-1}$  组免疫鹅用 DPV- II 攻毒后完全保护。

以上试验结果表明, 两种弱毒可同时在同一鸭胚增殖, 病毒间未见干扰作用。这从鸭胚尿囊液中可检出两种病毒粒子, 使 DEF 单层发生 CPE, 小鹅瘟 MID 试验检出 GPV 抗原, 免疫鹅对 DPV 强毒攻击有免疫力, 其血清存在两种抗体并能中和 GPV 等多方面得到证实。一般认为, 两种病毒感染同一细胞可能产生干扰作用<sup>[2,3]</sup>。本研究结果则从另一方面证明某些不相关两种病毒可在同一鸭胚复制, 表明两种病毒感染同一宿主后结果的多样性, 在实践上为利用同一鸭胚研制二联疫苗, 简化制苗工艺等方面提供了依据。

### 参 考 文 献

- (1) 殷震等主编, 1985, 动物病毒学, 200-288, 科学出版社
- (2) Baten, A. et al., 1976, in *Animal Microbiology*, Vol. 2, 437-449 Black Well Sci. Publ., Oxford.
- (3) Fenner, F. et al., 1974, in *the Biology of Animal Viruses*, 2nd ed, 319-324 Academic press New York.
- (4) Gough, R. F. et al., 1981, *Vet Record*, 108: 399-400.
- (5) Roszkowski, J. et al., 1982, *Avian Pathology*, 11: 571-578.
- (6) Wolf, K. et al., 1974, *Avian dis.*, 18(3): 427-434.
- (7) Chang, J. D. T. et al., 1983, *Poultry Science* 85(11): 2326-2335.
- (8) Yarov, K. P., 1967, *Acta Virol*, 11: 494-499

## Study on the Propagation of Duck and Gosling Plague Viruses in Identical Host System

Hong Feng    Hunag Yin-xian

(South China Agricultural University, Guangzhou)

It is the first time in the present paper to report the propagation of duck plague virus (DPV-I) and gosling plague virus (GPV-I) in the identical duck embryo, what have been revealed in the results are as follows,

1. Both DPV and GPV particles were detected under electronic microscope in the CAF of the duck embryos infected with DPV-I and GPV-I.
2. CAF with viruses could produce cytopathic effect (CPE) in the duck embryonic blast (DEF) cell monolayers, showing the existence of DPV, and GPV antigens were detected by micro-immune diffusion (MID) test for gosling plague.
3. The neutralization antibodies to both DPV/GPV and GPV-precipiting antibody were detected in the adult geese vaccinated with DPV/GPV, and
4. The vaccinated adult geese were resistant to the challenge with virulent DPV 16 days after vaccination.

It has also been found that GPV-I could not be propagated solely or coinfectd with DPV-I in the DEF cells.

**Key words:** Co-infection DPV GPV