

接种不同毒力的马立克氏病病毒后鸡病毒血症的动态比较*

殷俊¹, 崔治中^{2**}

(1. 扬州大学畜牧兽医学院, 江苏扬州 225009;

2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

Comparison of Dynamics in Viremia Levels in Chickens Inoculated with Marek's Disease Virus Strains of Different Pathotypes

YIN Jun¹, CUI Zhi-zhong^{2**}¹(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, 225009 China)²(Department of Preventive Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian, 271018 China)

Abstract: One-day-old unvaccinated chicks were inoculated with serotype I virulent strain GA and vaccine strain CVI988, serotype III vaccine strain HVT of Marek's disease viruses (MDV). By using an indirect immunofluorescence assay of suspensions of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with monoclonal antibodies (MAb) BA₄ and BD₈ specific to glycoprotein B of MDV, the dynamic courses of viremia levels for each of 3 strains from 4 days to 45 days postinfection (PI) were determined. Viremia for virulent strain GA-infected chickens was detected from 4 days PI until days before death of infected chickens, it got its peak at about 14 days PI. Viremia in serotype I vaccine CVI988-inoculated chickens was measured between 4 to 22 days PI, it could be detected from 4 days PI and ended at 18 days PI, it got its peak at 8 days PI. For serotype 3 vaccine HVT-inoculated chickens, viremia could be detected between 4 to 14 days PI, its peak happened at about 6 days PI. Such IFA with MAbs BA₄ and BD₈ could be used to evaluate quality of vaccination process in chicken flocks. The differential dynamic courses of viremia for different strains may be used to diagnose virulent MDV infection in vaccinated flocks. The viremia levels measured by IFA with the MAbs and co-cultivation assay for plaque forming unit (PFU) were compared. The results indicated that IFA assay of PBMC suspension was more sensitive and specific than co-cultivation assay, i. e. viremia levels measured by IFA were 30 to 100-fold higher than that by plaque-forming assay in CEF for the same sample.

Key Words: Marek's disease virus; Viremia dynamic; IFA

摘要: 1日龄非免疫鸡分别接种马立克氏病病毒(MDV)I型强毒GA株、I型MDV疫苗毒CVI988株和III型火鸡疱疹病毒(HVT)疫苗株后第4日起,定期采血并用抗MDV囊膜糖蛋白B(gB)单克隆抗体介导的间接免疫荧光试验检测MDV在外周血单核细胞(PBMC_s)中的感染状况。结果发现,自接种I型强毒GA株后第4日到鸡发病死亡前,都能检出GA株引起的病毒血症,并于2周左右达到高峰;自接种CVI988株后第4日到第20日止,能检出病毒血症,并于第8天左右达到高峰;自接种HVT后第4日到第16日止,能检出病毒血症,并于第6天左右达到高峰。与此同时,将GA株病毒血症的IFA检测结果与细胞培养上病毒空斑计数试验结果比较,发现IFA试验比空斑计数试验更为敏感。本试验既可用于判断对鸡作MDV疫苗免疫的接种效果,又可用于检测MDV野毒感染状态。

收稿日期:1999-11-16,修回日期:2000-03-22

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870008)

作者简介:殷俊(1973-),女,助教,预防兽医学硕士。

** 通讯作者:崔治中(1944-),男,教授,博士,主要研究兽医微生物学及分子病毒学。For correspondence.

关键词: 马立克氏病病毒; 病毒血症动态; 间接免疫荧光试验

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)01-0059-05

马立克氏病(MD)是由马立克氏病毒(MDV)引起的鸡的一种高度传染性肿瘤疾病^[1,2],也是迄今为止第一个能用疫苗预防的病毒性肿瘤病。马立克氏病病毒是一种嗜淋巴性细胞结合病毒,分为三个血清型^[3],其中致弱的 I 型和不致病的 II 和 III 型均可用作疫苗^[4],对预防和控制 MD 发挥了重要作用。目前,国内外市场上主要使用的疫苗中, I 型 CVI988 株使用效果最好, III 型 HVT 目前在我国使用最为广泛。

根据对 MDV 的分子生物学研究得知, MDV 的糖蛋白 B 抗原(MDVgB)是一种非分泌性抗原^[5],它位于感染细胞表面和胞浆中^[6],可导致中和抗体产生^[7]。陆长明等用能表达 I 型 MDVgB 的重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞免疫小鼠,筛选到两株单克隆抗体细胞 BA₄ 与 BD₈ 株^[8],其中 BD₈ 识别的是 MDVgB 上三个型所共有的抗原决定簇, BA₄ 识别的是 MDVgB 上 I 型特异性抗原决定簇,这是国内外已报导的杂交瘤细胞中唯一的一个 I 型 MDVgB 特异性细胞株,可直接用于区别 I 型 CVI988 株疫苗与其它 II、III 型疫苗。

MDV 在机体外周血液单核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)中的增殖特点是体现该病毒特性的一个重要方面。Holland 等利用抗 HVTgB 单抗(L₇₈)介导的间接免疫荧光试验(IFA)测定了 HVT 在感染鸡体内的病毒血症动态情况,发现从接种后第 4 日检测起到第 12 日止,能检出 HVT 引起的病毒血症,并于第 6 日达到高峰^[9]。

关于 MDV 的 I 型强毒株(GA)和 I 型疫苗株(CVI988)在感染鸡体内的病毒血症动态情况,目前尚缺乏系统资料,更无对三种不同类型病毒(GA、CVI988、HVT)的病毒血症动态变化的系统比较。鉴于 Holland 等的实验结果,我们在对 PBMC 的预处理方法进行比较的基础上,利用抗 MDVgB 单抗(BA₄、BD₈)介导的 IFA 测定了 MDV I 型毒株(GA、CVI988)及 HVT 株病毒血症的消长情况。

1 材料与方法

1.1 病毒的准备

按常规方法取 9~10 日龄 SPF 鸡胚(购自南京药械厂),制备鸡胚成纤维细胞单层增殖 I 型 MDV 强毒株 GA(来自美国农业部禽病和肿瘤研究所,用

时已大约第 30 代病毒株)及 I 型疫苗毒的克隆株 CVI988/C4(由本实验室保存,崔治中 1999^[10])。病毒经 CEF 增殖后,冻存于液氮中,并进行空斑计数备用。空斑数已知的 HVT 株疫苗由本院传染病教研室惠赠。

1.2 动物接种与饲养

试验一、1 日龄非免疫鸡(由江苏省家禽研究所提供)20 只,腹腔接种 GA 株(1500 PFU/只),设空白对照鸡 5 只,每组隔离饲养,定期采血,分离 PBMC,用不同的方法测定病毒血症。

试验二、1 日龄非免疫鸡 60 只随机分为三组,每组 20 只,分别腹腔接种 GA 株(1700 PFU/只)、CVI988/C4 株(1300 PFU/只)、HVT 株(2000 PFU/只),并设空白对照鸡 5 只。每组隔离饲养,定期采血,分离 PBMC,用不同方法测定病毒血症;其间剖检死亡鸡,观察大体病变。

1.3 用单抗(BA₄、BD₈)介导的间接免疫荧光试验测定鸡感染 MDV 后的病毒血症

1.3.1 PBMC 固定方法的比较

自接种后 4 d 起,隔日心脏采血,每组 4 只鸡,每只 1~2 mL,血液以枸橼酸钠抗凝。将抗凝血缓慢加入装有淋巴细胞分层液(上海华美生物工程公司产品)的试管中,使血液重叠于分层液上,用水平离心机 2 000 r/min 30 min 离心。以毛细血管吸取 PBMCs 层,置离心管中,用 PBS(0.01 mol/L pH7.2)以 1 000 r/min 10 min 洗涤 1~2 次,用 PBS 配成细胞悬液(约 10⁷ 个/mL)。部分细胞留作直接检测,部分制成细胞涂片,自然干燥。为了能够有效地观察特异性荧光,把细胞涂片分成四组。第一组浸于 2.5% 戊二醛溶液中室温作用 10~15 min。第二组浸于 100% 丙酮中室温作用 10~15 min。第三组浸于丙酮-乙醇(6:4)混合液中室温作用 10~15 min,第四组浸于 4% 多聚甲醛溶液中,室温作用 30 min,所有标本于 PBS 中室温浸泡 5 min 后备用。

1.3.2 对 PBMC 悬液的间接免疫荧光试验(IFA)

主要操作程序

(1)在小试管中加入 100 μL PBMCs 悬液后,再加 100 μL 第一抗体,即单抗 BA₄ 和 BD₈(以 PBS 做 1:200 稀释),并混匀,于 37℃ 作用 30~90 min。

(2)将细胞重新悬液于 1~1.5 mL PBS 中以 1 000 r/min 离心 5 min 洗涤,重复一次。

(3)以 100 μ L PBS 重新悬浮细胞沉淀,加 100 μ L 荧光抗体(异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠 IgG, Sigma 公司产品,以 PBS 做 1:25 稀释),置 37 $^{\circ}$ C 作用 30~90 min。

(4)用 PBS 洗涤两次。

(5)将细胞重新悬浮于 20~30 μ L 含 10% 甘油的 PBS 中,即滴加于载玻片上,加盖玻片封载。

(6)立即在倒置荧光显微镜(Olympus, IX-FLA 型)下检查。

1.4 病毒血症水平的病毒空斑计数试验

按常规方法分离 PBMCs,用细胞计数板计数,将大约 2 $\times 10^5$ 个 PBMCs 接种到 CEF 单层上,接种后 48 h 进行换液,接种后 4~10 d 每日观察病毒空斑的出现,结果以空斑数目/ 10^6 淋巴细胞来表示。

2 结果

2.1 间接免疫荧光试验检测鸡感染 MDV 后的病毒血症动态

2.1.1 PBMC 预处理方法的比较

PBMC 经 2.5% 戊二醛固定后,IFA 结果背景染色深而均匀,但未发现特异荧光;经 100% 丙酮、丙酮-乙醇(6:4)、4% 多聚甲醛固定后,IFA 结果背景染色深而不均匀,即使有特异性荧光存在,但因非特异性背景荧光与特异性荧光反差不明显,因而很难做出明确判断。相反,对 PBMC 悬液直接做 IFA 检测,可在一部分细胞表面检出明显的特异性荧光,

而其它绝大多数细胞无任何非特异性反应。因此,我们选择细胞悬液法来研究鸡感染 MDV 后的病毒血症情况,并在预试验中测得接种后第 12 天到第 30 天 GA 株病毒血症大致动态(结果见表 1)。

表 1 IFA 检测鸡感染 GA 株 MDV 后的病毒血症动态

Table 1 The dynamic of viremia for MDV strain GA

接种后日龄(d) Postinfection(days)	阳性细胞(%) Positive cells		阳性鸡数目/被检鸡数 Positive/tested
	平均值 Average	范围 Range	
12	3	1-4	3/3
18	1	0.5-2	3/3
22	0.5	0.5-0.5	2/2
26	0.1	0.05-0.2	4/4
30	0.1	0.1	1/1

2.1.2 鸡感染不同毒株 MDV 后的病毒血症动态

鸡在用强毒 GA 株接种后第 4 天开始检测起,直至试验鸡发生典型症状而死亡前都能在其 PBMC 中用 I 型特异性单抗(BA₄)检出 IFA 阳性细胞,约在 14 d 左右达到高峰,后降至较低水平并持续很长时间,且在鸡发病死亡前(攻毒 45 d 以后)仍能检出。自接种 I 型疫苗株 CVI988/C4 第 4 天起到第 18 天止都能用单抗(BA₄)检出接种鸡 PBMC 中的 IFA 阳性细胞,约 8 d 左右达到高峰,并很快下降,18 d 后则难以检出。在接种 III 型 HVT 后第 4 天起到 14 d 止,都能用 MDV 群特异性单抗(BD₈)检出其 PBMC 中的 IFA 阳性细胞,并于一周左右达到高峰(结果见表 2 及图 1)。

表 2 鸡感染不同毒株 MDV 后的病毒血症动态

Table 2 The differential dynamics of viremia in chickens inoculated with different MDV strains

接种后日龄 (d) Postinfection (days)	GA			CVI988			HVT		
	% 阳性细胞 Positive cell		阳性鸡数目/被检 鸡数目 Positive/tested	% 阳性细胞 Positive cell		阳性鸡数目/被检 鸡数目 Positive/tested	% 阳性细胞 Positive cell		阳性鸡数目/被检 鸡数目 Positive/tested
	平均值 Average	范围 Range		平均值 Average	范围 Range		平均值 Average	范围 Range	
4	0.1	0.05-0.2	3/4	3	1-4	4/4	2	1-3	4/4
6	4	1-8	4/4	6	4-10	4/4	5	2-7	4/4
8	5	2-8	4/4	6	4-10	4/4	4	1-5	4/4
10	7	2-10	4/4	5	3-8	4/4	2	1-3	4/4
12	6	3-10	4/4	4	1-7	4/4	1	0-2	3/4
14	8	3-10	4/4	4	1-8	4/4	0.5	0-1	2/4
16	5	3-6	4/4	2	1-3	4/4	0	0	0/4
18		ND		0.2	0-1	1/4	0	0	0/4
20	2	1-4	4/4	0	0	0/4			
22	2	0.5-3	4/4	0	0	0/4			
24	1	0.5-3	4/4						
27	0.3	0.2-1	4/4						
29	0.1	0.05-0.2	4/4						
32		\approx 0.05	4/4						
36		\approx 0.02	3/4						
40		\approx 0.05	4/4						
45		\approx 0.08	2/4						

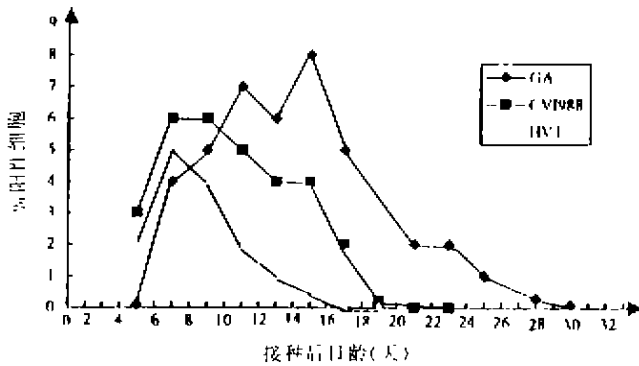


图1 鸡感染不同毒株 MDV 后的病毒血症

Fig. 1 The differential dynamics of viremia in chickens inoculated with different strains of MDV

2.2 间接免疫荧光试验与病毒空斑计数试验测定病毒的阳性率比较

于接种 GA 株后第 7 天和第 40 天分别用间接免疫荧光试验与病毒空斑计数试验测定病毒血症, 两者的滴度相平行, 但 IFA 测得的阳性率比病毒空斑计数试验大约高 40~100 倍(结果见表 3)。

3 讨论

MDV 的强细胞结合性给疫苗的生产、运输、使用等环节带来诸多不便, 稍有不慎, 即可能损失疫苗效价而导致疫苗保护性下降, 因此对疫苗接种效果的检测就显得非常必要。如图 1 所示, 1 日龄雏鸡用疫苗毒免疫接种后, 病毒血症在短时间内即升至一定水平, 并很快下降至检不出的水平; 但强毒株接种后其病毒血症可维持较长时间。因此, 我们可以

表 3 IFA 试验与病毒空斑计数试验测定 GA 株病毒血症的阳性率比较

Table 3 Comparison of viremia levels for strain GA measured by IFA and co-cultivation assay

检测方法 & 表示法	接种后天数及样品 Days PI and samples					
	7 d			40 d		
	#1	#2	#3	#4	#5	#6
IFA 阳性细胞百分比(A) Percentage of positive cells	2	1	1	0.05	0.05	0.1
空斑计数法(B) plaque forming Assay (pfu/10 ⁶)	190	150	135	15	10	25
阳性率比率(A/B) Ratio of A to B	105	66	75	66	50	40

#1 - #6 为各自独立采集的样品, 阳性率比率(A/B)的计算方法, 如样品 #1: 阳性细胞百分比(A)/空斑计数法(B) = 2% ÷ 190/10⁶ = 105

#1 - #6 are samples collected from different birds, Calculation for the ratio of A to B, as sample for sample #1: A/B = 2% ÷ 190/10⁶ = 105

采用这种免疫荧光试验来检测和判断孵坊中对鸡的免疫接种效果。商品代鸡坊在从孵坊购回雏鸡后, 如果于第 1 周内检出免疫鸡病毒血症水平高达 3%~5%, 则可以说明免疫接种本身是可靠的; 但如果在这一期间病毒血症水平很低或无病毒血症, 则可能预示免疫接种效果不可靠或根本没有接种疫苗。

近年来, 除了超强毒株(vvMDV, 如 MD₅ 株, RBIB 株)外, 在美国和欧洲发达国家发现和报导了特超强毒株(vv⁺MDV, 如 584A 株, 610A 株, 648A 株等)^[2, 13]。目前国际上鉴别 MDV 毒力型的依据还只能依靠动物试验, 即根据人工感染后的死亡率及不同类型的抗 MD 疫苗对其的免疫保护效果的差异来确定^[15]。这是一个耗时费力因此成本很高的试验方法, 无法满足养鸡业的实际需要。因此, 许多可能的方法都在被一一尝试着^[16, 17], 但迄今为止均不十分理想。病毒在 PBMC_s 中的增殖情况是体

现病毒特性的一个重要方面, 现已发现 MDV 强毒致弱后, 病毒血症强度变弱(空斑减少)且其持续时间变短^[18]。因此不难想象, MDV 毒力型与其产生的病毒血症很有可能存在某种相关关系, 这对于 MDV 毒力型的鉴定无疑是一个值得尝试的设想。利用本研究采用的免疫荧光试验检测 MDV 病毒血症动态, 不仅比其它方法方便、快捷, 而且成本低廉, 更重要的是该方法具有可数量化表示的特点, 适用于不同毒株病毒血症的定量比较。

对于 MDV 感染的检测, 可以根据不同的条件和需要选择不同的方法, 如 AGP 检验^[19]、ELISA 检验^[20]、FA 检验^[21]和核酸探针检验^[22]等等, 其中, FA 检验因其独特的敏感性和直观性得到广泛应用。因此, 本研究采用免疫荧光试验来检测 MDV 病毒血症动态, 既可用于判断鸡体免疫接种效果, 又可用于检测野毒感染状态。由图 1 可见, 如果雏鸡

18日龄后的病毒血症仍持续在一定水平,则预示已发生野毒感染并正产生病毒血症。

Holland等^[9]在对HVTgB的检测过程中采用4%多聚甲醛作为固定液,取得良好效果,但经我们多次重复,效果却并不理想。显然,该方法的可重复性还不稳定。为此,我们尝试了用未经固定的PBMC_s悬液直接做IFA检测,对不同毒株都得到了很好的结果。虽然该方法与固定方法相比操作较为繁琐,且需在采样后短时间内检测,但其特异性和敏感性显著高于固定法,结果易于判定,是一种适用于实验室应用的较好的检测方法。

病毒空斑计数试验一直是研究MDV的一种很好的分离定量方法,但一般需要5~10d才能观察结果。我们的实验发现,对于MDV病毒血症的检测,免疫荧光试验所检阳性率要比病毒空斑计数试验高得多。由于IFA检测的是所有感染了MDV且病毒开始复制的细胞,不论细胞状态如何,是否死亡或已失去传染活性,理论上都能被检出。而且越是感染后期由于病毒大量复制而死亡的细胞,其MDV抗原更易检出,因此,IFA检验的阳性率显著高于空斑计数试验不仅是理解的,而且对比较病毒血症水平的差异来说将显得更为优越。

参考文献

- [1] Churchill A E, Biggs P M. Agent of Marek's disease in tissue culture[J]. Nature, 1967, 215: 258.
- [2] Hazerant K, Solomn J J, Witter R I, et al. Studies on the etiology of Marek's disease. Finding of a herpes virus in cell culture[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1968, 127: 177.
- [3] Lee I F, Liu X, Witter R I. Monoclonal-antibodies with specificity for three different serotypes of Marek's Disease Viruses in chickens[J]. J Immunol, 1983, 130: 1005-1006.
- [4] Calnek B W, Witter R I, Calnek B W. Marek's Disease of Poultry[J]. Iowa state University Press, Ames, 1997, 369-400.
- [5] Churchill A E, Chubb R C, Baxendale W. The attenuation, with loss of oncogenicity of the herpes-type virus of Marek's disease (strain Hprs-16) on passage in cell culture[J]. J Gen virol, 1969, 4: 557-564.
- [6] Kato S, Hirai K. Marek's disease virus[J]. Adv virus Res, 1985, 30: 225-277.
- [7] Ono K, Takashima M, Ishikawa T, et al. Partial Protection against Marek's disease in chickens immunized with glycoproteins gB purified from turkey-herpesvirus-infected cells by affinity chromatography coupled with monocloned antibodies[J]. Avian Disease, 1985, 29: 533-5393.
- [8] 陆长明,崔治中,秦爱建. 对马立克病毒囊膜糖蛋白B抗原I型特异性和群共同性决定簇的单克隆抗体[J]. 中国兽医学报, 1997, 17: 1-4.
- [9] Holland M S, Silva R F, Mackenzie C D, et al. Identification and localization of glycoprotein B expression in lymphoid tissues of chickens infected with turkey herpesvirus[J]. Avian disease, 1994, 38: 446-453.
- [10] 崔治中, Lee I F. 表达强毒 pp38 决定簇的马立克病毒疫苗 cv988 点突变株的构建和特性[J]. 病毒学报, 1999, 15: 148-153.
- [11] Churchill A E, Payne L N, Chubb R C, et al. Immunization against Marek's disease using a live attenuated Virus[J]. Nature, 1969, 221: 744-747.
- [12] Witter R I. Very virulent Marek's disease viruses: Importance and control[J]. World's Poul Sci J, 1989, 45: 60-75.
- [13] Calnek B W, Harris R W, Buscaglia C, et al. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates[J]. Avian Dis, 1998, 42: 124-132.
- [14] Gumen J, Witter R I, Reed W M. Four distinct neurological syndromes in Marek's disease: effect of viral strain and pathotype[J]. Avian Dis, 1999 (In Press).
- [15] Witter R I, Deshan Li, Dan Jones, et al. Retroviral insertional mutagenesis of a herpesvirus: a Marek's disease virus mutant attenuated for oncogenicity but not for immunosuppression *in vivo* replication[J]. Avian Dis, 1997, 41: 407-421.
- [16] Haider S A, Lapen R F, Kenzy S G. Use of feathers in a gel precipitation test for Marek's disease[J]. Poul Sci, 1970, 49: 1654-1657.
- [17] Cauchy L. The detection of viral antigens in Marek's disease by immunoperoxidase. In: E. Krustak and R. Morisset (eds) [J]. New York: Viral Immunodiagnosis, Academic Press, 1974, 77-78.
- [18] Spencer J I, Calnek B W. Marek's disease: Application of immunofluorescence for detection of antigen and antibody[J]. Am J Vet Res, 1970, 31: 345-358.
- [19] Davidson I, Malkinson M, Strenger C, et al. An improved ELISA method, using a streptavidin-biotin complex, for detecting Marek's disease virus antigen in feather-tips of infected chickens[J]. J Virol Methods, 1988, 14: 237-241.
- [20] Witter R I. Characteristics of Marek's disease virus isolated from vaccinated chicken flocks. Association of viral pathotype with lymphoma frequency[J]. Avian Dis, 1983, 27: 113-132.
- [21] Schat K A, et al. Characterization of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus[J]. Avian Pathology, 1982, 11: 593-605.
- [22] Witter R I. Evolution of virulence of Marek's disease virus: evidence for a novel Pathotype [A]. In: Current Research on Marek's disease[M]. Silva R F eds. Tallahassee: Rose Printing Company, Inc, 1996, 86-91.