

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1247—2006

禽网状内皮增生病诊断技术

Diagnostic technique for avian reticuloendotheliosis

2006-12-06 发布

2007-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

禽网状内皮增生病病毒(Reticuloendotheliosis Viruses, REV)是一群不同于禽白血病病毒(Avian Leukosis Viruses, ALV)的反转录病毒,它包括一群血清学上密切相关的从不同种禽类分离到的病毒。代表毒株有:从患有肿瘤的火鸡分离到的 T 株、鸭坏死性肝炎病毒(SNV)、鸡合胞体病毒(CSV)、鸭传染性贫血病毒(DIAV)。以后又不断从不同的家禽和野禽分离到该类病毒,就不再单独命名,只给予病毒株名。

REV 属 C-型反转录病毒,有囊膜,呈球形,直径 $80\ \mu\text{m}\sim 110\ \mu\text{m}$ 。其病毒粒子中的基因组是由二条相同的单股 RNA 以非共价键连接在一起组成的,每条链长约 $8\ \text{kb}\sim 9\ \text{kb}$ 核苷酸。

REV 被列为鸡群中除马立克氏病病毒(MDV)和 ALV 外的第三类致肿瘤病毒。由于 REV 可感染不同禽类,分别引起从亚临床感染到生长迟缓、免疫抑制和肿瘤等不同的临床和病理变化,很容易与其他引起类似症状和病理变化的疾病相混淆,在现场对该病的鉴别诊断就比较困难。人们注意到 REV 常常污染活疫苗(如马立克氏病和禽痘的活疫苗),但对其自然感染造成的经济损失还一直估计不足。

本标准的编制参考了世界动物卫生组织(OIE)的《诊断试验和疫苗标准手册》(2000 版)有关章节。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:山东农业大学。

本标准主要起草人:崔治中、孙淑红。

禽网状内皮增生病诊断技术

1 范围

本标准规定了禽网状内皮增生病诊断的技术要求。它包括两方面：

对禽网状内皮增生病病毒(REV)特异血清抗体的检测；

病料及生物制品中传染性 REV 的检测。

本标准适用于：

检测 REV 的特异性抗体,用以判断禽群体(场)或个体是否感染过 REV;特别适用于 SPF 鸡场中是否存在 REV 感染的大批样品的抽检；

检测疑似病禽的病料或某些弱毒疫苗中是否存在传染性 REV。

2 疾病的流行病学和致病作用

禽网状内皮增生病的病原 REV 可感染鸡、火鸡、鹌鹑、鸭和鹅等多种家禽及一些野生鸟类。该病毒既可水平感染,也可通过鸡(禽)胚垂直感染。当种禽在开产后才感染 REV 时,会有一短暂的病毒血症期,此期间可造成垂直感染。此外,部分个体在感染后可呈现耐受性病毒血症,即持续性的病毒血症。这些个体血清中可能产生抗体,但也可能不产生抗体。这些鸡(禽)不一定表现临床症状,但它们更是鸡(禽)群体中造成垂直感染的主要来源。垂直感染的禽或在出壳后不久感染 REV 的个体(如由于应用了污染 REV 的疫苗),最容易产生耐受性病毒血症。

REV 感染鸡群后,虽然可分别引起生长迟缓、免疫抑制或肿瘤发生,诱发完全不同的临床表现和病理变化,但在过去几十年中,并没有造成严重的流行。只是在 REV 污染的活病毒疫苗大面积使用时,才会造成严重的经济损失。

当 REV 感染雏鸡群后,可在一部分鸡引起无特殊临床表现的生长迟缓和免疫抑制。剖检时可见法氏囊和胸腺不同程度的萎缩,并导致对某些疫苗(如新城疫疫苗)免疫反应的显著下降。REV 引起的肿瘤既可见于 6 月龄以上的成年鸡,也可见于 2 月~3 月龄鸡。既可引发网状细胞或其他非淋巴细胞类细胞的肿瘤,也可诱发淋巴细胞肿瘤(T 淋巴细胞肿瘤或 B 淋巴细胞肿瘤)。因此,除非做病原学鉴定,仅根据流行病学、临床表现和病理变化是很难与鸡的马立克氏病或白血病肿瘤相鉴别的,也很难与其他免疫抑制性病毒(如鸡传染性贫血病毒)感染相区别。

近两年来,在我国所做的血清流行病学调查和现场病例实验室诊断结果分析表明,在 60% 以上的鸡群(场)已有 REV 感染。在病理上诊断为马立克氏病肿瘤或 J-亚型白血病肿瘤的现场样品中,在分离到马立克氏病病毒(MDV)或 J-亚型白血病病毒(ALV-J)的同时,也有近 50% 的样品同时分离到 REV。在表现为生长迟缓及免疫抑制的青年鸡群中,也常常证明存在着 REV 与鸡传染性贫血病毒的共感染。显然,在鸡群感染 REV 时,其发病作用往往是在与其他病毒共感染过程中,以相互协同作用的形式表现出来的。正因为 REV 感染时还经常发生其他病毒的多重感染,使现场病例的鉴别诊断变得更为复杂。因此,对 REV 感染的实验室诊断显得更为重要。

3 病毒的分离培养和鉴定

3.1 病料的采集

疑似病鸡的血清或血浆,采集后经处理立即用于接种鸡胚成纤维细胞(CEF)培养或置于 -70℃ 保存备用。疑似病鸡的脾脏、肝脏、肾脏,采集后立即研磨成悬浮液供接种 CEF,或立即置于 -70℃ 保存。疑似污染 REV 的活病毒疫苗,在用于分离病毒前必须保存在相应疫苗规定的条件下。

3.2 分离病毒用细胞

可选用需新鲜制备的原代或次代 CEF 单层,也可用悬浮培养的细胞系 MSB₁ 细胞。

3.2.1 CEF 细胞单层

按中国农业出版社 2001 年版《中华人民共和国兽用生物制品质量标准》附录“细胞制备方法”介绍的方法进行(见附录 A)。

从 SPF 鸡胚制备的原代或次代 CEF 悬液,接种于细胞培养瓶(皿)中形成细胞单层。为便于连续检测病毒,可在培养皿中加入数片盖玻片。

3.2.2 MSB₁ 细胞

为马立克氏病肿瘤细胞系,可连续悬浮培养,所用培养液为加 5%~10% 胎牛血清的 DMEM 培养液(见附录 B)。

3.3 待检样品的处理与接种

3.3.1 血清或血浆

置于小离心管中,在 10 000 r/min 转速下离心 5 min 后,取上清经 0.45 μm 滤器过滤后,取 0.1 mL~0.2 mL 接种于面积约 30 cm² 的含有 CEF 单层培养瓶(皿)中,或约含 3 mL MSB₁ 细胞悬液的培养瓶(皿)中。将细胞置于含 5% 二氧化碳的 37℃ 恒温箱中继续培养。

3.3.2 脏器标本

将不同脏器充分研磨后,逐渐加入少量灭菌生理盐水继续研磨直至成匀浆,然后按脏器重量的 1 倍~2 倍加入生理盐水。将悬液移至小离心管中充分震荡后,在 10 000 r/min 下离心 5 min。将上清用 0.45 μm 滤器过滤,按 3.3.1 方法和接种的量接种 CEF 单层或 MSB₁ 细胞悬液。将细胞置于含 5% 二氧化碳的 37℃ 恒温箱中继续培养。

3.3.3 疫苗样品

3.3.3.1 马立克氏病细胞结合疫苗

从液氮中取出后,在含疫苗的细胞悬液中加入 9 倍~10 倍量的灭菌注射用水,将细胞悬液移入小试管混匀,在 4℃ 下放置 10 min,让细胞在低渗下裂解死亡。按 3.3.1 方法和接种量接种于含 CEF 单层的培养瓶(皿)中。在 37℃ 孵育 2 h 后,吸去细胞培养液,换入新鲜的细胞培养液。将细胞置于 5% 二氧化碳的 37℃ 恒温箱中继续培养。

3.3.3.2 其他病毒冻干活疫苗

将冻干活疫苗用无菌注射用水按每羽份加入 0.2 mL 进行稀释。取 0.2 mL 疫苗悬液与 0.2 mL 抗相应疫苗毒株的单因子血清(必须来自 REV 的 SPF 鸡)混合,在 4℃ 下作用 60 min 后,接种于面积约 30 cm² 的已长成 CEF 单层的细胞培养瓶(皿)中。在 37℃ 下孵化 2 h 后,倾去细胞培养液,换入新鲜的含 3% 单因子鸡血清的细胞培养液继续培养。如相关疫苗病毒在细胞培养上不易产生细胞病变,则不须加血清进行中和。

3.4 接种后细胞培养的维持

3.4.1 CEF

接种后,将细胞培养瓶(皿)置于 37℃ 培养箱中培养 2 h。然后吸去培养液,换入新鲜培养液,以后每 2 天~3 天更换一次培养液。从第 4 天起,可每隔一天取出一片盖玻片供间接免疫荧光抗体反应(IFA)检测病毒用。REV 感染 CEF 后通常不产生细胞病变,也不影响 CEF 的生长复制。如果细胞密度过大,细胞单层有脱落的可能,可将细胞单层再次用 0.25% 胰酶溶液消化成细胞悬液后离心,悬浮于新鲜培养液中,将 1/2~1/3 的细胞再接种于另一新的已置入盖玻片的空白细胞培养瓶(皿)中,继续培养。由于 REV 复制较慢,当原始病料中病毒滴度很低时,接种病料的 CEF 至少维持培养和观察 10 天。

3.4.2 MSB₁ 细胞悬液

接种样品后,每天观察细胞的密度,细胞密度控制在 5×10^5 个/mL左右。当细胞密度明显升高时,去掉一半细胞悬液,加入一半新鲜细胞培养液。一般每天观察和处理一次。从第4天开始,每隔一天取一滴细胞悬液于载玻片上,任其自然干燥,备作IFA检测。

3.5 用特异性抗体作间接免疫荧光抗体反应(IFA)鉴定病毒

3.5.1 细胞的固定

将盖玻片上的CEF或滴在载玻片上的MSB₁细胞,在自然干燥后滴加丙酮:乙醇(6:4)混合液固定5 min,待其自然干燥后,立即用于IFA,或置于-20℃保存备用。

3.5.2 REV特异性抗体

作为第一抗体,可用REV单克隆抗体,REV单因子鸡血清。

3.5.3 FITC标记抗体

如第一抗体为REV特异性单克隆抗体,则选用市售的FITC标记的抗小鼠IgG山羊血清作为第二抗体。如第1抗体为抗REV单因子鸡血清,则选用市售的FITC标记的抗鸡IgY兔或山羊血清为第二抗体。

3.5.4 间接荧光抗体试验(IFA)操作过程

在固定有CEF细胞的盖玻片或MSB₁的载玻片上,分别滴加一滴第一抗体,即用pH 7.4的PBS作工作浓度的单克隆抗体,或抗REV单因子鸡血清,在含100%相对湿度的37℃培养箱中作用40 min,然后用PBS洗涤3次。再加入工作浓度的第二抗体,即用PBS稀释FITC标记的抗小鼠IgG或鸡IgY的兔或山羊血清,在37℃继续作用40 min,用PBS洗涤3次。在样品上加少量50%甘油水后将盖玻片上的样品倒扣于载玻片上,或在载玻片的样品上,加盖一张盖玻片。在荧光显微镜下用510 nm波长的紫外线观察。同时,设未感染的CEF或MSB₁细胞作为阴性对照,及对检测样品设SPF血清做阴性对照。

3.5.5 结果的判定

被感染梭状的CEF细胞内呈现黄绿色荧光,周围未被感染的细胞不被着色或颜色很淡。在放大 $200 \times \sim 400 \times$ 时,可见被感染细胞胞浆着色,细胞核不易着色。因此,在一部分感染细胞中,可见荧光着色的细胞浆使细胞呈梭状,而其中的细胞核很暗,不着色。被REV感染的MSB₁,显示黄绿色的荧光,细胞质着色,而细胞核不着色。由于MSB₁细胞的细胞核较大,有的阳性细胞显示出一圈黄绿色的荧光,周围尚未被感染的细胞可显出细胞轮廓。在隔日连续取样过程中,阳性细胞的比例明显增加。一般情况下,两种细胞在接种阳性病料5天~7天后,呈现荧光染色阳性的细胞比例应在70%以上。

4 血清特异性抗体的检测

检测鸡(禽)群(场)的REV抗体是否阳性或阳性率程度可用于以下几个流行病学研究的目的:①该鸡群(场)是否已有REV感染,SPF鸡群必须定期检测其中是否出现抗体阳性的群体;②根据种鸡开产前对REV抗体阳性率的变化趋势,判断种鸡产生垂直感染的可能性大小;③雏鸡出壳后,检测母源抗体存在与否及阳性率,可判断其对水平感染的易感性。

4.1 样品的采集

可采集不同年龄鸡全血置于1.5 mL的已编号的eppendoff离心管中,在室温下放置20 min,待血液自然凝固后,在台式离心机中以10 000 r/min离心5 min。吸取血清,置于另一已编号的离心管中,于-20℃冰箱中冻存备用。

4.2 抗体的检测方法

取决于实验室设备条件,既可采用ELISA也可选用IFA。

4.2.1 ELISA

可选用进口的试剂盒,严格按厂家提供的说明书操作。可适于大批量样品检测。

4.2.2 IFA

IFA 可用来比较个体抗体水平,检测时需用自制抗原,在荧光显微镜下人工判读,不适于大批量样品,但成本较低。

4.2.2.1 抗原

为固定在盖玻片或载玻片上(适用于少量样品)或 96 孔细胞培养板上(适用于大量样品,特别是需确定抗体滴度时)的 REV 感染的 CEF 或 MSB₁ 细胞(制备方法见附录 D)。若同时用两种细胞比较,更能提高判断的准确性。盖玻片适宜于高放大倍数观察细胞(如 400×),在 96 孔培养板上的 IFA 结果只能在 100×~200× 下观察。

4.2.2.2 操作过程

在相应的盖玻片上或抗原孔中加入用 PBS 作不同滴度稀释的血清,在 37℃ 下作用 40 min,用 PBS 洗涤三次。再加入用 PBS 作 1:100 稀释(或按厂家说明)的 FITC 标记的抗鸡 IgY 兔血清(第二抗体),在 37℃ 作用 40 min,用 PBS 洗涤 3 次,加少量 50% 甘油水后在荧光显微镜下观察。

4.2.2.3 结果的判定

同 3.5.5。

附 录 A

(规范性附录)

鸡胚成纤维细胞(CEF)的制备

选择9日龄~10日龄发育良好的SPF鸡胚。先用碘酒棉再用酒精棉消毒蛋壳气室部位,无菌取出鸡胚,去头、四肢和内脏,放入灭菌的玻璃器皿内,用汉克氏液洗涤胚体。用灭菌的剪刀剪成米粒大的小组织块,再用汉克氏液洗2次~3次,然后加0.25%胰酶溶液(每个鸡胚约加4 mL),在37.5℃~38.5℃水浴中消化20 min~30 min。吸出胰酶溶液消化产生的悬液,再加入适量的营养液(用含5%~10%犊牛血清的汉克氏液,加适宜的抗生素适量)吹打,用4层~6层纱布滤过。取少量过滤后的细胞悬液做细胞计数,其余在2 000 r/min下离心5 min。将细胞沉淀再混悬于细胞培养液中,制成每毫升含活细胞数约100万~150万的细胞悬液,分装于培养瓶(皿)中,进行培养。形成单层后备用(一般在24 h内应用)。

附 录 B
(规范性附录)
MSB₁ 细胞培养基配制

商品化的 DMEM 液,加 5% 胎牛血清,pH7.6。青、链霉素:各 250 IU/mL。
培养条件:37℃,5% CO₂。

附录 C

(规范性附录)

抗 REV 单因子鸡血清的制备

选择经鉴定无任何其他潜在病毒的 REV 参考株作为种毒,接种 CEF 后复制和扩增病毒。CEF 在接种病毒后,继续培养,每隔 1 天~2 天换一次培养液,在第三次换液后 48 h 收取上清液(通常可达到最高病毒效价),分装在小试管中,每支 1 mL,于 -70°C 冰箱保存。2 天~3 天后,取出一支,用细胞培养液作 10 倍系列稀释后,分别接种于含有新鲜配制的 CEF 单层(细胞覆盖面应 70%)96 孔培养板上,每个稀释度 8 孔。在 37°C 下培养 6 天后,弃上清液,用 PBS 洗一次后,加入丙酮-乙醇(6:4)固定。待干燥后,用抗 REV 的单克隆抗体,以 IFA 的结果来判定病毒感染的终点,测定其中 REV 的 TCID_{50} 量。

选用 3 周龄以上 SPF 鸡,隔离器饲养。每只鸡皮下接种 10^4 个 TCID_{50} 的 REV 悬液。3 周后采集血清。IFA 抗体滴度应 $\geq 1:200$ 。

附 录 D
(规范性附录)

IFA 法抗体检测用 REV 感染细胞的制备

REV-CEF 在 10 cm²CEF 单层细胞瓶(皿)中加入 10³TCID₅₀的 REV 悬液,隔一天换液。换液 2 天后将细胞单层用胰酶(见附录 A)溶液消化分散成悬液,经离心后,重新悬浮于新鲜细胞培养液中。将细胞浓度调至每毫升 5×10⁵ 个细胞。在加入盖玻片的培养皿(直径 10 cm²)中加入 10 mL 细胞悬液,或在 96 孔培养板上每孔加入 100 μL 细胞悬液。在 37℃ 继续培养 3 天。将盖玻片从培养皿中取出,在 PBS 中漂洗后,滴加丙酮-乙醇(6:4)固定液固定 5 min。弃去 96 孔板中培养液,用 PBS 洗一次后,滴加丙酮-乙醇(6:4)固定液固定 5 min。干燥后,用塑料薄膜包裹后置 -20℃ 保存。

REV-MSB₁ 在含有 10 mL MSB₁ 细胞悬液(10⁵ 个/mL)的细胞培养瓶(皿)中,接种 10⁴TCID₅₀REV 悬液。每天观察细胞悬液中细胞密度,当细胞密度增大时,加入等量新鲜培养液,混匀后分至两块培养瓶(皿)中,继续培养。在接种病毒后 5 天~6 天,取少量细胞悬液按 3.5 方法做 IFA,观察 IFA 阳性细胞比率,当阳性细胞达到 50%时,即可收获细胞。将细胞悬液滴加于 96 孔板中,每孔 100 μL。将 96 孔板在相应离心机上离心使细胞沉底贴壁,弃去上清液,加入 50 μL 丙酮:乙醇(6:4)混合液固定细胞。或将细胞悬液滴加于盖玻片上或载玻片上,任其自然干燥,再加丙酮:乙醇固定液固定 5 min。干燥后用薄膜包裹后于 -20℃ 保存。
