

传染性法氏囊病毒 HN 株的分离鉴定及 应用免疫荧光检测 IBDV

杨明凡¹, 王 岩², 张素梅¹, 郭小参¹, 陈红英¹

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州牧业工程高等专科学校, 河南 郑州 450008)

摘要: 河南郑州地区某养鸡场的三黄肉鸡出现精神沉郁, 拉水样白色粪便, 剖检可见法氏囊水肿、出血; 肾脏出血肿大, 有尿酸盐沉淀, 呈花斑状; 腿肌、胸肌有出血斑点; 腺胃与肌胃交界处出血。经病毒分离、鸡胚接种、琼脂扩散试验和细胞接种试验, 最后确诊为传染性法氏囊病。同时, 采集病料, 制备冰冻切片, 建立一种检测病料中的 IBDV 免疫荧光检测方法。

关键词: 传染性法氏囊病毒; 分离鉴定; 免疫荧光

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)01-0099-03

Isolation and Identification of Infectious Bursal Disease Virus and Detection of IBDV of Infected Tissue by IF

YANG Ming-fan¹, WANG Yan², ZHANG Su-mei¹, GUO Xiao-can¹, CHEN Hong-ying¹

(1. Faculty of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: A virus was isolated from the Sanhuang broiler, which was suspected to be infectious bursal disease virus. By AGP and inoculated into CEF identification, the virus was infectious bursal disease virus. An IF was established for detection of IBDV of the infected tissue. The result indicated that the bursa was the seriously infected, caecal tonsil; kidney and spleen were second-class infected. No positive cell was found in the thigh muscle.

Key words: Infectious bursal disease virus (IBDV); Isolation and identification; Immunofluorescence (IF)

传染性法氏囊病(IBD)是由传染性法氏囊病毒(IBDV)引起的一种鸡的急性高度接触性传染病, 主要发生于3~6周龄的幼鸡, 也可见于14~20周龄的成年鸡群, 发病率可达80%~90%, 死亡率为5%~20%, 并发或继发感染所致的死亡率更高^[1]。由于该病侵害体液免疫器官——法氏囊, 导致免疫抑制, 从而降低机体对其他传染病的免疫反应性。鸡早期感染传染性法氏囊病毒后, 对其他病毒和细菌的易感性增高, 也能影响免疫接种效果。能降低新城疫疫苗免疫效果40%以上, 降低马立克氏病疫苗免疫效果20%以上^[2]。

IBD最初于1957年发现于美国的特拉华州盖姆波罗地区, 我国于1979年先后在北京、广州、上海

等地发现该病, 现已遍及全国各地, 给养鸡业造成了很大的经济损失^[3~5]。最近几年, IBD出现了一些新的特点: 暴发式流行, 死亡率增高; 发病日龄明显变宽; 病症不典型, 出现亚临床症状; 超强毒株和变异株不断出现; 经典IBDV疫苗免疫效果差, 出现不同程度的免疫抑制^[6~9]。这些新特点使IBDV的诊断和防治面临新的困境。试验分离鉴定出河南株IBDV, 并建立一种间接免疫荧光检测方法快速检测病料中的IBDV。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF (special pathogen free animal, SPF) 鸡胚

收稿日期: 2007-10-07

作者简介: 杨明凡(1971-), 女, 河南新野人, 在读博士研究生, 主要从事动物分子病原学研究。E-mail: yangmingfan_123@163.com

购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司; IBDV 标准阳性血清购自中国兽医监察所; FITC 标记 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 的兔抗鸡 IgG, 购自 Sigma 公司; 免疫荧光显微镜, 型号 Nike E400。

1.2 发病情况

2006 年 12 月份, 郑州某养鸡场饲养有 20000 只三黄肉鸡, 饲养至 35 日龄时, 少数鸡只出现精神不振, 采食下降, 畏寒怕冷, 排出米汤样、水样的白色粪便, 肛门周围粘满污粪, 轻者耐过自愈, 重者因极度脱水衰竭而死。3 d 后发病鸡只逐渐增多, 5~7 d 达到最高峰, 发病率为 60%, 死亡率 10%。

1.3 剖检变化

病鸡剖检时, 可见法氏囊水肿、出血、体积增大, 浆膜下覆盖有淡黄色胶冻样渗出物; 肾脏出血肿大, 有尿酸盐沉淀, 呈花斑状, 肾小管扩张, 内有干酪样物; 腿肌、胸肌有出血斑点; 腺胃与肌胃交界处出血。

1.4 病毒分离

取病死鸡的法氏囊组织, 用剪刀剪碎研磨, 加入 1:10 生理盐水 (含 1000 U/mL 青霉素和 1000 U/mL 链霉素) 作用过夜, 反复冻融 3 次, 离心取上清, 经 0.22 μ m 滤器过滤除菌, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 鸡胚接种

选购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司的 SPF 鸡胚, 采用鸡胚尿囊膜接种方法, 接种于 10 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.2 mL, 37 $^{\circ}$ C 继续孵化, 每日照蛋观察; 弃去 24 h 内死亡鸡胚, 孵化 5~6 d 后将鸡胚放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 收集尿囊膜, 剪碎研磨, 加入适量 PBS 稀释, 按 1000 U/mL 加入青霉素、链霉素, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 反复冻融 3 次, 离心取上清, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 琼脂扩散试验

用标准阳性血清作为琼脂扩散试验的阳性抗体, 分离毒株作为琼脂扩散试验的待检抗原; 同时, 用生理盐水作为阴性对照, 在 1.5% 的琼脂板上, 按照常规方法打孔、加样, 置 37 $^{\circ}$ C 湿盒中, 24 h 后观察结果。

1.7 细胞培养

将分离病毒接种于长满单层鸡胚成纤维细胞 (CEF) 上, 观察有无细胞病变; 连续盲传数代, 直至出现明显细胞病变。

1.8 间接免疫荧光检测病料中 IBDV

1.8.1 组织切片制备 分别采集病死鸡的法氏囊、盲肠扁桃体、脾脏和肾脏等组织, 取每种组织投入正己烷中并迅速置于 -80 $^{\circ}$ C。玻片经清洗干净风干, 用 50 倍稀释的硅烷包被, 取出风干。病料提前置于 -20 $^{\circ}$ C, 次日 -20 $^{\circ}$ C 修块后用 OCT 包埋, 冰冻切片机上切成 4~5 μ m 的冰冻切片, 将其贴于硅烷包被好

的玻片上, 每一组织块做 3 张以上切片, 37 $^{\circ}$ C 干燥 24 h, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.8.2 FITC 标记的兔抗鸡 IgG (抗抗体) 处理 FITC 标记的兔抗鸡 IgG 购自 Sigma 公司, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。使用时用 PBS 作 1:400 稀释, 稀释后与剪碎的鸡法氏囊组织混匀, 离心取上清, 以除去非特异性反应成分。

1.8.3 间接免疫荧光检测 将 -70 $^{\circ}$ C 保存的冰冻切片室温平衡后, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冷乙醇中固定 15 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, ddH₂O 洗涤 1 次, 风干后加入 1:200 稀释的 IBDV 阳性血清, 置于湿盒内; 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h, 用含 0.5% 吐温-20 的 PBS 洗涤 5 次后, 再加入 1:400 稀释的 FITC 标记的兔抗鸡 IgG, 37 $^{\circ}$ C 作用 1 h; 最后用含 0.5% 吐温-20 的 PBS 洗涤 3 次, 滴加甘油缓冲液固定后, 置于倒置荧光显微镜下观察结果。同时, 设未发病鸡的法氏囊组织切片作对照。

2 结果与分析

2.1 琼脂扩散试验

用标准阳性血清作为琼脂扩散试验的阳性抗体, 分离毒株作为琼脂扩散试验的待检抗原; 加样后置 37 $^{\circ}$ C 湿盒中, 24 h 后观察到抗体和待检抗原之间有一条明显的乳白色沉淀线, 说明分离的病毒为传染性法氏囊病毒。

2.2 细胞培养

将分离病毒接种于长满单层 CEF 上, 观察有无细胞病变, 连续盲传 4 代后才出现明显细胞病变, 如图 1。

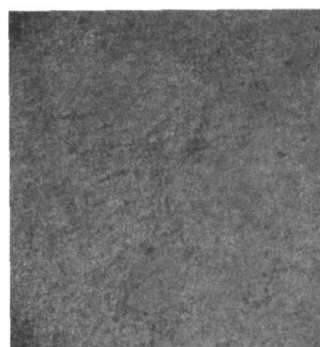


图 1 分离 IBDV 在 CEF 上引起的细胞病变

2.3 间接免疫检测

免疫荧光反应的组织切片置于荧光显微镜下观察, 特异性的荧光细胞呈黄绿色, 胞浆中黄绿色颗粒或亮斑为 IBDV 存在的阳性信号。根据荧光的强弱, 荧光细胞的数量及荧光结构的清晰度可判为“+”、“++”、“+++”、“++++”。“+”表示视野内有散在的荧光点, 见图 2; “++”表示视野内可见少

数几个荧光细胞, 荧光呈团块状, 见图 3; “+++”表示视野内可见多个荧光细胞, 荧光亮, 见图 4; “++++”表示视野内布满荧光细胞, 荧光极亮, 见图 5; 无特异性黄绿色荧光者判为阴性“—”, 见图 6。

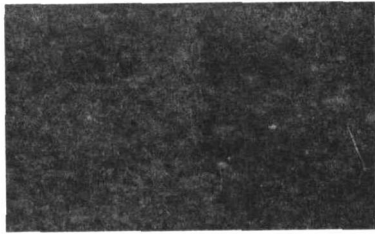


图 2 “+”阳性信号



图 3 “++”阳性信号

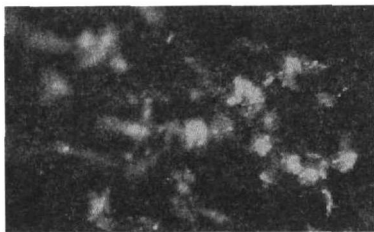


图 4 “+++”阳性信号

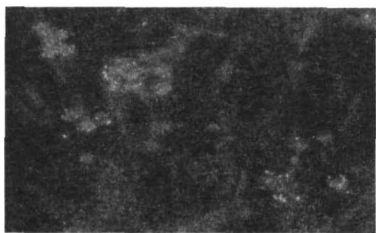


图 5 “++++”阳性信号

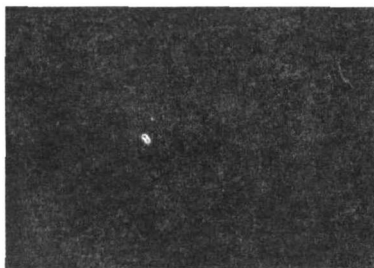


图 6 阴性对照结果

免疫荧光检测不同组织病料中 IBDV 结果显示, 法氏囊组织中 IBDV 荧光最多、最亮, 可判为“++++”; 而盲肠扁桃体、脾脏和肾脏组织中 IBDV 次之, 均可判为“+++”; 依次是肝脏和胸腺, 可判为“++”; 腿肌中没有发现特异性荧光, 判为阴性“—”。

3 讨论

IBD 是鸡的一种主要免疫抑制性传染病, 对养鸡业的危害极大; 控制该病的重要措施之一是免疫接种, 提高鸡体的免疫力, 避免早期感染。首先, 注意提高雏鸡母源抗体的水平, 使小鸡对早期感染具有抵抗力; 对种鸡使用油佐剂灭活疫苗进行免疫接种, 免疫后种鸡能产生高的抗体。另外, 控制该病还要搞好卫生消毒工作, 由于法氏囊病毒对环境因素的抵抗力很强, 一旦环境被污染, 将长期存在。因此, 对环境、鸡舍、笼具、用具、地面、种蛋等要彻底清洁消毒。严格限制人员进出鸡舍。对发病鸡群, 应提供充足的饮水或用 4% 红糖水代替饮水, 增加饲料中维生素 A, B, D, E 的含量, 停用磺胺类药物, 有利于康复。

免疫荧光技术 (IF) 也称荧光抗体技术 (IFA), 是用荧光素与抗体结合形成荧光抗体进行的抗原抗体反应。常用的荧光素有异硫氰酸荧光素 (FITC) 和四乙基罗丹明 (RB200)。抗体与荧光素结合后仍具有结合抗原的活性, 并可在荧光显微镜下显示荧光。由于病毒抗原标记比较困难, 常用标记抗体检测未知抗原。荧光抗体技术具有抗原—抗体反应的特异性和染色技术的快速性, 可在细胞水平进行抗原定位, 所以, 该技术是病毒学研究和病毒病诊断中应用很广的一种方法。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 582—585.
- [2] 韦平. 家禽病毒性免疫抑制病的危害及其防控策略 [J]. 中国家禽, 2001, 23(22): 182—185.
- [3] Van den Berg T P, Gonze M, Prales D M, *et al.* Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain [J]. *Avian Pathology*, 1996, 25: 751—768.
- [4] Chistopher D S, Murugan N, Sheela S E, *et al.* Infectious bursal disease influence of vvIBDV on immunity to Rani-khetdisease New castle disease at the field level [J]. *The Indian Journal of Animal Science*, 1997, 10: 833—835.
- [5] 韦平, 龙进学, 阳秀英, 等. 传染性法氏囊病毒快速检测与分型技术的研究 [J]. 中国兽医学报, 2004, 24(4): 313—316.
- [6] 孙淑红, 崔治中, 丁家波, 等. 传染性法氏囊病毒野毒株的致病性及其 vp2 基因比较 [J]. 中国病毒学, 2004, 19(3): 245—249.
- [7] 崔治中, 孙淑红, 单忠芳, 等. 鸡传染性法氏囊病毒超强毒株 GX 899 株的致病性 [J]. 病毒学报, 2002, 18(2): 162—164.
- [8] 曹水长, 毕英佐, 梁志清, 等. 超强传染性法氏囊病毒保护性抗原的子特征 [J]. 中国兽医学报, 1998, 18(6): 521—526.