

鸡传染性囊病的微量血清中和试验^{*}

刘福安

陈博文

(牧医系)

(广州动植物检疫所)

提 要

本文报道利用鸡传染性囊病 (IBD) 国外引入的一株细胞适应病毒而进行的微量血清中和试验。采用了国产的聚苯乙烯微量培养板、鸡胚成纤维细胞和Earle氏水解乳蛋白营养液。对方法的摸索过程作了较详细的描述。本试验敏感性高, 对调查传染性囊病在鸡群里的流行情况是一个有力的武器。利用这个方法检测一批人工感染鸡的血清中和抗体水平的结果表明, 对于传染性囊病来说, 预防24日龄以下的幼鸡发病是最主要的。

引 言

鸡传染性囊病虽然早在1962年已发现于美国甘波罗市^[1], 但只有到了近几年了解到本病有抑制鸡体免疫功能之后才真正引起人们的重视。如今它已成为国外研究最多的鸡病之一。我国不久前报道了本病的发现, 病原分离及琼脂双扩散沉淀反应诊断方法^[2]。除了琼扩试验外, 国外也有利用细胞培养物进行微量血清中和试验^[3]。本文报导利用引入的美国致鸡胚成纤维细胞病变的IBD毒株, 结合我国的实际条件而定出的微量血清中和试验常规法。目前正在进行IBD感染鸡体内中和抗体的消长规律观察。

材 料 与 方 法

(一) 细胞培养

取10~12日龄鸡胚, 用无菌操作去头、脚和肝脏后, 尽量剪碎, 以Hanks氏盐液冲洗两次, 再加入用Hanks氏液制备的0.06%新疆产的胰酶, 于37°C水浴消化10分钟。在用Hanks氏液两次轻轻地洗去胰酶液后即加入营养液10毫升。营养液为含0.5%水解乳蛋白和5%犊牛血清的Earle氏盐液, 每100毫升又加2.92% (20mM) 消旋谷氨酰胺2毫升和庆大霉素 (5000单位/毫升) 1毫升。用注射器吹打冲散细胞组织块后, 通过细孔尼龙筛膜将细胞悬浮液滤入有刻度的12毫升离心管中并以1200转/分速度离心5分钟。根据沉淀的细胞量再加Earle氏营养液使成为1:600细胞悬浮液。用1毫升吸管以0.2毫升量将细胞悬浮液分装于培养板的各个孔内。

* 中华人民共和国广州动植物检疫所资助了本项试验并在其他方面给予大力支持。该所的林颖超、李树根、黄亚德同志完成了鸡的人工感染和供应部分的被检血清。美国加州大学Yamamoto博士赠送了适应鸡胚成纤维细胞的IBD毒株并指导主要作者在美国进修期间学习本项技术, 在此表示谢意。

(二) 微量试验仪器

1. 微量培养板为天津有机玻璃制品厂生产的有盖40孔平底聚苯乙烯滴定板。第一次使用前以95%酒精浸泡2小时作去毒处理。用双蒸水冲洗干净后，于37℃温箱晾干。从10公分距离用紫外线灯照射揭盖的滴定板1小时作为消毒处理。塑料板经4%氢氧化钠和硫酸重铬酸钾洗液清洁后可以反复使用。

2. 微量液体取样器为上海求精玻璃仪器厂产品，有25、50、100、200微升规格，配有能高压灭菌的塑料头子。

3. 涤纶绝缘胶带为上海制笔零件三厂产品，宽5厘米。

(三) 血清

1. 美国引进的无特定病原 (SPF) 血清。

2. 北京市农科院畜牧兽医所提供的琼扩试验用的IBD阳性血清，经微量法测定其中和滴价为 2^{12} ，即稀释1:4096仍可抑制细胞病变 (CPE) 的产生。

3. 广州动植物检疫所提供的IBD阳性血清。供血清的鸡是进口的来航小鸡，在隔离饲养至24日龄时用华南农学院分离的IBD CG821毒株滴眼接种。感染后第3、7、14、21……每隔7天随机抽2只鸡放血致死制备血清作检验用。剖杀时见到的法氏囊病理变化为IBD典型变化。

4. 深圳市示范鸡场甲、乙两舍的石岐杂鸡血清。甲舍鸡(1—5号为44日龄，乙舍鸡(6—10号)为77日龄。该场曾根据临床症状、剖检以及琼脂扩散试验而认为IBD阳性场。

5. 华南农学院试验鸡群1只2岁老公鸡和2只7月龄的后备公鸡的血清。鸡只均饲养于同一栏。

(四) 病毒

微量中和试验用的IBD病毒为美国加州大学Yamamoto博士提供的已适应鸡胚成纤维细胞并能产生细胞病变的Lukert毒株。病毒引进后在我们的实验室用鸡胚成纤维细胞单层作了扩大繁殖。病毒接种后77小时将培养物反复冻融3次，所收获的营养液及其中的细胞残块不加任何处理即为病毒原液，存-20℃备用。用微量法滴定，每0.2毫升含 10^5 组织培养物半感染量 (TCID₅₀)。

(五) 微量血清中和试验

采用两板操作法。板一用于血清一病毒感作，板二用于正式试验。

用营养液将病毒原液稀释成每25微升含有200TCID₅₀，盛装于小玻璃瓶内待用。

在板一除第10纵列的孔加入50微升量外，其余的36个孔均用微量液体取样器各加入25微升营养液。在A横列的第1孔加入一份被检血清25微升，混和后再从第1至8孔依次作系列对倍稀释，最后从第8孔弃去25微升液体。

按上述方法在B、C横列第1至8孔稀释第二、三份被检鸡血清样品。每个样品必须注意更换一次微量液体取样器上的塑料头子。D横列的第1至4孔放对倍稀释的阴性血清，第5至8孔放阳性血清。

除了第10纵列的孔外，在其他所有36孔加入25微升病毒稀释液。第9纵列是未加过血清的，即为病毒对照组。

板一各孔加液完毕即加盖稍加振荡、置于室温（无菌罩内）使血清和病毒感作30~60分钟。

用制备好的1:600鸡胚成纤维细胞悬浮液分装于板二的所有孔内，每孔各放0.2毫升量。

血清和病毒感作后，将板一各孔液体用微量液体取样器全部（50微升）转移到板一的相应孔内。每一血清样品从浓度最高的孔开始依次用同一塑料头子进行转移操作。每一份样品须换用一

新的塑料头子。第9纵列的病毒对照孔和第10纵列的细胞对照孔也分别使用新头子（图1）。

各孔分装完毕就用涤纶胶带贴在孔口上密封之，再放37°C培养72~96小时。以完全抑制CPE的最高稀释度的倒数为血清的中和滴价。如果血清样品中和滴价高于 2^8 ，则用两个横列的孔或以血清1:32稀释度为第一孔重复一次试验。中和试验一般以培养后72小时就可以进行读判。只有四种对照产生正确结果，试验数据才能算准确。可以用肉眼观察各孔的颜色（即代谢抑制试验）或用倒置显微镜观察CPE情况，也可以用1%结晶紫溶液染色再观察^[5]。染色后的微量培养板可作长期记录保存，其典型外观如图2所示。



图1 微量血清中和试验操作程序

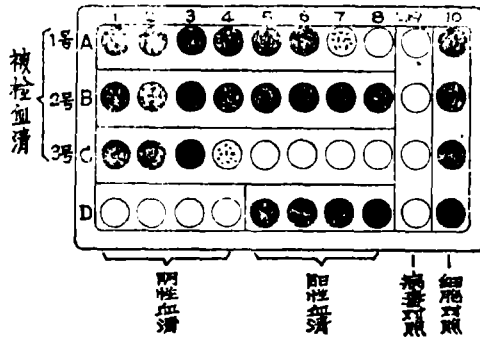


图2 结晶紫染色后的微量中和试验板

结 果

（一）试验一为对IBD自然感染鸡血清的病毒中和价进行检测。用SPF（阴性）血清、北京阳性血清，深圳市示范鸡场两个鸡舍和华南农学院试验鸡群采集的鸡血清进行微量血清中和试验，结果以 Log_2 值表示如图3：

从结果可以看出，SPF血清完全没有病毒中和作用而北京的阳性血清稀释4096倍（即 2^{12} 倍）可以完全抑制CPE的出现。深圳示范鸡场两个鸡舍的血清呈不同

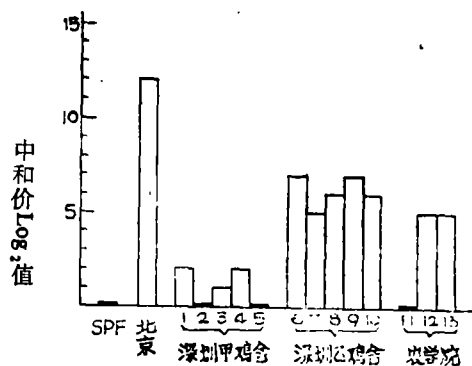


图3 IBD自然感染鸡只的血清中和价

水平的病毒中和作用。甲舍的1—5号鸡组内数值接近且滴价很低,其中2只为0而另外3只均处于 2^2 之内。乙舍的6—10号鸡血清中和价,虽然比甲舍的高得多,但组内数值也接近,其 Log_2 值在10—12之间。至于华南农学院试验鸡群的血清,来自其中一只2岁老公鸡的样品中和价为0;这与同组的两只7月龄鸡的 2^5 数值差异很大。

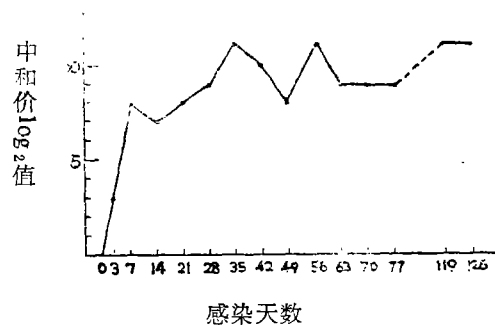


图4 IBD人工感染鸡只的血清中和价

(二)试验二是对初次人工感染鸡血清的IBD病毒中和价的检测,所获结果如图4所示。

从测定的血清中和滴价结果来看,人工接种病毒后中和滴价从感染前的0迅速上升,第35天达顶峰后维持时间较长而变化幅度不大。

讨 论

(一)鸡胚成纤维细胞的微量培养条件与常量法有不尽相同之处。本项研究开始时耗费了不少时间才将培养方法确定下来。在这方面碰到的主要问题是加入营养液犍牛血清的细胞毒性和塑料培养板的毒性,其次是消化组织细胞的胰酶浓度和作用时间等因素。

不同动物个体的血清,有的表现抑制细胞生长的毒性,有的却没有。有人认为这是与其抗胰酶物质含量有关,含量高就能中和细胞制备过程的胰酶残量而使细胞生长良好;相反,如果血清中抗酶物质少,残存的胰酶就会继续起作用而毒杀细胞培养物^[2]。然而,一般认为真正的原因尚未弄清楚。我们最初的许多次培养都不成功,探讨了各种因素,到改用另一批犍牛血清方领悟到血清细胞毒性的关键性。对鸡胚成纤维细胞表现细胞毒性的犍牛血清往往能够用于培养鸡胚肾细胞。这一现象曾对我们的认识起迷惑作用。

我们初期使用国产塑料培养板,虽经强硷强酸洗涤,细胞生长还是不佳,有的孔生长好一些有的很差,没有规律性。据国内别的单位反映,国产培养板表现的细胞毒性因生产批次不同而差异很大;要先试购一小批,发现细胞生长好就得赶紧购入大批备用。我们后来用酒精试作去毒处理,效果甚为显著,用于培养细胞的酒精处理板与进口培养板一样令人满意。估计这是因为酒精能清除聚苯乙烯板制作过程使用的脱模剂之故^[2]。又由于用紫外线近距离照射能达到灭菌作用,我们对使用国产培养板的信心从此就完全确立了。

在消化组织方面我们曾按过去处理猪及鸡胚肾组织的办法去消化10至12日龄鸡胚组织,也就是说用0.25%胰酶在37℃静置消化30分钟。结果虽然当时能制备细胞悬液但生势很弱。随着消化时间的缩短到5分钟,细胞生长效果就逐步提高。曾试用不加胰酶只作剪碎的方法,但效果很差。这表明要用胰酶消化但作用强度要小。最后我们把胰酶浓度降低四倍至0.06%,消化时间为10分钟。这样在操作上易于掌握,效果又稳定。进

行鸡胚成纤维细胞培养时要用弱于鸡胚肾细胞培养的胰酶消化作用可能是由于制备前者的鸡胚龄(10~12日)比后者(18~20日)的小,也可能是由于肾细胞培养物的主要细胞类型是类上皮细胞而不是成纤维细胞。如上所述鸡胚肾细胞能生长在含对鸡胚成纤维细胞有毒性的犊牛血清营养液里,这一点也提示类上皮型细胞较能耐受胰酶的损伤作用。总之,掌握胰酶的消化过程是一个须注意的因素。有人认为胰酶对鸡胚成纤维细胞有促进生长的作用⁹,有人则认为利用低浓度胰酶消化处理是成功地培养鸡胚成纤维细胞的关键。我们的经验比较符合第二个观点。

谷氨酰胺是细胞生长必需的养分之一,但在营液成份(如血清)保藏待用期间易于破坏,故国外通常在使用营养液之前临时加入冰冻保藏的谷氨酰胺溶液。我们使用国产的消旋谷氨酰胺,按一般采用左旋谷氨酰胺量(0.2mM)的两倍加入细胞营养液,对细胞生长有促进作用同时犊牛血清量又可减一半。谷氨酰胺原液含20mM/毫升,是用蒸馏水制备的,每100毫升营养液加2毫升;虽然渗透压有所下降但不至于影响细胞的生长。

庆大霉素为一广谱抗菌素且能耐受高达120°C的温度¹²,平时保藏于4°C即可。国外已有许多人在细胞营养液中用它代替青、链霉素抗菌素液。我们采用广州白云山制药厂产的庆大霉素按50单位/毫升营养液的含量使用,效果很好,对细胞培养物不呈毒性而除极个别情况下发生霉菌污染外,从未发生细菌性污染。按价格庆大霉素与青、链霉素大体相等,故本实验室已全部改用之。

(二)在微量血清中和试验条件方面,也曾在营养液、细胞量、病毒接种量等进行摸索。

Hanks氏和Earle氏平衡盐液制成的水解乳蛋白液均可用于本试验法(以下简称本法)。因Hanks氏液适合在一般空气中达到pH平衡¹²,所以培养板上加上塑料盖并在盖的周围用胶纸稍加封闭就可以产生适宜细胞培养的pH条件。Earle氏液适合于5% CO₂空气的条件;在没有二氧化碳培养箱的情况下,如果仅仅加塑料盖和封边,因孔和盖之间空隙较大,将导致各孔内营养液失去的二氧化碳过多而变得过硷,不适宜细胞生长。但是,用涤纶胶带直接贴在孔口上,二氧化碳的保留有效得多,使孔内营养液能保持在适宜细胞生长的pH范围内。胶带不用处理已是无菌和无毒性,用起来方便。又因为Earle氏营养液含碳酸氢钠较多,当细胞生长不良时(如受病毒致病作用后)营养液显得深红,而当细胞生长旺盛时所产的酸性物质使营养液变为黄色,颜色的差异反映细胞代谢抑制程度。Earle氏营养液比Hanks氏的pH变化范围较大,肉眼判断血清中和作用就较容易。因此,我们的试验采用Earle氏营养液和用胶带封孔,不用二氧化碳培养箱也可以获得良好效果。我们曾试用塑料盖松动地放在培养板上再置于底部盛水的腊烛缸内在37°C培养。虽然细胞生长正常但塑料盖下往往凝结大量的小水滴,对细胞观察不利,故不再采用。

各孔所加入的细胞为1:600悬液,乍看起来似乎比常量培养瓶使用的浓度少一倍,但因为孔底面积小、液体深约8毫米,实际上沉到孔底的细胞并不少;细胞多了反而使CPE的观察困难。

本血清中和试验采用培养细胞和接种病毒同时进行的方法；病毒在24小时内并未产生细胞病变，细胞仍可正常地贴壁和生长。这样的程序比先让细胞形成单层再接种病毒的可节省一天时间、简化了操作和减少污染的风险。

营养液内含犊牛血清量以5%为宜，曾试用10%浓度而发现虽然细胞生长很好，但要明确看出CPE的天数增加了。这种现象大概与本法不采用换上血清含量少的维持液的操作方法有关，而营养液内含高浓度血清显然有延迟CPE出现的作用。

本法用的病毒量为每孔200TCID₅₀。少于100TCID₅₀就会延长读判结果的时间，太多虽然可以提早一些看到结果，但对于发现可疑阳性血清样品不利。我们是在200微升细胞悬浮液里测得IBD病毒毒价为15⁵TCID₅₀的，在血清中和试验中加入的病毒液量为25微升。经过换算须将病毒原液稀释62.5倍。

本血清中和试验采用的两板操作法有操作简便和孔间交叉污染少的优点。这是因为病毒和血清感作必须在加入细胞之前30分钟进行。如果采用一板法，每将细胞悬液加入一个孔就要换一次吸管以保证不将孔内原来的病毒和血清从一个孔带到另一孔。用两板法就可以用一支吸管在板二的所有孔内分装细胞悬液而不必顾虑孔间交叉污染。向板二加入板一的病毒血清混合液时，因为量只有50微升，用微量液体取样器很方便，而且从血清浓度最高（即病毒被中和的作用最强）的孔开始移液，每份血清样品使用一个塑料头子即可。

微量血清中和试验，虽然可以参考营养液的颜色变化和结晶紫染色的细胞培养物，但精确的读判结果须要用倒置显微镜观察。这是国内许多实验室还未具备的设备条件。国外凡是搞细胞培养都用它。其实，国产的倒置显微镜已出口多年，现在国内也可购到。随着细胞培养术的广泛应用，相信各地很快会有所配置。

（三）从血清中和试验的结果看来，用美国引进的细胞适应IBD毒株可以用于诊断我国发生的鸡传染性囊病。例如，北京市农科院畜牧兽医所供应的，原目的为进行琼脂扩散沉淀试验的阳性血清，其IBD病毒中和价竟高达2¹²，这与作者在美国进修期间测过的一份强阳性血清滴价一样高。广州地区分离的IBD CG821毒株进行人工感染的幼鸡在第一次感染后可以于35天产生滴价为2¹¹的特异性抗体。据报道^{〔7〕}IBD病毒有两个血清型。I型主要感染鸡，II型主要感染火鸡。我国很少饲养火鸡，又因本试验使用的细胞适应毒株是属I型的，故可以肯定被检鸡群流行的病是由IBD病毒I型引起的。

（四）应用微量血清中和试验应如判断被检鸡群是否IBD阳性是此项研究的一个重要目的。从深圳甲舍的1—5号鸡血清的测定结果看，可认为是阴性群。易感鸡群有尖峰式死亡曲线^{〔3〕}，即死之多集中在2~3天内，说明全群是大致同时患病的；又从我人工发病群血清检测结果看，24日龄鸡初次感染后中和抗体很快就升高并维持18周以上。在污染场地重复多次自然感染的条件下，抗体维持高水平想必时间会更长。因此，如果是来自阳性群，5只鸡中总该发现一只中和抗体滴价是高的，但是实际上没有一只超过2²的滴价。乙舍的6—10号鸡血清中和滴价为2⁵—2⁷，显然属阳性群。据了解甲舍鸡苗来自白坑鸡场，乙舍的来自坪山种鸡场。鸡苗来源不同，进场后又实行

鸡舍间隔离制度大概是两群鸡IBD疫情不同的原因,而日龄(44和77)上的差异看来关系不大。美国加州大学Yamamoto博士认为 2^2 的血清中和滴价可看作可疑阳性, 2^3 和以上者当阳性。我们的结果也符合这种判断标准。假如一个鸡群的IBD血清中和滴价达到但不超过 2^2 时,可在两周后再行检测,如果滴度仍没有提高则可判断为阴性群。本试验重复性很好,反复多次用同一血清样品进行检测,结果一致,偶尔有差异也顶多一个 Log_2 的滴价值。

(五) 设立阴性和阳性血清对照组对本法是重要的。鉴于鸡在接触IBD病毒后很快产生和维持高水平的中和抗体以及本病的流行情况,阳性血清是不难找到的。问题是如何获得阴性血清。诚然,如果只用SPF血清将无法推广这项诊断技术的。我们根据鸡的法氏囊在性成熟后很快退化^[8],缺乏这个靶器官IBD病毒不能引起疾病^[3],和体内抗体不断遭到破坏而减少^[9]的原理出发,我们选用了一只2岁老公鸡进行血清检测,结果发现其IBD病毒中和价为0,同栏的两只7个月龄公鸡的滴价则为 2^5 ,尽管这只老公鸡的血清中和价显然是阳转阴性,但作为本试验的阴性血清对照与SPF血清是同样适宜的。

(六) 我们对严格隔离24天后人工感染IBD的CG821毒株的鸡定期抽样剖杀和采集血清进行微量中和抗体测定(图3)。虽然被检血清不是从同一只动物身上采的,但血清中和价的提高确能反映鸡只是受过感染的。因为小鸡来源一致、是共同饲养于隔离舍并且感染前中和抗体为0,所以感染后测得的抗体曲线在一定程度上能代表初次免疫应答过程。然而,抗体水平表现出某些特点,一是抗体产生早,二是抗体维持高水平的时间长。按照一般情况,初次免疫的抗体要到接种后7天左右才能被检出^[9]而我们3天后已能做到这一点,这可证明检测方法的敏感性高。IBD病毒是众所周知的免疫抑制因子,故上述现象更使人感觉意外。注射后35天中和抗体达高峰后至126天始终保持在2滴价水平之上也值得注意的。很难想象初次抗原刺激产生的浆细胞(分泌抗体的细胞)其寿命会比通常叙述的5~6天^[9]长很多,因此,合符逻辑的结论是病毒抗原存留于鸡体内时间长或者从污染的外界不断发生病原入侵。这样,本试验测出的抗体水平实际上代表初次和再次免疫应答的共同作用。7个月龄的12、13号鸡抗体检测结果提示在IBD疫场鸡只的高中和抗体水平可能一直维持到成年和法氏囊萎缩后一段时间。在自然条件下,有法氏囊这个靶器官鸡才能感染IBD病毒、才能产生抗体的现象,似乎指出IBD病毒在法氏囊繁殖起码有一段时间是不受机体免疫功能的攻击的。据Edwards等(1982)报道^[10],1日龄鸡接种一种市售IBD“弱”毒疫苗能引起长达4周的免疫抑制;我们于24日龄进行强毒人工感染却未见有这种现象。大概这是因为24日龄时经过法氏囊发育阶段到达外周淋巴器官的B细胞数量已足于执行有效的体液免疫应答,而感染日龄越低影响越大。据Faragher等(1974)报道^[11],1日龄小鸡感染IBD能引起几乎完全的免疫抑制,7日龄感染免疫抑制要少一些,而在14日龄以上感染所产生的影响差不多难于觉察出来。从报道过的资料和我们本次试验的结果来看,要避免IBD产生的免疫抑制的危害,最主要的是预防24日龄以内雏鸡感染本病。

参 考 文 献

- [1] 周蛟、刘福致等：北京地区鸡传染性法氏囊病病原分离，《中国兽医杂志》，8(7) 1982，25—26。
- [2] G. D. 华斯莱编：《动物组织培养术》，何申、吴克复等译，1982，科学出版社出版1982年。
- [3] M. S. 霍夫斯塔主编：《禽病学》，胡祥璧等译，农业出版社出版1981年。
- [4] Cosgrove, A. S. (1962). An Apparently New Disease of Chickens—Avian Ne phrosis. *Avian Diseases*. 6:385-389.
- [5] Villegas, P (1981). *Laboratory Manual - Avian Virus Diseases*. University of Georgia.
- [6] Baserga, R. (1976). *Multiplication and Division in Mammalian Cells*. Temple University Health Center, Philadelphia.
- [7] McFerran, J. B. et al. (1980). Isolation and Serological Studies with Infectious Bursal Disease Virus from Fowl, Turkeys and Ducks; Demonstration of a Second Serotype. *Avian Pathology* 9:395-403.
- [8] King, A.S., McLelland, J. (1975). *Outlines of Avian Anatomy*. Bailliere Tindall, London.
- [9] Tizard, I. R. (1977). *An Introduction to Veterinary Immunology*. W. B. Saunders Company.
- [10] Edwards, K. R. et al. (1982). Duration of Immunosuppression Caused by a Vaccine Strain of Infectious Bursal Disease Virus. *Research in Veterinary Science*, Vol. 32, 79-83.
- [11] Faragher, J. T. et al. (1974). Immunosuppressive Effect of Infectious Bursal Agent on Vaccination Against Newcastle Disease. *Veterinary Record*, 95:385-388.

A SERUM MICRONEUTRALIZATION TEST FOR INFECTIOUS BURSAL DISEASE OF CHICKENS

Liu Fuan

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine)

Chen Bowen

(Guangzhou Animal and Plant Quarantine Service)

ABSTRACT

A serum microneutralization test using a cell-adapted Infectious Bursal Disease virus strain is reported in this paper. China-made polystyrene micro-culture plates, chicken embryo fibroblast culture and Earle's lactalbumin hydrolysate nutrient medium were used in the test. Details of the modified procedure are described. The test has been found to be highly sensitive and will be a powerful tool in epidemiological survey of the disease in chicken flocks.

The results of assessing the neutralizing antibody levels in a batch of artificially infected chickens demonstrates that it is most important to prevent IBD infection in chickens under 24 days old.