

广东地区鸡传染性囊病的研究*

毕英佐

(广东省家禽科学研究所)

提 要

本文报道传染性囊病 (IBD) 血清学调查情况及两株传染性囊病病毒 (IBDV) 的分离和鉴定过程。这两毒株的鉴定是通过血清学、病理学、理化性质测定和电镜观察等方法而确定下来的。

通过对广东省五个地区17个鸡场的血清学调查,发现其中13个鸡场存在IBD沉淀抗体。由此推论,可能我省已有不少鸡场存在着IBD。本文并分析了一些鸡场爆发鸡新城疫的可能原因是IBD的免疫抑制作用。

在血清学调查的基础上,成功地分离到两个IBDV株。

在病毒的鉴定过程中,将分离株接种到易感小鸡后,引起法氏囊产生典型的病理学变化,包括水肿、表面见条纹或黄色冻胶样物等。接种病毒3天后,便见囊萎缩。组织学观察发现淋巴细胞坏死,网状细胞增生等炎症反应。接种病毒1月后,囊有明显的再生作用。两分离株均不能使小鸡产生明显的临床症状,其它器官组织一般无肉眼病变可见。

将分离株接种鸡胚后,鸡胚于3~7天死亡。胚体出现充血、出血、皮下水肿、肝变黄绿色、且呈斑驳状坏死等病变。

琼脂凝胶沉淀试验表明,两个分离株均能与美国IBD阳性血清产生明显的沉淀线。在病毒中和试验中,用两个分离株感染鸡后,其康复血清能中和美国IBD—Lukert病毒株,其中和指数均大于4.2。

本试验对其中一分离株进行了毒价测定、电镜观察和理化性质鉴定。对7天龄和1月龄小鸡的毒价,分别为 $10^{-3.2}$ 和 $10^{-7.2}$ BLD₅₀ (囊的半数病变量)。电镜观察可见在法氏囊淋巴细胞的胞浆中,有晶格状排列的病毒颗粒,其直径在45~53nm之间,同时还见直径为22~26nm的电子密度较大的小颗粒集丛。理化性质测定结果表明,该病毒对酸稳定,耐热,对脂溶剂有绝对的抵抗力。从实验结果证实,作者所分离的两个毒株为传染性囊病病毒,并分别将其命名为IBDV—CG821株和IBDV—CG822株。

前 言

鸡传染性囊病 (下简称为IBD) 是一种由病毒引起的高度接触性传染病。1957年最初发现于美国特拉华州甘保罗地区,1962年Cosgrove首次报道此病^[1],并称之为甘

* 本研究是作者的硕士论文。在导师邱荣禄教授的指导下完成。

致谢: 本研究得到华南农业大学牧医系禽病教研组的老师和工人的大力支持,病理部分在省家禽所罗庆芳老师的指导下完成,谨表谢意。

保罗病 (Gumboro disease)。同年Winterfield等分离到病原, 命名为传染性囊因子 (IBA)^[21]。此后世界各地陆续有此病的报道。IBD的特点是发病率高、病程短、死亡率低, 多呈隐性感, 但能引起中枢免疫器官的法氏囊 (BF) 产生严重病变, 使参与体液免疫的B淋巴细胞受到破坏, 产生免疫抑制作用; 使鸡对新城疫 (ND)、传染性支气管炎 (IB)、传染性喉气管炎 (ILT)、马立克氏病 (MD) 等疫苗不能产生理想的免疫效果^{[13][18][19]}, 并可增加鸡对球虫、大肠埃希氏杆菌、鸡伤寒菌、葡萄球菌、包含体肝炎病毒等的易感性^{[22][12]}, 使养鸡业蒙受巨大而又难以估量的损失, 因此引起人们广泛的重视。

1979年, 邝荣禄、陈玉汉等在广州白云山机械化鸡场根据流行病学、病理学调查及对病死鸡的法氏囊切片观察, 发现有典型的囊病病理变化, 提出此病在我国的存在。同年, 北京农科院兽医所周蛟等也有囊病的报道^[3], 并先后在北京地区分离到两个毒株。

为了进一步证实IBD在我省的存在并了解其流行情况, 作者从1981年初开始, 在广州、深圳、佛山、惠阳、珠海等地区的一些鸡场对此病进行了病理学和血清学调查, 并采集有疑似法氏囊病变的病料进行病原的分离和鉴定, 从而获得了两个IBDV毒株, 分别被命名为IBDV—CG821株和IBDV—CG822株。

材 料 与 方 法

(一) 血清学调查

1. 现场血清的采集: 从不同地区的鸡群中采集不同日龄鸡的血清置普通冰箱, 三天内做琼脂凝胶沉淀 (AGP) 试验。

2. AGP试验用的抗原和血清:

(1) 北京农科院兽医所IBD—CJ801抗原和血清。

(2) 英国IBD—JAN—78标准抗原, 抽样复检时用。

3. AGP试验方法: 按常规法制作琼脂板并作梅花形打孔, 孔径3毫米、孔距也是3毫米。中间孔加抗原, 外周孔加待检血清, 并设阳性血清作对照, 加样后做好标记, 置湿润容器内于37℃温箱中经24~48小时判定结果, 在抗原和血清孔间出现白色沉淀线者为阳性。

(二) 病毒的分离

1. 小鸡: 从广州市种苗公司购进一日龄来航小鸡, AGP试验为阴性, 专人管理, 隔离饲养至本实验所需的日龄。

2. IBDV—CG821株的分离: 广州市食品进出口公司竹料鸡场兽医梁荣赞于1980年底曾有疑似传染性囊病的诊断报告。作者在血清学调查的基础上剖检了10~35天龄各批次的病、死鸡, 一般见法氏囊萎缩和水肿, 偶见粘膜小点出血。将这些不同批次的法氏囊混合, 按W/V 1:1加水解乳蛋白液 (LH液) 匀浆, 3000转/分钟离心30分钟, 取上清液用氯仿处理 (方法同理化性质测定一节), 点眼、口服接种40天龄的易感来航小鸡, 每只0.5毫升, 2天半后剖杀取囊作继代用。

3. IBDV—CG822株的分离: 中山县外贸局白石鸡场自1981年底以来, 连续近 20 批 1 月龄左右的小鸡爆发新城疫。该场兽医曾取早期发病的病、死鸡的法氏囊用福尔马林固定送我院作病理切片检查, 可见典型的IBD病理组织学变化。又送来康复期血清样本14个作AGP试验, 结果全部阳性。后来作者到现场调查时, 除见有ND的症状和病理变化外, 还见法氏囊水肿、出血、内有干酪样物、萎缩等病变。取有可疑病变的法氏囊用上述方法处理, 接种42天龄的来航小鸡, 2 天半后剖杀取囊匀浆作继代用。

(三) 病毒的鉴定

1. 病毒的鸡体传代: 分别用上述两个分离物各代次的BF匀浆液接种不同日龄的来航鸡, 2~5 天后剖杀, 观察BF和其它组织器官的病理变化。每次均设健康对照组。

2. 分离物的鸡胚接种: 实验用鸡胚来自广州市种苗公司。

分别用CG821株和CG822株的BF匀浆液, 每毫升加双抗2000单位; 或用各代次鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)匀浆液, 接种于10~12天龄来航鸡胚的CAM, 每只0.1毫升, 每天照蛋两次, 24小时前死亡的废弃, 合乎要求的死胚和接种物均作无菌检验。并分别将两毒株的胚毒点眼、口服回接于21天龄来航小鸡各5只, 每只0.2毫升, 3天后剖杀观察BF病变。

3. 血清学反应:

(1) AGP试验, 参考Ley, D. H法^[17]。

待检抗原: 分别将两个分离株的鸡体第一代BF匀浆液反复冻融三次, 经4000转/分钟离心1小时后, 取其上清液。

正常囊匀浆液: 一月龄健康来航鸡BF匀浆液, 处理方法同上。

阴性血清: 一月龄健康来航鸡血清。

标准抗原: 英国IBD—JAN—78抗原。

标准血清: 美国IBD—Lukert株阳性血清。

试验方法: 孔径5毫米、孔距4毫米, 作梅花形打孔, 其他方法同血清学调查一节。

(2) 病毒中和(VN)试验。病毒: 美国IBD—Lukert细胞适应株, 经两次测定毒价为 $10^{-5.5}$ TCID₅₀; 阳性血清: 北京IBD—CJ801血清; 阴性血清: 一月龄健康来航鸡血清, AGP试验为阴性。

鸡抗血清的制备: 分别用IBD—CG821株BF₄代和CG822株BF₂代囊匀浆液0.1毫升点眼、口服接种于4周龄的来航小鸡, 接毒后30天心脏穿刺取血制备血清。上述各种血清于试验前经56℃30分钟灭活处理。

细胞培养: 接常规细胞培养法^[4]制备鸡胚成纤维单层细胞。试验采用固定血清、稀释病毒法^[7]。

用Hanks液将病毒作 2×10 倍系列连续稀释, 从 2×10^{-1} — 2×10^{-7} ; 各种血清作10倍稀释。取各个稀释度的病毒悬液0.75毫升分别与0.75毫升的各种血清混合, 摇匀后于37℃作用1小时, 然后将病毒、血清混合液接种于鸡胚成纤维单层细胞, 每管0.5毫升, 每个稀释度3管, 于37℃吸附1.5小时后倾去混合物, 换上维持液, 当对照组90%细胞发生病变时, 判断各管的结果并计算中和指数。

对照组，每组3管。a. 加100TCID₅₀病毒组。b. 空白对照组。c. 加阴性血清组。d. 加CG821血清组。e. 加CG822血清组。f. 阳性血清+100TCID₅₀病毒组。

4. 小鸡接种CG821株后BF病理变化观察：将IBD—CG821株BF₄代法氏囊匀浆液点眼和口服接种15只24天龄的来航小鸡，每只0.1毫升，接毒后分别于1、2、3、4、5、6、8、10、12、15、17、23、30天各剖杀1只，观察囊的病理变化；并于3、8、15、23、30天各剖杀健康对照鸡1只，分别称囊重和体重，测定囊指数（BBIX）。并将BF浸于10%福尔马林固定，经石蜡包埋切片和H. E. 染色后，观察其组织学变化。

5. CG821株的电镜鉴定：将CG821株BF₄代囊匀浆液经氯仿处理后（见理化特性测定一节）接种1月龄来航小鸡6只，分别于接毒后28小时、48小时、120小时剖杀取囊，按常规电镜法进行固定、脱水、包埋，LKB—V型超薄切片机切片，切片用醋酸铀和柠檬酸铅双染色，然后用荷兰EM₁₀型电镜观察，健康鸡法氏囊处理方法同上。

6. 鸡体毒毒价测定：将CG821株BF₄代囊匀浆液作10倍系列稀释，分别接种于7天龄和30天龄来航小鸡，每组6只，每只点眼、口服共0.1毫升。各组隔离饲养，并设健康对照组，接毒三天后各组剖杀3只，称囊重和体重，测定囊指数，观察囊的肉眼病变并切片观察其组织学变化。各组留下的3只鸡于接毒后第8天心脏抽血取血清做AGP试验，剖杀观察囊的肉眼变化并称囊重和体重，测定囊指数，计算囊的半数病变量（BLD₅₀）。

7. CG821株理化特性鉴定：鸡：33天龄来航小鸡，每组4只，各组隔离饲养并设健康对照。病毒：IBDV—CG821株BF₄。NDV—广东省农科院兽医所提供。

（1）热稳定性测定：将CG821株BF₄代囊匀浆液在56℃水浴中加热2小时，然后点眼和口服接种小鸡，每只共用0.1毫升，3天后剖杀检查囊的肉眼病变。

（2）pH稳定性测定：用1NHCl将CG821株BF₄病毒液调至pH2，于4℃2小时，取出后用7%的NaHCO₃调至pH7.2左右，点眼、口服接种小鸡，每只0.2毫升，3天后剖杀检查囊的肉眼病变。

（3）对乙醚和氯仿敏感性试验：取4份CG821病毒液和1份乙醚混合，置4℃18小时，另外4份CG821病毒液和1份氯仿混合置4℃60分钟，将混合物震荡多次，然后经3000转/分钟离心10分钟，乙醚浮在病毒液表面，而氯仿沉在底部，分别用吸管将病毒液吸出，吹打数次，使残留的乙醚、氯仿挥发后，点眼和口服接种小鸡，每只共用0.1毫升，3天后剖杀检查囊的肉眼病变。

将ND强毒10⁻²稀释，按上法用氯仿处理，另外一些不加氯仿处理，然后分别接种两组来航小鸡，每组3只，每只肌注0.1毫升，隔离饲养，观察发病情况。

结 果

（一）血清学调查

对五个地区的17个鸡场进行IBD血清学调查，发现13个场存在IBD沉淀抗体，阳性率达76%，采集现场血清样本293个，阳性数128个，阳性率为43%。不同地区各鸡场

IBD血清学调查情况见表1。

(二) 病毒的分离

分别将处理过的竹料、白石鸡场的野外病料接种易感小鸡，2天半后剖杀，两种病料均能使法氏囊产生典型的肉眼病变（见表2、表3）。经鉴定证实两分离物为传染性囊病病毒，鉴定方法和结果见下述各项。

表1 现场血清IBD抗体调查

地区	鸡场名称	日 龄	抽样数	阳性数	阳性率%	地区	鸡场名称	日 龄	抽样数	阳性数	阳性率%	
深 圳	示范鸡场	120	10	8	8/10	珠 海	前山鸡场		18	9	50	
	七甲鸡场	90	10	9	9/10		食品公司鸡场	55	3	3	3/3	
	福永鸡场	70	9	8	8/9	惠 阳		60	10	0	0/10*	
	沙井鸡场	60	4	4	4/4			100	10	0	0/10*	
	西乡鸡场	85	10	0	0/10			9月龄	10	0	0/10*	
广 州	梅花园鸡场	6月龄	10	0	0/10			绿峰鸡场	21	5	3	3/5**
		70	10	0	0/10			45	5	4	4/5**	
	石榴岗鸡场	60	16	0	0/16		100	5	5	5/5**		
		仲凯鸡场	65	10	0	0/10		小计	45	12	26	
		华农鸡场	年半	13	4	4/13	佛 山		45	8	0	0/8
		三元里鸡场	60	8	3	3/8		燎原鸡场	年半	10	3	3/10
		黄波鸡场	8月龄	10	3	3/10			小计	18	3	17
	竹料鸡场		45	28	62	中山白石鸡场		44	34	77		
	合 计	***13/17	293	128	43							

*1982年1月第一次取样

**1982年6月第二次取样

***阳性鸡场数/鸡场总数

(三) 病毒的鉴定

1. 病毒的鸡体传代：CG821株和CG822株分别在鸡体传了六代。接毒后2~5天，除见个别鸡精神沉郁和拉白色或绿色粪便外，一般无明显的临床症状，但BF却有典型的肉眼病变：主要是水肿、表面见纵纹，有时见黄色冻胶样物包裹，切开见皱襞有凹陷处而呈卷曲状，个别见多量的黄色粘液或奶油样物。偶见粘膜有充血和小出血点。囊的颜色变黄或变白。接毒后3天便见囊开始萎缩。CG822株引起囊的萎缩较明显，而周围黄色冻胶样物少见。其它组织器官无明显的肉眼病变可见（见表2、表3）。

2. 毒株鸡胚接种及传代：两个毒株分别在鸡胚传了六代，鸡胚于接毒后3~7天死亡，死后及时收获。8天不死者活收（见表4、表5）。各批鸡胚死亡和病变不规律，常见胚体充血、出血，尤以颈背部和趾部为甚，腹部皮下水肿，肝变黄色或绿色，呈斑驳状坏死，心、脾颜色淡白。活收的鸡胚尿囊液有时呈绿色，肝变绿，但胚体出血较轻。肾一般无病变可见。

两个胚毒回鸡均能引起囊水肿、颜色变黄色、萎缩等典型病变。

表2 IBDV—CG821株鸡体传代

代次	鸡数	接毒日龄	收毒时间 (PI天)	B F 病 变							症 状	感染率 %
				水 肿 见纵纹	萎 缩	黄 色	黄色冻 胶样物	囊内分 泌物	充血 出血	皱襞有 凹陷处		
野外病料	5	27	2.5	3	1	2	2	1			2	100
BF ₁	4	33	3	1	2	3	3	1		1		100
BF ₂	4	23	3	3	1	3	1					100
BF ₂	3	23	5		3	3				2	1*	100
BF ₃	5	28	3.5	2	4	4		2	2	1		100
BF ₄	10	44	2.5	6	3	4	3	3	1	3		100
BF ₅	6	35	2.5	5	2	3	2			2		100

*肌肉有出血点

表3

IBDV—CG822株鸡体传代

代次	鸡数	接毒日龄	收毒时间 (PI天)*	BF 病 变**						症 状	感染率 %
				水肿见 纵 纹	萎 缩	黄 色	囊内分 泌 物	充血 出血	皱襞有 凹陷处		
野外病料	4	27	2.5	4	1		2	1	1		100
BF ₁	4	30	2	3			1			1	100
BF ₂	4	33	3	4	3		1		1		100
BF ₃	4	23	4.5		4	4			2		100
BF ₂	4	35	2.5	2	3	1		3	2		100
BF ₄	5	44	3	2	4	3	2		1	1	100
BF ₅	8	30	3	3	7	4	1		3		100

*PI = Postinoculation接毒后；**全部没有黄色冻胶样物。

3. 血清学反应：

(1) AGP试验结果表明CG821、CG822株囊抗原均能与美国IBD阳性血清产生明显的沉淀线，英国IBD抗原和北京IBD抗原也能与CG821、CG822血清产生沉淀线（见表6）。

(2) 病毒中和试验：正常血清+病毒组，TCID₅₀为10^{-4.12}。

CG821免疫血清+病毒组和CG822免疫血清+病毒组都不能产生细胞病变，其中和指数均大于4.2。据П. А. ПАДЧУК^[6]，IBD免疫血清中和指数>2就可判为阳性。

4. 接种CG821株后鸡法氏囊病理变化观察：

(1) 肉眼病变（表7）：接毒后1天见囊充血，2天后出现水肿、表面条纹或有

表 4

IBDV—CG821株鸡胚接种和传代

代次	胚数	接种材料	鸡胚死亡时间 (天)							活收***	鸡胚病变				感染率 (%)
			1	2	3	4	5	6	7		+++	++	+	-	
1	6	BF ₂			1	2				3		1	3	2	67
2	8	EF ₁ **		1		2		2	1	2		1	4	3	62
3	10	BF ₄				3	2	1	1	3		3	4	3	70
4	7	EF ₂			2		3	2				4	3		100
5	10	EB ₃				4	3	1		2	3	4	2	1	90
6	10	EF ₆					2	2	1	5		2	4	4	60
对照	6	LH液								6					0

*24小时内死亡不计算在内；**胚毒；***置4℃冰箱冻死后才收获。

表 5

IBDV—CG822株鸡胚接种和传代

代次	胚数	接种材料	鸡胚死亡时间 (天)							活收	鸡胚病变				感染率 %
			1	2	3	4	5	6	7		+++	++	+	-	
1	6	BF ₂			1		2	1		2		2	3	1	83
2	8	EF ₁		1	1	1		2		3	1	1	4	3	72
3	7	EF ₂			1	2	3			1	1	2	3	1	85
4	8	EF ₃			2	2	1	1		2		3	4	1	89
5	10	BF ₄			1	2	3	1		3		3	5	2	80
6	6	BF ₃			1		3		1	1		1	3	2	67
对照	6	LH液								6					0

表 6

IBDV—CG821和CG822株琼脂凝胶沉淀试验

抗原	血清 结果	CG821	CG822	美国血清	北京血清	正常血清
		血 清	血 清			
CG821囊匀浆液		+	+	+	+	-
CG822囊匀浆液		+	+	+	+	-
英国抗原		+	+	+	+	-
北京抗原		+	+		+	-
正常囊匀浆液		-	-	-	-	-

表 7 接种CG821株后鸡法氏囊病理变化

解剖号	解剖日龄	PI (天)	囊重(g)/体重(g) × 1000	BBIX*	囊的肉眼病变	正 常 囊**	
						号数	囊重/体重 × 1000
1	25	1	1.0/170 = 5.8		充 血		
2	26	2	0.57/168 = 3.4		水肿、见条纹		
3	27	3	0.6/148 = 4.5	0.83	表面有冻胶样物,内有多量粘液	正 1	0.92/170 = 5.4
4	28	4	0.3/168 = 1.78		萎缩、黄色、皱襞卷曲		
5	29	5	0.39/180 = 2.17		黄色变长、稍硬		
6	30	6	0.27/175 = 1.54		囊壁变薄、皱襞变小		
7	32	8	0.22/173 = 1.27	0.21	黄色、浆膜有小出血点	正 2	1.1/185 = 6.0
8	34	10	0.25/214 = 1.17		淡黄色、壁薄、变软		
9	36	12	0.2/194 = 1.03		淡灰色、皱襞变小		
10	39	15	0.17/209 = 0.81	0.15	灰白色、变软、皱襞不清	正 3	1.6/301 = 5.3
11	41	17	0.35/300 = 1.16		淡黄色、稍韧		
12	47	23	0.42/390 = 1.08	0.24	皱襞较薄	正 4	1.8/400 = 4.5
13	54	30	0.68/545 = 1.24	0.3	除比正常小外无其它异常变化	正 5	2.1/506 = 4.15

• BBIX 囊 指数 = $\frac{\text{感染鸡的囊重/体重}}{\text{正常鸡的囊重/体重}}$; ** 对照鸡为同批同日龄鸡。

黄色冻胶样物, 接毒 3 天后便见囊萎缩、变长、变黄色或白色。囊壁变薄, 有时见皱襞有凹陷处而呈卷曲状。囊指数 (BBIX) 逐渐下降, 接毒后 15 天 BBIX 仅为 0.15; 后期随着鸡体重增加, 囊有增大的倾向。其它组织器官一般无肉眼病变可见。

(2) 病理组织学变化: 接毒 1 天后, BF 便发生明显的组织学变化, 除见部分滤泡保持正常外, 其它滤泡髓质淋巴细胞数目大大减少, 滤泡内网状细胞开始增殖, 偶见异嗜细胞。

接毒后 2~3 天, 以破坏为主, 浆膜层、肌层、粘膜下层及滤泡间水肿。见充血、出血和少量的异嗜细胞浸润, 偶见巨噬细胞和浆细胞; 滤泡界限模糊而显缩小, 皮质髓质界限不清, 滤泡的淋巴细胞几乎消失 (图 2、图 3), 皮质仅见网状细胞和结缔组织细胞, 髓质为网状细胞、异嗜细胞及核碎屑。部分滤泡细胞成分甚少, 只有大小不等的空泡。

接毒后 4~6 天, 水肿不明显, 间质中纤维组织明显增生, 滤泡缩小, 原来的未分化上皮细胞增殖, 核淡且圆, 滤泡皮质中只见小量的淋巴细胞, 原髓质部小空泡增多 (见图 4), 粘膜上皮增生。

接毒后 8~15 天, 皱襞逐渐变小变薄, 滤泡缩小成圆形或椭圆形, 数量减少, 髓质部逐渐为增殖的皮质——髓质上皮细胞和网状细胞所代替, 粘膜上皮弯入加强而成陷窝及腺体样结构 (图 5), 并见有圆形的囊泡, 囊壁为单层立方上皮或纤维组织, 内有淡嗜碱性的分泌物。

接毒后 17~23 天, 小梁及滤泡间纤维组织增生。滤泡中大部分是网状细胞, 网眼中

的淋巴细胞逐渐增多, 在皱襞中出现数处无滤泡结构的淋巴细胞的堆集。

接毒后30天, 皱襞恢复至正常的厚度。滤泡也增至正常数目, 呈多角形, 有一些滤泡则已接近正常的结构(图6), 但淋巴细胞染色稍淡, 部分滤泡髓质中淋巴细胞数量较正常少, 仍见较多的网状细胞。

5. 病毒的电镜鉴定: 感染CG821株的BF在电镜下观察, 接毒28小时后, 在淋巴细胞和异嗜细胞的胞浆中靠近细胞核处有卵圆形的包涵体, 在包涵体中有许多形态相似的病毒颗粒, 常呈晶格状排列(见图7、图8), 病毒颗粒近似六边形, 直径在45~52毫微米之间。在胞浆中还见一些分散的病毒颗粒(图9); 偶见呈髓脂质样的图象, 内有病毒丛集, 病毒丛外有一界膜包围(图10)。在胞浆中还见一些电子密度较大的近似圆形的小颗粒集丛, 直径在22~26毫微米之间(图11)。接毒48小时后, 除了晶格状排列的病毒外, 还见胞浆中有大小不等的空泡。小颗粒集丛增多, 有时充斥于上述的空泡中(图12)。接毒120小时后, 不见晶格状排列的病毒颗粒, 而偶见上述的小颗粒集丛。在细胞核和正常的BF中未发现病毒颗粒。

6. CG821株鸡体毒价测定: 经两次测毒, CG821株对7日龄和1月龄小鸡的毒价分别为 $10^{-3.2}$ BLD50/0.1毫升和 $10^{-7.24}$ BLD50/0.1毫升。个别囊虽然肉眼病变不明显, 但组织学观察证实已被感染。接毒8天后囊明显萎缩, 感染量越大, 萎缩越明显(见表8、表9)。

7. CG821株的理化特性鉴定: CG821株对乙醚氯仿不敏感, 耐热耐酸, 而有囊膜的NDV经氯仿处理后被破坏而失去致病力(表10)。

表8

对7日龄小鸡测毒

滴度	鸡数	接毒后8天		接毒后8天		囊病变		A G P
		平均囊重(克)/平均体重(克)	BBIX	平均囊重(克)/平均体重(克)	BBIX	肉眼病变	组织学病变	
		×1000		×1000				
10^{-1}	6	0.2/70 = 3.01	1.0	0.1/72 = 1.38	0.45	6/6		+
10^{-2}	6	0.16/58.3 = 2.86	0.95	0.12/78 = 1.54	0.5	6/6	3/3	+
10^{-3}	6	0.2/65 = 3.07	1.02	0.15/94 = 1.59	0.51	4/6	2/3	±
10^{-4}	6	0.22/65.7 = 3.4	1.13	0.25/85 = 2.94	0.94	0/6	0/3	-
10^{-5}	6	0.2/63 = 3.2	1.06	0.24/75 = 3.2	1.03	0/6	0/3	-
对照	6	0.18/70 = 3.0		0.27/86 = 3.1		0/6	0/3	-

表9 对 1 月 龄 小 鸡 测 毒

滴 度	鸡 数	接毒后 3 天		接毒后 8 天		囊病变		A G P
		平均囊重(克)/平均体重(克) × 1000	BBIX	平均囊重(克)/平均体重(克) × 1000	BBIX	肉眼 病变	组织学 病变**	
原液	6	0.8/201 = 3.98	0.63	0.22/253 = 0.87	0.17	6/6*		+
10 ⁻¹	6	1.2/217 = 5.52	0.9	0.31/301 = 1.03	0.2	6/6		+
10 ⁻²	6	0.93/220 = 4.42	0.72	0.45/281 = 1.6	0.32	6/6		+
10 ⁻³	6	1.26/222 = 5.7	0.92	0.3/298 = 1.0	0.19	6/6		+
10 ⁻⁴	6	0.83/181 = 4.6	0.75	0.28/271 = 1.01	0.2	6/6		+
10 ⁻⁵	6	0.9/198 = 4.54	0.74	0.45/300 = 1.5	0.3	5/6		+
10 ⁻⁶	6	0.73/183 = 4.0	0.65	0.55/266 = 2.06	0.4	5/6	3/3	+
10 ⁻⁷	6	0.83/187 = 4.46	0.72	0.7/260 = 2.7	0.53	4/6	2/3	+
10 ⁻⁸	6	1.6/260 = 6.15	1.0	0.97/320 = 3.04	0.6	1/6	0/3	-
10 ⁻⁹	6	1.1/223 = 4.95	0.8	1.4/335 = 4.12	0.81	0/6	0/3	-
对照	6	1.55/253 = 6.13		1.3/257 = 5.06		0/6	0/3	-

*病变数/鸡只数; **接毒后 3 天切片检查。

表10 IBDV—CG821株理化特性鉴定

处 理	鸡 数	BF 病 变*				感 染 率	死 亡 数
		+++	++	+	-		
CG821毒(未处理)	4	2	2			4/4	0
20%乙醚 4 °C 18 小时	4	1	2	1		4/4	0
20%氯仿 4 °C 60 分钟	4	2	1	1		4/4	0
pH 2 4 °C 2 小时	4		2	2		4/4	0
56 °C 2 小时	4		3	1		1/4	0
NDV 20%氯仿 4 °C 60 分钟	3					0/3	0 (健活)
NDV (未处理)	3					3/3	3
对 照	3				3		0

*+++严重病变; ++中等病变; +较轻病变; -无病变。

讨 论 和 结 论

(一) 通过对我省五个地区的17个鸡场的血清学调查, 发现其中13个鸡场IBD沉淀抗体反应为阳性, 这说明了IBD可能在我省许多鸡场存在。我省毗邻港澳, 是我国出口活鸡的主要基地, 近年来养鸡业发展很快, 但卫生防疫制度不严, 管理水平较低, IBD污染可能有不断增加的趋向。

(二) IBD一旦在鸡场中爆发流行后, 多转为隐性感染。许多学者报道: 此病多呈

亚临诊经过^{[9][21]}, 所以一般不易被发现。

Jayaramaian认为, 能在鸡群中查出IBD沉淀抗体的鸡场, 就可以分离到囊病病毒^[16]。作者通过血清学调查, 掌握IBD抗体出现的规律, 取有可疑病变的病、死鸡的法氏囊多批混合用氯仿灭菌和灭活有囊膜的病毒, 然后接种易感小鸡, 成功地分离到两个毒株。

(三) IBD能引起免疫抑制作用, 国外已有大量报道, 特别是对ND免疫的影响, 人们尤其关注。当小鸡出壳后早期感染IBDV, 新城疫疫苗的免疫效果就会受到严重的抑制^[13]。这些鸡如感染NDV时, 发病率、死亡率增加, 并延长排毒时间^[18], 且对中等毒力的疫苗株甚至是ND-B₁等弱毒株也能产生严重的反应和死亡^{[10][5]}, 这可能是鸡感染IBDV后, 宿主免疫系统发生紊乱, 淋巴组织受到广泛破坏, 免疫反应大大降低, 有利于病原的增殖, 从而产生严重的病毒、细菌、寄生虫等的继发感染或并发症。

作者进行血清学调查的17个鸡场, 是年产量5万~30万不等的鸡场。近年来90%的场都发生过新城疫, 特别是深圳地区和一些外贸鸡场, 鸡新城疫连绵不断, 情况严重。这些场的鸡在7~10天龄和21~30天龄时都分别使用过ND-B₁和I系疫苗, 但接种后, 其HI抗体效价很低, 或接种后反应严重, 死亡率增加, 有时甚至出现鸡新城疫的症状。特别是在分离到囊病病毒的二个外贸鸡场, 连续十多批甚至近20批的鸡发生新城疫, 这很可能与囊病的感染有直接的关系。

(四) IBDV的靶器官是法氏囊, 根据Hirai等报道: BF肿大, 表面见条纹, 有黄色冻胶样物等特征性病变即可作出初步的诊断^{[16][14]}。在本实验人工发病的小鸡中, 虽然没有见到明显的临床症状和其它组织器官的眼肉病变, 但BF的病变是必有的。感染后2天便见BF水肿, 表面纵纹, 色泽变白或变黄, 感染后3天不见囊肿大反而见萎缩, 这一现象和Vindevoel等的观察结果相似^[20], 而Cosgrove等学者报道: 接毒后3天, 囊比正常肿大1~2倍^{[11][14]}。这可能是彼此的实验动物或毒株不同之故。作者曾用北京CJ801株对不同日龄小鸡人工发病后作病理学观察, 囊的病理学变化基本和本实验相似。

Helmboldt等报道囊受IBDV破坏后无再生作用^{[11][14]}。但是本实验在接毒后5天开始, 就见淋巴细胞再现, 以后逐渐增多, 接毒后17天便见滤泡样的淋巴细胞集丛; 到接毒后1个月, 在皱襞中可见许多正常的滤泡, 除一些滤泡中的淋巴细胞较稀疏外, 已恢复到近似正常法氏囊的结构。谷明等曾提及: 在野外已有不显性感染的鸡, 其BF确被侵犯, 但在抗体阳转后经过30~40天左右, 恢复到和抗体阴性群一样的淋巴组织原状^[3]。其再生作用的机理尚未明确, 作者认为可能是: (1) 由粘膜上皮来的未分化上皮细胞化生而成淋巴细胞^[2]; (2) 残存的淋巴细胞急速地分化、增殖; (3) 当BF机能被破坏时, 在神经体液的调节下, 由骨髓来的干细胞在骨髓或囊中被诱导转化而成B细胞, 重组新的滤泡。

上述学者所报道的囊无再生作用, 可能是他们接毒后观察时间不长, 或实验条件包括毒株、接毒日龄、感染程度等不同之故。

(五) 综上所述, 作者分离到的病毒对酸稳定、耐热, 对脂溶剂有绝对抵抗力, 电

镜下见到病毒在胞浆复制，呈晶格状排列，而在核内未见病毒的踪迹。电镜观察和理化特性与其他学者所描述的IBDV特性基本相同^{[1][8]}。从上述病理学和血清学方面的研究结果表明，作者所分离到的CG821株和CG822株是传染性囊病病毒。

参 考 文 献

- [1] 平井 克哉：鸡传染性法氏囊病——最近的研究情况和将来的展望，原载鸡病研究会报（日）：15卷增刊号1979：23—35。任大庚译，《北京农业科技》1980增刊1：56—76。
- [2] 谷口稔明：伝染性ファブリキウス囊病の病理变化。鸡病研究会报：14卷增刊号1979：9—18。
- [3] 周蛟、刘致福等：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。
- [4] 殷震：《动物病毒学基础》，吉林人民出版社。137—138，1980年。
- [5] 汤浅囊：鸡疾病の发病に及ぼす伝染性ファブリキウス囊病ウイルスの影響（实验例につつて），鸡病研究会报：14卷增刊号1978：47—57。
- [6] Л. А. РАДЧУК等著：《冈博罗病的诊断》，原载ВЕТЕРИНАРИЯ(1)：1980，68—69。汪光裕译，《畜禽传染病》1（2）1981：40—42
- [7] Beard, C. W. 1980. Serologic procedures. In , isolation and identification of avian pathogens. (S. B. Hitchner, Editor) Second Edition, 129—135.
- [8] Benton, W. J. , M. S. Cover, J. K. Rosenberger, and R. S. Lake. 1967. Physicochemical properties of the infectious bursal agent (IBA) . Avian Dis. 11 : 438—445.
- [9] Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK. 1981. Epidemiological note, Subclinical infectious bursal disease in the broiler industry, interim report. Vet. Rec. 108, 88—89.
- [10] Cheville, N. F. 1967. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of chickens. Amer. J. Path. 51:527—551.
- [11] Cosgrove, A. S. 1962. An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. Avian Dis. 6: 385—389.
- [12] Fadly, A. M. , R. W. Winterfield, and H. J. Olander. 1976. Role of the bursa of Fabricius in the pathogenicity of inclusion body hepatitis and infectious bursal disease viruses. Avian Dis. 20: 464—477.
- [13] Faragher, J. T. , W. H. Allen, and P. J. Wyeth. 1974. Immunosuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. Vet. Rec. 95, 385—388.
- [14] Helmboldt, C. F. ,E. Garner. 1964. Experimentally induced Gumboro disease (IBA) . Avian Dis. 8, 561—575.
- [15] Hirai, K. , S. Shimakura, C. N. Chang, Y. Tsushiv, and M. Hirotsu. 1973.

- Isolation of infectious bursal disease virus and distribution of precipitating antibodies in chickens sera, Jap. J. Vet. Sci. 35, 105—113.
- [16] Jayaramaiah, B. and B. B. Mallick. 1975. Serological survey of infectious bursal disease. Indian Vet. J. 52, 673—676.
- [17] Ley, D. H. , A. A. Bickford, and R. Yammamoto. 1979. An infectious bursal disease virus outbreak in 14-and 15-week-old chickens. Avian Dis. 23, 235—240.
- [18] Pattison, M. , W. H. Allan. 1974. Infection of chicks with infectious bursal disease and its effect on the carrier state with Newcastle disease virus. Vet. Rec. 95, 65—66.
- [19] Rosenberger, J. K. , J. Gelb. 1978. Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. Avian Dis. 22, 95—105.
- [20] Vindevogel, H. M. Gouffaux, G. Muelemans, P. Halen, P. Schyns. 1974. Gumboro disease. II Experimental inoculation, clinical and histological study. Vet. Bull. 1975. 45, 343.
- [21] Winterfield, R. W. , S. B. Hitchner. 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. Am. J. Vet. Res. 23, 1273—1279.
- [22] Wyeth, P. J. , 1975. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to S. typhimurium and E. coli infections. Vet. Rec. 96, 238—243.

A STUDY ON INFECTIOUS BURSAL DISEASE OF THE CHICKEN IN GUANGDONG AREA

Bi Yingzuo

ABSTRACT

This article is a report on the study of the serological survey of infectious bursal disease (IBD) of the chicken and the isolation procedure of two isolants of infectious bursal disease virus (IBDV). The identification of the two isolants was made possible by serological and pathological methods, by determination of their physicochemical properties and by electron microscopic observation.

Through serological survey of 17 chicken farms in 5 prefectures in Guangdong, precipitating antibodies against IBV were found on 13 of them. Hence, a conclusion can be drawn that IBD may be highly prevalent in this area. The author also analyzes the possibility that immuno-suppressive effect of IBD might have constituted the cause of quite a number of outbreaks of Newcastle disease that occurred recently.

Two isolants were successfully obtained on the basis of serological survey. In the course of virus identification, when susceptible chickens were inoculated with the two

isolants, typical pathological changes took place in the bursa, such as edema, longitudinal striations of the wall clearly seen through the outer surface, or yellow gelatinous covering. Atrophy was seen on the third post-inoculation day. Histopathological study showed necrosis and inflammation, such as depletion of lymphocytes, proliferation of reticular cells, etc. In a month after inoculation, the bursa was found to have obvious regeneration. Both isolants failed to produce distinct clinical signs and no gross lesions could be seen in other organs and tissues of experimental chickens.

When chicken embryos were inoculated with the isolants, the embryos died in 3—7 days. The lesions consisted of cutaneous congestion and hemorrhages, subcutaneous edema and greenish-yellow mottling appearance of necrotic areas in the liver.

Agar-gel precipitating test revealed clear precipitation lines formed by reaction between the virus (isolants) and the positive IBD serum obtained from U. S. A. Convalescent serum could neutralize the American IBD-Lukert strain. Their neutralizing indices were larger than 4. 2.

One isolant was titrated and its physico-chemical properties were identified. Electron microscopic observation was also made. The titers for 7-day-old and one-month-old chickens were $10^{-3.2}$ and $10^{-7.2}$ BL₅, respectively. Crystalline-arranged particles were found in the cytoplasm of lymphocytes in the bursa. The diameter of such particles was 45-53 nm. Smaller electro-dense virus particles were also found with diameter of 22—26 nm. The determinations of its physicochemical properties demonstrated that the virus isolant was pH stable, thermostable and absolute resistance to lipid solvents.

In accordance with the experimental results, the author can claim the two isolants to be strains of IBD virus and hence they are designated as IBDV-CG821 and IBDV-CG822.

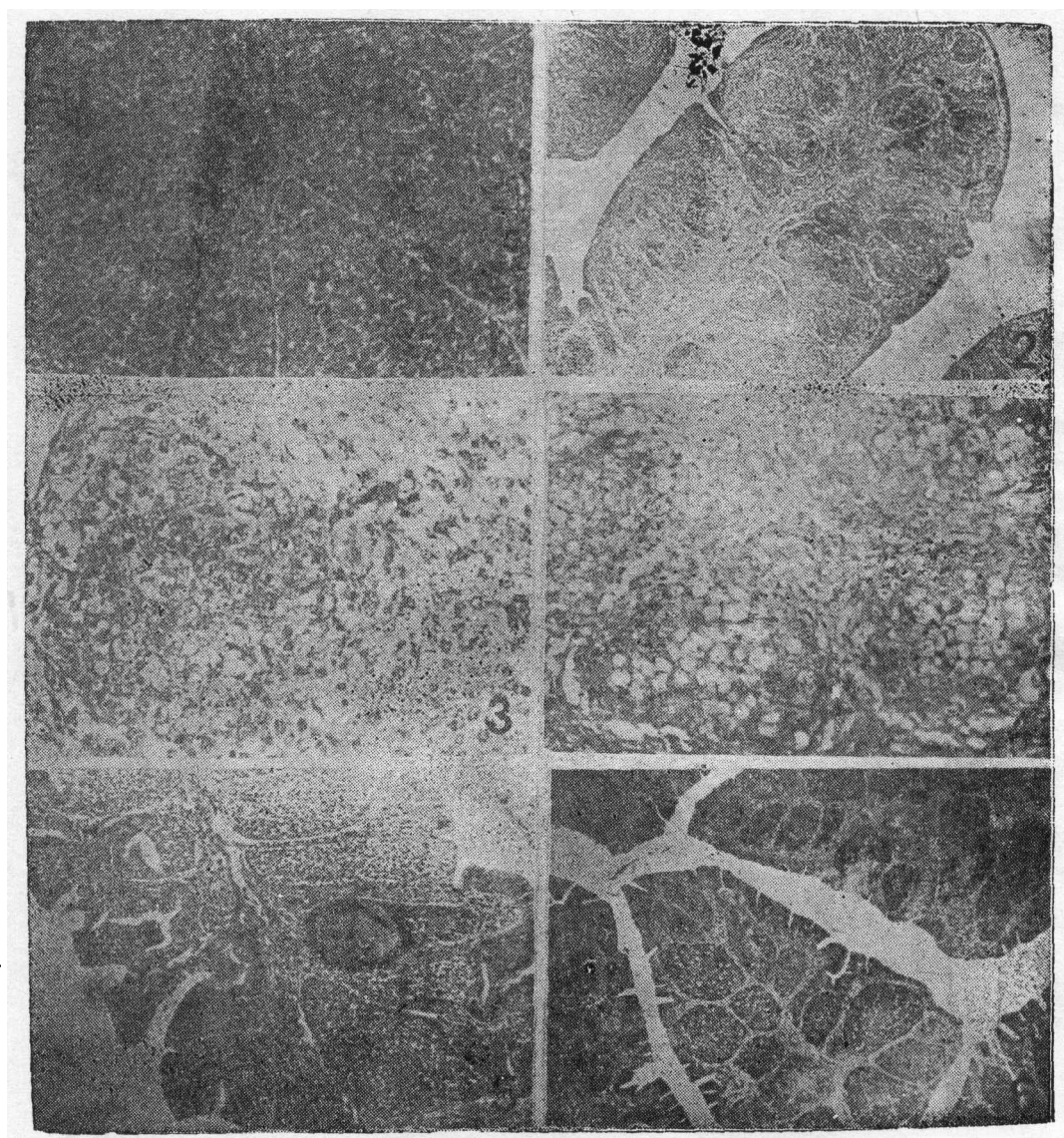


图1 正常法氏囊组织。H. E. $\times 80$

图2 接毒后3天, 滤泡数目减少和体积缩小。H. E. $\times 40$

图3 接毒后3天, 淋巴细胞几乎消失, 网状细胞大量增生和异嗜细胞浸润, H. E. $\times 400$

图4 接毒后6天, 滤泡间纤维组织增生。髓质部有许多小空泡。H. E. $\times 200$

图5 接毒后15天, 粘膜上皮弯入加强成陷窝或腺体样结构。H. E. $\times 80$

图6 接毒后30天。皱襞中充满再生的滤泡。H. E. $\times 40$

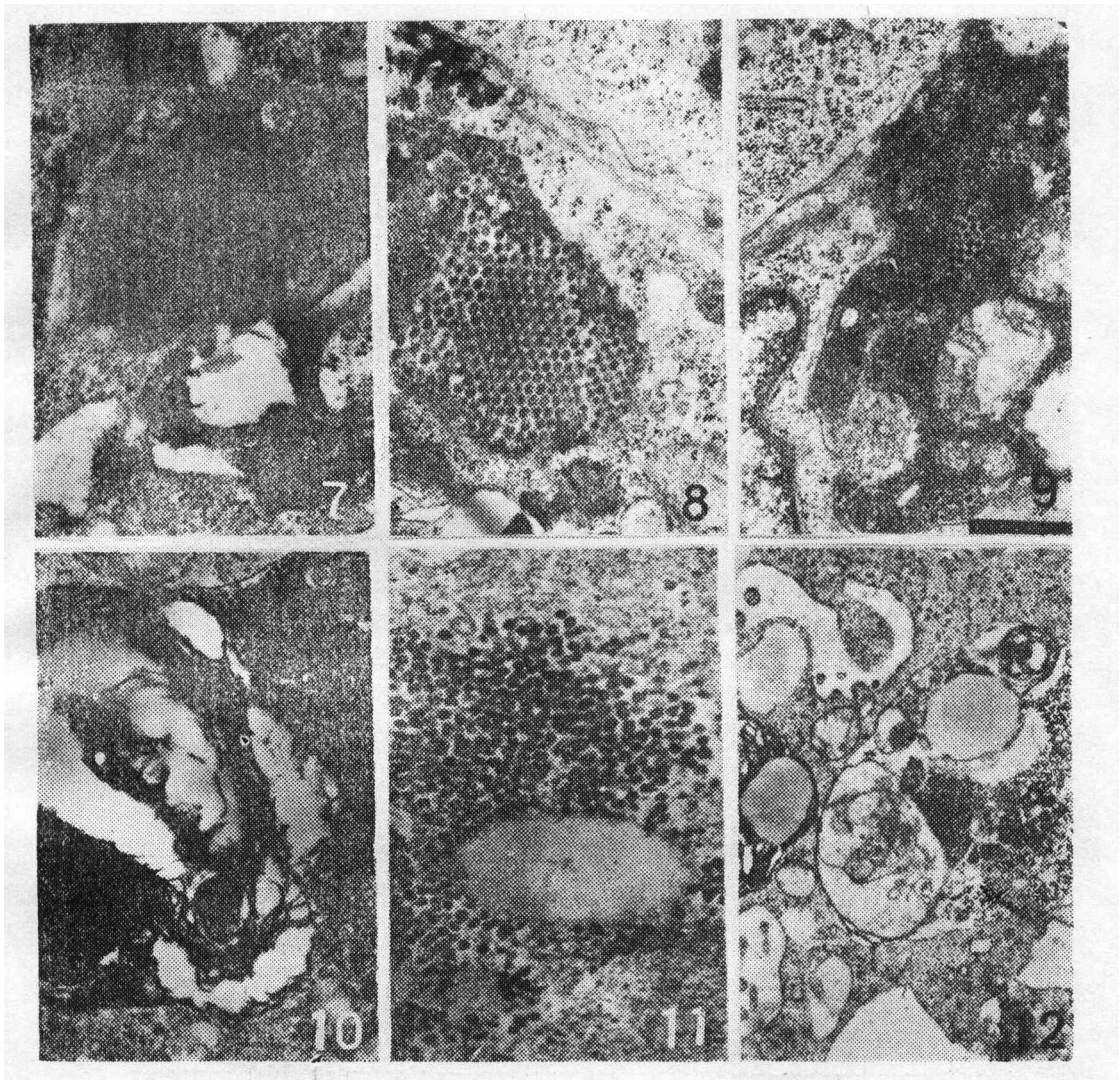


图7 在胞浆中细胞核旁的包涵体，内有大量的病毒颗粒。×39000

图8 呈晶格状排列的病毒颗粒。×30000

图9 在包涵体中见散在的病毒颗粒。×23000

图10 病毒集丛外有不完整的界膜。×18000

图11 直径为22~26毫微米的小颗粒集丛。×64500

图12 胞浆中的空泡，内有小颗粒集丛。×18000