

反向被动血凝检测鸡传染性 支气管炎病毒的研究*

赵新柳**

(兽医系)

提 要

本文首次报道一种快速检测鸡传染性支气管炎病毒(IBV)的反向被动血凝法(RPHA), 并对其特异性、敏感性和实用性进行了探讨。还用该RPHA法比较了不同纯度抗原制备的抗体的免疫学特性和应用价值。最后, 对单克隆抗体(McAb)用于RPHA的可能性也进行了一些试验。

结果表明: 1.用RPHA法检测IBV有快速、敏感、简便而准确的优点; 2.病毒抗原经一次超速离心处理, 即可达到RPHA的要求; 3.抗体谱较窄或效价较低的McAb, 可能不适用于IBV的RPHA方法。

关键词 反向被动血凝; 抗原纯度; 鸡传染性支气管炎病毒

引 言

自Schalk等(1931)报道鸡传染性支气管炎(IB)以来, 世界各地对IB的诊断做了许多研究, 其中包括根据临床症状、病变、人工发病、病毒分离和其对鸡胚的致病性作出诊断^[10]以及中和试验^[9]、琼脂扩散^[11]、补体结合试验^[10]、正向被动血凝法^[8]、空斑减数法^[12]、荧光抗体^[7]、血凝抑制试验^[6]、鸡胚干扰法^[16]和酶联免疫吸附试验^[13]等。但从目前情况来看, 仍然缺乏一种适于实际应用的定型方法。

反向被动血凝法(RPHA)具有快速、敏感、特异性高和简单易行的优点^[1], Saneckata, T.等(1979)^[17]用RPHA法检测幼畜粪便中的轮状病毒, 结果比电镜检测简易、灵敏、快速。Sato, k.等(1984)^[18]用RPHA法检测牛粪中的牛冠状病毒, 结果比细胞培养、免疫荧光及免疫电镜更简便、敏感和快速。从所查国内外文献来看, 尚未有用RPHA法直接检测IBV的报道。本研究的主要目的是探讨RPHA法快速检测IBV的可能性。

* 本研究是在导师欧宇杆教授的指导下完成的。还得到刘福安教授、黄引贤教授、林维庆副教授、毕英佐同志, 许如芬、林永青、戚丹英等同学及本系微生物学教研室各位同志的热情帮助, 于此一并致以衷心的感谢!

** 本校1984~1987硕士研究生, 现在深圳动植物检疫所工作。 1988年3月12日收稿

另外, 目前在病毒抗原的提纯方面存在不同看法, 因此, 如何视具体情况而选用既经济实用而又能满足试验要求的提纯方法, 是有实际意义的。本研究的另一个方面是比较不同纯度抗原制备的抗体的免疫学特性及应用价值。

再者, 近年来单克隆抗体(McAb)已在生物学和医学领域中日益广泛地应用^[15]²⁰。本研究也同时探讨了抗IBV的McAb用于RPHA的可能性。

材料和方法

(一) 毒株或菌株

1. IBV—M₄₁, 是中监所提供的强毒株, 其半数鸡胚感染价(EID₅₀)为 $10^{-5}/0.1\text{ml}$;
2. IBV-农科院, 为广东省农科院兽医所提供的地方株, 其EID₅₀为 $10^{-5.5}/0.1\text{ml}$;
3. IBV疫苗, 来源同2; 4. IBV-分离株, 为作者试验期间从广州某鸡场分离的野毒, 其EID₅₀为 $10^{-5.1}/0.2\text{ml}$; 5. NDV强毒, 由本校许如苏同志提供; 其EID₅₀为 $10^{-7.5}/0.1\text{ml}$; 6. ILTV疫苗, 为美国威兰公司制造的擦肛强毒疫苗, 气管内接种对鸡的半数感染量为 $10^{-3.5}/0.1\text{ml}$; 7. NDV-B₁株, 由禽病室提供, 其EID₅₀为 $10^{-8.15}/0.1\text{ml}$, HA效价为1:320~640; 8. IBDV与MDV皆由本校戚丹英同志提供, 均为鸡胚肾细胞培养物; 9. 鸡败血霉形体, 由本校林维庆副教授提供, 一个为中监所菌株, 一个为美国菌株, 均对敏感的鸡有致病力。

(二) 人工感染用的鸡

1. A种: 为1周龄健康沃加鸡, 无任何临床症状, 并经RPHA法抽检数只鸡的肺和气管组织混合液, 为阴性反应; 2. B种: 非免疫来航鸡胚孵化的20日龄小鸡, 无任何临床症状, 并证明其血清无IBV的抗体(双扩散及RPHA抑制价均小于1:2), 其肺和气管组织的RPHA效价小于1:2。

(三) 抗IBV单克隆抗体C₁₂₄

由英国Houghton家禽所的Mockett博士赠送, 用前提纯并测其蛋白含量。

(四) 抗原纯化与鉴定^{[2][14][18]}

1. 提纯: 将IBV—M₄₁接种鸡胚48小时后收获的尿囊液进行如下处理: (1) 经6800 r.p.m. 离心30分钟, 上清液再经37000 r.p.m. 离心2小时, 去掉上清, 沉淀用PH7.2 PBS 悬浮即得到Ag-I样品; (2) Ag-I再经37000 r.p.m. 离心一次, 得到Ag-II; (3) Ag-II再经20~50%蔗糖梯度离心一次, 得到Ag-III; 上述样品均放-30℃备用, 免疫家兔时, 均稀释成原样品的1/20体积。

2. 纯度及感染性鉴定: (1) 纯度鉴定: 采用负染及电镜观察; (2) 感染性鉴定: 包括鸡胚致病观察与鸡胚干扰试验^[18]。

(五) 高免血清制备及效价测定

参照文献介绍方法分别制备Ag—I、Ag—II及Ag—III的抗血清^[2, 18]；效价测定包括双扩散效价^[11]、中和效价^[9]及RPHA抑制价^[18]的测定。

(六) 抗体提纯及含量测定

抗血清先经硫酸铵粗提，再经葡聚糖G—200过柱二次。含量测定参照Bradford氏方法^[4]。

(七) 血球固定、醛化、致敏及RPHA测定

按常规方法配制双醛化血球，用IgG—I、IgG—II、IgG—III及IgG—IV致敏的血球分别称RBC—I、RBC—II、RBC—III及RBC—IV。RPHA测定参照有关文献^[11, 18]。

(八) 人工感染鸡的检测

共5批，采用气管注射，0.2ml/只，对照用正常胚液接种，试验组用IBV强毒株。具体见表1（病料均取肺和气管）。

(九) 鉴别诊断试验

用B种鸡，分5组；(1)IBV组；(2)NDV组；(3)CRD组；(4)ILTV组；(5)对照组；分别用不同毒株、菌株或正常鸡胚液接种，方法同(八)。

(十) 不同检测方法对比试验

用B种鸡，试验组14只，对照4只，攻毒方法同(八)；将RPHA法分别与鸡胚干扰试验、鸡胚致病性试验及鸡胚中和试验进行比较。

(十一) 天然病鸡检测

共5批，方法同(11)。

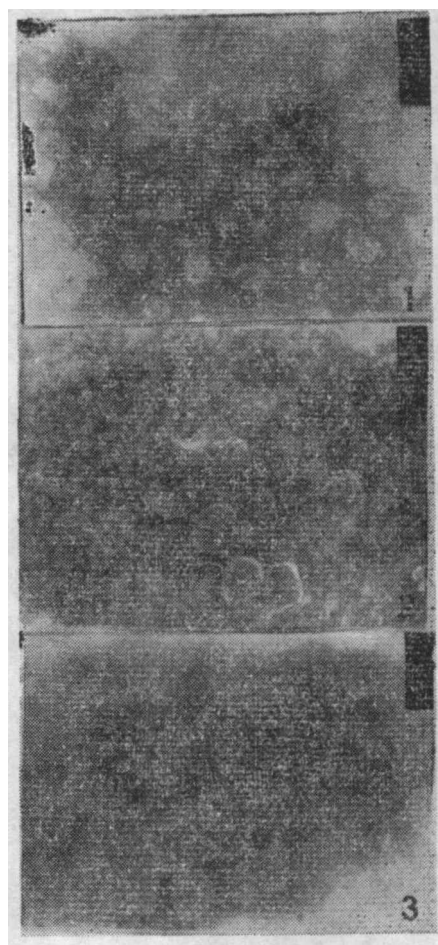
(十二) 不同纯度抗原制备的抗体免疫学特性及应用价值的比较

采用琼扩、中和试验及RPHA抑制试验同时比较不同抗原制备的抗体的效价；另外，以RBC—I、RBC—II、RBC—III及RBC—IV同时检测不同材料中的IBV；并同时针对不同毒株或菌株进行比较检测；由于RBC—IV为用McAb提纯的IgG—IV致敏，所以该项目也探讨了McAb用于RPHA的可能性。

试验结果

(一) 抗原纯化及鉴定结果

1. 纯度：以Ag—III的电镜图最清楚，隐约可见囊膜粒分布在病毒体外围；Ag—I



图版 1 Ag—I 电镜像 (80000×)
2 Ag—II 电镜像 (110000×)
3 Ag—III 电镜像 (110000×)

的图象不如Ag—Ⅲ那样清晰，但病毒粒子较完整，而Ag—Ⅲ中的病毒粒子有损伤，Ag—I的纯度明显低于前二者；详见图版1、2、3。

2. 感染性比较：第一代只有Ag—I能引起50%鸡胚产生病变，第一代各种抗原均不能在鸡胚内干扰NDV—B₁，明显比IBV—M₁₁原液的感染性为低；随着代次增加，对鸡胚的致病力逐渐恢复到IBV—M₁₁的水平；第二代时Ag—I及Ag—Ⅱ已达到鸡胚干扰试验阳性标准，这表明鸡胚致病性试验与干扰试验的结果相平行。

表1 人工感染鸡的检测方式

批次	数量	检测方式		
		病料直接检测	接种鸡胚后再检测	病料经PEG浓缩后
1	试验组12只，对照组8只	攻毒后2、4、6及8天分别取试验组8只，对照组2只剖杀后取病料做成乳剂，用20%双醛化血球处理后进行RPHA检测（用RBC—I）	取病料接种9日龄鸡胚，每只鸡接8个胚，于接种后24、48小时，分别测4个胚的尿囊液的效价。	未做
2	同上	同上	同上，只是将4个胚液混合后再测定其混合液的效价，以方便操作。	未做
3	对照组2只，试验组10只	攻毒后2天全部剖杀，同上方式取病料分别用RBC—I、RBC—Ⅱ、RBC—Ⅲ及RBC—Ⅳ比较检测。	同上，只是分别用RBC—I、RBC—Ⅱ、RBC—Ⅲ及RBC—Ⅳ四种致敏血球检测。	未做
4	试验组18只，对照组6只	攻毒后2及4天分别取试验组8只，对照组2只，进行检测，方法同第1批。余下者至14天，采面测其双扩散效价及RPHA抑制价。	同上第2批	未做
5	同上	同第4批	未做	将每个鸡病料经30%PEG浓缩后进行RPHA检测。

说明：所用试验鸡1~3批均为1周龄健康沃加鸡；4~5批均为用非免疫未航鸡蛋孵化出壳，隔离养至20日龄。上述鸡只用前均经过检查（见材料方法（三）之相应部分），合格者才用于试验。

（二）不同纯度抗原制备的抗体效价比较

详见表2。

表2 不同纯度抗原制备的抗体效价比较

材 料	效 价	琼 扩 效 价	中和抗体效价	RPHA抑制价
正常兔血清		<1:2	无中和作用	<1:2
Ab—I		1:32	-2.925 (1:841.4)	1:1024
Ab—Ⅱ		1:8	-2.625 (1:421.7)	1:128
Ab—Ⅲ		1:4	-2.475 (1:298.5)	1:64

(三) 不同纯度抗原制备的免疫球蛋白致敏效果比较 (包括McAb提纯的免疫球蛋白)

1. 培养物检测比较: 见表3。2. 感染鸡检测比较: (1) 病料直接检测: 只有RBC—I从10只鸡中检出6只(60%), 其余3种敏化血球均检不出。(2) 病料接种鸡胚后检测结果: 在24小时检测时, 只有RBC—I检出55%阳性; RBC—II与RBC—III表现为非特异反应; RBC—IV无反应。在48小时检测时, RBC—I检出80%; RBC—II检出20%; RBC—III仍为非特异反应, RBC—IV无反应。

表3 四种敏化血球对各种培养物的检测结果比较

效价 血球	IBV- 尿囊液	IBV- CEK	IBV 疫苗	正常 AF	正常 CEK	IBDV- CEK	MDHV- CEK	NDV- CEK	MG 培养物	巴氏 杆菌苗	稀释 液
RBC—I	2 ¹⁵	2 ⁴	2 ¹²	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
RBC—II	2 ⁰	<1:2	2 ⁷	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
RBC—III	2 ⁷	<1:2	2 ⁵	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2
RBC—IV	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2	<1:2

(四) 人工发病鸡检测结果

详见表4。

表4 用RPHA法检测人工感染IB病鸡的结果

批 次	病料直接检测				病料经 PEG*浓缩后		24小时AF**检测				48小时AF检测			
	*** 2PI	4PI	6PI	8PI	2PI	4PI	2PI	4PI	6PI	8PI	2PI	4PI	6PI	8PI
第一批	66%	66%	33%	0%	—	—	80%	66%	66%	58%	100%	100%	100%	100%
第二批	66%	66%	33%	0%	—	—	100%	100%	33%	0%	100%	100%	100%	66%
第三批	60%	—	—	—	—	—	55%	—	—	—	80%	—	—	—
第四批	62%	62%	—	—	—	—	87%	75%	—	—	100%	100%	—	—
第五批	62%	50%	—	—	100%	100%	—	—	—	—	—	—	—	—

*PEG代表聚乙二醇; **AF代表鸡胚尿囊液; ***PI代表感染后, 2PI为感染后2天

(五) 鉴别诊断结果

1. 培养物检测比较: 见表3。2. 人工发病鸡检测: 不论直接检测, 还是AF效价检测, 都只有IBV组有不同程度的检出率(病料直接检测的检出率为66%; 24小时胚液检出率为83%; 48小时的胚液检出率为100%); 其他各组都为阴性反应。

(六) 不同检测方法的结果比较

详见表 5。

表 5 不同检测方法检测同一批人工IB病鸡的结果

方 法	结 果	检 出 率	所 需 时 间	备 注
RPHA法		100%(8/8)	3 天	为胚液检出率
鸡 胚 干 扰 试 验	第一代	0%(0/8)	3~4天	
	第二代	87%(7/8)	5~6天	
鸡胚致 病性试 验	第一代	0/8	7 天	
	第二代	3/8	9 天	
	第三代	8/8	11天	
	第四代	8/8	13天	
鸡胚中 和试验	第一次检	66%(2/3)	17天	该时间包括感 染时间在內
	第二次检	100%(3/3)	23天	

(七) 天然病例检测结果

详见表 6。

表 6 天然IB病鸡检测结果

批 次	直接检病料	病料经 PEG处理后	44小时AF 检测	鸡胚盲目传 代	干扰试验	人工发病	RPHA法检 测CEK液
I 批	50%(2/4)	—	100%	100%	100%	100%	100%
II 批	62%(5/8)	—	100%	100%	—	—	—
III 批	0%(0/5)	—	0 %	—	—	0 %	0 %
IV 批	55%(5/9)	—	100%	—	—	—	—
V 批	60%(3/5)	100%(5/5)	100%	100%	—	—	—

讨 论

(一) IBV的RPHA检测法

1. 特异性：致敏血球只与鸡胚液、鸡肾细胞培养物及病料中的IBV反应，且这 种

反应可被相应的抗IBV血清抑制;另外,致敏血球对多种其他禽类病毒及菌株(见结果部分)均不发生反应,这都表明该方法的特异性是达到实用标准的。

2. 非特异性反应的消除:本RPHA法采取事先将被检胚液稀释100倍,或从血凝板上第8孔才开始加入RBC—I的方法,有效地消除了非特异性反应。应当指出,被检样品究竟应稀释多少倍,取决于所制备的致敏血球的特异性效价与非特异性效价的差数,而不能一概而论。

3. 敏感度与实用性:从人工感染IB病鸡的检测、鉴别诊断、不同检测方法对比检测和天然病例的检测结果等方面看,初步表明该RPHA法对于检测IBV是比较敏感而实用的,特别是在检出时间上,RPHA法在3天内即可100%的检出,明显快于其它方法。

4. 有待提高及改进的方面:该RPHA法还不能达到完全的直接检出病料中IBV的程度,虽经PEG浓缩后可以100%的检出,但这样就增加了检测时间和使操作复杂化。

上述分析表明,尽管IBV的RPHA法有某些不足之处,但它仍然具有快速、敏感、准确、简便而实用的优点,可以作为IBV的一种检测方法,并在使用中不断加以完善。

(二) 不同纯度抗原制备的抗体免疫学特性及应用价值

本研究的结果显示,Ag—Ⅲ的纯度高于Ag—Ⅱ及Ag—I。RPHA反应也证明RBC—Ⅲ对正常胚液的非特异性效价低于RBC—Ⅱ及RBC—I。这都说明不同纯度抗原制备的抗体,其特异性是有差异的。

高纯度(并同时高效价)的抗原一般不易得到,或者成本太高而不经济实用。本研究的结果表明,只有Ab—I能满足RPHA的要求。可见对于RPHA而言,病毒抗原的提纯,采用一次超速离心处理就可达到要求。

(三) 单克隆抗体(McAb)在RPHA中的应用

近年来,McAb已开始应用于快速诊断,成为分子水平上鉴定病毒的有力工具^{[14][15][20]}。本研究采用抗IBV膜蛋白的McAb进行RPHA反应,结果全部阴性。这与某些学者的报道有出入^[3]。作者曾就此问题请教赠送此McAb的Mockett博士,他认为可能是因为McAb的抗体谱太窄而不能在抗原之间形成交联桥(Crossing-Linking Bridges),或者虽然能形成交联桥,但由于McAb只与单个的抗原决定簇发生反应,因而不足以产生肉眼可见反应。作者的导师则认为可能与该McAb的效价太低有关,而后者正是RPHA反应中需形成抗原抗体大分子交联反应的条件之一。

应当指出,目前对McAb在许多免疫学诊断方法中应用所遇到的一些问题尚难做出令人满意的解释,尚须进一步试验才有可能找出其规律。初步认为,抗体谱太窄或效价太低的McAb可能不适用于IBV的RPHA检测法。

引用文献

- [1] 上海市第六人民医院检验组. 微生物学报, 1977, 17(3):247—252
- [2] 王世中. 免疫化学技术, 科学出版社, 1980:158—163
- [3] 陈伯权等. 病毒学报, 1986, 2(4):387—388
- [4] 李琳, 焦新之. 植物生理学通讯, 1980, 6:52—55
- [5] 徐为燕等. 畜牧兽医学报, 1981, 12(1):23—25
- [6] Alexander, D. J. et al., Avian Pathol., 1976, 5:125—134
- [7] Braune, M. D. et al., Avian Dis., 1965, 9:535—545
- [8] Brown, W. F. et al., Avian Dis., 1962, 6(1):99—106
- [9] Fontaine, M. P. et al., Avian Dis., 1963, 7(2):203—206
- [10] Hofstad, M. S. et al., Avian Dis., 1966, 10:230—239
- [11] Lohr, J. E., Avian Dis., 1980, 24(2):463—467
- [12] Lukert, P. P., Avian Dis., 1966, 10:305—310
- [13] Marquardt, W. W. et al., Avian Dis., 1982, 25:713—722
- [14] Mockett, A. P. A. et al., J. gen. Virol., 1984, 65:2281—2286
- [15] Nishikawa, K. et al., Virology, 1983, 130(2):318—330
- [16] Raggi, L. G., Avian Dis., 1975, 19(2):334—342
- [17] Sanekata, T. et al., J. Clin. Pathol., 1979, 32:963—968
- [18] Sato, K. et al., Archives of Virol., 1984, 80:23—31
- [19] Steel, F. M. et al., Am. J. Vet. Res., 1964, 25:1249—1255
- [20] Travis, C. M. et al., Am. J. Vet. Res., 1983, 44:1284—1288

STUDY ON THE DETECTION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS
BY REVERSE PASSIVE HEMAGGLUTINATION TEST

Zhao Xinliu

(Dept. of Veterinary Med.)

ABSTRACT

A reverse passive hemagglutination (RPHA) test for the detection of infectious bronchitis virus (IBV) is described for the first time in this paper. The specificity, sensitivity and potential for practical application of the RPHA was studied, and the immunological characteristics and usefulness of the antibodies produced by antigens of different purity were also compared. Finally, some work was done to investigate the possibility of using monoclonal antibody (McAb) in the RPHA test.

Results showed that the RPHA test was a rapid, sensitive, simple and accurate method for detecting IBV, and that the antigen centrifuged once by ultra-centrifugation could meet the requirements of the RPHA test, whereas the McAb with too narrow an antibody spectrum or with too low a titer might be unsuitable for this test.

Key words, RPHA; Antigen purity; IBV