

5株传染性支气管炎病毒分离株的鉴定和血清分型

陈峰¹, 吴孔兴², 张齐², 冯寿华², 张秀丽², 廖秋生², 曹永长¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 广东温氏食品集团有限公司, 广东 新兴 527439)

摘要:从四川、重庆和广东3个不同地区,不同时间发病的肉鸡中分离出5株病毒. 通过鸡胚发育试验、NDV干扰试验、动物回归试验和感染后鸡血清中抗体水平变化确定这5株病毒均为传染性支气管炎病毒. 血清中和试验表明,这5株病毒血清型与北京分离的A2株一致,而与H52、H120、M41、T和Holte株不同. 该研究结果证实了鸡传染性支气管炎病毒类4/91毒株在我国华南和西南地区的流行.

关键词:传染性支气管炎病毒; 鉴定; 血清型

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2005)04-0092-04

Identification and serotyping of five infectious bronchitis virus isolates

CHEN Feng¹, WU Kong-xing², ZHANG Qi², FENG Shou-hua²,
ZHANG Xiu-li², LIAO Qiu-sheng², CAO Yong-chang¹

(1 College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Wen's Foodstuff Group, Xinxing 527439, China)

Abstract: Five field strains of infectious bronchitis virus (IBV) were isolated from the affected broilers in Chongqing City, Sichuan and Guangdong Provinces by inoculation into allantoic cavity of 10-day SPF embryos. Biological characteristics of the isolates were studied by virus pathogenicity to SPF chicken embryos and chickens, hemagglutination activity of virus to chicken red blood cells, interference with NDV and detection of antibody titer of post-infected chickens. The results revealed that all of the five strains were IBV. Moreover, the data of viral-neutralization indicated that the serotypes of the five strains were similar to IBV strain A2, but different from classic IBV strains H52, H120, M41, T and Holte. The results provided foundation for prevention of infectious bronchitis in these areas.

Key words: infectious bronchitis virus (IBV); identification; serotype

传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)属于冠状病毒科(Coronaviridae)冠状病毒属,可引起鸡传染性支气管炎(infectious bronchitis, IB). IB是鸡的一种急性、高度接触性传染病,可引起鸡呼吸道、输卵管、肾脏、肠道及腺胃等多组织器官的病变^[1~3]. IB给全球养鸡业造成了巨大经济损失,成为危害世界大多数国家养鸡业的重要传染性疾病之一. 目前,全世界有20多个血清型的IBV,不同血清型之间交叉保护效果差,变异株的不断出现和流行,是造成鸡群免疫失败的原因^[4~6]. 因为从免疫鸡群

中不断分离到新的血清型IBV,使得IB对养鸡业造成的威胁持续存在,明确流行毒株的生物学特性和流行特点是正确使用疫苗的前提. 如果疫苗株与流行毒株血清型不同,或在新的IBV变异毒株出现时,往往导致免疫失败. 因此当新的变异株出现时,能够快速分离、鉴定,这在理论上和实践上都具有十分重要的意义. 近2年来,每年的11月份至次年的5月份,在四川、重庆和广东的部分鸡场发生了一种发病急、传播快的传染病,各种日龄都会发生,早的发生于8、9日龄,迟的发生于80日龄左右. 公鸡的发病

收稿日期:2004-12-16

作者简介:陈峰(1972-),男,硕士,助理研究员. 通讯作者:曹永长(1965-),男,博士,

教授; E-mail: yccao@scau.edu.cn

基金项目:“十五”国家重点攻关计划(2001BA508B21);广东省科技攻关计划重大项目(2004A20106001)

率高于母鸡。死亡率在5%~30%之间,多为10%~20%,用药物治疗的效果差。临床症状主要表现为:病鸡精神沉郁,鸡爪干枯;畏冷;喘息,气管啰音;有的轻微腹泻,多数拉白色水样稀粪。剖检发现大部分鸡机体脱水严重,肌肉发绀;气管,支气管粘膜充血或出血;鼻腔、喉头、气管内有少量淡黄色粘稠液体;肾肿大苍白,呈典型的花斑肾;输尿管变粗,内有大量的尿酸盐沉积。经过病原分离、鉴定和血清学分型等确定,该疾病主要是由一种变异型的传染性支气管炎病毒引起的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 SPF鸡胚 购自北京梅里亚SPF实验动物中心和山东家禽研究所无特定病原种鸡场。

1.1.2 试验用鸡 为非免疫1日龄黄鸡,购自温氏集团某孵化场。

1.1.3 病料 CQ03,于2003年采于重庆某鸡场;CQ04,于2004年采于重庆某鸡场;SC03,2003年采集于四川德阳;SC04,2004年采集于四川德阳;GD株,2004年在广东河源采取。

1.1.4 NDV IV系活疫苗 购自广东省生物药厂,批号为030357。

1.1.5 标准毒株和抗血清 Connecticut株、Gray株、Holte株、Aust-T株、M41株、H120、A2株及相应标准抗血清均由中国农业大学实验动物研究所病毒室保存。

特异性抗血清在中国农业大学实验动物研究所制备。将分离株的鸡胚液分别通过滴鼻或点眼途径接种SPF鸡,每只0.5 mL,每隔10 d滴鼻或点眼1次,共进行3次;第4次滴鼻或点眼0.5 mL,并腿肌注射0.5 mL加强免疫,10 d后用ELISA试剂盒逐只检测IB血清抗体,取最高抗体滴度的血清用作血清中和试验。

1.1.6 传染性支气管炎抗体ELISA检测试剂盒 购自IDEXX公司。

1.2 方法

1.2.1 病原的分离及处理 对有典型病变的鸡,取肺、肾、输卵管和盲肠扁桃体于无菌试管或样品袋中-20℃保存;病料处于半冻状态剪碎,用5倍体积生理盐水稀释,匀浆,冻融3次,12 000 r/min,4℃,离心5 min,无菌过滤,取滤液备用。

1.2.2 鸡胚接种 取滤液尿囊腔接种10 d SPF鸡胚8枚,0.2 mL/枚,37℃孵化;同时取4枚做对照;弃去24 h内死胚,36~48 h试验组抽检3枚,对照组抽检2枚。剩余5枚继续孵化至16日龄观察与记录

死亡及侏儒胚数量。无菌收集36~48 h的尿囊液,经4℃低速离心10 min取上清液,测HA,当试验与对照组均为阴性时,继续传代,每代8枚。盲传4代,收集尿囊液,12 000 r/min离心5 min后备用。

1.2.3 对NDV增殖的干扰试验 取16枚10日龄SPF鸡胚,分为2组,每组8枚。第1组尿囊腔接种第4代上清液0.2 mL/胚,37℃孵化10 h后接种ND IV系活疫苗;第2组与第1组同时接种ND IV系活疫苗,0.2 mL/胚,继续孵化36 h,取鸡胚尿囊液测HA。

1.2.4 动物回归试验 取易感鸡分成5组,各组均为120只。分别用第4代胚液于15日龄点眼或滴鼻攻毒,每只鸡0.3 mL。

1.2.5 血清中和试验 取传代稳定后的鸡胚尿囊液进行血清中和试验。取各株病毒和血清两两交叉,等量混合,并将各毒株与IBV阴性血清等量混合,于4℃过夜后接种SPF鸡胚,每胚0.2 mL,每组3枚。置37℃恒温箱培养144 h,弃去24 h内死去的鸡胚。

1.2.6 人工感染病鸡血清抗体的检测 将未免疫黄鸡分成6组,每组150只。将5个分离株第4代鸡胚尿囊液原液分别经口感染15日龄的未免疫黄鸡,每只鸡0.2 mL,对照组不感染。分别在15、25、30、35、40、50、60、70日龄翅下采血,每组每次采血16份,常规分离血清,-20℃保存。用ELISA测定血清IB抗体。

2 结果

2.1 鸡胚发育试验

在鸡胚中经过4次传代,鸡胚出现稳定的病变。在接种后144 h收胚时发现,各接毒组的胚体发育明显受阻,明显小于正常鸡胚,有的出现卷曲胚,两脚抱头,羽毛发育不良,鸡胚液增多,死亡鸡胚的皮肤常有出血,充血现象,死亡时间大多在60~144 h之间。

2.2 NDV干扰试验

根据感染试验的判定标准,试验组鸡胚液有50%以上HA滴度在1:20以下,而对照组90%以上鸡胚液HA滴度在1:40以上判定为IBV感染。本次试验中,对于5个分离株所做的干扰试验结果表明,所有试验组(IV+IBV)的HA均小于1:20,而对照组的HA均大于1:40,说明5个分离株均能干扰NDV的增殖。

2.3 动物回归试验

攻毒后各组的死亡情况如表1。剖检发现各组死亡的鸡均出现肾脏肿大,花斑肾和气管环状出血,直肠增厚,随死亡时间的后移,花斑肾越来越明显。各

表1 攻毒后各组的死亡情况
Tab.1 Mortality of chickens after infection with IBV isolates

组别 group	总数 total no.	死亡数 death no.	死亡率 mortality/%
SC01	120	14	11.7
CQ01	120	28	23.3
GD	120	39	32.5
SC02	120	37	30.8
CQ02	120	35	29.2

组鸡都有少数鸡只喉头、气管有黄色粘液。后期死亡的鸡出现肌肉发绀,腿肌和胸肌出血。不同毒株发病

严重程度不同,死亡率在 11.7% ~ 32.5% 之间。无菌取死亡鸡的肾、肝、气管、支气管和心等,用营养琼脂、麦康凯培养基培养,未发现有细菌生长。将回收的病料按上述方法处理后接种 10 日龄鸡胚,每份病料接种 5 枚,16 日龄时均出现侏儒胚。

2.4 血清中和试验

鸡胚接种各毒株与血清中和的试验结果见表 2。由表 2 可知,除 GD 株与 Connecticut 株,CQ03 与 M41 和 H120 有部分交叉外,各分离株与其他标准株间血清型不同,而与 A2 株的血清型一致;各分离株间,除 CQ03 与 SC03、GD 株间是部分交叉外,其他各株间的血清型一致。

表2 IBV 分离株与 IBV 常用毒株的血清中和试验¹⁾
Tab. 2 Cross antiserum neutralization tests of 5 isolates and 7 IBV strains

毒株 strain	血清 antiserum												
	C	G	H	T	M41	H120	A2	CQ03	CQ04	SC03	SC04	GD	阴性血清
C	3/3	-						0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
G		3/3											0/3
H			3/3										0/3
T				3/3									0/3
M41					3/3			2/3					0/3
H120						3/3		2/3					0/3
A2							3/3						0/3
CQ03	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	0/3
CQ04	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
SC03	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
SC04	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3
GD	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3

1) C 表示 Connecticut 株;G 表示 Gray 株;H 表示 Holt 株;T 表示澳大利亚 T 株;其中分子表示被保护的鸡胚数,分母表示接种的鸡胚数

2.5 人工感染鸡血清抗体水平的变化

人工感染不同日龄鸡血清抗体水平变化如表 3。由表 3 可知,各攻毒组在攻毒后 10 d IB 抗体水平有所升高,攻毒 20 d 后抗体水平均高于 1 500,这明显高于在 10 日龄和 20 日龄 2 次免疫 IB 活苗的抗体水

平(数据未给出),并且维持在一个较高的水平(2 000 以上),而正常免疫一般是难以达到这样的抗体水平的。在感染初期,抗体离散度较大,而在感染后期,抗体离散度较小。不同毒株的抗体变化有一定差异。

表3 不同毒株感染的不同日龄血清抗体水平¹⁾
Tab. 3 Changes of antibody level against IBV post-infection with different IBV isolates

组别 group	日龄 day age of chickens/d							
	15	25	30	35	40	50	60	70
SC01	374 ± 87.7	109 ± 25.6	816 ± 196.8	1 716 ± 221.1	1 922 ± 357.8	2 152 ± 320.4	2 305 ± 423.4	2 855 ± 404.1
CQ01	334 ± 94.4	367 ± 97.9	1 268 ± 421.1	1 907 ± 326.8	2 106 ± 421.4	2 149 ± 414.4	2 473 ± 503.0	2 287 ± 334.1
GD	215 ± 32.4	301 ± 64.3	1 214 ± 216.8	1 634 ± 407.5	1 386 ± 261.7	2 049 ± 368.8	2 513 ± 399.1	3 074 ± 556.2
SC02	352 ± 72.7	467 ± 87.7	1 250 ± 279.0	2 084 ± 459.1	907 ± 167.7	2 555 ± 690.9	3 303 ± 519.0	2 098 ± 262.9
CQ02	534 ± 72.0	993 ± 216.9	1 735 ± 342.7	2 210 ± 462.9	1 258 ± 233.7	2 215 ± 561.7	1 848 ± 407.0	5 242 ± 550.6
对照 control	761 ± 138.0	179 ± 57.8	26 ± 4.9	-	-	-	-	-

1) 对照组为未攻毒未免疫组,35 日龄后所测出的抗体均为阴性

3 讨论

鸡传染性支气管炎(IB)是由传染性支气管炎病毒(IBV)引起的一种急性、高度接触性呼吸道病。根据其临床表现的侧重点不同,可将本病分为呼吸器官病变型、生殖器官病变型、消化器官病变型和肾病型等多种类型。通常以呼吸器官病变型为多见,或者以其为基本经过伴发其他病型。进入20世纪80年代以来,国内外肾病型日趋多见,分离到嗜肾型病毒株的报道也屡见不鲜^[7-11]。由于干扰试验、侏儒胚试验以及感染后鸡血清中IB抗体升高等情况说明,此次从不同地方和时间所分离的5株病毒均为传染性支气管炎病毒。根据生产中IB疫苗免疫失败,致病性与实验室诊断等,可以初步判定此次在四川、重庆和广东发生的几起IB均是由IBV变异株引起的。血清中和试验发现各发病组的血清基本一致,与北京所分离的A2株(类4/91株)血清型基本一致,均能引起肾脏肿大^[10],但各地分离的毒株毒力有一定差异。另外,本次分离的IBV毒株在致死鸡中均发现腿肌和胸肌出血,这与4/91引起的病变类似^[7]。

IB主要从呼吸道排毒,经空气传播给易感鸡,病鸡康复能带毒49 d,在35 d内有感染性^[12];而且由于IB的血清学众多,各血清间的交叉保护差^[11]。目前对IB的预防主要采用活苗免疫,而疫苗毒的存在对IB病原分离与鉴定产生较大的干扰,而临床上引起鸡的呼吸道症状和肾型病变的因素很多,各种因素的综合存在一定程度上干扰临诊判定,作者认为对IB抗体的检测在IB诊断具有十分重要的意义。据广东温氏食品集团禽病实验室检测结果表明,活苗免疫IB的ELISA滴度一般低于1 500,当大于1 500时可判为感染,因此抗体检测对IBV是否感染的确诊,具有十分重要的意义。

多种类型的传染性支气管炎病毒共存于一个地区,但在一定时间内只有一种毒株占主导地位,而任何一个国家和地区的传染性支气管炎的病毒也不是固定不变的^[13]。对IB的防治主要是防止病原入侵鸡群,减少应激因素和提高鸡的免疫力。而免疫仍是防治IB的主要手段。由于IBV变异较快,IBV血清型的研究也需跟上IBV变异的速度,才能有效预防。由于研制相同血清型的弱毒苗需要较长的时间,较实用的方法是活苗加本地株制作的灭活苗一起免疫,能有效预防IB,另外,母源抗体可减轻雏鸡IB的症状^[14],因此在预防IB的同时需做好种鸡的免疫。

笔者采用IBV H52株加IBV分离株制作的灭活油乳剂疫苗免疫种鸡,使雏鸡获得较高的母源抗体,然后用同样的灭活油乳剂疫苗免疫10 d龄肉鸡,获得了较好的免疫保护效果。

参考文献:

- [1] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 第10版. 高福,苏敬良主译. 北京:中国农业出版社,1999. 653-665.
- [2] 邝荣禄. 禽病学[M]. 北京:中国农业出版社,1997. 61-66.
- [3] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1997. 675-680.
- [4] GELB J Jr, KEELER C L Jr, NIX W A, et al. Antigenic and S1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus[J]. Avian Dis, 1997, 41: 661-669.
- [5] JIA W, KARACA K, PARRISH C R, et al. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains[J]. Arch Virol, 1995, 140: 259-271.
- [6] KUSTERS J G, NIESTERS H G M, BLEUMINK-PLUYM N M, et al. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands[J]. J Gen Virol, 1987, 68: 343-352.
- [7] COOK J K, ORBELL S J, WOODS M A, et al. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B)[J]. Vet Rec, 1996, 138(8): 178-180.
- [8] 何长生,魏建忠,王桂军,等. 鸡肾型传染性支气管炎病毒的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(1): 39-41.
- [9] 何永强,周继勇,于涟,等. 应用RT-PCR和RFLP分析肾型鸡传染性支气管炎病毒基因型[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(3): 117-120.
- [10] 赵继勋,秦卓明. 一株类4/91病毒的初步研究[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 6: 360-363.
- [11] 黄廷贺,郝振国,尹广东. 一株嗜肾型传染性支气管炎病毒的分离、鉴定及现地苗应用研究[J]. 辽宁畜牧兽医, 2003, 6: 2-4.
- [12] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第4版. 北京:中国农业出版社, 2001. 310-313.
- [13] CHVANAGH D. Infectious bronchitis vires: A moving target[J]. Poultry International, 1999, 38(3): 58-61.
- [14] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京:中国农业出版社, 1999. 43-53.

【责任编辑 柴焰】