

禽网状内皮组织增殖病的实验室诊断技术

降浩琳, 杨世敏

(河南省汝州市职业中专, 河南 汝州 467500)

摘要:禽网状内皮组织增殖病(reticuloendotheliosis, RE)是由禽网状内皮组织增殖病病毒(REV)引起的鸡、火鸡、鸭、鹅、雉和鹌等以淋巴网状细胞增生为特征的肿瘤性疾病。尽管 REV 本身对禽的致死作用并不很明显, 但由于 REV 能使法氏囊萎缩, 其致病基因 *V-rel* 能引起 B 淋巴细胞转化为肿瘤细胞, 侵损禽机体免疫系统, 使机体抵抗力下降, 从而导致其他疾病的并发感染, 造成高淘汰率和高死亡率。血清学调查表明, 我国鸡群感染 REV 的比率很高。介绍了禽网状内皮组织增殖病(RE)的病原学诊断和血清学诊断方法。

关键词:禽; 网状内皮组织增殖病; 实验室诊断

中图分类号: S858.353

文献标识码: A

文章顺序编号: 1672-5190(2009)11-0122-01

1 病原学诊断

1.1 病料的采集和处理 选做病毒分离的样品可以来自任何年龄的可疑病鸡的全血、新鲜脾脏和含有完整活细胞的肿瘤组织等。采集全血加肝素(50 U/mL)抗凝, 不用稀释。由于采血和对血细胞处理很方便, 所以一般选全血或淋巴细胞作为分离病毒的材料。

1.2 病毒的分离 REV 可以在鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)上产生痘样病变, 并常导致鸡胚死亡。

REV 野外毒株也能很容易地在禽细胞培养中增殖复制。鸡肾、鸭胚成纤维细胞、火鸡胚成纤维细胞和鹌鹑成纤维细胞都适用于病毒的分离培养, 但通常使用代代鸡胚成纤维细胞。

初次分离是在长成单层的培养瓶中, 不倒掉培养液, 接种 0.1 mL 细胞试验样品。无细胞样品应接种于倒掉液体的培养物上, 以后每隔 2~3 d 换液 1 次。一般在接种 14 d 以后, 病毒滴度达到最高峰。

1.3 鸡体回归感染试验 按上述方法培养的病毒, 腹腔接种 1 日龄雏鸡, 每只雏鸡接种 0.2 mL, 置隔离器中饲养观察 8 周以上, 可复制出典型病例。

1.4 电子显微镜检查 取病毒细胞培养物做超薄切片, 电子显微镜观察, REV 病毒粒子直径约 100 nm, 核心具有链状或假螺旋状结构。表面附有 6 nm×10 nm 的突起。病毒以出芽方式从感染细胞的胞膜上释放。

2 血清学诊断

用血清学方法, 可以从待分离物接种禽或田间可疑禽群的血清中查到抗体或抗原。抗体出现的时机和持续时间不一。应用间接免疫荧光法、病毒中和试验、琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验等, 可以在感染禽的血清中或卵黄中查到特异性抗体。用含有抗体的阳性血清作琼脂免疫扩散试验可以测定待检血清中的病毒抗原。

2.1 琼脂免疫扩散试验

2.1.1 材料准备

①抗原和标准阳性血清: 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

②被检血清: 被检血清要先经 56℃水浴灭活 30 min 待

检, 血清应不溶血和腐败。

③1%琼脂糖板的制备: 取 pH 值为 7.0 浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 液 100 mL, 加琼脂糖 1 g, 氯化钠 8.0 g, 煮沸溶化后滤去沉淀, 加 0.01% 硫柳汞防腐, 冷却到 50℃左右倒制琼脂板。在直径 90 mm 平皿中加注融化的琼脂糖 16 mL。琼脂糖厚度不少于 2.8 mm, 4℃冷却后打孔。

2.1.2 操作方法

①打孔: 取琼脂糖板用六角型七孔模具打孔, 孔径 5 mm, 孔距为 3 mm。

②抗原和血清的添加: 中间孔加抗原, 第 1, 3, 5 孔分别加入标准阳性血清, 第 2, 4, 6 孔分别加入被检血清, 每孔加液 50 μL, 加样完毕后, 将琼脂糖板放在铺有湿纱布的带盖容器内, 并用支持物将琼脂糖板水平放稳。然后置于 37℃温箱中培养 24~48 h 后判定结果。

2.1.3 结果判定: 阳性血清对照应与抗原孔中间形成 1 条清晰、致密的沉淀线时, 才能进行判定。

①阳性: 被检血清孔与抗原孔中间形成沉淀线, 并与阳性血清沉淀线弯曲环连, 判为阳性(+).

②可疑: 沉淀线不清晰或阳性对照沉淀线向被检血清孔微弯时, 判为可疑(±)。可疑血清样品应予重检, 重检结果相同时应判定为阳性(+).

③阴性: 无沉淀线出现为阴性。沉淀线与阳性对照沉淀线交叉或不相连时, 均属非特异性反应, 判定阴性(-).

2.2 间接免疫荧光法

2.2.1 材料准备

①器材: 荧光显微镜、载玻片、盖片、温箱、滴管等。

②标准阳性血清、兔抗鸡 IgG 荧光抗体: 由指定生物制品厂供应。

③被检血清: 被检血清要先经 56℃水浴灭活 30 min 待检, 血清应不溶血和腐败。

2.2.2 抗原标本片制备: REV 接种生长良好的 SPF 鸡胚代成纤维细胞, 37℃培养 10 d, 倒出维持液, 用 PBS 洗 1~3 次, 加 1.5~2.0 mL 浓度为 0.25% 的胰酶, 让胰酶液黏附细胞层后, 弃去多余的胰酶液。待细胞层出现裂隙时, 加入 10 mL PBS 吹打, 取细胞悬液 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。用少量 PBS 悬浮, 吸取 10 μL 滴在玻片上, 以视野(400 倍)中有 100~200 个细胞为较合适的细胞浓度, 室温下干燥, 丙酮固定 10 min, -20℃冻存备用。取未接毒的细胞涂片

收稿日期: 2009-10-14

作者简介: 降浩琳(1978—), 男, 助理讲师, 主要从事畜禽养殖教学工作和兽医临床诊断工作。

鸡传染性贫血病的实验室诊断技术

朱雪冬, 李雨来

(河北省玉田县畜牧水产局, 河北 玉田 064100)

摘要:鸡传染性贫血病是由鸡贫血病毒(CAV)引起的一种病毒性传染病,是鸡的主要免疫抑制病之一。从该病的病料采集和处理、病毒分离、鉴定和血清学诊断等方面介绍了该病的实验室诊断技术,旨在为该病的诊断和防治提供参考。

关键词:鸡传染性贫血;鸡贫血病毒;实验室诊断

中图分类号:S858.315.3 **文献标识码:**A **文章顺序编号:**1672-5190(2009)11-0123-02

1 病料的采集和处理

多数情况下采集可疑病例的肝脏,也可采集胸腺、骨髓、脾脏等组织,尽量保证操作过程无菌。将采集的病料用灭菌 PBS 液研磨,在终浓度 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的双抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 30 min,反复冻融 3~4 次,离心,上清液加入 50 %体积分数氯仿作用 15 min,期间不停振摇,70 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min,离心,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,置低温冰箱冻存,待进行病毒分离试验。

2 病毒分离

一般情况下,体内病毒分离试验的接种对象为 1 日龄 SPF 雏鸡,体外病毒分离试验的接种对象为 MDCC-MSBI 细胞。

2.1 敏感动物感染试验 肌注或腹腔内接种 1 日龄 SPF 雏鸡是初次分离 CAV 最特异、可靠的动物实验方法。对采集到的病料处理好以后,腹腔或皮下接种 1 日龄 SPF 雏鸡,每只 0.3 mL。接种 14~16 d 后对感染雏鸡做贫血症状检查,发现 HCT 低于 27 %,剖检可见特征性骨髓黄化、胸腺萎缩、肌肉皮下出血及其他贫血病症状,可初步诊断为 CIA 阳性。有些 HCT 值不是很低的鸡也可出现典型的肉眼可见病变,也将其判为 CIA 阳性。

2.2 体外细胞培养传代试验 通过体外分离病毒,目前普遍使用 MDCC-MSBI 传代细胞做体外培养。接种细胞的初始浓度为 $(2\sim3)\times10^5$ 个/mL,接种剂量一般为 1:10 体积分数,感染的细胞每隔 2~4 d 继代 1 次。经过 1~6 次带毒继代,可见感染细胞肿胀、边缘破裂,死亡细胞逐渐增多,直至

最后 CAV 感染细胞大部分死亡,培养液颜色不再发生改变,细胞不能继续传代。

3 病毒鉴定

3.1 间接免疫荧光法检测抗原

3.1.1 材料准备:抗 CAV 阳性血清、0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 液、荧光标记的抗鸡 IgG 等。

3.1.2 组织抗原的检测:取敏感动物试验中感染鸡肝脏做组织冰冻切片,用丙酮固定 10 min;0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 液洗 3 次,每次 3 min;洗完后用滤纸尽量吸干水分,加入已知抗 CAV 阳性血清(1:40~1:80 倍稀释),放入湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min;取出后用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 液洗 3 次,每次 3 min;加入荧光标记的抗鸡 IgG 抗体,放入湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min;取出后用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 液洗 3 次,每次 3 min;洗涤后用甘油缓冲液封片,进行荧光显微镜镜检。同时需设立阴性血清对照。CAV 感染阳性组织切片在显微镜下可见荧光标记。

3.1.3 细胞抗原的检测:将组织毒接种于 MDCC-MSBI 细胞,带毒继代 6~7 次,收集感染细胞,反复冻融 3 次,作为种毒二次接种 MDCC-MSBI 细胞。48 h 后收获感染细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 液将细胞沉淀悬浮起来,1 000 r/min 离心 5 min,再用 PBS 液洗 1 次。弃上清液,用余液将细胞沉淀悬起。取细胞悬浮液微量,涂布于载玻片上,吹干,丙酮固定 10 min,作为细胞抗原。同样制备已知阳性抗原对照。

将固定好的细胞抗原置 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 液中洗 3 次,每次 3 min;洗完后用滤纸尽量吸干水分,加入抗 CAV 阳性血清(1:80 倍稀释),放入湿盒内,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min;取出后用 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 液洗 3 次,每次 3 min;加入

收稿日期:2009-11-20

作者简介:朱雪冬(1973—),男,畜牧师,主要从事畜牧兽医技术推广工作。

作阴性对照片。

2.2.3 阳性血清和荧光抗体工作浓度的滴定:将第 1 抗体和第 2 抗体做倍比系列稀释,进行方阵滴定,选择合适的工作浓度,结果见表 1。

表 1 间接免疫荧光试验中抗体最佳工作浓度的选择

第 1 抗体	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
1:4	+++	+++	+++	+++	+++	++
1:8	+++	+++	+++	+++	+++	++
1:16	+++	+++	+++	+++	+++	++
1:32	+++	+++	+++	+++	+++	++
1:64	+++	+++	+++	+++	++	+
1:128	++	++	++	+	+	+
1:256	++	+	+	+	-	-

2.2.4 间接免疫荧光染色:在 REV 抗原细胞涂片和未接种细胞涂片上滴加 1:64 倍稀释的被检血清,将标准阳性血清和阴性血清,放入恒湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,用浓度为 0.01 mol/L 的 PBS(pH 值为 7.4)漂洗 3 次,每次 20 min,最后用无离子水洗 1 次。干燥后滴加用 0.02 %伊文思蓝溶液 1:32 倍稀释的兔抗鸡 IgG 荧光抗体于标本上,置恒湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。用 PBS 漂洗同前。室温干燥后滴加碳酸缓冲甘油封片。

2.2.5 结果判定

①阳性:用免疫荧光抗体染色的 REV 感染细胞内可见弥散性黄绿色荧光颗粒,背景清晰。

②阴性:用免疫荧光抗体染色的 REV 感染细胞内无荧光、呈暗红色。 □