



鸡输卵管囊肿病病原的分离与鉴定

李肇增¹, 金山², 王金福², 闫红霞¹, 乌尼², 郝永清², 李凤华¹, 窦洪举¹

(1.内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010031; 2.内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 用病鸡的输卵管囊肿液中脱落的上皮细胞感染 SPF 鸡胚及 BHK₂₁、Vero、L₉₂₉ 细胞, 观察 3~10 d 鸡胚死亡情况及细胞生长情况, 并进行病原分离、鉴定、检测等。结果为 SPF 鸡胚感染后盲传 15 代, 1~11 代基本无鸡胚死亡, 12~15 代鸡胚有死亡。细胞感染后第 1 代可见到 CPE, 敏感性 L₉₂₉>Vero>BHK₂₁ 细胞, 被感染的细胞及卵黄膜(第 4 代起)CF 呈阳性; 电镜观察到胞浆中有衣原体; Giemsa 染色光镜下可见包涵体颗粒; 碘染色及磺胺嘧啶敏感试验均呈阴性; 病毒学及细菌学检测阴性; 雏鸡感染试验阳性; 病鸡肝、脾、输卵管等组织病理变化明显。

关键词: 衣原体; 输卵管囊肿; 分离; 鉴定

中图分类号: S858.312.67

文献标识码: A

文章顺序编号: 1672-5190(2010)06-0212-03

1998 年以来, 在内蒙古地区一些鸡场相继发生一种以输卵管囊肿为特征的疾病。其临床症状为高峰期产蛋率仅达 45%~65%; 死亡率低(1%); 而淘汰率为 40%~50%; 鸡冠鲜红色; 腹部肿大, 触摸有波动感; 喜卧, 行走为企鹅状。剖解可见输卵管膨大, 内有较清亮的积液, 黏稠度低, 积液可达 500~1 000 mL; 内脏其他器官因受压迫而体积缩小, 位置前移。为了深入研究, 对其病原进行分离, 现将病原分离情况介绍如下。

1 材料

具有典型临床症状的病鸡 9 只, 作为分离的病料来源, 取自呼和浩特、包头、薛家湾等地。SPF 种蛋购于中监所。非免疫鸡胚由内蒙古生药厂提供。1 日龄罗曼雏鸡来自内蒙古家畜改良站。L₉₂₉ 细胞由内蒙古农业大学家畜传染病实验室提供, Vero 细胞由内蒙古卫生防疫站赠送, BHK₂₁ 细胞由内蒙古生药厂提供。衣原体补体结合诊断试剂购自中国农业科学院兰州兽医研究所。溶血素、补体自备。

鲜血琼脂、营养琼脂、SS 琼脂、营养肉汤等自制。

Giemsa、Gimenez、Lugol's 液均自制。

磺胺嘧啶钠(SD)由汉中兽药厂生产。

内蒙古测试中心提供日立 H-700 H 透射电子显微镜。

2 方法

2.1 样品制备

本文首次发表在本刊 2002 年第 5 期。

作者简介: 李肇增(1944—), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事畜禽传染病病理研究。

2.1.1 无菌采集输卵管、肝、脾等, 剪碎、研磨后加入链霉素和卡那霉素(各 500 IU/mL)用 MEM 或 1 640 组织培养液(pH 7.2), 稀释成 1:10 悬液备用。

2.1.2 无菌采集输卵管积液, 以 3 000 r/min, 离心 30 min, 沉淀加入含有链霉素及卡那霉素(500 IU/mL)的 1 640 组织培养液(pH 7.2)稀释成 1:10 悬液, -20 ℃冷冻备用。使用前用无菌玻璃珠打碎, 离心后取上清液备用。

2.2 细菌学检查

对接种的病料及所收获卵黄膜、细胞培养物按常规方法进行无菌检查。

2.3 病毒学检查

将病料接种于 SPF 鸡胚尿囊腔内, 37 ℃培养, 观察 5 d, 盲传 3 代。收集尿囊液, 酶处理后检查 HA 以检查鸡传染性支气管炎病毒 IBV。新城疫 ND 按常规方法检查 HA。

2.4 衣原体的分离与培养

2.4.1 鸡胚接种与培养

将病料在 39 ℃ 0.4 mL/胚, 接种于 6~7 日龄 SPF 鸡胚卵黄囊内, 收集 4~10 d 死亡的鸡胚卵黄膜涂片、染色、镜检、无菌检查, 有衣原体颗粒者收集备用或将未死的鸡胚收集卵黄膜继续盲传。

2.4.2 细胞感染

将 BHK₂₁、Vero、L₉₂₉ 细胞复壮后, 弃去培养液, 用 pH 7.2 Hank's 液轻洗 2 次, 按培养液的 10% 加入脱落输卵管上皮细胞感染上清液, 37 ℃吸附感染 2 h 后弃液。更换含放射菌酮(0.5~2 μg/mL)的组织培养液, 继续培养 5~7 d, 于 48 h 及 96 h 取出盖玻片用 Giemsa 染色镜检。每天检查 CPE, 收集培养

物用玻璃珠打碎细胞,1 500 r/min 离心 5 min,除去沉渣,传代或测 CF 用。

2.5 衣原体的鉴定

2.5.1 补体结合试验 CF

2.5.1.1 被检卵黄膜样本(抗原)的制备

收集感染的卵黄膜及对照组卵黄膜,研磨后每份样本加 10 mL PBS (pH 7.2) 制成悬液,10 磅 20 min 灭活处理,匀浆 3~5 min 后加最终浓度为 0.5% 的酚。4℃保存 3 d 后以 1 000 g 离心 20 min,取中层液体为被检样本,4℃保存备用。

2.5.1.2 被检细胞样本(抗原)的制备

收集感染细胞和正常细胞,分别加入 1%苯酚 37℃24 h 灭活处理,以 1 000 g 离心 1 h。沉淀用 1%酚和 1%甘油 VBS 缓冲液制成 10%的悬液。匀浆 1~3 min,再以 1 500 r/min 离心 15 min,取上清液为被检样本,4℃保存备用。

2.5.1.3 CF 试验

按常规方法进行,被检样本为抗原,设阳性对照及盐水对照。

2.5.2 磺胺嘧啶(SD)敏感试验

将被感染的卵黄膜悬液用 MEM 或 1 640 倍稀释成 1 000 倍分为 4 组,第 1 组加 2.5 mg/mL SD;第 2 组加入 7.5 mg/mL SD;第 3 组不加药物;第 4 组加 3 mg/mL SD,加入未被感染的 1 000 倍卵黄膜悬液,以 0.4 mg/胚每组接种 10 枚 6 日龄非免疫鸡的胚卵黄囊内,观察 10 d。

2.5.3 碘染色

按文献所示方法进行。

2.5.4 电镜观察

先将被感染的 BHK₂₁ 细胞离心,沉淀物用戊二醛和四氧化锇双固定,待酒精脱水后用环氧树脂 618 包埋,制备切片,用醋酸双氧铀和柠檬铅染色,进行观察与拍照。

2.6 组织学观察

将病鸡的输卵管、肝、脾用 10%甲醛生理盐水固定制片,染色,光镜观察。

2.7 人工感染

从无输卵管囊肿病病史的鸡场取 1 日龄雏鸡 20 只,随机分成 4 组,每组 5 只。用感染衣原体的卵黄膜悬液为材料,第 1 组经口腔感染,第 2 组滴鼻感染,第 3 组腹腔注射感染,第 4 组为对照不感染组。每只以 0.3 mL 感染,观察 21 d 后检查。

3 试验结果

3.1 细菌及病检均为阴性

3.2 衣原体培养与分离结果 以输卵管等混合悬液连续传 15 代,1~11 代中仅第 6 代有 SPF 鸡胚死亡,12~15 代出现死亡,见表 1。

表 1 输卵管悬液接种 SPF 鸡胚结果

传代数	接种数(枚)	3 d 内死亡数	4~10 d 死亡数	4~10 d 死亡率
1	6	1	0	0/5
2	10	2	0	0/8
3	5	0	0	0/5
4	5	0	0	0/5
5	4	0	0	0/4
6	4	0	2	2/4
7	10	2	0	0/8
8	10	1	0	0/9
9	9	2	0	0/7
10	6	0	0	0/6
11	6	0	0	0/6
12	6	0	1	1/6
13	6	1	0	1/5
14	6	0	1	1/6
15	50	4	9	9/46

表 2 脱落上皮细胞感染 BHK₂₁ 细胞情况

传代数	接种数(瓶)	试验组		对照组	
		CPE	包涵体	CPE	包涵体
1	4	+	-	-	-
2	5	++	+	-	-
3	5	++	+	-	-
4	5	+++	+	-	-
5	6	+++	+	-	-

3.3 细胞感染结果

3.3.1 将脱落上皮细胞感染 BHK₂₁ 细胞,从第 2 代起可观察到 CPE,见表 2。

3.3.2 将衣原体病料同时感染 BHK₂₁、Vero、L₉₂₉ 细胞,均能产生 CPE,但 3 种细胞的敏感性为 L₉₂₉>Vero>BHK₂₁,见表 3。

3.4 CF 试验结果

CF 试验采用常规方法进行,溶血素效价为 1:4 000,补体稀释为 1:33,标准抗原效价为 1:128。结果见表 4,说明 3 种细胞均可被衣原体感染。

3.5 磺胺嘧啶钠(SD)敏感试验结果

该试验所用鸡胚为非免疫鸡胚,第 1,2,3 组均可引起部分鸡胚死亡,只接种 SD 组不引起鸡

表 3 BHK₂₁、Vero、L₉₂₉ 细胞感染衣原体情况

感染时间	BHK ₂₁		Vero		L ₉₂₉	
	48	96	48	96	48	96
第一代	-	-	-	+	+	+
第二代	±	+	+	+	+	+
第三代	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示可观察到 CPE；“-”表示未观察到 CPE；“±”为可疑。

表 4 CF 试验检测 3 种细胞抗原效价

样品	第一代	第二代	第三代
BHK ₂₁	1:8	1:16	1:32
Vero	1:16	1:32	1:64
L ₉₂₉	1:32	1:64	1:128
标准抗原	1:128	1:128	1:128
未感染的 3 种细胞	1:0	1:0	1:0

表 5 SD 敏感试验结果

组别	接种物	注射剂量 (mL)	接种数 (枚)	3 d 内死亡数 (枚)	4~10 d 内死亡数 (枚)	死亡率
1	SD 2.5 mg/mL 的衣原体悬液	0.4	10	0	2	2/10
2	SD 7.5 mg/mL 的衣原体悬液	0.4	10	1	2	2/9
3	衣原体悬液	0.4	9	1	2	2/9
4	SD 3 mg	0.03	10	4	0	0/6

表 6 人工感染结果

组别	接种雏鸡数	感染途径	注射剂量 (mL)	死亡数	染色检查
1	5	口腔	0.3	0	-
2	5	滴鼻	0.3	0	+
3	5	腹腔	0.3	0	+
4	5			0	-

胚死亡。说明 SD 对该衣原体无抑制作用,应属于鸚鵡热衣原体属,见表 5。

3.6 碘染色试验

将被感染的卵黄膜及被感染的 BHK₂₁ 细胞培养物及对照物 Lugol's 碘液染色,镜检均未见棕色衣原体颗粒,说明不是沙眼衣原体。

3.7 染色

被感染的卵黄膜悬液及被感染的 BHK₂₁ 细胞均可被 Giemsa 将衣原体颗粒染成紫红色,被 Gimenez 染液染成红色。衣原体的浓缩物将看得更清楚。

3.8 组织学观察

组织学切片可见肝组织水肿,中央静脉及窦状隙扩张、充血,多数肝细胞变性、坏死,肝窦状隙有单核细胞、淋巴细胞;脾小体消失、坏死,窦腔中有单核细胞和淋巴细胞;输卵管变薄、坏死,上皮脱落,浆膜水肿;衣原体颗粒不易识别。

3.9 人工感染试验结果

各组均未出现死亡,剖杀取心、肝、脾涂片,只在 2,3 组可观察到衣原体颗粒及包涵体,说明这两组已被衣原体感染,见表 6。

3.10 电镜观察

可见衣原体,较小的为原体 (elementary body, EB),较大的为始体 (reticulate body, RB)。

4 结论

4.1 根据鸡胚培养、细胞培养物的涂片染色镜检、补体结合试验检测、电子显微镜的检查,可以见到衣原体的包涵体和原体 (EB) 及始体 (RB),依据碘染色,SD 敏感性试验,病毒、细菌检查阴性等结果认为鸡输卵管囊肿病病原为鸚鵡热衣原体。

4.2 应用收集的鸡输卵管脱落的上皮细胞感染鸡胚及细胞分离衣原体可获得满意的效果。

4.3 鸡输卵管囊肿衣原体感染细胞的敏感性为 L₉₂₉>Vero>BHK₂₁ 细胞系。

参考文献 (略)