

鸡传染性贫血病的 实验室诊断技术

山西农业大学动物科技学院 赵 锋 刘桂林
天津禽病培训诊断中心 梁志选 赵建增

鸡贫血病毒(CAV)是鸡传染性贫血病的主要病原,其不但引起骨髓等造血组织萎缩,导致严重贫血甚至死亡而且引起胸腺等淋巴组织萎缩,导致免疫抑制。

自日本1979年首次报道该病毒以来,世界主要养禽国家如英国、丹麦、波兰、美国、澳大利亚、荷兰、巴西和阿根廷等国先后发现该病毒的存在。

我国于1992年在黑龙江首次分离到该病毒,随后在辽宁、吉林、山东、江苏、河南等地的鸡群中也陆续发现。通过血清学调查发现,在产蛋鸡群和肉鸡群中CAV抗体也相当普遍,许多地区鸡群中CAV抗体的检出率高达70%~90%,说明该病在世界范围内广泛分布,正在直接或间接地对世界养禽业造成巨大的经济损失。因此,对鸡传染性贫血病的实验室诊断极为重要,下面就对该病的诊断方法综述如下。

(一) 临床症状诊断

采用1日龄SPF雏鸡接种感染

CAV后发生贫血症状,可观察到生长发育缓慢,食欲减退,体弱,鸡冠、肉髯、眼睑等可视黏膜苍白等临床症状,症状严重期,发病鸡羽毛蓬松、翅膀下垂、蜷缩一旁,甚至出现死亡。测定红细胞压积值,病鸡血液的血细胞压积值(HCT)明显降低,各种血液细胞数量明显减少,发病严重情况下HCT值可降到10%以下,血细胞数可降到 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 以下。实验室内常将HCT作为CAV的一个诊断指标,一般将HCT低于27%判为发病。

(二) 病原学诊断

1. 病毒的分离。多数情况下采集可疑病例的肝脏,因为肝脏含有高浓度的病毒,也可采集胸腺、骨髓、脾脏等组织,尽量保持无菌操作。将采集的病料用灭菌PBS研磨,终浓度1000u/mL的双抗37℃下作用30min,反复冻融3~4次,离心,上清液加入50%体积氯仿作用15min,期间不停振摇,70℃处理5min,离心,上清液经0.22μm滤膜

过滤,置低温冰箱冻存,待进行病毒分离试验。体内病毒分离实验的接种对象为1日龄SPF雏鸡,体外病毒分离实验的接种对象为MDCC-MSB细胞。过滤除菌后的病料上清液接种MSB1细胞培养,可以用于鸡贫血病毒的分离鉴定。接种病毒后,每隔2~3d传代一次,连续传4~7代,如果出现细胞肿胀,变大变圆,随后有侧解,细胞培养液不再变色,无法继续传代,可以初步确定为有CAV的存在。MSB1细胞也可以用于鸡贫血病毒的毒价滴定,连续稀释后的病毒接种MSB1细胞,在细胞板上连续传4代以上,观察细胞病变,也可以传1代后,用荧光抗体来检查鸡贫血病毒的存在和病毒的滴度。

2. 病毒鉴定。病毒的鉴定可以采用间接荧光法检测抗原。取敏感动物实验感染鸡肝脏做组织冰冻切片,用丙酮固定,加入已知抗CAV阳性血清;取出后用PBS洗3次,加入荧光标记的抗鸡IgG抗体,甘油缓冲液封片,进行荧光显微镜镜检。该试验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。

CAV感染阳性细胞涂片在荧光显微镜下可见MDCC-MSB 1细胞肿胀,细胞核内颗粒状或弥散状荧光标记,荧光标记细胞的多少与毒株的感染力有关。阳性对照可见到同样结果,荧光标记细胞在30%~60%,阴性对照细胞内不出现荧光颗粒。

(三) 血清学诊断

CAV感染1日龄雏鸡后产生的中和抗体能维持20周,感染10周龄以上的成年鸡后所产生的中和抗体能维持10~63周,(一般44周以上),但是目前的研究一致表明,CAV感染鸡血清中的中和抗体滴度较低,最高值为1:5 120,最低值为1:20,低水平的母源抗体能有效地抵抗CAV的感染。病毒中和试验(VN)、间接荧光抗体试验、免疫过氧化物酶试验(IFA)和ELISA试验可用于检查血清和卵黄中的抗体。

1. VN试验:以56℃灭活30min的血清(倍比稀释)与 2×10^3 CED50(可使50%雏鸡致病的有效剂)或200TCID₅₀的病毒等体积混匀,37℃1h或4℃过夜,然后肌肉接种1日龄雏鸡连续观察14d,鸡健存,或MSB1细胞连续传代培养7~10代以上,细胞新陈代谢仍活跃,可判定抗体阳性。若作大批血清样本检测,一般采用微量VN反应法。有时较低稀释度的血清对细胞会有毒性或易引起对病毒的非特异性抑制。VN法的检测灵敏度要高于其他血清学方法。在CAV感染鸡产生的中和抗体的维持时间要明显长于IFA抗体维持时间。此方法有两个局限性:(1)使用该方法需至少培养7代MSB 1细胞才可获得血清的终点滴度。(2)并且VN法不能适用于一些在MSB 1不同的亚系上生长不良或不能复制的CAV毒株。

2. 间接荧光抗体试验(IFA):将种毒接种于MDCC-MSB1细胞内,48h后收获,离心取细胞沉淀,用PBS洗2次,涂布于载玻片上,晾干后丙酮固定10min,可作为细胞抗原检测血清。该抗原可与CAV阳性血清反应,用荧光标记的抗鸡IgG显示,荧光显微镜下观察,在肿胀的细胞核区出现较小的、形态不规则的荧光染色颗粒或轮环状结构,可判为抗体阳性。但应设立严格的阳性血清、阴性血清和非CAV感染细胞作对照,以排除非特异性荧光和可能掩盖特异性反应的背景染色。

3. ELISA试验:以部分纯化的细胞培养毒直接包被ELISA板或用单克隆抗体包板捕获细胞培养物中的病毒,可用于检测血清抗体,并且都已用于商品化试剂盒的生产,但由于病毒复制量较低,成本较大,难以大批量生产和推广。Kling(1991), Otaki(1991)和王笑梅(1998)用病毒感染细胞或裂解上清液作为包被抗原建立了ELISA检测方法,但效果不如纯化或半纯化的病毒。Pallister(1994)以大肠杆菌内表达的重组VP1作间接ELISA, Kato(1995)以大肠杆菌内表达的LacZ-VP3重组物作间接ELISA, Iwata(1997)以昆虫细胞内表达的VP2或VP3表达物包板作ELISA,都可检测鸡血清中的CAV抗体,并且与其他检测方法(如IFA, VN等)结果的吻合性较好。因此,由于各CAV毒株的基因序列的保守性,以CAV基因的体外表达产物纯化物作ELISA检测原,用于检测鸡血清抗体的ELISA,被证明是既特异又敏感的方法,为CAV血清学诊断开辟了一条新的途径。

(四) 生物技术方法诊断

随着分子生物学新方法的不断

出现,PCR技术、核酸探针技术以及第二代ELISA技术等已用于CAV特异性检测。对CAV抗原的检测可采用PCR方法, C. Some(1993)报道,利用PCR技术可以从CAV感染鸡体组织内或感染细胞内检测其DNA。Noteborn等采用同位素标记克隆化的CAV基因组作探针进行杂交实验,能够检测出不同毒株感染的细胞中双链复制型及单链环状CAV基因组。Todd等用P32标记的克隆化CAV的DNA片段作探针,可检测到CAV感染鸡组织中特异性DNA,随后Noteborn等用非放射性的地高辛(Digoxigenin)标记探针,成功地检测了多株CAV分离株。1995年Nielsen等用生物素标记的双股DNA探针进行原位杂交试验,不仅可以检测到人工感染发病鸡体内的CAV,而且可以检测患兰翅病鸡体内所含的CAV的DNA。

为顺应检测敏感性的需要,CAV特异性PCR技术在实验室诊断及疫苗试验上,充分体现了该法不可比拟的优势,它不仅与病毒分离法一样敏感,而且能检测到高背景DNA下的CAV分子。Soine等利用套式PCR法(多组引物)扩增出能和特异性探针发生杂交的CAV基因,但此法易造成假阳性结果。CAV感染剂量大小将直接影响其致病程度,故检出敏感细胞或组织中的病毒含量尤为重要。Dren等采用热启动PCR法不仅克服了上述缺陷,而且还成功地检测到一个感染细胞,相当于1 OTCID₅₀的CAV分子。

总之,快速准确地诊断是防治CAV发生和流行的重要前提保证。各种诊断方法又各有利弊。在生产中应根据自身情况确定检测方法。**新**