

禽脑脊髓炎病毒检测技术研究进展

王 劭, 胡奇林, 林锋强, 程晓霞, 欧阳岁东, 陈仕龙

(福建农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013)

摘 要 禽脑脊髓炎是一种病毒性传染病, 能引起雏鸡、雉、鹌鹑和火鸡感染, 其特点是运动失调和快速震颤。文章就其检测技术, 如病毒分离、血清学诊断和核酸探针等的研究进展做一阐述。

关键词 禽脑脊髓炎病毒; 检测技术

禽脑脊髓炎(Avian Encephalomyelitis, AE)是一种病毒性传染病, 能引起雏鸡、雉、鹌鹑和火鸡感染。其特点是运动失调和快速震颤, 特别是头部和颈部, 称为传染性震颤。1930年, Jones首次在2周龄商品代洛岛红鸡中见到AE, 其表现为震颤。另两次暴发是在1931年的1和4周龄的鸡, 这些鸡虽养在不同的鸡场, 但来自同一批种鸡。在以后的两年间, 康涅狄格、缅因、马萨诸塞和新罕布什尔等州均发现了AE的暴发, 因此又称“新英格兰病”。1932年又根据发病雏鸡特征性头颈震颤, 称为“禽流行性震颤”。1938年Van Roekel等根据实验性分类, 将其定名为“禽脑脊髓炎”。

禽脑脊髓炎实际上是全球发生。我国1980年以来, 先后在黑龙江、辽宁、内蒙古、河北、江苏、上海、福建、广东等省市区发生。禽脑脊髓炎病毒主要侵害1~4周雏鸡, 6周龄以上的鸡受感染后一般不表现临床症状。

当有大量幼鸡发生共济失调和震颤, 即应怀疑为本病。确诊应进一步做实验室检验。目前实验室诊断主要是病毒分离、血清学诊断和分子生物学技术等。

1 病毒的分离鉴定

无菌取发病后2~3d表现典型症状鸡的脑组织(以表现早期AE症状或发病不超过2、3d的病禽脑组织为最好)、胰或十二指肠及腺胃, 研磨、匀浆、冻融、离心, 取上清无菌处理后备用。病毒分离有两种途径:

1.1 雏鸡 将病料脑内接种1日龄SPF雏鸡, 雏鸡多于5~10d发病, 取接种后1~4周内发生典型临床症状的雏鸡脑、胰等, 按常规分离病毒。

1.2 鸡胚 将病料通过卵黄囊途径接种5~6日龄SPF鸡胚, 接种后12d检查鸡胚是否有AEV所致鸡胚典型病变, 并留取少量接种胚继续孵化至出雏, 观察鸡胚出雏后20d内症状, 如有类似AE症状, 则采集脑, 分离原代病毒。野外分离病毒, 常常不能使SPF鸡胚产生病变, 需盲传3~4代, 方能适应鸡胚, 产生病变。应注意的是, 无AE母源抗体的鸡胚于5日龄经卵黄囊接种是分离和繁殖本病毒的最佳途径, 鸡胚必须是来自无AEV感染的鸡群, 否则由于卵黄内存在母源抗体, 病毒就不能增殖。

2 鸡胚易感性试验

通过鸡胚易感性试验, 可以确定种鸡群是否经受过鸡传染性脑脊髓炎病毒的感染。具体做法是将被检鸡群的受精蛋进行孵化, 在6日龄时, 至少取20枚该日龄鸡胚, 经卵黄囊

对每个鸡胚接种100个EID₅₀的适应鸡胚的传染性脑脊髓炎病毒, 接种后连续观察10~12d, 看鸡胚是否有死亡和特征性病变。如有典型病变的鸡胚比例小于50%, 则证明种蛋是有母源抗体的, 种鸡群是有免疫力的, 如果100%的鸡胚都有病变, 则证明种蛋无抗体, 种鸡群未经受过病毒感染, 如有病变的鸡胚超过50%又达不到100%, 则可能表示种鸡群近期受过病毒的感染或被感染时间已久。

3 琼脂扩散试验

根据要求, 按0.8%~1.0%的比例取优质琼脂粉加入缓冲液或生理盐水中煮沸融化, 待冷至45~56℃, 浇灌琼脂平板, 使其凝固, 厚度约2~3mm。后打成中央一孔周围六孔的梅花形孔, 一般孔径3~5mm, 孔距4~7mm。并用火焰封孔底, 每孔加约30μL抗原或抗血清, 置37℃湿盒中(或室温)24~48h, 根据特异性沉淀线的有无进行判定。如有必要可观察72h或到96h。赵心力、秦爱建、张淑霞等利用AEV Van-Roeke1鸡胚适应株或野毒株感染SPF鸡或鸡胚, 研制琼脂沉淀抗原, 均获得良好效果, 可用于各种鸡群AE的诊断。

4 血清学诊断

4.1 血清中和试验 可用标准的中和试验方法来确定被检雏鸡血清的中和指数, 据此来推测雏鸡的感染状态。一般可用已适应于鸡胚的毒株, 先测定毒株对敏感鸡胚的EID₅₀, 然后将无菌采集的被检鸡血清分别与等量经10倍递增稀释的病毒稀释液混合, 经相互作用后接种于6日龄无AE抗体敏感鸡胚的卵黄囊内, 37℃孵化, 连续观察12d, 检查鸡胚是否有特征性病变, 确定病毒与血清作用后的EID₅₀, 病毒EID₅₀与被血清作用后病毒的EID₅₀之间的对数差即为被检血清的中和指数。中和指数在1.1~3之间是较早感染过的鸡群。一般在感染后的2周即可检出抗体。一般来说, 敏感鸡在感染后的第2周即可检出抗体, 随后抗体继续上升, 并可在几个月内保持在有意义的水平之上。

4.2 酶联免疫吸附试验 自从报道单克隆抗体可识别AEV的共同抗原表位后, 各种单克隆抗体介导的ELISA方法被建立起来。秦卓明等利用制备AEV单抗建立了检测AEV抗原的间接Dot-ELISA方法, 对AEV最低检出量为16.08μg/mL, 对40份临床自然发病的鸡病料的阳性检测率为92%, 对10份AEV病原分离阳性样品, 检测阳性率为100%。杨建民等通过制备抗AEV VanRoekel的单克隆抗体, 初步建立了检测AEV抗体的单抗捕捉ELISA方法, 与进口

试剂盒进行平行检测 40 份血清,总符合率为 92.5%,同时又建立了检测 AEV 抗原的直接 Dot-ELISA 方法,对 AEV 最低检出量为 8.03 μg/mL,对 100 份临床自然发病鸡病料检测,阳性检出率为 90%,对 10 份 AEV 病原分离阳性样品检测阳性率为 100%。

另外,秦卓明等也利用鸡胚成纤维细胞繁育 AEV,取其培养物,经差速离心提纯,做为酶联包被抗原,建立了检测 AEV 抗体的间接 ELISA 吸附试验,采用自制 AE 包被板与美国进口 AE ELISA 包被板进行平行试验,将 46 份未知待检血清均按进口板要求 1:500 稀释,在自制板和进口板上按各自程序作平行检测,阳性符合率为 89.1%,具有较高的特异性和重复性。

4.3 间接荧光抗体检测法 间接荧光抗体试验将 AEV 接种于已培养好的鸡胚成纤维细胞 (CEF) 或神经胶质细胞 (CEB),继续培养 3~4d 移去上清,用-20℃预冷的丙酮固定细胞,固定好的细胞用 PBS 洗 3 次,按常规方法加入被检血清,同时用抗 AE 阳性血清、正常 SPF 鸡血清、马立克氏病 (MD) 阳性血清、新城疫 (ND) 阳性血清、法氏囊病 (IBD) 阳性血清作对照,于 37℃温育 30min 后用 PBS 洗涤,加入兔抗鸡 IgG 荧光抗体,置 37℃温育 30min,最后经 PBS 洗涤后在荧光显微镜下观察。凡出现明显绿色荧光者判为阳性,无荧光者为阴性。杜元钊等用 AEV 免疫的鼠阳性血清作为诊断抗体,建立异源抗体免疫荧光技术,避免了用鸡血清做为第一抗体,而产生的鸡源抗体的非特异性反应和一些禽病病毒的干扰,提高了间接荧光试验的灵敏性。秦卓明等利用 AEV VanRoekel 鸡胚适应株在 CEF 和 CEB 上传代,用盲传至第 6 代的 CEF、CEB 制成荧光标本。建立了 AEV 间接免疫荧光抗体检测方法,对鸡群 AEV 血清抗体的检查,具有很强的特异性。

5 分子生物学技术

5.1 核酸探针技术 刘丽华等报道通过 RT-PCR 扩增出 AEV 内蒙古分离株 NH937 株基因组 3' 末端 706bp 的 cDNA 片断,利用随机引物法 Dig 标记法制备探针,通过斑点杂交定量分析不同稀释倍数的重组阳性质粒 DNA、AEV 的 RNA 以及病鸡脑组织中的 AEV,对重组质粒的最小检出量为 10pg,对 AEV RNA 的最小检出量 10ng,在病鸡脑细胞胞浆内可见蓝紫色阳性杂交信号的颗粒。王纯洁等报道通过制备针对巨噬细胞炎性蛋白-1 (MIP-1) 和 IL-8 受体 cDNA 的原位杂交探针,经原位杂交染色检测,发现 AEV-NH937 人工感染 SPF 鸡时,病鸡大脑皮层锥体细胞和皮质下各核团的较大神经元的胞浆内,上述两种趋化因子 mRNA 含量明显增加,这与 AEV 感染引起鸡脑中神经系统的弥散性非化脓性脑脊髓炎变化有关。

5.2 聚合酶链式反应 AEV 基因组是带有 polyA 尾巴的单链 RNA,长度约为 7.5Kb AEV 以单链 RNA 为遗传物质,编码多聚蛋白,只含有一个开放阅读框 (ORF),主要的 ORF 结束于离 polyA 尾巴 147bp 处。AEV 结构蛋白有 VP1、VP2、VP3 和 VP4,其中 VP2 和 VP4 又合称 VP0。张立成等从 AEV VR 株感染的 SPF 鸡胚脑以及内脏器官组织中扩增出了 VP3 基因,经测序分析,基因全长 735bp,共编码 245 个氨

基酸,与 AEV-1143 株相应片段的核苷酸和氨基酸同源性分别为 93.0%和 97%。葛俊伟等收集 AEV 感染有典型病变的鸡胚脑、胰、胃肠道以及尿囊液,提纯病毒,应用 RT-PCR 技术,扩增了 VP1 基因,测序结果表明该基因全长 810bp,编码 270 个氨基酸,与 AEV-1143 株相比,核苷酸同源性为 94.2%,氨基酸同源性为 99.26%。韦莉等根据发表的 AEV 序列设计引物,从 AEV 分离株感染的 SPF 鸡胚病变组织中扩增出 VP0 基因,与 AEV-1143 株 VP0 基因的核苷酸与氨基酸之间的同源性分别为 95.2%和 97.5%,并以提取的 RNA 为模板,用 Oligo(dT)15 为引物合成 cDNA,完成了对 AEV-L2Z 基因组全序列的测定。

6 结束语

由于 AEV 无囊膜,对外界环境影响具有较强抵抗力,故 AE 与传染性法氏囊炎被并称为“场”病。AEV 可水平传播并可通过蛋垂直传播,给养鸡业的危害日益严重。

然而 AEV 的细胞培养比较困难,目前针对 AE 的检测方法仍较多地局限于传统的血清学方法,常常是通过用免疫荧光法对冰冻的脑部材料进行分析来对 AEV 的感染进行确诊。因此,深入研究 AE,将为开发更多敏感性和特异性高的 AEV 诊断方法打下坚实的基础,使 AE 得到有效的免疫监测和检验检疫。

参考文献

- [1] 黄骏明,朱庆虎.用鸡胚敏感试验检测蛋鸡群禽脑脊髓炎[J].中国畜禽传染病,1997,23(1):13~14.
- [2] 张淑霞,李金钧等.禽脑脊髓炎琼扩抗原的研制和应用[J].动物医学进展,2001,22(2):59~60.
- [3] 赵继勋,秦卓明.禽脑脊髓炎琼扩抗原的研制与应用[J].中国家禽,1997,(4):9~11.
- [4] 程安春,汪铭书,范伟兴等.现代禽病诊断和防治全书[M].成都:四川大学出版社,270~273.
- [5] 叶满红,崔治中.禽脑脊髓炎病毒单克隆抗体制备[J].中国兽医学报,1999,19(3):306~307.
- [6] 杨建民,秦卓明.禽脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备及鉴定[J].畜牧兽医学报,2003,34(2):191~194.
- [7] 秦卓明,杨建明.单抗间接 Dot-ELISA 检测禽脑脊髓炎病毒抗原的研究[J].畜牧与兽医,2002,34(3):8~11.
- [8] 杨建民,秦卓明.单抗捕捉 ELISA 检测 AEV 抗体方法的研究[J].动物医学进展,2002,23(1):72~75.
- [9] 秦卓明,赵继勋,杨建民等.利用鸡胚成纤维细胞培养禽脑脊髓炎病毒的研究[J].中国兽医杂志,2003,39(4):3~5.
- [10] 刘丽华,马学恩,赵振华.应用原位杂交检测禽脑脊髓炎病毒[J].中国兽医杂志,2004,40(2):25~26.
- [11] 王纯洁,马学恩,金晓.实验性禽脑脊髓炎中 MIP-1 和 IL8 的 mRNA 原位杂交实验[J].中国预防兽医学报,2003,25(3):223~226.
- [12] 张立成,关云涛,杨增岐等.禽脑脊髓病毒 VP3 基因的克隆与序列测定[J].中国兽医科技,2004,34(11):63~66.
- [13] 葛俊伟,关云涛,王云峰.禽脑脊髓 VP1 基因的克隆与表达[J].中国预防兽医学报,2005,27(6):450~453.
- [14] 韦莉,刘爵,曹永长.禽脑脊髓炎病毒 VP0 基因的克隆与序列测定[J].病毒学报,2001,17(1):33.
- [15] 韦莉,刘爵,姚炜光等.我国禽脑脊髓病毒分离株全基因组的测定[J].病毒学报,2004,20(3):230~236.