

两株鸡传染性喉气管炎病毒的分离与鉴定

陈红英^{1,2}, 崔保安^{1,2}, 李新生¹, 廖仲磊¹, 段廷云³, 方丽云¹

(1.河南农业大学牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2.河南省动物性食品安全重点实验室, 河南 郑州 450002;
3.漯河出入境检验检疫局, 河南 漯河 462000)

摘要:从河南省长葛、荥阳等地采集的病鸡(临床疑似感染 ILTV)喉气管组织中分离得到两株病毒, 暂命名为 ILTV-CG 和 ILTV-XY。经人工接种易感鸡, ILTV-CG 组于接种后第四天、ILTV-XY 组于接种后第三天部分鸡只死亡, 并可致死部分鸡胚, 绒毛尿囊膜增厚且有大小不等、数量不一的白色痘斑; 两株病毒对乙醚、氯仿敏感; 在电镜下可观察到六边形、二十面体对称、有囊膜、具空心颗粒的病毒粒子; 根据 GenBank 中收录的 ILTV TK 基因核苷酸序列, 设计一对特异引物, 以两病毒株及参考株的 DNA 为模板进行 PCR 反应, 均扩增出完全一致的特异带, 扩增产物用 EcoR 酶切后的酶切图谱也完全一致。试验结果表明两分离株均为 ILTV。

关键词:鸡传染性喉气管炎病毒; 分离; 鉴定

中图分类号: S858.315.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-874X(2007)04-0076-03

Isolation and identification of two avian infectious laryngotracheitis virus isolates

CHEN Hong-ying^{1,2}, CUI Bao-an^{1,2}, LI Xin-sheng¹, LIAO Zhong-lei¹, DUAN Ting-yun³, FANG Li-yun¹

(1.College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2.Henan Animal Food Safety Key Laboratory, Zhengzhou 450002, China;
3. Luohu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Luohu 462000, China)

Abstract: ILTV-CG and ILTV-XY isolates were isolated from laryngotracheal mucosa of chickens which revealed respiratory symptom in Changge and Xingyang. Four of six chickens inoculated with ILTV-CG isolate died at the fourth day, three of six chickens inoculated with ILTV-XY isolate died at the third day. The isolates caused mortality of chick embryo and chicken allantochoerion membrane with white variola, were susceptible to diethyl ether and chloroform. The virus were observed to be hexagon virus particles with peplous, icosahedral symmetry in electron microscope. One pair of primers was designed according to avian infectious laryngotracheitis virus TK gene sequences in GenBank. Length of TK genes amplified from genome DNA extracted from ILTV-CG, ILTV-XY and control strain of ILTV were the same, and electrophoresis map for PCR products digested by EcoR I were the same. These results showed that ILTV-CG and ILTV-XY isolates were avian infectious laryngotracheitis virus.

Key words: avian infectious laryngotracheitis virus; isolation; identification

鸡传染性喉气管炎(ILT)是由传染性喉气管炎病毒(ILTV)引起的一种急性、烈性上呼吸道传染病, 病毒在喉头和气管粘膜上皮细胞中大量繁殖, 引起粘膜的炎症反应。此病可感染各品种不同日龄鸡只, 且在鸡群内传播快、发病急, 常表现为呼吸困难、气喘、咳出血样渗

出物、产蛋率下降, 其发病率极高, 死亡率较高, 给养鸡业带来严重的经济损失。自 1925 年 May 等首次在美国罗德岛发现该病以来, ILT 在全世界广泛流行^[1], 20 世纪 90 年代在国内已发现了该病^[2-3]。2005 年 3~4 月河南省长葛、荥阳等地的蛋鸡群突然发生以呼吸困难为主要症状的疾病, 数日内发病率高达 85%以上、死亡率近 17%、产蛋率下降 15%; 剖检可见上呼吸道有大量黏性分泌物, 有的含有血丝或血液; 蛋形明显变小, 蛋壳变薄易碎; 经细菌学检查未见可疑病菌。临床初步诊断为 ILT。为此, 我们采取病死鸡喉气管组织作病毒分离, 并对分离病毒进行了鉴定。

收稿日期: 2007-01-29

基金项目: 国家“十五”食品安全重大攻关专项 (2001BA804A30-11)

作者简介: 陈红英 (1965-), 女, 博士, 副研究员, E-mail: chhy927@163.com

通讯作者: 崔保安 (1948-), 男, 教授

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 9~11 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司, 经血清学检验未发现 ILTV 抗体的 13 日龄商品代罗曼蛋鸡由河南农业大学种鸡场提供; ILTV 疫苗株由河南省动物性食品安全重点实验室提供, ILTV 阳性血清由中国农科院哈尔滨兽医研究所提供; 限制性内切酶 EcoR、蛋白酶 K、Premix Taq DNA 聚合酶等购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 病毒分离试验

1.2.1 病料处理 采集长葛、荥阳等地病鸡(临床疑似感染 ILTV)的喉气管组织, 剪碎、研磨, 按 1:5(W/V) 加入生理盐水, 研磨成匀浆, -20℃ 冻融 3 次, 加青霉素、链霉素各 5 mg/mL, 4℃ 感作 4 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液为病毒分离材料。

1.2.2 鸡胚接种和传代 将上述两种病料的上清液按常规方法^[4]经绒毛尿囊膜(CAM)接种 10 日龄 SPF 鸡胚各 10 枚, 每枚接种 0.2 mL, 同时设生理盐水对照组。37℃ 孵育 7 天, 每天观察鸡胚的死亡情况。无菌取出 CAM, 检查 CAM 的病变情况及胚体情况, 取有典型痘斑的 CAM, 再以 CAM 途径接种下一代 10 日龄 SPF 鸡胚, 并传至第三代。

1.3 病毒鉴定试验

1.3.1 毒价测定 用生理盐水将传至第三代的两株病毒作 10 倍系列稀释, 每一稀释度各接种 4 枚 10 日龄 SPF 鸡胚, 每枚接种 0.2 mL, 37℃ 孵育, 观察 7 天。根据 CAM 病变情况, 按 Reed-Muench 法计算 EID₅₀。

1.3.2 中和反应 两分离株各取 200 EID₅₀, 分别与倍比系列稀释的 ILTV 阳性血清充分混合, 置 37℃ 感作 60 min。每一稀释度各接种 4 枚 10 日龄 SPF 鸡胚, 每枚接种 0.2 mL, 37℃ 孵育, 观察 7 天。根据 CAM 病变情况, 按 Reed-Muench 法计算中和价。

1.3.3 人工发病 将两分离株第三代的 CAM 分别剪碎匀浆, 用生理盐水按 1:10(W/V) 稀释制成悬液, 经气管内接种 13 周龄育成鸡各 6 只, 每只接种 0.2 mL; 同时取正常鸡胚 CAM 按同样的方法处理, 接种 2 只 13 周龄育成鸡作对照。接种后观察鸡只发病情况, 连续观察 7 天。

1.3.4 敏感性检验 (1) 对乙醚敏感性: 取 2 支灭菌试管, 各加入 1:10 稀释的病毒液 0.8 mL, 其中一支试管加入乙醚 0.2 mL, 另一试管加入生理盐水 0.2 mL 作对照, 用橡皮塞塞紧, 振摇成乳浊状, 室温静置 20 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸去上层乙醚, 用无菌棉塞

塞紧, 置 4℃ 下过夜。次日取两管病毒液各接种 4 枚 10 日龄鸡胚, 每枚接种 0.2 mL, 37℃ 孵育, 观察 7 天, 检查 CAM 病变情况。(2) 对氯仿敏感性: 取 2 个无菌试管, 各加入 1:10 稀释的病毒液 2.38 mL, 其中一支试管加入氯仿 0.12 mL, 另一支试管加入生理盐水 0.12 mL 作对照, 用橡皮塞塞紧, 振摇成乳浊状, 室温静置 20 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 每管各接种 4 枚 10 日龄 SPF 鸡胚, 每枚接种 0.2 mL, 37℃ 孵育, 观察 7 天, 检查 CAM 病变情况。

1.3.5 病毒形态观察 两病毒分离株的 CAM 分别按常规方法包埋、超薄切片, 用醋酸铀和柠檬酸铅染色后观察病毒粒子大小、形态等。

1.3.6 分离株分子生物学鉴定 根据 GenBank 中收录的 ILTV TK 基因序列(序列号为 S83714), 设计并合成 1 对引物: TK1 5' TCAAAGACTTCCTCCAGTG 3', TK2 5' GGAACATTACGAACCCAT 3'。引物跨越 TK 全基因, 理论跨幅为 1 183 bp, 序列 616 bp 处有一 EcoR I 限制性酶切位点。按常规方法^[5]提取病毒 DNA 进行 PCR 扩增, 同时提取正常鸡胚 CAM 基因组 DNA 进行 PCR 扩增作阴性对照。PCR 产物进行酶切分析, 取 10 μL 回收的 PCR 产物、2 μL 10×buffer (H)、6 μL 超纯水、2 μL EcoR 混合均匀, 于 37℃ 消化 1 h 后电泳分析酶切结果。

2 结果与分析

2.1 病毒分离情况

根据临床症状, 初步诊断长葛、荥阳等地的鸡群感染 ILTV, 将病鸡的喉气管病料接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 分离得到两株病毒, 分别命名为 ILTV-CG 和 ILTV-XY。

2.2 病毒鉴定结果

2.2.1 鸡胚死亡情况和剖检病变 将 ILTV-CG 和 ILTV-XY 在鸡胚上传 3 代, 各代次鸡胚均出现死亡, 剖检死胚, CAM 增厚且有大小不等、数量不一的白色痘斑, 胚体表面充血, 有的鸡胚头部和背部有点状出血, 尿囊液清亮, 细菌学检查为阴性。从表 1 可以看出, ILTV-CG 和 ILTV-XY 传至第三代时, 鸡胚死亡趋于规律, 集中于接种后 3~5 天死亡, 死胚率为 90%~100%, 而且 CAM 及胚体病变更为明显。

2.2.2 毒价中和价 据测定, 毒株 ILTV-CG 的 EID₅₀ 为 5×10^{63} EID₅₀/mL, ILTV-XY 的 EID₅₀ 为 5×10^{55} EID₅₀/mL。中和试验显示, ILTV-CG 和 ILTV-XY 均可被 ILTV 阳性血清中和, 按 Reed-Muench 法计算, 中和价均为 1/64。

表 1 ILTV- CG 和 ILTV- XY 接种鸡胚各代次每天的死胚数(只) 调查结果

代 次	ILTV- CG 处理							ILTV- XY 处理						
	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
第一代	0	3	2	1	0	0	0	0	2	1	2	0	0	0
第二代	0	1	2	1	2	1	1	0	1	1	2	1	1	0
第三代	0	0	2	3	2	1	0	0	0	2	2	3	0	0

注: 每一代次、每一处理接种 10 日龄 SPF 鸡胚各 10 枚, 接种后连续观察 7d。

2.2.4 人工发病情况 据观察, 对照组鸡无异常反应。而试验组鸡人工接种 ILTV- CG 和 ILTV- XY 48~72 h 后, 均出现张口呼吸、咳嗽和湿性罗音, 其中 ILTV- CG 组有 4 只鸡于接种后第四天死亡, 有 2 只于 7 天后逐渐好转; ILTV- XY 组有 3 只鸡于接种后第三天死亡, 有 1 只于接种后第四天死亡, 有 1 只 7 天后逐渐好转。剖检病死鸡可见喉头、气管黏膜水肿、充血或出血, 气管中有大量粘稠的分泌物, 脏器细菌学检查为阴性。

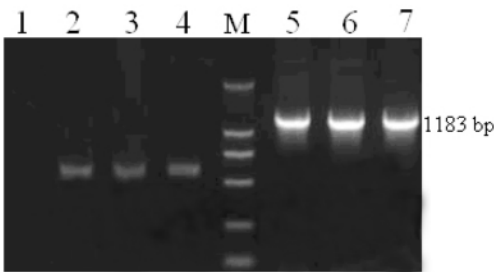
2.2.5 病毒敏感性 将经乙醚、氯仿处理的 ILTV- CG 和 ILTV- XY 分别接种鸡胚, 37℃下孵育 7 天, 未见鸡胚死亡, 剖检后 CAM 无痘斑病灶, 胚体发育正常, 无病变。试验结果表明, 分离株 ILTV- CG 和 ILTV- XY 经乙醚、氯仿处理后均丧失对鸡胚的感染力, 即 ILTV- CG 和 ILTV- XY 对乙醚、氯仿敏感。

2.2.6 病毒形态 观察结果显示, ILTV- CG 和 ILTV- XY 的病毒粒子均呈六边形、二十面体对称, 有囊膜, 为空心颗粒, 成熟的病毒粒子直径约 180~200 nm。

2.2.7 病毒分离株分子生物学鉴定结果 PCR 产物电泳结果显示, 两分离株 ILTV- CG 和 ILTV- XY 及参考株 ILTV 均扩增出一条特异带, 大小与预期扩增的 DNA 片段大小(1 183 bp)相符, 而对正常绒毛尿囊膜组织提取的 DNA, 扩增不出任何条带。PCR 扩增产物经 EcoR 限制性内切酶酶切消化均可得到长度为 616 bp 和 567 bp 的 2 条谱带(几乎重叠在一起), 与预期结果相符(图 1)。

3 结 语

近年来, 随着分子生物学技术的发展, PCR 技术和限制性内切酶酶切技术越来越广泛地被应用于病毒



1: 阴性对照; 2~4: EcoR 酶切 PCR 产物; M: DL2000 DNA marker; 5: ILTV 疫苗株 PCR 产物; 6: ILTV- CG PCR 产物; 7: ILTV- XY PCR 产物;

图 1 ILTV TK 基因的 PCR 产物和 EcoR 酶切电泳图

的检测, 该检测方法具有高度敏感、特异、快速和简便等特点。鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)属于疱疹病毒科, 其 TK 基因高度保守, 不同毒株 ILTV 相当保守, 扩增 TK 基因可用于对所有 ILTV 的检测。通过接种鸡胚的病变特点、中和试验、病毒敏感性、病毒形态及分子生物学鉴定等结果, 证实从长葛、荥阳等地鸡场采集的鸡气管组织病样分离所得的两株病毒物均为 ILTV。

参考文献:

[1] B.W.卡尔尼克编; 高福, 刘文军译.禽病学[M].北京: 北京农业大学出版社, 1991.
[2] 周永强, 潘琦, 路振香, 等.鸡传染性喉气管炎病毒的分离鉴定[J].中国畜禽传染病, 1995(5): 1-3.
[3] 何水林, 蔡玉书, 李新雨, 等.鸡传染性喉气管炎病毒的分离与鉴定[J].上海畜牧兽医通讯, 1994(3): 7-9.
[4] 殷震, 刘景华.动物病毒学[M].北京: 科学出版社, 1997.
[5] 娄高明. 检测伪狂犬病的 PCR 方法的建立及其在临床诊断中的应用[J].病毒学报, 2002, 28(2): 171- 176.

“ 茄果类新品种选育 ”等项目通过验收

受广东省科技厅委托, 广东省农业科学院于 2007 年 3 月 13 日主持召开了由广东省农科院蔬菜研究所承担的省科技攻关项目“茄果类新品种选育”、“彩色甜椒杂交一代新组合选育研究”、“抗病优质节瓜、苦瓜、小型冬瓜杂交一代新品种选育”的结题验收会。广东省科技厅农村处许茵副处长、斯恒副科长, 院科研处刘军博士及蔬菜研究所相关科研人员出席了会议。

验收专家组听取了项目组的综合报告, 审阅了相关资料, 并进行了提问和答辩。经认真讨论后一致认为, 项目全面完成了合同书中的各项技术经济指标, 以项目为依托育成的 5 个蔬菜新品种通过广东省农作物品种审定, 选育出 12 个蔬菜新品系, 获得较好的社会效益, 一致同意通过结题验收, 并对项目的研究工作提出了中肯的评价和改进意见。