

# 鸡传染性法氏囊病病毒的分离与鉴定

胡晓苗, 张丹俊, 汪丽, 李克勇

(1. 安徽省农业科学院畜牧研究所, 安徽合肥230031; 2. 安徽省五河县畜牧水产局, 安徽五河233300)

**摘要** 从安徽省合肥郊县疑似传染性法氏囊病的雏鸡体内, 分离到4株病毒。经血清学、人工感染、鸡胚接种、分子生物学试验鉴定, 结果表明, 分离物为传染性法氏囊病病毒(IBDV)。人工感染易感鸡试验表明, 4株中有2株具有超强毒株的致病特点。将其接种36日龄鸡后第2天精神沉郁, 拉白色或绿色稀粪, 发病率为100%。第3~4天出现死亡高峰, 死亡率达80%。剖检可见全身性出血素质, 法氏囊呈“紫葡萄”样外观。接种鸡胚后72~96h引起鸡胚全部死亡。另外2株接种易感鸡后, 发病率和死亡率都较低, 临床症状不典型, 出现亚临床传染性法氏囊病, 剖检病理变化不明显, 表明此2株毒力较弱。

**关键词** 传染性法氏囊病病毒; 分离; 鉴定

中图分类号 S851.34+7.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)23-6205-02

## Isolation and Identification of Infectious Bursal Disease Virus of Chicken

HU Xiao-miao et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Anhui Academy of Agricultural Science, Hefei, Anhui 230031)

**Abstract** 4 strains of virus were isolated from the infected birds from different chicken farms in Hefei, Anhui province. With serological test, embryo inoculation test, animal infection test and PCR for amplification of special segment, the isolates were identified as infectious bursal disease virus. Two strains of isolates were inoculated into the 36-day-old chickens. After two days' post-inoculation and the birds experienced depression and white or green watery feces. The death peak with 80% mortality appeared in 3~4 days of inoculation and the intensive hemorrhage occurred in visceral organ, especially in bursa. The chicken embryos of 9~10 days age were killed in 72~96 hours after the inoculation, which suggested that two isolates be characteristic of very virulent IBDV, other two isolates be artificially inoculated into susceptible birds which shared low mortality and morbidity with no evident lesion in bursa and other visceral organs. It suggested that two isolates fell into low pathological strains of infectious bursal disease virus.

**Key words** Infectious bursal disease virus; Isolation; Identification

鸡传染性法氏囊病(IBD)是由双RNA病鸡传毒科禽双RNA病毒属传染性法氏囊病病毒引起3~12周龄的雏鸡与青年鸡的高度接触性传染病, 该病原主要破坏鸡的中枢免疫器官——法氏囊<sup>[1]</sup>, 造成机体的免疫抑制, 导致感染鸡对其他致病因子的感染性增加和对其他疫苗的免疫应答能力下降, 给养禽业造成严重的危害<sup>[2-4]</sup>。由于普遍存在疫苗使用和免疫程序的混乱, 环境的严重污染及超强毒株(wIBDV)和变异毒株(vIBDV)的出现, 导致我国目前IBD仍然广泛流行, 既有wIBDV引起的大批量死亡<sup>[5,6]</sup>, 也有vIBDV导致的鸡群免疫抑制和与其他疾病的混合感染<sup>[7]</sup>, 在临床症状上呈现非典型特征, 这就给诊断带来很大的困难。笔者2005年4月中下旬从安徽省合肥郊县不同地点疑似传染性法氏囊病的鸡群中采集4份病料, 利用血清学、人工感染、鸡胚接种、分子生物学试验对IBD的分离与鉴定进行了探讨。

## 1 材料与方 法

**1.1 病料** 采自合肥郊县4份疑似IBD法氏囊病料。

**1.2 试验鸡和SPF鸡胚** 36日龄健康鸡, 由实验室自孵自养, 没进行过任何免疫。SPF鸡胚购自山东家禽研究所, 由实验室孵化至9日龄。

**1.3 IB DV 阳性血清与标准抗原** 购自哈尔滨兽医研究所。

**1.4 分子生物学主要试剂** UNQ 10柱式总RNA抽提纯化试剂盒、MMLV反转录酶(200 U/μl)、RNA酶抑制剂(40 U/μl)、Taq DNA聚合酶(5 U/μl)、PUC(MX) Marker、优质琼脂粉均购自上海生物工程有限公司。

**1.5 试验器材** 玻璃匀浆器、打孔器、高速离心机、PCR仪、微量移液枪、WH2微型旋涡混合仪、电泳槽等。

**1.6 病料的处理** 取病鸡法氏囊, 剪碎, 在玻璃匀浆器中研磨, 以1(5~10)加入灭菌生理盐水混匀, 制成匀浆。3 500

r/min离心10 min, 取上清液, -20℃反复冻融3次, 加青链霉素各1 000 U/ml, 4℃作用4 h, 血平板无菌检验阴性者, 置-20℃保存备用, 分别命名为HF1、HF2、HF3、HF4。

**1.7 琼脂扩散试验** 其中加样与扩散时, 在中心孔加入IBD阳性血清, 周边1、3、5、6孔滴加疑似IBD病料上清液, 2、4孔加IBD标准抗原作对照。

**1.8 人工感染试验** 将病料上清液经口服、滴鼻、点眼、涂抹肛门等途径接种36日龄的健康鸡, 每个病料分别接种8只, 设对照组, 接种剂量为0.5 ml/只, 记录发病特点, 剖检观察其病理变化。

**1.9 鸡胚绒毛尿囊膜接种试验** 将处理好的4份病料上清液分别接种5枚9~10日龄SPF鸡胚, 每枚鸡胚接种0.2 ml。24 h照卵1次, 接种后弃去24 h内死胚, 之后, 每12 h照胚1次, 记录120 h内死胚数目及死亡时间。活胚继续孵化至第7天, 剖检死胚及活胚, 观察病理变化。

**1.10 外源病毒排除试验** MDV、REV、ALV的检测: 利用实验室已建立的肿瘤病多重PCR方法对病料上清液进行MDV、REV、ALV排除检测。NDV的检测: 对第2代鸡胚绒毛尿囊膜悬液进行血凝试验。

**1.11 病毒核酸的提取** 使用UNQ 10柱式总RNA抽提纯化试剂盒按其产品说明的方法进行RNA的提取。取得的RNA在-20℃保存备用。最好立即反转录, 以防RNA降解。

**1.12 分子生物学快速诊断** 引物设计与合成: 根据已发表的IBDV各致病型毒株的序列, 在IBDV基因组的VP5和VP2重叠基因区设计一对引物P1和P2, 进行RT-PCR扩增, 预期扩增片段大小为222 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。试验前用RNase-free ddH<sub>2</sub>O溶解成40 μmol/L溶液作为贮存液。引物序列和长度如下: 上游引物(P1)为5'-ACA-GATTGTTCCGTTTCATACG-3'; 下游引物(P2)为5'-TCGA ACTGTAGTTC CATTG-3'。

**作者简介** 胡晓苗(1971-), 男, 安徽望江人, 在读硕士, 助理研究员, 从事兽医实验室工作。

收稿日期 2006-09-12

反转录(RT): $5 \times$  RT buffer  $5 \mu\text{l}$ , dNTP(10 mmol/L)  $2.5 \mu\text{l}$ , P1  $0.5 \mu\text{l}$ , RNasin(40  $\mu\text{mol/L}$ )  $0.5 \mu\text{l}$ , MMLV 反转录酶(200 U  $\mu\text{l}$ )  $1 \mu\text{l}$ , RNA 提取液  $10 \mu\text{l}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O  $5.5 \mu\text{l}$ 。

混匀,42 水浴反应62 min,94 10 min 后,反转录酶聚合酶链式反应(PCR): $10 \times$ PCR 缓冲液 $5 \mu\text{l}$ , dNTP(10 mmol/L)  $2 \mu\text{l}$ , P1  $1 \mu\text{l}$ , P2  $1 \mu\text{l}$ , Taq 酶(5 U  $\mu\text{l}$ )  $0.5 \mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub>  $3 \mu\text{l}$ , RT 产物  $10 \mu\text{l}$ , ddH<sub>2</sub>O  $27.5 \mu\text{l}$ 。循环参数:94 1 min,57 45 s,72 90 s,94 45 s,57 45 s,重复循环30 次,72 继续延伸5 min。

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物:电泳结束,用60~80 V 电压电泳约15 min 后在紫外检测箱中拍照,记录电泳结果。

## 2 结果与分析

**2.1 琼脂扩散试验** 48 h 后IBDV 阳性血清孔和待检样品孔之间出现乳白色清晰沉淀线。

**2.2 症状** HF1、HF3 接种鸡后出现的IBD 典型症状:精神沉郁、羽毛蓬乱、食欲减退、呆立、眼睑闭合、两翅下垂、粪便中水分增多,继而出现拉白色或绿色稀粪,发病率为100%,在接种后2 和3 d 分别死亡2 和4 只鸡。剖杀死亡鸡,可见鸡只脱水、消瘦;腿肌、胸肌有出血条纹或片状出血;法氏囊黄色化,胶胨样水肿、质脆,有的呈“紫葡萄”样外观。存活的2 只鸡在接种后第4 天剖杀,法氏囊黄色化,其他脏器无异常。正常对照鸡同样剖杀观察均无异常。HF2、HF4 接种鸡后,鸡只仅表现为食欲减退,精神沉郁。剖检时有的无肌肉出血变化,多数病鸡法氏囊缺乏特征性病变。

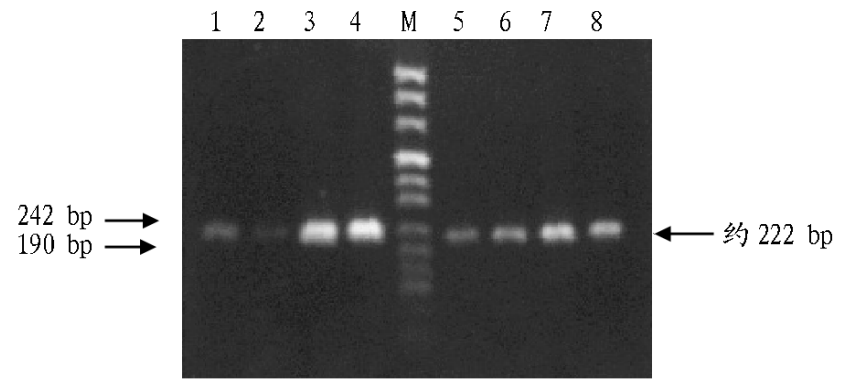
**2.3 鸡胚接种试验** HF1、HF3 接种鸡胚后死亡时间集中在72~96 h,死亡率达100%。死胚发育弱小,周身水肿,出血严重,以头和趾部出血尤为严重;尿囊膜增厚,出血和小玻璃泡状附着物;肝脏肿大、出血、坏死,常见绿色与白色相间的花斑肝;心脏苍白呈煮肉样,脾脏出血,肾脏肿大、出血、坏死,法氏囊偶见出血。HF2、HF4 接种鸡胚后死亡率20%~30%,病理变化不明显,未出现典型病理变化。

**2.4 外源病毒排除试验结果** MDV、REV、ALV 的检测结果:利用实验室建立的肿瘤病多重PCR 方法从病料上清液中未扩增出任何条带。NDV 的检测结果:第2 代鸡胚绒毛尿囊膜悬液血凝价为零。由此可判断鸡胚并非NDV 致死。

**2.5 IBD 的 RT-PCR 检测结果** 采用 RT-PCR 检测方法对4 份疑似IBD 感染的病料以及对应的鸡胚尿囊膜悬液进行了检测,结果均得到222 bp 的扩增带,与预期的扩增产物大小相符,见图1。

## 3 结论与讨论

(1) 研究表明,从合肥郊县疑似的鸡群中分离到的病原是鸡传染性法氏囊病病毒,其中HF1、HF3 具有超强毒株的特



注:M 为PUC MX Marker;1~4 为RT-PCR 分离结果;5~8 为鸡胚培养液的RT-PCR 结果。

图1 RT-PCR 扩增结果

点,HF2、HF4 毒力较弱。

(2) 目前安徽省合肥郊县使用的疫苗,有进口的,也有国内生产的,但免疫失败的情况时有发生,常常借助于本地分离毒株免疫鸡制备的高免蛋黄抗体加以补救,因此,有必要进一步开展合肥郊县IBD 的流行病学调查,这对IBD 的综合防制具有重要的意义。

(3) 近年来合肥郊县IBD 频繁暴发,给养鸡业带来巨大经济损失,笔者针对预防和治疗鸡传染性法氏囊病提出一些建议。

**预防:**免疫接种是控制的主要方法,可以提高雏鸡母源抗体水平,防止雏鸡早期感染。由于母源抗体水平、当地污染情况、鸡场性质、饲养管理方式不同,因此在生产实践中,应根据鸡场情况,综合考虑,选择适宜的疫苗和可行的免疫程序。要根据母源抗体的高低决定首免日龄,在10~15 日龄首免、滴口,同时免疫油乳剂苗,在20~21 日龄二免、饮水、倍量。种鸡在产前免疫1 次,在208~300 日龄时再免疫1 次,可保证出壳雏鸡有充足的母源抗体。

**治疗:**在发病早期用高免血清或卵黄抗体注射,选择有效药物治疗并发症或继发病,同时应用多维倍量饮水,还应加强饲养管理,减少各种应激因素。

## 参考文献

- [1] 于孝文,王宏卫,潘德良,等. 鸡传染性法氏囊病株活疫苗的免疫实验[J]. 中国家禽,2002,38(11):14-15.
- [2] 刘爵,刘尚高,周蛟. 鸡传染性法氏囊病超强毒LX 株的分离鉴定[J]. 中国兽医杂志,2000,26(5):13-15.
- [3] 吴健敏,兰美益,蒋冬福,等. 广西鸡传染性法氏囊病病原的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志,1999,25(12):15-17.
- [4] THERYP, VAN DEN BERG. Acute infectious busd disease in poultry areview[J]. Aian Pathology,2000(29):175-194.
- [5] 崔治中. 鸡群中免疫抑制性病毒蛋传病毒的多重感染[J]. 中国家禽,2000,22(5):17-18.
- [6] 李瑞芳,李立译. 用套式PCR 检测法氏囊中的法氏囊病毒[J]. 预防兽医学进展,1999,1(3):50-51.
- [7] 曹永长,毕英佐,梁志清,等. 超强传染性法氏囊病病毒株宿主保护抗原的分子特征[J]. 中国兽医学报,1998,18(6):521-526.