

鸡传染性支气管炎诊断方法研究进展及应用概况

栗 硕, 张桂红 *

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

中图分类号: S852.65

文献标识码: B

文章编号: 1008-0589(2013)01-0077-04

鸡传染性支气管炎(Avian infectious bronchitis, IB)是由冠状病毒科冠状病毒属中的IB病毒(IBV)引起的鸡的一种急性高度接触性呼吸道传染病。该病首先由Schalk等于1931年在美国发现^[1],我国于1972年由邝荣禄等首次在广东报道;目前该病呈世界性流行,是危害养禽业的重大传染病之一。目前已发现IBV近30种血清型,常见的有M41、Conn、Iowa97等,我国流行的IBV类型主要为M型^[2]。此外,新的血清型在不断的出现,不同血清型的IBV之间仅有部分或完全没有交叉免疫保护,不同血清型的临床症状和病理变化存在差异,伴有混合感染、继发感染等因素,给IB的免疫检测和免疫预防带来了很大困难。因此,为有效地控制IBV的流行,快速准确的检测方法区别不同IBV血清型致病毒株具有重要意义。

1 病原学诊断方法

1.1 病毒的分离鉴定 IBV的分离鉴定被认为是检测病原的金标准,因该方法比较耗时,而且所需材料成本较高,一般作为新方法建立的验证方法。常用气管环培养和细胞培养分离病毒。气管环培养时,采用18~20日龄鸡胚,制备1 mm厚气管环做旋转培养,3感染IBV 1 d~4 d,纤毛运动停止,继而上皮细胞脱落。该方法可以作为IBV分离和滴定,并适用于不易在鸡胚中增殖IBV分离株。在鸡胚气管组织培养中第1代即能够很快产生纤毛止动效应,无需多次传代培养;细胞培养分离病毒时,可用于IBV分离鉴定的细胞有Vero细胞、气管上皮细胞(CTE)、鸡胚肾细胞(CEK)等。2002年报道肾型IBV在Marc145细胞获得了适应。孙裴等利用气管灌注冷消化法分离培养出CTE,并报道肾型T株和呼吸型M41株均能够在CTE中获得适应培养,研究结果表明体外培养CTE

可以放大或显现出病毒在活体中不明显的细胞病变效应^[3]。

1.2 电镜的病毒检测 电镜技术可以直观、准确的鉴别病毒,根据病毒的形态、结构和大小等不同特征,可以做出诊断。将感染鸡组织、器官或分泌物做常规负染色进行电镜观察,IBV病毒粒子直径90 nm~200 nm,囊膜表面具有许多间距较宽的杵状突起,长约20 nm,排列成冠状。该方法直观、快速,但该方法比较复杂,一般仅限于以研究为目的的应用。

2 血清学诊断技术

2.1 传统血清学试验

2.1.1 琼脂扩散试验(AGP) 自1966年Woernle将AGP标准化以来,该方法被广泛应用于IBV的抗体检测,鸡群中IBV抗体阳性率上升则表示存在IBV新近感染发生^[4]。但该方法敏感性低,而且鸡群中免疫IBV后的沉淀性抗体持续时间短;同时,抗原的制备处理是试验成功的关键因素之一。封文海等认为,用感染IBV的鸡胚尿囊液和绒毛尿囊膜制备琼扩抗原,并以感染IBV后20 h~30 h的绒毛尿囊膜和感染IBV后48 h~60 h的尿囊液效果最佳^[5]。该方法简便快捷,特异性强,不受病毒亚型限制,但敏感性并未提高。

2.1.2 血凝抑制试验(HI) 该方法适用于IB的快速诊断,在临床中可作为辅助性的检测手段,具有简便、快速的特点。但血凝抑制试验需要一系列方法处理抗原,并且HI滴度与保护力在免疫期并不相关。所以,该方法用于IBV诊断仍需深入研究。

2.1.3 病毒中和试验(VNT) 通常应用已知病毒检查待检血清中的特异性抗体,该方法操作简便,可在鸡胚、鸡胚肾细胞或气管培养物中进行。判定标准有观察细胞

收稿日期: 2011-12-14

基金项目: 现代农业产业技术体系(CARS-36)

作者简介: 栗 硕(1987-),男,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,主要从事动物传染病研究。

* 通信作者: E-mail: guihongzh@scau.edu.cn

病变、免疫荧光染色等多个标准,但结果往往带有主观因素。

2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA 检测法已被广泛应用 IBV 的检测,ELISA 在 IB 的早期感染、持续感染中均得到应用,并可以同时用于特性抗原和抗体的检测。在诊断方面,定期采血监测正常鸡群中 IBV 抗体的 ELISA 效价,当鸡群出现呼吸症状后,根据 ELISA 抗体升高的程度判断是否存在感染 IBV。母源抗体的存在对疫苗的免疫效果产生影响,常应用 ELISA 检测方法对疫苗免疫后血清中抗体的情况进行调查。在敏感性方面,ELISA 与 HI 试验反应的曲线相似,但比较反应值,ELISA 的敏感性要高一些。Gibertoni 等用酵母表达 IBV 的 N 蛋白作为 ELISA 包被抗原来检测 IBV 抗体,取得了较好的效果^[6]。

2.2.1 间接 ELISA 该方法主要用于抗体 IgM 和 IgG 的检测,Wang 等利用原核表达的重组的 IBV 的 N 蛋白和部分 S 蛋白作为包被抗原建立了检测 IBV 抗体的 ELISA^[7]。但以 IBV 重组表达蛋白作为诊断抗原尚处于探索阶段,缺乏临床应用验证。磨美兰等将 ELISA、AGP 及 VNT 3 种检测 IBV 方法进行了比较,结果表明 ELISA 的敏感性最高。ELISA 的检测敏感性为 VNT 的 2.3 倍,为 AGP 的 188 倍^[8]。

2.2.2 Dot-ELISA 该方法是一种以硝酸纤维素膜等固相化基质膜为载体的 ELISA,用于检测抗体或抗原,具有简便、经济、结果判定直观等优点,但也存在结果判断主观性强的不足。刘红等建立了应用 Dot-ELISA 检测 IBV 的方法,并对病毒的最低检出量进行了研究。不仅检测纯化的病毒,而且可直接用于检测鸡胚尿囊液或病变组织,可以作为 IBV 早期诊断的方法^[9]。

2.2.3 单克隆抗体(MAb)夹心 ELISA 该方法利用 MAb 包被 ELISA 板,具有极高的特异性。刘滨东等用 MAb 夹心 ELISA 检测结果明显高于传统的鸡胚气管环法及鸡胚传代方法^[10]。

2.2.4 双抗夹心 ELISA 该方法分别利用多克隆抗体、MAb 作为一抗、二抗,并采用标记抗鼠 IgG 的为指示系统,建立的 ELISA 检测 IBV 的方法。该法比较适合于检测病料和感染鸡胚尿囊液中的 IBV,但要求病料中病毒含量达到 TOC 半数感染量为 10^5 时方能够检出^[11]。

2.3 免疫胶体金诊断技术 胶体金免疫层析法是将免疫胶体金技术与层析分析技术有机结合起来建立的一种快速免疫学检测技术。该技术最早用作电镜的示踪标记物,并逐步应用于禽病检测,朱瑞良等用免疫胶体金试纸膜进行快速检测传染性法氏囊病毒(IBDV)的研究,试验结果能够识别不同的 IBDV 株^[12]。王泽霖等采用胶体金标记纯化的羊抗鼠 IgG,建立了一种对 IBV 进行检测的银加

强金标免疫技术(SECGA)^[13]。苏磊等利用 IBV MAb 及兔抗 IBV 多抗建立了用于检测 IBV 的免疫胶体金诊断试纸条技术,该技术通过与 IBV 双抗夹心 ELISA 法比较,具有较高的特异性、灵敏性、稳定性,并且可在加入待检样品 15 min 后即可判定结果^[14]。

3 病毒 RNA 诊断技术

3.1 RT-PCR PCR 技术用于 IB 诊断使诊断技术提高到基因水平,该方法具有简便快速和敏感性、特异性强的特点。Jackwood 等提取了分属于 5 个血清型的 8 株 IBV 的 RNA,将其反转录成 cDNA 后,用 PCR 扩增,利用生物素标记的探针进行斑点杂交,结果这 8 株病毒均被检出^[15]。陆苹等对四川分离的多株 IBV S1 基因和 N 基因用 RT-PCR 进行了扩增,结果证明 RT-PCR 检测方法具有敏感性,特异性,适用于不同来源及不同血清型 IBV 的检测^[16]。潘盛通过在 IBV 非结构基因 3abc 的保守区域设计一对引物,建立和优化了一步法 RT-PCR,并在此基础上组装成一步法 RT-PCR 检测试剂盒。通过对 8 株 IBV 国内分离株和 3 株国内标准株以及 IB DNA 疫苗(S1、M 和 N 3 种基因混合)和 4 株鸡常见病原体的检测,表明该试剂盒具有极高的特异性^[17]。王非等建立了鸡传染性喉气管炎(IL)、IB、新城疫(ND)和禽流感(AI)的多重 RT-PCR 鉴别诊断方法,通过 RT-PCR 方法能检测出极微量的病毒核酸,具有特异性强,敏感性高的特点,但由于弱毒疫苗株在宿主体内的复制,有可能造成多重一出现假阳性结果,对疫情的准确判定造成影响^[18]。

3.2 实时荧光 PCR 实时定量 PCR 与普通 PCR 相比,其特异性和灵敏度都更高。崔沛首次在国内建立了对 IBV 的实时荧光 PCR 检测体系,该方法有效提高了反应特异性和灵敏度,更好地避免了假阴性结果,使 PCR 技术检测痕量样品的能力进一步提高^[19]。刘乔然等通过 IBV tl/CH/LDT3/03 株的 N 基因设计建立了检测 IBV 核酸的 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法,其敏感性比常规 PCR 相比高 100 倍^[20]。Jackwood 等根据应用实时荧光 PCR 中的荧光共振能量转移技术设计多种特异性探针,根据各种探针的裂解曲线不同而进行待检病原的区分,建立了同时检测 9 个 IBV 株的实时荧光 PCR 方法,结果显示标准病毒株均能被很好的区分^[15]。

3.3 DNA 指纹图谱分析 DNA 指纹图谱分析是 80 年代末期发展起来的一项技术,根据检测物在图谱的产物位置上存在差异,可以区别不同病毒株或者同一病毒株的变异株。Kusters 等对 12 株分离自荷兰的 IBV 进行寡核苷酸指纹图谱分析结果显示,病毒株核苷酸序列的同源率均在 95 % 以上。Butcher 等利用该方法对 DPI 株 10 代

及 100 代鸡胚传代物的 T 株、M41 株进行了分析结果显示, 这 4 种图谱均存在差异。该方法一般应与其他方法相结合来进行 IBV 的诊断。

3.4 基因芯片技术 基因芯片技术是近年来分子生物学与微电子学等多学科交叉融合而成的一项高新技术。DNA 芯片技术检测疾病具有高通量、并行性和结果判读客观、准确和信息化的特点。陈凤梅通过分子克隆操作, 获得 NDV、AIV、IBV、ILT、MG 各一段特异性核苷酸序列, 用芯片点样仪点样, 同时设系统监控的参照基因, 制备成“禽呼吸道疾病诊断基因芯片”。该方法敏感性高, 重复性可以达 90 %~100 %, 但该检测方法要求非常严格, 易出现假阳性和假阴性^[21]。曹三杰等年构建制备了 NDV、IBV、AIV 和 IBD 等禽类主要疫病的基因检测基因芯片, 该方法具有同步检测和鉴别诊断的功能^[22]。

3.5 限制性酶切片长度多态性技术(RFLP) RFLP 技术是 20 世纪 80 年代中期发展起来的一种最早的分子标记技术, 该技术与 RT-PCR 结合, 可针对 IBV 基因组的高度变异的特点, 对其进行快速诊断和分型。Lin 等应用该方法对 IBV 的 S2 基因分型方法与 IBV 的 VN 方法比较, 两方法很相符^[23]。磨美兰等用两种引物结合的方法, 对 8 个 IBV 分离株进行扩增, 并进行 RFLP 分析, 结果可以将其细分为 7 个基因型, 更好地区分了不同的 IB 毒株^[24]。Kwon 等最早用 RT-PCR 技术获取了含 S1 基因序列的 11 个病毒血清型的 1700bp 的序列, 进行了 RFLP 检测, 结果与用中和试验得出的病毒血清分型一致并对 IBVS1 基因进行 RT-PCR/RFLP 分析已在血清学分类上得到了广泛应用^[25]。Majdeni 等在 IBV 的检测中对比 N 基因和 3'UTR 的 RT-PCR 和 RFLP 方法对比 S1 基因的效果, 结果表明前者在 IBV 不同血清型分类检测中具有较高的敏感性^[26]。

3.6 环介导逆转录等温扩增技术(RT-LAMP) RT-LAMP 技术是建立在基础 PCR 基础上的一种新型的核酸检测的方法, 具有简便、快速高效、敏感性强等优点。陈豪泰等建立了检测 IBV 的 RT-LAMP 检测方法最小检测病毒浓度为 10 ng^[27]。Luo 等通过对 IBV 高度保守的基因引物设计建立的 RT-LAMP 对 IBV 检测的敏感性比 RT-PCR 高达 10 倍^[28]。

4 小 结

目前 IB 病原学诊断、血清学诊断、分子生物学检测方法的研究在广度和深度上已有了较大进展, 但各种方法各有优缺点, 每一种方法都难完全做到快速、简便、灵敏、特异、经济和实用。因此对 IBV 感染的诊断必须建立在临床初步诊断的基础上, 结合实验室诊断手段, 快速确定病原, 然后根据判定结果, 制定相对应的免疫

程序, 达到快速防治 IBV 感染的目的。

参考文献:

- [1] Cavabagh D. Coronavirus avain infectious bronchitis virus [J]. Vet Res, 2007, 38(2): 281-297.
- [2] 张宁. 鸡传染性支气管炎病毒不同血清型交互免疫试验研究 [D]. 河南: 河南农业大学, 2010.
- [3] 孙裴, 张彦明, 张浩, 等. 鸡气管上皮细胞分离培养及传支病毒在其培养特性研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 861-867.
- [4] Woernle H. The use of the agar-gel diffusion technique in the identification of certain avian virus diseases [J]. Veterinarian, 1966, 4(1): 17-28.
- [5] 封文海, 陈德威. 琼脂凝胶扩散试验检测鸡传染性支气管炎抗体[J]. 中国兽医杂志, 1993, 12(19): 6-7.
- [6] Gibertoni A M, Montassier M F, Sena J A, et al. Development and application of a saccharomyces cerevisiae-expressed nucleocapsid protein -based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against infectious bronchitis virus [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1982-1984.
- [7] Wang Xiu-qing, Schnitzlein W M, Tripathy D N, et al. Construction and immunogenicity studies of recombinant fowl poxvirus containing the S1 gene of Massachusetts 41 strain of infectious bronchitis virus [J]. Avian Dis, 2002, 46(4): 831-838.
- [8] 磨美兰, 李孟, 陈秋英, 等. 鸡传染性支气管炎病毒快速诊断方法的建立[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(8): 30-32.
- [9] 刘红, 吴延功, 等. 应用 Dot-ELISA 检测鸡传染性支气管炎病毒的研究[J]. 中国动物检疫, 1998, 3: 3-8.
- [10] 刘滨东, 孔宪刚. 单抗夹心 ELISA 法检测鸡传染性支气管炎病毒的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1997, 1: 36-39.
- [11] 李锋, 王锡坤. ELISA 双抗夹心法检测鸡 IBV 的研究[J]. 中国兽医科技, 1992, 4: 5-7.
- [12] 朱瑞亮, 崔治中. 用免疫胶体金试纸膜检测 IBDV 的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(3): 227-231.
- [13] 王泽霖, 王新卫, 刘守川, 等. 银加强金标免疫技术在及传染性支气管炎病毒检测中的应用[J]. 河南农业大学学报, 2005, 39(2): 201-205.
- [14] 苏磊. 鸡传染性支气管炎免疫胶体金诊断试纸研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [15] Jackwood M W, Hilt D A, Callison S A, et al. Detection of infectious bronchitis virus by Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction and identification of a quasispecies in the beaudette strain [J]. Avian Dis, 2003, 47: 718-724.
- [16] 陆苹, 张斌, 朱建国. RT-PCR 检测及传染性支气管炎病毒方法的建立[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2003, 21: 10-13.

- [17] 潘盛. 禽传染性支气管炎病毒一步法 RT-PCR 检测试剂盒的研制和应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.
- [18] 王非, 蒋建一, 华炯刚, 等. 鸡 ILV、IBV、NDV 和 AIV 多重 RT-PCR 检测方法的初步建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(4): 37-40.
- [19] 崔沛. 鸡传染性支气管炎病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立[D]. 郑州: 河南农业大学, 2007.
- [20] 刘乔然, 刘胜旺. 鸡传染性支气管炎病毒 Real-time PCR 方法的建立及其对感染鸡体内病毒的检测[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(8): 638-641.
- [21] 陈凤梅. 鸡呼吸道传染病基因芯片诊断方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(12): 1358-1362.
- [22] 曹三杰, 文心田, 肖驰, 等. 几种主要禽疫病诊断基因芯片的制备及初步应用[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(4): 356-360.
- [23] Liu Z, Kato A, Kudou Y, et al. A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis [J]. Arch Virol, 1991, 116, 19-31.
- [24] 磨美兰, 李康然, 韦平, 等. RT-PCR 及 RFLP 分析技术对鸡传染性支气管炎病毒诊断和 S1 基因分型研究[J]. 中国预防兽医学报, 2001, 23(4): 277-283.
- [25] Kwon H M, Jackwood M W, Gelb J Jr. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis [J]. Avian Dis, 1993, 37: 194-202.
- [26] Majdani R, Mardani K, Morshedi A, et al. Molecular typing of N gene and 3'untranslated region of IBV field isolates and vaccine strains using RT-PCR and RFLP [J]. Comp Clin Pathol, 2012, 21: 283-287.
- [27] Chen Hai-tai, Zhang Jie, Ma Yan-ping, et al. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for infectious bronchitis virus in infected chicken tissues [J]. Mol Cellular Probes, 2010, 24: 104-106.
- [28] Luo Hong-bin, Zhu Dao-zhong, Xue Chun-yi, et al. An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of infectious bronchitis Virus [J]. J Anim Vet Advan, 2012, 11(14): 2398-2402.

(本文编辑: 赵晓岩)