

鸡传染性支气管炎病毒 H₁₂₀ 株细胞适应毒的培育研究

张玉杨¹, 肖治军¹, 王四保¹, 郭成留¹, 王治方¹, 刘文惠¹, 曹春景¹, 李 丽²

(1. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 2. 南阳市畜牧兽医工作站, 河南 南阳 473068)

摘要: 以 IBH₁₂₀ 鸡胚毒适应成纤维细胞 (CEF) 单层, 培养出 IBH₁₂₀ 细胞弱毒株。电镜观察, 可见典型的冠状病毒粒子。IBH₁₂₀ 细胞弱毒株经细菌、霉菌、支原体、鸡白血病病毒检测均为阴性, 且具有 IB 病毒特异性。CEF 单层接毒后 48 h 左右病毒增殖达到高峰。随着细胞传代次数的增加, C₄~C₁₀ 代 H₁₂₀ 株细胞毒的毒价 (TCID₅₀) 逐步增高而趋于稳定, C₄~C₁₀ 代细胞毒的 TCID₅₀ 稳定在 $10^{7.35 \sim 8.0}$ mL 之间, 而 C₅~C₁₀ 代 IBH₁₂₀ 细胞毒的 EID₅₀ 呈下降趋势, 变动范围在 $10^{7.3} \sim 10^{6.5}$ mL。以 $10^{3.5}$ TCID₅₀/只和 $10^{4.5}$ TCID₅₀/只的剂量, C₄, C₈, C₁₀ 代毒分别滴鼻接种 3 日龄敏感鸡, 免疫鸡的攻毒保护率为 80%~100%, 病毒分离回收率分别为 20% 和 0。

关键词: 鸡传染性支气管炎 H₁₂₀ 细胞弱毒株; 繁殖曲线; 免疫原性; 免疫保护率

中图分类号: S436.612 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)05-0096-04

A Study of Culture Virus of Chicken Infectious Bronchitis Virus H₁₂₀ Strain in Cells

ZHANG Yu-yang¹, XIAO Zhi-jun¹, WANG Si-bao¹, GUO Cheng-liu¹,
WANG Zhi-fang¹, LIU Wen-hui¹, CAO Chun-jing¹, LI Li²

(1. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute of Henan Academy of
Agricultural Science, Zhengzhou 450002, China; 2. Animal Husbandry and
Veterinary Medicine Station of Nanyang City, Nanyang 473068, China)

Abstract: Cellular attenuated strain of infection bronchitis H₁₂₀ strain (IBH₁₂₀) was cultured successfully with virus which cultured on the chicken embryo. Atypical Coronary viral partical were observed by electric microscope. IBH₁₂₀ cellular attenuated strains were negative after examination bacterium, mildew, mycoplasma, chicken leukemia virus, moreover, they speciticity of IB virus. Virus proliferate could reach peak after 48 h. When CEF cells infected with IBH₁₂₀, TCID₅₀ of C₄~C₁₀ generation of H₁₂₀ strain cellular attenuated virus rose gradually and stabilized with increasing generation. TCID₅₀ of C₄~C₁₀ generations were between $10^{7.35}$ and $10^{8.0}$, but EID₅₀ of C₅~C₁₀ generation were degressive trend. The variational range was between $10^{7.3}$ and $10^{6.5}$. The immunogenicity of IBH₁₂₀ cellular attenuated virus was checked. The result demonstrated that three days old chickens were inoculated in nose with $10^{3.5}$ TCID₅₀ and $10^{4.5}$ TCID₅₀ of C₄, C₈, C₁₀ generation virus in each chicken respectively, their protection rate was between 80% and 100%. The virus separation recovery rate was 20% and 0 respectively.

Key words: Cellular attenuated strain of IBH₁₂₀; Breeding curve; Immunogenicity; Immune protection rate

鸡传染性支气管炎 (IB) 是严重危害鸡的主要传染病之一。为了避免在 IB 防治过程中胚源性污染及母源抗体的干扰以保证疫苗质量, 简化疫苗生产

程序及增加疫苗品种, 我们开展了 IBH₁₂₀ 鸡胚毒在 SPF 鸡胚制备的 CEF 单层上感染、繁殖研究。据文献报道, IBV 鸡胚适应毒或经鸡胚多次传代的 IBV

收稿日期: 2005-04-12

基金项目: 河南省重大科技攻关项目 (0322011200)

作者简介: 张玉杨 (1972), 女, 河南开封人, 本科, 助理研究员, 主要从事畜禽传染病的研究。

可在鸡肾细胞(CK)、鸡胚肾细胞(CEK)或鸡胚细胞(CE)中繁殖、形成空斑,甚至产生细胞病变(CPE)。S. R. Hopkins^[1]把美国本土的主要 IBV 分离株(包括 M₄₁ 株)和澳大利亚 T 株在 CK 细胞上连传 6 代后产生 CPE,从而把 IBV 的 CK 细胞培养技术发展为蚀斑减数中和技术,用于病毒的纯化和分型;其研究结果还显示,培养介质中加入牛血清或正常鸡血清均会降低 IBV M₄₁ 等 IBV 的蚀斑总数。刘文惠等^[3,4]报道,IBV H₁₂₀ 株可适应鸡全胚细胞(CE),其适当代次的细胞培养毒具有较好的免疫原性。因此,我们对 IBV 鸡胚尿囊毒液进行预处理和控制接毒后维持液的酸碱度(pH)、牛血清和胰酶的量及培养温度等因素,使 IBV H₁₂₀ 株适应 CEF 细胞,并产生 CPE。这种 CPE 于初代次培养表现与 M₄₁ 株在 CK 细胞上产生的 CPE 相似^[1]。通过电镜观察、纯粹性和免疫原性测定,证实这种 CPE 为 IBV H₁₂₀ 株病毒所引起。以适宜代次的 IBV H₁₂₀ 细胞弱毒免疫雏鸡,应用安全,免疫效果理想。

1 材料和方法

1.1 毒种

1.1.1 种毒 IBV H₁₂₀E₄ 鸡胚弱毒株由中国兽药监察所提供,毒价(EID₅₀)为 $10^{-7.0}$ mL。

1.1.2 强毒 IBV M₄₁E₅ 强毒株(EID₅₀ $\geq 10^{-7.0}$ mL)由中国兽药监察所提供。

1.2 培养基及诊断试剂

检验细菌、霉菌、支原体培养基(T·G、G·A、G·P、改良 Frey 氏液体与固体培养基),鸡滑液囊支原体参照株(MS)及 IBV M₄₁株高免血清购自中国兽药监察所。

1.3 SPF 鸡胚和试验鸡

制备鸡胚细胞和测定毒价用的 SPF 鸡胚均为从北京梅里亚公司和山东家禽研究所购进,SPF 试验鸡为 SPF 鸡胚孵化 20 d,经消毒转入 SPF 隔离器内饲养。

1.4 鸡胚成纤维细胞(CEF)的制备

取 9~11 日龄的 SPF 鸡胚,参照 Asilim 氏鸡胚皮肤细胞制备技术制备 CEF。

1.5 IBV H₁₂₀E₄ 鸡胚毒的传代及毒价测定

按常规方法制备 3 批(NO. 1~3) H₁₂₀E₅ 毒;取 10^{-2} 0.1 mL E₅ 毒接种 10 日龄 SPF 鸡胚传至 H₁₂₀E₈ 代。按文献[7]的方法,用 SPF 鸡胚测定 NO. 1~3 E₅ 代毒及 H₁₂₀E₈ 代毒的毒价(EID₅₀)。

1.6 IBV H₁₂₀ 株的细胞培养与传代

按常规方法进行细胞培养,将冻融 3 次后经细菌检验和血凝试验阴性的培养物预留为毒种或用于测定,再按上述方法连续传至一定代次。

1.7 IBV H₁₂₀ 株细胞适应毒的鉴定

1.7.1 血凝性测定 选择一定代次细胞培养毒(同时设未接毒的 CEF 对照)反复冻融 3 次后,按文献[5]的方法处理。同时用不经磷酸酯酶 C 处理的 IBV,直接做 HA 试验。

1.7.2 对鸡胚的毒力测定 选择一定代次细胞培养毒作 10 倍递增稀释,0.1 mL/胚,经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每个稀释度接种鸡胚 5 枚以上,37 °C 孵育 6 d,测定 EID₅₀^[7]。

1.7.3 CEF 的感染剂量(TCID₅₀)测定 将一定代次细胞培养毒作 10 倍递增稀释,每个滴度接种 CEF 单层 5 瓶,37 °C 继续培养,按 Reed-Muench 法计算其 TCID₅₀。

1.7.4 IBV H₁₂₀ 株细胞培养毒纯净性及禽白血病毒病的检验 将 IBV H₁₂₀ 株细胞培养毒按含毒量作适当稀释,与等量 IBV 特异性血清完全中和后,接种 CEF 单层,连传 3 代,检查每代细胞 CPE 及血球吸附性,并对第 3 代培养物作双抗体夹心酶联免疫吸附试验(DAS-ELISA)。

1.7.5 免疫原性及最小免疫剂量测定 免疫原性比较: 取 IBV H₁₂₀ 株细胞毒(C₄, C₈, C₁₀)均以 $10^{3.5}$ TCID₅₀/0.1 mL 只剂量饮水和滴鼻两种方式分别接种 3 日龄 SPF 鸡,同时设非免对照鸡,与免疫鸡同条件下隔离饲养。

免后 14 d,免疫鸡和对照鸡均用 10^{-1} M₄₁ 强毒 0.1 mL/只滴鼻攻毒,攻毒后第 2 d,逐一提起在耳旁听有无呼吸啰音及检查有无神经症状或死亡,共观察 10 d,记录两组鸡中出现临床反应(呼吸啰音或神经症状或死亡)的鸡数。

攻强毒后 4 d,扑杀部分免疫鸡和对照鸡,采集其气管和肺制成 1:2 混悬液,取其无菌上清液 0.2 mL/胚经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚分离 IBV 病毒。

免后 14 d,采取两组鸡血清用固定病毒稀释血清法测定中和抗体,中和病毒用 10^{-3} M₄₁ 强毒。

1.7.6 IBV H₁₂₀ 株细胞培养毒的电镜观察 取细胞病变明显且 TCID₅₀ 达到 10^{-6} ~ 10^{-7} mL 的 C₄~C₈ 代 H₁₂₀ 株细胞培养物,反复冻融 3 次后,超速离心。取沉淀物加缓冲液悬浮,悬浮液吸附于铜网上后,用磷

钨酸染色,在 JEX-1200EX 透射电子显微镜下观察病毒负染色形态。

1.8 IBV H₁₂₀株细胞培养毒的繁殖曲线测定

取 CPE 明显且 TCID₅₀达 10⁻⁶ mL 以上的 H₁₂₀株细胞培养毒,按细胞维持液 5% 的量接入 SPF CEF 细胞致密单层数瓶,同时设不接毒 CEF 单层数瓶,37 ℃培养,于接毒后 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 h, 随机抽样,同时将接毒 CEF 致密单层及非接毒 CEF 单层收冻于-15 ℃。各收冻培养物反复冻融 3 次后,接种于 SPF 鸡胚 CEF,测定 TCID₅₀。

2 结果与分析

2.1 IBV H₁₂₀ E₅, E₈ 鸡胚毒的毒价测定结果

测得 IBV H₁₂₀ E₅ (NO. 1、NO. 2、NO. 3) 和 H₁₂₀ E₈ 的毒价 (EID₅₀/mL) 分别为 10^{-8.7}, 10^{-8.5}, 10^{-8.8}, 10^{-8.9}。

2.2 IBV H₁₂₀株感染的细胞病变(CPE)及其细胞培养毒的毒价

接种 IBV H₁₂₀毒后,细胞第 1 代未出现 CPE,第 2, 3 代有轻微的细胞融合病变和脱落,第 4 代出现明显的 CPE,表现为细胞变暗、胞质黑色颗粒增多、细胞融合、聚堆及出现折光性强的圆缩细胞,漂浮脱落出现空斑。75% 的细胞发生病变时收毒。各代次细胞培养毒的毒价测定结果见表 1。

表 1 IBV H₁₂₀株各代次细胞培养物的毒价检测结果

Tab 1 The poisonous price examination of generations cellular cultural IBH₁₂₀ strains

培养代次 Cultural generation times	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₁₀
EID ₅₀ /mL	10 ^{-5.6}	10 ^{6.0}	10 ^{7.3}	10 ^{7.3}	10 ^{7.2}	10 ^{7.0}	10 ^{6.7}	10 ^{6.5}
TCID ₅₀ /mL	10 ^{-5.9}	10 ^{6.4}	10 ^{7.35}	10 ^{7.5}	10 ^{7.65}	10 ^{7.7}	10 ^{7.8}	10 ^{8.0}

表 1 结果显示,随着细胞传代次数的增多,H₁₂₀

株细胞培养毒的毒价 TCID₅₀在 C₁₀代以前逐步增高而趋于稳定,C₅ 代后,其 TCID₅₀ ≥10^{7.5} mL; 而 EID₅₀ 从 C₆ 代开始显示出下降的趋势。

2.3 IBV H₁₂₀株细胞培养毒血凝性测定结果

IBV H₁₂₀株细胞培养毒不凝集 1% 鸡红血球,但经磷酸酯酶 C 处理后呈现出低滴度(1: 8~ 1: 16) 的鸡红血球凝集性,该结果(表 2) 与文献[3] 报道的结果相符合。

表 2 各代次 IBV H₁₂₀株细胞培养毒血凝性测定结果

Tab 2 The hemagglutinating examination of cellular IBVH₁₂₀ strains

培养代次 Cultural generation times	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₈	C ₁₀
IBV H ₁₂₀						
未经酶处理 Not treatwith enzyme	-	-	-	-	-	-
经酶处理 Treat with enzyme	+	+	+	+	+	+
正常 CEF 细胞 Normal CEF cell						
未经酶处理 Not treatwith enzyme	-	-	-	-	-	-
经酶处理 Treat with enzyme	-	-	-	-	-	-

注: + 阳性; - 阴性 Note: + Positive; - Negative

2.4 IBVH₁₂₀细胞毒的纯净性检验

2.4.1 细菌、霉菌、支原体检验结果 C₄, C₅, C₈ 代毒样接种到 T·G、G·A、G·P、改良 Frey 氏液体和固体培养基后,在观察期内均未见细菌、霉菌、支原体生长。

2.4.2 IBH₁₂₀细胞毒种中禽白血病病毒检验结果经中国农业大学实验动物研究所检验,受检样品总数 95 份,均没出现 CPE 及血球吸附, DAS-ELIS 检测,阴性 95 份,阳性 0 份,阳性率 0。

2.5 免疫原性检验结果

IBV H₁₂₀株细胞培养毒以两种途径免疫鸡 14 d 后,各组分别以 3 种方法检验其免疫原性,结果分别见表 3、4。

表 3 IBV H₁₂₀株细胞培养毒免疫原性检测结果

Tab 3 The immunogenicity examination of cell cultural IBVH₁₂₀ strains

代次 Generations times	免疫途径 Immunity path	免疫鸡日龄	攻毒日龄	攻毒剂量 (10 ⁻¹ M ₄₁ 滴鼻) Offend the poison dose	临床反应(发病数/ 攻毒数) The clinic respond(The number of fall ill/ The number of offend the poison)				病毒回收率(阳性数/ 检测鸡数) The virus recovery rate (positive number/ examin number)			
		(d)	(d)									
		Days old of immunity chicken	Days old of offend the poison									
					10 ^{2.5}	10 ^{3.5}	10 ^{4.5}	对照	10 ^{2.5}	10 ^{3.5}	10 ^{4.5}	对照
C ₁₀	滴鼻 Inoclated in nose	3	17	0. 1mL/ 只	3/ 10	1/ 10	0/ 10	5/ 5	2/ 5	1/ 5	0/ 5	5/ 5
	饮水 Drinking	3	17	0. 1mL/ 只		2/ 10		5/ 5		2/ 5		5/ 5
C ₈	滴鼻 Inoclated in nose	3	17	0. 1mL/ 只	2/ 10	1/ 10	0/ 10	5/ 5	2/ 5	1/ 5	0/ 5	5/ 5
	饮水 Drinking	3	17	0. 1mL/ 只		2/ 10		5/ 5		2/ 5		5/ 5
C ₄	滴鼻 Inoclated in nose	3	17	0. 1mL/ 只		1/ 10		5/ 5		1/ 5		5/ 5
	饮水 Drinking	3	17	0. 1mL/ 只		1/ 10		5/ 5		1/ 5		5/ 5

注: * TCID₅₀/ 只

表 3 显示, C₁₀, C₈, C₄ 代毒以 10^{3.5} TCID₅₀/只滴鼻或饮水免疫后 14 d, 攻强毒观察 10 d。有 20% 的免疫鸡出现 1 次以上的呼吸啰音, 未见死亡; 对照鸡攻毒后, 全部鸡出现明显呼吸道症状。当以同样的剂量免疫鸡时, 滴鼻的免疫效果略好于饮水途径。10^{3.5} TCID₅₀/只可作为 IBV H₁₂₀ 株细胞培养毒的最小免疫剂量, 10^{4.5} TCID₅₀/只可作为 1 个免疫剂量。

表 4 免疫鸡血清中和抗体测定

Tab 4 The neutralizing antibody examination of immunize chicken's serum

方法 Method	出现 IBV 阳性鸡胚(死亡+卷曲僵小胚)比率 The rate of positive chicken's embryos (Death and curl short and small embryo)					
	饮水组 Drinking set			滴鼻组 Inoculated in nose set		
	C4	C8	C10	C4	C8	C10
免疫鸡血清原液+10 ⁻³ M ₄₁	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Immunity chicken serum+10 ⁻³ M ₄₁						
免疫鸡 E ₂ 血清+10 ⁻³ M ₄₁	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
Immunity chicken's E ₂ serum+10 ⁻³ M ₄₁						
对照鸡血清原液+10 ⁻³ M ₄₁			5/5			5/5
Control chicken's serum+10 ⁻³ M ₄₁						
10 ⁻³ M ₄₁ 病毒对照液+10 ⁻³ M ₄₁						5/5
virus control Liquid						

表 4 显示, 免疫后 14 d 均能测出血清中和抗体, 其中滴鼻组免疫鸡血清 1:2 稀释与 10³M₄₁ 病毒中和接种鸡胚后均能达到 100% 保护。

2.7 IBV H₁₂₀株细胞培养毒的电镜负染结果

由哈尔滨兽医研究所电镜室完成(图 1)。图 1 显示, IBV H₁₂₀株细胞培养物中存在单一的冠状病毒粒子群。



图 1 IBV H₁₂₀株细胞培养毒电镜负染照片

Fig 1 The electric microscope negate dye photograph of cellular virus IBH₁₂₀ strains

2.9 IBV H₁₂₀株细胞毒的繁殖曲线

于 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 h 收冻的 IBV H₁₂₀ 株细胞培养毒混合物的毒价 TCID₅₀/mL 分别为 10^{4.0}, 10^{6.0}, 10^{7.2}, 10^{7.8}, 10^{7.5}, 10^{7.0}, 10^{6.4}。IBV H₁₂₀ 株细胞

培养毒的繁殖曲线见图 2。

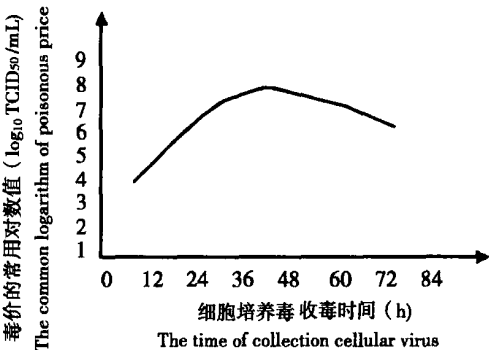


图 2 IBV H₁₂₀株细胞培养毒的繁殖曲线

Fig 2 The breeding curve of cellular virus IBVH₁₂₀ strains

图 2 显示, IBV H₁₂₀株细胞培养毒的繁殖滴度高峰在接毒后 48 h 左右, 其 TCID₅₀达 10^{7.5~7.8}/mL。

3 结论与讨论

随着 IBV H₁₂₀株在 CEF 细胞上的逐步适应和 CPE 的出现、稳定, H₁₂₀株细胞培养毒的毒价 TCID₅₀ 逐步增高而趋稳定, C₄~C₁₀代毒的 TCID₅₀ 稳定在 10^{7.35~8.0}/mL 之间。随着细胞传代次数的增加, C₅~C₁₀代 H₁₂₀株细胞培养毒的 EID₅₀ 呈现出下降的趋势, 变动范围在 10^{7.3}~10^{6.5}/mL。这可能与 H₁₂₀株细胞培养毒对鸡胚的毒力或敏感性下降而对 CEF 细胞的适应性增加有关, 其机理有待进一步研究。

本研究根据免疫鸡攻毒后的临床反应观察、气管及肺的病毒分离回收和免疫鸡血清中和抗体测定 3 种方法检验 H₁₂₀株细胞培养毒的免疫效果。结果表明, 气管病毒分离回收比临床反应观察更为精确和可靠, 血清中和抗体测定虽不能准确反映攻毒保护效果, 却是反映病毒免疫原性的常规方法^[4]。

根据免疫原性试验和毒价测定结果, C₄~C₁₀代细胞培养毒可用来制造 IBV H₁₂₀活疫苗。

参考文献:

[1] Hopkins S R. Serological Comparison of strains of infectious bronchitis virus using plaque-purified isolants [J]. Avian Dis, 1974, 2: 231-239.
[2] Winterfield R W, Fadly A M. Potential for polyvalent infectious bronchitis vaccine [J]. AM J Vet Res, 1975, 4: 524-526
[3] 刘文惠. 应用鸡全胚细胞培养技术增殖鸡传染性支气管炎 H₁₂₀株弱毒的研究[J]. 中国家禽, 1992, (4): 22-23.
[4] 刘文惠. 鸡传染性支气管炎 H₁₂₀株细胞弱毒疫苗的研究[J]. 华北农学报, 1993, 8(增刊): 137-141.
[5] 林雪. 微量血凝抑制试验检测鸡 IBV 抗体的研究[J]. 中国兽医科技, 1995, 6(25): 8-10.
[6] 金梅林. IBV 在鸡胚成纤维细胞中适应及复制的生物学特性研究[J]. 中国兽医杂志, 1998, 11(24): 3-5.
[7] Purchase H G. 唐桂运. 武华主译校. 禽病原分离鉴定实验室手册(第 3 版)[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993 217; 236-241.