

传染性囊病变异株病毒 BK 912的培育及鉴定\*

刘有昌 刘 爵 周 蛟 姚炜光 范书曦 张方亮  
 (北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100081)

摘 要 用由国外引进的 IBD 变异株鸡胚适应毒经 CEF 传代适应后所获得的 BK 912F<sub>5</sub> 毒液进行了病毒理化特性试验和形态学观察, 并与标准 I 型毒 CJ801BK F 株进行了抗原相关性检测. 实验证明, BK 912 具有 IBDV 的基本特性且与标准 I 型毒 CJ801BK F 株处于不同血清亚型. 以 2000TCID<sub>50</sub>/0.2 ml 的 BK 912 冻干活疫苗免疫 SPF 鸡后能完全抵抗美国标准变异株强毒 1084A 的攻击. 一系列试验证明 BK 912 仍为 IBDV 变异株毒.  
 关键词 鸡 传染性囊病 BK 912 毒株 变异株

传染性囊病 (Infectious Bursal Disease, 简称 IBD), 是由传染性囊病病毒引起的一种高度接触传染性疾病. 由于最早发生于美国 Delaware 州的 Gumboro 镇, 所以又称甘布罗病 (Gumboro Disease). 该病主要侵害 3~ 12 周龄的雏鸡和青年鸡, 病毒可造成鸡的主要免疫器官——法氏囊的损伤, 破坏 B 淋巴细胞的产生, 从而导致免疫抑制, 给养鸡业带来严重的危害. 我国近年来 IBD 流行严重, 并先后出现了法氏囊病超强毒株 (vvIBDV) 和血清亚型或变异株<sup>[1]</sup>, 特别是亚型或变异株的出现使原有的标准 I 型活疫苗免疫保护效果下降. 为防止传染性囊病血清 I 型及 I 型亚型或变异株强毒所致的感染, 我们开展了 IBD 标准 I 型株加 I 型变异株二价活疫苗的研究. 本文就是对二价活疫苗中所含的 BK 912 变异株的培育过程, 该毒株理化特性, 其与标准 I 型毒株之间的抗原相关性, 病毒形态学特征以及对 SPF 鸡的免疫效果等方面的研究给予报道.

1 材料和方法

1.1 种毒培育及传代

将由美国引进的 IBD 变异株鸡胚适应毒按适当比例接种鸡胚成纤维细胞, 经在鸡胚成纤维细胞适应后做为 BK 912 第一代, 然后按同样的方法连传 4 代, 得到鸡胚成纤维细胞适应毒第五代. 以第五代毒液制备疫苗免疫 SPF 鸡及进行其它相关实验. 本次实验所用 BK 912 毒液未处理前毒价为 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>/0.1 ml.

1997-07-31 收稿.  
 \* 国家科委“八五”科技攻关项目.

## 1 2 病毒理化特性的测定

### 1 2 1 BK 912 株核酸型的鉴定

表 1 BK 912 株核酸型鉴定实验设计

组 别	病 毒 (m l)	维持液成分 (m l)	
		不含疱疹净 的 维 持 液	含疱疹净 的维持液*
细胞对照	-	1 0	-
疱疹净对照	-	0 1	0 9
BK 912 对照	0 1	0 9	-
伪狂犬病毒对照	0 1	0 9	-
BK 912+ 疱疹净	0 1	-	0 9
伪狂犬病毒+ 疱疹净	0 1	-	0 9

\* 疱疹净浓度为  $100\mu\text{g}/\text{ml}$

用市售的 DNA 合成抑制剂——5 碘脱氧尿苷, 商品名又称疱疹净鉴定病毒的核酸型。疱疹净能抑制 DNA 病毒在细胞培养物中的繁殖, 但不能抑制 RNA 病毒的繁殖。本次实验的对照病毒为已知的 DNA 型伪狂犬病病毒鸡胚成纤维细胞适应毒株, 由中国农业大学动物医学院刘尚高教授赠送。实验具体做法是在进口

的大 24 孔细胞培养板上接种按常规制备的鸡胚成纤维细胞, 长成细胞单层后按表 1 设计实验。

将按上述设计各组的培养物置  $37^{\circ}\text{C}$  温箱培养、观察, 待两种病毒对照产生 80% 以上病变, 而细胞对照正常时, 将病毒及病毒加疱疹净组分别收冻, 以备测定毒价。

1 2 2 BK 912 对有机溶剂耐受的测定 参考有关资料<sup>[2]</sup>按常规法测试 BK 912 株对有机溶剂氯仿和乙醚的敏感性。

1 2 3 BK 912 对反复冻融的耐受 将 BK 912F<sub>5</sub> 细胞毒分装于 3 个无菌小青霉素瓶中, 每瓶 5ml 毒液, 加塞后放置于  $-30^{\circ}\text{C}$  冰箱中冻结, 然后在室温下融化, 分别做如此反复冻融处理 3 次、6 次、9 次各一瓶, 再分别测定各样品毒价。

1 2 4 BK 912 热稳定性测定 将 BK 912F<sub>5</sub> 毒液分别加到 2 个无菌小青霉素瓶中, 每瓶 5ml 分别经  $56^{\circ}\text{C}$  水浴 0.5h、 $56^{\circ}\text{C}$  水浴 90min 处理, 然后测其毒价。

1 2 5 BK 912 对酸碱的耐受 取 2 只无菌小青霉素瓶, 各加入 BK 912F<sub>5</sub> 3ml。第一瓶中加入 0.1N HCl 调 pH 至 3, 第二瓶中毒液用 0.1N NaOH 调 pH 为 14, 置室温下 3h 后, 第一瓶用 0.1N NaOH 调回至 pH 7.0, 第二瓶用 0.1N HCl 调 pH 至 7.0, 分别测定这两瓶病毒毒价。

以上 1.2.2~1.2.5 实验为无菌操作, 同时均设未经处理同一批 BK 912F<sub>5</sub> 细胞毒对照, 并测定毒价以进行比较。病毒毒价的测定是在 24 孔聚苯乙烯微量细胞反应板上进行的。按 Reed-Muench 法计算病毒毒价。病毒毒价以每 0.1ml 半数组织感染量即  $\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$  为单位表示。

### 1 3 BK 912 株与标准 I 型毒株间抗原相关性的测定

参考有关文献<sup>[3]</sup>将 BK 912F<sub>5</sub> 和已知标准 I 型毒 C J801BK F 株<sup>[4,5]</sup>进行抗原相关性检测。

1 3 1 交叉中和试验所用两株 IBDV 毒株 已知标准 I 型鸡胚成纤维细胞适应毒 C J801BK F 株, 周蛟等分离并经鸡胚囊细胞、鸡胚肾细胞传代适应于 CEF 后的第 5 代, 测得毒价为  $10^{7.0}\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ , BK 912F<sub>5</sub> 毒价为  $10^{7.5}\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 。

1 3 2 阳性血清的制备 分别以 C J801BK F 株和 BK 912F<sub>5</sub> 为抗原, 免疫不同隔离器中饲养的 SPF 鸡, 免疫后 14d 心脏采血测其琼扩试验沉淀抗体价, 两种病毒所制备的血清都能与 IBD 株标准抗原发生沉淀反应且 AGP 抗体价为  $\geq 1:8$ , 然后由心脏无菌采集血液, 离心分离血清, 经  $56^{\circ}\text{C}$  30min 灭活后,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

1 3 3 交叉中和试验 参照常規交叉中和试验方法, 根据经典公式计算抗原相关系数  $R=$

$n_1, n_2$ , 公式中  $R$  为抗原之间相关值,  $n$  为血清 1 对病毒 2 的中和抗体滴度与血清 1 对病毒 1 的中和抗体滴度之比;  $n_2$  为血清 2 对病毒 1 的中和抗体滴度与血清 2 对病毒 2 的中和抗体滴度之比。同源病毒  $R$  值为 1 当  $R \geq 0.8$  时, 两病毒为同一亚型,  $R < 0.001$  时, 为不同血清型

#### 1.4 病毒形态观察

采用法氏囊组织超薄切片法, 用 BK 912F<sub>5</sub> 细胞毒注射接种 14 日龄 SPF 鸡, 每只鸡 1 ml 部位为胸肌和腿部分点注射。接种后 72 h 剖杀实验鸡, 采法氏囊按常规方法进行固定、脱水、包埋、切片、染色, 在 H-500 透射电镜下观察法氏囊病毒的形态。

#### 1.5 BK 912 株疫苗免疫效果的观察

将毒价为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 的疫苗按正常使用剂量 2000 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 接种 30 只 20 日龄的 SPF 鸡, 免疫后观察实验鸡有无临诊变化, 并于首免后 14 d 进行二免, 二免后 14 d 攻击由美国引进的 IBD I 型变异株 1084A 强毒, 攻毒剂量为 1:100 倍法氏囊研磨稀释液, 途径为点眼、口服。同时设 SPF 鸡健康对照组及 1084A 攻毒对照组。攻毒后 3 d 剖杀所有实验鸡, 观察记录剖杀结果。检查各组鸡法氏囊、脾脏、胸腺等器官病变情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 BK 912 株在 CEF 上的培养及病毒感染力的测定

BK 912 病毒株是由美国变异株鸡胚适应毒经在鸡胚成纤维细胞适应后而得, 并在 CEF 上连传 5 代, 这 5 个代次的 CEF 适应毒所导致的细胞病变的特点基本一致。接种后 24 h 细胞单层上呈现均匀散在的折光性强的圆缩细胞, 48 h 后细胞单层几乎完全圆缩, 并有聚集现象。单层细胞之间的空隙加大呈网状, 培养液中悬浮大量脱落的圆缩细胞, 而正常细胞对照未见此种变化。BK 912 株在 CEF 上连传 5 代后病毒毒价基本稳定在  $10^{6.25} \sim 10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 之间。

### 2.2 病毒理化特性的检测结果

2.2.1 BK 912 株核酸型鉴定 实验结果表明, BK 912 复制不受 DNA 合成抑制剂——5 碘脱氧尿苷 (疱疹净) 的影响, 经处理的 BK 912 毒价无变化仍为  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 与处理前的 BK 912 毒价无异。而伪狂犬病病毒用疱疹净处理后则无毒价, 证明病毒的复制被完全抑制。

2.2.2 病毒对相关理化因素的耐受情况 BK 912 病毒能耐受有机溶剂氯仿、乙醚的作用, 经处理的病毒毒价比较稳定, 与对照组  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 无太大差异, 氯仿处理 BK 912 为  $10^{7.25}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 乙醚处理组 BK 912 毒价为  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 说明 BK 912 为无囊膜病毒。病毒对反复冻融有耐受, 反复冻融 3~6~9 次的病毒毒价分别为  $10^{7.25}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 经 56℃ 水浴加热 30 min 和 90 min 病毒感染力没有影响, 毒价分别为  $10^{7.25}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 和  $10^{7.25}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml pH 14 的碱性环境使 BK 912 丧失活力, 不能产生细胞病变。而在 pH 3 的酸性环境中 3 h 病毒感染力有下降, 毒价下降了 1.5 个滴度。酸处理后的 BK 912 毒价为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml 但病毒仍有感染力, 仍可产生 CPE。

### 2.3 BK 912 与 CJ801BKF 株抗原相关性测定结果

据报道, 同源病毒间的  $R$  值为 1 不同血清型的  $R$  值低于 0.001。IBDV 不同血清亚型  $R$  值小于等于 0.8。经交叉中和试验测定 CJ801BKF 株和 BK 912F<sub>5</sub> 的抗原相关性  $R$  值为 0.52 低

于 0 8 为同一血清亚型的指标, 证明 BK 912 与 C J801BK F 株为 IBDV 血清 I 型不同亚型病毒

#### 2 4 病毒形态电镜下观察结果

采集接种 BK 912F<sub>5</sub> 的 SPF 鸡法氏囊做超薄切片, 在电镜下观察, 可见在细胞质内有大量散在的或数个簇集的病毒粒子。而健康对照鸡法氏囊超薄切片未见病毒存在

#### 2 5 BK 912 疫苗免疫效果

经 2 次 BK 912 冻干活疫苗免疫后观察, 30 只 SPF 实验鸡未见异常, 免疫鸡与健康鸡分别攻击 1: 100 倍稀释的 1084A

变异株强毒后, 免疫鸡无临床症状, 剖杀后未看法氏囊病变, 脾脏大小也与健康鸡相近, 表现完全保护; 而未免疫的 1084A 攻毒对照组虽未见临床症状, 但剖检中见到法氏囊严重萎缩、色黄、质度硬, 脾脏较健康鸡肿大。由此可见, BK 912 株免疫 SPF 鸡后既安全又可抵抗变异株强毒的攻击。这点充分体现了变异株疫苗的优势。

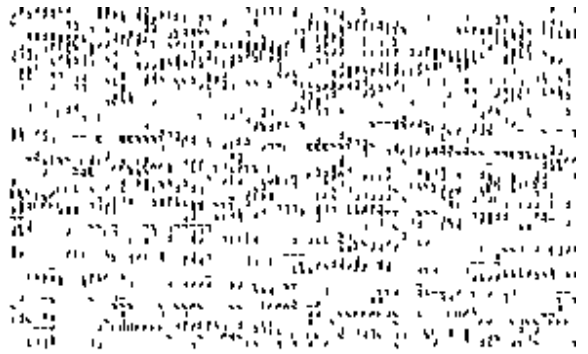


图 1 接种 BK 912 病毒的 SPF 鸡法氏囊超薄切片电镜照片

### 3 讨论

用从国外引进的 IBD 变异株鸡胚适应毒, 经培育适应鸡胚成纤维细胞后命名为 BK 912 株。继而在 CEF 上又连续传四代, 本实验的目的就是要通过对 BK 912 鸡胚成纤维细胞培养物进行一系列相关试验而证明其仍为 IBDV I 型变异株。法氏囊超薄切片电镜下观察可见到大量散在或簇集的病毒粒子。核酸型试验说明 BK 912 毒株不能被 DNA 复制抑制剂——5 碘脱氧尿苷 (泡疹净) 所抑制, 病毒处理后毒价没有变化, 可以证明 BK 912 株为一株 RNA 病毒。理化特性试验证明 BK 912 为一无囊膜病毒, 对热、反复冻融耐受, 耐酸, 不耐碱, 这些与 IBDV 的理化特性指标相符合。另外, 经 BK 912 免疫的 SPF 鸡阳性血清既可以和 IBD 标准抗原出现特异性沉淀反应又可以和标准 I 型毒 C J801BK F 株发生特异性中和反应, 而两株毒的交叉中和试验测得抗原相关值  $R = 0.52$  小于同一亚型 0 8 的指标, 大于 0.001 不同血清型的指标, 证明 BK 912 为 IBDV I 型亚型毒株。

在致病性血清型 I 型 IBDV 中, 不同亚型之间的抗原相关性在 10% ~ 70% 之间。Ismail 等<sup>[6]</sup>的研究发现高剂量的标准 I 型疫苗免疫后只能抵抗低剂量变异株强毒的攻击。Rosenberger<sup>[7]</sup>等发现经典毒株不能有效地保护免疫鸡抵抗变异株的攻击, 而只有变异株疫苗才能够对变异株强毒的攻击提供良好的保护。

BK 912 免疫试验中以 2000TCID<sub>50</sub>/0.2ml 剂量的 BK 912 活疫苗两次免疫 SPF 鸡后能够完全抵抗变异株强毒 1084A 的攻击, 说明 BK 912 虽经在 CEF 上传递 5 代, 但仍然保留了变异株的特性, 结合交叉中和试验结果可以证明 BK 912 是一株 IBDV 变异毒株。其它研究证明, 当 BK 912 与标准 I 型株 BJ836 按适当比例混合后免疫 SPF 鸡, 分别能够抵抗极高剂量的标准 I

型强毒 CJ801F<sub>15</sub>和高剂量变异株强毒 1084A 的攻击,而 BJ836则不能抵抗它们各自的攻击,这也充分说明了 BK 912做为变异株所起的作用。

美国 Select公司 80年代末就已有标准 I 型毒加变异株毒的混合活疫苗问世。在我国目前存在 IBDV I 型亚型或变异株的情况下,使用含 BK 912变异株的二价活疫苗免疫有 IBDV 亚型或变异株流行地区的鸡群能够对免疫鸡提供广谱的保护。经实验证明二价活疫苗中 BK 912变异株的作用是不可替代的。

## 参 考 文 献

- 1 李锋,等. 近年来鸡 IBD 超强毒和变异株在国内外 IBD 流行中的地位. 中国畜禽传染病, 1994 (1): 57
- 2 李汉秋,等. 鸡传染性法氏囊病病毒 CJ801株细胞毒理化特性和形态学研究. 畜牧兽医学报, 1995, 16 (3): 178~ 185
- 3 Jackwook DH, et al Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. Avian disease, 1987, 31: 766~ 770
- 4 周蛟,等. 北京地区鸡传染性法氏囊病病原分离. 中国兽医杂志, 1982, 8(7): 25~ 26
- 5 崔静,等. 传染性法氏囊病病毒 CJ801BKF毒株 VP<sub>2</sub> DNA 基因结构的分析. 病毒学报, 1995, 11(3): 234 ~ 240
- 6 Ismail NM, et al Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens. Avian disease, 1991, 35: 460 ~ 469
- 7 Rosenberger JK, et al Use of infectious bursal disease virus variant vaccine in broilers and broiler breeders. In: Proceeding of 36th Western Poultry Disease Conference. Davis California, 1987, 105~ 109

# Culture and Characterization of Infectious Bursal Disease Virus Variant BK912 Strain

Liu Youchang   Liu Jue   Zhou Jiao   Yao Weiguang   Fan Shuxi  
Zhang Fangliang

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Sciences, Beijing Municipal  
Academy of Agriculture and Forestry Sciences 100081)

**Abstract** The IBDV strain BK 912F<sub>5</sub> was obtained from imported chicken embryos adapted variant virus through CEF adaptation and it was characterized and observed for physicochemical and morphological properties respectively. The antigenic relation between BK 912 and standard serotype I CJ801BKF strain was also tested. The results showed that the BK 912 strain possessed basic properties of IBDV and belonged to a different subtype compared with CJ801BKF strain. The SPF chickens vaccinated with lyophilized live BK 912 vaccine at 2000TCID<sub>50</sub>/0.2ml each bird could protect the challenge of USA virulent variant completely. A series of tests fully proved that the BK 912 was still an IBDV variant strain.

**Key words** Chicken infectious bursal disease; BK 912 strain; Variant