

鸡新城疫荧光抗体的制备 及其在人工感染病例中的应用

肖俊杰 赵余放 李东成 寇改霞

(西北农学院畜牧兽医系)

摘 要

用自制的鸡新城疫高免血清制成了荧光抗体。将该荧光抗体稀释至16—32倍,对人工感染病鸡的脾、肾、肺及肝冰冻切片和感染强毒的鸡胚成纤维细胞进行染色,均可出现特异的黄绿色荧光,此种特异荧光可被鸡新城疫阳性血清抑制,但不被阴性血清抑制。该荧光抗体不能使健康鸡和人工感染巴氏杆菌鸡的同种组织冰冻切片出现特异荧光。

鸡新城疫的病象变化不一,使得这种疫病的认诊困难多端^[3]。虽然在实验室可以采用病毒分离,血球凝集抑制试验以及中和试验等诊断方法,但是这些方法或者因操作手续繁杂,或者因得出诊断结果需要较长的时间,或者因病程或病型的不同,其应用受到限制,因而在生产中未得到普遍应用。

荧光抗体法在鸡新城疫诊断中的应用在国外曾有研究。1957年, M. A. Илецко-ченко氏应用荧光抗体法证明了病鸡的肝、肺、肾和脾等脏器触片中的病毒^[1]。Simic'氏(1972)报导鸡于感染6小时后,在脑、气管、肺、脾、肝与盲肠扁桃体的网状内皮细胞中检查出病毒^[2]。截止目前,关于鸡新城疫荧光抗体的研究,仍为人们所重视,国内外许多单位在这方面仍在继续开展研究。

我们从1980年9月开始进行鸡新城疫荧光抗体的制造,并应用于人工感染病鸡中,现已得出初步结果,报告如下。

材 料 和 方 法

一、鸡新城疫种毒

鸡新城疫种毒系中央农业部兽医生物药品监察所的冻干毒。稀释后接种于孵育9—11天鸡胚尿囊腔中,接种后24小时以内鸡胚死亡者弃去,24小时至72小时鸡

本研究中华鸡市畜牧兽医工作站胡志忠,西安市肉联厂王景安、陶铭同志参加部分检验工作,特此致谢。

胚发生死亡,即以无菌手术收获尿囊液,血凝价在1:80以上者,即为尿囊毒,放入-20℃冰箱保存备用。另外,将尿囊毒接种在鸡胚成纤维细胞中,待绝大部分细胞出现CPE时,即可收获病毒,此为细胞毒,分装后置-20℃冰箱中保存。

二、鸡新城疫高免血清

选未注射过任何疫苗,体重在3市斤以上的健康公鸡19只,隔离观察10天,精神食欲皆无异常,遂开始按下述程序进行免疫:

第一次: I系冻干弱毒苗 1.0毫升(1头份)

第二次: I系冻干弱毒苗 1.0毫升(10头份)

第三次: 鸡新城疫尿囊毒(血凝价1:80以上)0.5毫升

第四次: 鸡新城疫尿囊毒(血凝价1:80以上)1.0毫升

第五次: 鸡新城疫尿囊毒(血凝价1:80以上)2.0毫升

第六次: 鸡新城疫尿囊毒(血凝价1:80以上)4.0毫升

采取肌肉注射。在每次注射后间隔10天进行下次注射,最末次注射10天后试血,血凝抑制价达640*以上,即可心脏采血分离血清,保存于冰箱备用。

三、荧光抗体的制备

取新城疫高免血清20ml,向其中加入0.01M pH7.4 PBS 20ml,在用电磁搅拌器不断搅拌的情况下,逐滴加入饱和硫酸铵21.5ml,使成35%饱和,继续搅拌30分钟后,经7000转/分离心,弃去上清液,将沉淀用0.01M pH 7.4 PBS 稀释至20ml。以上述方法重复用35%的饱和硫酸铵沉淀一次,再将沉淀物稀释至20ml,向其中加入饱和硫酸铵4.4ml,使成18%饱和,经7000转/分离心,弃去沉淀(除去纤维蛋白),并向上清液中补加饱和硫酸铵5.3ml,再次使成35%饱和,经7000转/分离心,弃去上清,以0.01M pH 7.4 PBS 4ml使沉淀溶解后,装入透析袋中,在0.01M pH 7.4 PBS 中,4℃环境下透析过夜(中间换液数次),次日通过葡聚糖凝胶G—50柱,以0.01M pH 8.0 PBS 洗脱,收集蛋白液。用佛林法测定含氮量,并以0.5M pH 9.5 碳酸缓冲液稀释至每毫升含蛋白10—15毫克,按蛋白总量的1.5%称取异硫氰酸荧光素(FITC,美国Sigma),溶解于少量0.5M pH 9.5 碳酸缓冲溶液中,在电磁搅拌下缓慢地逐滴滴入蛋白液中,同时不断测试pH,按需要加入0.1M 磷酸钠溶液,使其pH维持在9.0—9.5之间,室温(10—12℃)搅拌结合1.5小时,然后通过葡聚糖凝胶G—50柱,除去未结合的荧光素后,收集荧光抗体,分装,低温保存备用。

四、荧光抗体对不同标本片的检验方法

(一) 标本片的制备

1. 人工感染鸡新城疫强毒病鸡组织标本片

自西北农学院畜牧场鸡舍选取孵育18天的鸡胚100个,移入实验室继续孵育。出壳后专人饲养,32日龄后随机取出67只仔鸡分成两组,分别以人工接种和同居感染的方法,给仔鸡感染鸡新城疫强毒。分别在感染后的12—144小时和48—168小时采取其脾、肾、肺、肝等,按常规方法用半导体致冷切片机,制成5—7微米厚的切片,立即用电扇吹干后,冷丙酮(-20℃)固定15分钟,取出风干,进行染色或装入塑料袋内密

封，置-20℃冰箱中保存备用。

2. 人工感染巴氏杆菌病鸡组织标本片

取鸡5只人工感染巴氏杆菌，待其发病后，以无菌手术采取同上组织并分成两份，一份制备冰冻切片，供荧光抗体染色用，另一份供细菌分离和涂片检查用。

3. 健康鸡组织标本片

取上述实验室孵育出壳，并养至32日龄的仔鸡20只，扑杀后，以同上方法采取材料和制片。

4. 感染鸡新城疫强毒鸡胚成纤维细胞标本片

培养在小瓶中盖玻片上的原代鸡胚成纤维细胞长成单层后，将小瓶分为两组。试验组接入鸡新城疫强毒，对照组不接毒。在试验组接毒后2—48小时，分别取出试验组和对照组小瓶中的盖玻片，在0.01M pH 7.4 P B S 中轻轻刷洗后吹干，以冷丙酮固定后进行染色。

(二) 染色

将新城疫荧光抗体用0.01M pH 8.0 P B S 稀释至工作浓度(1:16)，滴加于已固定过的标本片上，置37℃水浴箱内孵育30分钟，取出后立即用0.01M pH 8.0 P B S 反复刷洗3次，然后滴加0.1%伊文斯兰，淬灭2—3秒钟后，立即用上述缓冲液刷洗，甩干后以缓冲甘油封裱，即可观察。

将人工感染鸡新城疫强毒病鸡组织标本片，以鸡新城疫高免血清做一步法抑制实验，即向1滴鸡新城疫荧光抗体中加入新城疫阳性血清8滴，0.01M pH 8.0 P B S 7滴，混合后，用其染标本片30分钟，然后按上述方法用伊文思兰淬灭后，封裱观察。在抑制试验中，另设阴性血清对照，其血清和荧光抗体的比例，与此相同。

(三) 观察和结果判定

用Reichert大型研究显微镜，加有EITC，滤片，以透射光观察，每份材料观察2张以上切片标本，并按照以下规定记录结果：

1. 具有耀眼的黄绿色荧光，或细胞内有较大的颗粒性荧光者，记为“++++”。
2. 具有很强的黄绿色荧光，或细胞内仅有较小的颗粒性荧光者，记为“+++”。
3. 具有亮的黄绿色荧光，细胞内看不到颗粒性荧光者，记为“++”。
4. 出现稍弱的黄绿色荧光者记为“+”。
5. 无特异荧光细胞者记为“-”。

结 果

一、人工感染鸡新城疫强毒鸡病各种组织标本染色结果

人工感染鸡新城疫强毒病鸡潜伏期后的各种组织标本经鸡新城疫荧光抗体染色后，其表现如下：

1. 脾脏

荧光细胞为区域性存在，少数为弥散存在。胞浆内可看到不均匀的荧光，其亮度

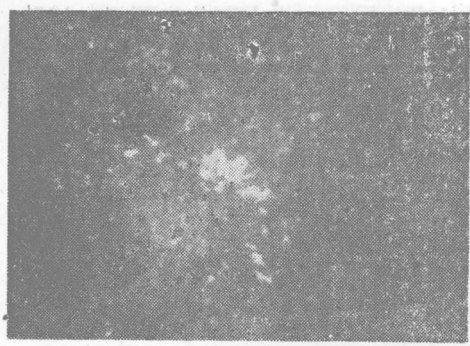
++—+++ (见照片1)。

2. 肾脏

某些肾小管细胞内有数量和大小不等的颗粒性荧光, 这些细胞常围绕肾小管腔形成一个荧光环, 也可看到不规则的成片荧光, 亮度可达+++—++++ (见照片2)。

3. 肺脏

在增厚的肺泡中隔内和渗出性肺炎区可看到较多的荧光细胞, 细支气管周围也可看到类似细胞, 其亮度一般可达++—+++ (见照片3)。



照片1 脾脏中区域性细胞发荧光



照片2 肾小管细胞发荧光或呈片状荧光



照片3 肺泡中隔细胞发荧光

4. 肝脏

肝小叶间可看到荧光细胞, 有时在汇管区周围看到类似细胞, 亮度达+—++。

二、人工感染鸡新城疫强毒病鸡潜伏期后的4种组织标本片, 经用鸡新城疫阳性血清(血凝抑制价为1280^{*})作一步法抑制处理后, 均不再出现黄绿色荧光。但用标准阴性血清作同样处理, 其特异荧光则不消失。

三、20只健康鸡的4种(同上)组织标本片, 均不出现荧光。

四、人工感染巴氏杆菌病鸡的肝、脾等组织经细菌培养和涂片标本瑞氏染色后, 均证明有典型的巴氏杆菌。但该种病鸡的脾、肾、肺、肝组织切片标本经荧光抗体染色后, 均无荧光。

五、接种鸡新城疫强毒的鸡胚成纤维细胞染色结果

试验组细胞在接毒后 2—3 小时未出现 CPE，其后时间细胞均出现明显的 CPE。未接毒的对照细胞无 CPE。试验组细胞在接毒后不同时间用荧光抗体染色，细胞浆内可看到明亮的颗粒性荧光（见照片 4、5）；同时对照组细胞进行荧光抗体染色，细胞浆内看不到荧光。试验组和对照组细胞染色结果见表 1。



照片 4 接毒后12小时培养细胞内
呈颗粒性荧光



照片 5 接毒后24小时病变细胞
胞浆内发荧光

表 1 鸡胚成纤维细胞染色试验

接 毒 后 取片时间 (小时)	荧 光 抗 体 染 色		试验组抑制试验	
	对 照 组	试 验 组	阳性血清	阴性血清
2	—	—		
3	—	—		
4	—	+—++		
5	—	+—++		
6	—	++	—	++
7	—	++	—	++
8	—	++	—	++
9	—	++	—	++
12	—	+++	—	+++
16	—	+++	—	+++
18	—	++++	—	++++
19	—	+++	—	++++
23	—	++++	—	++++
24	—	++++	—	++++
26	—	++++	—	++++
30	—	++++	—	++++
48	—	++++	—	++++

六、人工感染鸡新城疫强毒病鸡不同时期所采组织标本染色结果见表2。

表2 人工感染病鸡组织标本荧光抗体染色试验

感染时间 (年、月、日)	鸡的 日龄	鸡 号	接种方法	临床表现	感染或同 居后取材 经过的时间(小时)	荧光抗体染色结果			
						脾	肾	肺	肝
81. 5. 5	32	1	肌注和滴鼻	无异常表现	24		++	++	
		2					++	++	
		3					++	++	
		4					++	++	
		5	肌注	精神稍差	48	+++	+++	++	++
		6				+++	+++	++	++
		7				+++	+++	++	++
		8				+++	+++	++	+
		9				+++	+++	++	+
		10	肌注	死亡	72		++++	+++	
		11	滴鼻	濒死扑杀	96	+++		+++	++
		12				++		+++	++
		13				++++		+++	++
		14				++++		+++	++
		15				++++		+++	+
		16	滴鼻	其中2只死亡 2只濒死扑杀	120		++++	+++	
		17					++++	+++	
		18					++++	+++	
		19					++++	+++	
81. 5. 13	40	20	滴鼻	无异常	12	-	-	-	-
		21				-	-	-	-
		22	滴鼻	无异常	24	++	-	+	-
		23				++	-	+	-
		24	滴鼻	无异常	48	+++	+	++	-
		25				+++	+	++	-
		26	滴鼻	濒死扑杀	72	+	++	+++	+
		27				+++	++	+++	++
		28	滴鼻	死亡	96	+	+	+	-
		29				+	+	+	-

		30				+++	+++	+++	+
		31				+++	+++	+++	+
		32	滴鼻	死亡	144	++++	++	+	+
		33	同居	死亡	114	+	++	+	+
		34	同居	死亡	120	++	++	+	-
		35				+++	++	+	+
		36				+++	++	+	+
		37	同居	其中 2 只死亡 1 只濒死扑杀	144	++	-		
		38				++	+		
		39				++	+		
81. 5. 26	53	40	滴鼻	无异常表现	12	-	-	-	-
		41				-	-	-	-
		42	滴鼻	无异常表现	24	-	-	-	-
		43				-	-	-	-
		44	滴鼻	无异常表现	48	+++	++	-	-
		45				+++	-	-	-
		46	滴鼻	无异常表现	72	+++	+	++	-
		47				++++	+++	+++	-
		48	滴鼻	死亡	96	++	++	+++	+++
		49				+++	+++	+++	-
		50	同居	无异常表现	48	-	-	-	-
		51				-	-	-	-
		52				-	-	-	-
		53				-	-	-	-
		54	同居	个别精神稍差	72	-	+	-	-
		55				-	-	-	-
		56				-	-	-	-
		57				-	++	-	-
		58	同居	死亡	96	-	-	-	-
		59	同居	其中 1 只死亡 其余扑杀	120	-	-		
		60				-	-		
		61				-	-		
		62				-	-		
		63	同居	扑杀	144	++	+++		
		64				+++	-		
		65				-	-		
		66				-	-		
		67	同居	精神差扑杀	168	++++	+++	++	++

讨 论 与 结 论

一、M. A. Шесточенко (1967) 以病鸡的肺、肝、肾及脾组织压印片进行荧光抗体染色, 发现嗜伊红白细胞, 假嗜伊红白细胞和浆细胞的颗粒、细胞核和胞浆中, 出现明显的金黄色荧光^{[1][2]}。从表2看, 本试验用荧光抗体对人工感染鸡新城疫强毒病鸡的脾、肾、肺和肝进行染色, 同样也看到了荧光, 但荧光的性质为黄绿色, 和前者所见不同, 其原因何在, 尚待进一步研究。不过上述人工感染病鸡的组织切片标本, 经用荧光抗体染色, 不仅均可出现荧光, 并经阳性血清抑制处理, 荧光即可消失, 阴性血清处理, 荧光不被抑制。健康鸡各种组织切片中, 均无荧光。人工感染巴氏杆菌病鸡组织切片中, 无特异荧光细胞。从而证明, 自制的鸡新城疫荧光抗体是一种特异性很强的制品。

二、用免疫母鸡的丙种球蛋白制备荧光抗体, 对病鸡的肺、肝、肾和脾等组织的压印片进行染色, 发现嗜伊红白细胞、假嗜伊红白细胞和浆细胞的颗粒、细胞核及细胞浆中, 出现明显的金黄色荧光^[4]。我们在实验中, 用免疫公鸡的丙种球蛋白制备了荧光抗体, 该荧光抗体除应用于人工感染鸡和健康对照鸡不同组织标本, 取得了上述结果外, 还以该荧光抗体在感染了鸡新城疫强毒的鸡胚成纤维细胞上进行了研究。从表1看出, 试验组细胞在接毒后4小时, 经荧光抗体染色均出现荧光, 并且该荧光用新城疫阳性血清作抑制处理, 可以抑制, 经阴性血清处理, 则不被抑制。对照组细胞经荧光抗体染色后, 均不出现荧光。另外, 从表1还看出, 试验组细胞接毒后2—3小时, 即在细胞未出现CPE以前, 经荧光抗体染色, 均无荧光, 此时可能为病毒在细胞内的潜伏期; 接毒4小时以后, 细胞一方面出现CPE, 同时经荧光抗体染色, 出现荧光, 并且在12小时以后, 其荧光亮度变得更强。这一情况和文献^[5]中所记载的鸡新城疫病毒在鸡胚肺细胞中, 其潜伏期为3小时, 病毒生长期为3—10小时基本相符。

根据上述, 认为采用免疫公鸡的丙种球蛋白制备荧光抗体不论应用于人工感染病鸡的组织标本的染色, 或应用于培养细胞标本的染色, 均可获得满意的结果。

三、从表2看出, 以肌注或滴鼻感染的鸡在12小时所采组织标本, 均无荧光, 24小时后, 部分出现荧光, 96小时后, 全部出现荧光; 同居感染鸡在同居后的24—96小时, 不出现荧光, 仅72小时取材的2只病鸡肾脏标本出现弱的荧光, 其原因可能由于该鸡的体质以及同传染来源鸡接触的方式与程度不同所致。同居后124—144小时, 部分出现荧光, 168小时, 全部出现荧光。这一结果, 与Simic' 报告的鸡于感染6小时后, 即可在体内查出病毒不相符合。但是, 该氏所用毒株、感染途径和接种剂量等均与本试验所用的不同, 这可能是这一差异存在的原因。虽然如此, 从表中仍能看出, 荧光抗体法对感染鸡在症状未出现之前或刚出现, 即可查出病毒。如果应用于临床检验, 仍具有能够早期查出病毒这一特点。

检验组织中, 脾、肾、肺和肝均可使用, 唯肝的切片经荧光抗体染色后, 荧光较弱, 荧光细胞出现较少。我们在工作中多采用脾、肾、肺作为检验材料, 一般均能得到

理想的结果。

四、目前，在国内外有较多的单位从事鸡新城疫荧光抗体的研究，然而，截至现在有关这方面的研究报告，国外发表不多，国内尚无报导。为什么会有这种情况，在研究过程中体会到，鸡新城疫荧光抗体的研制较其它动物病毒性疾病荧光抗体的制备，其难度要大得多。首先，鸡血清中丙种球蛋白的含量较低，按常规方法提取，往往会因所得球蛋白液的蛋白含量过低而不能进行标记，需要进行适当的浓缩；其次，鸡丙种球蛋白在脱离白蛋白后，显得更娇嫩，在提取、浓缩和标记过程中，对温度稍控制不适，可引起蛋白的变性。较长时间的透析，也能损害球蛋白的活性；其三，在荧光抗体制备和使用过程中，所用各种溶液如果配制不当，即可引起丙种球蛋白和荧光抗体的凝集和沉淀；其四，荧光抗体的保存也较为讲究，如果长期置入 -20°C 下结冻保存，在使用稀释时，溶液中会出现蛋白团块，染色时附着于标本片上很难除掉，严重地影响标本观察。我们也将新城疫荧光抗体按常规方法，真空冷冻干燥后保存过，结果在使用稀释时出现絮状蛋白，荧光抗体的特异性也随之消失。因此，认为在鸡新城疫的荧光抗体制备中，要求的条件比较严格，操作要求准确，不然将难以成功。

主要参考文献

1. 中国农业科学院科技情报所译：免疫荧光技术在兽医诊断上的应用，国外农业科学动态 2，1972。
2. 安徽农学院编译：荧光抗体技术及其在兽医上的应用，上海人民出版社，1975年版，141页。
3. 盛彤笙译：鸡新城疫，家畜的传染病（上册），科学出版社，1981年版，第53页。
4. 江苏农学院、山东农学院主编：鸡新城疫，家畜传染病学，上海科学技术出版社，1978年版，第306页。
5. 翟中和编：动物病毒鉴定部分的测定方法，全国高等农业院校兽医微生物学教材师资训练班教材，1981年。
6. 徐宜为编：制备IgG的硫酸铵沉淀法，实验免疫学技术，科学出版社，1979年版，第170—171页。
7. 井上 勇等编：鸡病临床图说，日本畜产振兴会，1979年版，第12—25页。