

鸡传染性支气管炎病毒 M41 株种毒的冻干鉴定

张敏,蒋桃珍,王静文,张兵,陈玲

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2015-07-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 08-0005-04 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为制备合格的鸡传染性支气管炎病毒 M41 株种毒,将 M41 株毒种接种 SPF 鸡胚进行传代培养,收获尿囊液、分装、冻干,并对冻干毒进行了无菌检验、支原体检验、剩余水分测定、真空度测定、外源病毒检验、病毒含量测定、特异性检验、致病性试验。结果表明,该冻干毒种各项检验均符合规定,可作为研究用种毒。本研究可为其他禽源病毒种毒的制备提供借鉴。

[关键词] 鸡传染性支气管炎病毒;冻干;鉴定

Lyophilization and Identification of Chicken Infectious Bronchitis Virus M41 Strain Seeds

ZHANG Min, JIANG Tao-zhen, WANG Jing-wen, ZHANG Bing, CHEN Ling

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: For the preparation of qualified chicken infectious bronchitis virus M41 strain seeds, M41 strain seeds were inoculated on SPF chicken embryo for subculture. Allantoic fluid was harvested, repackaged and lyophilized, then subsequent identification were conducted including the sterility test, mycoplasma test, determination of residual moisture, vacuum degree, exogenous virus test, virus content determination, specific identification and pathogenicity test. All the results show that lyophilized seeds meet the demand of regulation and can be employed for research. This research provides the reference for the preparation of other types poultry virus of seeds.

Key words: chicken infectious bronchitis virus; lyophilization; identification

鸡传染性支气管炎 (IB) 是由鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 引起鸡的一种急性高度接触性呼吸道传染病,以气管啰音、咳嗽、打喷嚏、幼鸡流鼻涕,产蛋鸡产蛋量减少和蛋的品质下降为特征,常因呼吸道感染、肾脏或消化道感染而引起死亡,本病至今在世界范围内广泛流行,给养鸡业带来严重危害^[1-3]。疫苗免疫是当前预防和控制 IB 的主要

措施^[4-7],IBV M41 株不仅用作疫苗制备^[8],而且是《中华人民共和国兽药典》中规定的疫苗效力检验攻毒用标准强毒株^[9]。本实验对中国兽医微生物菌种保藏中心的 IBV M41 株进行了扩繁、冻干,并对冻干毒进行了一系列鉴定工作包括性状、无菌检验、支原体检验、剩余水分测定、真空度测定、外源病毒检验、病毒含量测定、特异性检验和致

病性试验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 IBV M41 种毒 CVCC 编号为 AV1511,购自中国兽医药品监察所,置 -70°C 冰箱保存备用。

1.1.2 实验动物 SPF 鸡、SPF 鸡胚均购自北京梅里亚维通动物技术有限公司。

1.1.3 其他材料及试剂 IBV 特异性阳性血清、禽网状内皮组织增生症病毒(REV)、鸡 REV 特异性抗体、禽白血病毒(RAV1、RAV2),中国兽医药品监察所;5%蔗糖牛奶、无菌培养基、支原体培养基,中海动物保健科技公司;MEM、胎牛血清, Hyclon公司;禽白血病毒 ELISA 试剂盒, IDEXX 公司;FITC 标记的兔抗鸡 IgG, sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 毒种繁殖 将 IBV M41 种毒用生理盐水 10 倍稀释后尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚, $0.1\text{ mL}/\text{枚}$, 37°C 孵育,每日照蛋,24 h 前死胚弃去,24 h 后的死胚及时放置于 4°C 冰箱保存。收获 36 h 鸡胚尿囊液,无菌检验合格后作为冻干用毒液,置 -70°C 冰箱保存。

1.2.2 毒种冻干 将病毒尿囊液与无菌检验合格的 5%蔗糖脱脂牛奶等量混合,分装于安瓿瓶中,每支 1 mL ,含病毒 0.5 mL ,分装好后立即置于冻干机中冻干,冻干程序为: -40°C 150 min; -10°C 660 min; 26°C 540 min。冻干结束后将安瓿二次抽真空封口,置 -70°C 冰箱中保存待检。

1.2.3 毒种鉴定

1.2.3.1 常规检验 冻干后毒种按《中华人民共和国兽药典》抽样进行鉴定:性状检验应为淡黄色海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解;无菌检验应无细菌生长;支原体检验应无支原体生长;剩余水分测定和真空度测定应符合规定;外源病毒检验应无外源病毒污染。

1.2.3.2 病毒含量测定 抽取待检样品用生理盐水复溶至原体积,然后 10 倍系列稀释,取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 四个稀释度各接种 5 枚 9 日龄 SPF 鸡胚,每枚 0.1 mL ,同时设生理盐水对照组,置

37°C 培养箱中孵育 144 h,每天照蛋,弃去 24 h 死亡鸡胚,记录 24 h 后的死胚和鸡胚有胎儿发育小、蜷缩等病变数。按 Reed - Muench 法计算 EID_{50} 。

1.2.3.3 特异性检验 抽取待检样品,用灭菌生理盐水稀释至 $200\text{ EID}_{50}/0.1\text{ mL}$,取 1.5 mL 与等体积的鸡传染性支气管炎病毒特异性阳性血清混合,室温作用 1 h(期间振摇 1 次),经尿囊腔接种 10 枚 9 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.2 mL ,同时设置病毒对照组和生理盐水对照组。 37°C 孵育,24 h 死亡鸡胚弃去不计,观察 24~144 h 鸡胚存活和胚胎发育情况^[8-9]。

1.2.3.4 致病性试验 取冻干毒 1 支,用生理盐水做 10 倍稀释后滴鼻、点眼 6 日龄 SPF 鸡 20 只,每只 0.2 mL ,设生理盐水对照鸡 10 只,每只鸡同法接种生理盐水。所有鸡接种后观察 14 d,记录死亡情况和出现甩头、伸颈、呼吸困难、流鼻涕等传染性支气管炎典型症状的情况^[8-9]。

2 结果

2.1 性状检验 冻干后病毒呈淡黄色海绵状疏松团块(图 1),易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解。



图 1 IBV M41 冻干毒株

2.2 无菌检验 经 25°C TG、GA、GP 三种培养基和 37°C TG、GA 两种培养基检测发现,IBV M41 冻干毒无细菌生长,检验合格。

2.3 支原体检验 由表 1 可以看出,IBV M41 冻干毒无支原体生长,检验合格。

表 1 支原体检验结果

组别	第一次移植		第二次移植		第三次移植		第四次移植	
	小管	平皿	小管	平皿	小管	平皿	小管平皿	
IBV M41	-	-	-	-	-	-	-	-
阳性对照组	+	+	+	+	+	+	+	+
阴性对照组	-	-	-	-	-	-	-	-

“-”表示无支原体生长;“+”表示有支原体生长

2.4 剩余水分测定 由表 2 可以看出,IBV M41 冻干毒剩余水分符合规定。

2.5 真空度测定 使用高频火花真空测定器对冻干毒种进行测定,出现白色、粉色或紫色辉光的判为合格,真空合格的毒种为 216 支。

2.6 外源病毒检验 鸡胚检查法尿囊腔和绒毛尿囊膜两种途径接种后胎儿发育正常,绒毛尿囊膜无病变,鸡胚液血凝试验结果为阴性;禽白血病毒检查结果(表 3)和禽网状内皮组织增生症病毒检查结果(图 2)也均为阴性,说明该冻干毒无外源病毒污染。

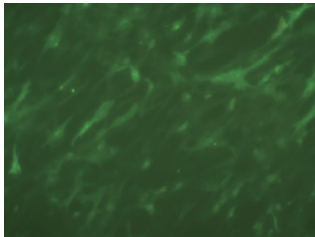
表 2 剩余水分测定结果

瓶号	空瓶重/g	干燥前总重/g	第一次干燥后总重/g	第二次干燥后总重/g	干燥前重/g	干燥后重/g	剩余水分含量
	A	B	C	D	E(即 B - A)	F(即 D - A)	E - F/E
1	9.1421	9.2771	9.2760	9.2759	0.1350	0.1338	0.9%
2	8.6712	8.7789	8.7782	8.7780	0.1077	0.1068	0.8%
3	8.6269	8.8036	8.8015	8.8015	0.1767	0.1746	1.2%
4	8.9590	9.1357	9.1344	9.1342	0.1767	0.1752	0.8%

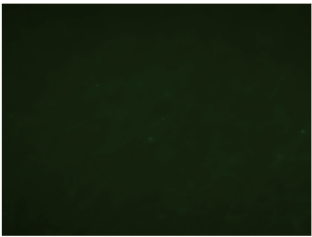
表 3 禽白血病毒检查 ELISA 试验结果

样 品		平均 OD _{650nm} 值	S/P 值	检定结果
IBV M41	P ₁	0.0575	0.0859	阴性
	P ₂	0.049	0.073	阴性
	P ₃	0.047	0.0702	阴性
细胞对照	P ₁	0.055	0.0822	阴性
	P ₂	0.0475	0.071	阴性
	P ₃	0.048	0.0717	阴性
病毒对照 (RAV - 1 株)	P ₁	0.224	0.335	阳性
	P ₂	1.423	2.127	阳性
	P ₃	1.342	2.01	阳性
病毒对照 (RAV - 2 株)	P ₁	0.905	1.353	阳性
	P ₂	1.204	1.80	阳性
	P ₃	1.06	1.584	阳性
阳性对照		0.669	/	/
阴性对照		0.044	/	/

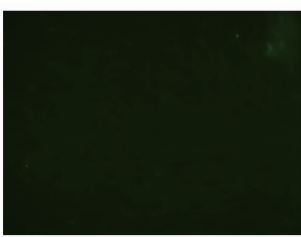
S/P 值≤0.2 判为阴性,S/P 值 >0.2 判为阳性



阳性对照



阴性对照



IBV M41样品

图 2 网状内皮组织增生症病毒检查结果

2.7 病毒含量测定 结果见表4。IBV M41 冻干毒对鸡胚的半数感染量为 $10^{5.9}/0.1\text{ mL}$,符合要求。

表 4 病毒含量测定结果			
样品	稀释度	病变数/接种数	病毒含量/EID ₅₀
IBV M41	10^{-4}	5/5	$10^{5.9}/0.1\text{ mL}$
	10^{-5}	4/5	
	10^{-6}	2/5	
	10^{-7}	1/5	

2.8 特异性检验 结果见表5。可以看出,IBV M41 冻干毒的特异性检验符合要求。

表 5 特异性检验结果			
组别	感染率	未感染率	鉴定结果
实验组	0/10	10/10	完全中和
病毒对照组	10/10	0/10	阳性对照成立
生理盐水对照组	0/5	5/5	阴性对照成立

2.9 致病性试验 由表6 结果可见,该病毒从第2 天起就能引起6 日龄SPF 鸡出现传染性支气管炎临床症状,发病症状明显、特异,发病时间集中在第2~7 天,至观察结束,能引起鸡群100% 发病。

表 6 致病性试验结果									
接种物	新增发病鸡数量/只								发病率
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	7d~14d	
IBV M41	0	5	6	5	2	1	1	0	20/20
生理盐水	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10

3 讨论与小结

冻干后保存是菌毒种最有效的保存方法,保存年限可达15~20 年,甚至更长,原理就是使菌毒种在安瓿中冷冻,然后在真空下利用升华现象除去水分,使其处于干燥、缺氧状态,生理活动停止,在4℃即可保存,并且方便存取、运输、销售和交换。未经冻干的湿毒即使在超低温冰箱中保存也存在毒力下降的风险,且不适合运输,因此很多微生物菌种保藏中心对菌毒种的保藏一般采用冻干保存^[10]。

冻干后鉴定是菌毒种保藏前重要的步骤,鉴定不合格的不能作为种毒保存。鉴定不仅要 对菌毒种本身特性进行鉴定,也要对其纯净性和冻干后性状进行判定。本研究对传染性支气管炎病毒 M41 株进行鸡胚传代扩繁后冻干,抽取样品,经病毒含量测定、纯净性、特异性、致病性、性状、真空度、剩余水分等鉴定证明,该病毒传代稳定,病毒含量达到要求;无细菌、支原体和外源病毒污染;能够被同型特异性阳性血清中和;能引起雏鸡100% 发病;冻干后性状、真空度和剩余水分都能达到要求,可以作为研究用种毒。

参考文献:

[1] 童光志. 动物传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,2008.

[2] Saif Y M , Bames H J , Glisson J R , *et al.* Diseases of poultry [M]. 11th. Ames:Iow a State University Press, 2003.

[3] Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. Veterinary Research, 2007,38(2):281-297.

[4] Bijlenga G,Cook J K,Gelb J Jr,*et al.* Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from theNetherlands as a vaccine[J]. Avian Pathol,2004,33(6):550-557.

[5] 陶家权,刘乔然,乔荣苓,等. 鸡传染性支气管炎的流行及防控[J]. 中国家禽,2009,31(24):65-66.

[6] 代金芳. 鸡传染性支气管炎疫苗使用概况[J]. 畜禽业,2014,12(308):14-15.

[7] 李英芳. 鸡传染性支气管炎流行现状及其防控措施[J]. 畜牧兽医杂志,2015,34(4):88-89.

[8] 农业部兽药评审中心. 兽药质量标准汇编[S]. 2011.

[9] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2010 年版三部.

[10] 华泽钊. 冷冻干燥新技术[M]. 北京:科学出版社,2006.

(编辑:李文平)