

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.05.04

鸡痘病毒活疫苗污染禽网状内皮组织增生症病毒的间接免疫荧光法检测研究

孙 淼, 李 岭, 李启红, 夏业才, 李慧姣, 李俊平*, 杨承槐*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-06-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 05-0024-05 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 通过向无外源病毒污染的鸡痘病毒活疫苗中添加不同剂量的禽网状内皮组织增生症病毒(REV), 然后用间接免疫荧光法(IFA)进行检测, 确定了该 IFA 方法的最低检出量为每 500 羽份疫苗中污染 20 TCID₅₀ 的 REV。使用该方法对国内 16 家企业生产的 60 批鸡痘病毒活疫苗进行了检验, 结果显示 2 个企业生产的 4 批疫苗 REV 检测为阳性。随机选取 5 批 IFA 检测阴性样品和 4 批 IFA 检测阳性样品, 按鸡检查法进行外源病毒检验, 结果两种方法对 REV 污染的检测结果的符合率为 100%。

[关键词] 鸡痘病毒活疫苗; 网状内皮组织增生症病毒; 间接免疫荧光法

Research of Detection of Avian Reticuloendotheliosis Virus Contamination in Fowlpox Live Vaccine by Indirect Immunofluorescence Assay

SUN Miao, LI Ling, LI Qi-hong, XIA Ye-cai, LI Hui-jiao, LI Jun-ping*, YANG Cheng-huai*

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

Corresponding authors: LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com; YANG Cheng-huai, E-mail: ychenghuai@163.com

Abstract: In this study, the fowlpox live vaccine, not contaminated with exogenous viruses, was added with different doses of avian reticuloendotheliosis virus (REV) and REV was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA). The results indicated that the lowest detection limit was 20 TCID₅₀ for 500 doses of vaccine. 60 batches of fowlpox live vaccine from 16 companies were selected to detect REV contamination using IFA method. The results showed that 4 batches of vaccine were REV positive. 5 batches of REV negative vaccine and 4 batches of REV positive vaccine were selected randomly for exogenous virus detection using chicken test method. The coincidence rate of the two methods was 100%.

Key words: fowlpox live vaccine; REV; IFA

基金项目: 中国兽医药品监察所所级课题(201504)

作者简介: 孙 淼, 助理研究员, 从事兽用病毒类生物制品检验与相关研究工作。

通讯作者: 李俊平, E-mail: lijunping03@163.com; 杨承槐, E-mail: ychenghuai@163.com

禽网状内皮组织增生病是由反转录病毒科的网状内皮组织增生病病毒 (Reticuloendotheliosis Virus, REV) 引起的一种禽类肿瘤性疾病^[1-2]。鸡痘的免疫防控主要使用鸡痘弱毒活疫苗, 免疫的成功与否主要取决于疫苗的抗原效价、纯净性及特定的使用条件。外源病毒污染是目前影响我国鸡痘活疫苗质量的严峻问题。国内外已有多例关于禽用活疫苗中污染 REV 并造成严重损失的报道^[3-4]。

目前, 国内外已建立了多种用于检测 REV 的血清学和分子生物学方法^[5-6], 这些方法常用于进行 REV 的流行病学调查, 或比较不同 REV 毒株间的核苷酸序列差异, 分析其遗传进化规律等。也有很多研究者使用 PCR 的方法从禽用疫苗中检测出 REV 的污染^[7-8]。美国 CVB 实验室已经建立了 REV 的 PCR 检测方法并将其作为种毒的标准检验方法, 欧洲药典中则规定使用免疫染色法对种毒中是否含有 REV 进行检验。

根据《兽用生物制品规程》(二〇〇〇年版)^[9]、《中华人民共和国兽药典》三部(二〇〇五年版)^[10]规定, 鸡痘活疫苗必须进行外源病毒检验, 确保疫苗使用的有效性和安全性。在进行外源病毒检验时, 鸡胚检查法和细胞检查法均无法有效检出 REV, 只有通过鸡检查法才能检测到 REV 污染, 但鸡检查法成本高、检验周期长。李俊平等^[11]在国内首次通过系统的研究建立了禽用活疫苗中污染 REV 的间接免疫荧光法 (Indirect Immunofluorescence Assay, IFA) 检测方法, 并被《中国兽药典》三部(二〇一〇年版)收录, 作为禽用活疫苗检测 REV 污染的国家标准。为进一步确定该方法对不同疫苗产品的检测灵敏度并与传统鸡检查法进行比较, 开展了鸡痘活疫苗中污染 REV 的 IFA 检测研究, 以期为鸡痘活疫苗质量控制提供更有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鸡痘活疫苗 已知无外源病毒污染的样品 1 批; 待检样品 60 批来源于 16 个生产企业。

1.1.2 REV HA9901 株 山东农业大学动物科技

学院家禽肿瘤病实验室惠赠。

1.1.3 SPF 鸡胚 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.4 试剂 M199 营养液、新生牛血清均购自 Hyclone 公司; 鸡抗 REV 特异性血清, 中国兽药药品监察所病毒制品检测室制备^[12]; 兔抗鸡 IgY 荧光抗体, 购自 SIGMA 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 取 1000(或以上)羽份鸡痘活疫苗样品, 用 4 mL(或适量)不含血清的 M199 营养液溶解, 使最终为 500 羽份/2 mL; 4 ℃, 12000 g 离心 15 min; 上清液经 0.8 μm、0.45 μm、0.22 μm、0.1 μm 滤器各过滤 1 次, 取滤液 2 mL(相当于 500 羽份)用于接种鸡胚成纤维细胞(CEF)。

1.2.2 样品接种与传代 按常规方法制备 CEF; 将处理好的样品接种于 1 个 25 cm² 的 CEF 单层, 置 37 ℃吸附 1 h, 弃去接种液, 用含 3% 牛血清的 M-199 培养液洗 CEF 单层 2 次, 2 mL/次, 每瓶细胞加 7~8 mL 含 3% 牛血清的 M199 培养液, 37 ℃培养 7 d。培养到期, 按照常规方法消化, 取消化后 1/10 的细胞用 2 mL 含 3% 新生牛血清的 M199 营养液悬浮, 接种 4 孔 48 孔板, 每孔接种 0.5 mL。剩余细胞做好标记, -15 ℃以下保存备用。接种细胞的 48 孔板置 5% CO₂, 37 ℃继续培养 5 d。

1.2.3 荧光染色 按照常规方法进行间接免疫荧光染色, 在倒置荧光显微镜下观察。

1.2.4 IFA 法检测鸡痘活疫苗中污染 REV 的最低检出量 向每 500 羽份鸡痘活疫苗样品(外源病毒检测为阴性)中分别添加 0 TCID₅₀、5 TCID₅₀、10 TCID₅₀、20 TCID₅₀ 的 REV, 按 1.2.1、1.2.2、1.2.3 步骤用 IFA 方法进行检测。

1.2.5 商品化鸡痘活疫苗中污染 REV 的检测 由 16 家企业生产的 60 批鸡痘活疫苗样品用《中国兽药典》^[13]规定的 IFA 方法进行外源病毒 REV 的检测。

1.2.6 IFA 法与鸡检查法的符合率比较 随机选取 5 批 1.2.5 中检测结果为阴性的样品和全部阳性样品, 按照《中国兽药典》^[13]规定的鸡检查法进行

检验,比较两种方法的符合率。

鸡痘活疫苗中污染 REV 的最低检出量为每羽份疫苗中含 0.04 TCID₅₀ 的 REV。

2 结 果

2.1 IFA 法检测鸡痘活疫苗中污染 REV 的最低检出量 表 1 结果显示,每 500 羽份鸡痘活疫苗中污染 20 TCID₅₀ 的 REV 即可检出,即 IFA 检测方法对

2.2 商品化鸡痘活疫苗中污染 REV 的检测 表 2 结果显示,2 家企业生产的 4 批活疫苗样品中 REV 检测为阳性。

表 1 鸡痘活疫苗中不同 REV 添加量的 IFA 检测结果

Tab 1 Result of IFA detection of REV in fowlpox live vaccine with different dosage of REV

试验组 experimental group	0 TCID ₅₀ /500 羽	5 TCID ₅₀ /500 羽	10 TCID ₅₀ /500 羽	20 TCID ₅₀ /500 羽
鸡痘活疫苗 fowlpox live vaccine	/	1/4 阳性	3/4 阳性	4/4 阳性
病毒对照 virus control	4/4 阳性	/	/	/
正常细胞 cell control	4/4 阴性	/	/	/

表 2 IFA 法检验商品鸡痘活疫苗中 REV 污染结果

Tab 2 Result of REV contamination in commercial fowlpox live vaccines using IFA method

企业编号 number of company	产品名称 name of product	检验批数 batches of detection	REV 阳性率 positive rate of REV
1	鸡痘活疫苗(I)	3	0/3
2	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	7	0/7
3	鸡痘活疫苗	9	3/9
4	鸡痘活疫苗(细胞苗)	3	0/3
5	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
6	鸡痘活疫苗	3	0/3
7	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
8	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	4	0/4
9	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	4	1/4
10	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
11	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
12	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
13	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
14	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
15	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
16	鸡痘活疫苗(鹌鹑化弱毒株)	3	0/3
总计 total	/	60	4/60

2.3 IFA 法与鸡检查法的符合率比较 表 3 结果显示,IFA 法检测阳性的 4 批鸡痘活疫苗,鸡检查法均为阳性;IFA 法检测阴性的 5 批鸡痘活疫苗,

鸡检查法也均为阴性,表明两种检测方法对 9 批临床疫苗中污染 REV 的检测结果符合率为 100%。

表 3 IFA 法与鸡检查法的符合率比较

Tab 3 Coincidence rate of IFA method and chicken test method

产品名称 name of product	试验批数 batches of detection	IFA 法检测结果 result of IFA method	鸡检查法检测结果 result of chicken test method	符合率 coincidence rate
鸡痘活疫苗 fowlpox live vaccine	4	4/4 批阳性	4/4 批阳性	100%
	5	5/5 批阴性	5/5 批阴性	100%
总计 total	9	/	/	100%

3 讨 论

李俊平等^[11]建立的 IFA 方法自收入《中国兽药典》以来,已经广泛应用于禽用活疫苗外源病毒 REV 的检验工作,该方法与传统鸡检查法相比具有快速、准确、成本低的优点。通过检验,从商品化鸡痘活疫苗中检测出了 REV 阳性样品,并进一步确定了运用 IFA 法检测鸡痘活疫苗中污染 REV 的敏感性及其与鸡检查法的符合率。

研究通过向外源病毒检测为阴性的鸡痘活疫苗中添加不同病毒含量(0 TCID₅₀、5 TCID₅₀、10 TCID₅₀、20 TCID₅₀)的 REV,模拟 REV 的污染,并用 IFA 法进行检验,确定了其检测鸡痘活疫苗污染 REV 的最小检出量为每 500 羽份污染 20 TCID₅₀的 REV。Luan H^[8]等通过人工添加不同剂量的 REV 到鸡马立克氏病活疫苗和鸡痘活疫苗中,再用建立的 qPCR 方法进行检测,结果表明 qPCR 法最低可检出每 500 羽份污染 0.5 TCID₅₀的 REV。虽然 IFA 法与 qPCR 法比较敏感性略低,但是其检测为阳性的样品中可以确定含有感染性的 REV 病毒粒子,而 qPCR 法与其他 PCR 方法检测的是 REV 的某段核苷酸序列,并不能确定是否含有感染性病毒粒子。

王景燕等^[14]将禽痘活疫苗接种 7 日龄雏鸡,采血浆接种 CEF 进行传代培养,并分别用 IFA 法和 PCR 法进行检测,最终获得 1 株 REV 游离病毒。Awad 等^[15]用 PCR 方法对 30 批鸡痘病毒疫苗样品

检测 REV 污染情况,在 1 批样品中检测到 REV 核酸阳性。同时,该疫苗样品接种 5 日龄 SPF 鸡,定期采集血清用 ELISA 方法检测 REV 抗体均为阳性,定期采集肝脏、脾脏和法氏囊,通过组织病理学检查,在这些器官中均存在肿瘤细胞,说明该疫苗样品确实污染了 REV。应用 IFA 法对 16 家企业生产的 60 批商品化鸡痘活疫苗进行了 REV 检测,结果 2 家企业生产的 4 批活疫苗 IFA 检测为阳性,说明我国鸡痘活疫苗中存在污染 REV 的情况。

目前,对鸡痘活疫苗污染 REV 的检测仅限于血清学和分子生物学方法,很少用鸡检查法进行验证。Awad 等^[15]将 1 批污染了 REV 的鸡痘活疫苗接种 SPF 鸡,最终检测出 REV 的抗体,对 PCR 法进行了验证。国内学者尚无系统的使用鸡检查法与鸡痘活疫苗污染 REV 的检测方法进行比较验证。鸡检查法是我国现行合法的能够有效地检测出禽用活疫苗中污染 REV 的方法。研究选取 IFA 法检测 REV 为阳性的 4 批鸡痘活疫苗样品通过鸡检查法都检测到了 REV 的特异性抗体,而 5 批阴性样品检测均为阴性,二者检测结果的符合率为 100%,再次确证了 IFA 方法检测的可靠性。鸡痘活疫苗污染 REV 的 IFA 检测方法具有较高的敏感性,该方法的建立进一步完善了禽用活疫苗外源病毒的检验体系,为有效防控禽用活疫苗污染外源病毒提供了更可行有效的检验手段。

参考文献:

- [1] Y.M.Saif. 禽病学[M]. 第十二版. 北京: 中国农业出版社, 2012; 663-688.
Y.M.Saif. Diseases of poultry[M]. 12nd edition. Beijing: China Agriculture Press, 2012; 663-688.
- [2] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014; 844-846.
Hu R L. Modern animal virology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014; 844-846.
- [3] Jackson C A W, Dunn SE, Smith DI, *et al.* "Nakanuke" and reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys (HVT)[J]. Australian Veterinary Journal, 1977, 53(9): 457-458.
- [4] Wei K, Sun Z, Zhu S, Guo W, *et al.* Probable congenital transmission of reticuloendotheliosis virus caused by vaccination with contaminated vaccines[J]. PLoS one, 2012, 7(8): e43422.
- [5] Fadly A M, Garcia M C. Detection of reticuloendotheliosis virus in live virus vaccines of poultry[J]. Dev Biologicals, 2006, 126: 301-305, discussion 327.
- [6] 邓小芸, 祁小乐, 高玉龙, 等. 禽网状内皮组织增生症流行现状及检测技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2010, 31(9): 93-96.
Deng X Y, Qi X L, Gao Y L, *et al.* Progress on epidemiology and detection technique of reticuloendotheliosis[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(9): 93-96.
- [7] Takagi M, Ishikawa K, Nagai H, *et al.* Detection of contamination of vaccines with the reticuloendotheliosis virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)[J]. Virus Research, 1996, 40(2): 113-121.
- [8] Luan H, Wang Y, Li Y, *et al.* Development of a real-time quantitative RT-PCR to detect REV contamination in live vaccine[J]. Poultry Science, 2016, pii: pew147.
- [9] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程(二〇〇〇年版)[S]. 北京: 科学出版社, 2000.
Veterinary Biologics Regulation Commission of Ministry of Agriculture. Regulation of Veterinary Biologics of People's Republic of China (2000 edition)[S]. Beijing: Science Press, 2000.
- [10] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部(二〇〇五年版)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China 3rd part (2005 edition)[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.
- [11] 李启红, 杨承槐, 刘丹, 等. 鸡马立克病活疫苗中污染禽网状内皮组织增生病毒检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2014, 50(11): 81-84.
Li Q H, Yang C H, Liu D, *et al.* Establishment of indirect immunofluorescence assay method for detection of avian reticuloendotheliosis virus contamination in Marek's disease live vaccine[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 50(11): 81-84.
- [12] 李俊平, 杨承槐, 李启红, 等. 鸡抗 REV 血清的制备与检定[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(9): 15-18.
Li J P, Yang C H, Li Q H, *et al.* Preparation and Identification of Chicken Anti-Reticuloendotheliosis Virus Polyclonal Antibody[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2011, 45(9): 15-18.
- [13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部(二〇一五年版)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China 3rd part (2015 edition)[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2016.
- [14] 王景艳, 李中明, 赵鹏, 等. 禽痘病毒活疫苗中网状内皮组织增生病毒病的分离鉴定及其序列比较[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(1): 35-39.
Wang J Y, Li Z M, Zhao P, *et al.* Isolation of reticuloendotheliosis virus from a fowl pox live vaccine and env gene sequence analysis[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2010, 18(1): 35-39.
- [15] Awad A M, Abd EI-Hamid H S, Abou Rawash A A, *et al.* Detection of reticuloendotheliosis virus as a contaminant of fowl pox vaccines[J]. Poultry Science, 2010, 89(11): 2389-2395.

(编辑: 李文平)