**病毒总论**

**病毒基本特征：**

形体极其微小，必须在电子显微镜下才能观察，一般都可通过细菌滤器；

没有细胞构造，故也称分子生物；

其主要成分是核酸和蛋白质；

既无产能酶系也无蛋白质合成系统；

在宿主的活细胞内营专性寄生；

在宿主细胞协助下，通过核酸的复制和核酸蛋白装配的形式进行增殖，不存在个体生长和二均等分裂等细胞繁殖方式

在离体条件下，以无生命的化学大分子状态存在，并可形成结晶；

每一种病毒只含有一种核酸，不是DNA就是RNA；

对一般抗生素不敏感，但对干扰素敏感。

**病毒核心、衣壳、囊膜的基本功能**

功能：含有病毒基因组(genome)，控制病毒的复制、遗传与变异

功能：保护病毒核酸、具有免疫原性、介导病毒进入细胞

功能：保护，介导病毒进入细胞(嗜细胞性)，具有致病性，免疫原性

**病毒的化学组成**

1.核酸：遗传的物质基础。

2.蛋白质：与易感细胞表面的受体有特殊的亲和力。

3.类脂质：具有宿主细胞脂质的特性。

4.糖类：是某些病毒纤突的成分。

**病毒分类标准：**

病毒的形态结构（如杆状病毒、弹状病毒等）

核酸类型和多肽（RNA/DNA，ds/ss，linear/circular，fragment /no-fragment）

病毒的复制

对理化因素的稳定性

**病毒的特异性吸附与细胞受体的关系**

特异性吸附（与病毒的细胞嗜性（cell tropism）相关）

①病毒表面分子，如纤突等

②细胞表面的病毒受体：多为糖蛋白

③部分病毒除受体外还需辅受体，如腺病毒

血凝作用（haemagglutination，HA）：如AIV,NDV等血凝素，能与红细胞表面神经氨酸受体结合

血凝抑制作用 (haemagglutination-inhibition,HI)：如AIV等神经氨酸酶破坏神经氨酸受体，使病毒从吸附的红细胞上脱落。

血吸附(haemadsorption)：如非洲猪瘟病毒一种特殊形式的血凝作用，是将红细胞吸附于病毒感染的宿主细胞表面

**6 病毒增殖的一般过程。**

包括（1）吸附期，病毒和细胞相互碰撞而接触，并通过病毒表面的吸附点和易感细胞表面相应受体互相吸附。（2）进入期，病毒通过吞饮方式或直接穿入方式进入细胞内（3）脱壳期：动物病毒在侵入寄主细胞的过程中，其病毒粒子会脱去包膜和壳体，使病毒核酸得以复制（4）生物合成期，病毒进行基因组复制和子代蛋白质合成。（5）病毒的组装和释放，：所有的病毒结构成分聚集在细胞内的一个位置上，形成病毒颗粒的基本结构的过程，病毒在细胞内装配完整的病毒子，然后通过出芽和裂解方式释放的细胞外。

无囊膜病毒

1、吞饮作用：病毒首先被吞入，进入吞噬泡，再与溶酶体融合，脱衣壳（蛋白酶作用），暴露基因组。

2、结构改变：病毒吸附于细胞后，衣壳就开始解体，失去完整性。如小RNA病毒。主要是受体使壳粒重新安排。随后病毒被吞噬或直接进入细胞，将基因组释放到胞浆中。

3、直接侵入：病毒吸附于细胞受体后，直接穿过细胞膜，衣壳被细胞蛋白酶所消化，释放核酸，如腺病毒。

有囊膜病毒

有些有囊膜病毒在吸附后囊膜与细胞膜融合，核衣壳侵入细胞，完成脱壳程序，如副粘病毒和疱诊病毒。也可经过吞噬作用而侵入细胞，如弹状病毒和披膜病毒。

穿入：

 在胞浆膜穿入并脱壳（膜融合）：NDV

 在内吞小体脱壳：AIV

 在核膜脱壳：腺病毒

①有囊膜的病毒

病毒囊膜与宿主细胞膜融合，病毒衣壳直接进入细胞浆中；整个病毒颗粒被吞入吞噬泡。

②无囊膜的病毒——经细胞膜吞入

**有囊膜病毒如何成熟和释放**：

以出芽方式成熟，有细胞膜出芽和胞吐两种形式。

有囊膜的DNA病毒

一部分：移至核膜上，以芽生方式进入胞浆中，获得宿主细胞核膜成分的囊膜，并逐渐从胞浆中释放到细胞之外。

另一部分：能通过核膜裂隙进入胞浆，从胞奖膜上获得囊膜，沿核周围与内质网相通部位从细胞内逐渐释放。

 有囊膜的RNA病毒

其RNA与蛋白质在胞浆中装配成螺旋状的核衣壳，宿主细胞膜上在感染过程中已整合有病毒的特异抗原成分。当成熟病毒以芽生方式通过细胞膜时，就带有这种胞膜成分，并产生刺突。

**病毒的基因重组：**

（1）分子内重组：指两种不同但密切相关的病毒的核苷酸片段的交换。DNA病毒可发生此种现象，RNA 病毒更为普遍。

（2）重配：在两株基因组分节段的RNA病毒感染同一细胞时，两者基因组发生互换，产生稳定或不稳定 的重配毒株。

（3）复活：是指用同一株病毒产生不同程度致死性突变的若干病毒颗粒同时感染某一细胞时。

**CPE的含义及表现形式：**

CPE（Cytopathic effect）：某些病毒接种培养的单层细胞后，第一轮感染产生的子代病毒将蔓延感染邻近的细胞，最终感染所有的细胞，感染导致的细胞损伤称为CPE。 CPE可在光学显微镜下观察，是病毒学检测和研究的常规手段之一。

不少病毒产生CPE的能力与其对动物致病力正相关，因此通常用CPE作为指标判定病毒的毒力，计算病毒的半数细胞感染量TCID50.

CPE的表现因病毒和细胞种类而异: 有多种形式，如细胞圆缩、肿大、形成合胞体或空泡等。可表现为细胞膜和细胞骨架的变化。

1. 涉及细胞膜的CPE：细胞膜与病毒吸附、进入、组装及释放有关。细胞膜融合与合胞体的形成是病毒感染的特性。

2. 涉及细胞骨架的CPE：细胞骨架由微丝、中间丝及微管组成，与细胞结构的完整性、物质运输及运动性有关。病毒感染可导致这些结构破坏，细胞崩解。

3. 细胞凋亡和坏死：感染细胞可引起程序性死亡。

**病毒引致的非杀细胞变化**

**•**通常引致持续感染，对细胞新陈代谢影响不大，同时还生产释放子代病毒粒子。

•感染细胞大多能继续生长并分裂。

•常见于某些RNA病毒感染，如副粘病毒、瘟病毒等。

•持续感染的细胞发生慢性渐进性变化，最终死亡。

1. **简答**
2. **实验动物在病毒学研究中不可代替的应用**

（1）病毒的致病性研究；

（2）抗血清的制备；

（3）病毒性疾病的药物治疗实验；

（4）疫苗免疫保护效果分析

**2.以双股DNA病毒为例说明病毒复制机制**

**（简图或语言）**

1. **病毒持续性感染的特点**

①长达几个月至几年的潜伏期（除个别例外）；②病原体长期乃至终生持续存在；③病变和症状常与免疫病理或免疫缺陷有关，发病后常呈进行性，预后大多不良；④除少数例外，自然感染的宿主范围极窄，大多局限于同一种属动物，而且常有遗传倾向，临床症状和病理变化也较严重。

1. **病毒核衣体的对称种类**

1.螺旋状对称

在螺旋状对称的病毒粒子中，核衣壳内的核酸分子由蛋白亚单位周期性地围绕，一起盘绕成线团或弹簧样，外由脂蛋白囊膜所包围。病毒壳粒呈缧旋形对称 排列，中空，见于弹状病毒、正黏病毒和副黏病毒及多数杆状病毒。

2、 二十面体对称

核衣壳形成球状结构，壳粒镶嵌排列成二十面体对称型式，每一面都呈等边三角 形，构成了 12个顶、20个面和30个棱的立体结构，病毒粒子顶角由5个相同的壳粒构 成,称为五邻体，而三角形面由6个相同壳粒组成，称六邻体。

3.复合对称型

病毒的壳粒排列构型，既有螺旋状对称又有二十面体对称，即为复合对称型病毒 结构,代表病毒为痘病毒、噬菌体等。

1. **病毒持续性感染的分类及概念**

持续性感染：病毒在宿主体内持续存在，达数月甚至终生，但不一定持续增殖和持续引起症状。

分类 ：①潜伏感染（latent infection）：是指病毒侵入机体后，并不引起明显的临床症状，也不复制出大量的病毒颗粒，仅在一定的组织中潜伏存在。

②慢性感染（chronic infection）：病毒在机体内持续增殖，可不断排出体外，常不引起临床疾病，但在机体免疫功能低下时发病，症状长期存在，其免疫病理作用在病毒致病机制上具有重要意义。

③慢病毒感染（slow virus infection）：为慢性发展的进行性加重的病毒感染，较为少见但后果严重。

1. **细胞培养及其概念**

细胞培养的概念：利用机械、酶或化学方法，使动物组织或传代细胞分散成单个乃至2～4个细胞团悬液进行培养。

1. **论述**
2. **病毒核酸特点。举例说明哪些病毒核酸具有该特点**

1、种类。DNA或RNA。DNA病毒：痘病毒科、天花病毒；RNA病毒：正黏病毒科、禽流感病毒。

2、股数。单股DNA病毒：犬细小病毒科、犬细小病毒；单股RNA病毒：微RNA病毒科、口蹄疫病毒；双股DNA病毒：疱疹病毒科、猪伪狂犬病病毒；双股RNA病毒：双RNA病毒科、鸡染性法氏囊病毒。

3、线状和环状。线状核酸病毒：副黏病毒科、新城疫病毒；环状核酸病毒：猪圆环病毒。

4、分节段和不分节段。病毒核酸分几个阶段病毒：正黏病毒科、禽流感病毒；核酸不分节段病毒：弹状病毒科、狂犬病毒。

5、正股和负股。单链正股RNA病毒：冠状病毒科、SARS病毒；单链负股RNA病毒：副黏病毒科、犬瘟热病毒。

6、病毒核酸差别很大。最小的动物DNA病毒是圆环病毒，其基因组仅1.7 kb，最大的DNA病毒是疱疹病毒及痘病毒，都大于200 kb。

7、病毒核酸的结构特征。 分段基因组病毒粒子有两种存在方式：多个核酸节段包装在同一病毒粒子中和多个核酸节段分别包装在不同的病毒粒子中，称多分体病毒。 帽子和ploy（A）结构 可以保护核酸，还与病毒的侵袭性有关。

**2.病毒持续性感染机制**

（1）病毒基因组整合到宿主细胞DNA中

（2）病毒侵犯免疫细胞或在有掩护的细胞内增殖

（3）病毒抗原发生变异

（4）缺损干扰颗粒的出现

（5）免疫耐受

（6）抗体功能异常或引起靶细胞表面病毒抗原的改变

（7）干扰素产生能力低下

（8）细胞免疫应答低下

（9）宿主的遗传因素

**3.病毒复制、复制周期、感染复数、共分期、隐蔽期、复制阶段**

1）病毒复制及复制周期的概念：病毒在活细胞内，以病毒基因组为模板，在酶的作用下，分别合成病毒基因及蛋白质，再组装成完整的病毒颗粒，这种方式称为复制。从病毒吸附于宿主细胞开始，到产生成熟子代病毒从感染细胞内释放到细胞外的复制过程，称为病毒的复制周期。

2）感染复数（multiplicity of infection，m.o.i）是指用以起始病毒感染的每个细胞所需的病毒颗粒数目，单位（PFU/cell）。

3）病毒的一步生长曲线及其分期：采用适量的病毒悬液来感染标准培养条件下高浓度的细胞溶液，经过病毒吸附后，洗涤细胞去除未被吸附的病毒，尽可能的达到病毒的感染复数为1，使一个病毒感染一个细胞。这样所有的细胞同时被感染，增殖就是同步单周期的。经过培养一段时间以后，进行取样，分别测定病毒的效价，以感染时间为横坐标，病毒效价为纵坐标，绘制出的病毒增殖特征曲线。即为一步生长曲线。分为潜伏期、裂解期和衰退期。

4)病毒复制的隐蔽期，是指有感染性的亲代病毒粒子从消失到子代病毒出现这段时期。

5)病毒的复制阶段：吸附、侵入、脱壳、生物合成、装配和释放六个阶段。

**4.鸡胚接种病毒的途径及时间**

(1)绒毛尿囊膜接种：主要用于在绒毛尿囊膜上能够形成痘斑样病变的病毒接种，如痘病毒、疱疹病毒等，接种的日龄是10-12日龄；

(2)尿囊腔接种：主要用于正黏病毒或副黏病毒的接种，接种日龄为10-12日龄；

(3)卵黄囊接种：主要用于虫媒病毒或披膜病毒的接种，还可用于繁殖立克次氏体/衣原体的接种，接种日龄多为6-8日龄；

(4)羊膜腔接种：很多病毒可在羊膜腔接种后繁殖。其接种方法难度较大，限制了应用。接种日龄为10-12日龄。

**10、病毒病的微生物学检验程序**。

答：(一)、样品采集和递送及处理

(二)、镜检

1、光学显微显镜检查 包涵体：内基氏小体；细胞的病变特征：非化脓性脑炎。2、电子显微镜检查：主要有：形态、大小、构造；目前尚难培养的病毒；免疫电镜等。优点是：快速、肯定、无需培养，可以检查到混合感染；缺点是：不敏感（106／ml）、判别困难、效率低。成本昂贵。常用的技术：负染法、超薄切片法和免疫电镜法等。

(三)、病毒分离培养鉴定 分离培养：动物接种——原动物/实验动物 鸡胚接种——尿囊腔、卵黄囊、尿囊膜、羊膜腔等 细胞培养——原代细胞 ； 二倍体细胞 ； 技术克隆/扩增； 传代细胞组织块培养——肠管、气管环等 鉴定：生物学特性鉴定；血清学鉴定（对病毒）；病毒特性： 如血凝性；分子生物学技术等

(四)、血清学检查： 双份血清法（检抗体）HA、HI、补反、 放射元素\荧光\酶标记 中和试验

(五)、分子生物学技术 核酸酶切图谱 核酸探针 PCR技术等 其他病原微生物

**病毒各论**

1. **新城疫病毒诊断**与**防控**

A 微生物学诊断

（1）病毒分离：无循环抗体时，取脾、脑或肺制成匀浆，冻融三次，加双抗感作，接种10日鸡胚，观察死亡胚体出血情况，尿囊液做血凝试验，以新城疫病毒血清做血凝抑制实验鉴定。鉴定为新城疫病毒还需要做ICPI、MDT和IVPI测定病毒毒力。

如果有循环抗体，病料为肠内容物或用肠道制成的匀浆。

（2）荧光抗体染色：用于气管切片或抹片染色，观察荧光有无。

（3）RT－PCR诊断：病料提取RNA后，反转录cDNA，用可区分强毒株和弱毒株的引物扩展，直接鉴定病毒确诊。

（4）HI实验：用于非免疫鸡群诊断。免疫鸡群HI抗体效价参差不齐，可以用于辅助诊断。

B 防控

生产实践中，常用LaSota弱毒分别在第7、15、30天滴鼻点眼或饮水，60日注射I系，120天接种灭活油佐剂疫苗，进行预防接种。发病鸡用新城疫特异性卵黄抗体治疗有一定效果。

1. **犬瘟热致病机理（出现两次发热原因）、诊断**

原因：病毒首先在上呼吸道及黏膜上皮细胞复制，继而在局部淋巴结复制后被淋巴细胞携带进入血流，产生初始病毒血症，同时伴有第一次发热。病毒扩展到网状内皮系统，在淋巴器官增殖的病毒被淋巴细胞及单核细胞携带进入血流，产生第二次病毒血症，伴有第二次体温升高。

诊断：①病毒分离：病兽的淋巴细胞与经丝裂原刺激的健康犬淋巴细胞共同培养，传代后，可在MDCK、Vero或原代细胞生长、盲传数代可形成放射状及形成合胞体。

②免疫组化或RT－PCR检查病毒：取临死前动物外周血淋巴细胞或剖检动物的肺、胃、肠及膀胱组织做压片或提取RNA，用免疫组化或RT－PCR检测病毒抗原。

另外，现在临床上还可以用胶体金试纸条。

1. **狂犬病致病机理**

主要传播途径为被带毒动物咬伤。病毒进入机体后，特异性结合神经肌肉结合处的乙酰胆碱受体和神经节苷脂等受体。在伤口附件的肌细胞内复制，然后通过感觉或运动神经末梢侵入外周神经系统，沿神经轴索上行至中枢神经系统，在脑的边缘系统大量复制，并以很高的滴度分泌到唾液中。在动物出现兴奋狂暴症状乱咬时，唾液中含有高度感染性的病毒。

1. **禽流感病毒抗原性及其变异**
2. AIV表而抗原主要有HA抗原和NA抗原，内部抗原为N和M。这终抗原均具 杳良好的免疫原性。A1V的内部抗原较为保守,表面抗原HA和NA的变异频率髙，存时单独变有时同 时变异，是禽流感病毐区分亚型的主要依据。其变异嵙购种形式：抗原漂移和抗原转换。前莕指编码NA和HA蛋白的基因发生点突变而导致HA或NA抗原性的微小变化后 者主要指编码HA或NA的病毐基因发生基因重组或交换而导致HA或NA抗原的完全改变,它致使病毒 发生型的变异。由于甲型流感病毒各亚型之间抗体的交叉保护力差，所以当抗原转换导致新的巫型产生 时,宿主对新亚型无免疫力，往往发生流感的大流行。
3. **AIV毒力及其分生物学基础**

1、禽流感病毒的毒力差异很大，禽类感染流感病毒，轻者小表现明 显临床症状，重者感染鸡类可100%死亡。在病毒感染过程中，HA必须经过蛋白酶切割变成HA1和 HA2,所以HA对蛋白酶切割的敏感性直接影响到病毒的毒力。通过蛋白质生化及基因工程技术已经tf:明，HA切割位点的结构造影响切割 敏感性的主要原因。在切割位点插入碱性氨基酸序列，则容易切割。

2、正是由于禽流感病诲的诲力相差较大,根据其致病件的不同分为高致病性禽流感病海、低致病性禽流感病毒和无致病性禽流感病毒。

1. **PRRSV实验室诊断**

**血清学方法:**

 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA）

 间接免疫荧光试验(IFA)

 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)

 血清中和试验(SN)等

 血清学诊断操作容易，敏感性和特异性都较高。目前这4种 方法主要用于检测PRRSV抗体，对PRRS的诊断具有重要意义。

**病毒检测：**

 RT-PCR

 Real-time RT-PCR

 病毒分离：在流产猪中的病毒失活很快，采样要迅速。样品可选用血清、肺、淋巴结等。该方法较困难，周期长且只在猪肺巨噬细胞、非洲绿猴肾细胞系MA-104和Marc-145细胞中生长，易受宿主细胞类型限制。

**疫苗防制（**对种猪加强检疫，建立无病猪场是根本性措施。）

**灭活疫苗**

最大优点就是安全性较好，但是一般情况下，需要多次免疫才能刺激机体产生可以检测的抗体免疫应答。

 **弱毒疫苗**

最有可能提供高水平保护力，但在使用时，如果外界因素造成疫苗毒在无免疫力的猪体内连续传代，其毒力就有返强的可能。

 亚单位疫苗

 基因工程缺失疫苗

 核酸疫苗

感染猪场加强饲养管理，控制继发感染是重要手段。（免疫抑制）

1. **猪瘟病毒微生物学诊断**

(1)病毒分离：病料可取高热期发病猪的血液或病死猪的扁桃体、脾脏和淋巴结等;慢性塱病例还可 采集流产胎儿或死产猪的脏器。无菌处理后,接种动物或细胞，进行病毒分离。

(2)血清学实验:常采用免疫荧光技术、免疫酶实验、琼脂扩散实验和中和实验等,其中的荧光抗体技 术、免疫酶组化法和抗原捕捉EL1SA可快速检测组织中的病毒抗原。

(3)兔体反应实验：取健康易感兔,测定体温后接种待检病料,每天测量体温，7d后再接种兔化猪瘟 病毒弱毒株，并连续测温3 d,如果兔体温没有升高或升高不到1C，则证明病料中存在猪瘟病毒。而不接 种病料，只接种兔化猪瘟病毒弱毒株的对照兔体温上升，超过正常体温1 t以上（超过40.5C以上）

(4)新城疫病毒强化法：CSFV可以在ST细胞上繁殖,但不产生明显的细胞病变；新城疫病毒（NDV) 不能在ST细胞上繁殖,但将CSFV接种于ST细胞上37 t培养4 d，随后接种1 x 106PFU的NDV继续培养 3 d,在细胞上可出现明显的细胞病变，以此可证明猪瘟病毒在细胞上的存在,进行猪瘟的诊断。这种方法 称为新城疫病毒强化法。亦可用RT - PCR快速检测感染组织中的CSFV。

1. **口蹄疫病毒生态学**

口蹄疫在自然条件下仅感染偶蹄兽，牛最易感，猪次之,羊为隐性带毒。野生偶蹄兽也能感染和发病，猫、狗等动物可以人工感染，病畜是口蹄疫的主要传染源,在潜伏期就能排毒。水疱皮、水疱液、奶、唾液、 尿液及炸便的含毒量最多，病毒力也最强，易于传染。猪不能长期带毒,牛、羊及野生偶蹄动物可隐性带毒。

病毒通过直接接触传播。污染的畜产品、饲料、草场、饮水和水源、交通工具、饲养工具都可传播本病。空气也是重要的传播媒介。 口蹄疫传播迅速,且可跳跃式传播。该病流行有明显的季节性,一般冬春易发生大流行。

1. **朊病毒蛋白质结构**

（1）正常人和动物神经细胞能够表达一种PrP类似物，被称作PrP前体或朊粒前体分子，也即PrPC或PrP33-35。

（2）PrPC分布于正常细胞表面，对蛋白酶敏感，其功能尚不清楚。

（3）由羊瘙痒病因子感染的仓鼠脑组织分离的PrP则称之PrPSC（scrapie isoform of PrP）。（4）PrPSC和PrPC的一级结构相似，但由三级结构所决定的构象相有差异，PrPC几乎无β-折叠，具有4个α-螺旋结构。两者构象的主要区别为PrPC的2个α-螺旋与PrPSC结构中4个β-折叠的转变，并推测原本无毒的PrPC可通过这种结构的转变而获得毒性和对蛋白酶的抗性。

（5）PrP在一定条件下形成杆状结构或纤维状结构。后者就是可在电镜下看到的所谓痒疫相关纤维。

**IBDV A片断各编码蛋白的功能**

**** VP2和VP3是主要的病毒衣壳蛋白，占病毒蛋白的90％，分别组成病毒粒子的内外衣壳。

 VP2是病毒的宿主保护性抗原，与病毒中和抗体的诱导、抗原和毒力的变异及细胞凋亡等有关。

 VP3是群特异性抗原，与VP1蛋白形成VP1-VP3复合物，促进完整的病毒形态形成。

 VP4是病毒编码的一种具有酶活性的蛋白，能将多聚蛋白NH2-VP2-VP4-VP3-COOH以自裂解的方式水解，从而释放出成熟的VP2和VP3，故在病毒蛋白的成熟过程中起着重要的作用。

 VP5，非结构蛋白，在病毒复制中不是必需的，改变细胞膜通透性，与病毒粒子的释放有关，故在致病性方面起着重要作用。

**IBDV B片断基因的功能特点**

VP1以游离和与基因组结合两种形式存在。

 与病毒基因组dsRNA末端通过共价键牢固结合的VP1称为VPg，游离形式的90KDa蛋白则称为VP1。

 VP1蛋白具有RNA依赖RNA聚合酶活性（RdRp及鸟苷酸转移酶和甲基转移酶活性.

 VP1蛋白在胞浆内表达，和VP3蛋白共定位。

**IBDV病毒培养**

**鸡胚接种**

****培养和分离IBDV的最好手段

选用无母源抗体的鸡胚

5-7日龄鸡胚接种卵黄囊，9-11日龄鸡胚接种绒毛尿囊膜（CAM）和尿囊腔

CAM最敏感，病料接种后4-6天死亡。感染鸡胚发育阻滞，水肿和出血。肾脏充血出血。肝脏斑点状坏 死和出血。感染鸡胚胚体较尿囊液的毒量更高。

**细胞培养**

****能在鸡胚成纤维细胞（CEF），鸡胚法氏囊细胞，肾细胞中增殖，产生细胞病变和形成蚀斑。

对非鸡源细胞也敏感：火鸡胚细胞，鸭胚细胞，兔肾细胞，猴肾细胞（Vero）和幼素领猴肾细胞等。

适应鸡胚的IBDV可以在CEF上增殖，并产生细胞病变。

**免疫学鉴定** 琼脂扩散试验：简便快速。

荧光抗体：组织切片或触片。用SPF鸡法氏囊均浆吸附以去除荧光抗体中的非特异性结合。

ELISA：双夹心抗体ELISA, 普遍用于评价鸡群内IBDV抗体。

中和试验：鉴定不同血清型。

RNA电泳 SDS处理，苯酚－氯仿抽提后电泳，2条带。

**某鸡场 20 日龄肉用仔鸡，怀疑发生了传染性法氏囊炎，请用微生物学方法确诊？**

**答：**

􀁺 检测程序

（1） 症状观察和病理解剖，观察剖检病变；（0.5 分）

（2） 采样：以无菌方式采集病变严重和含毒量高的组织(法氏囊、脾、肾等)进行实验室

诊断；（1 分）

（3） 细菌分离：对病料进行平板培养分离细菌；（0.5 分）

（4） 病料的无菌预处理：将病料加入5-10 倍的生理盐水研磨均匀，离心取上清并加入一

定浓度的抗生素作用一段时间或直接通过过滤除菌，进行无菌预处理；（1 分）

（5） 病毒分离：绒毛尿囊膜接种9-11 日龄SPF 或无抗IBDV 抗体的鸡胚，接种后24h

照胚，弃去死胚，留下24h 以后死亡鸡胚，并收集尿囊膜和尿囊液进行下述检测；

（1 分）

􀁺 病毒特异性检测：

（1） 使用已知的抗IBDV 多抗或单抗与临床分离的病毒进行琼脂扩散试验（2 分）；

（2） 对所分离的病毒，也可通过其它特异的实验室方法鉴定病毒，如病毒中和试验、免

疫荧光试验、ELISA、核酸检测试验（PCR、核酸杂交检测法）等。（1 分）

􀁺 判定标准

（1） 通过症状与剖检病变进行初步诊断（1 分）；

（2） 细菌分离培养为阴性（1 分）；

（3） 如果琼脂扩散试验中的抗原孔和抗体孔之间出现白色沉淀线，或其它特异的诊断结

果为阳性，即可判定所分离的病毒为IBDV（1 分）。

􀁺 综上所述，可确断为传染性法氏囊炎。

**AIV神经氨酸酶**（NA）是镶嵌在病毒双层类脂膜上的另一种表面糖蛋白，是病毒的重要的表面抗原。

它的主要作用是水解呼吸道细胞表面的特异性糖蛋白末端的唾液酸残基，将病毒颗粒从细胞受体上释放出来，帮助子代病毒离开细胞进一步扩散传播。

基质蛋白（M）

 基质蛋白（M）蛋白有2个ORF，可转录出2个mRNA，即M1和M2。

 M1具有连接能力，能够参与调控病毒的转录和被感染细胞的胞核与胞浆间的物质转运。

 M2是一种跨膜蛋白，发挥离子通道作用。

**AIV致病机理**

毒力因子 除血凝素(H)外，还包括如核衣壳蛋白基因，聚合酶基因等。

毒力差异 未裂解的H无传染性，只有在靶器官呼吸道及肠道组织的相应的蛋白酶作用下，裂解为H1和H2，暴露融合肽段，通过融合进入宿主细胞。高致病力毒株与低致病力毒株的H裂解位点的氨基酸序列有差异。

致病 禽流感病毒的大多数强毒株感染鸡或火鸡可出现病毒血症，导致胰腺炎、心肌炎、肌炎及脑炎等。在发病后3-7d可检出抗体，在第2周时达到高峰，可持续18个月以上。

传播 大量病毒可通过粪排出，在环境中长期存活，尤其是在低温的水中。病毒通过野禽传播，特别是野鸭，即使在迁徙及越冬时也是如此。鸟也可带毒造成鸡群禽流感的流行。

**AIV诊断**

分离病毒非常必要，对鉴定病原及其毒力均不可少。

病料 一般从泄殖腔内采样，也可采肝、脾、血液、肺等。

分离 接种8-10日龄鸡胚尿囊腔。

鉴定 取尿囊液用鸡红细胞作HA-HI或ELISA等。进一步鉴定亚型需送国家级指定实验室完成。

毒力分析 可将分离株接种鸡，或用分离毒作空斑试验，检测其毒力，有毒株能产生空斑，无毒株则否。

高致病力OIE规定的标准为：将含病毒的鸡胚尿囊液原液用灭菌生理盐水作1:10稀释，静脉内接种4-8周龄SPF鸡8只，每只0.2ml，隔离饲养观察10d，死亡≥6只者，判为高致病性禽流感病毒。

血凝抑制试验(HI) 非特异凝集素和非特异抑制素。

神经氨酸酶抑制试验（NIT） 不能用于亚型鉴定。

琼脂凝胶扩散（AGP） 水禽血清缺乏沉淀抗体。

病毒中和试验（SN） 试验的周期长，操作繁琐。

免疫荧光法（IFA） 成本高。

酶联免疫吸附试验（ELISA）敏感、特异，适用大量样品。

**新城疫病毒中融合蛋白F蛋白的主要功能及作用**有：

① 直接参与NDV致病过程，在HN的协同作用下使病毒囊膜与宿主细胞膜的融合，病毒穿过细胞膜进入胞内，使红细胞溶解。

② F蛋白与病毒的毒力有关。

③ F蛋白是主要的保护性抗原。

④ F基因是用于遗传学分析的主要基因。

**新城疫致病机理**

感染 病毒首先在呼吸道及肠道黏膜上皮复制，借助血流扩散到脾及骨髓，产生二次病毒血症，从而感染肺、肠及中枢神经系统。

血清型 NDV只有一个血清型，但毒株毒力有较大差异。 可分成3个类型：强毒型、中毒型和弱毒型。 强毒型又名嗜内脏型，致死率可达100％，引致广泛的出血性损伤。天然弱毒株已作为疫苗使用。

传播 病毒通过气雾、污染的食物及饮水传播。

免疫 抗体产生迅速。HI抗体在感染后4-6d即可检出，可持续至少2年。HI抗体的水平是衡量免疫力的指标。雏鸡的母源抗体保护可有3-4周。

**NDV诊断**

血凝性：

新城疫病毒也能使红细胞吸附在细胞培养物中感染细胞的表面，此即所谓血细胞吸附现象。

血凝、血细胞吸附都由囊膜上的糖蛋白所引起，能被特异性抗体所抑制。

所有毒株都有凝集多种动物红细胞的作用，但以鸡、豚鼠和人“O”型的红细胞最为常用。

病毒培养：

鸡胚培养 10-12日龄鸡胚，绒毛尿囊膜或尿囊腔接种，鸡胚常经 24—72 小时死亡，呈出血性病变和脑炎。

细胞培养 最常用的为鸡胚成纤维细胞、鸡胚肾和乳仓鼠肾细胞。细胞培养物中病毒感染合胞体的形成。病毒引起形状不规则、嗜酸性的胞浆内包涵体。

**预防与控制**

 新城疫是OIE规定的A类疫病，许多国家都有相应的立法。 控制措施包括良好卫生及免疫。

卫生：搞好卫生消毒，加强饲养管理，防止病原侵入。

 免疫：通常采用由天然弱毒活毒苗及强毒株的油乳剂灭活苗，应根据母源抗体水平和当地疫情合理安排免疫程序。

 弱毒疫苗免疫可采用饮水、气雾、滴眼或滴鼻途径。小鸡7-10d一免、20-25d二免、50-60d三免，免疫后约3-7d可产生免疫保护，产蛋母鸡应每4个月免一次。

**鸡新城疫病毒强化试验**：猪瘟病毒和鸡新城疫病毒在猪睾丸细胞均不产生CPE，但在接种猪瘟病毒后3天再接种鸡新城疫病毒，可产生明显的CPE，而且提高鸡新城疫病毒的滴度。

**猪瘟病毒致病机理**

最主要的入侵途径是通过采食，扁桃体是最先定居的器官，而后在内皮细胞、淋巴器官及骨髓增殖，导致出血症和白细胞减少。

出现最急性型、急性型、亚急性型、慢性型、持续感染型等多种临床症状。

组织器官的出血灶、脾梗死是特征性病变，肠黏膜的坏死性溃疡可见于亚急性和慢性病例。

**FMDV血清型：**

 有7个血清型： O型、A型、C型、Asia-l型（亚洲1型）、SAT1型（南非1型）、SAT2型（南非2型）、SAT3型（南非3型）

 型内有亚型（已有65个亚型 ），型间无免疫交叉

**口蹄疫病毒诊断**

**(一)病料采集**

可采集水泡皮或水泡液，立即加入等量细胞维持液中混匀，低温保存备用。同时剪取水泡皮，置50%甘油磷酸盐缓冲液中，低温保存备用。

**(二)分离培养**

1.动物接种 常用豚鼠、乳小白鼠、乳兔等，3～5天小鼠20～30小时死亡。

2.细胞培养

**(三) 血清学试验**

补体结合试验 本法可确定病毒血清型

中和试验 主要用于检测病畜和康复动物血清中抗体，也可用已知抗血清鉴定病毒，可用乳鼠或细胞进行。

琼扩试验 可检测抗原又可检测抗体，可确定血清型。

**FMDV防治**

自然感染或实验感染康复动物能产生坚强免疫力，能抵抗同型强毒攻击，但不能抵抗异型强毒攻击。

应严格执行检疫、消毒等预防措施，发生口蹄疫时应采取扑灭措施。

防制主要依靠综合防制措施，疫苗主要有灭活苗和弱毒苗两大类。由于口蹄疫病毒血清型复杂，尚无一种很好的疫苗用于预防接种。

口蹄疫具有公共卫生意义，人可因接触病畜，处理病畜肉品等而感染。

感染主要是由于饮食病乳奶脂，或通过挤奶、处理病畜而接触感染，创伤也可感染。

人患病后，体温升高，口腔发热，唇、齿酿相颊部粘膜潮红，发生水疱，舌边咽部、手足、也发生水疱。

对儿童危害大，可引发“虎斑心”而死亡。发病必须申报

**IBV主要结构蛋白**

核衣壳蛋白（N） ：与RNA结合，形成螺旋对称的核衣壳

S蛋白（主要纤突糖蛋白）: 长约20nm ，突出于病毒表面，主要决定病毒的病原性，诱导产生中和抗体。

 M 和E蛋白（主要和次要嵌膜蛋白）: 跨囊膜，镶嵌于囊膜中；E和M蛋白共同构成病毒的基本构架

**IBV致病机理**

 病毒进入禽体内后，首先在上皮细胞或肠道复制，可以达到很高的滴度。

 感染1-2d后，出现病毒血症，将病毒散布到许多器官，导致生殖系统及肾脏的严重损伤。

 感染10d后，很难分离到病毒，个别情况下，病毒可持续50d。

 肾、腔上囊、腺胃等多种器官可分离到病毒。

 某些毒株对对未成熟的输卵管产生永久性结构损伤。

**IBV诊断**

（1）鸡胚接种：特征性变化是胚体矮小并蜷缩成球形，尿囊膜增厚，紧贴胚体，卵黄囊缩小，尿囊液增多等。

（2）细胞培养：IBV能在鸡胚肾细胞（CEK）、鸡肾细胞（CK）和鸡胚肝细胞（CEL）上生长，经多次传代（6～10代）后，可引起较明显的细胞病变，表现为胞浆融合，形成合胞体及细胞死亡。

多数IBV野毒不需要适应就可以在气管组织培养物上生长，并引起纤毛运动停止。由此建立的鸡胚气管环培养法（Toc）已成为分离IBV、测定毒价和血清分型的有效方法。

（3）血清学试验：荧光抗体技术、琼扩、ELISA或中和试验

（4）分子生物学检测：RT-PCR，cDNA探针

**IBV防治**

1. 接种疫苗：弱毒苗，通过饮水、喷雾或点眼。7-10日初免，4周后再免。由于AIBV不断出现新的突变株，不同血清型间缺乏交叉保护，免疫效果难以保证。

（2）药物防治 该病目前尚无有效药物治疗，广谱抗生素只能控制并发症。

（3）饲养管理 加强饲养管理，发病与正常鸡群隔离饲养，降低饲养密度，合理配比饲料有助于控制发病。

**MDV可分为三个血清型：**

血清1型：为致瘤的MDV，包括强毒（VMDV）、超强毒（VVMDV）株和由它们致弱的变异株。

血清2型：为非致瘤性的MDV，是自然无致病力和致瘤力的毒株；

血清3型：包括火鸡疱疹病毒（HVT）和它的变异株，对火鸡可致产蛋下降，对鸡无致病性。

在鸡体内的两种存在形式：

不完全病毒，即无囊膜的裸体病毒或核衣壳呈六角形，主要存在于肿瘤病变中，这种病毒严格地与细胞结合，在外界很容易死亡。

完全病毒，存在于羽毛囊的上皮细胞及脱落的皮屑中，外有厚的囊膜，为非细胞结合性的病毒，可脱离细胞而存活，对外界环境的抵抗力很强。

**MDV诊断**

临床综合诊断：本病多见于1-3月龄的小鸡，神经型和眼型有特征性症状，内脏型有特征的病理变化，容易作出诊断。

病原学诊断：可在鸭胚成纤维细胞和鸡肾细胞上生长，继代之后可在鸡胚成纤维的细胞上繁殖。羽髓琼脂扩散试验。

鉴别诊断：内脏型MD与鸡淋巴细胞性白血病很相似，要注意鉴别。

**防制**

疫苗接种是防制本病的关键,目前鸡马立克氏病疫苗使用最普遍的是火鸡疱疹病毒（HVT）苗，在鸡1日龄时进行免疫接种。

对鸡群除采取全进全出的管理体制外，抗病育种也是重要措施。

**PCV2主要引起**：

仔猪多系统衰弱综合征 (PMWS)

**PCV2能够诱导淋巴系统中B细胞凋亡，使患猪处于免疫抑制状态，从而导致机体免疫功能下降**

猪皮炎与肾炎综合征(PDNS)

仔猪先天性震颤(CT)

增生性坏死性肺炎

**PVC诊断**

通过临床症状、剖解变化做出初步诊断

实验室诊断: 病毒分离—细胞培养(无CPE，结合IFA进行检测)

核酸诊断—PCR

免疫实验技术—抗体检测

**PVC防制措施**

 猪的圆环病毒病，目前尚无疫苗可供免疫接种，用抗生素治疗也无效果，仅能减少继发性的细菌感染。

 有效的方法是改进饲养管理方法。

①减少断奶仔猪的应激；

②强化猪场的生物安全；

③全面实施严格的防疫消毒制度。