



新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定

苏敬良¹, 黄瑜², 贺荣莲³, 赵继勋¹, 郭玉璞¹

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 福建农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;

3. 广西农业科学院兽医研究所, 广西 南宁 530001)

摘要:从北京和广西发病鸭群中分离到2株病毒, 分别编号为B株和G株, 病毒大小约40 nm, 无囊膜。血清中和试验表明, 2株病毒为同一血清型, 与1、3型鸭肝炎病毒和鸭瘟病毒无血清学相关性。人工感染试验表明, G株对雏鸭具有很强的致病性, 可引起典型的鸭肝炎病变, 但死亡率随雏鸭日龄的增长而明显下降; B株病毒不能致死正常雏鸭, 但雏鸭经过环磷酰胺处理后, 感染B株病毒可引起雏鸭死亡, 死亡鸭肝肿胀、出血。

关键词:新型鸭肝炎病毒; 鸭; 分离

中图分类号: S 852.659.6

文献标识码: B

文章编号: 1000-6419(2002)01-0015-02

1999年5月北京、广西等地3~13日龄北京鸭和樱桃谷鸭发生一种类似于1型鸭病毒性肝炎的疾病, 死亡率20%~80%。病鸭表现为突然发病、抽搐并很快死亡; 剖检可见肝肿胀, 其表面呈树枝状充血或有出血点、出血斑, 胆囊充盈, 肾轻度淤血。取病死鸭肝做细菌分离培养, 结果为阴性; 经病毒分离分别从北京和广西的病料中各分离到1株病毒(编号为B株和G株)。经过鸭胚血清中和试验表明两者为同一血清型, 但与1、3型鸭肝炎病毒阳性血清无交叉中和反应^[1~3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料 1型鸭肝炎病毒: 鸡胚适应毒65代, ELD₅₀为10^{-6.12}/0.1 mL, 由本室保存; 鸭抗1型肝炎病毒阳性血清: 鸡胚中和效价≥1:64; 抗3型鸭肝炎病毒阳性血清: 由美国康乃尔大学B. W. Calnek教授惠赠; 鸭抗鸭瘟病毒阳性血清: 本室制备。北京鸭胚及1日龄雏鸭: 购自中国农业科学院畜牧研究所; SPF鸡胚: 山东家禽研究所秦卓明研究员提供; 环磷酰胺: 上海华联制药有限公司生产, 批号991109。

1.2 材料处理 无菌取病死鸭肝按1:5加入灭菌PBS后研磨, -20℃冻融1次, 10 000 r/min离心30 min, 取上清用220 nm针头式过滤器过滤除菌。

1.3 病毒分离 将上述处理材料经尿囊腔途径接种9日龄北京鸭胚, 0.2 mL/胚, 观察鸭胚病变和死亡情况, 收获尿囊液并传代。

1.4 阳性血清制备 取B株第4代鸭胚尿囊液人工感染7日龄雏鸭, 接种7 d后仍存活, 对存活的雏鸭于10 d后再用灭活的尿囊液加强免疫1次, 采血, 分离血清。

1.5 病毒对鸭胚成纤维细胞适应试验 将分离的2株病毒第4代鸭胚尿囊液分别接种鸭胚成纤维细胞单层, 盲传5代后取细胞培养液接种9日龄鸭胚, 检查病毒是否能够在成纤维细胞中增殖。

1.6 病毒对SPF鸡胚适应试验 取分离的2株病毒第4代鸭胚尿囊液经尿囊腔接种SPF鸡胚, 0.2 mL/枚, 盲传6代后收获

尿囊液返传鸭胚, 检查分离株是否适应鸡胚。

1.7 分离毒株鉴定^[2,3]

1.7.1 乙醚敏感性试验 取第4代鸭胚尿囊液病毒0.8 mL加0.2 mL乙醚于灭菌离心管中, 振荡10 min, 于4℃放置24 h, 3 000 r/min离心20 min, 吸取病毒液并反复吹打几次使残留乙醚挥发后分别作10⁻¹~10⁻⁶稀释, 每个稀释度接种5枚9日龄鸭胚, 设未加乙醚处理的病毒液作对照。观察7 d, 记录鸭胚死亡情况。

1.7.2 鸭胚ELD₅₀测定 取B株第5代及G株第4代鸭胚尿囊液毒液分别作10⁻¹~10⁻⁶稀释, 接种5枚9日龄鸭胚, 0.1 mL/枚, 观察7 d, 记录鸭胚死亡情况。

1.7.3 血清中和试验 分别将56℃灭活的1型、3型鸭肝炎病毒性血清和鸭瘟病毒阳性血清作1:5、1:10和1:40稀释, 并与分离得到的病毒第5代尿囊液(100 ELD₅₀)等量混合, 4℃过夜, 每个稀释度接种5枚鸭胚, 0.2 mL/枚, 同时设病毒液对照, 0.1 mL/枚, 观察7 d, 记录鸭胚死亡情况。抗B株病毒阳性血清与1型肝炎病毒及G株病毒交叉中和试验, 操作步骤与上述相同。

1.7.4 电镜观察 取死亡鸭胚肝经戊二醛固定后做超薄切片, 观察细胞中病毒粒子。另取鸭胚尿囊液经10 000 r/min离心60 min后取上清, 经40 000 r/min离心2 h, 弃上清并用少量蒸馏水悬浮沉淀, 再将悬液滴加至250 g/L的蔗糖垫上重新超离1次除去部分杂质, 取沉淀并去除蔗糖后用20 mL/L磷钨酸负染, 透射电镜观察病毒的形态。

1.8 攻毒试验

1.8.1 B株

1.8.1.1 取B株第5代鸭胚尿囊液分别经腿部注射2日龄和7日龄鸭各10只, 0.5 mL/只, 观察7 d。

1.8.1.2 将饲养于正压隔离器中的16只1日龄雏鸭, 于2、3日龄2次腿部注射环磷酰胺, 4 mg/只; 4日龄时经腿内侧注射第5代鸭胚尿囊液毒, 0.5 mL/只, 共11只; 另5只作对照, 攻毒后于隔离器中饲养观察7 d。饲料和饮水均经过无菌处理。

1.8.2 G株 取G株第4代尿囊液毒腿部注射感染3批雏鸭, 分别为2、7和13日龄雏鸭各10只, 0.2 mL/只, 每批设6只

收稿日期: 2001-07-23

作者简介: 苏敬良(1967-), 男, 江西省金溪县人, 副教授, 博士。

空白对照,攻毒后观察 7 d。

2 结果

2.1 病毒分离 将处理的病料接种鸭胚后 96 h 内可 100% 致死鸭胚,可见胚体水肿、出血,肝出血或有白色坏死点。鸭胚尿囊液传代毒接种鸭胚成纤维细胞连续 5 代均不产生细胞病变;细胞培养液毒接种鸭胚不能致死鸭胚。经 SPF 鸡胚中连续传 5 代,鸡胚发育正常,试验表明分离的 2 株病毒不能在鸭胚成纤维细胞和鸡胚中增殖。

2.2 乙醚敏感性试验 将 2 株病毒经过乙醚处理后接种鸭胚,鸭胚死亡和病变情况与未经乙醚处理的对照组无差异,证明所分离的病毒为无囊膜病毒。

2.3 鸭胚 ELD₅₀ 测定 B 株第 5 代鸭胚尿囊液 ELD₅₀ = $10^{-4.11}/0.1\text{ mL}$; G 株第 4 代尿囊液 ELD₅₀ = $10^{-4.12}/0.1\text{ mL}$ 。

2.4 中和试验 1、3 型鸭肝炎病毒阳性血清及鸭瘟病毒阳性血清对 2 株分离病毒均无中和作用,抗 B 株病毒阳性血清对 1 型鸭肝炎病毒 65 代鸡胚适应毒无中和作用,而对 G 株病毒的中和效价 $\geq 1:40$,说明 B 株病毒和 G 株病毒为同一血清型,但与目前所报道的 1、3 型鸭肝炎病毒不同。

2.5 病毒形态观察 电镜下,鸭胚的肝超薄切片细胞质和超离沉淀负染样本中可见到少量 40 nm 左右的无囊膜病毒;切片中未发现有晶格状排列的病毒粒子。

2.6 动物感染试验

2.6.1 B 株病毒人工感染雏鸭不能引起发病和死亡;经过环磷酰胺处理的雏鸭攻毒后 72 h 开始死亡,至观察结束共死亡 8 只(8/11),剖检可见肝肿胀、充血,少数有出血斑和条状出血。

2.6.2 G 株病毒人工感染雏鸭可引起明显的发病和死亡,但随着雏鸭日龄增大,死亡率明显下降。2 日龄感染鸭死亡率为 80% (8/10),7 日龄为 40% (4/10),13 日龄组未表现发病症状和死亡(0/10)。大多数雏鸭在感染后 24~48 h 死亡,雏鸭临死

前出现明显的神经症状、抽搐,并很快死亡。剖检可见肝明显肿胀,肝表面有大量的出血点、出血斑,死亡时间越短的病鸭其肝表面出血越严重,96 h 左右死亡鸭肝表面出血点明显减少。

3 小结和讨论

3.1 从北京和广西两地区发病鸭中分离到 2 株病毒,经过中和试验表明两者为同一血清型,与 1、3 型鸭肝炎病毒无血清学相关性。此结果与临床上对发病鸭群使用 1 型鸭肝炎弱毒疫苗或高免卵黄抗体进行预防或治疗无效相一致,另外从病理组织学观察发现(另文报道),G 株病毒人工感染鸭引起的病变与 1 型鸭肝炎病毒有所不同,因此,本研究将分离到的病毒暂时定为新型鸭肝炎病毒,对其理化及分子生物学特性有待于进一步研究,从而确定其分类地位。

3.2 对分离株人工感染试验表明,2 株病毒对雏鸭的致病力有很大的差异,在临床上由 B 株引起雏鸭的死亡率约为 20%,连续感染的 5 批鸭雏均在 6 日龄开始出现死亡,12 日龄左右停止;剖检死亡鸭可见肝肿胀、边缘树枝状充血,未见典型的肝出血变化。由 G 株感染雏鸭则表现为急性发病和大量死亡,与 1 型鸭肝炎病毒感染极为相似,调查发现,由 B 株鸭肝炎病毒在临床上引起的雏鸭发病,可能与鸭场的饲养管理条件差有一定的关系。

参考文献:

- [1] 卡尔尼克 BW. 禽病学[M]. 第 10 版. 高福, 苏敬良. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] Purchase H G, Arp L H, Domermuth C H, et al. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens [M]. third edition. Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa USA, 1989.
- [3] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.

同胚接种 IBDV 和 NDV 制造二联弱毒苗

张明波, 于作利, 苏雅君, 姜力, 毛春玲

(黑龙江省生物制品一厂, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要: 用鸡传染性腔上囊病病毒 (IBDV) 和新城疫病毒 (NDV) 接种同一鸡胚收取种毒, 试制 IBDV、NDV 二联弱毒冻干疫苗, 安全性和效力检验均达到这 2 种单苗《规程》规定的标准, 证明 2 种病毒在鸡体内产生互不干扰抗体。

关键词: 传染性腔上囊病; 新城疫; 二联苗

中图分类号: S 852.32

文献标识码: B

文章编号: 1000-6419(2002)01-0016-03

目前我国预防鸡新城疫 (ND)、鸡传染性腔上囊病 (IBD), 一般用 2 种单苗分别进行免疫。因两者的免疫途径及免疫程序不一, 给这 2 种病的免疫工作带来一些不便; 偶见使用的二联苗也是由 2 种单苗混合后冻干制成, 其成本相对较高。笔者采用 NDV、IBDV 同胚接种制苗种毒, 试制 IBDV、NDV 二联冻干弱毒苗 (以下称二联苗) 10 余批, 其安全性、效力检验均达到单

苗《规程》规定的标准, 田间试验也收到理想效果, 证明此二联苗完全可以作为预防 IBD 和 ND 的生物制品。

1 材料和方法

1.1 种毒制备 IBDV 弱毒株由中国兽药监察所提供, NDV 为黑龙江生物一厂保存的 C30~86 株, 用 2 种制苗种毒接种同一鸡胚, 收取胚液、胚胎, 混合制成 IBDV、NDV 二联种毒, 用于生产二联苗。

1.2 种毒检验 将制备的种毒分别用 ND、IBD 标准阳性血清中和后接种鸡胚, 以 NDV 血凝效价 $\geq 1:640$ 以上, IBDV

收稿日期: 2001-10-10

作者简介: 张明波 (1971-), 男, 黑龙江省阿城市人, 兽医师。