维普资讯 http://www.cqvip.com

Ⅰ型鸭肝炎病毒变异株的鉴定

郑献进，张大丙，曲丰发，丁春宇
(中国农业大学动物医学院农业部预防兽医学重点开放实验室，北京 海淀 100094)

中图分类号:S858.325.3　文献标识码:B　文章编号:0529-6005(2006)05-0015-02

鸭病毒性肝炎是雏鸭的一种高度致死性传染病，其特点是发病急、病程短、传播快、死亡率高，死亡鸭多呈角弓反张，其肝脏常有特征性的出血性病变[1]。鸭肝炎病毒(duck hepatitis virus, DHV)是本病病原，目前归属于小RNA病毒科的未确定种[2]，DHV分为Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型，其中Ⅰ型呈世界范围分布，Ⅱ型仅限于英国，Ⅲ型则限于美国[3]。DHV还存在一类毒株，与Ⅰ型仅有部分血清学相关性，Sandhu等(1992)称之为Ⅰ型的变异株，命名为Ⅰa型[4]。

我国自1958年发生鸭肝炎[1]，迄今已流行近半个世纪。1984年郭玉璞等确定我国存在Ⅰ型[5]，此后多认为我国流行Ⅰ型。但近几年来，在许多暴发鸭肝炎的鸭场，针对Ⅰ型的主动免疫或被动免疫并不能有效地保护雏鸭抵抗DHV的感染。本文比较了一个DHV分离株与DHVⅠ型参考毒株的血清学相关性，确定该毒株属于DHVⅠ型的变异株，命名为Ⅰv型。

1 材料与方法

1.1 实验动物和鸡胚　1日龄雏鸭，来自中国农业科学院畜牧研究所，7日龄雏鸭，来自未发生雏鸭肝炎疫情的某商品鸭场；9日龄鸡胚，来自中国农业大学动物科技学院畜牧场；健康大耳白兔，由中国农业大学动物医学院实验动物研究所提供。

1.2 毒株　鸭瘟病毒弱毒株DPV MLV，DHVⅠ型强毒株C1，DHVⅠ型鸡胚化弱毒株C80，保存于本室。DHV待检病料HB1是2001年河北某鸭场2日龄樱桃谷肉鸭暴发雏鸭肝炎时采集，经鸡胚分离并传代1次，收获鸡胚2代含毒尿囊液保存于本室，将该毒接种鸡胚并传代获得待检病毒的不同代次鸡胚毒；其中3代毒E3、8代毒E8、28代毒E28、63代毒E63用于本试验。

1.3 抗血清制备　含毒尿囊液经过10 000 r/min离心10 min，取上清作为抗原，经4次免疫制备抗血清。首免加弗氏完全佐剂，在兔子颈背部皮内多点注射0.5 ml/只和腿部肌肉注射0.5 ml/只；二免加弗氏不完全佐剂，颈背部皮下注射0.5 ml/只和肌肉注射0.5 ml/只；三免为肌肉注射抗原液1 ml/只；四免经耳静脉注射抗原液1ml/只。两次免疫之间间隔1周，在四免1周后，采血分离血清，置－20℃保存。按此程序制备两个批次血清，一次为兔抗C80和E28的血清，二次为兔抗C80和E63的血清。阴性血清取自未免疫健康兔。

1.4 人工致病试验　取1日龄鸭，经腿部肌肉注射DHV强毒，0.5 ml/只，观察7天。用1日龄雏鸭盲传1次，取有典型DHV病变的肝脏制成匀浆并加抗生素，用7日龄鸭返强2代。以此比较E3和C1的致病性。

1.5 PCR和RT-PCR　检测E8，以DPV MLV为对照，用PCR扩增鸭瘟病毒的UL6基因，核酸提取、引物设计、PCR反应条件和程序均参照文献[6]。用RT-PCR扩增禽流感病毒的NP基因，委托农业部兽医诊断中心检测。

1.6 免疫电镜　取E63的尿囊液，10 000 r/min离心60 min，留上清，45 000 r/min离心3 h，用少量Tris盐酸(0.01 mol, pH 7.4)悬浮沉淀，超声波裂解，12 000 r/min离心30 min，取上清，1份上清液中加4份兔抗E63血清，4℃过夜，12 000 r/min离心30 min，取沉淀用双蒸水悬浮，经醋酸铀负染，透射电镜观察。

1.7 交叉中和试验　用固定血清-稀释病毒的方法在鸡胚上进行。抗血清置60℃ 30 min后，用生理盐水稀释1∶5。将病毒用灭菌生理盐水进行10倍系列稀释，每个稀释度病毒液分别与等量阴阳性血清混合，37℃反应1 h，每个稀释度接种5枚鸡胚，0.2 ml/胚，观察7天，记录鸡胚死亡数，按常规方法计算抗体中和效价以及毒株间的相关系数[7,8]。试验分两次，分别用E28和E63与C80进行比较。

2 结果

2.1 人工致病试验　在初代接种中，待检病毒E3和Ⅰ型强毒C1均未致死1日龄雏鸭，但盲传一代后，待检毒株的死亡率达60%，DHVⅠ型强毒的死亡率为10%，此后用7日龄鸭传代时，待检毒株的致死率均为100%，而DHVⅠ型强毒仅有10%～40%的死亡率(表1)。

接种后24 h内，雏鸭表现精神沉郁，死亡多发生于接种后24～96 h，接种144 h后，存活鸭常恢复正常。濒死鸭侧卧于地，头颈摇晃，双腿反复蹬踢，表现出典型的DHV症状，部分死亡鸭呈角弓反张。死亡鸭的肝脏稍肿大，有多少不等的出血点，存活鸭未见明显病变。

收稿日期:2005-12-25
作者简介:郑献进(1979-)，男，硕士生，从事动物病毒学研究
通讯作者:张大丙，E-mail:zdb@cau.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 人工致病试验

代次	毒株	日龄	
		1	7
初代	C1	0/5	—
	E3	0/5	—
二代	C1	1/10	—
	E3	6/10	—
三代	C1	—	1/10
	E3	—	5/5
四代	C1	—	4/10
	E3	—	10/10

结果指死亡鸭只数/接种鸭只数 "-"指未测

2.2 PCR 和 RT-PCR 如图1所示,对照组 DPV MLV 被扩增出长约421 bp 的条带,而待检样品E8的PCR 结果呈阴性(图1)。从待检样品中,未扩增出禽流感病毒的NP 基因(图略)。

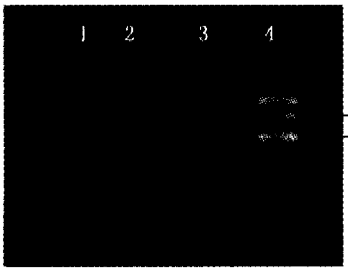

图1 从待检样品中扩增DPV UL6基因的结果

1: 阴性对照; 2: E8; 3: DPV MLV; 4: DNA marker

2.3 电镜观察 负染样本中存在大小较一致的病毒颗粒,直径约为20~30 nm,一个视野中,见多个病毒颗粒聚集成团(图略)。

2.4 交叉中和试验 表2和表3为两个批次的中和试验结果。如表所示,DHV Ⅰ型抗血清能部分中和待检毒株HB1的28代和63代鸡胚化弱毒,但待检毒株的抗血清对DHV Ⅰ型弱毒没有中和作用。两次制备的DHV Ⅰ型和待检病毒的抗血清效价高低略有不同。两次试验中,待检毒株和DHV Ⅰ型的相关系数分别为37.4%和63%。

表2 待检病毒28代鸡胚适应毒与DHV Ⅰ型弱毒之间的交叉中和试验 (log_{10})

病毒	抗血清	
	C80	E28
C80	2.29	0.43
E28	1.26	1.69

表3 待检病毒63代鸡胚适应毒与DHV Ⅰ型弱毒之间的交叉中和试验 (log_{10})

病毒	抗血清	
	C80	E63
C80	1.77	0.95
E63	1.56	2.11

3 讨论

DHV 的鉴定主要依靠分离病毒时胚胎的病变和人工致病试验[3]。在繁殖病毒的最初几代,鸡胚死亡率不高,死亡时间稍晚,但随着传代次数的增加,鸡胚死亡率逐步上升,死亡时间缩短。将HB1传至63代,在接种后24~48 h,鸡胚死亡率可达100%,胚胎表现为发育不良,皮下出血和水肿,部分鸡胚的肝脏坏死或变绿。若将DHV强毒株接种于1~7日龄雏鸭,可引起雏鸭发病和死亡,并能复制出DHV的症状和大体病变。本试验中,待检毒株和DHV Ⅰ型在引起鸡胚病变、雏鸭发病症状和病变上均无明显差异。DHV Ⅰ型强毒虽经过4代返强,死亡率仍不高,可能与保存时间较长有关。

近年来,我国某些地区时有鸭瘟发生,特别是禽流感的流行对养鸭业亦构成了威胁,而各种日龄鸭均对禽流感病毒易感,故本文设计了PCR和RT-PCR试验,旨在排除样品中存在鸭瘟病毒和禽流感病毒的可能。电镜观察结果进一步表明,待检病毒的形状和大小均与Ⅰ型DHV相似[3]。

交叉中和试验中,待检毒株与Ⅰ型参考毒株之间存在部分血清学相关性,计算两个毒株间的相关系数,并按杨汉春(2003)介绍的判断标准[8],作者认为待检毒株与DHV Ⅰ型参考毒株互为亚型关系,亦可认为待检毒株是Ⅰ型的变异株。特别是从交叉反应情况看,待检毒株HB1颇似Sandhu等(1992)提出的Ⅰa型[4]。所谓Ⅰa型,指Ⅰ型抗血清可部分中和Ⅰa型病毒,但Ⅰa型抗血清对Ⅰ型病毒缺乏中和作用[4]。由于未能获得Ⅰa型参考毒株,尚不能确定变异株HB1是否与Ⅰa型具有抗原同一性,暂称之为Ⅰv型。用不同批次制备的抗血清进行交叉中和试验,其结果略有波动,此现象在Sandhu等(1992)的研究中亦存在[4],可能与制备血清时抗体的产生情况有关。

参考文献:

[1] 郭玉璞. 鸭病诊治彩色图说[M]. 北京:中国农业出版社,1997. 5-11.

[2] Cornelia Büchen-Osmond. The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses[DB]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb, 2005. 2-18.

[3] Saif Y M. 禽病学(第11版)[M]. 高福,苏敬良,索勋,译. 北京:中国农业出版社,2004. 376-384.

[4] Sandhu T S, Calnek B W, Zeman L. Pathologic and serologic characterization of a variant of Duck hepatitis type Ⅰ virus[J]. Avian Diseases, 1992, 36: 932~936.

[5] 郭玉璞,潘文石. 北京鸭病毒性肝炎血清型的初步鉴定[J]. 中国兽医杂志,1984,10(11): 2-3.

[6] 陈建君,张毓金,杨增岐,等. 鸭瘟病毒的PCR检测及其产物分析[J]. 动物医学进展,2003,24(5): 71~73.

[7] 殷震,刘景华. 动物病毒学(第二版)[M]. 北京:科学出版社,1997. 336-340.

[8] 杨汉春. 动物免疫学(第二版)[M]. 北京:中国农业大学出版社,2003.

志谢:感谢农业部兽医诊断中心在RT-PCR试验中对本文的帮助,感谢中国农业大学动物医学院郭玉璞教授对本文的指导。