

新型鸭肝炎病毒流行病学调查 及免疫防治试验

刘 建, 苏敬良, 张克新, 张国中, 赵继勋

(中国农业大学动物医学院, 北京 海淀 100094)

摘要: 本试验通过鸭胚尿囊腔接种, 对我国部分省市采集的死于疑似鸭病毒性肝炎的病鸭肝组织进行病原分离, 获得 9 个病毒分离株。这些分离株对 10 日龄鸭胚的致死率为 100%, 人工感染 6 日龄雏鸭的致死率为 0~100% 不等。死亡鸭呈角弓反张姿势, 剖检可见肝脏肿大, 有出血点或出血斑。将 9 株分离株经鸭胚传至第 5 代, 收集鸭胚尿囊液毒测定这些毒株的 ELD_{50} 为 $10^{-7.32}/0.2\text{ ml} \sim 10^{-3.5}/0.2\text{ ml}$ 不等。用鸡抗 1 型 DHV 及新型 DHV 的血清进行中和试验, 结果表明: 有 7 株为新型 DHV, 有 2 株为 1 型 DHV。

对实验室早期分离的新型鸭肝炎病毒 B 株经过鸭胚传代致弱后, 收集鸭胚尿囊液毒稀释成不同倍数对 1 日龄雏鸭进行免疫, 并于 10 日龄时用新型鸭肝炎强毒进行攻毒保护试验, 结果 B_{20} 株在 20 倍稀释时, 保护率达 100%。采集免疫的雏鸭血清, 中和试验测定血清的效价, 雏鸭在免疫后可检测到中和抗体, 第 10 天时抗体水平达到高峰, 然后呈逐渐下降趋势。结果表明, B 株经过鸭胚传代致弱后在毒力下降的同时仍保留一定的免疫原性, 可以作为疫苗的候选株。

关键词: 新型鸭肝炎病毒; 流行病学; 免疫防治

中图分类号: S858.325.3 文献标识码: A 文章编号: 0529-6005(2006)02-0003-04

Epidemiological investigation and experimental immunization of Non-serotype 1 duck hepatitis virus

LIU Jian, SU Jing-liang, ZHANG Ke-xin, ZHANG Guo-zhong, ZHAO Ji-xun

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Nine strains of duck hepatitis virus (DHV) were obtained from duckling liver samples through duck embryo by allantoic sac inoculation. All these samples were collected from ducklings diagnosed clinically dying from duck virus hepatitis in several provinces of China. The lethal rate of 10-day-old duck embryos inoculated with these isolates was 100 percent. When inoculating 6-day-old ducklings with these isolates, the mortality rate was among 0~100%. Dead ducklings showed the sign of opisthotonus, with swollen and punctuate hemorrhage in their livers. The ELD_{50} of these virus strains determined with duck embryos were among $10^{-7.32} \sim 10^{-3.5}$. Viral neutralization test was done using standard sera against DHV type 1 and non-serotype 1 DHV. Seven of nine isolates belonged to non-serotype 1 DHV, the other two belonged to DHV type 1.

A strain of non-serotype 1 DHV previously isolated from Beijing was attenuated by passage in duck embryos and designated B_{20} strain. Diluted allantotic fluid virus was used to immunize 1-day-old ducklings and the immunized ducklings were challenged with virulent non-serotype 1 10 days post immunization. The result indicated that the protection rate of 20 folds dilution of B_{20} could reach up to 100 percent. However, 100-fold dilution of B_{20} provided no protective effect. The sera of the immunized ducklings were collected and the antibody titers were measured by virus neutralization test. The antibody level reached peak in 10 days post vaccination and then decreased. The results showed that B_{20} strain could provide protection against the infection with non-serotype 1 DHV and may be used as the candidate vaccine strain.

Key words: epidemiological investigation; new serotype duck hepatitis virus; experimental immunization.

Corresponding author: SU Jing-liang

鸭肝炎(DH)是雏鸭的一种传播迅速的高度致死性病毒病, 以肝炎为其主要特征。病原分别是 1 型、

2 型和 3 型鸭肝炎病毒(DHV)。人们首次认识到 2 型和 3 型 DHV 作为独立的病原体, 是由于免疫了 1 型

收稿日期: 2005-01-07

作者简介: 刘建(1976-), 男, 硕士, 从事图书出版工作。现工作单位为中国农业科技出版社, 北京海淀 100081

通讯作者: 苏敬良, E-mail: sujingl@cau.edu.cn

DHV 的雏鸭仍可罹患肝炎^[1]。我国商品肉鸭早在 1960 年即有临床病例报道,1980 年潘文石等^[2]在北京首先分离到鸭肝炎病毒,郭玉璞等^[3]于 1984 年确定为 1 型 DHV。该病在我国广大养鸭地区均有不同程度的流行,由于其致死率高,一旦暴发,往往给养殖业造成很大的经济损失,是商品肉鸭的主要传染病之一。随着弱毒疫苗和高免卵黄抗体的应用,1 型 DHV 感染得到一定的控制,但在 1999 年之后许多养鸭地区发生一种临床表现和剖检病变与 1 型 DHV 感染相似的病例,用弱毒疫苗和卵黄抗体预防和治疗无效,怀疑为 1 型变异株和新的血清型^[4,5]。苏敬良等^[6]经过病原分离和血清中和试验,证明在北京和广西存在有新的血清型毒株。为了进一步了解该病的流行情况,制定相应的防治措施,本研究采集了部分地区疑似鸭肝炎的病料进行病毒分离、血清中和试验和弱毒株免疫保护试验,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 参照毒株 1 型 DHV 弱毒株、新型 DHV G 株和 B 株,本实验室保存。

1.2 实验动物 免疫用 SPF 鸡 中国农业大学实验动物所提供;日龄北京鸭,购自中国农科院畜牧所;北京鸭胚,购自中国农科院畜牧所;繁殖 1 型 DHV 所用鸡胚,购自中国农业大学试验鸡厂。

1.3 鸭肝炎病毒毒株的分离

1.3.1 病料来源 根据各地送检雏鸭,剖检有明显的肝脏出血病变,然后取肝脏进行病毒分离,各分离株来源如下:J 株,北京某鸭场;R 株和 RL 株,河北任丘 2 个鸭场;F 株和 SL 株,山东 2 个鸭场;L 株,2001 年山东昌乐某鸭场;H 株和 HY 株,河北河间两鸭场;GX 株,广西兽医研究所分离。

1.3.2 病料处理 将肝组织剪碎后按 1:5 加灭菌 PBS,置于组织研磨器中研磨,8 000r/min 离心 20 min,取上清,220 nm 滤器过滤,滤液作为接种材料。

1.3.3 鸭胚接种与传代 将病毒液经尿囊腔接种 10~12 日龄鸭胚,每枚鸭胚注射 0.2 ml,每个样品接种 3~5 枚鸭胚,37℃ 孵育,弃掉 24 h 内死亡鸭胚,收获 96 h 内死亡尿囊液。第一代若在 96 h 内未死亡,则 4℃ 冻死,收集尿囊液,盲传 1 代,第二代仍未死亡者弃去。选择可致死鸭胚,经细菌培养无污染的尿囊液,在鸭胚中继续传至第 5 代,收集尿囊液,−80℃ 保存备用。

1.3.4 分离株人工感染试验 1 日龄雏鸭笼养至 6 日龄,腿静脉注射感染分离株鸭胚尿囊液毒,0.3 ml/只,观察记录结果。

1.4 病毒分离株的鉴定

1.4.1 SPF 鸡抗 DHV 血清的制备 (1)鸡抗 1 型 DHV 血清制备:将实验室保存的 1 型 DHV 弱毒接

种 10 日龄鸡胚,37℃ 孵育,收集 24~96 h 内死胚尿囊液,并测定该毒株的毒价,−20℃ 保存备用。取上述收集的 1 型 DHV 弱毒鸡胚尿囊液毒肌肉注射 3 只 35 日龄 SPF 鸡,1 免 1.5 ml/只,2 免每只 2 ml,3 免每只 2.5 ml,每次免疫时间间隔 10 天。3 免后 15 天心脏采血分离血清,−20℃ 保存备用。(2)鸡抗新型 DHV 血清制备:将实验室保存新型 DHV G 株接种 10 日龄鸭胚,37℃ 孵育,收集 24~96 h 内死胚尿囊液,并测定该毒株的毒价,−20℃ 保存备用。取上述收集的 1 型 DHV 弱毒鸡胚尿囊液毒免疫 35 日龄 SPF 鸡,免疫方法同上。

1.4.2 各分离株鸭胚半数致死量(ELD₅₀)的测定 根据 Reed-Muench 法计算各毒株的 ELD₅₀。

1.4.3 鸭肝炎病毒中和试验 (1)鸡抗 DHV 血清中和效价测定:用固定病毒稀释血清法对 1 型和新型 DHV 血清做中和试验。(2)使用上述固定病毒稀释血清法对 12 株分离株做中和试验。

1.5 新型 DHV 免疫保护试验

1.5.1 B 株传代致弱试验 将本室分离保存的新型 DHV B 株经鸭胚尿囊腔传代传至第 20 代,命名为 B₂₀株,测定其尿囊液毒 ELD₅₀为 10^{-4.35}/0.2 ml。

1.5.2 攻毒用强毒株毒力复壮 取新型 DHV G 株第 5 代尿囊液毒肌肉注射 5 日龄雏鸭,每只 0.5 ml。取死亡雏鸭肝脏,研磨并加抗生素除菌后,再接种 5 日龄雏鸭,连续返强 3 代可 100% 致死雏鸭后,取死亡雏鸭肝脏作为攻毒时所用种毒,并用鸭胚测定该种毒的病毒滴度。

1.5.3 肝组织强毒 ELD₅₀测定 将肝组织充分研碎,取 1 ml 浸出液,加入 5 ml 灭菌 PBS 和 4 ml 双抗溶液,4℃ 过夜除菌。将处理过的肝组织毒根据 Reed-Muench 法计算毒株的 ELD₅₀。

1.5.4 雏鸭的免疫 将 1 日龄雏鸭分为 A、B、C、D 和 E 共 5 组,A 组免疫 1 型 DHV 弱毒株(鸡胚尿囊液毒 20 倍稀释),B、C、D 组分别免疫新型 DHV B₂₀株 20 倍稀释、50 倍稀释和 100 倍稀释的鸭胚尿囊液毒。免疫组 B、C、D 组免疫 15 只雏鸭,每只 0.5 ml,A 组免疫 10 只雏鸭,每只 0.5 ml。E 组 10 只为未免疫对照组。

1.5.5 攻毒保护试验 在雏鸭 10 日龄时,用上述新型 DHV 返强毒攻毒,每组攻 10 只,腿部肌肉注射,每只 0.5 ml,观察记录死亡情况。

1.5.6 免疫组鸭血清抗体效价测定 (1)B、C、D 组各采集 5 份血清,分别于免疫后 5 天、10 天、16 天和 21 天采血,10 000 r/min 离心 3~5 min 分离血清。所收集血清于 56℃ 水浴灭活 30 min,过滤除菌。(2)用固定新型 DHV G 株病毒稀释血清法做中和试验,并计算血清中和效价。

2 结果

2.1 病毒的分离 从 9 份疑似肝炎的病料中,经鸭胚尿囊腔途径接种 10~12 日龄鸭胚,分离得到 9 株病毒。这 9 株病毒经过鸭胚传至第 3 代可 100%致死胚,死亡胚体表现为出血、水肿,部分肝脏有明显的坏死灶或坏死点。

2.2 病毒分离株人工感染雏鸭结果 对 8 个分离株的第 3 代鸭胚尿囊液毒,经腿静脉接种感染 6 日龄雏鸭,各毒株对雏鸭的致死率为 0~100%不等,死亡情况见表 1。雏鸭死亡绝大部分发生在感染后 48 h 以内,主要表现为短时间内停止运动,蹲伏并半闭眼。病鸭身体倒卧,两腿痉挛性后伸,头向后背,一般在出现症状后 1~2 h 左右死亡。剖检死鸭可见明显的肝脏肿大、出血,肝脏表面有出血点,部分死亡雏鸭可见肾脏有充血和出血,少部分雏鸭脾脏见有针尖大小的坏死点。

表 1 8 个分离株人工感染 6 日龄北京鸭的死亡情况

毒株名称	雏鸭数	死亡情况						死亡率(%)
		24 h	36 h	48 h	60 h	124 h	132 h	
SL	5							0
H	5	4						80
L	5		2					40
F	5					1		20
R	5	2	1				1	80
RL	4	3	1					100
GX	5	1	3					80
J	5		2					40

2.3 标准毒株毒价测定及 SPF 鸡抗血清中和效价测定 对 1 型 DHV 弱毒和新型 DHV G 株分别采用鸡胚和鸭胚测定两株毒株尿囊液毒的毒价,结果 1 型 DHV 弱毒株的 ELD₅₀=10^{-4.83}/0.2 ml。新型 DHV 广西分离株鸭胚 ELD₅₀=10^{-4.22}/0.2 ml。

SPF 鸡经过三免后制备出抗 1 型弱毒株和新型 DHV 广西分离株血清,与 1 型 DHV 弱毒和新型 DHV 病毒中和效价见表 2。

表 2 SPF 鸡抗 1 型和新型 DHV 抗体血清中和效价

	鸡抗 1 型 DHV 血清稀释倍数				鸡抗新型 DHV 血清稀释倍数				病毒对照组
	20×	40×	80×	160×	20×	40×	80×	160×	
1 型 DHV 死胚数	0	0	1	2	5	5	5	5	5
新型 DHV 死胚数	5	5	5	5	0	0	1	3	5

由表 2 可知,1 型和新型 DHV 两毒株之间无血清交叉反应,两种血清在 40 倍稀释时能 100%中和同源病毒,因此我们将 2 种血清作 40 倍稀释作为本试验的阳性血清工作浓度。

2.4 病毒分离株鸭胚 ELD₅₀的测定 对所分离 9 株病毒传至第 5 代,收集鸭胚尿囊液毒,测定 ELD₅₀,为

10^{-3.5}~10^{-7.32}/0.2 ml。

2.5 各分离毒与 1 型和新型 DHV 抗血清中和试验结果 11 型和新型 DHV 抗血清做不同稀释倍数后,分别与 12 个毒株的 200 个 ELD₅₀的稀释液中和得出分离株中和结果,各毒株各稀释度接种 5 枚鸭胚,同时设有 5 枚对照。

表 3 分离株血清分型结果

毒株	不同稀释倍数 1 型 DHV 血清中和死胚数			不同稀释倍数新型 DHV 血清中和死胚数			对照组死胚数	血清型判定
	20×	40×	80×	20×	40×	80×		
HY	5	5	5	1	0	0	5	新型 DHV
R	5	5	5	1	0	1	5	新型 DHV
F	5	5	5	0	0	1	5	新型 DHV
GX	5	5	5	0	1	1	5	新型 DHV
L	5	5	5	1	0	0	5	新型 DHV
H	5	5	5	0	0	0	5	新型 DHV
RL	5	5	5	0	1	1	5	新型 DHV
SL	1	0	0	5	5	5	5	1 型 DHV
J	0	1	1	5	5	5	5	1 型 DHV

由表 3 可知,HY、R、F、G、L、H、和 RL 这 7 株可被新型 DHV 血清中和,判定为新型鸭肝炎毒株;ST 和 J 这 2 株可被 1 型 DHV 血清中和,判定为 1 型鸭肝炎毒株。

2.6 新型 DHV 免疫保护试验结果

2.6.1 强毒株毒力复壮结果 新型 DHV 广西株第 5 代尿囊液毒肌肉注射感染 5 日龄雏鸭后第 1 代致死率为 75%(3/4),取死亡鸭肝脏处理后再感染雏鸭,死亡率可达到 100%,而且雏鸭死亡集中于 48 h 以内,最快的在接种后 20 h 左右死亡,剖检肝脏有

明显的肿胀和出血。收集复壮第 3 代死亡鸭肝脏均做无菌处理,测定肝组织含毒量,根据 Reed-Muench 法计算出 ELD₅₀=10^{-6.37}/0.2 ml。

2.6.2 雏鸭攻毒实验结果 将新型 DHV B₂₀尿囊液毒和 1 型 DHV 弱毒免疫 1 日龄雏鸭后,从临床上观察未出现任何不良反应,采食和精神状态等与对照组相比未见有任何异常,说明新型 DHV B 株经过鸭胚传代后,毒力被致弱。免疫后 10 天,采用新型 DHV 复壮毒进行攻毒保护试验,结果如表 4。

表 4 1 型 DHV 弱毒及新型 DHV B₂₀ 免疫雏鸭后对新型 DHV 强毒攻毒保护试验结果

免疫所用弱毒株	攻毒雏鸭数	死亡情况					死亡率(%)
		24 h	48 h	72 h	96 h	124 h	
1 型 DHV 弱毒株(20×)	10	8				1	90
B-20 弱毒株(20×)	10	0				0	0
B-20 弱毒株(50×)	10	2	2			0	40
B-20 弱毒株(100×)	10	3	4	3		0	100
未免疫对照组	10	10					100

由表 4 可知未免疫对照组 100% 死亡(10/10),1 型 DHV 弱毒株免疫组死亡率为 90%(9/10),B₂₀ 尿囊液毒 20 倍稀释后对攻毒保护达 100%,50 倍稀释保护率为 60%,100 倍稀释无保护作用。根据这一结果可以认为 B 株病毒经过鸭胚传代后对雏鸭无明显的致病性,但仍有一定的免疫原性,可以作为新型鸭肝炎的疫苗候选株。

2.6.3 免疫组鸭血清中和抗体效价测定结果 采用新型 DHV B₂₀ 尿囊液毒的不同稀释倍数免疫 1 日龄雏鸭后,在不同日期对免疫组雏鸭采取血样,通过鸭胚中和试验结果可以看出,雏鸭接种弱毒后很快可刺激机体产生中和抗体。B₂₀ 弱毒株 20 倍稀释接种后 5 天平均抗体效价为 1:45,之后继续上升,第 10 天检测时达到高峰,为 1:56。然后呈下降趋势,至 21 日龄时抗体效价为 1:29。B₂₀ 弱毒株 50 倍稀释接种后 5 天平均抗体效价达 1:28,之后继续上升,第 10 天检测时达到高峰,为 1:45。然后呈下降趋势,至 21 日龄时抗体效价为 1:31。B₂₀ 弱毒株 100 倍稀释接种后 5 天平均抗体效价为 1:29,然后呈下降趋势,至 21 日龄时抗体效价为 1:22。根据所测血清的中和效价,不同稀释度毒株免疫后,抗体产生动态见图 1。

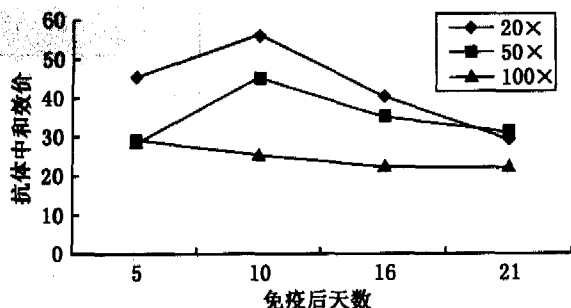


图 1 B₂₀ 尿囊液毒不同稀释倍数免疫鸭血清抗体产生动态图

3 讨论

3.1 关于鸭肝炎病毒的分离和流行病学 本试验所采集的病料来源于北京、河北、山东和广西等地区的鸭场,选择临床症状和病理剖检变化疑似病毒性肝炎的病死鸭肝脏组织作为分离对象。病料经过无菌处理后经尿囊腔途径接种 10~12 日龄鸭胚,从第一代开始即可致死鸭胚,传至第 3 代,所有分离株均可 100% 致死鸭胚。将分离株人工感染 7 日龄雏鸭,死亡率为 0~80%,死亡鸭表现出明显的肝炎剖检病

变。从血清中和试验结果看出,9 个分离株中,有 7 个属于新的血清型,而且新型鸭肝炎分离株对雏鸭均有明显的致病性;2 个分离株为 1 型。这一结果说明我国部分地区存在有新型鸭肝炎病毒流行,也解释了某些鸭场雏鸭在免疫接种了 1 型肝炎弱毒疫苗后仍然发生肝炎。

3.2 关于新型鸭肝炎病毒的免疫预防 本研究中选用了早期分离的致病性较低的新型鸭肝炎病毒 B 株经过鸭胚连续传 20 代后,初步试验证明对雏鸭无致病性。以其鸭胚尿囊液毒试验免疫接种雏鸭,攻毒保护试验表明对新型鸭肝炎病毒的强毒有很好的保护作用。20 倍稀释时,保护率达到 100%,而随着稀释倍数的增大,保护率下降。免疫了 1 型 DHV 弱毒株的雏鸭和未免疫的雏鸭于 24 h 左右死亡。通过鸭胚中和试验测定免疫鸭血清的中和效价,雏鸭在免疫后 5 天即可检测到中和抗体,免疫后 10 天抗体水平达到最高,随着免疫日龄的延长,抗体水平逐渐下降。而当弱毒株稀释倍数为 100 倍时,抗体水平比较低,这可能与尿囊液毒价相对较低有一定的关系。

从本试验的结果可以看出,无论是体外试验还是体内攻毒保护试验,新型鸭肝炎病毒与 1 型鸭肝炎病毒都无血清学交叉反应。鉴于该病在我国部分养鸭地区的流行情况,研制新型鸭肝炎病毒弱毒疫苗对该病的预防具有一定的实际意义。B 株弱毒株在经鸭胚传代致弱后,仍然有一定的免疫原性,在一定的稀释倍数内可以刺激免疫体产生抗体而起到保护作用,可以作为疫苗的候选株。

参考文献:

- [1] Sandhu T S, Shawky S A. Duck hepatitis In: Y M Saif(eds). Diseases of poultry[M]. 11th edition, Iowa State University Press Ames, IA. 2003.
- [2] 潘文石. 鸭病毒性肝炎的研究——鸭肝炎病毒的鸡胚化弱毒株(dhv-41)[J]. 北京大学自然科学学报,1980,(4): 83-90.
- [3] 郭玉璞,潘文石. 北京鸭病毒性肝炎血清型初步鉴定[J]. 中国兽医杂志,1984,10(11): 2-3.
- [4] 邹永新,凌育森,罗映霞,等. 水鸭类病毒性肝炎的诊治[J]. 中国兽医杂志,2001,28(4): 22-23.
- [5] 苏敬良,黄瑜,贺荣莲,等. 新型鸭肝炎病毒的分离及初步鉴定[J]. 中国兽医科技,2002,1: 15-16.
- [6] 黄安国,蒋玉雯,白安斌,等. 新型鸭肝炎病毒的分离与初步鉴定[J]. 广西畜牧兽医,2003,5:198-199.