

鸭肝炎病毒的分离鉴定及其理化和生物学特性初步研究

谢金文^{1,2}, 苗立中², 王艳², 肖跃强¹, 王金良^{1,2}, 沈志强^{1,2}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 滨州 256600; 2. 山东绿都生物科技有限公司, 滨州 256600)

摘要: 通过鸡胚尿囊腔接种, 对山东省滨州地区采集的死于疑似鸭病毒性肝炎 (DVH) 的病鸭肝组织进行病原分离, 获得 1 株病毒。动物试验结果表明, 该病毒分离株的致死率高达 80%。经过临床症状观察、剖检病理变化、理化特性试验、中和试验、RT-PCR 鉴定和动物致病性试验等鉴定为 I 型鸭肝炎病毒 (DHV), 命名为 BZ-I 株。该研究为有效预防 DVH 提供了较为有用的试验数据。

关键词: 鸭肝炎病毒; 鸭病毒性肝炎; 分离; 鉴定; 理化特性; 生物学特性

中图分类号: S858.322.65

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)01-0051-04

Isolation and identification of duck hepatitis virus and its physical-chemical and biological characteristics

XIE Jin-wen^{1,2}, MIAO Li-zhong², WANG Yan², XIAO Yue-qiang¹, WANG Jin-liang^{1,2}, SHEN Zhi-qiang^{1,2}

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600;

2. Shandong Lvdu Bio-Sciences & Technology Co. Ltd, Binzhou 256600)

Abstract: A strain of virus was isolated from suspected duck hepatitis virus (DHV) in duckling liver samples through chicken embryo allantoic sac inoculation. The sample was collected from ducklings diagnosed clinically dying from duck virus hepatitis on the duck farm in Binzhou county of Shandong province in China. Animal test indicated that the death rate was 80%. The virus strain was identified as DHV serotype I and named as DHV BZ-I strain by observation of clinical performance and the tests results of pathological examination, physical-chemical characteristics, neutralization, RT-PCR, and animal pathogenicity. This study could provide a useful data for effective prevention of DVH.

Key words: duck hepatitis virus (DHV); duck viral hepatitis (DVH); isolation; identification, physical-chemical characterization; biological characteristics

鸭病毒性肝炎 (duck viral hepatitis, DVH) 是由鸭肝炎病毒 (duck hepatitis virus, DHV) 引起的一种高度致死性的病毒性传染病, 以发病急、传播快、病程短、死亡率高为主要特征^[1]。临床上主要表现为痉挛、抽搐和角弓反张等神经症状; 肝肿胀和出血为其特征性病变^[2-3]。DHV 属于小 RNA 病毒科^[4-6]、肠道病毒属, 有 3 个血清型, 即 I、II、III 型。近年来, 随着我市周围地区养鸭业的蓬勃发展, 一些鸭场不断发生疑似 DVH, 严重影响着养鸭业的发展。主要危害 7 日龄~20 日龄雏鸭, 其病死率高达 80%。本试验对送检的疑似鸭病毒性肝炎病鸭进行了病原分离和鉴定, 并对其理化和生物学特

性进行了初步研究^[7-12], 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病料与标准毒株

DVH 病料来自山东省滨州市某鸭场的发病鸭 (分离株命名为 BZ-I); DHV 标准毒株 (AV2111, I 型), 购自中国兽医药品监察所。

1.2 试验动物

无 DVH 母源抗体的鸭胚及健康雏鸭, SPF 鸡胚购自济南斯帕法斯家禽有限公司, 自行孵化。

1.3 试剂与培养基

rTaq DNA 聚合酶 (5 U· μ L⁻¹)、dNTP、DNA

Maker DL2000 均购自大连宝生物有限公司;普通琼脂平板、巧克力琼脂平板、麦康凯琼脂平板均按配方自制。

1.4 兔抗 I 型 DHV 标准阳性血清及分离株高免血清制备

用鸭肝炎 AV2111 标准毒株及分离株的鸡胚尿囊液毒,以 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,分别取上清液加等量弗氏完全佐剂混匀乳化制成油乳剂,皮下注射 2 只成年家兔,1 mL·只⁻¹。2 周后以病毒液与等量弗氏不完全佐剂制成油乳剂于皮下注射,1 mL·只⁻¹。第 4 周后再以无佐剂病毒 0.2、0.4、0.8 mL 递增剂量 1 周分 3 次耳缘静脉注射。5 周后采血,在 37℃ 温箱中感作 30 min,4℃ 放置过夜,分离血清,3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清,测定其效价,置 -80℃ 保存备用^[7,13]。

1.5 细菌分离

从病死鸭肝脏无菌操作取样接种于普通琼脂平板、巧克力琼脂平板、麦康凯琼脂平板,分别于 37℃ CO₂ 培养箱和 37℃ 恒温箱中培养,观察有无细菌生长。

1.6 病毒分离及增殖

将采集的病鸭肝脏在灭菌的研钵内充分研磨,用灭菌生理盐水制成 1:5 乳剂,冻融 3 次,3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清液,加青、链霉素,使终浓度为 2 000 IU·mL⁻¹,37℃ 作用 30 min。取 9 日龄 SPF 鸡胚 20 枚,分为 2 组,每组 10 枚,第 1 组为试验组,经尿囊腔途径接种病料,0.2 mL·胚⁻¹;第 2 组为对照组,经尿囊腔途径接种无菌生理盐水,0.2 mL·胚⁻¹。接种后继续孵化,每天照蛋 2 次,收获 24~144 h 死亡胚尿囊液,冷冻保存、备用,观察胚体及内脏病变。

1.7 病毒毒价 (ELD₅₀) 测定

取标准毒株和分离毒株鸡胚尿囊液毒分别作 10⁻¹~10⁻⁹ 稀释,每个稀释度接种 8 枚 9 日龄鸡胚,0.2 mL·枚⁻¹,观察 7 d,记录鸡胚死亡情况。根据死胚的时间和数量按 Reed-Muench 法计算 ELD₅₀。

1.8 RT-PCR 鉴定

应用本实验室建立的 I 型鸭肝炎病毒 RT-PCR 诊断方法对分离病毒进行鉴定。上游引物 DHV5: 5'-TGGGCTAATGGTCTTCGT-3',下游引物 DHV6: 5'-TTGGGTCTGGIATTGTCTGT-3'。分别提取 AV2111 标准毒和分离株核酸^[14],应用上述特异性引物按程序进行 RT-PCR 扩增,产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳后观察。

1.9 病毒血凝性测定

病毒血凝性测定按照常规血凝试验方法进行。

1.10 理化特性研究

1.10.1 温度敏感性试验 将病毒液经 60℃ 水浴 30 min 处理后,同 1.7 接毒并计算 ELD₅₀。

1.10.2 有机溶剂敏感性试验 (1) 氯仿敏感性试验。向病毒液中加入分析纯的氯仿,使其终浓度为 4.8%,置 4℃ 振荡混合 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,同上法接毒并计算 ELD₅₀。

(2) 乙醚敏感性试验。取鸡胚尿囊液病毒 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⁻¹ 离心 20 min,吸取病毒液并反复吹打数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 日龄鸡胚,0.2 mL·胚⁻¹。同时设未加乙醚处理的病毒液作对照。连续观察 7 d,记录鸡胚死亡情况。

1.10.3 酸碱稳定性试验 病毒液分装于青霉素瓶中,分别用 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 或 NaOH 调 pH 至 3.0 或 12.0,并在另一个青霉素瓶的病毒液中加入相同于用酸和碱量的灭菌生理盐水作为对照。置 37℃ 温箱中作用 60 min 后,再分别用 56 g·L⁻¹ NaHCO₃ 或 0.1 mol·L⁻¹ 的 HCl 将 pH 调回至 7.2,病毒液分别作倍比稀释后接种于 9 日龄发育良好的 SPF 鸡胚,0.2 mL·胚⁻¹。24 h 内的死胚弃去,随后每天两次检蛋,死胚及时取出,到 168 h 停止,根据死胚的时间和数量按 Reed-Muench 法计算 ELD₅₀^[15]。

1.10.4 胰蛋白酶敏感性试验 在灭菌青霉素瓶中加入鸡胚病毒液 0.5 mL,再加入溶于 pH7.4 Hank's 液的 10 g·L⁻¹ 胰蛋白酶溶液 0.5 mL,使胰蛋白酶的最终浓度为 5 g·L⁻¹。混合,于 37℃ 温箱放置 1 h 后加入灭活犊牛血清 4 mL 终止作用,接种于 9 日龄发育良好的 SPF 鸡胚,0.2 mL·胚⁻¹。并设立未经胰蛋白酶处理的对照,观察 7 d,记录鸡胚死亡情况。

1.11 动物致病性试验

选择无鸭病毒性肝炎母源抗体的 7 日龄雏鸭 30 只,分为 3 组,第 1 组用收获尿囊液经肌肉接种雏鸭 10 只,0.2 mL·只⁻¹;第 2 组用分离病料 (20% 肝悬液) 经肌肉接种雏鸭 10 只,0.2 mL·只⁻¹;第 3 组注射灭菌生理盐水作为对照组。3 组试验鸭均隔离饲养,观察 1 周以上,记录发病死亡情况。死亡鸭解剖观察病理变化,并取有眼观病变的病鸭肝,按常规方法制作石蜡切片,光学显微镜下观看。

1.12 鸡胚中和试验

取 9 日龄鸡胚 40 枚,随机分成 4 组。第 1 组将收获的标准株尿囊液作 1:10 稀释,与 I 型 DHV 标

准阳性血清等体积混合后于 37℃ 反应 1 h; 第 2 组将分离株传代尿囊液作 1:10 稀释, 与 I 型 DHV 标准阳性血清等体积混合后于 37℃ 反应 1 h; 第 3 组为 I 型 DHV 标准阳性血清; 第四组为灭菌生理盐水对照组。各组均经尿囊腔途径接种鸡胚, 0.1 mL·枚⁻¹, 接种后继续孵化, 观察鸡胚死亡情况^[16]。

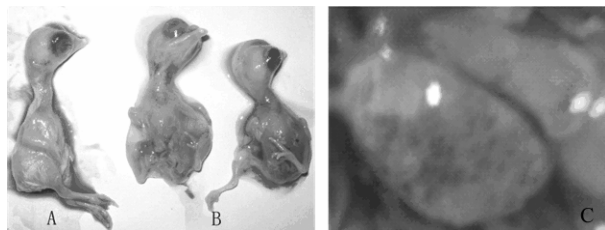
2 结果与分析

2.1 细菌分离

经普通琼脂平板、巧克力琼脂平板、麦康凯琼脂平板分别于 37℃ CO₂ 培养箱和 37℃ 恒温箱中培养, 均无细菌生长。

2.2 病毒分离与增殖

试验组鸡胚接种病毒后孵化至 144 h 全部死亡, 死亡胚皮下出血、水肿 (见图 1B), 肝脏有明显的坏死灶或坏死点 (见图 1C)。对照组鸡胚则全部存活。



A. 正常鸡胚; B. 接种 BZ-I 株的鸡胚; C. 接种 BZ-I 株的鸡胚肝脏

A. Normal chicken embryo; B. Chicken inoculated with BZ-I strain; C. Liver of the chicken embryo inoculated with BZ-I strain

图 1 接种 BZ-I 株后鸡胚及鸡胚肝脏病变

Figure 1 Pathological changes of chicken embryo and liver inoculated with BZ-I

2.3 病毒毒价 (ELD_{50}) 测定

经测定计算出标准毒株 AV2111 的 ELD_{50} 为 $10^{-5.10}$, 分离毒株 BZ-I 的 ELD_{50} 为 $10^{-5.56}$ 。

2.4 RT-PCR 鉴定

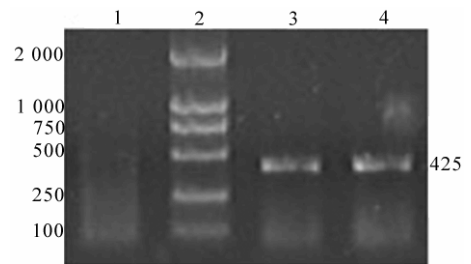
AV2111 标准毒和分离株均扩增出 425 bp 大小的特异性条带, 而阴性对照则无, 与预期结果一致 (见图 2)。初步说明分离的病毒为鸭肝炎病毒。

2.5 病毒血凝性测定

结果表明鸭肝炎病毒标准株 AV2111 和分离株 BZ-I 均无血凝性。

2.6 理化特性研究

分离毒株 BZ-I 的理化特性研究结果见表 1。



1. 阴性对照; 2. DNA Marker DL2000; 3. 标准株扩增产物; 4. 分离株扩增产物

1. Negative control; 2. DNA Marker DL2000; 3. PCR product of AV2111 strain; 4. PCR product of the isolated strain

图 2 DHV 的 RT-PCR 扩增结果

Figure 2 The RT-PCR results of DHV

表 1 分离毒株的理化特性

Table 1 The physicochemical characteristics of the isolated strain

测试项目 Item	ELD_{50}	
	试验组 Test group	对照组 Control group
60℃ 30 min	4.85	5.10
4.8% CHCl ₃	4.60	5.00
乙醚 Aether	5.23	5.72
pH3.0	4.56	5.21
pH12.0	4.94	5.56
胰蛋白酶 Trypsin	5.10	5.83

从表 1 可以看出, 所分离病毒株经热、氯仿、酸、碱等处理后, ELD_{50} 差异均小于 2, 表明该病毒没有囊膜, 对热、有机溶剂、酸、碱等均不敏感。

2.7 动物致病性试验

第 1、2 组试验鸭攻毒后 24 h 内开始发病死亡, 至第 4 天基本停止死亡, 死亡主要集中在第 3 天, 共死亡 16 只, 致死率高达 80%; 临床症状为突然发病, 精神萎靡, 食欲废绝, 发病片刻即倒地, 先是两腿向上作游泳样划动, 后头部向后仰, 呈现角弓反张状, 同时伴有高声鸣叫。解剖死亡鸭, 病变特征与自然发病病例相似, 主要是: 肝脏肿胀, 呈土黄色, 有明显的出血斑点, 其他脏器无显著变化。在光镜下见病雏鸭肝组织发生广泛的炎性变化, 肝细胞大量变性、坏死, 小静脉、微静脉形成大量的微血栓。第 3 组对照鸭则全部健康存活。

2.8 鸡胚中和试验

取 40 枚 9 日龄鸡胚, 随机分成 4 组进行中和试验, 观察结果显示, 各组鸡胚 96 h 内全部存活, 鸡胚无鸭病毒性肝炎特征性病变。

3 讨论

近年来, 随着山东省特别是滨州市周围地区养

鸭业的蓬勃发展,一些鸭场不断发生疑似 DVH,其发病急,致死率高,给养鸭业的发展造成了严重的影响。本研究从一起发病鸭群分离出一株病毒,经鸡胚病变、RT-PCR 鉴定、理化特性研究、病理学检查、动物致病性试验和鸡胚中和试验等鉴定为 I 型鸭肝炎病毒(DHV-I),命名为 BZ-I 株。也从而证实了山东省滨州市周围地区养鸭场发生的高致病性疫病是由 I 型鸭肝炎病毒分离株 BZ-I 株引起的鸭病毒性肝炎。

分离的病毒株致病性很强。动物致病性试验表明,在很大程度上再现了鸭肝炎病毒的流行特点,如发病急、病程短、死亡率高,临床表现主要为角弓反张,病变特征为肝脏肿大、出血和变性坏死等。由于鸭传染性浆膜炎也能出现神经症状、腹泻等临床表现,极易与鸭病毒性肝炎相混淆,所以进行病原的分离与鉴定对确诊该病具有重要意义。本研究分别以标准株和分离株作为模板,以设计的特异性引物通过 RT-PCR 扩增出了鸭肝炎病毒基因 425 bp 长的特异性片段。试验结果表明,该试验方法与其他方法比较具有敏感、特异、简便、快速等优点,能够用于鸭病毒性肝炎的快速、准确诊断。

鸭病毒性肝炎是危害养鸭业最严重的疾病之一,广大养殖户应引起足够的重视,以免引起较大的经济损失。

本试验分离并获得了一株 I 型鸭肝炎病毒,关于该病毒的免疫原性及其对雏鸭的保护性,以及我市周围地区是否存在 II 型或(和) III 型鸭肝炎病毒引起的鸭病毒性肝炎等有待于进一步研究和监测。另外,近年来,相继分离的 DHV 台湾株和韩国株等与经典的 I 型鸭肝炎病毒在血清学关系和基因组等方面有一定的差异,被认为是新型鸭肝炎病毒,至于作者分离到的 BZ-I 株在亲缘关系上孰近孰远,也还需进行深入的研究。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [3] 刘美玲. 鸭病毒性肝炎的流行病学特征及防制[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(7): 103-104.
- [4] Tseng C H, Tsai H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus[J]. Virus Research, 2007, 126(1/2): 19-31.
- [5] Ding C Y, Zhang D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1[J]. Virology, 2007, 361(1): 9-11.
- [6] Seng C H, Knowles N J, Tsai H J, et al. Molecular analysis of duck hepatitis type I indicates that it should be assigned to a new genus[J]. Virus Research, 2007, 123(2): 190-203.
- [7] 张丽, 杨润德, 靳芹, 等. 鸭肝炎病毒 BD-I 株的分离鉴定[J]. 动物医学进展, 2007, 28(11): 21-25.
- [8] 魏雪涛, 于敏, 张敬峰, 等. 一株安徽株雏鸭肝炎病毒的分离与鉴定[J]. 江西农业学报, 2007, 19(9): 94-96.
- [9] 陈珍, 施少华, 杨维星, 等. 雏麻鸭 1 型鸭肝炎病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建畜牧兽医, 2008, 30(5): 16.
- [10] 周珍辉, 李玉冰, 杨新建, 等. 雏鸭病毒性肝炎的分离与初步鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(3): 75-76.
- [11] 温纳相, 宋永峰, 周全, 等. 广东新兴 I 型鸭病毒性肝病病原分离与鉴定[J]. 水禽世界, 2009, 2: 36-38.
- [12] 陈海军, 程安春, 汪铭书, 等. 鸭病毒性肝炎的病原分离和鉴定[J]. 中国家禽, 2007, 29(12): 9-12.
- [13] 刘玉斌, 苟仕金. 动物免疫学实验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989: 2-9.
- [14] 程安春, 汪铭书, 信洪一, 等. I 型鸭病毒性肝炎病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(1): 38-42.
- [15] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 329-340.
- [16] 邵洪泽, 高云航, 苏双. 鸭病毒性肝炎病毒的分离与鉴定[C]//中国畜牧兽医学会动物传染病学分会第 12 次学术研讨会论文集. 江西省井冈山, 2007: 740-742.