一株新型鸭肝炎病毒的分离与鉴定

陈生雷,李凤艳,郭 华,边少国,项 伟,舒秀伟,苗玉和
(辽宁益康生物股份有限公司,辽宁辽阳 111000)

[收稿日期] 2015-09-18 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2016)01-0019-05 [中图分类号]S852.65

[摘 要] 从辽宁省某鸭场疑似鸭病毒性肝炎病料中分离到一株病毒,经PCR检测初步鉴定其为鸭肝炎病毒,命名为YK株,应用易感鸭胚和雏鸭进行传代及病毒含量测定,E_1~E_5代鸭胚适应毒病毒含量在$10^{6.5}$~$10^{6.9}$ ELD_{50}/0.2 mL之间,E_2代鸭肝组织毒病毒含量为$10^{6.3}$ LD_{50}/0.1 mL。动物试验结果表明,YK株鸭胚适应毒E_2代对7日龄雏鸭的致死率高达100%。序列测定分析表明,YK株与DHV-A的VP1基因同源性在71.4%~72.3%之间,与DHV-B的VP1基因同源性在71.9%~72.3%之间,与DHV-C的VP1基因同源性在94.3%~98.8%之间。试验表明,YK株与韩国新型鸭肝炎病毒在同一分支上,属于基因C型DHV。

[关键词] 鸭肝炎病毒;分离;鉴定

Isolation and Identification of a Duck Hepatitis Virus Strain

CHEN Sheng-lei, LI Feng-yan, GUO Hua, BIAN Shao-guo,
XIANG Wei, SHU Xiu-wei, MIAO Yu-he
(*Liaoning Yikang Biological Co., Ltd, Liaoyang, Liaoning* 111000, *China*)

Abstract: A virus strain was isolated from suspected duck viral disease from dead duck in liaoning Province, and identified by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. It is a duck hepatitis virus that named YK strain. The isolates were passed from E_1 to E_5, the titer determination in duck embryos were from $10^{6.5}$ to $10^{6.9}$ ELD_{50}/0.2 mL; the titer determination in duckling hepatitis tissue titer was $10^{6.3}$/0.1mL at E_2. Animal regression experimental results showed that The YK strain in duck embryos to 7-day-old duckling mortality was 100%. Sequence comparison with DHV-A serotype showed that the identity was 71.4%~72.3%, 71.9%~72.3% with DHV-B serotype and 94.3%~98.8% with DHV-C serotype. It proves that the YK strain and new serotype strain in Korea belongs to DHV-C serotype.

Key words: duck hepatitis virus; isolation; identification

鸭病毒性肝炎(duck viral hepatitis, DVH)是由鸭肝炎病毒(duck hepatitis virus, DHV)引起的一种传播迅速并高度致死雏鸭的病毒性传染病,以发病急、传播快、病程短、死亡率高为主要特征,主要侵害4周龄以内雏鸭,1周内最易感,死亡率可高达90%以上[1-2]。研究表明,鸭肝炎病毒有三个血清

作者简介:陈生雷,兽医师,从事生物制品研究工作。E-mail: chenshenglei1028@163.com

型,即Ⅰ型(DHV-1)及其变异株(la型)、Ⅱ型(DHV-2)和Ⅲ型(DHV-3),DHV-2和DHV-3又分别被称为台湾新型和韩国新型,三个血清型之间没有交叉保护和交叉中和作用。

为了更好地研究鸭病毒性肝炎的病原,根据DHV的基因进化规律又将其分为A、B、C型,分别对应原有的DHV-1、台湾新型、韩国新型[3-5]。新型的鸭肝炎病毒的出现给养鸭业带来了严重的经济损失。近年来,戴玉婷[6]、孙林杰[7]、张雪[8]等相继报道了与DHV-1不同的新型鸭肝炎病毒。本试验对辽宁省疑似鸭病毒性肝炎病鸭进行了病原分离和鉴定,以期为鸭病毒性肝炎的防治提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料　DHV-1型病毒SDE株及其阳性血清,由辽宁益康生物股份有限公司提供;疑似DHV病料来自辽宁省一鸭场的发病鸭。

1.2　实验动物　易感鸭胚及健康易感雏鸭,由辽宁益康生物股份有限公司提供,使用前检测抗体为阴性。

1.3　试剂　核酸提取试剂盒和RT-PCR一步法试剂盒,购自北京全式金生物科技有限公司。

1.4　病毒鉴定与增殖

1.4.1　RT-PCR初步鉴定　根据GenBank中已公布的新型鸭肝炎病毒全基因序列,设计引物,上游引物:5'-AGCACGAGAGACCCTTACG-3',下游引物:5'-CCCACAGGCTCTCACTAAAG-3',由宝生物工程(大连)有限公司合成。将采集的病料处理后,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,预计扩增片段长度为770 bp。

1.4.2　在鸭胚上增殖　将无菌采集的病鸭肝脏在灭菌的研磨器内充分研磨,用灭菌生理盐水制成1∶5乳剂,3000 r/min离心30 min,取上清液,加青、链霉素,使终浓度为2000 IU/mL,4 ℃过夜。取11日龄易感鸭胚20枚,分为2组,第1组为试验组,经尿囊腔途径接种病料,0.2 mL/胚;第2组为对照组,经尿囊腔途径接种灭菌生理盐水,0.2 mL/胚。接种后继续孵化,每日照蛋2次,收获24~144 h死亡胚尿囊液,观察胚体及内脏病变,参照《中国兽药典》[9]经无菌、支原体及外源病毒检测合格后冻干保存、备用。按此方法连续传代。

1.4.3　在易感雏鸭上增殖　将1.4.2样品做100倍稀释后,经胸部肌肉注射7日龄雏鸭,0.1 mL/只。观察7日,无菌采集攻毒后死亡且具有典型病变的鸭肝脏,研磨后分装,-20 ℃保存。

1.4.4　对鸭胚的半数致死量测定　取分离株鸭胚尿囊液作10倍系列稀释,取适宜稀释度经尿囊腔接种11日龄易感鸭胚,每个稀释度接种5枚,0.2 mL/枚,37 ℃孵育,观察7日,记录鸭胚死亡情况,按Reed-Muench法计算鸭胚半数致死量(ELD_{50})[9]。

1.4.5　对易感雏鸭的半数致死量　将肝组织毒E_2经10倍系列稀释,取适宜稀释度经胸部肌肉注射7日龄易感雏鸭,每个稀释度接种6只,0.1 mL/只,观察10日,计算雏鸭半数致死量(LD_{50})[9]。

1.4.6　动物致病性试验　取7日龄雏鸭20只,随机分为2组,第1组将收获的E2代鸭胚尿囊液作10倍稀释,经胸部肌肉接种雏鸭10只,0.2 mL/只;第2组将0.85%灭菌生理盐水经胸部肌肉接种雏鸭10只,0.2 mL/只,作为对照组。观察10日,记录发病死亡情况,死亡鸭解剖观察病理变化。

1.4.7　特异性血清中和试验　采用固定病毒稀释血清法进行测定,将鸭胚适应毒E2代和SDE株E2代病毒液稀释至病毒含量为200 ELD_{50}/0.1 mL,取适宜稀释度SDE株阳性血清与等量的200 ELD_{50}病毒液混合,37 ℃中和1 h,0.2 mL/枚,同时设立血清对照和病毒对照组,5枚/组,37 ℃孵育7日,记录各组死亡情况。

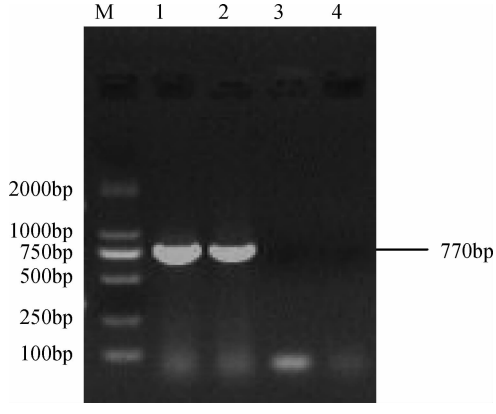
1.4.8　基因序列测定与分析　将PCR产物送至宝生物工程(大连)有限公司进行测序,并将结果用DNAStar软件进行序列分析,参考序列见表1。

表1　参考序列

编号	毒株	GenBank 登录号	分离地	基因型
1	AP-03337	DQ256132	South Korea	DHV-C
2	AP-04009	DQ256133	South Korea	DHV-C
3	AP-04114	DQ812093	South Korea	DHV-C
4	AP-04203	DQ256134	South Korea	DHV-C
5	FS	EU877916	China	DHV-C
6	SD02	GQ485311.1	China	DHV-C
7	04G	EF067923	Taiwan	DHV-B
8	90D	EF067924	Taiwan	DHV-B
9	DRL-62	DQ219396	ATCC	DHV-A
10	R85952	DQ226541	ATCC	DHV-A
11	JX	EF093502	China	DHV-A
12	ZJ-A	EF442072	China	DHV-A
13	AV2111	EF442073	China	DHV-A

2　结　果

2.1　*分离鉴定结果*　将临床疑似鸭肝炎病例的感染动物,采集肝组织,经研磨处理经 RT-PCR 初步鉴定为新型鸭肝炎病毒(图1),此病毒能在鸭胚上增殖,并能使7日龄易感雏鸭发病。



M:DL2000 Marker;1:YK 株鸭胚毒;
2:YK 株肝组织毒;3:SDE 株;4:阴性对照

图1　RT-PCR 结果

2.2　*鸭胚传代及病毒含量测定*　在11日龄鸭胚上连续传代至 E_5 代,接种鸭胚后死亡时间主要集中在96~120 h,死亡胚皮下出血、水肿,肝脏有明显的坏死灶或坏死点(图2),对照组鸭胚则全部存活。传至 E_3 代后鸭胚死亡规律,毒价稳定,表明该分离株能很好的适应11日龄易感鸭胚。结果见表2。

表2　鸭胚传代死亡比例及病毒测定结果

检测项目	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
病毒传代死亡比例	6/10	8/10	10/10	10/10	10/10
病毒含量/($ELD_{50}\cdot 0.2mL^{-1}$)	$10^{6.5}$	$10^{6.9}$	$10^{6.7}$	$10^{6.5}$	$10^{6.7}$

2.3　*雏鸭半数致死量测定*　将 YK 株 E_2 代肝组织毒应用7日龄易感雏鸭进行半数致死量测定,易感雏鸭于攻毒后24 h开始死亡,死亡高峰集中在24~48 h,死亡雏鸭呈现典型的角弓反张状态,剖检肝脏有明显的点状出血。结果 YK 株 E_2 代肝组织毒对雏鸭的半数致死量为 $10^{6.3}LD_{50}/0.1mL$。

2.4　*动物致病性试验*　第1组试验鸭攻毒后24 h开始发病死亡,72 h全部死亡,死亡主要集中在攻毒后24~48 h,共死亡20只,致死率高达100%;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。解剖死亡鸭,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,剖检结果见图3。第3组对照鸭则全部健康存活。

2.5　*血清中和试验*　表3结果表明,YK 株不能被Ⅰ型鸭肝炎病毒阳性血清中和,SDE 株能被Ⅰ型鸭肝炎病毒阳性血清中和,说明 YK 株和 SDE 株为不同血清型。

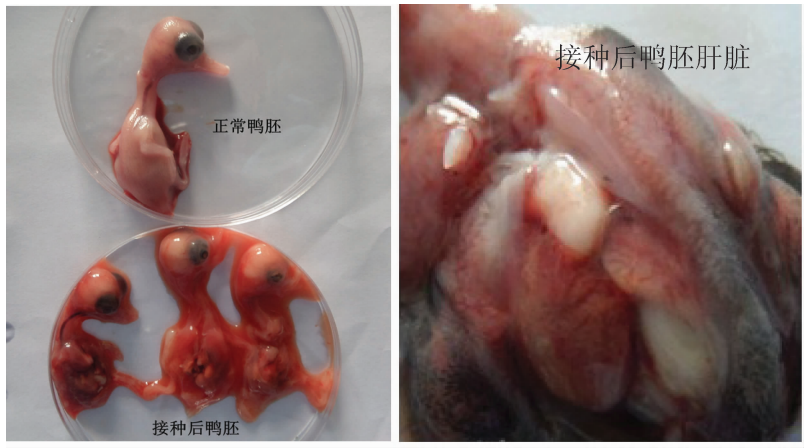


图 2　YK 株接种后鸭胚及肝脏病变

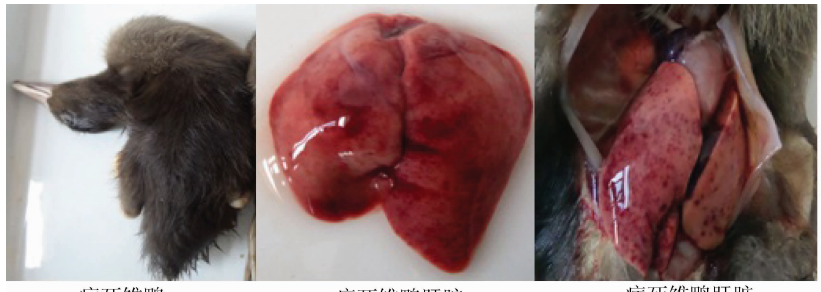


图 3　攻毒后死亡雏鸭及病变肝脏

表 3　血清中和试验结果

毒株	鸭胚死亡比例		
	DHV－1 阳性血清	病毒对照	空白对照
YK 株	5/5	5/5	0/5
DHV－1 型 SDE 株	0/5	5/5	/

2.6　测序分析　应用设计引物,对 YK 株进行 RT－PCR扩增并将产物进行测序,将测序结果与鸭肝炎病毒 VP1 基因序列进行比对,并构建进化树。结果显示,YK 株与 DHV－C 型基因同源性为 94.3%~99.0%,与台湾新型(04G 和 90D)基因同源性分别为 71.9% 和 72.3%,该分离株与 DHV－C 型属于同一基因型,且与 DHV－B 型相邻,但与 DHV－A 处于不同的分支。结果见图 4、图 5。

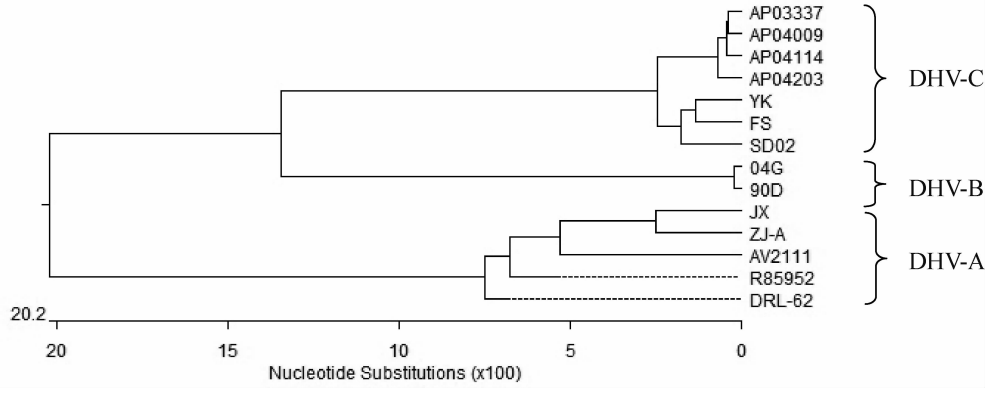


图 4　YK 株测序结果进化分析

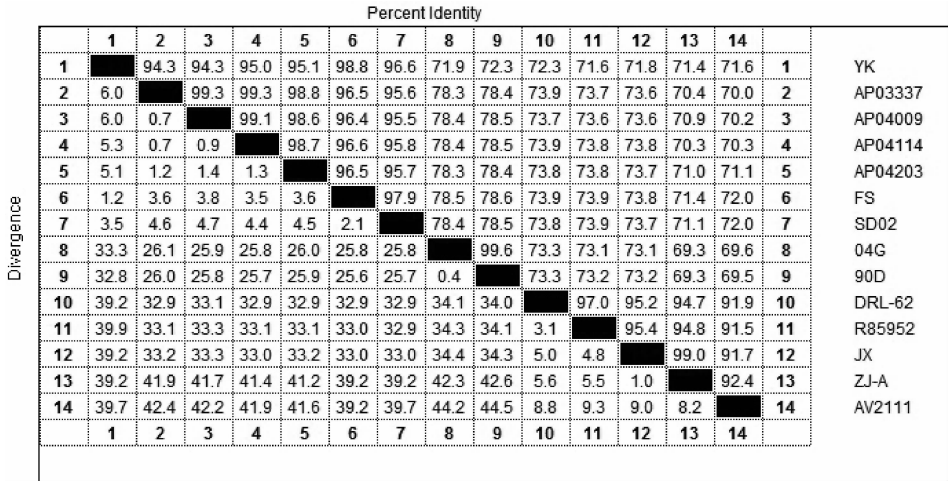


图 5　不同毒株基因序列比较分析

3　讨论与小结

本试验应用 RT－PCR 检测,对辽宁省某地发病鸭初步鉴定为新型鸭肝炎病毒,并使用易感鸭胚对病料进行分离传代培养,该分离株经病毒含量测定、半数鸭胚致死量测定、本动物回归试验、血清中和试验鉴定为为 DHV－C 型鸭肝炎病毒,并命名为 YK 株。

目前鸭病毒性肝炎的预防与治疗主要以Ⅰ型的弱毒疫苗和卵黄抗体制剂为主,但Ⅰ型和新型的鸭肝炎病毒之间不具备交叉保护。本研究中成功分离到 DHV－C 型鸭肝炎病毒,为进一步研制针对 DHV－C 型鸭肝炎病毒的抗体制剂或疫苗奠定了基础。

参考文献:

[1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.

[2] 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.

[3] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, *et al*. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus revealed the presence of a newgeno－and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strain [J]. Arch Virol, 2007,152 (11) : 2059－2072.

[4] Wang L, Pan M, Fu Y, *et al*. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis[J]. Virus Genes,2008,37(1) :52－59.

[5] 韦天超,石梦霞,兰奉瑜,等. 一株广西新型鸭肝炎病毒的分离与初步鉴定[J]. 广西畜牧兽医,2012,28(5):259－260.

[6] 戴玉婷,王 杉,宋 扬,等. 鸭甲肝病毒 VP1 基因克隆及序列分析[J]. 中国兽药杂志,2015,49(2):18－21.

[7] 孙林杰,王雪平,宋国亮,等. 一株鸭肝炎病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽药杂志,2014,48(4):15－18.

[8] 张 雪,龚文孝,胡 勇,等. Ⅰ型鸭肝炎病毒基因 C 型株的分离与鉴定[J]. 动物医学进展,2015,36(1):23－26.

[9] 中国兽药典委员会. 中和人民共和国兽药典[S]. 2010 版. 北京:中国农业出版社,2011.

(编 辑:李文平)