

陕西关中地区 EDS-76 病毒的 分离与初步鉴定*

杨增岐 赵余放 张淑霞 吴廉甫 康佐文

(西北农业大学禽病研究室, 陕西杨陵 712100)

摘要 采用鸭胚传代的方法, 首次从陕西省关中地区 EDS-76 HI 抗体阳性鸡群的卵巢和输卵管中分离到 1 株病毒, 经血凝与血凝抑制试验、电镜观察、乙醚和氯仿的敏感性试验、核酸型鉴定试验及回归动物试验等, 鉴定该分离物为 EDS-76 病毒。从病原学上证实陕西省已有该病的发生与流行。

关键词 产蛋下降综合征病毒, 形态学, 理化特性, 人工感染试验

中图分类号 S858.310.53

产蛋下降综合征(Egg Drop Syndrome, EDS-76)是一种禽腺病毒引起的鸡产蛋量下降的传染病。该病临床症状表现不明显, 而以产蛋量下降、蛋壳异常、蛋体畸形、蛋质低劣为特征^[1]。近年来, 陕西关中部分地区的鸡场发生过不明原因产蛋量下降、畸形蛋增多等情况, 经流行病学调查与血清学检测证实为 EDS-76。本研究从有产蛋下降史及血清学阳性鸡群分离获得 1 株 EDS-76 病毒, 旨在为进一步研究该病及研制防治该病的油佐剂灭活苗提供必需材料。

1 材料

病料 选取具有 EDS-76 临床特征及血清学(HI 抗体)阳性的产蛋母鸡, 心脏采血致死, 无菌采集其卵巢和输卵管, 研磨, 用 pH7.2 的 PBS 液作 1:5 稀释, 1500 r/min 离心 10 min 取上清, 加双抗处理, 低温保存作鸭胚接种用。

鸭胚 从偏远农村选择 EDS-76 HI 抗体阴性的健康鸭群, 收集其受精蛋, 于 38.5℃ 孵化至 10 日龄使用。

EDS-76 HI 抗原(NE₁株)及其阳性血清 由南京农业大学李刚副教授惠赠。

试验用鸡 20 只海赛克斯褐蛋鸡, 22 周龄, EDS-76 HI 抗体均为阴性。

试剂 0.01 mol/L pH8.0 的 TE(Tris-EDTA)缓冲液, 70%~30%的蔗糖, 1%鸡红细胞悬液, IUDR(5-碘脱氧尿核苷)溶液, 按常规制备。

电子显微镜 日立牌 SCP-85H 型, 所用转头为湘仪 TOMY-GL-20 型。

2 方法

2.1 病毒分离

取处理好的材料上清液, 经绒毛尿囊膜接种 10 枚 10 日龄鸭胚, 每胚 0.2 mL。继续孵

收稿日期: 1995-09-20

* 杨陵农业科技开发基金资助项目。

化 72 h,然后置 4℃冷藏过夜。次日无菌收集尿囊液,并观察鸭胚病变。然后以此尿囊液接种下一批鸭胚,如此盲目传代。至第 3 代后改用尿囊腔接种。当观察到鸭胚有规律地死亡,胚体出血,且尿囊液具有较高血凝性时,可初步认为分离到病毒。以其尿囊液作为病毒液进行鉴定。

2.2 病毒鉴定

血凝(HA)与血凝抑制(HI)试验 用微量 HA 试验测定每次收集尿囊液的 HA 效价,如有 HA 效价时,再分别用 EDS-76 和 ND 阳性血清作 HI 试验,并设已知 EDS-76 和 ND 抗原对照。

电镜观察 选择 HA 效价达 $23 \log_2$ 的鸭胚尿囊液,8 000 g 4℃离心 20 min 取上清,40 000 g 4℃离心 2 h 取沉淀,经 70%~30%蔗糖梯度以 100 000 g 4℃离心 1.5~2 h,沉淀物用磷钨酸负染后电镜观察。

理化特性鉴定 分离毒(尿囊液)DEID₅₀(鸭胚半数感染量)的测定,对乙醚、氯仿等脂溶剂的敏感性试验和核酸型鉴定试验(IUDR 抑制法)等,均按殷震等^[2]介绍的方法进行,当处理后,其 DEID₅₀降低 2 个对数以上时判为敏感。

回归动物试验 将 21 周龄的海赛克斯褐母鸡(21 周龄开产)随机分为相等的两组,试验组每只滴鼻、口服 EDS-76 分离毒的鸭胚尿囊液 1 mL(含 $10^{7.65}$ DEID₅₀),对照组滴鼻、口服等量生理盐水。隔离饲养,观察记录每组的产蛋情况,并每隔 10 d 采血检测其血清 EDS-76 HI 抗体。于 25 周龄时分别取两组鸡的泄殖腔拭子(每组 3 只鸡)和 1 只试验组鸡的输卵管,处理后接种 10 日龄鸭胚进行病毒回收试验。

3 结 果

3.1 病毒分离结果

接种材料后盲传,可使鸭胚有规律地出现病变。第 1、2 代的病变不明显,大部分能存活到 72 h;至第 3 代时,个别胚在 72 h 后有不同程度的出血点;至第 4 代时有病变的鸭胚可达 1/3~1/2,胚体出血点增多,尤以头颈部明显,少数胚的尿囊液也变红;从第 5 代起病变基本稳定。从第 3 代起尿囊液出现不同程度的血凝性。

3.2 病毒鉴定结果

3.2.1 HA 与 HI 试验结果 第 1、2 代尿囊液无明显的血凝性,从第 3 代始出现血凝现象,HA 价为 $1 \log_2 \sim 2 \log_2$,HA 价随着代数的增加而增加,至第 5 代达到 $12 \log_2 \sim 16 \log_2$,且传代稳定,至第 6 代最高可达 $23 \log_2$ 。此种血凝性可被已知 EDS-76 的阳性血清完全抑制,而不能被 ND 阳性血清抑制。

3.2.2 电镜观察结果(附图) 放大到 30 000 倍时,可见病毒粒体密集成堆,有的视野下为单个散在或 2~3 个一堆,外形呈圆球状,有的破损,失去完整的形态;放大到 216 000 倍时,可见病毒粒体大小均一,衣壳结构清晰,呈二十面体立体对称,衣壳外有清晰的壳粒,无包膜;放大到 330 000 倍时,壳粒更加清晰,病毒粒体的大小为 75~85 nm。

52.0 [*]	31	83.85	54.849.1 [*]
60.0 [*]	32	87.86	64.650.2 [*]
67.7 [*]	33	85.87	78.948.4 [*]

产蛋率比较试验组与对照组的产

蛋率比较试验组与对照组的产

蛋率比较试验组与对照组的产

4 讨 论

产蛋率比较试验组与对照组的产

病例无明显差别,表明这是 1 株感染性较强的毒株。该毒株对乙醚、氯仿不敏感,耐酸,核酸型为 DNA,电镜下的形态特征与王新平^[3]等新近观察的结果一致,表明其理化特性与形态特征均与 EDS-76 病毒相符合。

甘孟侯^[1]等报道,从血清学阳性鸡中可分离到 EDS-76 病毒,本试验的结果也进一步证实了这一点。

据报道,攻毒后 7 d 可从泄殖腔拭子中回收到 EDS-76 病毒^[4],本试验未能从泄殖腔拭子中回收到 EDS-76 病毒,可能与采样时机掌握不当有关。

参 考 文 献

- 1 甘孟侯. 产蛋下降综合征. 中国兽医杂志, 1991, 17(5): 49~52
- 2 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1985, 833~834
- 3 王新平, 宣华, 任文陟等. 鸡产蛋下降综合征病毒的分离及初步鉴定. 兽医大学学报, 1993, 13(2): 114~115
- 4 谈建明, 吴祖立, 马式虹. 鸡产蛋下降综合征的病毒分离与初步鉴定. 上海农学院学报, 1993, 36, 110~111

Isolation and Identification of EDS-76 Virus of Chickens in Guanzhong Area of Shaanxi Province

Yang Zengqi Zhao Yufang Zhang Shuxia Wu Lianfu Kang Zuowen

(Research Laboratory of Poultry Disease, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract One strain of virus was isolated from ovary and oviduct of laying chicken flocks which had positive EDS-76 HI antibody by means of inoculating duck embryo chorioallantoic sac in Guanzhong Area of Shaanxi Province. The virus was identified as EDS-76 virus by HA and HI tests, the observation under electronic microscope, the sensitivity test to ether and chloroform, the identification test to nucleic acid type and challenge test, which proved that the disease had been prevailing in shaanxi.

Key words EDS-76 virus, morphology, physical and chemical property, artificial challenge test