

新型鸭呼肠孤病毒分离株的致病性研究

陈仕龙, 陈少莺, 程晓霞, 林锋强, 江斌, 王劲, 朱小丽, 张世忠, 李兆龙

(1 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所福建 福州, 350013; 2 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州, 350013)

【摘要】 **【目的】**研究新型鸭呼肠孤病毒(NDRV)的致病性。**【方法】**以 NDRV 分离株 NP01、NP03、NPM 为供试病毒,分析其对禽胚(番鸭胚、鸡胚)、部分禽类(雏番鸭、雏半番鸭、雏鸡、雏鹅)及细胞的致病性。**【结果】**NDRV 分离株经尿囊腔接种能 100% 致死 12 日龄番鸭胚和 9 日龄鸡胚。2 日龄雏番鸭、雏半番鸭经腿肌、口鼻、爪垫等途径人工感染 NDRV 分离株后,出现了与自然病例相同的病症,NDRV 分离株对雏番鸭和雏半番鸭的致死率分别为 20%~53% 和 13%~33%,同时能从病死鸭肝脾中回收到该病毒,耐过鸭大多成为僵鸭;15 日龄雏鸡和 2 日龄雏鹅人工感染 NDRV 分离株后观察 20 d,均未表现出 NDRV 致病的临床症状。NDRV 分离株具有较广的细胞亲嗜性,能在 MDEF、CEF、AD293、Marc145、Vero、ST、MDCK 等细胞中增殖并产生细胞病变,病变细胞呈现巨融合状;但 NDRV 分离株在 PK 细胞中盲传 3 代均未出现病变。**【结论】**NDRV 在致病特性方面明显不同于禽呼肠孤病毒和番鸭呼肠孤病毒。

【关键词】 新型鸭呼肠孤病毒;致病性;禽胚;禽类;细胞病变

【中图分类号】 S858.32

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)04-0014-05

The study on the pathogenicity of new type duck reovirus

CHEN Shi-long, CHEN Shao-ying, CHENG Xiao-xia, LIN Feng-qiang,
JIANG Bin, WANG Shao, ZHU Xiao-li, ZHANG Shi-zhong, LI Zhao-long

(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 2 Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: **【Objective】** The experiment was conducted to study the pathogenicities of new type duck reovirus (NDRV). **【Method】** The pathogenicities of NDRV strains (NP01, NP03, NPM) were investigated in some kinds of fowls, avian embryos and cells. **【Result】** These NDRV strains could cause muscovy ducklings and semi-muscovy ducklings to disease and die, the mortalities of Muscovy duckling and semi-muscovy ducklings were 20%—53% and 13%—30% respectively. These dead ducklings showed characteristic hemorrhagic necrotic hepatitis, the same with the clinically dead birds and the challenged virus could be reisolated from artificial infection. The survival ducks infected experimentally with isolates were markedly stunted in growth. These NDRV strains had no obvious pathogenicity to 15-day-old chicken or 2-day-old goose. Muscovy duck embryos and chick embryos inoculated with NDRV died completely and had the hemorrhage and necrosis in embryo-livers. NDRV induced syncytium formation in MDEF, CEF, AD293, Marc145, Vero, ST and MDCK cells monolayers and no cytopathic effect (CPE) was observed in PK cell monolayer. **【Result】** NDRV's pathogenicity differed from that of ARV and MDRV.

Key words: new-type duck reovirus; pathogenicity; avian embryo; poultry; cytopathic effect (CPE)

* [收稿日期] 2009-10-23

[基金项目] 福建省农业科学院动物传染病防控创新团队项目(STIF-Y02);福建省公益类项目(2010R1101003-5)

[作者简介] 陈仕龙(1979—),男,福建宁化人,助理研究员,主要从事动物传染病免疫学研究。

[通信作者] 陈少莺(1962—),女,福建长乐人,研究员,主要从事动物传染病病原与防治研究。E-mail:chensy58@163.com

自2005年以来,在福建、广东和浙江等地,番鸭、半番鸭、麻鸭群发生了一种以肝脏不规则坏死和出血混杂为主要特征的传染病(暂称为鸭出血性坏死性肝炎),给养鸭业造成了极大危害。目前,国外尚未见报道类似鸭病,本研究室经病原分离、动物回归试验、病毒形态观察、理化特性、病毒核酸电泳等鉴定,在国内外首次将该病原暂归类于呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属新型鸭呼肠孤病毒(New-type duck reovirus, NDRV)^[1]。为进一步明确该病原的致病性,本研究测定了NDRV分离株(NP01、NP03、NPM)对禽胚、部分禽类和细胞的致病性,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 病毒与细胞

NDRV分离株NP01、NP03、NPM的分离、鉴定和保存,以及传代细胞人胚肾细胞(AD293)、恒河猴肾细胞(Marc145)、非洲绿猴肾细胞(Vero)、猪睾丸细胞(ST)、猪肾细胞(PK)等的传代和保存,均在福建省农业科学院畜牧兽医研究所动物病毒研究室完成。

犬肾细胞(MDCK)由福建省农业科学院畜牧兽医研究所畜病室提供,按常规方法培养和传代。番鸭胚成纤维细胞(MDEF)和鸡胚成纤维细胞(CEF)按照文献[2]的方法制备。

1.2 试验动物与禽胚

2日龄雏番鸭和12日龄番鸭胚,购自福州山区番鸭场;9日龄鸡胚、2日龄雏半番鸭、15日龄雏鸡和2日龄雏鹅,购自福州郊区养禽场。

1.3 NDRV分离株对禽胚致病性的检测

将NDRV分离株NP01、NP03、NPM的番鸭胚液毒经尿囊腔,分别接种5枚12日龄番鸭胚和9日龄鸡胚,接种剂量为0.1 mL/胚,37℃孵化7 d,每天观察2次,记录各胚死亡时间,收获24 h后的死胚尿囊液,并观察禽胚病变情况。

1.4 NDRV分离株对部分禽类致病性的测定

将NDRV分离株NP01、NP03、NPM第6~9代MDEF细胞毒,经腿肌、口鼻、爪垫接种2日龄雏番鸭、2日龄雏半番鸭、15日龄雏鸡及2日龄雏鹅4种动物,每种动物接种5~15羽,接种剂量为0.5~1.0 mL/羽。同时分别设置健康对照组(CK),经同样途径接种相同剂量的灭菌Hank's液。各种动物隔离饲养,每天观察并记录临床症状、发病死亡情况和病理变化,连续观察20 d。

1.5 中和抗体的测定

无菌采集、分离人工感染耐过雏番鸭、雏半番鸭、雏鸡、雏鹅的血清,并以未接种病毒的健康对照组动物血清为对照,于56℃作用30 min,采用固定血清稀释病毒法,测定血清中和抗体,中和指数大于50即判为抗体阳性。

1.6 病毒回收试验

无菌采集人工感染NDRV致死雏番鸭、雏半番鸭的肝脏、脾脏等脏器,按常规方法制成匀浆后经尿囊腔接种12日龄番鸭胚,收获24 h后死胚尿囊液,并观察番鸭胚的病变情况。

1.7 细胞致病性试验

将NDRV分离株NP01、NP03、NPM分别接种MDEF、CEF原代细胞和AD293、Marc145、Vero、ST、MDCK、PK等传代细胞单层,于37℃、体积分数为5% CO₂条件下培养72~96 h,同时设未接毒的正常细胞为对照。每日观察,当细胞病变达75%时,收获病毒或连续盲传3代。

2 结果与分析

2.1 NDRV分离株对禽胚的致病性

经尿囊腔接种后,NDRV分离株能致死12日龄番鸭胚和9日龄鸡胚,禽胚于接种后2~5 d死亡,78 h达死亡高峰,死亡胚体全身充出血,各组死亡胚均表现为不同程度的肝、脾出血斑/点或灰白色坏死灶/点,心脏出血,胚液清亮。NDRV分离株对番鸭胚和鸡胚的致死率均为100%。

2.2 NDRV分离株对部分禽类的致病性

2.2.1 雏番鸭 经腿肌、口鼻、爪垫等途径分别接种NDRV分离株NP01、NP03、NPM第6~9代MDEF细胞毒后,2日龄雏番鸭第4天开始发病,第4天到第8天为死亡高峰,第9天后基本稳定。从表1可知,NP01组的发病率、死亡率均为20%~40%;NP03组的发病率和死亡率均为53%;NPM组的发病率为40%,死亡率为33%;发病雏番鸭几乎100%死亡,其发病率和死亡率均高于临床调查统计的流行病学,且发病率、死亡率与攻毒剂量呈正相关关系。

2.2.2 雏半番鸭 将NDRV分离株NP01、NP03、NPM第6~9代MDEF细胞毒,经腿肌、口鼻、爪垫接种2日龄雏半番鸭后,其发病过程大致与雏番鸭相似。由表2可知,NP01组的发病率为27%,死亡率为20%;NP03组的发病率和死亡率均为33%;NPM组的发病率为20%,死亡率为13%。病毒对

雏半番鸭的致病力低于雏番鸭。

表 1 NDRV 分离株对雏番鸭的致病性

Table 1 Mortality of 2-day-old muscovy ducklings infected experimentally with NDRV strains

组别 Group	试验鸭数 Number of ducks	攻毒剂量/mL Dose	发病率/% Incidence	死亡率/% Mortality
NP01	5	0.5	20(1/5)	20(1/5)
NP01	15	1.0	40(6/15)	40(6/15)
NP03	15	1.0	53(8/15)	53(8/15)
NPM	15	1.0	40(6/15)	33(5/15)
CK	5	1.0	0(0/5)	0(0/5)

表 2 NDRV 分离株对雏半番鸭的致病性

Table 2 Mortality of 2-day-old semi-muscovy ducklings infected experimentally with NDRV strains

组别 Group	试验鸭数 Number of ducks	攻毒剂/mL Dose	发病率/% Incidence	死亡率/% Mortality
NP01	15	1.0	27(4/15)	20(3/15)
NP03	15	1.0	33(5/15)	33(5/15)
NPM	15	1.0	20(3/15)	13(2/15)
CK	5	1.0	0(0/5)	0(0/5)

2.2.3 雏鸡和雏鹅 15 日龄雏鸡和 2 日龄雏鹅经腿肌、口鼻、爪垫接种后,观察 20 d,均未表现出 NDRV 致病的临床症状,接种部位也未见不良反应。

2.3 人工感染 NDRV 分离株耐过动物血清中和抗体的检测结果

由表 3 可知,耐过雏番鸭、雏半番鸭的血清中和抗体阳性率分别为 46% 和 40%;雏鸡和雏鹅人工感染后虽未表现出 NDRV 致病的临床症状,但部分能

表 3 人工感染 NDRV 分离株耐过动物血清中和抗体的检测结果

Table 3 Results of neutralizing antibody test to NDRV NP03 strain by sera obtained from resistant animals.

供试禽类 Poultry	康复羽数 Total	抗体阳性羽数 Number of positive	阳性率/% Positive rate
雏番鸭 Muscovy ducklings	26	12	46
雏半番鸭 Semi-muscovy ducklings	35	14	40
雏鸡 Chicken	45	10	22
雏鹅 Gosling	45	23	51

2.5 NDRV 分离株回收试验的结果

采集经人工感染 NDRV 分离株致死雏番鸭和雏半番鸭的肝脏、脾脏等脏器,匀浆后经尿囊腔接种 12 日龄番鸭胚,结果显示,接种番鸭胚在 72 h 内全部死亡,死胚的病变一致,且死胚尿囊液能在 MDEF 中增殖发生巨融合细胞病变。

2.6 NDRV 分离株对不同细胞的致病性

将 NDRV 分离株 NP01、NP03、NPM 番鸭胚尿囊液毒接种 MDEF、CEF 单层细胞后,第二代产生细胞病变,表现为细胞巨融合(图 1-A~D)。NDRV 分离株 NP01、NP03、NPM 第 6~9 代 MDEF 细胞毒在 ST、MDCK、Marc145、Vero、AD293 细胞中传至第一代时都能产生巨融合细胞病变(图 1-E~N);而在 PK 中盲传 3 代,均未出现细胞病变。将

产生特异性抗体,阳性率分别为 22% 和 51%;对照组均为阴性。

2.4 鸭经人工感染 NDRV 分离株后的症状及病变

经人工感染 NDRV 分离株后,雏番鸭、雏半番鸭都能复制出与自然病例相同的临床病状和病理变化,主要表现为肝脏略肿大,表面有不同程度点/斑状出血或坏死灶,脾脏坏死,心脏出血,在部分病死鸭的肾脏和法氏囊可见到坏死灶和出血点。攻毒后存活鸭的质量明显小于健康鸭。

NDRV 分离株接种单层细胞后,24 h 即开始出现细胞病变,表现为单层细胞聚集成团,形成大量合胞体,48 h 后细胞病变达 50%,细胞拉网,变性细胞逐渐脱落,悬浮在培养液中;在整个观察过程中,正常细胞(对照)均生长良好,未出现异常。

3 结论与讨论

本研究发现,NDRV 分离株能 100% 致死 12 日龄番鸭胚和 9 日龄鸡胚;经人工感染 NDRV 分离株的 2 日龄雏番鸭和雏半番鸭均能表现出与临床一致的典型病变,且可从致死鸭脏器中再次分离到原攻击病毒;经人工感染 NDRV 分离株的 15 日龄雏鸡和 2 日龄雏鹅,观察 20 d 后发现,其均未出现临床症状,但多数康复鸭和部分康复雏鸡、雏鹅均能产生

特异性中和抗体。病毒能在 MDEF、CEF、AD293、Marc145、Vero、ST、MDCK 等细胞中增殖,并产生

巨融合细胞病变。

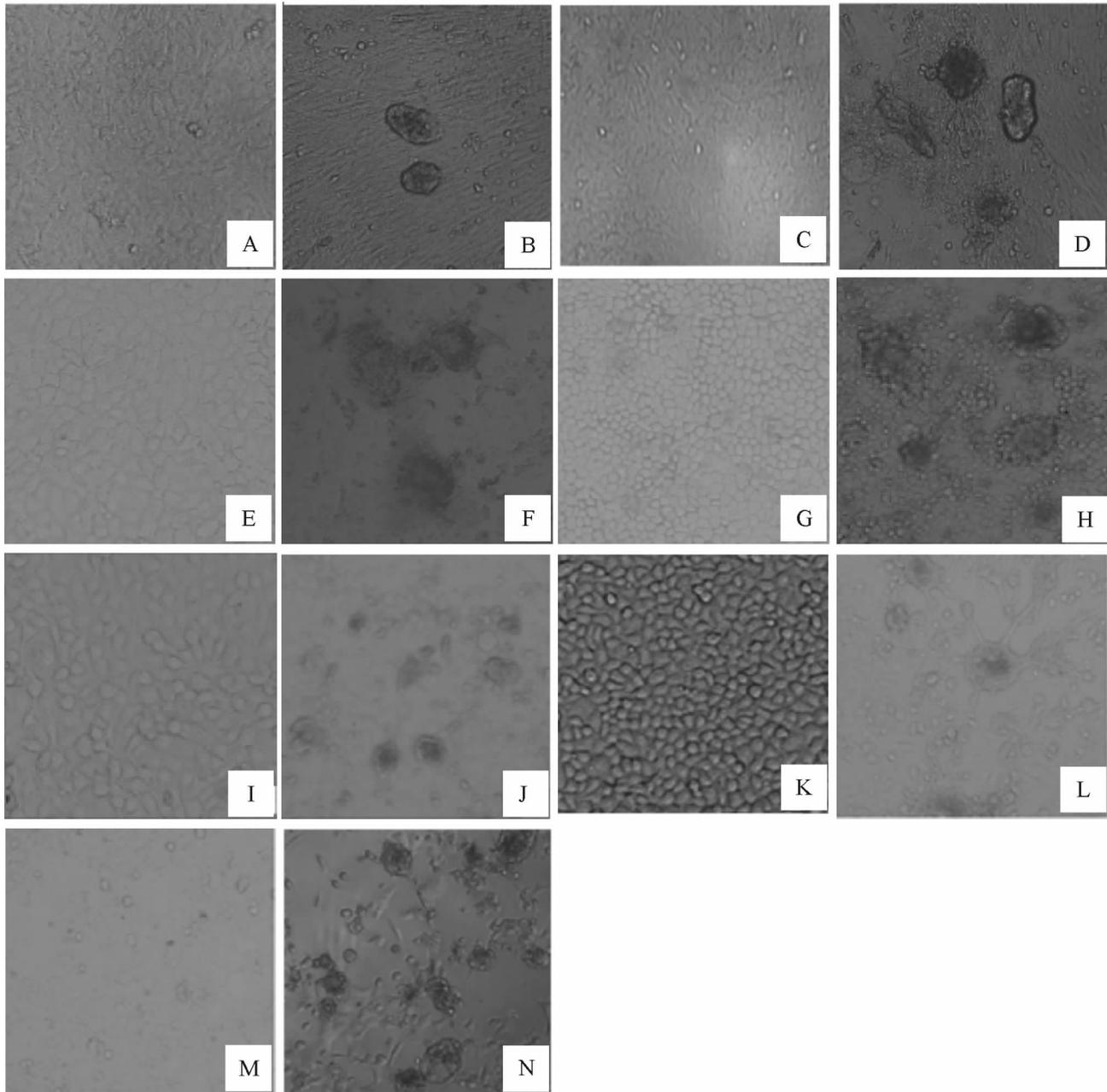


图 1 NDRV 分离株对不同细胞的致病性($\times 100$)

A,B. 分别为正常和感染 NDRV 分离株的 MDEF(37°C 、48 h);C,D. 分别为正常和感染 NDRV 分离株的 CEF(37°C 、72 h);E,F. 分别为正常和感染 NDRV 分离株的 ST 细胞(37°C 、72 h);G,H. 分别为正常和感染 NDRV 分离株的 MDCK 细胞(37°C 、72 h); I,J. 分别为正常和感染 NDRV 分离株的 Marc145 细胞(37°C 、72 h); K,L. 分别为正常和感染 NDRV 分离株的 Vero 细胞(37°C 、96 h);M,N. 分别为正常和感染 NDRV 分离株的 AD293 细胞(37°C 、96 h)。

Fig 1 Syncytium formation by NDRV onto cell monolayers($\times 100$)

A,B. Normal MDEF cells monolayer and MDEF inoculated with NDRV, 48 h at 37°C . C,D. Normal CEF cells monolayer and CEF inoculated with NDRV, 72 h at 37°C . E,F. Uninoculated ST cells and ST cells inoculated with NDRV, 72 h at 37°C . G,H. Uninoculated MDCK cells and MDCK cells inoculated with NDRV, 72 h at 37°C . I,J. Uninfected Marc145 cells and Marc145 cells inoculated with NDRV, 72 h at 37°C . K,L. Uninfected Vero cells and Vero cells inoculated with NDRV, 96 h at 37°C . M,N. Normal AD293 cell and AD293 cell incubated with NDRV, 96 h at 37°C .

NDRV 分离株与禽呼肠孤病毒(ARV)和番鸭呼肠孤病毒(MDRV)在致病性方面存在如下异同:

1)对鸡胚的致病性不同。NDRV 分离毒株经尿囊腔接种能致死番鸭胚和鸡胚,而 MDRV 经尿囊腔接种不能致死鸡胚^[3]。2)临床表现形式不同。MDRV 是一种临床上以软脚为主要症状,以肝、脾表面有多量白色坏死点为主要病理变化的传染病,无肝脏出血病变,人工感染致鹅和半番鸭发病,而其对鸡不致病^[3-5];ARV 引起鸡和火鸡的病毒性关节炎/腱鞘炎、吸收障碍综合征(MAS),对鸭、鹅等水禽一般不表现临床症状^[6-9];而 NDRV 分离株致病的临床主要表现为肝脏不同程度点/斑块状出血和坏死,脾脏肿大坏死,心脏、肾脏法氏囊等出血,病鸭不软脚,人工感染鸡和鹅不发病。人工感染的剂量与发病死亡率相关,即感染剂量大,发病死亡率高,感染日龄越小,发病死亡率也越高。王永坤等^[10]报道,鹅出血性坏死性肝炎的病原为鹅呼肠孤病毒(GRV),病死鹅的主要特征与鸭出血性坏死性肝炎极为相似,但未见 GRV 对其他禽类致病性的研究。3)细胞致病性不同。NDRV 和 ARV 均能致感染细胞出现细胞巨融合的病变;而 MDRV 则致感染细胞出现细胞圆缩、崩解坏死的细胞病变,无细胞巨融合现象^[3]。上述结果表明,NDRV 在致病特性方面明显不同于 ARV 和 MDRV,但临床表现形式与王光锋等^[5]报道的鹅出血性坏死性肝炎极为相似,同时 GRV 和 NDRV 在致病性和基因组特性方面是否存在差异,还值得进一步研究。

禽类呼肠孤病毒具有基因组多样性及致病性多样的特点,不同毒株在抗原结构、细胞培养特性以及致病性上存在差异,提示禽类呼肠孤病毒经过野外的长期进化和选择,已发生了较大的变异,对水禽的致病性逐渐加强,应引起兽医工作者的高度重视。

[参考文献]

[1] 陈少莺,陈仕龙,林锋强,等.一种新的鸭病(暂名鸭出血性坏死性肝炎)病原学研究初报[J].中国农学通报,2009,25(16):28-31.

- Chen S Y, Chen S L, Lin F Q, et al. The primary study of pathogen of duck hemorrhagic-necrotic hepatitis [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25 (16): 28-31. (in Chinese)
- [2] 肖履中.应用鸡胚成纤维细胞培养鸡痘病毒[J].青海畜牧兽医杂志,2000,30(2):15-17.
Xiao L Z. Culture of fowl pox virus in chick-embryo fibroblast [J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2000, 30(2): 15-17. (in Chinese)
- [3] 胡奇林,陈少莺,林锋强,等.番鸭呼肠孤病毒的鉴定[J].病毒学报,2004,20(3):242-248.
Hu Q L, Chen S Y, Lin F Q, et al. The identification of muscovy duck reovirus [J]. Chinese Journal of Virology, 2004, 20 (3): 242-248. (in Chinese)
- [4] 黄瑜,施少华,李文扬,等.雏番鸭呼肠孤病毒的致病性[J].中国兽医学报,2004,24(4):326-328.
Huang Y, Shi S H, Li W Y, et al. The pathogenicity of the reovirus isolated from semi-muscovy ducklings [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2004, 24(4): 326-328. (in Chinese)
- [5] 王光锋,王永坤,王建业,等.一株鹅源呼肠孤病毒的分离与鉴定[J].中国家禽,2003,25(15):8-10.
Wang G f, Wang Y K, Wang J Y, et al. Isolation and identification of one goose reovirus strain [J]. China Poultry, 2003, 25 (15): 8-10. (in Chinese)
- [6] Jones R C. Avian reovirus infections [J]. Revue Scientifique et Technique, 2000, 19(2): 614-625.
- [7] Spackman E, Pantin-Jackwood M, Day J M, et al. The pathogenesis of turkey origin reoviruses in turkeys and chickens [J]. Avian Pathol, 2005, 34(4): 291-296.
- [8] Van Der Heide L. The history of avian reovirus [J]. Avian Dis, 2000, 44(3): 638-641.
- [9] Van Loon A A, Koopman H C, Kosman W, et al. Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens [J]. The Veterinary Quarterly, 2001, 23 (3): 129-133.
- [10] 王永坤,周继宏,严维巍,等.鹅出血性坏死性肝炎的初步研究[J].中国家禽,2002,24(18):9-11.
Wang Y K, Zhou J H, Yan W W, et al. Primary studies on the gosling hemorrhagic necrotic hepatitis [J]. China Poultry, 2002, 24(18): 9-11. (in Chinese)