

1 株鸭坦布苏病毒的分离鉴定及产蛋鸭发病模型的建立

姚蓉¹ 康超¹ 邹忠¹ 徐巧霞¹ 孙小美² 孙小云¹ 金梅林^{1,2}

1. 武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070; 2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

摘要 本研究采集疑似感染鸭坦布苏病毒的蛋鸭卵巢病变组织, 经 RT-PCR 鉴定其结果为鸭坦布苏病毒阳性。将组织处理液接种到 SPF 鸡胚并盲传 3 代后成功分离到 1 株鸭坦布苏病毒, 连续传代 10 代后, 病毒含量达到 $10^{5.0}$ ELD₅₀/mL。为建立鸭坦布苏病毒病的发病模型, 将分离到的鸭坦布苏病毒腿部肌肉接种蛋鸭, 每日对鸭只采血并对分离的血清进行病毒分离, 摸索鸭坦布苏病毒病的病毒血症规律; 另外每日随机挑选 10 只感染鸭进行剖杀, 观察卵泡病变情况, 摸索卵泡病变规律。结果显示, 感染鸭只第 1~3 日血清中病毒分离率均为 100%, 第 4 日病毒血症阳性率开始下降, 第 6 日病毒血症消失; 感染鸭只卵泡第 3 日开始出现变形、破裂或出血等病理变化, 第 8~10 日病变率达到 100%。本研究建立了一种鸭坦布苏病毒感染产蛋鸭的发病模型并确定了发病评判标准, 为鸭坦布苏疫苗的免疫效果评价提供了基础。

关键词 鸭坦布苏病毒; RT-PCR; 病毒分离; 动物模型

鸭坦布苏病毒病是由鸭坦布苏病毒(*duck tembusu virus*, DTMUV)感染鸭引起的, 是 2010 年以来在我国主要蛋鸭养殖区陆续暴发的一种急性传染病, 以蛋鸭、种鸭产蛋骤然下降为主要临床特征, 以出血性卵巢炎为主要病变特征^[1]。商品肉鸭和育成期的种鸭可在 20 日龄前发病, 表现为神经症状, 腿脚麻痹、站立不稳, 病鸭大多数因饮水、采食困难衰竭死亡, 若发生细菌继发感染则死淘率会增加^[2]。鸭坦布苏病毒病的暴发流行给我国养鸭业造成了重大经济损失, 严重危害了我国养鸭业的健康发展^[3-5]。加强对 DTMUV 的分离鉴定及发病模型的建立, 不仅能对该病进行监测及防控, 也能为鸭坦布苏病毒疫苗的研制和疫苗的效力检验提供实验依据^[6-7]。

本研究室采集了湖北某鸭场蛋鸭的卵巢病变组织, 组织经研磨处理后, 经 RT-PCR 鉴定, 结果为鸭坦布苏病毒阳性。将组织处理液在 SPF 鸡胚上连续传代, 成功分离鉴定出 1 株 DTMUV, 命名为 DT-

MUV-DF2 株。通过将 DTMUV-DF2 株感染成年鸭建立动物感染模型, 结果病毒感染 1~3 d, 有感染鸭血清中病毒分离率均为 100%; 病毒感染后卵泡出现变形、破裂或出血等变化, 感染后 5~10 d 卵巢病变率较高, 8~10 d 病变率均为 100%。对以上统计数据进行分析, 最终确定了该病毒对产蛋鸭的发病模型。

1 材料与方法

1.1 鸡胚与试验动物

6 日龄 SPF 鸡胚和 8~10 日龄 SPF 鸡胚均购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

25~40 周龄鸭坦布苏病毒抗体阴性健康易感麻鸭均购自湖北隆兴湖蛋鸭养殖股份有限公司。

1.2 主要试剂

病毒基因组提取试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司; AMV 反转录酶、RNase Inhibitor 和 DNA Marker DL-2000 均购自宝生物工程(大连)有

收稿日期: 2021-04-01

基金项目: 国家重点研发计划项目“家禽重大疫病诊断新技术研究”(2016YFD0501600)

姚蓉, 女, 1986 年生, 硕士, 中级兽医师。

限公司; dNTP Mixture 购自罗氏公司; TransTaq -T DNA Polymerase 购自全式金生物; 青链霉素混合液 (100×) 购自吉诺生物医药技术有限公司; GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自上海生工生物技术有限公司。鸭坦布苏病毒的鉴定引物序列为 NS5-F: 5'-GGGGAGGTG-GTTTGTTAG-3'; NS5-R: 5'-GTTCTGGGGCTTTG-GTATC-3', 扩增片段大小为 498bp^[8-9]。

1.3 样品的采集和处理

无菌采集病死鸭病变卵巢, 剪碎匀浆后按 1:4 (v/v) 的比例加入灭菌磷酸盐缓冲液 (PBS), 反复冻融 3 次后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清加入青链霉素, 使终浓度均为 10 000 单位/mL, 4 °C 作用 2 h。用 0.22 μm 的滤器过滤除菌, 滤过液置 -70 °C 以下保存备用^[10]。

1.4 样品的 RT-PCR 鉴定

取经处理的病料滤过液 300 μL 至 1.5 mL EP 管中, 参照病毒基因组提取试剂盒提取病毒 RNA, 最后用 20 μL DEPC 水溶解。反转录按 AMV Reverse Transcriptase 说明书进行。PCR 反应体系 cDNA 2 μL, 10×Trans Buffer 2.5 μL, TransTaq DNA Polymerase 0.5 μL, 上、下游引物各 1 μL, 补 H₂O 至 25 μL。PCR 反应程序为 95 °C 变性 5 min 后进行 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s 的 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 保存于 4 °C。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 若扩增出 498 bp 片段大小则说明 RT-PCR 扩增结果为阳性^[10]。

1.5 病毒分离

将 RT-PCR 检测为阳性的病料悬液经尿囊腔接种 5 枚 8 日龄 SPF 鸡胚, 0.2 mL/胚, 每日观察, 弃去 24 h 内死亡胚, 24~96 h 死亡鸡胚随时收获, 96 h 后将未死亡鸡胚置 4 °C, 且于 12 h 后收集鸡胚尿囊液。对收获的鸡胚尿囊液进行 RT-PCR 扩增, 若为阳性则置 -70 °C 以下保存备用, 若为阴性则进行盲传, 盲传 7 代后仍为阴性者弃去。

1.6 病毒含量测定 (鸡胚半数致死量 ELD₅₀)

将病毒悬液用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释, 取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 4 个稀释度, 每个稀释度经卵黄囊接种 6 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚, 每胚 0.1 mL, 置湿度 60%~65%、温度 37 °C 继续孵育。逐日照胚并记录结果, 24 h 内死亡鸡胚不计, 统计 24 h 后死胚数量, 一般需要观察 5 d; 结果的计算按 Reed-Muench 法进行计算^[11]。

1.7 动物发病模型的研究

1) 病毒血症的研究。将 25~40 周龄成年蛋鸭随机分成 10 组, 10 只/组, 每只鸭经腿部肌肉接种鸭坦布苏病毒 (DF2 株) 鸡胚毒, 每只 0.5 mL (病毒含量为 10⁵ELD₅₀)。攻毒后第 1~10 日, 每日随机选取一组, 经翅静脉采血后分离血清, 每份血清卵黄囊接种 5 枚 6 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.1 mL。接种后置 37 °C 温箱继续孵化, 24 h 内死亡鸡胚弃去, 统计 24~120 h 鸡胚死亡情况, 5 枚鸡胚至少有 4 枚鸡胚死亡, 则判定这份血清病毒分离为阳性^[12-13]。

2) 卵泡病理变化。每日对采血后的鸭进行剖杀, 观察并记录卵泡是否有破裂、出血、变形或坏死等病理变化。统计每日卵泡病变比例, 摸索鸭坦布苏病毒引起的卵泡病变规律。结合病毒分离情况及卵巢病变情况, 分析卵巢的病变特征, 依据病毒分离及卵泡病变情况确定发病判定标准^[14]。

2 结果与分析

2.1 病毒分离及鉴定结果

对采集的样品进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 从 3 份样品中扩增出了特异性片段, 大小为 498 bp, 与预期结果相符 (图 1)。将 RT-PCR 检测为阳性的病料悬液经尿囊腔接种 5 枚 8 日龄 SPF 鸡胚, 对收获的鸡胚尿囊液进行 RT-PCR 扩增, 结果在盲传 3 代后 RT-PCR 扩增为阳性, 记为 F1 代。在鸡胚上连续传代至 F5 代, RT-PCR 扩增均为阳性 (图 2), 将获得的病毒液命名为 DF2 株 (登录号为 KJ489355.1)。

2.2 病毒在鸡胚上的传代与含量测定

将获得的 DF2 株病毒液在 SPF 鸡胚上连续传代, 一直到第 10 代, 结果每一代病毒液的 RT-PCR 均为阳性, 测定各代次病毒液的病毒含量 ELD₅₀, 结果 DF2 株病毒在传到第 5 代时病毒滴度上升到 10^{4.5}ELD₅₀/mL, 在第 10 代达到 10^{5.0}ELD₅₀/mL, 说明 DF2 株在鸡胚上的增殖能力较强 (表 1)。

2.3 动物发病模型结果

1) 病毒分离。鸭只经病毒感染后前 3 d 病毒分离阳性率均为 100%, 从第 4 天开始病毒分离阳性率开始下降, 自第 6 天开始, 血清病毒分离均转为阴性 (表 2)。

2) 卵泡病变情况。鸭只经病毒感染后, 每日对已采血的鸭只进行剖杀, 结果, 有 13 只鸭无大的卵泡,

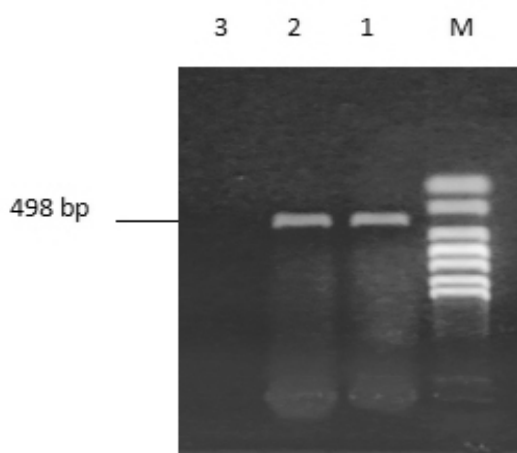


图1 病料 RT-PCR 扩增结果

M: DNA Marker DL-2000; 1, 2, 3: 组织样品

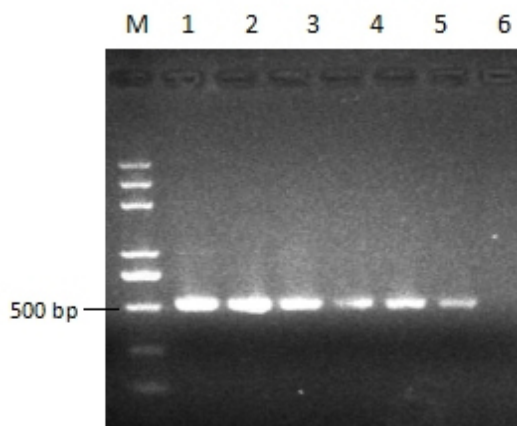


图2 分离株 RT-PCR 扩增结果

M: DNA Marker DL-2000;

1: F5代; 2: F4代; 3: F3代; 4: F2代; 5: F1代; 6: 阴性对照

表1 DF2分离株在 SPF 鸡胚上的增殖滴度(ELD₅₀/mL)

毒株	病毒代次								
	F1~F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
DF2株	-	10 ^{2.5}	10 ^{3.2}	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{4.8}	10 ^{4.7}	10 ^{4.8}	10 ^{5.0}

表2 感染鸭病毒分离情况

感染时间/d	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
病毒分离率	10/10	10/10	10/10	6/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

卵泡直径均 <1 cm,说明卵泡发育处于静止期,无法判断病毒感染对卵泡发育的影响,所以卵巢检查应剔除卵泡发育处于静止期的鸭^[14]。其余 87 只鸭卵泡处于生长期,病毒感染后第 2 日卵泡开始出现破裂、变形、出血或坏死,第 5~10 天卵泡病变率较高。对第 5~10 天的卵泡病变类型进行统计,结果 25.5% (14/55) 卵泡破裂、96.4% (53/55) 卵泡变形、38.2% (21/55) 卵泡坏死(图 3)。详细结果见表 3。

3) 发病判定标准的确定。由于产蛋母鸭卵巢发育存在个体差异(卵泡大小、卵泡数量),我们在制定发病判定标准时对这些情况进行了区分,以便于更客观的评价感染情况。①存在个别母鸭产蛋暂时处于静止期的生理状态,此时的卵泡直径均小于 1 cm,卵泡病变情况不易判断,所以我们在制定卵巢的病变情况时设定了卵泡直径大于 1 cm 的判定条件。②当母鸭产蛋旺盛时卵泡数量过多,在试验操作过程中会引起个别卵泡非特异性出血,为了更客观地判定攻毒鸭的发病情况,我们在制定发病判定标准时对此种情况规定为当卵泡数 >3 时,变

性和坏死卵泡数 ≥ 3 判为卵巢病变。③当母鸭卵泡数偏少时无相应的因挤压等引起的卵泡非特异性出血,我们在制定发病判定标准时对此种情况规定为当卵泡数 ≤ 3 时,变性和坏死卵泡数 ≥ 1 判为卵巢病变^[14]。

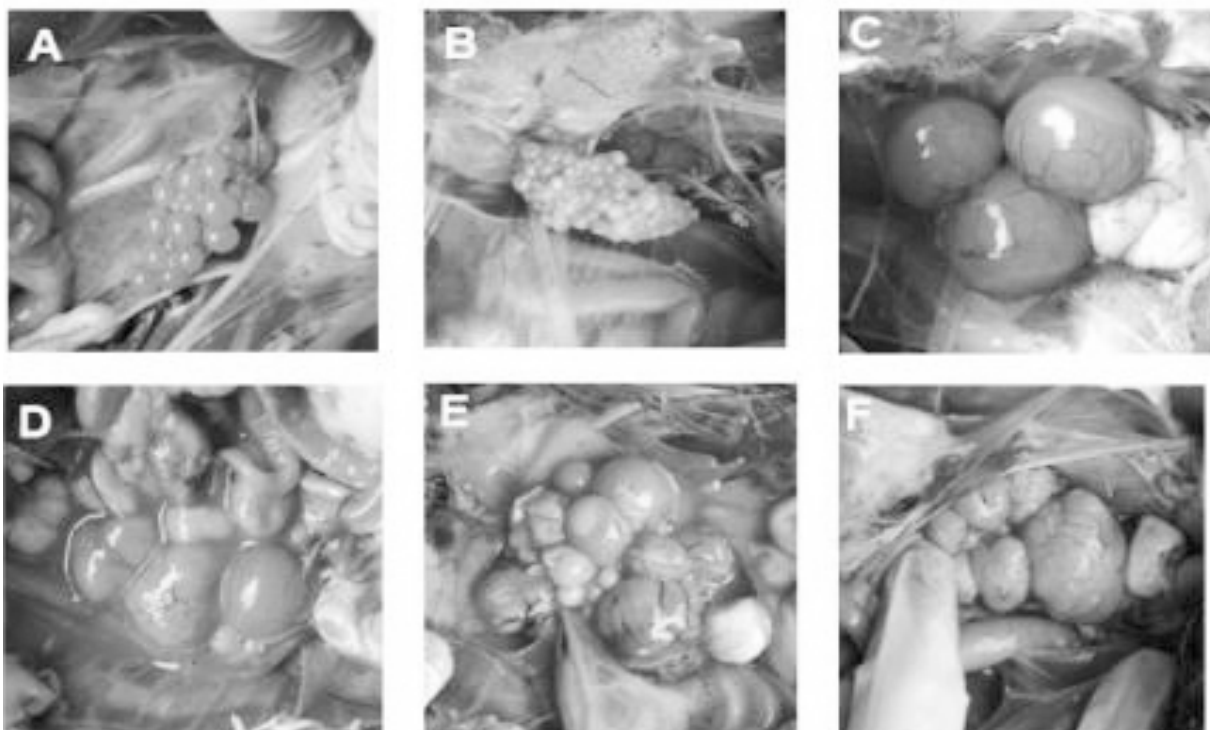
综合以上卵泡病变情况以及病毒血症规律,我们确定了鸭坦布苏病毒感染鸭的发病判定标准如下,攻毒后第 3 日采血分离血清,每份血清卵黄囊接种 5 枚 6 日龄 SPF 鸡胚,0.1 mL/枚,置 37 °C 培养箱培养,持续观察 5 d,24 h 内死亡鸡胚不计,如接种鸡胚中有 4 枚及以上死亡,则判为病毒分离阳性。病变卵巢的判定:卵泡数 >3 个时,变形、出血或坏死卵泡数 >2 个,卵泡数 ≤ 3 个时,有变形、出血或坏死卵泡。卵巢发育成熟期的鸭,病毒分离和卵巢病变均为阳性则判发病。

3 讨论

2010 年以来我国大部分种鸭和蛋鸭养殖地区相继发生了以减料、产蛋下降和伴有一定死淘率为

表 3 卵泡病变统计情况

感染时间/d	卵泡病变		
	破裂	变形、出血	坏死
1	0/9	0/9	0/9
2	0/8	2/8	1/8
3	0/10	6/10	1/10
4	1/7	6/7	2/7
5	2/9	8/9	3/9
6	1/9	9/9	2/9
7	2/9	8/9	4/9
8	3/9	9/9	5/9
9	1/8	8/8	4/8
10	2/9	9/9	3/9



A、B:发育静止期卵泡;C:正常卵泡;D:卵泡破裂、坏死;E:卵泡膜出血、坏死;F:卵泡变形、坏死

图 3 卵泡病变情况

特征的传染病,该病发病急,传播快,死淘率高^[15]。该病能引起蛋鸭产蛋率骤降、肉鸭发育迟缓甚至死亡,给我国养鸭业造成了巨大的经济损失。自该病暴发以来,迅速蔓延至我国大部分鸭养殖地区以及临近的东南亚地区。DTMUV 宿主范围广泛,除了感染鸭、鹅等水禽和鸡、麻雀等其他禽类外,也可以

感染哺乳动物,具有潜在的公共卫生安全风险^[16]。

在本研究中,本研究室从疑似感染鸭坦布苏病毒的病鸭组织中分离到 1 株鸭坦布苏病毒,在 SPF 鸡胚上增殖稳定后,对产蛋麻鸭进行了攻毒试验,摸索鸭坦布苏病毒病的发病情况。在此基础之上,我们建立了一种鸭坦布苏病毒病在产蛋鸭上的动

物模型,并确定了其发病判定标准,这不仅能在鸭坦布苏病毒病疫苗的研制过程中提供疫苗的效力检验评判标准,也为该病的临床诊断提供了依据,能有效监测和防控鸭坦布苏病毒病的流行和蔓延^[17]。

参 考 文 献

- [1] 颜丕熙.鸭坦布苏病毒分离鉴定及其生物学特性的研究[D].上海:上海兽医研究所研究生院,2012.
- [2] 李玉峰,马秀丽,于可响,等.一种从鸭新分离的黄病毒研究初报[J].畜牧兽医学报,2011,42(6):885-891.
- [3] 于春梅,刁有祥,唐熠,等.坦布苏病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立[J].中国农业科学,2012,45(21):4492-4500.
- [4] CHEN S L, WANG S, LI Z L, et al. Isolation and characterization of a Chinese strain of tembusu virus from Hy-Line Brown layers with acute egg-drop syndrome in Fujian, China [J]. Arch Virol, 2014, 159(5): 1099-1107.
- [5] CAO Z Z, ZHANG C, LIU Y H, et al. Tembusu virus in ducks, China [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10):1873-1875.
- [6] 李泽君.鸭坦布苏病毒病原的分离鉴定及生物学特性研究[J].中国家禽,2011,33(17):34-35.
- [7] 王小蕾,林健,杨志远,等.鸭坦布苏病毒病灭活疫苗血清学试验与免疫攻毒保护试验的相关性[J].中国农业科学,2019,52(23):4423-4428.
- [8] 李云霞,刘晓丽,张玥,等.鸭坦布苏病毒鸭胚成纤维细胞适应病毒编码基因序列测定及分析[J].中国预防兽医学报,2013,35(10):791-794.
- [9] FENG C L, JIN M L, YANG L X, et al. Pathogenicity of a Jinding duck-origin cluster 2.1 isolate of tembusu virus in 3-week-old Pekin ducklings [J]. Veterinary microbiology, 2020, 251:1-9.
- [10] 王宾宾,闫大为,倪欣涛,等.鸭坦布苏病毒分离鉴定及全基因组序列分析[J].中国动物传染病学报,2017,25(6):8-14.
- [11] 杨志远,段会娟,王小蕾,等.4株鸭坦布苏病毒的毒力、E基因序列和抗原差异性[J].中国农业科学杂志,2019,52(23):4406-4414.
- [12] 谢佳,韩春华,林健,等.鸭出血性卵巢炎病毒血症研究[J].中国农业科学,2014,47(23):4763-4768.
- [13] 林健,韩春华,陈华林,等.鸭出血性卵巢炎实验感染模型的建立[J].中国农业科学,2011,44(10):2161-2167.
- [14] 林健,杨志远,何平有,等.鸭坦布苏病毒病卵巢病变标准的判定[J].中国农业科学,2016,49(14):2830-2836.
- [15] 刘月焕.加快推进我国水禽疫病防控技术的研究[J].中国农业科学,2019,52(23):4386-4389.
- [16] 黄允真,孙敏华,廖明.鸭坦布苏病毒病的研究进展[J].广东农业科学,2020,47(11):182-190.
- [17] 张德宝,李雪松,郁宏伟,等.鸭坦布苏病毒间接 ELISA 抗体检测试剂盒的初步应用[J].中国家禽,2017,39(19):22-26.

【责任编辑:胡 敏】