352-359 6865(11)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第11卷第4期 中国病毒学 Vol.11 No.4
1996年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1996

禽呼肠孤病毒变异株的分离鉴定

赵振芬* 徐为燕 杜念兴 薛恒平

(南京农业大学动物医学院,南京 210095)

S852.65

提 要 从病鸡肝分离到一株病毒,经电镜检查、理化特性分析、核酸电泳和中和试验等证明它为禽呼肠孤病毒(ARV)。该病毒只在鸡胚肝细胞(CELi)上产生细胞病变(CPE),在鸡胚成纤维细胞(CEF)和Vero细胞上不增殖,它对热敏感,Mg^{2+}不能增强其对热的稳定性,其基因组中的4个小节段的迁移率与ARV FDO和S_{1133}株明显不同,表明它是不同于FDO和S_{1133}的ARV变异株。

关键词 禽呼肠孤病毒,ARV变异株,分离鉴定

自Fahey等(1954)首次从慢性呼吸道病鸡分离出禽呼肠孤病毒以来,在关节炎和腱鞘炎、肠炎、心肝病损等病鸡和外表健康鸡中相继分离到多株ARV[1]。近年来我国也分离到多株ARV,证明了该病毒引起的疾病在我国广泛存在[2]。本研究从坏死性肝炎病鸡肝脏中分离到一株病毒,经鉴定证明它是不同于ARV FDO和S_{1133}株的低致病力的禽呼肠孤病毒。

材料与方法

1 材料

1.1 CG-Cn 为病料CG_7鸡胚肝细胞培养分离株代号,Cn为细胞培养代数。

1.2 ARV FDO株 由本校传染病室提供,N.A.Menendez等(1975)从外表健康鸡法氏囊中分离[1]。

1.3 ARV S_{1133}株 来自中国兽药监察所。L.Vander,Heide等(1975)从患关节炎病鸡关节中分离[1]。

1.4 禽腺病毒(AAV)和鸡新城疫病毒(NDV) 分别由本校传染病室和南京药械厂提供。

1.5 鸡抗FDO阳性血清 由本校传染病室提供。

1.6 SPF鸡胚和非免疫鸡胚 由南京药械厂和本校生制厂提供。

1.7 细胞营养液 水解乳蛋白(LH)为英国OXOID公司产品。

1.8 磷酸盐蛋白胨肉汤 牛肉浸膏2 g,蛋白胨5 g,0.01 mol/L PBS 500 mL混合加热溶解,pH7.4~7.6,0.7×10^5 Pa蒸气灭菌15 min。

2 方法

2.1 病毒的分离 按殷震法[3]。将病鸡肝CG_7 1:10匀浆后分别接种CELi、CEF和8日龄SPF鸡胚(卵黄囊途径),设置细胞和鸡胚对照,37℃培养5 d并平行盲传。

2.2 病毒的血凝性 按殷震法[3]。

2.3 电镜观察 按殷震法[3]。

2.4 $TCID_{50}$测定 按殷震法[3]。

2.5 病毒理化特性测定 均在有CELi单层的96孔板上进行。预先将对照病毒(AAV,NDV和ARV FDO)

本文于1995年12月25日收到,1996年4月17日修回。

* 现在工作单位:郑州牧业工程高等专科学校基础部,邮编450045。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在CELi传两代并滴定出$TCID_{50}$。为测定方便,试验用各病毒根据其$TCID_{50}$设置5个稀释度。

2.5.1　核酸型鉴定　按Cottral法[4]。用含100 μg/mL的5-碘脱氧尿核苷(IUDR)的维持液10倍递进稀释的各病毒为处理组,用不含IUDR的维持液稀释的各病毒为对照组,处理组的$TCID_{50}$比对照组低2个对数以上者为DNA病毒,不到1个对数者为RNA病毒。

2.5.2　乙醚敏感试验　按殷震法[3]。乙醚处理组的$TCID_{50}$与对照组的差值大于2个对数以上的为乙醚敏感病毒(有囊膜)。

2.5.3　pH稳定性试验　按殷震法[3]。处理组的$TCID_{50}$比对照组降低2个滴度以上者为酸或碱敏感病毒。

2.5.4　热敏感和二价阳离子保护试验　按殷震法[3],结果判定同2.5.3。

2.5.5　胰蛋白酶敏感试验　按殷震法[3]。

2.6　病毒核酸电泳　按Squire法[5]。

2.7　动物回归试验　中和抗体呈阴性的20只12日龄雏鸡随机分两组、试验组每只鸡腹腔并口服共3 ml病毒原液,对照组同法接种灭菌盐水。每天观察并定时测体温;接种后第7、14、21和30天每组均采血并剖杀2只鸡,观察组织器官变化;将各组次鸡肝回归CELi并盲传4代[6,7],观察CPE;将各组次采集的血清与病毒做中和试验,检查有无抗体。

2.8　中和试验　按Giambrone法[8]。

结　果

1　病毒的分离和培养特性

病料经CELi盲传至第3代即出现以细胞收缩、变圆和脱落为特征的CPE,连续传代细胞病变规律,CELi单层常在接毒后24 h内变性脱落;病料经CEF盲传7代不产生CPE,经鸡胚盲传7代不致死鸡胚,胚体发育正常,胚肝无明显变化。肝细胞适应毒(CG－Cn)在Vero和CEF细胞上连续培养3 d,盲传4代均不产生CPE。

2　病毒的血凝性

CG－Cn在37 ℃,室温和4 ℃均不凝集鸡、人(O型)、豚鼠和兔的红细胞。

3　电镜观察

3.1　将出现75%病变的CELi单层制成超薄切片,电镜下可见肝细胞的胞浆内有大量散在和呈晶格状排列的球形无囊膜病毒颗粒,有双层结构,外层直径约为70 nm,内有40 nm的核心(图1,图2)。

3.2　CG－Cn细胞培养物经差速离心浓缩提取病毒,负染后在电镜下见病毒呈球形,无囊膜,有双层衣壳,外衣壳直径约70 nm,核心直径约40 nm,脱去外衣壳的不完全病毒呈六角形或圆形(图3)。

4　**$TCID_{50}$的测定**　在CELi单层上滴定CG－Cn的$TCID_{50}$,至第4天达滴定终点。三次重复测定结果基本一致,其平均值为$10^{-4.375}$/0.05 mL。

5　病毒理化特性测定

5.1　核酸型鉴定　三次重复测定的结果一致,见表1,CG－Cn在CELi上的IUDR抑制滴度小于1个对数。已知的DNA病毒AAV抑制滴度大于2个对数,已知的RNA病毒NDV和ARV FDO株抑制滴度小于1个对数,表明实验结果可靠,判定CG－Cn为RNA病毒。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图1 细胞浆内有大量散在的病毒颗粒（30000×）

Fig 1 Many diffuse virus particles in the liver cytoplasm (30000×)

图2 病毒粒子在细胞浆呈晶格状排列（30000×）

Fig 2 The virus particles in order of crystals in the liver cytoplasm (30000×)

维普资讯 http://www.cqvip.com

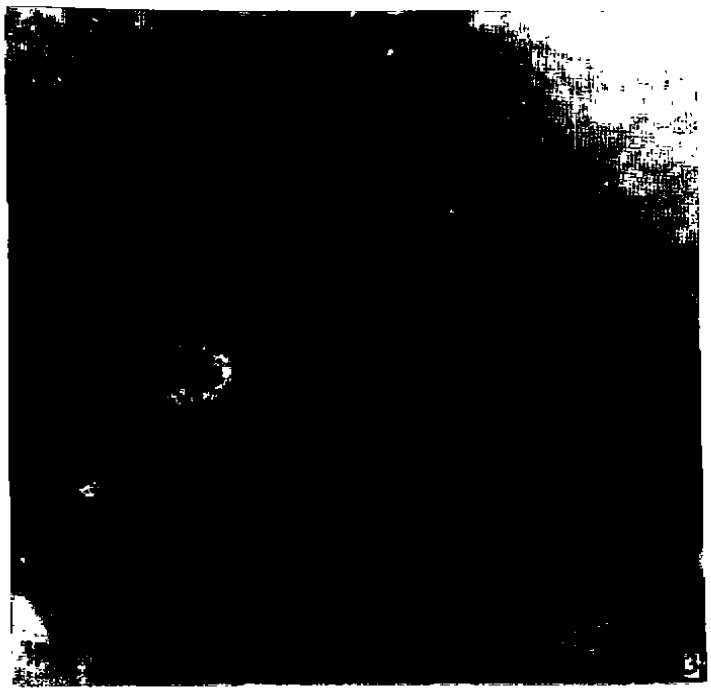

图3　提纯的病毒粒子(190000×)

Fig 3　The virus particles of extraction (190000×)

表1　CG－Cn核酸型的鉴定

Tab. 1　Identification of the nucleic acid type of CG－Cn

病毒稀释 Titre of virus dilution	CG－Cn		AAV		NDV		FDO	
	处理组 Treatment	对照组 Control	处理组 Treatment	对照组 Control	处理组 Treatment	对照组 Control	处理组 Treatment	对照组 Control
10^{-2}	8/8[a]	8/8	–	–	8/8	8/8	–	–
10^{-3}	8/8	8/8	5/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
10^{-4}	6/8	7/8	1/8	8/8	5/8	6/8	8/8	8/8
10^{-5}	1/8	1/8	0/8	8/8	2/8	2/8	8/8	8/8
10^{-6}	0/8	0/8	0/8	6/8	0/8	0/8	8/8	4/8
10^{-7}	–	–	0/8	1/8	–	–	3/8	4/8
$TCID_{50}^{b}$	4.375	4.5	3.25	6.375	4.375	4.5	6.875	7.0
抑制滴度[c] Titre of inhibition	0.125		3.125		0.125		0.125	
核酸型判定 Type of nucleic acid	RNA病毒 RNA Virus		DNA病毒 DNA Virus		RNA病毒 RNA Virus		RNA病毒 RNA Virus	

a　CPE孔数/接种细胞孔数　a means numbers of CPE well/numbers of inoculated well

b　用负对数表示　b means negative logarithm

c　处理组$TCID_{50}$与对照组差值　c means the $TCID_{50}$ different treatment group from control group

—　表示未测定　— means none done

维普资讯 http://www.cqvip.com

5.2 乙醚敏感试验 三次重复测定结果一致，见表2，CG－Cn经乙醚处理后$TCID_{50}$基本不变。囊膜病毒NDV经乙醚处理后完全丧失感染力，无囊膜病毒AAV和ARV FDO对乙醚不敏感，说明实验结果可靠，判定CG－Cn为无囊膜病毒。

5.3 pH稳定性试验 CG－Cn在pH3、5、9、11的$TCID_{50}$均无明显变化，说明CG－Cn对酸和碱的抵抗力很强。

表2 乙醚敏感性的测定

Tab.2 Sensitivity of CG－Cn to ether

病毒稀释 Titre of virus dilution	CG－Cn		AAV		NDV		FDO	
	处理组 Treatment	对照组 Control	处理组 Treatment	对照组 Control	处理组 Treatment	对照组 Control	处理组 Treatment	对照组 Control
10^{-2}	4/4	4/4	－	－	0/4	4/4	－	－
10^{-3}	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	4/4	4/4	4/4
10^{-4}	2/4	3/4	4/4	4/4	0/4	3/4	4/4	4/4
10^{-5}	1/4	1/4	3/4	4/4	0/4	1/4	4/4	4/4
10^{-6}	0/4	0/4	2/4	3/4	0/4	0/4	2/4	3/4
10^{-7}	－	－	1/4	1/4	－	－	1/4	2/4
$TCID_{50}^{a}$	4.25	4.5	6.0	6.5	0	4.5	6.25	6.75
差值[b] Difference of $TCID_{50}$	0.25		0.5		4.5		0.5	
结果判定 Result	抵抗 Resistance		抵抗 Resistance		敏感 Sensetivity		抵抗 Resistance	

a 以负对数表示 a means negative logarithm

b 处理组$TCID_{50}$与对照组的差值 b means the $TCID_{50}$ difference treatment group from control group

— 表示未测定 — means none done

5.4 热敏感和二价阳离子保护试验 三次重复测定结果一致，见表3。CG－Cn经50℃ 1 h失活，在1 mol/L $MgCl_2$中50℃ 1 h滴度下降为0，说明Mg^{2+}对CG－Cn无保护作用；FDO在50℃ 1 h稳定，Mg^{2+}可显著提高其对热的稳定性，而Na^+却无此作用。

表3 热敏感性和Mg^{2+}保护性的测定

Tab.3 Heat－stability of CG－Cn in or not in Mg^{2+} solution

病毒稀释 Titre of virus dilution	CG－Cn				FDO			
	50℃ 1 h	50℃ 1 h 1 mol/L $MgCl_2$	50℃ 1 h Saline	对照 Control	50℃ 1 h	50℃ 1 h 1 mol/L $MgCl_2$	50℃ 1 h Saline	对照 Control
10^{-2}	0/4	0/4	0/4	4/4	－	－	－	－
10^{-3}	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
10^{-4}	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	4/4	3/4	4/4
10^{-5}	0/4	0/4	0/4	1/4	4/4	4/4	1/4	4/4
10^{-6}	0/4	0/4	0/4	0/4	3/4	4/4	0/4	3/4
10^{-7}	－	－	－	－	0/4	4/4	0/4	2/4
$TCID_{50}^{a}$	0	0	0	4.5	6.25	>7.5	4.5	6.75
结果判定 Result	灭活 Inactivity	不保护 No effect	不保护 No effect	—	稳定 Stability	保护 Protection	不保护 No effect	－

a 以负对数表示 a means negative logarithm

维普资讯 http://www.cqvip.com

5.5 **胰蛋白酶敏感试验**　CG－Cn和FDO经胰酶处理后$TCID_{50}$均显著提高,说明CG－Cn对胰酶有抵抗力。

6 **病毒核酸电泳**

结果见图4。CG－Cn的基因组共分10个节段,与ARV FDO、S_{1133}谱带基本相似。CG－Cn的大节段(L_1、L_2、L_3)与参考株完全一致,中节段的M_1有较小差异,而小节段(S_1、S_2、S_3、S_4)的迁移率与参考株有明显不同。

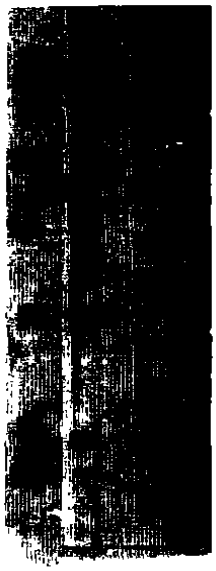

图4　CG－Cn与其它两株ARV基因图谱的比较

Fig.4　Comparison of CG－Cn genomic pattern with the other two ARV strains

a. FDO strain　b. CG－Cn strain　c. S_{1133} strain

7 **动物回归试验**　试验组和对照组鸡均无明显的临床症状和病理变化;各组次鸡肝回归CELi并盲传4代均无CPE出现;仅在接种后第30天的试验组鸡的血清中查到1:8的中和价,而对照组鸡无抗体检出。

8 **中和试验**　用各血清与CG－Cn在CELi单层上进行中和试验,设置的各对照均成立,至第4天达滴定终点。三次重复测定的结果基本一致。鸡抗FDO血清对CG－Cn的中和价为1:50,而该血清对FDO的同源中和价为1:70,说明CG－Cn与禽呼肠孤病毒有抗原相关性。

讨　论

1　从病鸡肝分离到一株病毒,其基因组为RNA,由10个节段组成;病毒呈球形,无囊膜,有双层衣壳,外衣壳直径约为70 nm,核心直径约为40 nm;该病毒无血凝性,pH3－11稳定,抗胰酶,能被禽呼肠孤病毒抗血清中和。由此判定该分离株为禽呼肠孤病毒[1,3]。

2　许多学者认为用CELi分离ARV最敏感,鸡肾细胞次之,CEF最差[9,10],本试验也证实了这一点。用鼠胶原铺层法[3]制备肝细胞单层繁琐且效果不佳,笔者在生长液中加入10%磷酸盐蛋白胨肉汤[1]则细胞生长良好。肝细胞继代不易形成单层,故试验时均采用原代鸡胚肝细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞。为避免可能来自试验用鸡胚内源性病毒的污染，病毒分离时均使用 SPF 鸡胚并将对照组平行盲传，因此可以肯定 CG－Cn 来自病鸡肝 CG_7。

3 CG－Cn 在 CELi 上的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-4.375}$/0.05 mL，而 FDO 在 CELi 上的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-7.0}$/0.05 mL；CG－Cn 不在 CEF 上增殖，而 FDO、S_{1133} 等分离株均适应于 CEF；CG－Cn、FDO、S_{1133} 等在 Vero 细胞上不增殖，这与 WUV_{2937}（Barta, 1984）分离株明显不同[1,11,12]。CG－Cn 对热敏感，50 ℃ 1 h 即完全失活（这与 Spandidos 等报道的 S_{1133} 株[1]一致），Mg^{2+} 对 CG－Cn 无保护作用；FDO 在 50℃ 1 h 稳定，Mg^{2+} 可显著提高其感染滴度。Gouvea 等（1982）发现不同的 ARV 分离株的 dsRNA 在 SDS-PAGE 中的迁移率有明显多形性，而在一次爆发疾病中的分离株迁移型式是一样的[13]。CG－Cn 基因组由 10 个节段组成，其中大节段 3 个，中节段 3 个，小节段 4 个，与 FDO、S_{1133} 的核酸基本相似，但 CG－Cn 的 4 个小节段的迁移率与 FDO、S_{1133} 有显著不同；本校传染病室分离的另三株 ARV（分别来自健康鹌鹑肠道、关节炎病鸡和外观正常鸡胚[11,12]）与 FDO、S_{1133} 的谱带位置完全一致。这些都表明 CG－Cn 是不同于 FDO、S_{1133} 等其它分离株的 ARV 变异株。

4 CG－Cn 回归鸡无明显的症状和病变出现，从接种鸡的肝中未分离到病毒，对照鸡无抗体产生，而试验组鸡的群体中和抗体动态检测结果表明，接种鸡第 30 天才有低滴度的抗体（1:8）产生，这说明 CG－Cn 可能在肝外的其他组织有过少量复制，因此认为 CG－Cn 单独感染致病力很弱。ARV 不仅引起关节炎等多种疾病，而且从健康禽体内也能分离到[1,14]。ARV 常和其它病毒、细菌和寄生虫混合感染，但其致病力却强弱不一，许多 ARV 毒株单独感染没有成功，所以 ARV 的病原学地位比较复杂，有时很难确定[1,14,15]。本试验中从同来源的另一病料并未分离出病毒，CG－Cn 的致病力很低，很可能为病鸡 CG_7 偶然所带，其生态分布还需进一步研究。

参 考 文 献

1 Robertson M D, Wilcox G E. Avian reovirus. Veterinary Bulletin, 1986, 56(1): 155～174

2 金扩世. 鸡呼肠孤病毒性关节炎研究进展. 中国兽医科技, 1989, 7: 42～43

3 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学. 第1版, 北京: 科学出版社, 1985. 275－285, 433－463

4 Cottral G E(Editor). Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology. Ithaca, New York, USA: Cornell University Press, 1978, 102－108

5 Squire K R E, Chuang R Y, Doi T H. A survey of electronpherotyped relationships of bluetongue virus isolates from the western United States. J Clin Microbiol, 1982, 16(2): 473－476

6 Kibenge F S B, Grwaze G E, Jones R C *et al*. Experimental reovirus infection in chickens: Observation on early viraemia and virus distribution in bone marrow, liver and enteric tissues. Avian Pathology, 1985, 14(1): 87－98

7 Gouvea V, Schnitzer T J Pathogenicity of avian reovirus examization of six isolates and a vaccine strain. Infection and Immunity, 1982, 38(2): 731－738

8 Giambrone J J. Microculture neutralization test for serodiagnosis of three avian viral infectious. Avian Disease, 1980, 24(1): 284－287

9 Guneratne J R M, Jones R C, Georgiou K *et al*. Some observation on the isolation and cultivation of avian reovirus. Avian Pathology, 1982, 11(3): 453－462

10 Nwajei B N C, Afaleq A Al, Jones R C. Comparison of chicken embryo liver and Vero cell cultures for the isolation and growth

维普资讯 http://www.cqvip.com

of avian reovirus. Avian Pathology, 1988, 17(6):759－766

11 张存.鸡传染性法氏囊病病毒和禽呼肠孤病毒核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳.[硕士学位论文].南京:南京农业大学,1990.

12 陈士友,陈鸿言,蔡宝祥.一株分离自外观正常鸡胚的禽呼肠孤病毒的鉴定.畜牧兽医学报,1993,24(3):243－247

13 Gouvea V, Schnitzer T J. Polymorphism of genomic RNAs among the avian reovirus. J General Virology, 1982, 61(1):87－91

14 Hieronymus D R K, Villegas P, Kleven S H. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malaborption syndrome. Avian Disease, 1983, 27(2):246－254

15 Engström B E, Fossum 0, Luthman M. Blue wring disease of chickens: Isolation of avian reovirus and chicken anaemia agent. Avian Pathology, 1988, 17(1):23－32

Isolation and Identification of an Avian Reovirus Variant Strain

Zhao Zhenfen　Xu Weiyan　Du Nianxing　Xue Hengping

(*College of Animal Medical, Nanjing Agriculture University, Nanjing* 210095)

A virus strain was isolated from the liver of a sick chicken and identified to be an avian reovirus (ARV) by observation of electron－microscopy, analysis of physical－chemical characteristics, SDS－PAGE of nucleic acid and neutralization test. The virus strain produced evident cytopathic effect (CPE) only on chicken embryo liver cell(CELi) but not on CEF and Vero cell, and was inactive at 50 ℃ for 1 hour, even in Mg^{2+} solution. Additionally, the migration rate of four small segments of it's genome was slightly different from ARV FDO and S_{1133} strain. The experiment suggested that the virus is a variant strain of ARV.

Key words Avian reovirus, Variant strain, Isolation, Identification