

# 鸡产蛋下降综合征病毒 NE<sub>4</sub> 毒株对 KM 小鼠 感染特性观察

马震原<sup>1,2</sup> 李刚<sup>1</sup> 郭宇飞<sup>2,3</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,农业部兽用药物与兽医生物技术北京科学观测实验站,北京 100193; 2. 四川农业大学动物医学院,雅安 625014; 3. 金陵科技学院动物科学院,南京 210038)

**【摘要】** 目的 初步探究鸡产蛋下降综合征病毒 NE<sub>4</sub> (EDSV NE<sub>4</sub>) 毒株对昆明小鼠的感染特性。方法 用 10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub> 攻毒量的 EDSV NE<sub>4</sub> 株对 4~6 周龄的 KM 小鼠进行攻毒试验,同时以正常尿囊液接种作为阴性对照。用荧光定量 PCR 对小鼠组织及粪便中的 EDSV 进行检测,同时用 HE 染色及免疫组化法对小鼠组织切片进行病理组织学观察和抗原定位。结果 EDSV 攻毒对小鼠的采食情况产生一定影响,但并未引起明显的临床症状;攻毒组小鼠可产生针对 EDSV 特异性的抗体,HI 抗体滴度可高达 2<sup>12</sup>,阴性对照组小鼠体内抗体检测为阴性;攻毒后小鼠大部分组织器官如肝脏、子宫、肾脏、肺脏等与攻毒 7 d 后粪便中均可检测到 EDSV,阴性对照小鼠所有受检组织中均未检测到病毒;EDSV 攻毒未能引起小鼠组织的病理学变化,攻毒后不同时间内,可在子宫、肺脏、肝脏、肾脏中可检测到阳性信号,最为典型的定殖位置是子宫腺体上皮细胞及肌层细胞的胞质中。结论 EDSV NE<sub>4</sub> 株可以感染 KM 小鼠。

**【关键词】** 鸡产蛋下降综合征病毒; NE<sub>4</sub> 株; 小鼠; 感染特性

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2012)06-0043-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2012.06.009

## Characterization of Kunming mice infected with egg drop syndrome virus (EDSV) strain NE<sub>4</sub>

MA Zhen-yuan<sup>1,2</sup>, LI Gang<sup>1</sup>, GUO Yu-fei<sup>2,3</sup>

(1. Beijing Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038)

**【Abstract】 Objective** To study the characteristics of mice infected with egg drop syndrome virus (EDSV) strain NE<sub>4</sub>. **Methods** Kunming (KM) mice in age of 4-6 weeks were artificially infected with 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> dose of EDSV strain NE<sub>4</sub>, and the negative control mice were inoculated with normal allantoic liquid at the same time. FQ-PCR assay was used to detect the quantity of virus in different tissues. HE and immunohistochemical staining were used to observe the pathological changes and antigen localization. **Results** The virus inoculation affected somehow the ingestion of mice, but did not cause obvious clinical symptoms. The virus-infected mice produced specific antibody, reaching up to a titer of 2<sup>12</sup>. The EDSV titer in the control mice was negative. EDSV was detected in the tissues of most organs such as liver, uterus, kidney, lungs of the mice by FQ-PCR assay, and at 7 days post infection, the mice began to release virus. Immunohistochemistry showed that EDSV was propagated in organs such as liver, uterus, kidney, and lungs of the mice, most notably, in the cytoplasm of uterine glandular epithelial cells and myocytes. No obvious pathological changes were found in tissues of infected mice. **Conclusion** EDSV strain NE<sub>4</sub> virus can infect KM mice.

**【基金项目】** 国家自然科学基金 (No. 31172342), 国家公益行业项目 (No. 200903037-2), 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2008AA10Z411), FAO/IAEA 项目 (14515)。

**【作者简介】** 马震原 (1986-), 女, 河南郑州人, 硕士生, 主要从事禽病方面的研究, E-mail: mazhenyuan.1986@163.com

**【通信作者】** 李刚, 教授, 博士生导师, E-mail: gli358@gmail.com

【Key words】 Egg drop syndrome virus (EDSV); Strain NE4; Kunming mice; Characteristics; infection

鸡产蛋下降综合征病毒(egg drop syndrome virus, EDSV)最早由荷兰学者 Van Eck<sup>[1]</sup>报道,李刚等<sup>[2]</sup>在中国南京利用鸭胚及鸭胚成纤维细胞从疑似病鸡的生殖器官、肛拭子及粪便中分离到 EDSV,从而证实了此病毒在中国大陆的存在。该病在我国的流行范围十分广泛,以产蛋量的突然下降,不能达到产蛋高峰,无特异性临床症状,但能产如薄壳、软壳或无壳等异常蛋为特征<sup>[3]</sup>,可引起养禽业的巨大损失。

腺病毒主要分为两个属:禽腺病毒属与哺乳动物腺病毒属。鸡胚致死孤儿病毒(chicken embryo lethal orphan virus, CELOV)与人腺病毒(human adenovirus, HAD) 1 型为其各自的代表种。EDSV 属于腺病毒科禽腺病毒属 III 群。该群病毒在血清学上与禽腺病毒 I 群和 II 群无关,只有一个血清型<sup>[4-5]</sup>。Zhu 等<sup>[6]</sup>报道 EDSV 的 50k 蛋白与人 2、12、40 型腺病毒,绵羊腺病毒,禽腺病毒 I 群有 25.5%~32.4% 的同源性,而与牛腺病毒同源性可高达 46.4%。Rohn 等<sup>[7]</sup>发现 EDSV 的五邻体蛋白与人腺病毒 2 型(HAD2)和禽腺病毒(fowl adenovirus, FAV) 1 型的同源性分别是 57.3% 和 55.3%。Hess 等<sup>[8]</sup>发现 EDSV 与羊腺病毒(ovine adenovirus, OAV) 具有高度的基因同源性,推测 EDSV 可能是介于哺乳动物腺病毒和禽腺病毒之间的一种病毒。本实验对 NE<sub>4</sub> 毒株在实验攻毒小鼠组织中的分布情况、定殖情况等方面进行研究,初步探索 EDSV NE<sub>4</sub> 株对哺乳动物的感染特性,为其生物学特性的深入研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒毒株、实验动物

EDSV NE<sub>4</sub> 株由本实验室李刚教授分离并保存; SPF 级 4~6 周龄 KM 雌性小鼠、SPF 级 3 月龄新西兰公兔购自北京芳元缘养殖场【SCXK(京) 2009-0017】【SCXK(京) 2009-0014】。无菌手术在北京畜牧兽医研究所动物实验设施进行【SYXK(京) 2008-2008】。

### 1.2 主要试剂

HRP-山羊抗兔 IgG 二抗、免疫组化专用笔、多聚赖氨酸防脱磨砂玻片均购自北京中杉金桥生物有限公司;增强型 HRP-DAB 显色试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;动物 DNAout 组织提取试剂盒购自北京天恩泽生物技术有限公司;荧光定量 PCR 2 × Ex premix Taq 试剂盒、DNA marker 均购于

大连宝生物工程有限公司(TaKaRa);二甲苯、苏木素染色液、伊红染色液购自北京隆哲伟业生物技术有限公司。

### 1.3 实验动物准备

30 只 SPF 级 4~6 周龄的 KM 小鼠,雌性,适应环境一周后开始攻毒。

### 1.4 病毒准备

取新鲜的 EDSV NE<sub>4</sub> 株病毒尿囊液,用 0.8% 的红细胞测定尿囊液的血凝效价,病毒 HA 效价  $\geq 2^{14}$  为合格尿囊液。

### 1.5 小鼠攻毒实验

攻毒组小鼠腹腔注射、肌肉注射、背部皮下多点注射各 100  $\mu$ L 灭菌 PBS 稀释的  $10^6$  TCID<sub>50</sub> 病毒尿囊液。阴性对照小鼠用同样的方法和剂量接种灭菌 PBS 稀释的正常鸭胚尿囊液。定期观察记录临床表现,记录采食情况,分别于攻毒后 0.5、1.5、4、7、10、14、21、28、35、63 d 随机捕捉攻毒组小鼠 2 只,阴性对照组 1 只,收集粪便,安乐死。

### 1.6 血凝抑制试验检测小鼠 EDSV 抗体水平

根据实验分组定期捕捉小鼠,采集血液置于 4℃ 过夜,次日分离血清,用于 HI 监测小鼠抗 EDSV 抗体水平。

### 1.7 荧光定量 PCR 方法检测 EDSV 在小鼠体内的分布情况

#### 1.7.1 剖检取材

取攻毒组小鼠和对照组小鼠的脑、肾、肺、肝、脾、心脏、肠、输卵管子宫、气管、食管、粪便,将各器官取一小部分立即固定于 10% 中性福尔马林中,其余器官放于 EP 管中,冻于 -80℃ 保存备用。

#### 1.7.2 核酸的提取

将各器官解冻,剪碎匀浆,分别取 0.2 g,用动物组织 DNAout 试剂盒提取。

#### 1.7.3 样品的检测

以从不同器官提取的等量总 DNA 为模板,用荧光实时定量 PCR 方法检测 EDSV 在小鼠体内的分布情况。本实验室建立的 TaqMan 荧光实时定量 PCR 检测鸡产蛋下降综合征病毒方法的探针及配套引物由上海基康生物技术有限公司设计并合成, Taq-EHF: 5'-GACCGGTCACAAAACTTCATCT-3'; Taq-HER: 5'-CACAATCCTGTTATCACCCACATTT-3'; TaqMan probe: 5-FAM-CGCATCGTCCCGATC-

CAAACAGA-BHQ 3'。反应条件为预变性 95℃ 30 s, 然后 95℃ 5 s 60℃ 30 s, 共 40 个循环。

1.8 免疫组化法对小鼠组织中 EDSV 的定位研究

取固定的攻毒组及对照组小鼠组织制作石蜡组织切片, 经过梯度脱水、抗原修复、血清封闭等步骤后, 以本实验室制备的纯化兔抗 EDSV 多抗为一抗、HRP-山羊抗兔 IgG 为二抗进行免疫组化检测, 增强型 DAB 显色, 显微镜下观察控制显色时间, 苏木素复染后中性树脂封片。

1.9 病理学切片观察

将固定组织进行二次固定后, 经梯度脱水, 二甲苯透明, 脱蜡、包埋、切片后进行 HE 染色, 显微镜下观察。

2 结果

2.1 小鼠攻毒后的临床症状观察结果

对小鼠进行攻毒试验后, 观察小鼠的临床症状, 小鼠精神活动正常, 无明显临床症状, 对攻毒组与对照组小鼠的采食情况进行记录, 监测小鼠的采食量变化情况, 结果(如图 1) 攻毒组的采食情况呈现总体下降趋势, 对照组则呈现上升趋势, 两者差异有显著性。

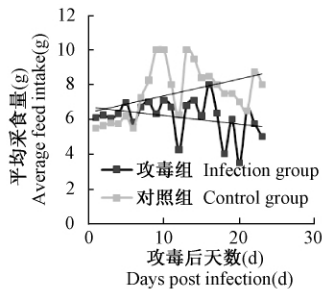


图 1 攻毒后小鼠采食变化的监测结果  
Fig. 1 Changes of ingestion in the mice post infection

2.2 小鼠血清 EDSV 抗体水平监测结果

用血凝抑制试验对小鼠血清中 EDSV 抗体进行检测, 小鼠从攻毒后 4 d 血清中出现抗 EDSV 的 HI 抗体滴度, 于 14 d 达到最高值 2<sup>12</sup>, 一直维持至 35 d 开始下降, 监测结束于攻毒后 63 d, 此时血清中仍有 2<sup>9</sup> 的 HI 抗体滴度, 阴性小鼠体内未检测到 EDSV 抗体, 说明 EDSV 可以使小鼠产生抗体, 并且在非高免的情况下, 小鼠体内的 EDSV 抗体于攻毒后两个月时仍保持很高的滴度水平(如图 2)。

2.3 荧光定量 PCR 方法检测 EDSV 在小鼠体内的分布情况

在整个试验中, 每只小鼠共有 12 个样本需要检测, 其中包括 11 个组织依次为脑、气管、食管、心脏、

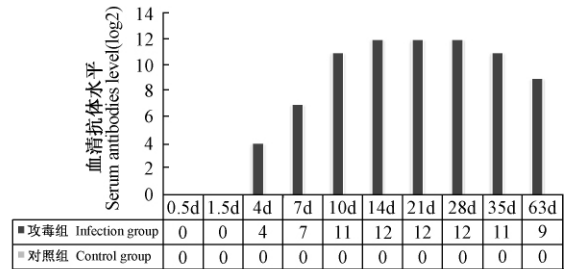


图 2 攻毒后小鼠血清 HI 抗体水平的监测结果  
Fig. 2 Changes of serum HI antibodies in the mice post infection

肝、脾、肺、肾、胃、肠、子宫以及粪便, 其中仅没有胃组织检测到 EDSV, 其他组织内均检测到病毒, 以肝脏中的病毒含量最高, 可达到 10<sup>7</sup> copies/μL, 肺、肾、子宫、脾的病毒含量其次, 可达到 10<sup>5</sup> copies/μL; 而在任何时间段阴性对照组小鼠的组织内均检测不到病毒。

攻毒后 12 h 即在小鼠脑、气管、食管、心脏、肝、脾、肺、肾、肠、子宫中检测到病毒 DNA, 其中气管与食管中的病毒含量在 12 h 为最高值, 之后开始下降; 食管中的病毒于攻毒后 10 d 转阴; 小鼠心脏、肝、脾、肺、肾、肠、子宫中的 EDSV 含量于攻毒后 36 h 达到高峰, 随后呈现波动下降趋势; 小鼠脑组织中的病毒 DNA 含量于攻毒后 4 d 达到高峰, 随后开始下降; 攻毒后 7 d 便可在攻毒组小鼠的粪便中检测到 EDSV, 直至两个月后仍可在粪便中检测到病毒。

通过检测结果可以看出, 直至监测结束, 仍可在小鼠的大部分组织检测到 EDSV, 只有食管和肠中的病毒分别于攻毒后 10 d 和 28 d 转至阴性。另发现, 被检组织在攻毒后不同时间内 EDSV 的含量有所不同, 平均含量由高到低为肝脏、子宫、肾、肺、脾、心脏、肠、食管、气管、脑、粪便、胃(如图 3 彩插 6)。

2.4 免疫组化法定位小鼠组织内 EDSV 结果

通过对攻毒后 7 d、10 d、14 d、21 d、28 d 小鼠的组织进行免疫组织化学染色检测发现, 攻毒后 7 d 的小鼠肝、肾、肺、子宫中可见到明显的阳性棕色颗粒, 直至攻毒后 21 d 还可找到阳性着色, 28 d 后阳性颗粒数量减少, 但仍可见到。其中以子宫的阳性颗粒着色位置最具特点, 大部分位于子宫腺体上皮细胞的胞质中, 呈现棕色管套状, 另外子宫腺体上皮细胞的胞核中亦可见, 也存在于子宫肌层细胞的胞质及胞核中。箭头所示阳性颗粒, 可见于 7 d 攻毒组小鼠的子宫(腺体细胞胞质、肌层细胞胞质及胞核)、肺(肺泡上皮细胞胞质)中, 10 d、21 d 攻毒组小鼠的子宫(腺体细胞胞质)(图 4 彩插 7)中。

## 2.5 病理变化观察结果

攻毒组和对照组小鼠的剖检组织中均未见到明显的病理变化。HE 染色观察组织切片,未见到充血出血、炎性细胞浸润、细胞变性坏死、组织增生等明显的病理变化,以子宫为例(如图 5 彩插 6)。

## 3 讨论

EDSV 属于禽腺病毒Ⅲ群,区别于其他禽腺病毒而类似于哺乳动物腺病毒的特点是 EDSV 具有血凝性,且与哺乳动物腺病毒的基因同源性高于与其他禽腺病毒的基因同源性<sup>[4]</sup>。本研究根据 EDSV 感染生殖系统为主及哺乳动物腺病毒以感染呼吸系统为主的特点,首次以 4~6 周龄的 KM 小鼠作为哺乳动物研究对象,对 KM 小鼠感染 EDSV 的感染特性进行探索性的研究,并通过免疫组织化学染色法证实了该病毒也可以在小鼠的呼吸系统和生殖系统中定位增殖,与该病毒在母鸡体内分布研究的相关报道结果相似,主要存在于咽部、肺部及输卵管<sup>[9]</sup>。为有效实现病毒感染,特参考鸡群攻毒量,采用三种接种途径进行攻毒<sup>[10]</sup>,并以等量正常尿囊液接种作为阴性对照,有效解决了背景值干扰而产生假阳性等问题。

在对小鼠体内各个组织进行检测时,为避免 EDSV 在组织中分布不均及批间差异的问题,要对检测组织进行整块处理、多次称量、等量消化、多次重复检测、设置对照,确保荧光定量 PCR 起始模板量与组织中病毒量之间的差异最小。研究中发现大部分被检组织中病毒 DNA 量于攻毒后 36 h 可达最高值,并且攻毒后 63 d 仍可检测到病毒,可初步推断,EDSV 可感染小鼠,并在 36 h 内通过体液扩散至各器官,同时可确定该病毒可在小鼠体内生长、复制。研究发现该病毒株没有引起小鼠的病理反应,其原因可能与小鼠本身隐性感染、本毒株毒力不强、小鼠品系或日龄等因素相关。

研究者关于 EDSV 在母鸡体内分布的早期研究中发现,子宫部在整个感染过程中未检出病毒<sup>[9]</sup>,但也有研究者发现感染 EDSV 鸡的输卵管会出现明显病理变化,病变主要集中在输卵管峡部和子宫部<sup>[11]</sup>。而本研究通过荧光定量 PCR 方法可在小鼠子宫检出本病毒,并通过免疫组织化学染色法对小鼠组织内 EDSV 进行准确定位,发现在小鼠的子宫中确实有病毒存在。由于本研究没有对本体动物感染 EDSV 的组织样本进行检测,因此无法确定该病毒是否可在感染后鸡的子宫部检出,还是早期检测方法不够灵敏,还有待证实。

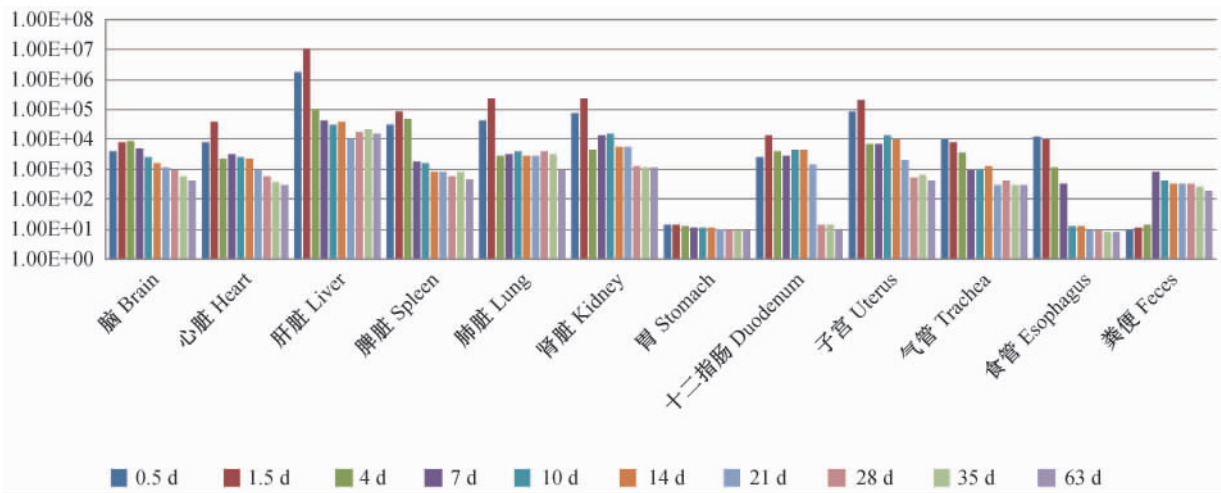
腺病毒一直是分子生物学和病毒学的重要研究对象,腺病毒基因组可承载异源性基因的特点使其基因载体系统得到突飞猛进的发展。人腺病毒(HAd)应用最为广泛,而动物腺病毒(AAd)作为人类基因治疗载体更具优势,不仅能有效感染人细胞,抗体滴度高,并且产生的细胞免疫反应较弱,使转移基因的表达延长。因此动物腺病毒具有在人源细胞中转基因的能力,可避免人腺病毒载体应用时遇到的免疫学问题的潜力<sup>[12]</sup>。EDSV 在小鼠体内能诱发长时间的高水平抗体,即使在抗体水平很高时,该病毒仍然能持续存在和排毒,该研究结果为 EDSV 作为腺病毒载体的研究提供了理论依据。

(本文图 3、5 彩插 6,图 4 见彩插 7。)

### 参 考 文 献

- [1] van Eck JH. Egg transmission of egg drop syndrome 1976 virus in fowl [J]. Tijdschr Diergeneesk, 1980, 105(14): 176-178.
- [2] 李刚,郑明珠,蔡宝祥,等. 从某鸡场已分离到产蛋减少综合征病毒 [J]. 南京农业大学学报, 1991, 5: 92-93.
- [3] McFerran JB, Connor TJ, Adair BM. Studies on a depressed egg production syndrome in Northern Ireland [J]. Avian Pathol, 1978, 7: 35-47.
- [4] Darbyshire JH, Peters RW. Studies on EDS virus infection in laying chickens [J]. Avian Pathol 1980, 9: 277-290.
- [5] Yamaguchi S, Imada T, Kawamura H, et al. Outbreaks of egg drop syndrome-1976 in Japan and its etiological agent [J]. Avian Dis, 1981, 25: 628-641.
- [6] 金奇,朱雷. 鸡减蛋综合征病毒 55K 蛋白基因的克隆与序列分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(2): 145-157.
- [7] Rohn K, Prusas C, Monreal G, et al. Identification and characterization of penton base and pVIII protein of egg drop syndrome virus [J]. Virus Res, 1997, 47(1): 59-65.
- [8] Blocker HM, Brandt, PH. The complete nucleotide sequence of the egg drop syndrome virus: an intermediate between mastadenoviruses and aviadenoviruses. [J]. Virology. 1997, 238(1): 145-156.
- [9] 孔德迎,刘福安. 减蛋综合征-76 病毒在鸡体内的动态分布及其与蛋传递的关系 [J]. 病毒学报, 1991, 7(2): 148-152.
- [10] 苗岚飞,崔尚金,张超范,等. PCV2 感染 SPF 昆明小鼠动物模型的建立 [C]. 中国畜牧兽医学会兽医公共卫生学分会第一次学术研讨会论文集, 2008, 348-354.
- [11] 朱国强,王永坤,张彪. 禽腺病毒人工感染产蛋鸡生殖道器官的病理学观察 [J]. 中国畜牧传染病, 1993, (6): 51-56.
- [12] 秦爱建,何秀苗. 动物腺病毒载体的研究进展 [C]. 第六次全国会员代表大会暨第 11 次学术研讨会, 2005, 21-26.

[收稿日期] 2012-05-03



EDSV NE<sub>4</sub> 株攻毒组小鼠体内 EDSV 的分布情况  
Distribution of virus in tissues of mouse infected with EDSV

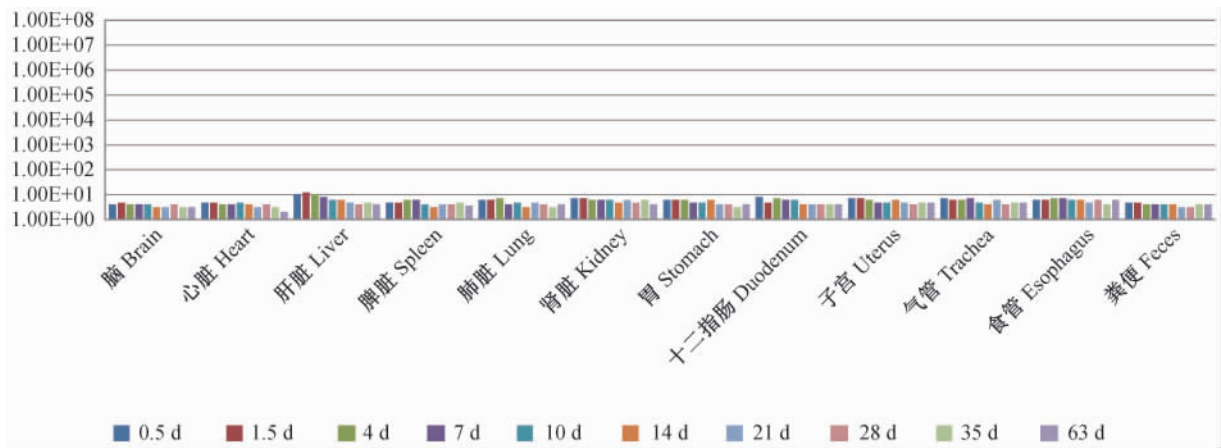
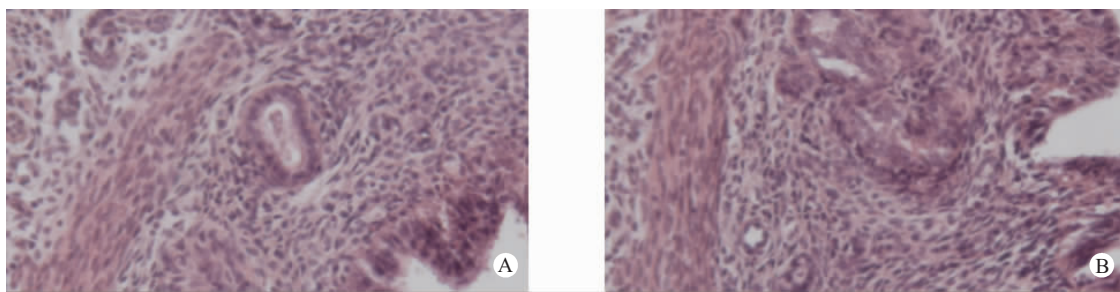


图 3 EDSV NE<sub>4</sub> 株攻毒后小鼠与对照组小鼠体内 EDSV 的分布情况

Fig. 3 Distribution of the virus in tissues of mice after infection with EDSV and the control mice



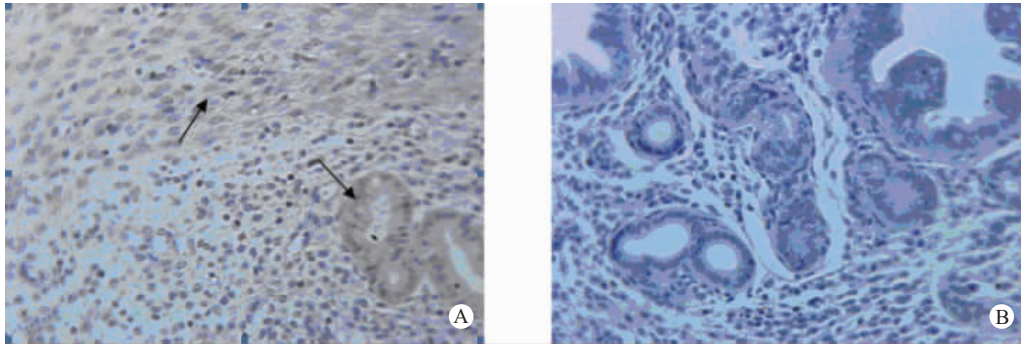
A. 10 d 攻毒组小鼠子宫

B. 10 d 对照组小鼠子宫

A. The uterus of a test mouse, 10 days post infection B. The uterus of a control mouse, 10 days post sham infection

图 5 小鼠组织切片 HE 染色观察

Fig. 5 Histological appearance of the uterus of the mice. HE staining

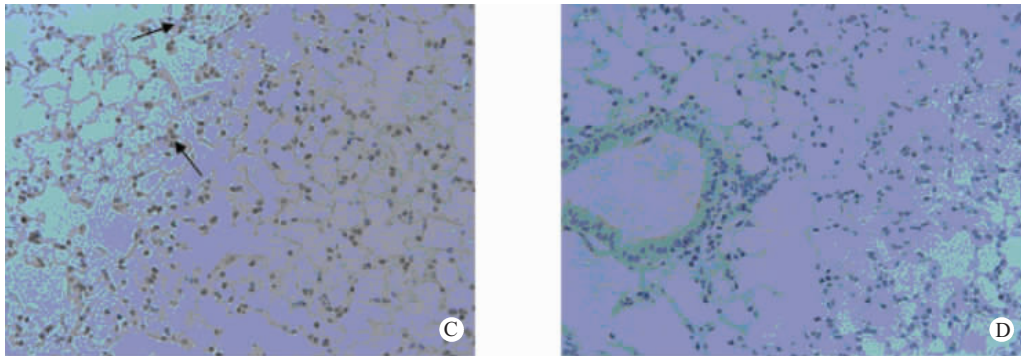


A. 7 d 攻毒组小鼠子宫

B. 7 d 对照组小鼠子宫

A. The uterus of a test mouse, 7 days post infection

B. The uterus of a control mouse, 7 days post sham infection

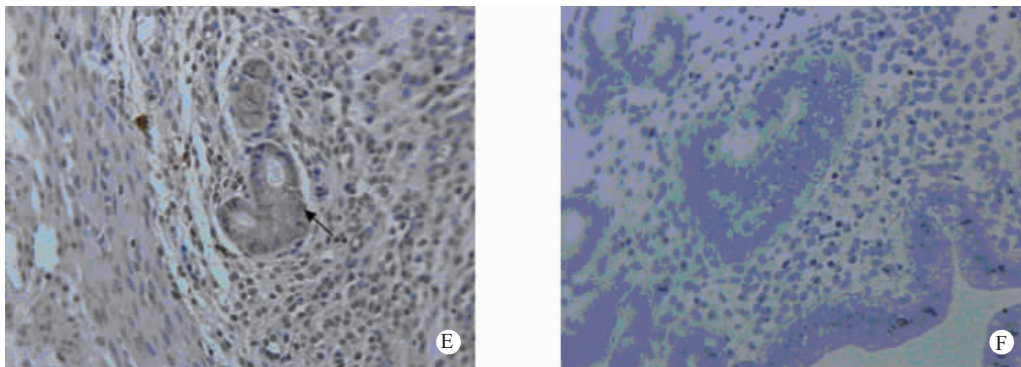


C. 7 d 攻毒组小鼠肺

D. 7 d 对照组小鼠肺

C. The lung of a test mouse, 7 days post infection

D. The lung of a control mouse. 7 days post sham infection

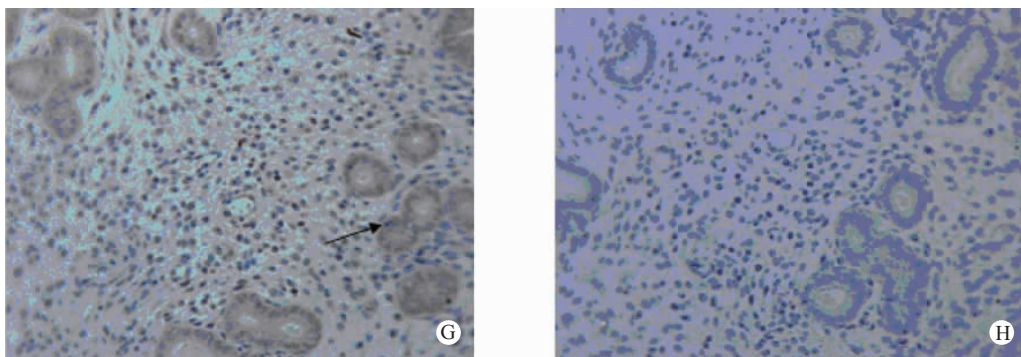


E. 10 d 攻毒组小鼠子宫

F. 10 d 对照组小鼠子宫

E. The uterus of a test mouse, 10 days post infection

F. The uterus of a control mouse, 10 days post sham infection



G. 21 d 攻毒组小鼠子宫

H. 21 d 对照组小鼠子宫

G. The uterus of a test mouse, 21 days post infection

H. The uterus of a control mouse, 21 days post sham infection

图 4 EDSV NE<sub>4</sub> 株感染小鼠的免疫组化染色

Fig. 4 Immunohistochemical changes in the mice inoculated with EDSV strain NE<sub>4</sub>