

## 鸡心包积液-肝炎综合征卵黄抗体对机体排毒的影响

王凯莉, 殷国政, 刘成, 李玉保, 路建彪, 楚肖冉, 司振书\* (聊城大学农学院, 山东聊城 252000)

**摘要** 为研究应用卵黄抗体防控鸡心包积液-肝炎综合征(HHS)的可行性及其对病毒分布和机体排毒的影响,采用卵黄抗体肌肉注射28日龄SPF鸡,同时设置对照组(生理盐水),2d后用血清4型禽腺病毒分离株(HuBei 201801)进行人工感染,采用PCR方法检测病毒的分布及排毒情况;对临床发病肉杂鸡注射卵黄抗体,检验其保护效果。结果显示,人工感染SPF鸡14d后,试验组存活率为93.33%,而对照组存活率为40.00%。试验组只有肝脏PCR检测呈阳性,其他器官均呈阴性;对照组肝脏PCR阳性率为100%,心脏、肾脏、脾脏等器官阳性率为60%。试验组未检出口腔排毒,泄殖腔排毒7dpi时阳性率为20.0%,其他时间未检出;对照组口腔排毒7dpi时阳性率为50.0%,其他时间未检出,在3、5、7dpi时均检出泄殖腔排毒,7dpi时排毒率达66.7%。临床发病肉杂鸡注射卵黄抗体24h后死亡数明显减少,72h后很少死亡。由此可见,卵黄抗体可以有效降低感染鸡的排毒率,阻止该病原的传播,为鸡群提供有效保护。应用卵黄抗体是防控鸡心包积液-肝炎综合征的一项有效措施。

**关键词** 心包积液-肝炎综合征;卵黄抗体;保护效力;排毒

**中图分类号** S855.3 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2022)05-0076-03

**doi:** 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.05.019

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Effects of Yolk Antibody with Chicken Hydropericardium-hepatitis syndrome on the Detoxification of Chicken**  
**WANG Kai-li, YIN Guo-zheng, LIU Cheng et al** (College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000)

**Abstract** To study the feasibility of using yolk antibody to prevent and control chicken hydropericardium-hepatitis syndrome (HHS) and its effect on virus distribution and detoxification of chicken, 28-day-old SPF chicken were injected intramuscularly with yolk antibody, and a control group (normal saline) was set up. After two days, artificial infection was performed with a serum fowl adenovirus type 4 (FAdV-4) isolate. The distribution and detoxification situation of the virus were detected by using PCR. The protective effect was tested by injecting clinically diseased broiler with egg yolk antibody. The survival rate in the test group was 93.33% and that in the control group was 40.00% at 14 days post infection (dpi), there was extremely significant difference between the test group and control group. DNA of the virus was detected as positive only in the liver and that in other organs were negative in the test group. In the control group, the positive rate by PCR was 100% in the liver, that in the heart, kidneys, spleen, and other organs was 60%. In the test group, the oral detoxification was not detected, the positive rate of the cloacal detoxification was 20.0% at 7dpi, the cloacal detoxification was not detected at the other time. In the control group, the positive rate of the oral detoxification was 50.0% at 7dpi, and that at the other time was not detected; cloacal detoxification was detected at 3, 5, 7dpi, and the detoxification rate was 66.7% at 7dpi. The death of clinically diseased broiler significantly reduced after injecting with yolk antibody 24 h, the death was little after 72 h. The yolk antibody could effectively reduce the detoxification rate of infected chicken, prevent the spread of the pathogen, and provide effective protection for SPF chicken. The application of yolk antibody was an effective measure to prevent and control HHS in chicken.

**Key words** Hydropericardium-hepatitis syndrome; Yolk antibody; Protective efficacy; Detoxification

心包积液-肝炎综合征(hydropericardium-hepatitis syndrome, HHS)又称安卡拉病,由血清4型禽腺病毒(fowl adenovirus-4, FAdV-4)引起,以心包积液和肝脏多灶性坏死为主要特征性病变<sup>[1-2]</sup>。自2015年以来,在我国山东、安徽、河南、河北、江苏等地均有发生<sup>[3-4]</sup>,严重影响了我国养禽业的健康发展。该病传播迅速,死亡率为30%~70%甚至更高,肉杂鸡、蛋鸡、白羽肉鸡和三黄鸡等均可发生,尤其对肉杂鸡危害严重,使得有些地区在该病流行时存栏量急剧下降。殷国政等<sup>[5-6]</sup>研究发现,FAdV-4分离株对鸡胚和1日龄SPF鸡的致死率可达100%,在死鸡的多个组织器官中检测到该病毒。感染鸡可以通过口腔和泄殖腔排毒,泄殖腔排毒是其主要的排毒方式。对蛋鸡强化免疫后,抗体在卵黄内蓄积,可制成卵黄抗体,用于相关疫病的紧急预防和治疗。当前已有鸡传染性法氏囊病、鸭病毒性肝炎和小鹅瘟3种疫病的9种商品化卵黄抗体,用于相关疾病的紧急预防和早期治疗<sup>[7]</sup>。

笔者制备了鸡心包积液-肝炎综合征卵黄抗体,对SPF鸡注射2d后,用血清4型禽腺病毒分离株感染,研究卵黄抗体对SPF鸡的保护效力及其对病毒分布和机体排毒的影响;用卵黄抗体对临床发病肉杂鸡进行治疗,取得了良好的治疗效果。

## 1 材料与方法

**1.1 毒株与疫苗** FAdV-4湖北分离株HuBei 201801,鸡胚半数感染量(EID<sub>50</sub>)为10<sup>-4.42</sup>/mL,由聊城大学畜禽疫病防控技术研究所分离鉴定并保存;FAdV-4灭活疫苗,由聊城大学预防兽医实验室制备并保存。

**1.2 试验动物** 选择130日龄健康高产海兰褐蛋鸡作为试验动物,该鸡群FAdV-4抗体检测呈阴性,由莘县某养殖场提供。28日龄SPF鸡;SPF种蛋购于济南斯派福瑞禽业科技有限公司,用小型孵化器孵化种蛋,隔离器内饲养。

**1.3 引物** 根据参考文献[8]合成1对扩增I群禽腺病毒6邻体基因(*Hexon*)的引物,目的条带1219 bp。引物序列H<sub>1</sub>为5'-TGGACATGGGGGCGACCT-3',H<sub>2</sub>为5'-AAGGGATT-GACGTTGTCCA-3',由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

**1.4 主要试剂** DNA提取试剂盒购于艾德莱生物科技有限

**基金项目** 山东省重点研发计划(公益类)项目(2019GNC106082);山东省自然科学基金项目(ZR2020MC175)。

**作者简介** 王凯莉(1997—),女,山东昌邑人,硕士研究生,研究方向:家禽疫病诊断与防控技术。\*通信作者,副教授,博士,硕士生导师,从事动物微生物学研究。

**收稿日期** 2021-06-21;修回日期 2021-08-01

公司;PCR Mix、DL2000 DNA Maker 50 等试剂购于北京索莱宝生物科技有限公司;血清 4 型禽腺病毒抗体检测试剂盒购于上海心语生物科技有限公司。

**1.5 卵黄抗体的制备及检验** 采用 130 日龄的健康蛋鸡 200 只,每只注射 FAdV-4 灭活疫苗 1.0 mL;15 d 后第 2 次接种,分 2 点肌肉注射 1.5 mL/只;10 d 后第 3 次接种,肌肉注射 2.0 mL/只。收集免疫蛋,分离卵黄,按照常规方法制备卵黄抗体。对制备的卵黄抗体采用 ELISA 方法进行抗体效价检测<sup>[9]</sup>;取少量卵黄抗体滴于营养琼脂培养基表面,37 °C 下培养 24 h 后进行无菌检验;用卵黄抗体颈部皮下注射 30 日龄健康肉杂鸡 10 只,2.0 mL/只,观察 14 d。

**1.6 SPF 鸡饲养、卵黄抗体的注射与攻毒** 将 28 日龄 SPF 鸡 60 只随机平均分成 2 组,试验组分 2 点肌肉注射卵黄抗体 1.0 mL/只,对照组采用同样的方法注射生理盐水,1.0 mL/只。2 d 后,对所有鸡只颈部皮下注射分离毒株病毒液,300  $\mu$ L/只(病毒含量约  $10^{3.9}$  EID<sub>50</sub>)。2 组在不同隔离器饲养,每天多次观察鸡只采食、活动、精神状态等健康状况及发病、死亡情况。

**1.7 感染死亡鸡各组织脏器中 FAdV-4 的 PCR 检测** 对感染后死亡鸡只进行解剖,观察其主要病变。无菌摘取肝脏、心脏、脾脏、肾脏、胰腺、小肠、肌胃、脑等器官,各取少量放入装有 PBS 缓冲液的离心管内,研磨后离心;取上清液提取 DNA,按照 DNA 提取试剂盒说明书进行,再对 FAdV-4 的六邻体基因进行扩增。

在 PCR 管内依次加入 PCR Mix 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L, H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub> 引物各 1.0  $\mu$ L, DNA 模板 2.0  $\mu$ L。PCR 反应程序如下:预变性 94 °C 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火

30 s,72 °C 延伸 90 s,34 个循环;72 °C 10 min 再延伸;4 °C 冰箱中保存。取 PCR 产物进行电泳,使用凝胶成像仪拍照并观察。

**1.8 人工感染鸡口腔、泄殖腔排毒情况检测** 在人工感染后第 3、5、7、14 天,分别随机选取 5~6 只鸡,取口腔和泄殖腔拭子,提取 DNA 并进行 PCR 检测,检测方法同“1.7”。

**1.9 卵黄抗体对临床发病肉杂鸡的治疗** 河北某鸡场的肉杂鸡约 1.1 万只,20 日龄时开始发病,死亡 62 只,剖检发现肝脏出血肿大,心包内有淡黄色清亮液体,对其肝脏进行禽腺病毒六邻体基因检测,结果呈阳性。21 日龄确诊后,每只注射卵黄抗体 1 mL,剩余 10 只未做处理作为对照,观察并记录鸡群的死亡情况。

## 2 结果与分析

**2.1 卵黄抗体效价及安全检验结果** 使用 FAdV-4 抗体检测试剂盒,测得卵黄抗体浓度为 54.6 ng/L。培养基上无菌落生长,说明卵黄抗体不带菌;注射抗体的肉杂鸡食欲、精神状态均良好,无不适反应。

**2.2 鸡只发病死亡情况** 试验组鸡只人工感染后第 1~2 天采食、精神状态、活动等均表现正常,第 4、5 天分别死亡 1 只,此后无发病死亡,死亡率为 6.67%。对照组第 2 天有 3 只精神萎靡、呆立,数小时后死亡,第 5 天达到死亡高峰,第 6 天后不再有死亡发生,死亡率为 60.00%。SPF 鸡人工感染后不同时间的死亡情况见表 1。试验组存活率为 93.33%,而对照组仅为 40.00%,2 组间差异极显著( $P < 0.01$ )。对死亡鸡进行剖检,发现心脏包膜内有淡黄色清亮的液体,心包积液最多时超过 10 mL,肝脏肿大出血,肾脏肿胀、尿酸盐沉积(图 1)。

表 1 SPF 鸡人工感染后不同时间的死亡情况

Table 1 The cumulative mortality of SPF chicken at different time after artificial infection

组别 Group	感染后不同天数的死亡数 Death number at different days post infection//只					死亡率 Mortality rate//%
	2	3	4	5	14	
试验组 Test group	0/30	0/30	1/30	2/30	2/30	6.67 B
对照组 Control group	3/30	6/30	15/30	18/30	18/30	60.00 A

注:同列不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )

Note: Different capital letters in the same column indicated extremely significant difference ( $P < 0.01$ )



注:A. 心脏包膜内有积液;B. 肝脏肿大、出血;C. 肾脏肿胀、尿酸盐沉积

Note: A. There was effusion in the heart capsule; B. The liver was swollen and bleeding; C. Kidney was swollen and urate deposition was seen

图 1 人工感染死亡鸡剖检主要病变

Fig. 1 Necropsy main lesions of dead chicken after artificial infection

**2.3 FAdV-4 在感染死亡鸡各组织脏器中的 PCR 检测结果** 对感染死亡鸡的肝脏、脾脏等器官进行处理,采用 PCR 方法扩增禽腺病毒的六邻体基因,检测结果见表 2。由表 2

可知,试验组肝脏中 FAdV-4 的阳性率为 100%,脾脏、胰腺等器官均呈阴性;对照组肝脏中 FAdV-4 的阳性率为 100%(5/5),脑、心脏、肾脏、法氏囊、胰腺等器官中的阳性率均为 60%。

表 2 人工感染死亡鸡各组织脏器 Hexon 基因 PCR 检测阳性率

Table 2 The positive rate of Hexon gene in various tissue organs of dead chicken after artificial infection by PCR detection %

组别 Group	肝脏 Liver	心脏 Heart	脾脏 Spleen	胰腺 Pancreas	脑 Brain	肾脏 Kidney	法氏囊 Bursa of Fabricius	肌胃 Muscular stomach	小肠 Small intestine
试验组 Test group	100	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组 Control group	100	60	60	60	60	60	60	60	60

**2.4 排毒情况检测结果** SPF 鸡人工感染后通过口腔、泄殖腔排毒情况检测结果见表 3。由表 3 可知,试验组在 7dpi 时 1 只鸡通过泄殖腔排毒,排毒率为 20.0%,其他时间均呈阴性。对照组 3dpi 时检出泄殖腔排毒阳性,排毒率为 16.7%;5dpi 时泄殖腔排毒率为 50.0%;7dpi 时口腔、泄殖腔排毒率分别为 50.0%和 66.7%;14dpi 时试验组和对照组均未检出排毒。

表 3 攻毒后不同时间的排毒率

Table 3 Detoxification rate at different time after virus challenge %

排毒方式 Detoxification methods	组别 Group	感染后天数 Days post infection(dpi)			
		3	5	7	14
口腔排毒 Oral detoxification	试验组	0	0	0	0
	对照组	0	0	50.0	0
泄殖腔排毒 Cloacal detoxification	试验组	0	0	20.0	0
	对照组	16.7	50.0	66.7	0

**2.5 临床发病鸡用卵黄抗体治疗后死亡情况** 注射卵黄抗体 24 h 内鸡群死亡 86 只,24~48、49~72 h 各死亡 57、21 只,72 h 后很少死亡,对出现的零星死亡鸡进行剖检,无 HHS 的典型病变,注射抗体后 72 h 死亡率约 1.50%;未注射抗体的 72 h 内死亡 3 只,死亡率约 30.00%。

### 3 讨论

自 2015 年 HHS 暴发以来,在我国鸡群时有发生,严重危害了养禽业的健康发展。该试验对 28 日龄 SPF 鸡注射卵黄抗体后人工感染 FAdV-4,结果发现注射卵黄抗体的鸡死亡率为 6.67%,明显低于对照组,表明卵黄抗体对 SPF 鸡抵抗 4 型禽腺病毒的感染具有良好的防效。杨晓伟等<sup>[10]</sup>发现用 FAdV-4 临近分离株免疫蛋鸡制备的卵黄抗体可以有效预防 15 日龄肉鸡感染。该试验结果与杨晓伟等<sup>[10]</sup>研究结果相一致,但卵黄抗体是否对禽腺病毒的分布与机体排毒产生影响则未见报道。对感染死亡鸡各脏器进行 PCR 检测,试验组鸡只在肝脏中检测到该病毒,其他脏器均呈阴性;对照组在

心脏、肝脏、脾脏等多种脏器均能检测到该病毒,且阳性率为 60%~100%,说明卵黄抗体能够与该病毒进行结合,使其不能吸附于细胞表面,失去感染细胞的能力,从而阻止病毒在机体内的复制和扩散。该试验对机体排毒情况的检测结果表明,试验组排毒率明显低于对照组,说明卵黄抗体能够有效抑制 SPF 鸡禽腺病毒的排出,降低排毒率,减少病毒的传播。

对发病鸡群的治疗效果表明,卵黄抗体能够显著降低临床发病鸡的死亡率,注射后 24 h 内死亡有所增加,可能与注射应激有关,24 h 后死亡明显减少,72 h 后很少死亡,说明卵黄抗体对发病鸡群起到了很好的保护作用。

### 4 结论

鸡心包积液-肝炎综合征卵黄抗体能够对 SPF 鸡和肉杂鸡起到很好的保护作用。应用卵黄抗体是防控该病的一项有效措施。

### 参考文献

- [1] ANJUM A D, SABRI M A, IQBAL Z. Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan[J]. Vet Rec, 1989, 124(10): 247-248.
- [2] LIU R X, ZHANG Y H, GUO H F, et al. The increased virulence of hyper-virulent fowl adenovirus 4 is independent of fiber-1 and penton [J]. Res Vet Sci, 2020, 131: 31-37.
- [3] 牛玉娟, 张桂华, 孙伟, 等. 鸡肝炎-心包积液综合征的病理学诊断[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(6): 1111-1114, 1120.
- [4] 路建彪, 李玉保, 裴兰英, 等. 心包积液-肝坏死综合征病原的分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(8): 109-110.
- [5] 殷国政, 司振书, 刘延伟, 等. 禽腺病毒感染 SPF 鸡的病变和病毒分布初步研究[J]. 中国家禽, 2019, 41(1): 54-57.
- [6] 殷国政, 王凯莉, 刘成, 等. 血清 4 型禽腺病毒对 SPF 鸡的致病特性及其排毒规律[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(10): 52-55.
- [7] 魏凤, 张文通, 苗立中. 商品化卵黄抗体分类及特点[J]. 养禽与禽病防治, 2020(1): 38-40.
- [8] RAUE R, HESS M. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus[J]. J Virol Methods, 1998, 73(2): 211-217.
- [9] 巨晓军, 杨海明, 王志跃, 等. 卵黄抗体在雏鸡组织器官中的转移变化规律[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(11): 1974-1979.
- [10] 杨晓伟, 杨万秋, 陆婧, 等. 禽腺病毒群血清 4 型的分子鉴定及其卵黄抗体的防控效果[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(1): 113-117.