

鸭源新城疫病毒的分离与鉴定

胡晓苗, 戴银, 张丹俊*, 赵瑞宏, 潘孝成, 周学利, 侯宏艳, 沈学怀, 朱传明

(安徽省农业科学院畜牧兽医研究所, 安徽合肥 230031)

摘要 [目的] 分离并鉴定鸭源新城疫病毒。[方法] 从安徽地区鸭病料中分离新城疫病毒, 测定其鸡胚半数感染量(EID_{50})、鸡胚平均致死时间(MDT)和1日龄雏鸡脑内接种致病指数(ICPI)。[结果] 2株新城疫病毒均为强毒。通过RT-PCR技术对这2株鸭新城疫病毒的F基因进行序列测定与分析, 结果发现F基因裂解位点为 $^{112}RRQKRF^{117}$, 符合NDV强毒株裂解位点氨基酸序列。F基因遗传进化树分析发现, AH1株属于基因VII型, 而AH2株属于基因VI型, 来源于鸽源病毒。[结论] 水禽新城疫病毒(NDV)的感染来源复杂, 应避免将不同种类的家禽混合饲养。

关键词 鸭; 新城疫病毒; 分离; 鉴定; F基因

中图分类号 S855 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)22-0073-02

Separation and Identification of Duck-origin Newcastle Disease Virus

HU Xiao-miao, DAI Yin, ZHANG Dan-jun* et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To separate and identify newcastle disease virus (NDV) from duck. [Method] NDV were separated from diseased duck samples from Anhui Province and their EID_{50} , MDT and ICPI were determined. [Result] Two strains of NDV were virulent. F gene of two strains of NDV were sequenced by RT-PCR, and the results showed that the cleavage site of F gene of the viruses was $^{112}RRQKRF^{117}$, which was accorded with the amino acid sequences of cleavage site of highly-pathogenic strain of NDV. The genetic evolutionary tree analysis of F gene showed that AH1 belonged to genotype VII, but AH2 belonged to genotype VI, which was from pigeon sources. [Conclusion] The infection sources of NDV from water birds were complex, so the mixed breeding of different varieties of fowls should be avoided.

Key words Duck; NDV; Separation; Identification; F gene

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的以感染禽类为主的一种急性、烈性传染病, 近年来鸭、鹅等水禽感染NDV并发病的病例越来越多, 也越来越严重, 给我国的水禽养殖业带来了巨大的经济损失^[1-4]。该病没有明显的流行季节, 一年四季均可发生, 发生该病后, 日龄稍大的患病水禽并未在短时间内大批死亡。如果有细菌等混合感染(主要是大肠杆菌病和传染性浆膜炎), 会使死亡率升高。笔者对临床上2个疑似鸭ND病例进行了病毒分离与鉴定。

1 材料和方法

1.1 病料来源 2016年10月, 临床诊治过程中接诊到2例发病蛋鸭, 临床和解剖情况均相似。鸭群精神表现尚可, 采食量略有下降, 产蛋鸭的主要变化为产蛋率下降明显, 有软壳蛋、畸形蛋、沙壳蛋, 少数出现临床症状。有临床症状的病鸭发病初期拉白色稀粪, 两腿无力, 蹲伏地面或瘫痪, 其后粪便呈水样、暗红色或墨绿色; 食欲减退、少食或拒食, 饮欲增加, 有的病鸭呼吸道发出“呼噜”声, 出现张口呼吸、甩头、咳嗽等呼吸道症状。使用头孢类、丁胺卡那霉素等多种抗生素治疗, 效果不明显。剖检病死鸭没有典型的病理变化, 可见肝脏充血、出血, 盲肠扁桃体出血, 肠道黏膜出血, 气管内黏稠分泌物。采集发病鸭的气管、肝脏、脑、脾脏、胰腺等病料, 用于分离与鉴定。

1.2 试剂 SPF种蛋购自北京梅里亚维通实验动物技术有

限公司, 由安徽省农业科学院畜牧兽医研究所兽医临床诊断中心孵化至9~11日龄; NDV标准阳性血清、禽流感病毒(H5、H7、H9亚型)标准阳性血清、减蛋综合征(EDS)阳性血清, 均购自哈尔滨兽医研究所; RNA提取试剂TRIzol, 购自Invitrogen公司; M-MLV反转录酶、RNasin、dNTP、Taq-DNA, 均购自大连TaKaRa公司; DNA凝胶回收试剂盒, 购自GeneMark公司; 特异性引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 预计扩增产物大小约900 bp; 青霉素10 000 U/mL, 链霉素10 mg/mL, 庆大霉素和卡那霉素均为250 μ g/mL。

1.3 病毒分离与血清学鉴定 将采集的鸭病料按1:5的比例加入四抗(青霉素、链霉素、庆大霉素和卡那霉素)溶液, 在组织研磨器中研磨, 制备组织匀浆。反复冻融3次, 将匀浆转移到灭菌的离心管中, 置于台式高速离心机中10 000 r/min离心5 min, 吸取上清液, 转移至另一灭菌离心管中, 用等体积的四抗溶液稀释, 再置于台式高速离心机中10 000 r/min离心5 min, 吸取上清液, 接种10日龄SPF鸡胚0.2 mL/个, 各3个。收集24 h后死亡的鸡胚尿囊液, 通过血凝试验(HA)测定其血凝效价, HA检测结果呈阳性的胚液继续传代, 每代都检测HA结果, 到第3代若收获的尿囊液仍为阴性, 则应弃去。HA阳性的尿囊液分别用禽流感病毒的H5、H7、H9亚型标准阳性血清、ND标准阳性血清以及EDS阳性血清进行血凝抑制试验(HI)^[5]。

1.4 病毒毒力指标的测定 用灭菌生理盐水分别连续10倍(从 10^{-4} 到 10^{-9})递增稀释分离毒株, 每个稀释度接种5枚10日龄SPF鸡胚, 37 $^{\circ}$ C孵育5 d, 记录鸡胚的死亡情况, 弃去24 h内死亡的鸡胚, 收集其余鸡胚的尿囊液, 通过红细胞凝集试验(HA)检测尿囊液效价, 若HA的效价大于等于4判

基金项目 安徽农业科学院学科建设项目(16A0411); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-41)。

作者简介 胡晓苗(1971—), 男, 安徽望江人, 助理研究员, 硕士, 从事兽医微生物与免疫学研究。*通讯作者, 副研究员, 从事家禽传染病研究。

收稿日期 2017-05-20

为阳性。采用 Reed - Muench 方法计算各毒株的鸡胚半数感染量(EID_{50}),按照文献[6]的方法计算病毒的鸡胚平均致死时间(MDT);根据测定的不同毒株的 EID_{50} 和MDT,选择不同毒力的代表毒株测定1日龄雏鸡脑内接种致病指数(ICPI),将纯化的病毒用灭菌生理盐水稀释10倍,脑内接种1日龄SPF雏鸡,攻毒剂量为0.05 mL/只,每个毒株接种10只,按文献[6]的方法计算病毒的ICPI。

1.5 病毒F基因的扩增与序列测定 参照 GenBank 中发表的鸭新城疫病毒F基因序列,应用 Premier 5.0 设计1对引物,用于扩增F基因,预计扩增产物大小为900 bp,由生物工程(上海)股份有限公司合成。上游引物P1为5'-CGTAGAAAAACACGGGTAGAAGA-3',下游引物P2为5'-CAGCTAGGTRGCACGCATATTATT-3'(R=G/A)。按照试剂盒说明书抽提病毒RNA,并进行反转录。以反转录产物cDNA为模板,利用PCR扩增分离病毒的F基因,PCR阳性产物经 Gel Extrac - lion Mini Kit 试剂盒回收纯化后送交生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

1.6 病毒F基因序列分析 采用 DNASTar 4.0 版本中的 EditSeq 和 MegAlign 进行病毒F基因序列分析,分析多肽裂解位点氨基酸序列;使用 NCBI 网站提供的 BLAST 程序,与 GenBank 上发表的 NDV 基因组序列进行同源性比较和系统进化树分析,使用 MEGA 5.0 分析软件进行系统进化树的绘制和遗传进化分析。

2 结果与分析

2.1 病毒分离与鉴定 从发病鸭中分离有血凝性的病毒,接种病毒的鸡胚48h就开始出现死亡。该病毒能被新城疫阳性血清中和,血凝抑制效价在 2^5 以上,对禽流感(H7、H5、H9亚型)和EDS阳性血清呈阴性,确定分离病毒为NDV。

2.2 病毒毒力测定 由表1可知,2株病毒的3个毒力指标(EID_{50} 、MDT和ICPI)按照毒力判断标准均符合强毒力的特点,表明2株分离的新城疫病毒株为强毒株。

表1 病毒毒力的测定结果

Table 1 The determination results of the virulence of two virus strains

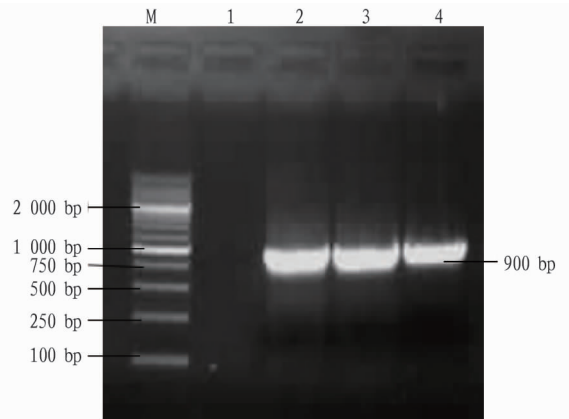
菌株 Strains	EID_{50}	MDT/h	ICPI	毒力 Virulence
AH1	$10^{-8.1}$	51.6	1.72	V
AH2	$10^{-7.9}$	49.8	1.69	V

2.3 病毒F基因的RT-PCR扩增 利用设计的引物对2株鸭NDV尿囊液提取的RNA进行RT-PCR扩增,得到1条大小约900 bp的特异性扩增条带,与预期设计的扩增片段大小相符(图1)。

2.4 F蛋白裂解位点分析 2株病毒AH1和AH2多肽裂解位点氨基酸组成为 $^{112}RRQKR^{117}$,具有NDV强毒株的典型分子特征,表明2株分离的新城疫病毒株为强毒株,与MDT、ICPI等毒力指标的测定结果相符。

2.5 F基因系统进化树分析 从图2可以看出,AH1和AH2均与LaSota、F48E9、V4等传统毒株的遗传距离较远,AH1与近年来流行毒株的基因型一致,为Class II系列中的

VII型;AH2与鸽源毒株的遗传距离较近。



注:M. Marker 2000;1. 阴性对照;2. 阳性对照;3. AH1;4. AH2

Note:M. Marker 2000;1. negative control;2. positive control;3. AH1;4. AH2

图1 病毒F基因的RT-PCR扩增结果

Fig. 1 RT-PCR amplification results of F gene of viruses

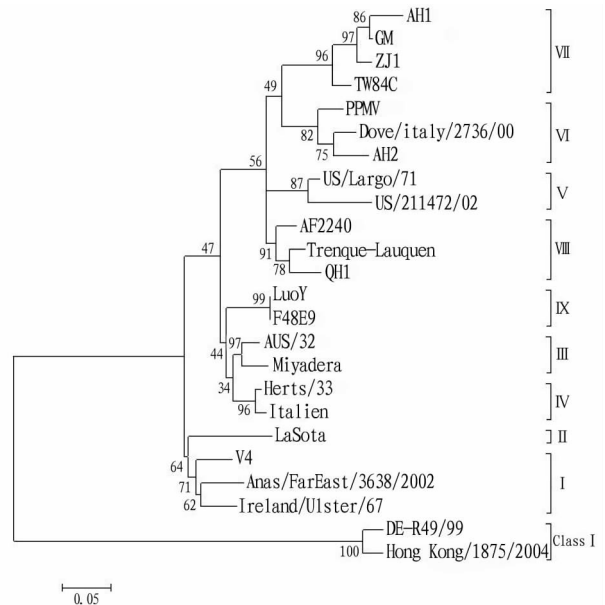


图2 F基因系统进化树分析

Fig. 2 The phylogenetic tree analysis of F gene

3 结论

(1)传统观点认为,新城疫病毒对鸡的致病性较高,对鸭、鹅等水禽虽然感染但不发病,无明显的临床症状和剖检变化。但是,近年来NDV对于水禽表现出较高的致病性。该试验中分离的2株病毒的MDT分别为51.6和49.8h(强毒株的MDT为40~60h),ICPI分别为1.72和1.69(强毒株的 $ICPI \geq 1.6$);测序结果表明,分离的2株鸭NDV裂解位点区的氨基酸序列均为 $^{112}R-R-Q-K-R-F^{117}$,与强毒株相应的氨基酸序列相符合。因此,判定这2株鸭源NDV分离株均为强毒株。

(2)由于AH1和AH2均与LaSota、F48E9、V4等传统毒株的遗传距离较远,传统疫苗难以有效保护免疫鸭免受

(下转第131页)

南、湖北、安徽、江西、广西、贵州等 20 个省(区、市)的交通运输、能源供应、电力传输、通信设施、农业及人民群众生活造成严重影响,受灾人口达 1 亿多人,直接经济损失达 540 多亿元,农作物受灾面积和直接经济损失严重^[15]。杨尚英^[17]分析华北地区最近半个世纪的干旱指数演变特征发现,在此期间华北地区以旱为主,存在非常强的干旱化趋势,且以夏、秋旱为主,多为两季连续干旱。

5 小结与讨论

全球气候变化对农作物的影响是极为复杂和多方面的,主要是通过温度、CO₂ 浓度、降水和极端气候事件的变化来直接、间接影响农作物生长的。笔者总结了气候变化对农作物生长影响的方式、程度及作用机理等方面的现有研究,得到以下主要结论:

(1) 全球气候变化将导致气温升高,气温的升高会缩短玉米、小麦、高粱和大豆的生长期,使稻类植物的不育率上升,加速叶片和植株整体的呼吸消耗,对呼吸的促进大于光合,影响植物器官尤其是生殖器官的生长发育,缩短小麦、水稻等籽粒的灌浆期,从而降低这些作物的产量。

(2) CO₂ 浓度增加可提高 C₃ 植物的光合作用率和水分利用效率,促进作物生长,对 C₄ 植物影响不大。CO₂ 浓度增加会增加植物叶面积,使粮食品质下降,而植物叶面积的增大将会消耗更多的土壤养分,增加了农田的投入。另外,CO₂ 浓度增加会导致农田杂草的数量和种类的增加,并有可能导致病虫害的加重及新的病虫害的产生。

(3) 近几十年来,由气候变化引发的降水时空特征改变致使我国干旱面积略有增加,但趋势不显著。其中,华北和西北东部干旱趋势显著,东北地区近 20 年来表现显著的干旱趋势。加剧的干旱化趋势对农作物的威胁也将加重。

(4) 气候变化使全球极端气候事件发生的频率、持续时间都有所增加,进而导致洪水暴发可能性增加和过度土壤湿度的产生,使作物生长阶段的水分胁迫加重,从而导致作物减产。我国主要极端天气气候事件发生的频率和强度在近 50 年出现了明显的变化,连续灾害事件频发,对作物生长威胁较大。

为应对气候变化对农作物生长的影响,趋利避害,在今后的农业生产中,应充分利用气候变暖带来的热能资源,遵循区域差异规律,开展专题研究,开发作物新品种,并适时调整农作物种植结构,提高复种指数,缓解气候变暖对我国农

业的冲击;通过推广设施农业和精细农业,减小 CO₂ 浓度增加对粮食品质的影响,降低杂草及病虫害对作物生长的影响;通过发展水利设施及制定应急预案提高应对极端气候事件的能力,减少气候灾害对农业生产的影响。同时,加强科技投入,借鉴国外应对气候变化的先进成果,构建保障我国粮食安全及农业可持续发展的长效机制,以增强我国应对未来气候变化的能力。

参考文献

- [1] 秦大河. 气候变化科学的最新进展[J]. 科技导报,2008(7):1.
- [2] IPCC. Climate Change 2007: Synthesis report [C]//PACHAURI R K, REISINGER A. Contribution of working groups I, II and III to the Fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Geneva, Switzerland: IPCC, 2007.
- [3] 熊伟. 未来气候变化情景下中国主要粮食作物生产模拟[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [4] IPCC. Climate change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability [C]//PARRY M L, CANZIANI O F, PALUTIKOF J P, et al. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007:1-976.
- [5] 秦大河, 罗勇, 陈振林, 等. 气候变化科学的最新进展: IPCC 第四次评估综合报告解析[J]. 气候变化研究进展, 2007, 3(6): 311-314.
- [6] BROWN R A, ROSENBERG N J. Sensitivity of crop yield and water use to change in a range of climate factors and CO₂ concentrations: A simulation study applying EPIC to the central USA [J]. Agricultural and forest meteorology, 1997, 83(3/4): 171-203.
- [7] PENG S B, HUANG J L, SHEEHY J E, et al. Rice yields decline with higher night temperature from global warming [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, 2004, 101(27): 9971-9975.
- [8] MATTHEWS R B, KROPFF M J, HORIE T, et al. Simulating the impact of climate change on rice production in Asia and evaluating options for adaptation [J]. Agriculture system, 1997, 54(3): 399-425.
- [9] TUBIELLO F N, SOUSSANA J, HOWDEN S M. Crop and pasture response to climate change [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america, 2007, 104(50): 19686-19690.
- [10] 王春乙, 潘亚茹, 白月明, 等. CO₂ 浓度倍增对中国主要作物影响的试验研究[J]. 气象学报, 1997, 55(1): 86-94.
- [11] DAHLMAN R C. CO₂ and plants: Revisited [J]. Plant ecology, 1993, 104/105(1): 339-355.
- [12] 李吉跃. 全球 CO₂ 变化与植物水分关系 [J]. 世界林业研究, 1997(5): 16-25.
- [13] 丁一汇, 任国玉, 石广玉, 等. 气候变化国家评估报告(I): 中国气候变化的历史和未来趋势 [J]. 气候变化研究进展, 2006, 2(1): 3-8.
- [14] 翟盘茂, 邹旭旭. 1951-2003 年中国气温和降水变化及其对干旱的影响 [J]. 气候变化研究进展, 2005, 1(1): 16-18.
- [15] 王凌, 高歌, 张强, 等. 2008 年 1 月中国大范围低温雨雪冰冻灾害分析. I: 气候特征与影响评估 [J]. 气象, 2008, 34(4): 95-100.
- [16] 刘颖杰. 气候变化对中国粮食产量的区域影响研究: 以玉米为例 [D]. 北京: 首都师范大学, 2008.
- [17] 杨尚英. 气候变化对我国农业影响的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(2): 303-304.

(上接第 74 页)

NDV 的感染; 由于 AH1 与近年来流行毒株的基因型同为 Class II 系列中的 VII 型, 因此可用新城疫 (ND) 的 VII 型疫苗进行免疫。AH2 为 Class II 系列中的 VI 型, 来源于鸽源病毒, 说明水禽 NDV 的感染来源复杂, 因此应避免将不同种类的家禽混合饲养, 以减少 NDV 的中间传播。

参考文献

- [1] 于可响, 马秀丽, 吴静, 等. 一株鸭新城疫强毒的分离鉴定和分子特性分析 [J]. 中国家禽, 2011, 33(16): 13-15.
- [2] 袁圣丹, 袁生. 蛋鸭副黏病毒病的初步诊断和防治 [J]. 中兽医学杂志,

- 2011, 16(3): 43-44.
- [3] 张秀峰, 丁壮, 刘佳旭, 等. 鸭副黏病毒病的诊断与病毒分离鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医 (综合指导版), 2012(10): 92-93.
- [4] 罗伟林, 武嘉平. 一例鸭副黏病毒感染鸡的诊断与思考 [J]. 中国家禽, 2009, 31(24): 70, 72.
- [5] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽和蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册 [M]. 中华人民共和国农业部畜牧兽医局, 译. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1996: 136-146.
- [6] ALEXANDER D J. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses [M]//PURCHASE H G, ARP L H, DOMERMUTH C H, et al. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th ed. Kennett Square, PA: America Association of Avian Pathologists, 1998: 156-163.