

张敬峰,李 银,赵冬敏,等. 鸭源坦布苏病毒株 NJX-4 的分离鉴定及部分生物学特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):228-229,297.

鸭源坦布苏病毒株 NJX-4 的分离鉴定 及部分生物学特性

张敬峰,李 银,赵冬敏,黄欣梅,周晓波,刘宇卓

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:采用 vero 细胞与鸡胚传代接种法,从江苏省南京市某肉鸭场发病鸭(临床表现为瘫痪、卧地不起、全身多器官出血)肝脏、脾脏病料组织中分离出 1 株病毒。RT-PCR 结果排除了分离病毒为禽流感、新城疫、鸭减蛋综合征、传染性支气管炎、鸭病毒性肝炎、鸭瘟等病毒的可能性;禽坦布苏病毒特异引物扩增结果呈阳性。序列测定与分析结果显示,分离病毒与 GenBank 上登录和实验室保存的坦布苏病毒 E 基因序列同源性在 99% 以上;部分生物学特性结果显示,该分离病毒不能凝集鸡红细胞,且对乙醚、三氯甲烷敏感,可引起试验鸭感染发病。分离毒株 NJX-4 是一种新的坦布苏病毒,属于黄病毒科坦布苏病毒属,暂称为鸭坦布苏病毒。

关键词:鸭;坦布苏病毒;鉴定;生物学特性

中图分类号: S858.325.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0228-02

近几年来,我国多地的蛋(种)鸭、蛋(种)鹅群中暴发了一种主要引起产蛋能力大幅下降的疫病,给养殖业带来严重的损失,现已证实引起该疫病的病原为坦布苏病毒^[1-5]。黄病毒科坦布苏病毒是一类单股正链 RNA 病毒,有囊膜,表面有纤突。黄病毒科中的大多数成员可通过吸血的蚊、蜱等媒介叮咬脊椎动物宿主传播疾病,如可传播热性病、出血热、休克综合征、肝炎和脑炎等,特别是脑炎和出血热的致死率很高。我国目前已证实的黄病毒有乙型脑炎病毒、森林脑炎病毒、登革热病毒和丙型肝炎病毒等^[6]。2012 年 8 月以来,江苏省南京市周边数个肉鸭场发生一种引起鸭群采食减少、精神沉郁,发病鸭表现瘫痪、卧地不起等症状的疫病。流行病学调查、临床剖解结果显示,该病发病率为 5%~20%,死亡率为 1%~10%。临床剖解其病变主要以心肌、肝脏、胰腺、脾脏等多器官轻微出血为主;心肌变性,心包积有黄色液体;气囊膜浑浊,表面有少量黄色黏液和结节;脾脏偶有肿大坏死;部分病死鸭腿部肌肉有出血斑。笔者对该疫病的病原进行了分离、鉴定,并测定了病原的部分生物学特性,以期为该病的流行规律、致病机理以及免疫防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病料采集及处理

病料来源于江苏省南京市某肉鸭场。无菌采取病死鸭肝脏及血液用于细菌分离。采集病鸭的肝、脾等组织,剪碎研磨,以 PBS 液制成 1:5(体积比)匀浆,冻融 3 次,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液经 0.22 μm 过滤器过滤除菌后作为病毒分离的接种病料^[2]。

收稿日期:2013-09-05

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)4024]。

作者简介:张敬峰(1980—),男,安徽含山人,硕士,助理研究员,主要从事畜禽重大疫病流行规律、诊断、监测和控制技术研究。
E-mail:jfzhang14@sina.com。

1.2 鸭胚与细胞

9~11 日龄 SPF 鸡胚购自南京天邦生物科技有限公司;vero 细胞为江苏省农业科学院兽医研究所保存;试验鸭购自南京某孵化场。

1.3 试剂

AMV 反转录酶、Ex Taq 酶等购自大连宝生物工程有限公司;DNA/RNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒、小量提取质粒试剂盒等购自 Axygen 公司;0.22 μm 一次性过滤器购自 Millipore 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.4 细菌分离

无菌采取发病鸭的心血、肝脏等组织,接种至 LB 琼脂板、血琼脂板,置于 37℃ 温箱培养 48 h。

1.5 病毒分离

取病料经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚,0.2 mL/枚,37℃ 孵育,每日观察 2 次至第 7 天,弃去 24 h 内的死胚,胚胎死亡时置 4℃ 冰箱 4 h 以上,解剖、观察病变,收获胚胎和胚液,-20℃ 冻存或传代。取病料接种 vero 单层细胞后置 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养,每日观察至第 7 天,细胞出现明显病变时取出,置于-20℃ 冻融 3 次后,盲传或检测^[5]。

1.6 病原的 PCR 鉴定

分别提取分离病毒、病料以及已知坦布苏病毒阳性病毒液的核酸,用禽流感(AIV)、新城疫(NDV)、减蛋综合征(EDSV)、传染性支气管炎(IBV)、鸭病毒性肝炎(DHV)、鸭瘟(DPV)等病毒及坦布苏病毒的引物进行 PCR 检测。

1.7 序列测定分析

根据鸭、鹅坦布苏病毒 E 基因序列^[2],设计 1 对特异性引物(F:5'-GGTCATCAGCCTGAACAT-3';R:5'-AATTGCTCTCCCACTTCT-3'),用于扩增该病毒 E 基因部分序列,预计片段大小为 533 bp。PCR 反应体系:10×PCR buffer 2.5 μL、25 mol/L MgCl₂ 1.50 μL、2.5 mol/L dNTP 2.0 μL、上下游引物各 0.50 μL、反转录产物 2.50 μL、Ex Taq 酶 0.25 μL、ddH₂O 补足至 25.00 μL。PCR 反应条件:94℃ 预

变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 52 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。循环反应结束后, 取 10.0 μL 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并观察结果。用胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物片段并与 pMD18-T 克隆载体连接, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细菌^[9]。经酶切鉴定后, 挑选阳性克隆送 Invitrogen 公司进行基因序列测定, 并对测序结果进行对比分析。

1.8 部分生物学特性测定

1.8.1 部分理化特性测定 按参考文献[6]的方法, 测定分离病毒对乙醚、三氯甲烷、脱氧氟尿苷等的敏感性。

1.8.2 血凝特性 按参考文献[6]的方法, 在 37 ℃、pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液中测定分离病毒对鸭、鹅红细胞的血凝性。

1.8.3 动物回归试验 将收集的含病毒细胞液肌肉接种于 10 羽 9 日龄鸭, 0.2 mL/只, 另取同日龄鸭 10 羽接种同剂量正常细胞培养液, 隔离饲养, 连续观察 14 d, 于攻毒后第 3 天分别扑杀试验组与对照组鸭各 5 只进行剖解观察, 并采取病料进行病毒鉴定^[2]。

2 结果与分析

2.1 病原分离

取典型发病鸭的心血、肝组织等接种于普通琼脂和鲜血琼脂平板培养 48 h, 均未分离到细菌, 说明发病鸭无细菌性疾病感染。

2.2 病毒分离

2.2.1 鸡胚分离 通过 SPF 鸡胚尿囊腔接种, 连续观察 7 d, 未见鸡胚死亡。无菌条件下收集其尿囊液, 并以 9 日龄 SPF 鸡胚传代, 接种后第 4 天发现有部分鸡胚死亡, 部分胚肝中有出血、坏死病变。无菌条件下收集死亡鸡胚尿囊液病毒(暂命名为 NJX-4 病毒株), 经无菌检验为阴性。将冻存的 SN01 病毒株病毒液以 10 日龄 SPF 鸡胚传接 2 代, 收集死亡鸡胚尿囊液病毒, 冻存备用。

2.2.2 细胞分离 病料接种 vero 细胞后第 3 天开始出现少量变圆、脱落等病变, 连续传代 2 次, 于接种后第 3 天出现 50% 病变, 收集细胞液, 冻存备用。

2.3 病原的 PCR 鉴定

2.3.1 不同引物 PCR 扩增 分离病毒中未扩增到禽流感(AIV)、新城疫(NDV)、减蛋综合征(EDSV)、传染性支气管炎(IBV)、鸭病毒性肝炎(DHV)、鸭瘟(DPV)等病毒的目的片段, 可以初步排除以上病毒的感染。分离株用坦布苏病毒特异引物进行扩增, 为阳性。

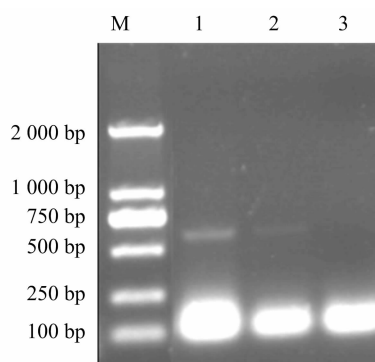
2.3.2 特异性引物 PCR 扩增 用特异性引物对分离株 SN01、坦布苏病毒参考阳性株、阴性对照进行扩增, PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果分离株 NJX-4、参考阳性株均在 530 bp 左右出现目的条带, 阴性对照则未出现目的条带(图 1)。

2.4 PCR 产物克隆与测序

测序结果经 DNASTAR 分析表明, 分离株与 GenBank 上登录和实验室保存的坦布苏病毒 E 基因序列同源性在 99% 以上。

2.5 分离病毒初步鉴定

2.5.1 部分理化特性鉴定 分离病毒对三氯甲烷、乙醚敏



M—DNA marker (DL2000); 1—分离毒株; 2—坦布苏病毒参考阳性株; 3—阴性对照

图1 PCR 产物凝胶电泳结果

感, 对脱氧氟尿苷(FUDR)不敏感, 表明分离病毒是无囊膜的 RNA 病毒。

2.5.2 血凝性测定 分离病毒在 37 ℃、pH 值 7.2 的条件下不能凝集鹅、鸭的红细胞, 排除它为禽流感病毒、副黏病毒和产蛋综合征病毒的可能。

2.5.3 动物回归试验 分离病毒不能致死试验鸭, 但可引起发病, 试验组鸭于攻毒后第 3 天出现卧地不起、瘫痪等症状; 剖解 5 只试验鸭观察, 心肌和肝脏边缘均出现出血斑, 2 只试验鸭腿部肌肉有少量出血点, 与临床发病鸭较为相似。对照组鸭均未出现临床症状和病变。采取发病鸭肝脏用坦布苏病毒特异性引物进行 PCR 扩增, 结果为阳性。

3 小结与讨论

本研究从江苏省南京市某发病肉鸭群中分离到 1 株病毒, 通过实验室检测排除了它为禽流感、产蛋综合征、新城疫、传染性支气管炎、鸭瘟、鸭肝炎等病毒的可能; 鸭坦布苏病毒特异性 RT-PCR 鉴定及测序分析结果表明该分离病毒为黄病毒科坦布苏病毒^[2], 与 2010 年蛋(种)鸭、蛋(种)鹅发生的坦布苏病毒具有高度同源性^[10]。

此次肉鸭感染坦布苏病毒临床致死率不高, 使用抗菌药物和抗病毒药物治疗均无明显效果。临床剖解病变主要以多器官出血为主, 心肌、肝脏有出血斑, 心包积有黄色液体, 气囊膜浑浊, 脾脏偶有肿大坏死, 部分病死鸭腿部肌肉有出血斑。这与蛋(种)鸭、蛋(种)鹅感染坦布苏病毒的病变多有相似之处^[11-12]。动物回归试验虽未致试验鸭死亡, 但可引起发病, 病鸭表现与临床相似的症状和病变^[12]。有关该病毒是否能由感染引起蛋(种)鸭产蛋下降扩展到感染肉鸭, 目前尚未确定, 还需要进一步进行流行病学调查、分子生物学调查和致病机理等研究^[7-8]。

坦布苏病毒病自 2010 年在我国浙江、福建等地鸭场首次发生, 在短时间内从少数地区鸭场发病发展到全国多部分地区的大流行, 这在我国近年来家禽新发传染病的流行中较为少见^[3], 其传染来源、致病机理目前尚不明确。大多数学者认为吸血的节肢动物(如蚊、蝉)是坦布苏病毒的传播媒介, 该病在秋季流行严重可能与蚊虫有关^[5,13]。关于该病的防治, 目前尚无有效的特异性方法。预防该病, 除加强日常安全卫生管理, 定期进行消毒和药物预防外, 还必须做好养殖场

(下转第 297 页)

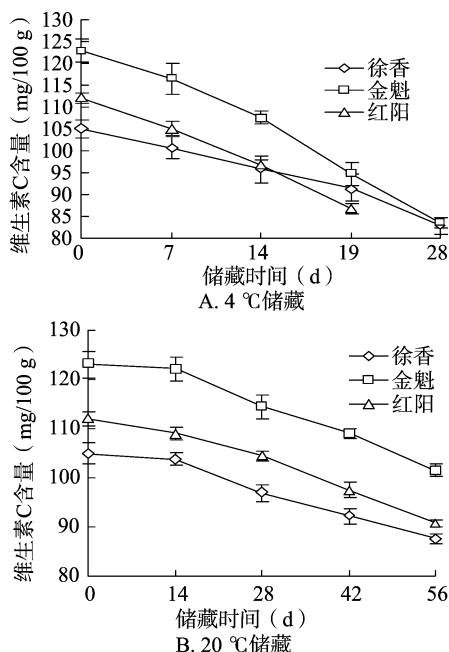


图4 猕猴桃储藏过程中维生素C含量变化

果肉硬度均高于徐香、红阳,所以金魁的耐储性好于其他2个品种。在4 °C储藏条件下,金魁果肉硬度变化呈“快-慢-快-慢”的变化趋势,而在20 °C条件下呈“慢-快-慢”的变化趋势,其原因可能是在4 °C条件下第1个试验间隔较长,其迅速下降的时间范围可能是在7~14 d。

在20 °C储藏条件下,红阳在采后14 d内,伴随着果肉硬度的迅速下降,TSS含量迅速增加;徐香在采后7 d内果肉硬度下降速度和TSS含量上升速度均缓慢,7~19 d果肉硬度迅速下降,在7~14 d TSS含量增加缓慢,14~19 d TSS含量迅速增加,TSS含量增加速度慢于果肉硬度下降速度。与徐香、红阳相比,金魁果肉硬度和TSS含量变化较缓,且TSS含量增加速度同样慢于硬度下降速度。

本研究表明,低温储藏延缓了猕猴桃果肉硬度下降速度,延缓了可溶性固形物和总糖含量的增加速度,抑制了维生素

C含量下降速度。低温可以抑制猕猴桃果实成熟,达到延缓后熟,延长衰老,保持果实鲜度的目的。

综合考虑,在不同储藏温度下猕猴桃品质变化存在差异,在4 °C条件下猕猴桃储藏28~42 d时是最佳可食状态。在20 °C条件下,红阳在7~14 d,徐香、金魁在14~19 d是最佳可食状态。

参考文献:

- [1] 朱鸿云. 猕猴桃[M]. 北京:中国林业出版社,2009:260-261.
- [2] Zhang L H, Li S F, Liu X H, et al. Effects of ethephon on physico-chemical and quality properties of kiwifruit during ripening[J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 65(1): 69-75.
- [3] Femenia A, Sastre-Serrano G, Susana S, et al. Effects of air-drying temperature on the cell walls of kiwifruit processed at different stages of ripening[J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, 42(1): 106-112.
- [4] Pranamornkith T, East A, Heyes J. Influence of exogenous ethylene during refrigerated storage on storability and quality of *Actinidia chinensis* (cv. Hort16A) [J]. Postharvest Biology and Technology, 2012, 64(1): 1-8.
- [5] Agar I T, Massantini R, Hess-Pierce B, et al. Postharvest CO₂ and ethylene production and quality maintenance of Fresh-Cut kiwifruit slices[J]. Journal of Food Science, 1999, 64(3): 433-440.
- [6] Fisk C L, Silver A M, Strik B C, et al. Postharvest quality of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* 'Ananasnaya') associated with packaging and storage conditions [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 47(3): 338-345.
- [7] 曾荣, 陈金印, 李平. 美味猕猴桃果实后熟过程中主要品质指标的变化[J]. 江西农业大学学报:自然科学版, 2002, 24(5): 587-590.
- [8] 王学奎. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2006:202.
- [9] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 1996: 79-81.
- [10] genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [8] Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, et al. Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. USA: Elsevier's Academic Press, 2005: 981-998.
- [9] 萨姆布鲁克 J D, 拉塞尔 W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 译. 北京:科学出版社, 2002.
- [10] 傅光华, 黄瑜, 施少华, 等. 鸡黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33(3): 1-2.
- [11] 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.
- [12] 王友令, 袁小远, 杨金兴, 等. 1株鸭坦布苏病毒人工感染雏鸭的病理学研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(1): 66-70.
- [13] Kono Y, Tsukamoto K, Abd Hamid M, et al. Encephalitis and retarded growth of chicks caused by Sitiawan virus, a new isolate belonging to the genus Flavivirus[J]. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2000, 63(1/2): 94-101.

(上接第229页)

蚊、虫等的防治工作。

参考文献:

- [1] 张琳, 逯茂洋, 胡北侠, 等. 4株鸭坦布苏病毒包膜蛋白基因的分子进化分析及表达[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(2): 175-180.
- [2] 黄欣梅, 李银, 赵冬敏, 等. 新型鹅黄病毒 JS804 毒株的分离与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(2): 354-360.
- [3] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(12): 3-6.
- [4] 滕巧决, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6): 1-4.
- [5] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 一种引起种(蛋)鸭产蛋骤降新病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2010, 25(6): 663-666.
- [6] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社, 1997: 314-364.
- [7] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary