

芮 艺,徐 洲,赵宝华. 乳鸽新城疫病毒的分离和鉴定[J]. 江苏农业科学,2021,49(4):116-119.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.04.022

# 乳鸽新城疫病毒的分离和鉴定

芮 艺<sup>1</sup>, 徐 洲<sup>2</sup>, 赵宝华<sup>3</sup>

(1. 徐州生物工程职业技术学院,江苏徐州 221006; 2. 扬州大学兽医学院,江苏扬州 225009;  
3. 江苏省家禽科学研究所,江苏扬州 225115)

**摘要:**江苏某肉鸽养殖合作社饲养的乳鸽出现扭头等神经症状,死亡率达 65%,剖检可见脑部出血、颈部皮下出血、十二指肠出血。从病死乳鸽中采集病料,分离到 1 株鸽新城疫强毒株,病毒毒力测定其 MDT 为 52 h、ICPI 为 2.2,动物回归试验表明具有较高的致病力,基因测序其 *F* 基因型为 Class II 基因 VIb 亚型。病理组织学研究发现,新城疫病毒会引起非化脓性脑炎和出血性坏死。研究结果为了了解江苏地区乳鸽新城疫的发生、流行和组织损害提供了研究数据。

**关键词:**乳鸽;新城疫病毒;毒力;*F* 基因型;病理组织学

**中图分类号:**S852.65<sup>+</sup>7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)04-0116-04

鸽新城疫,俗称鸽瘟,又称鸽 I 型副黏病毒病,是鸽的重要传染病。该病危害极大,鸽群常突然发病,蔓延迅速,具有发病快、流行期长、发病率和死亡率高的特点,病死率一般为 30%~80%,严重时,死亡率可达 95% 以上<sup>[1]</sup>。病鸽的康复时间较长,通常需要 1 月左右才逐渐康复,有些需要更长时间才能康复,部分患病鸽表现扭头等神经症状,从而丧失了其经济价值,损失严重<sup>[2]</sup>。

江苏徐州某肉鸽养殖合作社成员饲养 2 000 多对肉鸽,2019 年 11 月入冬后,其乳鸽不断地出现死亡现象,死亡的有 7 日龄小乳鸽,也有 20 多日龄大的乳鸽,起初死亡 2~3 只/d,成年鸽临床上未发现明显异常。1 周后乳鸽死亡近 10 只/d;部分成年鸽拉稀,并出现零星死亡。解剖病死乳鸽,主要表现脑部出血,颈部皮下出血,十二指肠等肠道出血,少部分可见腺胃乳头、肌胃出血、泄殖腔黏膜出血。病死成年鸽脑部出血不明显,此病变与乳鸽的解剖病变有明显差异,但可见颈部皮下、腺胃乳头、肌胃和十二指肠出血<sup>[3]</sup>。

为此,本研究团队从病死乳鸽中采集病料,分

离到 1 株鸽新城疫病毒,进行了鸽新城疫病毒毒力测定,对新城疫病毒 *F* 基因测序,开展了病理组织学研究,以期为了了解江苏地区乳鸽新城疫的发生、流行和组织损害提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病料 无菌采集江苏徐州某肉鸽养殖合作社病死乳鸽的脑组织,冻存备用。

1.1.2 试验鸡胚 SPF 鸡蛋购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司,扬州大学实验室孵化至 10 日龄鸡胚供使用。

1.1.3 试剂 新城疫病毒标准阳性血清(生产批号 20190508)、产蛋下降综合征病毒阳性血清(生产批号 20190308)和 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒阳性血清(生产批号分别为 20190522、20181206、20191116),购自哈尔滨国生生物科技股份有限公司;TRIzol,购自 Invitrogen 公司;AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、ExTaq 酶、pMD18-T、感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 回收试剂盒,购自 OMEGA 公司<sup>[4]</sup>。

1.1.4 未免疫鸽 未免疫鸽,购自扬州市绿杨畜禽养殖专业合作社,扬州大学实验动物房饲养供试验用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病毒的分离和鉴定

1.2.1.1 病毒分离 2020 年 3 月 23 日于扬州大

收稿日期:2020-06-28

基金项目:苏北科技专项(编号:SZ-SQ2017043);江苏省大学生创新创业训练重点项目(编号:201911117011Z)。

作者简介:芮 艺(1967—),男,江苏泰兴人,副教授,主要从事动物疾病教学和科研工作。E-mail:13814423402@139.com。

通信作者:赵宝华,硕士,研究员,主要从事禽病传染病研究工作。  
E-mail:yzhaobao@126.com。

学生物安全三级实验室,取出无菌采集病死乳鸽的脑组织病料,将病料剪成小块,置于研磨器内磨碎,用生理盐水将病料按 1:5 稀释制成组织混悬液,经 3 次冻融后,置离心机中以 5 000 r/min 离心 10 min,取上清,加入“双抗”(含青霉素 1 000 mg/mL 和链霉素 1 000 mg/mL),室温作用 4 h。取处理好的病料上清液,经尿囊腔接种 10 日龄的 SPF 鸡胚,每枚 0.2 mL,用蜡封孔,置于 37 ℃ 继续孵化,弃去 24 h 死亡的鸡胚。24 h 后每 2 h 照蛋 1 次,收取死亡的鸡胚,置 4 ℃ 冰箱,4 h 后无菌收集其尿囊液<sup>[4]</sup>。

1.2.1.2 微量血凝试验和血凝抑制试验 血凝抑制(HA)试验和血凝抑制(HI)试验按常规微量方法。2020 年 4 月 26 日于江苏省家禽科学研究所实验室,对收获的尿囊液进行 HA 试验,对 HA 阴性者盲传 3 代。经检测,对具有血凝性的鸡胚尿囊液,再用抗新城疫病毒标准阳性血清、产蛋下降综合征病毒阳性血清和 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒阳性血清进行 HI 试验<sup>[4]</sup>。

1.2.1.3 病毒毒力测定 2020 年 5 月 11 日于扬州大学生物安全三级实验室,采用世界动物卫生组织(OIE)规定的方法测定分离病毒的鸡胚最小致死量平均死亡时间(MDT)和 1 日龄鸡脑内接种致病指数(ICPI)<sup>[5]</sup>。

1.2.1.4 动物回归试验 2020 年 5 月 21 日于扬州大学实验动物房隔离器,分别以 0.1 mL 的分离毒株第 3 代种毒液对 10 羽 1 月龄未免疫的鸽进行肌肉注射,观察 20 d,记录发病和死亡情况,未发病的鸽则采血检测新城疫抗体<sup>[6]</sup>。同时设置未攻毒的未免疫鸽 10 羽作为对照,观察记录,采血检测新城疫抗体。

1.2.2 引物的设计 根据 GenBank 中收录的数百条 NDV *F* 基因序列<sup>[7]</sup>,用 Primer 5.0 自行设计扩增 NDV *F* 基因部分片段的引物,P1:5' - AGGATCCTTGGTCTACAGGTAAGTC - 3';P2:5' - AAAGCTTGTT CGTTCCTCATCTGTGTTTC - 3'。引物交生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.3 RT-PCR 按照 TRIzol 试剂盒的说明对第 3 代分离毒株的尿囊液进行病毒 RNA 的抽提,加入适量的 DEPC 水溶解。在 PCR 管中加入 RNA 9.5 μL,10 mmol/L dNTP 2 μL,10 × RTbuffer 2 μL,AMV 反转录 1 μL,RNA 酶抑制剂 0.5 μL,随机引物 1 μL,加灭菌去离子水至 20 μL,混匀,室温下作用 10 min,接着 42 ℃ 水浴 1 h,即为第一链 cDNA,以反

转录产物为模板进行 PCR。PCR 反应体系为:反转录产物 2 μL,5 × RTbuffer 5 μL,10 mmol/L dNTP 2 μL,20 μmol/L 的上下游引物各 1 μL,Ex - Taq 0.25 μL,加灭菌去离子水至 25 μL。反应条件:94 ℃ 2 min;然后 94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min,取 5 μL 反应产物在 1% 琼脂糖中电泳进行检验<sup>[8]</sup>。

1.2.4 连接、转化和产物的测序 按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明回收 PCR 产物,按照 pMD18 - T 载体试剂盒说明进行连接,16 ℃ 连接过夜。将连接产物转化感受态细胞 DH5α,均匀涂布在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37 ℃ 培养 18 h 后,挑取大小合适的白色单菌落进行培养。将菌液 PCR 阳性者送上海华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.5 病毒 *F* 基因片段的序列分析 利用 DNA STAR 5.0 软件分析测序结果,并翻译 *F* 基因裂解位点氨基酸序列。对 *F* 基因核苷酸序列进行同源性分析,并将 *F* 基因片段序列与 GenBank 中收录的 NDV 毒株绘制系统进化树;分析 *F* 基因裂解位点区(112 ~ 117)氨基酸序列特征。通过对 *F* 基因分型相关序列的生物遗传进化分析进行基因分型<sup>[9]</sup>。

1.2.6 病理组织学研究 2020 年 3 月 23 日于扬州大学生物安全三级实验室,采集病死乳鸽的脑、肺、肝、肠、脾组织器官,浸泡于 10% 福尔马林溶液中,按常规病理切片制作方法,按次序对其组织器官进行固定、脱水、浸泡包埋、切片、贴片、H. E 染色和封片<sup>[10]</sup>,放置高倍显微镜下观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒分离鉴定结果

从乳鸽脑组织中分离得到 1 株具有血凝性的病毒株,在鸡胚上传第 3 代后,鸡胚出现规律性死亡,死亡时间集中于 48 ~ 60 h。其第 3 代尿囊液 HA 效价为 27,血凝性能被新城疫阳性血清所抑制,但不能被产蛋下降综合征及 H5、H7、H9 亚型禽流感阳性血清所抑制。经鉴定其为鸽新城疫病毒,称为鸽新城疫徐州毒株,命名为 PPMV - 1/Pigeon/XZ/CH/2019(简称 XZ2019)。

### 2.2 病毒毒力测定结果

试验表明,鸽新城疫徐州毒株的 MDT 为 52 h、ICPI 为 2.2,根据 OIE 推荐的毒力判定标准,可判定其为速发型新城疫病毒。

### 2.3 动物回归试验结果

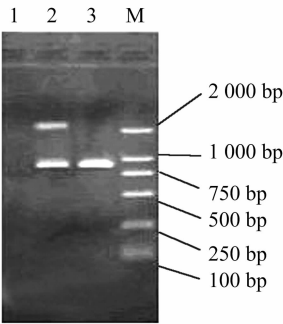
经注射鸽新城疫徐州毒株的 10 羽非免疫鸽,

2 d 3 羽发病,4 d 内全部发病。3 d 出现 2 羽死亡,4 d 死亡 3 羽,6 d 死亡 4 羽,其他存活至 20 d 出现扭头等神经症状。检测未死亡鸽的血清,其 NDV 的 HI 效价达到 25,表明鸽感染了鸽新城疫徐州毒株。对照组 10 羽非免疫鸽表现正常,20 d 采集鸽的血清,进行 NDV 的 HI 效价测定,均为 0。

2.4 鸽新城疫徐州毒株 F 蛋白基因序列及同源性分析

鸽新城疫徐州毒株 F 蛋白基因 PCR 扩增产物见图 1。由图 1 可知,F 蛋白裂解位点处的序列(112R-R-Q-K-R-117F)与新城疫强毒在这一区域的序列相符,与国内强毒 F48E9 株、疫苗毒 La Sota 株的核苷酸同源性分别为 85.2%、80.0%,氨基酸同源性为 83.6%、81.5%。经基因的遗传进

化分析(图 2)可知,鸽新城疫徐州毒株属于 Class II 基因 VIb 亚型。



M 表示 NDA Marker DL 2000; 1 表示以纯水为模板的 PCR 产物; 2 表示新城疫徐州毒株 F 基因的 PCR 扩增产物; 3 表示新城疫江南毒株 F 基因的 PCR 产物(阳性对照株,系江苏省家禽科学研究所 20 世纪 90 年代分离保存的鸽新城疫毒株)

图1 新城疫徐州毒株 F 基因的 PCR 扩增产物

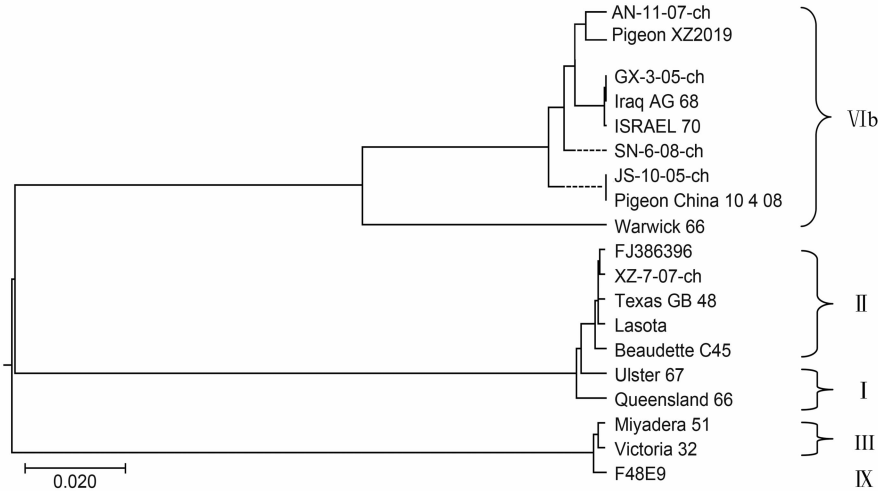


图2 鸽新城疫徐州毒株病毒 F 基因进化树图

2.5 病理组织学研究结果

通过病理切片观察(图 3)可知,鸽新城疫病毒能引起非化脓性脑炎,坏死灶中心和周围有大量多核巨细胞、巨噬细胞和淋巴细胞浸润。由图 4 可知,脑组织内血管充血、水肿和出血,血管中层水肿变性,毛细血管和小动脉玻璃样变,小血管生成透明血栓及血管内皮细胞坏死;肠道黏膜绒毛脱落,出血性坏死。肝脏出现网状组织细胞增生,脾脏的皮质部和生发中心可见局灶性淋巴细胞的空泡形成和破坏,出现坏死性损害;肺组织损害不明显。

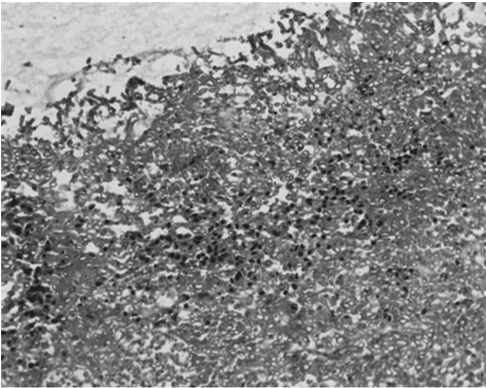


图3 非化脓性脑炎(H.E染色,400×)

3 小结与讨论

本研究从病死乳鸽脑组织中分离得到 1 株鸽新城疫病毒株,其 MDT 为 52 h、ICPI 为 2.2,动物回归试验及其 F 蛋白裂解位点处的序列测定,均表明鸽

新城疫徐州毒株为强毒株,对鸽尤其是乳鸽具有较强的致病力,与临床表现相符。据绘制的基因遗传进化树,鉴定出该分离株为基因 VI 型,为国内常发生的病毒基因型毒株<sup>[11]</sup>。本结果提示我们在肉鸽

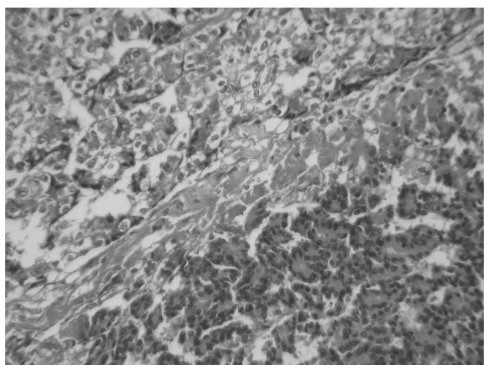


图4 出血性肠炎(H.E染色, 400×)

生产上需加强对鸽新城疫强毒株的防控,尤其需加强鸽场的卫生消毒工作,避免鸽新城疫强毒株的侵入,减少鸽场内的病原数量,降低鸽群的发病风险。

通过病理组织学观察,鸽新城疫病毒具有较强的嗜神经性,从而使乳鸽临床上出现扭头等神经症状。鸽新城疫病毒对神经系统的损害对乳鸽的危害尤其严重,由于鸽是晚成鸟,乳鸽出生后并不张眼,自身无法觅食,完全靠亲鸽哺喂,其脑部神经受鸽新城疫病毒侵袭而损伤后,造成乳鸽在哺食时抬头或举头困难,致使无法吃到食物,这可能是乳鸽发生鸽新城疫后死亡率较高的原因之一。

通过基因的遗传进化分析,鸽新城疫徐州毒株与目前国内流行株属于同一遗传分支,与弱毒疫苗株 La Sota 的遗传距离较远,提示需加强鸽新城疫专用疫苗的研制,并建议对乳鸽新城疫防制应尽量选择鸽新城疫专用疫苗,专用疫苗对鸽新城疫防疫将更有针对性,免疫效果也会更好,避免仅使用鸡新城疫弱毒 La Sota 株而影响免疫效果的问题<sup>[12]</sup>。另

外,为有效预防乳鸽发生新城疫,生产上需加强对亲鸽的新城疫防疫工作,以提高乳鸽的母源抗体水平,提高乳鸽特异性抵抗力,避免乳鸽早期被新城疫病毒感染而造成较大的经济损失。

#### 参考文献:

- [1] 赵宝华,戴鼎震,杨一波. 鸽病防治图谱[M]. 上海:上海科学技术出版社,2017.
- [2] Saif Y M. 禽病学[M]. 12 版. 北京:中国农业出版社,2016: 82-99.
- [3] 孙桂芹. 鸽 I 型副黏病毒病(简称鸽瘟)的发生与防治[J]. 中国动物保健,2017,19(12):93-94.
- [4] 杨丽云,阮二垒,陈芳艳,等. 1 株肉鸽新城疫强毒的分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(4):201-204.
- [5] 马玉峰,李 敏,李琛,等. 两株鸽 I 型副黏病毒的分离与鉴定[J]. 中国家禽,2019,41(15):67-69.
- [6] 熊晓妍,孙兴臣,李敏婕,等. 赛鸽新城疫病毒南京分离株的生物学特性及其 F 和 HN 基因的分析[J]. 中国兽医科学,2017,39(11):1363-1370.
- [7] 刘华雷,周 斌,郁 斌,等. 五株鸽副黏病毒国内分离株 F 基因片段的克隆与分子特性[J]. 病毒学报,2004,20(4):378-381.
- [8] 李 治,范俊清,李 冉,等. 信鸽新城疫病毒的分离、鉴定及 F 基因的进化分析[J]. 中国家禽,2018,40(8):56-59.
- [9] 张彦红,孙敏华. 1 株鸽新城疫病毒分离鉴定及分析[J]. 养禽与禽病防治,2018,40(8):17-21.
- [10] 郭亚男,马文才,何生虎. 肉鸽神经系统病理组织病理学观察[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(176):286-287.
- [11] 李仕超,刘佩红,丁 铲,等. 六株鸽源新城疫病毒的分离、鉴定与生物信息学分析[J]. 中国动物传染病学报,2014,22(5): 1-9.
- [12] 刘秀梵,胡顺林. 新城疫病毒的进化及其新型疫苗的研制[J]. 中国兽药杂志,2010,44(1):12-18.