

网络出版时间:2015-10-13 08:46

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.11.007

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151013.0846.014.html>

Ⅶ型 NDV 对鸽子和鸡的致病性差异研究

杨少华,许传田,胡北侠,张琳,黄庆华,张秀美

(山东省农业科学院 畜牧兽医研究所 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室,山东 济南 250100)

【摘要】 【目的】研究 NDV 强毒(基因Ⅶ型)对鸽子和 SPF 鸡的致病性差异。【方法】将试验鸽和 SPF 鸡随机分为 4 组,每组 10 只,给其中 2 组分别滴鼻和肌肉注射鸭源 NDV 分离株 Duck/China/SD03/2009,攻毒剂量为 $10^{6.2}$ EID₅₀,设空白对照组和同居感染组。攻毒后观察临床症状和剖检变化,并对攻毒后 3,5,7,14 d 动物的血清抗体,喉头、泄殖腔的排毒情况及内脏器官的病毒滴度、抗体效价进行检测。【结果】鸽子感染 NDV 强毒后呼吸道症状不明显,但脑膜严重出血,腺胃和肠道轻度出血,死亡率为 10%~30%;而同期 SPF 鸡攻毒后表现为急性感染症状,死亡率为 100%。鸽子在攻毒后第 7 天均检出排毒,至 14 d 时均未检出。攻毒后 5~14 d 在所检鸽体内脏器官中均检出病毒,以脑、肺、肠中的病毒含量较高。病毒也可诱导鸽子产生较高水平的血清抗体,至 14 d 时血清抗体 HI 滴度为 512~2 048。【结论】基因Ⅶ型新城疫强毒株 Duck/China/SD03/2009 对鸽子和鸡的致病性差异明显,与 SPF 鸡相比,鸽子感染后呼吸道和消化道症状较轻,死亡率也较低,表明基因Ⅶ型 NDV 强毒株能感染鸽子,但对鸽子的致病性较低。

【关键词】 鸽;SPF 鸡;新城疫病毒;致病性

【中图分类号】 S855.3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)11-0041-04

Differences in pathogenicity of genotype Ⅶ Newcastle disease virus to pigeons and chickens

YANG Shao-hua, XU Chuan-tian, HU Bei-xia, ZHANG Lin,

HUANG Qing-hua, ZHANG Xiu-mei

(Shandong Key Lab of Animal Disease Control and Breeding, Institute of Animal Science and Veterinary Medicine,
Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to compare the pathogenicity of genotype Ⅶ NDV to pigeon and chickens. 【Method】 Forty pigeons and forty SPF chickens were divided randomly into four groups, respectively, with 10 in each group. Two groups were infected with NDV strain Duck/China/SD03/2009 with the dose of $10^{6.2}$ EID₅₀. The other groups were blank control group and cohabitation infection group. Clinical signs and gross lesions were observed. Serum antibody virus shedding and virus titer in organs at different times after infection were also detected. 【Result】 Respiratory symptoms of pigeons inoculated with Duck/China/SD03/2009 strain were not obvious. Dead pigeons were mainly manifested by meningeal hemorrhage, glandular stomach and intestinal mild bleeding with mortality rate of 10%—30%. Chickens experimentally infected characterized by acute symptoms and the mortality rate was 100%. Virus shedding of three pigeon groups was detected at 7 d post infection, but was not detected at 14 d. Virus was detected in organs of dead pigeons at 5, 7, and 14 d post infection, and brain, lung and intestine had higher virus titers than other organs. The virus also induced infected pigeons to generate higher HI serum antibody titers of

【收稿日期】 2014-04-03

【基金项目】 公益性行业(农业)科研专项(201003012, 201303033);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-42-Z12)

【作者简介】 杨少华(1978—),女,山东烟台人,助理研究员,硕士,主要从事禽病综合防控技术研究。E-mail: ysh7865@163.com

【通信作者】 张秀美(1956—),女,江苏徐州人,研究员,主要从事禽病综合防控技术研究。E-mail: zxm820410@163.com

512—2 048 at 14 d post infection.【Conclusion】 The pathogenicity of virulent NDVs of genotype VII strain Duck/China/SD03/2009 to the pigeons and SPF chicken was significantly different. Compared with SPF chickens,infected pigeons manifested lighter respiratory and gastrointestinal symptoms and had a lower mortality rate. It is indicated that the genotype VII NDV can infect pigeons,but the pathogenicity is low.

Key words: pigeon;SPF chicken;Newcastle disease virus;pathogenicity

新城疫(Newcastle disease,ND)是严重危害养禽业的病毒性传染病,病原是新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)。NDV 又称为禽副粘病毒 1 型(Avian paramyxovirus type 1,APMV-1),属于副粘病毒科副粘病毒亚科腮腺炎病毒属^[1],其基因组为一条单股负链 RNA,长约 15 kb,从 3'到 5'包含 6 个开放性阅读框,依次编码核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、膜蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶(HN)和大分子蛋白(L)6 个结构蛋白(3'-NP-P-M-F-HN-L-5')^[1]。NDV 宿主范围非常广泛,不但能感染家禽,而且可以感染水禽和多种鸟类^[2-3]。鸽副粘病毒 1 型(Pigeon paramyxovirus type 1,PPMV-1)起源于 20 世纪 70 年代后期中东地区^[4],随后传到欧洲以及其他国家和地区,我国多数地区也有该病的报道^[3,5-7]。分子流行病学研究结果显示,从发病鸽群中分离的 NDV 均为基因 VI 型^[2-5,7],而目前危害我国家禽的 NDV 强毒为基因 VII 型^[2,8-9]。为了更好地理解 NDV 对不同宿主的致病性,本研究选取 1 株鸭源 NDV 强毒分离株在鸽子和鸡上进行了致病性差异评价,旨在为 ND 的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 病 毒 新城疫病毒分离株 Duck/China/SD03/2009 是从山东发病鸭群中分离的,其最小致死鸡胚平均死亡时间(MDT)和 1 日龄雏鸡脑内接种致病指数(ICPI)分别为 52 h 和 1.87,属于基因 VII 型 NDV 强毒株。病毒的鸡胚半数感染量为 $10^{-8.2}$ EID₅₀/0.1 mL。

1.1.2 SPF 鸡胚、SPF 鸡和试验鸽 10 日龄 SPF 鸡胚和 30 日龄 SPF 鸡,购自山东省农业科学院家禽研究所 SPF 鸡研究中心;35 日龄健康非免疫肉鸽购自某个体养殖户。

1.2 方 法

1.2.1 试验分组 将 40 只试验肉鸽随机分成 4 组(A1、A2、A3 和 A4),每组 10 只;将 40 只 30 日龄 SPF 鸡随机分成 4 组(B1、B2、B3 和 B4),每组 10

只。A1、A2 组鸽与 B1、B2 组鸡分别以滴鼻和肌肉注射 2 种途径攻毒 Duck/China/SD03/2009,攻毒剂量均为每只 $10^{6.2}$ EID₅₀;A3 和 B3 组为同居感染对照,分别与 A1、A2 和 B1、B2 组动物饲养在同一隔离器内;A4 和 B4 为空白对照组,分别肌肉注射 0.1 mL 无菌生理盐水。攻毒后每天观察并记录各组试验鸡和鸽的精神、采食、粪便及发病死亡情况。

1.2.2 样品的采集与检测 攻毒后第 3、5、7 和 14 天,每组随机取 5 只试验动物采集喉头、泄殖腔棉拭子,处理后接种 10 日龄 SPF 鸡胚,检测其排毒情况;对攻毒后第 5、7、14 天死亡的鸽子剖检,取心、脑、肺、肝、肾、腺胃、肠等内脏器官,研钵中研磨后以 PBS 依次作 10 倍稀释,进行鸡胚尿囊腔接种,每个稀释度接种 8 枚 10 日龄 SPF 鸡胚,置 37 ℃ 孵化 48 h,弃去 24 h 内死亡鸡胚,收获 24 h 后死亡鸡胚和 48 h 存活鸡胚的尿囊液,进行 HA 效价的测定,Reed-Muench 法计算病毒滴度;攻毒后第 7 和 14 天每组取 5 只鸽子,翅静脉采血约 1 mL/只,分离血清,通过血凝抑制试验(HI)检测 NDV 抗体效价。

2 结果与分析

2.1 NDV 强毒攻毒后试验鸽和鸡的临床症状及病理变化

观察发现,A1 和 A2 2 个攻毒组试验鸽第 3 天采食量下降,第 5 天部分鸽子开始表现出翅膀下垂、瘫痪、流泪等临床症状,呼吸道症状不明显。A2 组鸽子排绿色稀粪严重,攻毒后 5 d 出现死亡。在 14 d 观察期内,A1、A2 和 A3 组鸽病死率分别为 20%、30%和 10%(表 1),病死鸽主要表现脑膜严重出血、腺胃和肠道轻度出血。空白对照组(A4 组)试验鸽精神、食欲正常。

B1、B2 和 B3 各组试验鸡在攻毒后 3 d 开始出现死亡,至第 5 天全部死亡;B4 空白对照组试验鸡观察期内精神、食欲正常(表 1)。

2.2 NDV 强毒攻毒后试验鸽和鸡喉头、泄殖腔的病毒检测结果

攻毒后鸽子喉头、泄殖腔排毒结果显示,3 个试验组鸽子在攻毒后第 7 天均检出排毒,至 14 d 时均

未检出。A2 肌肉注射组试验鸽攻毒后第 3,5,7 和 14 天喉头或泄殖腔棉拭子中 NDV 的总体检出率均低于 A1 滴鼻组。B1~B3 组试验鸡攻毒后至 5 d 时全部死亡,只检测到 3 d 的病毒排毒情况。空白对照组试验鸽(A4)和试验鸡(B4)的病毒检测均为阴性(表 2)。

表 1 NDV 强毒攻毒后试验鸽和 SPF 鸡的死亡率

Table 1 Mortality of experimental pigeons and SPF chickens infected with virulent NDV			
组别 Group	试验动物 Bird	攻毒途径 Infection way	死亡率/% Mortality
A1	鸽 Pigeon	滴鼻 Intranasal	20
A2	鸽 Pigeon	肌肉注射 Intramuscular injection	30
A3	鸽 Pigeon	同居感染 Cohabitant infection	10
A4	鸽 Pigeon	空白对照 Blank control	0
B1	SPF 鸡 SPF chicken	滴鼻 Intranasal	100
B2	SPF 鸡 SPF chicken	肌肉注射 Intramuscular injection	100
B3	SPF 鸡 SPF chicken	同居感染 Cohabitant infection	100
B4	SPF 鸡 SPF chicken	空白对照 Blank control	0

表 2 NDV 强毒攻毒后不同时间试验鸽和 SPF 鸡喉头、泄殖腔中 NDV 的检出率(n=5)

Table 2 NDV detection rate of throat and cloaca of experiment pigeons and SPF chickens at different times post infection with virulent NDV strain(n=5)								
组别 Group	喉头棉拭子 Laryngeal swab				泄殖腔棉拭子 Cloacal swab			
	3 d	5 d	7 d	14 d	3 d	5 d	7 d	14 d
A1	20	40	40	0	0	20	0	0
A2	0	20	20	0	0	0	0	0
A3	0	20	0	0	0	40	20	0
A4	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	60	—	—	0	20	—	—	—
B2	80	—	—	0	40	—	—	—
B3	20	—	—	0	20	—	—	—
B4	0	0	0	0	0	0	0	0

注:“—”表示未进行该项试验。

Note:“—” represents not conducted.

2.3 NDV 强毒攻毒后试验鸽内脏器官的病毒滴度

在 NDV 攻毒后 5,7,14 d 剖检试验鸽心、脑、肺、肝、肾、腺胃和肠,检测病毒滴度,结果见图 1。从图 1 可知,在攻毒后 5~14 d 所检测各脏器均检出 NDV,以脑、肺、肠的病毒含量较高,这与临床剖

检结果基本一致。心、肝、脑的 NDV 滴度在攻毒后 5 d 达最高值,之后呈逐渐下降的趋势。肺、肾、腺胃、肠的 NDV 滴度在攻毒后第 7 天达到最高,之后逐渐下降。

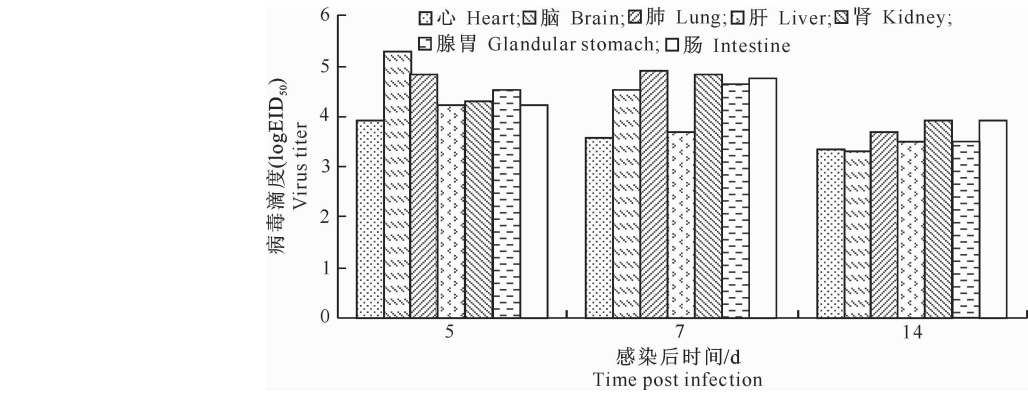


图 1 NDV 强毒攻毒后不同时间鸽子内脏器官的病毒滴度

Fig. 1 Virus titles of pigeons organs at different times post infection with virulent NDV

2.4 NDV 强毒攻毒后试验鸽 NDV 抗体检测结果

由于试验鸡于攻毒后 5 d 全部死亡,因此 B1~B4 组没有进行此项检验。由表 3 可知,攻毒后 7 d,

A1、A2、A3 组鸽子 HI 抗体效价为 8~32,至 14 d 时试验组鸽子 NDV 抗体均上升到较高水平,效价达 512 以上,而同期对照组鸽子 NDV 抗体为 0。

表 3 试验鸽攻毒后 NDV HI 抗体效价

Table 3 Antibody titers of pigeons in hemagglutination inhibition (HI) test

组别 Group	攻毒后 7 d 7 day post infection					攻毒后 14 d 14 day post infection				
	1 号 No. 1	2 号 No. 2	3 号 No. 3	4 号 No. 4	5 号 No. 5	1 号 No. 1	2 号 No. 2	3 号 No. 3	4 号 No. 4	5 号 No. 5
A1	16	8	16	32	16	2 048	1 024	2 048	2 048	1 024
A2	8	16	16	8	32	512	512	1 024	512	2 048
A3	8	0	8	8	8	512	512	512	512	512
A4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3 讨 论

Duck/China/SD03/2009 是从发病鸭群中分离的基因Ⅶ型 NDV 强毒株,对鸡有很强的致病性,攻毒 5 d 后试验鸡全部死亡;而以相同的剂量经滴鼻或肌肉注射途径攻毒鸽,鸽子出现与自然感染相似的临床症状,临床症状较轻,表明 Duck/China/SD03/2009 对鸽子和鸡的致病性差异明显。

本研究中鸽子感染基因Ⅶ型 NDV 的死亡率为 30%,而已有研究发现,基因Ⅵ型 NDV 感染试验鸽最高可导致 100%的病死亡率^[7,10],由此可见,基因Ⅶ型与基因Ⅵ型 NDV 的致病性具有一定的宿主特异性,其原因有待于进一步研究。排毒检测结果表明,各试验组鸽的排毒期均为 7 d;滴鼻组鸽子攻毒后病毒检测阳性率均高于肌肉注射组,推测经过呼吸道途径进入试验鸽体内的病毒量可能高于肌肉注射组。攻毒后 3 d 各组试验鸡喉头泄殖腔棉拭子均检测出排毒,且检出率明显高于试验鸽。对鸽子内脏器官进行病毒滴定结果显示,攻毒后第 5 天时脑的病毒含量最高,其次是肺、腺胃、肾、肠、肝、心,表明 Duck/China/SD03/2009 能在这些组织中较好地增殖,虽然攻毒后 14 d 产生了较高水平的血清抗体,在一定程度上降低了发病率和死亡率,但仍然无法抑制病毒在体内的增殖和排毒。新城疫病毒只有一个血清型,不同毒株新城疫病毒的毒力有很大的差异。研究显示,鸽子对基因Ⅵ型 NDV 比较敏感,从发病鸽群分离到的 NDV 均为基因Ⅵ型^[3,5,11-12]。基因Ⅵ型 NDV 也可以传染给鸡,引起鸡群新城疫的发生^[13-14],并在鸡新城疫的流行上起着一定的作用^[5,11,15]。许如苏^[16]报道用鸽子进行速发型 NDV 传代,第 2 代即不再发病,第 3 代即不能从脏器中分离到病毒,因此认为鸽子对速发型 NDV 自然感染具有抵抗力。本研究中,虽然基因Ⅶ型强毒 NDV 分离株 Duck/China/SD03/2009 对鸽子致病性不强,但鸽群均可被感染,且可通过喉头和泄殖腔向体外排毒,并可使同居鸽群感染发病死亡。因此,有必要采取有效措施做好鸽群 NDV 的防控,切断 NDV

在鸽群和鸡群之间的相互传播,这对于家禽 NDV 的有效防控具有重要意义。

〔参考文献〕

[1] Saif Y M. 禽病学 [M]. 苏敬良,高 福,索 勋,译. 11 版. 北京:中国农业出版社,2005:108-130.
Saif Y M. Disease of avian [M]. Su J L, Gao F, Suo X, translation. 11th ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2005: 108-130. (in Chinese)

[2] Dortmans J C, Koch G, Rottier P J, et al. Virulence of newcastle disease virus: What is known so far [J]. Vet Res, 2011, 42: 122.

[3] Ujvari D, Wehmann E, Kaleta E F, et al. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission [J]. Virus Res, 2003, 96(1/2): 63-73.

[4] Kaleta E F, Alexander D J, Russell P H. The first isolation of the PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons [J]. Avian Pathol, 1985, 14(4): 553-557.

[5] Alexander D J, Russell P H, Collins M S. Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1. Characterization of isolated viruses [J]. Vet Rec, 1984, 114: 444-446.

[6] Collins M S, Strong I, Alexander D J. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed “pigeon PMV-1 viruses” based on the nucleotide sequence of the fusion protein gene [J]. Arch Virol, 1996, 141(3/4): 635-647.

[7] 贾华敏. 鸽Ⅰ型副粘病毒 JSG-4 分离株生物学特性和免疫原性研究 [D]. 江苏扬州:扬州大学,2006.
Jia H M. Researches on the antigenicity and biological characteristics of pigeon paramyxovirus-Ⅰ JSG-4 strain [D]. Yangzhou, Jiangsu: Yangzhou University, 2006. (in Chinese)

[8] 刘秀梵,胡顺林. 新城疫病毒的进化及其新疫苗研制 [J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(1): 12-18.
Liu X F, Hu S L. Evolution of Newcastle disease virus and the development of novel vaccines [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2010, 44(1): 12-18. (in Chinese)

[9] Herczeg J, Wehmann E, Bragg R R, et al. Two novel genetic groups (Ⅶb and Ⅷ) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (Ⅶb) of which reached Southern Europe [J]. Arch Virol, 1999, 144(11): 2087-2099.

- 演变 [J]. 中国科学 C 辑:生命科学,2005,35(5):408-415.
- Hao C Y,Wang L F,Zhang X Y,et al. The genetic diversity of wheat varieties of China [J]. Science in China Series C:Life Sciences,2005,35(5):408-415. (in Chinese)
- [15] 詹克慧,高翔,范平,等. 河南审定小麦品种的骨干亲本分析 [J]. 河南农业大学学报,2006,40(1):11-14.
- Zhan K H,Gao X,Fan P,et al. An analysis of the corner stone parents for registered wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in Henan province [J]. Journal of Henan Agricultural University,2006,40(1):11-14. (in Chinese)
- [16] 武玉国,吴承来,秦保平,等. 黄淮冬麦区 175 个小麦品种的遗传多样性及 SSR 标记与株高和产量相关性状的关联分析 [J]. 作物学报,2012,38(6):1018-1028.
- Wu Y G,Wu C L,Qin B P,et al. Diversity of 175 wheat varieties from Yellow and Huai river valleys facultative wheat zone and association of SSR markers with plant height and yield related traits [J]. Acta Agronomica Sinica,2012,38(6):1018-1028. (in Chinese)
- [17] 李小军,徐鑫,刘伟华,等. 利用 SSR 标记探讨骨干亲本欧柔在衍生品种的遗传 [J]. 中国农业科学,2009,42(10):3397-3404.
- Li X J,Xu X,Liu W H,et al. Genetic diversity of the founder parent orofen and its progenies revealed by SSR markers [J]. Scientia Agricultura Sinica,2009,42(10):3397-3404. (in Chinese)
- [18] 肖永贵,殷贵鸿,李慧慧,等. 小麦骨干亲本“周 8425B”及其衍生品种的遗传解析和抗条锈病基因定位 [J]. 中国农业科学,2011,44(19):3919-3929.
- Xiao Y G,Yin G H,Li H H,et al. Genetic diversity and genome-wide association analysis of stripe rust resistance among the core wheat parent Zhou 8425B and its derivatives [J]. Scientia Agricultura Sinica,2011,44(19):3919-3929. (in Chinese)
-
- (上接第 44 页)
- [10] Alexander D J,Parsons G,Marshall R. Avian paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons:4 laboratory assessment of vaccination [J]. Vet Rec,1986,118(10):262-266.
- [11] Guo H,Liu X,Han Z,et al. Phylogenetic analysis and comparison of eight strains of pigeonparamyxovirus type 1 (PPMV-1) isolated in China between 2010 and 2012 [J]. Arch Virol,2013,158(6):1121-1131.
- [12] Wakamatsu N L,King D J,Kapczynski D R,et al. Experimental pathogenesis for chickens,turkeys,and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002—2003 [J]. Vet Pathol,2006,43(6):925-933.
- [13] Irvine R M,Aldous E W,Manvell R J,et al. Outbreak of Newcastle disease due to pigeon paramyxovirus type 1 in grey partridges (*Perdix perdix*) in Scotland in October 2006 [J]. Vet Rec,2009,165(18):531-535.
- [14] Alexamder D J,Morris H T,Pollitt W J,et al. Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997 [J]. Vet Rec,1998,143(8):209-212.
- [15] Dortmans J C,Rottier P J,Koch G. Peeters BP;Passaging of a Newcastle disease virus pigeon variant in chickens results in selection of viruses with mutations in the polymerase complex enhancing virus replication and virulence [J]. J Gen Virol,2011,92(2):336-345.
- [16] 许如苏. 鸽 I 型副粘病毒的研究 [J]. 华南农业大学学报,1988,9(3):37-45.
- Xu R S. Study on pigeon paromyxovirus type 1 [J]. Journal of South China Agricultural University,1988,9(3):37-45. (in Chinese)