

# 1997-2005 年中国水禽新城疫分子流行病学特点分析

刘华雷<sup>1</sup>, 郑东霞<sup>1</sup>, 孙承英<sup>1</sup>, 徐天刚<sup>1</sup>, 王永坤<sup>2</sup>, 吴延功<sup>1</sup>, 王志亮<sup>1\*</sup>

(1. 中国动物卫生与流行病学中心国家新城疫参考实验室, 青岛 266032;  
2. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

**摘要:** 对 1997-2005 年从国内分离到的 10 株水禽源新城疫病毒(NDV)进行了生物学特性和遗传特性研究。致病指数 MDT 和 ICPI 测定结果表明 10 株分离株均属于强毒株。采用 RT-PCR 扩增了各分离株 F 基因主要功能区片段(535 bp)并进行了序列分析。10 株分离株 F 蛋白裂解位点的氨基酸组成均为<sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>, 具有典型的强毒特征, 与致病指数测定结果一致。参照国内外已发表的部分毒株的 F 基因序列, 构建 NDV 的遗传进化树, 分析毒株间的遗传进化关系。遗传进化树分析表明 10 株 NDV 分离株中有 8 株属于基因 VII d 型, 1 株属于基因 VII c 型, 1 株属于基因 IX 型。表明基因 VII 型 NDV 是造成中国水禽近年来发生新城疫的主要原因, 与同期中国鸡群发生新城疫感染的流行特点一致。

**关键词:** 新城疫病毒; 水禽; 分子流行病学

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)01-0145-04

## Molecular Epidemiology Analysis of Newcastle Disease Outbreaks in Waterfowl during 1997 to 2005 in China

LIU Hua-lei<sup>1</sup>, ZHENG Dong-xia<sup>1</sup>, SUN Cheng-ying<sup>1</sup>, XU Tian-gang<sup>1</sup>,

WANG Yong-kun<sup>2</sup>, WU Yan-gong<sup>1</sup>, WANG Zhi-liang<sup>1\*</sup>

(1. National Reference Laboratory for Newcastle Disease, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Ten representative isolates of Newcastle Disease Virus (NDV) obtained from outbreaks in waterfowl in China during 1997 to 2005 were characterized both pathotypically and genotypically. Pathogenicity tests (MDT and ICPI) showed that all ten isolates were velogenic strains. The main functional region of the F gene comprising 535 nucleotides was amplified by RT-PCR and sequenced. The amino acid sequence of the fusion protein cleavage site in all ten isolates was <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>, which is a typical sequence of velogenic strains and is in agreement with the results of *in vivo* pathogenicity tests. For genotyping, a phylogenetic tree based on nucleotides 47-435 of the F gene was constructed. Phylogenetic analysis showed that, among the 10 isolates, 8 isolates were of the genotype VII d virus, 1 belonged to genotype IX virus, 1 belonged to genotype VII c virus. Results indicate that the strains of genotype VII d NDV have been the major pathogen, responsible for most epizootic ND outbreaks in waterfowl in China since 1997.

**Key words:** Newcastle disease virus; waterfowl; molecular epidemiology

收稿日期: 2008-01-14

基金项目: 青岛市科技计划项目(07-2-3-5-jch)

作者简介: 刘华雷(1976-), 男, 江苏丰县人, 博士, 主要从事动物病原学检测和分子生物学研究, Tel: 0532-87839922, E-mail: hualailiuyw@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 王志亮(1966-)男, 博士, 研究员, 首席科学家, 国家新城疫参考实验室主任

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(NDV)引起的以感染禽类为主的一种烈性传染病,是世界动物卫生组织(OIE)规定的法定报告的疫病<sup>[1]</sup>。NDV在分类地位上属于副黏病毒科禽腮腺炎病毒属(*Avulavirus*),其感染的宿主范围非常广泛,迄今已知能自然或人工感染的鸟类超过250余种。NDV曾一度被认为对鹅、鸭等水禽没有致病性,虽然可以表现出一定的隐性带毒率或血清NDV抗体阳性率,一般认为水禽对NDV具有较强的抵抗力,感染后症状轻微或不表现症状。我国鹅群发生新城疫至少已有十年之久,最早是在1997年,主要发生于江苏和广东等地<sup>[2-3]</sup>,目前国内多个省份均有水禽ND的暴发,并已呈扩大流行趋势。鸭群发生新城疫仅有零星报道,主要在福建、浙江和安徽等地流行<sup>[4-5]</sup>。作者选取自1997—2005年期间从国内水禽分离到的10株新城疫病毒分离株进行了致病指数测定和遗传进化分析,结果显示所有10株NDV在致病性上均属于强毒株,遗传进化分析表明10株NDV可分为3个基因亚型,分别为Ⅶc(1株)、Ⅶd(8株)和Ⅸ(1株),表明造成我国水禽发生新城疫的病原主要为Ⅶd,但也存在其他基因型引起的散发。这种流行特点与同期我国鸡群中新城疫的分子流行病学特点一致。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

在江苏、山东、安徽等临床发病的鹅群和鸭群中

按照OIE推荐方法进行病毒分离与鉴定,详见表1。

### 1.2 致病指数测定

MDT(致死鸡胚平均死亡时间)、ICPI(1日龄雏鸡脑内接种致病指数)均按照OIE推荐的方法进行。

### 1.3 致病性试验

选取具有代表性的3株分离株和我国NDV标准株F48,对32日龄的荣昌鹅进行致病性研究,接种剂量为 $10^5$ ELD<sub>50</sub>,接种途径为肌肉注射。

### 1.4 F基因主要功能区片段的扩增与序列分析

参照文献[6]进行。

### 1.5 遗传进化分析

将所测定的10株NDV分离株的F基因部分序列与GenBank中其他已发表的多株NDV相应片段作序列比较,应用遗传进化分析软件MEGA3.1来分析及绘制进化树。

## 2 结果

### 2.1 致病指数测定

10株NDV分离株MDT为49.6~56.7h,ICPI为1.75~1.91,按照OIE规定的毒力判断标准表明所有的分离株均属于强毒株,详见表1。

### 2.2 鹅致病性试验

3株NDV分离株和F48均表现出对鹅的高致病性,发病率均为100%,死亡率都在50%以上,详见表2。通过对发病鹅的剖检,病变与自然感染病例类似。

表1 本研究中NDV水禽分离株

Table 1 The NDV strains used in the study

菌株 Strain	宿主 Host	分离年代 Year	MDT/h	ICPI	基因型 Genotype	裂解位点 Cleavage site	登录号 GenBank No.
YG97	Goose	1997	52.0	1.84	Ⅶd	RRQKRF	AY390310
HG97	Goose	1997	56.7	1.76	Ⅶd	RRQKRF	AY390302
YG98-2C4	Goose	1998	53.2	1.82	Ⅶd	RRQKRF	AY390311
WG	Goose	1999	49.6	1.88	Ⅸ	RRQRRF	AY390308
KGC	Goose	2000	55.2	1.81	Ⅶd	RRQKRF	AY390303
QG02	Goose	2002	51.6	1.91	Ⅶd	RRQKRF	EF121314
NDV03-002	Goose	2003	52.0	1.75	Ⅶd	RRQKRF	DQ217667
NDV03-053	Goose	2003	53.4	1.81	Ⅶc	RRQKRF	DQ217718
NDV05-043	Duck	2005	52.0	1.80	Ⅶd	RRQKRF	DQ439899
NDV05-084	Goose	2005	53.6	1.82	Ⅶd	RRQKRF	DQ439936

表 2 NDV 代表株对 32 日龄荣昌鹅的致病性试验

Table 2 Pathogenicity test of NDV isolates in geese

分离株 NDV isolate	宿主 Host	分离年代 Year	基因型 Genotype	发病率 Morbidity	死亡率 Mortality
YG97	Goose	1997	Ⅶ d	10/10	7/10
QG02	Goose	2002	Ⅶ d	10/10	8/10
NDV03-053	Goose	2003	Ⅶ c	10/10	7/10
F48E9	Chicken	1946	Ⅸ	10/10	5/10

### 2.3 分离株 F 基因片段序列分析

所有测定的序列均已登录到 GenBank(登录号见表 1)。10 株分离株 F 蛋白裂解位点的氨基酸组成均为<sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>(表 1),具有 NDV 强毒株的典型分子特征,也与其致病指数 MDT 和 ICPI 的测定结果相符。

### 2.4 遗传进化分析

NDV F 基因的遗传进化树表明 NDV 共可分为 9 个基因型,分别为 I、II 至 IX 型。本研究中的 10 株 NDV 水禽分离株分别属于 3 个基因群,即:Ⅶ c(1 株)、Ⅶ d(8 株)和 IX 型(1 株)。

## 3 讨论

### 3.1 我国水禽新城疫的流行病学特点

我国目前水禽发生 ND 主要以鹅为主,家鹅可能比家鸭更为易感。

鹅新城疫最早发生于江苏和广东,曾先后被称为禽副黏病毒感染、鹅副黏病毒病等。近年来该病在国内多个省份都有流行的报道。其剖检特征病变:肠道呈糠麸样,黏膜出血、坏死、溃疡,且表面覆有纤维素性结痂,不易剥离,剥离后出现溃疡面;脾脏和胰腺均有大小不一的灰白色坏死灶。不同日龄的鹅均具有易感性,发病率在 40%~100%,病死率在 30%~100%<sup>[2-3]</sup>。

对于家鸭感染新城疫强毒,国内仅有零星报道,可能是由于鸭对新城疫的易感性比鹅低。2000—2002 年主要在福建、浙江和安徽等地流行<sup>[4-5]</sup>。福建农业科学院的黄瑜、程龙飞等报道了 2002 年在福建番鸭的临床 ND,以表现神经症状、腹泻、死亡率 9%~35%、腺胃黏膜局灶性出血或溃疡、肠道黏膜出血及胰腺或脾脏偶见白色坏死点为特征<sup>[5,7]</sup>。此外,还有一些鸭感染新城疫弱毒株的报道<sup>[8-9]</sup>。

### 3.2 分子流行病学特点分析

NDV 的分子流行病学研究显示近年来在欧洲、

亚洲、非洲等许多国家流行的新城疫以基因型Ⅶ型毒株为主,这种基因Ⅶ型的 NDV 正引起世界范围内的第 4 次大流行<sup>[10-11]</sup>。国家新城疫参考实验室自 2002 年成立就一直进行 NDV 的持续监测和分子流行病学研究,至今已经从全国范围内分离到 300 多株具有代表性的 NDV,并建立了详细的病毒库和基因库,分子流行病学显示基因Ⅶ型是我国目前 NDV 流行的主要优势基因型,但也存在Ⅲ、Ⅸ、Ⅵ等其它基因型散发,基因Ⅶ型 NDV 所占的比重呈逐年上升的趋势<sup>[12-13]</sup>。通过对 1997—2005 年从国内分离到的 10 株水禽源 NDV 进行了分子流行病学分析,显示 10 株分离株分属于Ⅶ c(1 株)、Ⅶ d(8 株)和 IX(1 株),表明基因Ⅶ型 NDV 是造成我国水禽发生 ND 的主要因素,但也存在其他基因型造成的散发。这与我国同期鸡群发生 ND 的分子流行病学特点一致,表明我国水禽发生 ND 可能是由感染鸡群传播的。

### 3.3 防控策略建议

(1)改变目前的养殖模式,重点强化生物安全管理措施:改放养为围栏饲养,避免与野生水禽接触;改同一地区混杂饲养多种禽类为单一品种饲养,避免同时饲养家养水禽和陆生家禽,尽量实行全进全出的饲养模式,提高生物安全管理水平。

(2)加强监测,进一步强化对健康水禽带毒情况调查:国内外的多项研究显示,水禽是 NDV 的储存库。建议加强对健康水禽带毒情况,尤其是强毒情况调查,了解我国水禽携带 NDV 的规律和特点。

(3)强化免疫,提高水禽新城疫的免疫密度:目前我国对于水禽 ND 的免疫也是采用 LaSota 疫苗,但多数地区对于水禽 ND 的免疫不重视,ND 免疫密度低。建议重视水禽 ND 的免疫,与高致病性禽流感的免疫等同对待,提高水禽 ND 的免疫密度,降低感染率和带毒、排毒现象。

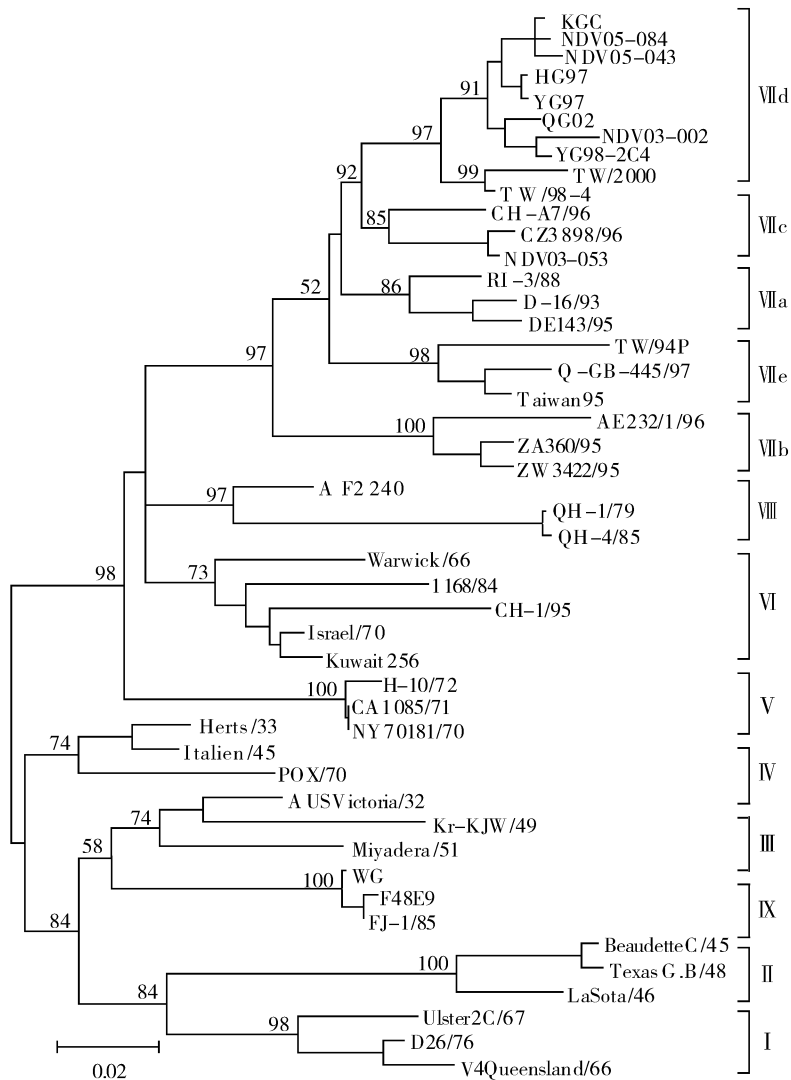


图 1 新城疫病毒 F 基因遗传进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 48 NDV strains based on a 389 bp region of the F gene

参考文献:

[1] CALNEK B W, BARNES H J, MC DOUGALD L R, et al. Disease of poultry [M]. Tenth edition, Iowa, USA: Iowa State University, 1997: 541-562.

[2] 辛朝安, 任 涛, 罗开健, 等. 疑似鹅副粘病毒感染诊断初报[J]. 养禽与禽病防治, 1997, (1): 5.

[3] 王永坤, 田慧芳, 周继宏, 等. 鹅副粘病毒病的研究[J]. 江苏农学院学报, 1998, 19(1): 59-62.

[4] 张训海, 朱鸿飞, 陈溥言, 等. 鸭副粘病毒强毒株的分离和鉴定[J]. 中国动物检疫, 2001, 18(10): 24-26.

[5] 黄 瑜, 李文杨, 程龙飞, 等. 番鸭 1 型副粘病毒的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(2): 148-150.

[6] 刘华雷, 王志亮, 吴延功, 等. 2005 年中国新城疫病毒分子流行病学研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(12): 1341-1346.

[7] 程龙飞, 黄 瑜, 傅光华, 等. 番鸭源新城疫病毒 F 蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 中国兽医学报, 2005,

25(6): 578-580.

[8] 程龙飞, 傅光华, 黄 瑜, 等. 半番鸭源禽 1 型副粘病毒 FM 01 株的分离鉴定与 F 蛋白基因分析[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(5): 499-502.

[9] 云 涛, 何永强, 刘光清, 等. 鸭 I 型禽副粘病毒 YH99V 株 F 基因的克隆和序列分析[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(1): 1-5.

[10] 刘文斌, 崔尚金, 赵玉军. 新城疫的分子流行病学[J]. 中国家禽学报, 2003, 7(1): 131-134.

[11] 程相朝, 吴庭才, 李清利. 新城疫病毒的基因分型与分子流行病学[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(8): 39-41.

[12] WANG Z L, LIU H L, XU J T, et al. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2002 to 2004 in China[J]. *Annals New York Academy of Sciences*, 2006, 1081: 228-239.

[13] LIU H L, WANG Z L, WU Y G, et al. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated from China in 2005[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 140: 206-211.