

网络出版时间:2019-10-08 10:45 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.04.006
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20191008.1044.012.html

肉鸡呼肠孤病毒的分离鉴定及致病性研究

张玉杰,刘 东,刘红祥,官 晓,李陆梅,
赵子瞳,邹 敏,范根成,杜元钊

(青岛易邦生物工程有限公司 动物基因工程疫苗国家重点实验室,山东 青岛 266114)

[摘 要] 【目的】从临床发病的疑似感染鸡呼肠孤病毒的白羽肉鸡病料中分离鉴定获得 1 株鸡源呼肠孤病毒 SD18,对 SD18 株进行致病性及传播特性研究,为该病毒的深入研究和综合防治奠定基础。【方法】无菌采集疑似感染鸡呼肠孤病毒发病鸡跖关节处的肌腱和渗出物,分离病原物,在 LMH 细胞上培养,并连续盲传 3 代,经无菌生理盐水倍比稀释,采用 Reed-Muench 法测定病毒鸡胚半数致死量(ELD_{50})和组织细胞半数感染量($TCID_{50}$);对分离毒株进行理化特性和血凝特性测定;利用设计的鸡呼肠孤病毒 L1 和 S1 基因特异性引物,对提取的病毒总 RNA 进行 RT-PCR 扩增,经 PCR 鉴定为阳性的菌落进行基因测序以及核苷酸同源性比对和系统遗传进化分析;用该分离株病毒对 SPF 鸡和白羽肉鸡进行动物回归试验,并用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定攻毒后的 SPF 鸡血清中呼肠孤病毒抗体滴度。【结果】从疑似感染鸡呼肠孤病毒发病鸡跖关节处的肌腱和渗出物中分离获得 1 株鸡源呼肠孤病毒 SD18,其 ELD_{50} 为 $10^{-6.5}/0.1$ mL, $TCID_{50}$ 为 $10^{-7.36}/0.1$ mL。RT-PCR 结果显示,目的基因片段长度分别为 1 100,750,265 bp,依次为鸡呼肠孤病毒的 S1、 σ C 和 L1 基因片段。核苷酸同源性比对结果显示,该分离株 SD18 与 V 群鸡源呼肠孤病毒 TW-918(台湾株)的 S1 基因序列同源性达 92.7%,与 I 群鸡病毒性关节炎疫苗 S1133 株的同源性仅为 59.0%。核酸序列遗传进化分析表明,该分离株 SD18 与 V 群鸡源呼肠孤病毒 TW-918(台湾株)处于同一进化分支上,与 I 群鸡源呼肠孤病毒 S1133 株处于不同的进化分支上,说明新分离的肉鸡呼肠孤病毒 SD18 株属于基因 V 群,可能是 I 群经典鸡源呼肠孤病毒 S1133 株的变异毒株。SPF 鸡和白羽肉鸡回归试验表明,SD18 株病毒能够引起鸡病毒性关节炎,与临床发病一致,并能水平传播。接种试验表明,病毒 SD18 能致死鸡胚,打开死亡鸡胚可见其绒毛尿囊膜增厚、尿酸盐沉积、胚体出血等症状,符合呼肠孤病毒的致病特点。【结论】该分离株 SD18 为新型肉鸡呼肠孤病毒,能够引起鸡发生病毒性关节炎。

[关键词] 鸡呼肠孤病毒;病毒分离鉴定;病毒致病性

[中图分类号] S858.312.65⁺7

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2020)04-0041-08

Isolation, identification and pathogenicity of broiler-chicken reovirus

ZHANG Yujie, LIU Dong, LIU Hongxiang, GONG Xiao, LI Lumei,
ZHAO Zitong, ZOU Min, FAN Gencheng, DU Yuanzhao

(State Key Laboratory of Animal Genetic Engineering Vaccine, YEBIO Bio-Engineering Co. Ltd. of Qingdao,
Qingdao, Shandong 266114, China)

Abstract: 【Objective】A strain of broiler chicken reovirus was isolated and identification from suspected infectious materials, and its pathogenicity and spreading characteristics were studied. 【Method】The

〔收稿日期〕 2019-03-04

〔基金项目〕 青岛市动物保健品行业智库联合基金二期项目(18-6-3-1-jch)

〔作者简介〕 张玉杰(1986—),男,山东青岛人,硕士,主要从事动物传染病学研究。E-mail:ddzhang2008-2009@163.com

〔通信作者〕 杜元钊(1965—),男,山东荣成人,研究员,博士,主要从事动物生物制品学研究。E-mail:duyuanzhao@126.com

joint tendons tissues and exudates of diseased chickens with suspected infection of chicken reovirus were collected and pathogens were separated before being cultured on LMH cell with continuous blind transmission for 3 generations. After aseptic saline ratio dilution, egg median lethal dose (ELD₅₀) and tissue culture median infective dose (TCID₅₀) were determined by the Reed-Muench method, and physicochemical characteristics and hemagglutination characteristics of isolated strains were measured. RT-PCR amplifications of L1 and S1 genes were conducted to extract total RNA using the designed specific primers of chicken reovirus gene. The positive colonies of PCR identification were sequenced, nucleotide homology was compared and system genetic evolution was analyzed. The isolate was used for animal regression experiment of SPF chickens and broiler chickens, and the reovirus antibody titrations of SPF chicken serum were determined by ELISA. 【Result】 A chicken reovirus SD18 strain was isolated from the joint tendons tissues and exudates of diseased chickens with ELD₅₀ of 10^{-6.5}/0.1 mL and TCID₅₀ of 10^{-7.36}/0.1 mL. The fragments of S1 gene, σC gene and L1 gene of the isolated SD18 were 1 100,750 and 265 bp, respectively. The results of nucleotide homology showed that the homology of S1 gene sequence of SD18 with TW-918 (Taiwan strain) of V group and S1133 vaccine of I group chicken viral arthritis was 92.7% and 59.0%, respectively. The genetic evolution analysis of nucleotide sequences showed that SD18 was on the same evolutionary branch as the V group chicken source isolate virus TW-918 (Taiwan strain) but different from the I group chicken source isolate virus S1133, indicating that SD18 belonged to the genotype V and was a variant strain of S1133. Animal regression experiment showed that SD18 could cause chicken viral arthritis in consistent with clinical morbidity and spread horizontally. The embryo inoculation test showed that the isolate could kill chicken embryo and cause thickness CAM, urate deposition and hemorrhage of chicken embryo, which was consistent with the pathogenic characteristics of reovirus. 【Conclusion】 The isolated SD18 strain was a new type of reovirus and could cause chicken viral arthritis.

Key words: chicken reovirus (REO); isolation and identification of virus; pathogenicity of virus

鸡呼肠孤病毒(chicken reovirus, REO), 又称“鸡病毒性关节炎”, 各品种和日龄的鸡均可感染发病, 其中以北方白羽肉鸡最为多见。该病不但可以水平传播, 还可垂直传播^[1], 造成鸡生产性能极大降低, 严重危害养鸡业的发展。禽呼肠孤病毒(avian orthoreoviruses, ARV) 属呼肠孤病毒科(Reoviridae)正呼肠孤病毒属(*Orthoreovirus*), 该病毒具有裸露的双链 RNA 基因组和双层同心核衣壳结构, 双链 RNA 基因组分为 10 个基因节段^[2], 呈二十面体球形对称。禽呼肠孤病毒广泛存在并影响各种禽类, 包括鸡^[3-4]、鸭^[5]和鹅^[6], 对养禽业造成巨大的经济损失。该病毒在肉鸡上表现病毒性关节炎、呼吸系统疾病、肝炎、心肌炎、免疫抑制和发育迟缓综合症等临床症状^[7]。通常来说, 鸡病毒性关节炎由经典 I 群 S1133 株血清型疫苗防控, 该疫苗在世界大部分地区已被证明是有效的。但针对抗原有差异的鸡呼肠孤病毒不同分离株, 经典 I 群 S1133 株血清型疫苗只能提供部分保护^[8]。近年来, 不断有新型变异呼肠孤病毒引起水禽发病的报道, 这些病毒均属于水禽源分离株, 与鸡源分离株在基因组结构和

致病性上有较大差异^[9], 但尚无新型鸡呼肠孤病毒的相关研究报道。为此, 本研究通过对采集的疑似感染鸡呼肠孤病毒的病料进行病原分离、鉴定、S1 基因序列分析以及动物回归试验, 解析禽呼肠孤病毒主要抗原基因 σC 的变异情况, 以期为该病的综合防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料、细胞及试验动物 病料样品来自山东某养殖场的发病感染鸡, 临床表现为瘫痪, 跗关节肿胀变形、发青或有干酪样物, 无菌采集发病鸡跗关节处的肌腱、渗出液; 10 日龄 SPF 鸡胚和 25 日龄 SPF 鸡, 购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司; 3 日龄白羽肉鸡, 购于青岛市平度鹏飞家禽育种公司, 品种为罗斯 308; LMH 传代细胞系, 购于中国兽医药品监察所。

1.1.2 主要试剂 柱式病毒 RNAout (TIANDZ 71001); Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM Version 2.0 R004A), dNTPs (2.5 mmol/L) (TaKaRa 639125),

DNA Marker DL2000(TaKaRa 3427Q),反转录酶 Reverse Transcriptase M-MLV(Rnase H-)(TaKaRa 2641Q),pMD19-T Vector(TaKaRa 6013),*E. coli* JM109 competent cells(TaKaRa 9052);DMEM 细胞培养液(GBICO 21885108),新生胎牛血清(GBICO 12662029);胶回收试剂盒 DNA gel extraction Kit(BioFlux BSC02M1),禽呼肠孤病毒抗体检测试剂盒(IDEXX REO 5008.00)。

1.1.3 引物设计与合成 登录 NCBI 查询已发表的鸡呼肠孤病毒相关基因序列,运用 Primer 5.0 引物设计软件在病毒的 S1 基因节段设计特异性引物,上游引物序列为 P1F: 5'-AGTATTTGTGAG-TACGATTG-3',下游引物序列为 P1R: 5'-GGCGC-CACACCTTAGGT-3',预期扩增片段大小为 1 100 bp;在 σ C 基因节段设计特异性引物,上游引物序列为 P2F: 5'-ATGGACGGTTTAACTCAG-3',下游引物序列为 P2R: 5'-TCAAGATCAAAA-CAAGAG-3',预期扩增片段大小为 750 bp;在 L1 基因节段设计特异性引物,上游引物序列为 P3F: 5'-ATTTGTGTACCGTCTGCA-3',下游引物序列为 P3R: 5'-CAAGCTCAAAGGACGTAC-3',预期扩增片段大小为 265 bp,引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 鸡呼肠孤病毒的分离 无菌采集发病鸡跗关节处的肌腱和渗出液等组织,剪碎研磨,按照体积比 1:5 加入生理盐水,匀浆器匀浆后加双抗各 1 000 U,反复冻融 3 次,4℃、5 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,0.22 μ m 无菌滤器过滤除菌。将上述滤液经绒毛尿囊膜接种 10 日龄 SPF 鸡胚 10 枚,接种量为 0.2 mL/枚。接种后置于 37℃ 生化培养箱恒温孵化。弃掉 24 h 内死亡的鸡胚,连续观察 7 d,收获 24~168 h 死亡及未死的鸡胚绒毛尿囊膜,-80℃ 冻存备用。按照同样的方法连传 3 代,解剖、观察并记录鸡胚死亡及病变情况。

1.2.2 鸡呼肠孤病毒在 LMH 细胞上的培养 将鸡胚绒毛尿囊膜 F₃ 代的毒液用 0.22 μ m 无菌滤器过滤除菌后接种 LMH 细胞单层,37℃、5% CO₂ 培养 5~7 d,同时设未接毒的正常细胞对照。每日观察并记录细胞病变情况,当细胞病变达 70%~80% 时收获细胞并连续盲传 3 代,-80℃ 冻存备用。

1.2.3 鸡呼肠孤病毒鸡胚半数致死量(ELD₅₀)和组织细胞半数感染量(TCID₅₀)测定 将 F₃ 代种毒用无菌生理盐水进行 10 倍系列稀释,共 10⁻⁴~

10⁻⁸ 5 组稀释度,每组稀释度的病毒液分别经鸡胚绒毛尿囊膜接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚,接种量为 0.1 mL/枚,置于 37℃ 恒温培养箱中孵化。弃去 24 h 内死亡的鸡胚,此后每日照胚 2~3 次,连续观察 5 d,每天记录鸡胚死亡情况,按 Reed-Muench 法^[10] 计算 ELD₅₀。

将分离株病毒 SD18 在 LMH 细胞上传代至第 20 代后,细胞病变比较稳定,将 F₂₁ 代病毒用维持液进行 10 倍系列稀释 10⁻⁵~10⁻⁹,分别接种于长满 LMH 单层细胞的 96 孔微量细胞培养板上,同一稀释度接种 6 孔,0.1 mL/孔,于 37℃、5% CO₂ 中培养 7 d,逐日观察细胞病变,根据 Reed-Muench 法^[10] 计算 TCID₅₀。

1.2.4 鸡呼肠孤病毒理化特性测定 将分离种毒以 5 000 r/min 离心 15 min,取上清液,按殷震等^[2] 的方法,用 LMH 单层细胞在 96 孔板上测定分离株病毒 SD18 对乙醚、氯仿、胰蛋白酶、酸、碱、甲醛和热等的敏感性。

1.2.5 鸡呼肠孤病毒血凝特性测定 用常规方法配制鸡、兔、小鼠的红细胞悬液,按微量血凝试验方法^[11] 测定分离株病毒 SD18 的血凝活性。

1.3 鸡呼肠孤病毒的鉴定

1.3.1 病毒 RNA 的提取 在 1.5 mL 离心管中加入 300 μ L SD18 株病毒绒毛尿囊膜研磨上清液,再加入 700 μ L Trizol Reagent RNA 提取液,混匀,室温放置 15 min。加入 200 μ L 氯仿,充分振荡混匀,室温静置 10 min;4℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液 500 μ L 转移至经 DEPC 处理的 1.5 mL 离心管中;加入预冷的异丙醇 500 μ L,-20℃ 静置 30 min,12 000 r/min 离心 15 min,弃掉上清;加入 1 mL 75% 乙醇,8 000 r/min 离心 5 min,倒掉液体;然后倒置于纸上干燥,将沉淀悬于 30 μ L RNA-free water 中,-80℃ 保存备用。按照反转录酶使用说明书对提取的病毒 RNA 进行反转录,将合成的 cDNA 于 -20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增和测序 PCR 反应体系(25 μ L): Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM Version 2.0) 12.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,cDNA 模板 2 μ L,ddH₂O 补加至 25 μ L。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 40 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

切下带有目的条带的胶块,用胶回收试剂盒回收纯化,将回收产物与载体 pMD19-T 连接,转化至

JM109 感受态细胞,并在 AMP⁺/LB 固体培养基中培养,用 PCR 方法鉴定重组质粒,对鉴定为阳性的重组质粒进行测序。

1.4 动物回归试验

1.4.1 SPF 鸡 将 15 只 25 日龄 SPF 鸡在动物隔离器中饲养 3 d 后进行试验。将 SPF 鸡平均分为 3 组,每组 5 只,试验 1 组用 SD18 F₃ 代绒毛尿囊膜研磨过滤的上清液 10 倍稀释作为攻毒用种毒,鸡脚垫攻毒 0.2 mL/只,饲养在第 1 台动物隔离器中;试验 2 组鸡不做任何处理,但与试验 1 组鸡饲养在同一台隔离器中,作为同居鸡;对照组以同样途径注射等量的灭菌生理盐水饲养在第 2 台动物隔离器中。每日观察鸡群精神状态、采食及发病情况,尤其是鸡脚垫在攻毒前后的变化,持续 20 d,并在攻毒后第 5,7 天分别采集试验组鸡泄殖腔拭子进行病毒分离,6 枚/拭子。攻毒后第 7,20 天分别采集试验 1 组和试验 2 组鸡血清共计 20 支,用禽呼肠孤病毒抗体检测试剂盒进行 ELISA 试验,并记录试验数据。

1.4.2 白羽肉鸡 将 15 只 3 日龄白羽肉鸡按照上述方法分为 3 组,以同样的方法进行试验,并记录试验数据。攻毒途径改为口服,攻毒剂量同 1.4.1 节。

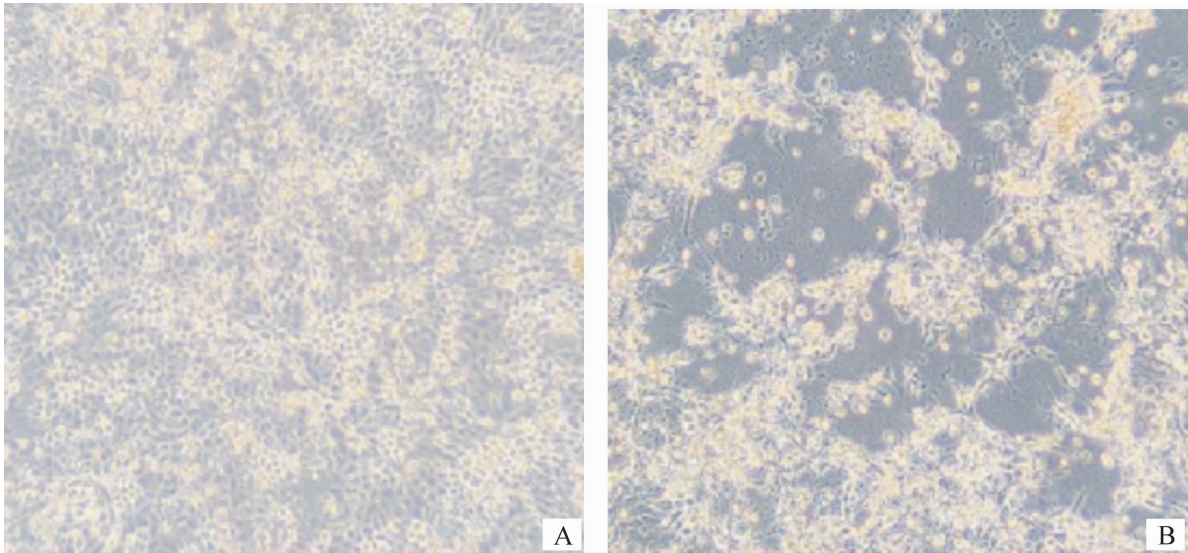
1.5 数据处理

使用 MEGA 6.0 软件对测定的病毒核苷酸序列与 GenBank 中收录的鸡源呼肠孤病毒序列进行同源性比对和分析;遗传进化分析利用 MEGA6.0 进行,采用 Bootstraptest NeighborJoining 方法,重复 1 000 次运算,并绘制遗传进化树。

2 结果与分析

2.1 鸡呼肠孤病毒的分离

观察发现,经绒毛尿囊膜初次传代的 10 日龄 SPF 鸡胚基本无明显可见变化,经第 2 代盲传后,鸡胚在接种后 48~120 h 陆续死亡,打开鸡胚可见绒毛尿囊膜明显增厚,尿酸盐沉积严重,胚体发育迟缓,全身水肿、出血,剖检鸡胚可见肝脏发绿或出血斑点。收集此时的绒毛尿囊膜和尿囊液,经检验无细菌污染,且病毒无血凝活性,暂命名为 SD18,−80 ℃ 保存备用。用 SD18 分离株接种 LMH 细胞并盲传,细胞出现病变的时间逐渐提前,且病变也明显,在接种后 72 h 有 70%~80% 细胞出现病变,大量细胞圆缩、融合、聚集成团;接种 96 h 后,部分细胞开始脱落、崩解,单层细胞出现较大的空洞(图 1)。



A. 正常 LMH 细胞;B. 接毒 96 h 后的 LMH 细胞
A. Normal LMH cells;B. LMH cells at 96 h post infection
图 1 SD18 分离株引起 LMH 细胞的病变情况(100×)

Fig. 1 Cytopathic effect on LMH induced by SD18 isolate(100×)

2.2 鸡呼肠孤病毒 SD18 分离株的 ELD₅₀ 和 TCID₅₀

用 10 倍系列稀释的 SD18 病毒液接种 10 日龄 SPF 鸡胚和 LMH 传代细胞,各稀释度鸡胚的死亡情况和 LMH 细胞病变情况如表 1 所示。根据

Reed-Muench 法计算,SD18 株病毒的 ELD₅₀ 为 10^{−6.5}/0.1 mL,TCID₅₀ 为 10^{−7.36}/0.1 mL。

2.3 鸡呼肠孤病毒分离株 SD18 的理化特性和血凝特性

SD18 分离株病毒耐酸不耐碱,在 pH 4.0~8.0

稳定,对 pH 11.0 敏感;对温度不敏感,能抵抗 56 ℃ 20 h,100 ℃ 30 min 可被灭活;乙醚对病毒感染性无影响;胰蛋白酶处理病毒后 TCID₅₀ 为 10^{-7.50} / 0.1 mL;1%福尔马林 37 ℃ 作用 30 h 可使其灭活。SD18 分离株不能凝集 1%的鸡、兔和小鼠的红细胞。

表 1 SD18 分离株接种后 SPF 鸡胚死亡率和接种 LMH 细胞病变率

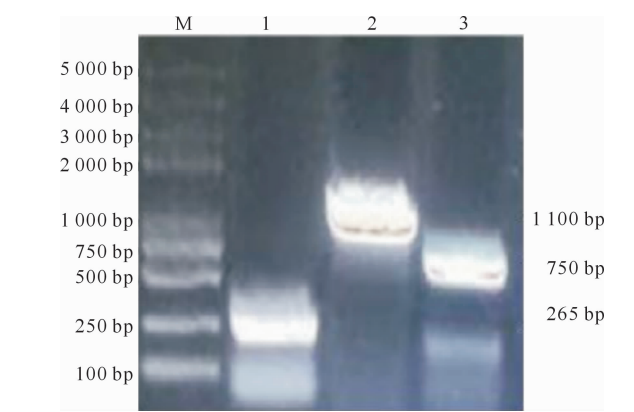
Table 1 Mortality rate of SPF chicken embryo and lesions rate of LMH cells experimentally infected with SD18 strain			
接种 SPF 鸡胚 Vaccinated SPF embryos		接种 LMH 细胞 Vaccinated LMH cells	
病毒液稀释度 Dilution of virus	死亡率/% Mortality rate	病毒液稀释度 Dilution of virus	死亡率/% Mortality rate
10 ⁻⁴	100.0	10 ⁻⁵	100.0
10 ⁻⁵	100.0	10 ⁻⁶	100.0
10 ⁻⁶	83.0	10 ⁻⁷	71.4

接种 SPF 鸡胚 Vaccinated SPF embryos		接种 LMH 细胞 Vaccinated LMH cells	
病毒液稀释度 Dilution of virus	死亡率/% Mortality rate	病毒液稀释度 Dilution of virus	死亡率/% Mortality rate
10 ⁻⁷	17.0	10 ⁻⁸	12.5
10 ⁻⁸	0	10 ⁻⁹	0

2.4 鸡呼肠孤病毒分离株 SD18 的鉴定

利用肉鸡呼肠孤病毒 L1、S1 和 σC 基因设计特异性引物,对本研究待检病毒进行 RT-PCR 扩增,电泳结果(图 2)显示,特异性目的片段大小分别为 265,1 100 和 750 bp,与预期片段大小相符,将目的片段 S1 连接到载体 pMD19-T,转化大肠杆菌感受态 JM109 并在 AMP⁺ /LB 培养基中培养,将得到的阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

将测得的肉鸡呼肠孤病毒 SD18 株 S1 基因序列与 GenBank 上发表的禽呼肠孤病毒参考毒株进行核苷酸同源性比对,结果见表 2。由表 2 可知,SD18 株与 V 群鸡源呼肠孤病毒 TW-918(台湾株)的 S1 基因序列同源性较高,可达 92.7%,与其他禽源呼肠孤病毒的同源性较低,为 59.0%~68.8%,与目前使用的 I 群鸡病毒性关节炎疫苗 S1133 株的同源性仅为 59.0%,因此推断 SD18 分离株属于 V 群鸡禽肠孤病毒。



M. DNA Marker DL2000;1. 绒毛尿囊膜 F₃-SD18 L1 基因;
2. 绒毛尿囊膜 F₃-SD18 S1 基因;3. 绒毛尿囊膜 F₃-SD18 σC 基因
M. DNA Marker DL2000;1. CAM F₃-SD18 segment L1;
2. CAM F₃-SD18 segment S1;3. CAM F₃-SD18 σC gene

图 2 鸡呼肠孤病毒 SD18 分离株的 RT-PCR 鉴定结果
Fig.2 Identification of SD18 strain isolated by RT-PCR

表 2 SD18 分离株与 8 个禽呼肠孤病毒参考毒株的核苷酸同源性

Table 2 Homology analysis of ARV SD18 and 8 avain reovirus disease reference strain sequence									%
毒株 Strain	S1133 (KF741772)	4599-V-04 (KX398298)	0699 (MG822691)	0753B (MG822676)	0804B (MG822671)	TW-918 (AF297215)	0025 (MG822690)	SD18	LY383 (MF183217)
S1133 (KF741772)		76.7	59.5	58.3	57.9	59.9	56.7	59.0	62.9
4599-V-04 (KX398298)			61.6	57.8	57.8	61.6	59.0	61.2	59.3
0699 (MG822691)				62.1	61.1	60.4	60.4	59.1	59.6
0753B (MG822676)					60.9	59.6	59.1	59.4	59.1
0804B (MG822671)						63.0	63.8	63.1	95.6
TW-918 (AF297215)							69.1	92.7	64.2
0025 (MG822690)								68.8	63.3
SD18									64.9
LY383 (MF183217)									

遗传进化分析结果(图 3)表明,新分离的肉鸡呼肠孤病毒 SD18 株与 I 群禽源呼肠孤病毒 S1133 株处于不同的进化分支上,两者的进化关系较远;而与 V 群禽源呼肠孤病毒 TW-918(台湾株)处于同一

进化分支上,两株病毒可能有着共同的进化关系。结合同源性分析可确定本研究中新分离的肉鸡呼肠

孤病毒 SD18 株属于基因 V 群,可能是 I 群经典鸡源呼肠孤病毒 S1133 株的变异毒株。

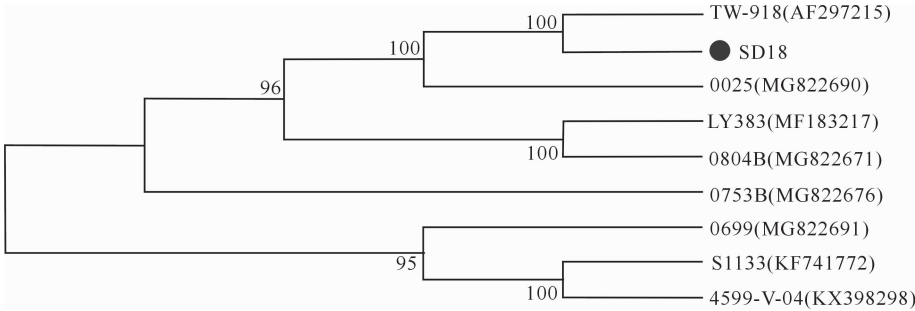


图 3 SD18 分离株与其他参考毒株 S1 核酸序列的遗传进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of SD18 strain and other strains based on S1 gene sequence

2.5 动物回归试验

2.5.1 SPF 鸡 观察发现,25 日龄 SPF 鸡经脚垫接种 SD18 分离株 F₃ 代毒液后第 5 天开始发病,第 7 天脚垫肿胀发青,临床观察无其他异常,至第 20 天后基本稳定。剖检肿胀脚垫,有炎性渗出和出血斑块聚集(图 4)。

分别采集攻毒后第 5 天和第 7 天的试验鸡泄殖腔拭子,接种 SPF 鸡胚后进行病毒分离,试验 1 组(攻毒组)鸡在攻毒后第 5 天和第 7 天均 100% 排毒,试验 2 组(同居组)鸡在同居后第 5 天和第 7 天的排毒率分别为 60% 和 100%(表 3)。采集攻毒后第 7 天和第 20 天的鸡血清,ELISA 试验表明,攻毒

后第 7 天鸡群的呼肠孤病毒血清抗体不转阳,攻毒后第 20 天鸡群的呼肠孤病毒血清抗体 100% 转阳(表 4)。

表 3 SD18 分离株攻毒后试验组鸡群的排毒率

Table 3 Shedding rate of chicken group experimentally attacked by SD18 strain

处理 Treatment	排毒率/% Shedding rate	
	5 d	7 d
攻毒组 Virus-attacking group	100	100
同居组 Cohabitation group	60	100
对照组 Control group	0	0

表 4 SD18 分离株接种 SPF 鸡后 ELISA 试验结果

Table 4 Elisa antibody of SPF chickens infected with SD18

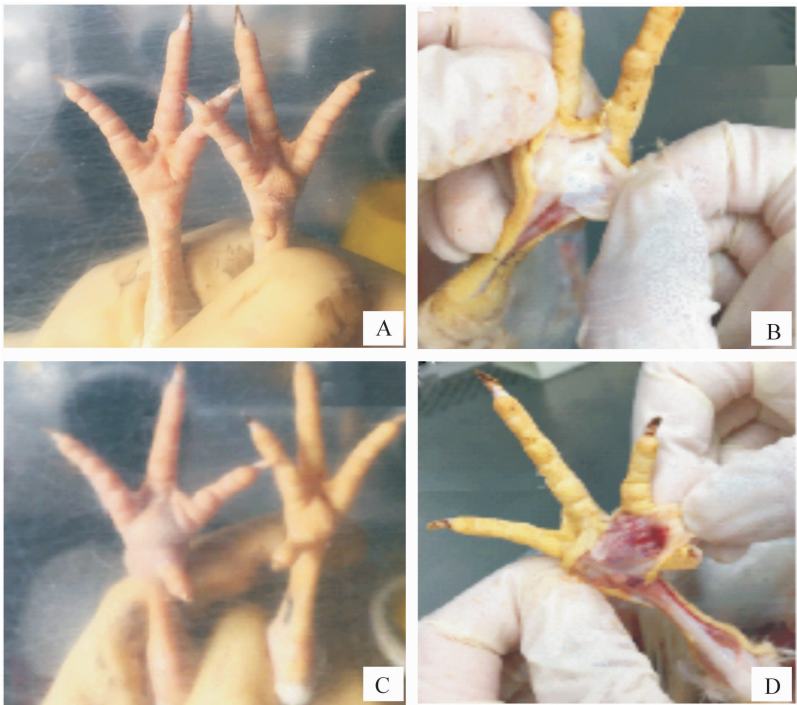
处理鸡编号 Number of chicken	7 d				20 d			
	OD 值 OD value	S/P 值 S/P value	滴度 Titration	判定结果 Results	OD 值 OD value	S/P 值 S/P value	滴度 Titration	判定结果 Results
A-1	0.080	0.07	120	—	0.329	0.09	2 034	+
A-2	0.056	—0.01	0	—	0.380	1.07	2 458	+
A-3	0.060	0.00	0	—	0.215	0.52	1 115	+
A-4	0.082	0.07	133	—	0.190	0.43	921	+
A-5	0.076	0.05	0	—	0.221	0.54	1 162	+
C-1	0.080	0.07	120	—	0.229	0.56	1 226	+
C-2	0.065	0.02	26	—	0.200	0.47	998	+
C-3	0.078	0.06	107	—	0.150	0.30	617	+
C-4	0.050	—0.03	0	—	0.226	0.55	1 202	+
C-5	0.082	0.07	133	—	0.202	0.47	1 014	+

注:A-1~A-5. 攻毒组 1~5 只鸡;C-1~C-5. 同居组 1~5 只鸡。S/P 值>0.2 判为阳性;滴度>396 判为阳性。“—”表示阴性,“+”表示阳性。

Notes:A-1~A-5 represent virus-attacking groups 1~5 chickens;C-1~C-5 represent cohabitation groups 1~5 chickens. S/P value>0.2 indicates positive; Titration>396 indicates positive. “—” represents negative, “+” represents positive.

2.5.2 白羽肉鸡 3 日龄白羽肉鸡口服攻毒后 7 d,攻毒组和同居组白羽肉鸡脚垫和腿关节均肿胀。攻毒后 20 d,攻毒组和同居组鸡脚垫和腿关节表现

为明显肿胀,且腿关节有发青、出血现象,与临床发病一致,而对照组鸡均正常(图 5)。



A,B 为对照组;C,D 为试验组 A,B control group;C,D test group

图 4 SD18 分离株对 SPF 鸡脚垫的影响

Fig. 4 Effect of SD18 strain on SPF chicken foot pads



A,B 为对照组;C,D 为试验组 A,B control group;C,D test group

图 5 SD18 分离株对白羽肉鸡跗关节的影响

Fig. 5 Effect of SD18 strain on broiler chicken joints

3 讨 论

早在 1954 年,Fahey 和 Crawley 从患有慢性呼吸

大利、荷兰、日本、匈牙利等国家均有 ARV 感染的报道。20 世纪 80 年代开始,我国也发现该病,并分离到 ARV。王锡坤等^[14] 在 1985 年证实了我国的鸡群中也有病毒性关节炎发生。1998 年,谢芝勋等^[15] 对广西不同地区未用过鸡病毒性关节炎疫苗的 38 群鸡进行血清抽样调查,结果表明血清抗体阳性率为 27%;廖敏等^[16] 于 2002 年从广西玉林患有

跛行、瘫痪、跗趾关节肿胀的三黄鸡场分离到 2 个毒株的呼肠孤病毒, 命名为 R1 和 R2 株, 鸡群发病率 40%, 死亡率 5%, 说明广西地区鸡群中 ARV 感染也很普遍。该病主要发生于肉鸡, 蛋鸡和火鸡亦可感染; 1 日龄雏鸡最为易感, 并通过粪便迅速发生水平传播, 随着鸡龄增大易感性降低, 20 周龄以后显著降低, 自然发病病例主要集中在 3~6 周龄, 水平传播是该病主要的传播途径^[17]。本试验中, 试验鸡攻毒后 7 d, 均能 100% 感染排毒, 但攻毒组和同居组鸡的血清呼肠孤病毒抗体未转阳, 攻毒后 20 d, 两组试验鸡的血清呼肠孤病毒抗体均 100% 转阳, 且两组鸡的血清呼肠孤病毒抗体水平无明显差异, 这说明该病可以水平传播, 且传播速度很快, 经口感染后 2~3 周便可发病。

近年来, 该病在我国某些地区的白羽肉鸡养殖场呈区域性流行, 引起的临床表现与传统的鸡病毒性关节炎感染有一定差异。本试验从患有瘫痪的病鸡中成功分离到 SD18 病毒, 经鉴定为禽呼肠孤病毒 V 群, 与传统的 I 群鸡呼肠孤病毒 S1133 在基因序列和致病性上存在一定差异。虽然目前公开发表的鸡呼肠孤病毒基因序列相对较少, 但近几年有呈现逐年增加趋势。点突变的快速积累是 RNA 病毒的一个代表性特征, 由基因重组引起的抗原漂移在 ARV 中时有发生, 最终导致新的毒株出现和疫苗失效^[18-19]。

在 ARV 的 8 个结构蛋白中, σ C 蛋白表现出高度的抗原异质性。作为一种抗原亚型, 该蛋白位于病毒衣壳表面, 能够诱导细胞凋亡, 增强病毒感染细胞能力, 且与病毒的致病性密切相关, 是引起病毒抗原发生变异的主要原因^[20]。由于该蛋白具有高度变异特性, 因此可以用其比较不同呼肠孤病毒株之间的序列差异, 并分析其序列差异与毒株致病力、免疫原性的关系, 进而研究不同毒株之间的抗体交叉保护性^[21]。本研究利用发现的 ARV σ C 基因部分序列进行系统发育分析, 在我国发现了一个新的 ARV 流行群, 该流行群与台湾株、韩国株最为接近, 但也有所差异。对 SD18 株的 σ C 基因分析显示了 ARV 的不断进化, 其与传统 S1133 株(I 群)、0699 株(II 群)、0753B(III 群)、LY383 株(IV 群)^[22-23]处于不同的进化分支, 因此 SD18 株病毒有可能是传统 ARV 的变异株。值得高度关注的是, 现有的商品化疫苗可能无法对新出现的病毒提供足够的保护, SD18 株与其他鸡呼肠孤病毒的血清学关系还有待进一步研究, 以确定现有疫苗的有效性。

前期研究显示^[24-25], 用鸡源和水鸡源呼肠孤病毒分别进行鸡胚和鸭胚的致病性试验, 结果表明鸡源呼肠孤病毒对鸡胚的致病性与水禽起源的 ARVs 对鸭胚的致病性具有某些相似性, 主要表现在病毒对鸡胚肝脏的损伤方面, 例如出血变化和坏死特点, 提示鸡源呼肠孤病毒和水鸡源呼肠孤病毒间发生了基因片段的重组或替换, 从而导致它们对易感动物的致病性具有相似的特点, 因此不同来源呼肠孤病毒基因组结构的差异分析和基因功能与致病性的关系尚需进一步论证。

[参考文献]

- [1] Benavente J, Martinez-Costas J. Avian reovirus: structure and biology [J]. *Virus Res*, 2007, 123(2): 105-119.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 544-548.
Yin Z, Liu J H. *Animal virology* [M]. Beijing: Science Press, 1997: 544-548.
- [3] Jones R C. Avian reovirus infections [J]. *Rev Sci Tech*, 2000, 19(2): 614-625.
- [4] Rosenberger J K, Sterner F J, Botts S, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian reoviruses: I. pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates [J]. *Avian Dis*, 1989, 33(3): 535-544.
- [5] Heffels-Redmann U, Muller H, Kaleta E F. Structural and biological characteristics of reoviruses isolated from *Muscovy ducks* [J]. *Avian Pathol*, 1992, 21(3): 481-491.
- [6] Palya V, Glavits R, Dobos-Kovacs M, et al. Reovirus identified as cause of disease in young geese [J]. *Avian Pathol*, 2003, 32(2): 129-138.
- [7] van Loon A A, Koopman H C, Kosman W, et al. Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption syndrome in chickens [J]. *Vet Q*, 2001, 23(3): 129-133.
- [8] van der Heide L. The history of avian reovirus [J]. *Avian Dis*, 2000, 44(3): 638-641.
- [9] 王丹, 张大丙. 水鸡源呼肠孤病毒的全序列测定和分型 [C]//杨汉春. 第四届全国禽病分子生物技术青年工作者会议论文集. 天津: 中国畜牧兽医学会禽病学分会, 2015: 24-30.
Wang D, Zhang D B. Complete sequence determination and typing of avian reovirus [C]//Yang H C. The fourth national young scholar conference on molecular biology technique in poultry disease conference on molecular biology technique in poultry diseases. Tianjin: China Institute of Animal Husbandry and Veterinary Poultry Health Branch, 2015: 24-30.
- [10] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoint [J]. *Am J Hyg*, 1938, 27(3): 493-497.
- [11] CDC. New laboratory assay for diagnostic testing of avian influenza A/H5(Asian Lineage) [J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2006, 10(55): 127.

Wang H Y,Li Y L,Zhu L,et al. Effect of seed dormancy on fatty acid accumulation in rapeseed and its molecular mechanism [J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture & Life Sciences),2017,43(4):397-403.

[27] Shockey J M,Fulda M S. Arabidopsis contains a large super-family of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme A synthetases [J]. Plant Physiology,2003,132(2):1065-1076.

[28] 武玉花,曹应龙,罗军玲,等. 甘蓝型油菜中 KCS6 基因的克隆和功能分析 [J]. 中国油料作物学报,2012,34(6):567-574.

Wu Y H,Cao Y L,Luo J L,et al. Cloning and functional analysis of KCS6 gene in *Brassica napus* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2012,34(6):567-574.

[29] Xiao F,Goodwin S M,Xiao Y,et al. *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development [J]. Embo Journal,2014,23(14):2903-2913.

[30] Weng H,Molina I,Shockey J,et al. Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis* [J]. Planta,2010,231(5):1089-1100.

(上接第 48 页)

[12] Fahey J E,Crawley J F. Studies on chronic respiratory disease of chickens: II. isolation of a virus [J]. Can J Comp Med Vet Sci,1954,18(1):13-21.

[13] Walker E R,Friedman M H,Olson N O. Electron microscopic study of an avian reovirus [J]. Ultrastruct Res,1972,41(1):67-79.

[14] 王锡坤,唐秀英,张庆祥,等. 应用琼扩试验检查鸡病毒性关节炎 [J]. 家畜传染病,1985,20(3):26-27.

Wang X K,Tang X Y,Zhang Q X,et al. Detection of chicken reovirus using AGP test [J]. Domestic Animal Epidemiology,1985,20(3):26-27.

[15] 谢芝勋,邓显文,刘家波,等. 鸡病毒性关节炎血清学调查 [J]. 中国家禽,1998,20(12):15.

Xie Z X,Deng X W,Liu J B,et al. Serology survey of chicken reovirus [J]. China Poultry,1998,20(12):15.

[16] 廖 敏,谢芝勋,刘家波,等. 鸡呼肠孤病毒分离与鉴定 [J]. 中国家禽,2002,24(1):12-14.

Liao M,Xie Z X,Liu J B,et al. Isolation and identification of chicken reovirus [J]. China Poultry,2002,24(1):12-14.

[17] 唐雨德,周宗安. 鸡病毒性关节炎国内外研究概况 [J]. 中国畜禽传染病,1992(6):57-58.

Tang Y D,Zhou Z A. Domestic and foreign research on chicken reovirus [J]. Chinese Domestic Animal and Poultry Epidemiology,1992(6):57-58.

[18] Farkas S L,Marton S,Dandar E,et al. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses [J]. Sci Rep,2016(6):36960.

[19] Tang Y,Lin L,Sebastian A,et al. Detection and characterization of two co-infection variant strains of avian orthoreovirus (ARV) in young layer chickens using next-generation sequencing (NGS) [J]. Sci Rep,2016(6):24519.

[20] David E S. Disease of poultry [M]. 13th ed. New York: Wiley,2013.

[21] 刁有祥,唐 熠,姜晓宁. 一种防治新型鸡呼肠孤病毒的灭活疫苗及其制备方法:中国,108379574 A [P]. 2018-08-10.

Diao Y X,Tang Y,Jiang X N. An inactivated vaccine for the prevention of a new type of avian reovirus and its preparation method:China,108379574 A [P]. 2018-08-10.

[22] Ayalew L E,Gupta A,Fricke J,et al. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan,Canada [J]. Sci Rep,2017,7(1):3565.

[23] Yun T,Yu B,Ni Z,et al. Genomic characteristics of a novel reovirus from Muscovy duckling in China [J]. Vet Microbiol,2014,168(2/3/4):261-271.

[24] Wu Q,Ding M,Li C,et al. Construction and characterization of an infectious molecular clone of novel duck reovirus [J]. J Gen Virol,2018,99(4):449-456.

[25] Praharaj M R,Sahoo A P,Chauhan T K S,et al. *In vitro* study on role of sigma B protein in avian reovirus pathogenesis [J]. Oncotarget,2018,9(28):19569-19583.