

我国部分省区鸡传染性法氏囊病病毒的分子流行病学研究

阳秀英^{1,2}, 韦平^{1*}, 黄志永¹, 磨美兰¹, 韦天超¹,
李康然¹, 韦住奉¹, 赖家宏¹, 朱学勤¹

(1. 广西大学, 南宁 530005; 2. 右江民族医学院, 百色 533000)

摘要: 应用 RT-PCR 技术, 对 2000-2006 年间收集于广西、江苏、浙江、安徽、海南的临床疑似传染性法氏囊病病的法氏囊、脾脏和骨髓样品进行检测, 对检测呈阳性的病料采用 9~11 日龄的鸡胚通过绒毛尿囊膜或鸡胚成纤维细胞接种的方法进行鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV) 的分离和传代, 结果成功分离到 23 株 IBDV; 设计针对 IBDV VP2 基因高变区 (用 *vVP2* 表示) 的引物对这些分离株及 5 株常用的中等毒力商品疫苗株进行 RT-PCR 扩增并对其进行酶切分析和核苷酸序列测定, 分析比较 23 个分离株与参考毒株的 *vVP2* 的序列并绘制遗传系谱树。结果表明 BH09、BH11、JS1、JS7、YY1、YY6、YL051、050222、TSC-2(9)、TZ(3)、HN0602 共 11 个分离株属于超强毒株, 与已发表的 vvIBDV 其它中国分离株、日本分离株 OKYM、欧洲分离株 DV86 和 UK661 的亲源关系均较近; 040124、YL052、020180、YLZF2、040131、BH15、YY2、050045、050057、050258、TSC-1(3)、A038 共 12 株属于经典毒株, 其中 040124、YL052 2 株属于中等偏强毒力疫苗株, 其余 10 株则属于弱毒疫苗株。本研究的结果表明, 近 6 年来在我国 5 个省区养鸡业中流行的 IBDV 主要为 vvIBDV 毒株, 而且所有分离株 VP2 基因高变区均缺乏明显的时间和地域的遗传特征。

关键词: RT-PCR; 限制性内切酶分析技术; 超强毒株; 经典毒株; 变异株; VP2 基因高变区; 分子流行病学

中图分类号: S852.65⁺9.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)06-0581-08

Molecular Epidemiology of Infectious Bursal Disease Viruses Isolated from Some Provinces of China

YANG Xiu-ying^{1,2}, WEI Ping^{1*}, HUANG Zhi-yong¹, MO Mei-lan¹, WEI Tian-chao¹,
LI Kang-ran¹, WEI Zhu-feng¹, LAI Jia-hong¹, ZHU Xue-qin¹

(1. Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Youjiang Medical College, Baise 533000, China)

Abstract: Tissue samples of Fabricius' bursal, spleen and bone marrow collected from the provinces of Guangxi, Anhui, Jiangshu, Zhejiang and Hainan during the years of 2000-2006, were detected by a developed reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for IBDV. Viral isolations were performed on the positive samples by chicken embryo inoculation via chorio-allantoic membrane (CAM) or cell culture with chicken embryo fibroblast (CEF) and 23 isolates of IBDV were obtained. A set of primer was designed to amplify the *vVP2* of 23 isolates and 5 commercial vaccine strains with intermediate and intermediate-plus virulence by RT-PCR. The PCR products were analyzed by restriction enzyme analysis (REA) and sequenced respectively. The sequences of all the isolates and reference viruses were analyzed and compared, and their phylogenetic tree was made based on the nucleotide sequences. The results indicated that isolate BH09, BH11, JS1, JS7, YY1, YY6, YL051, 050222, TSC-2(9), TZ(3) and HN0602 were

收稿日期: 2006-08-17

基金项目: 广西科技攻关项目(0537008-3A, 桂科计 2007-19-4-3); 教育部科研重点项目(02116)

作者简介: 阳秀英(1979-), 女, 广西桂林人, 硕士, 助教, 现在广西右江民族医学院工作

* 通讯作者: 韦平, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事禽病与病原分子生物学的研究, E-mail: pingwei8@eyou.com

classified to be very virulent IBDV (vvIBDV), and have close phylogenetic relationship with other Chinese isolates, Japanese isolate OKYM and European isolate DV86 and UK66, while isolate 040124, YL052, 020180, YLZF2, 040131, BH15, YY2, 050045, 050057, 050258, TSC-1(3) and A038 were classified to be classical IBDV (cIBDV). Isolate 040124 and YL052 were further identified as intermediate and intermediate-plus virulent vaccine strains, and the rest 10 isolates were identified as attenuated vaccine strains. The results of the study demonstrated that the viruses prevailing in chickens in these 5 provinces during 2000-2006 are vvIBDV and there is no significant evident divergence in *vVP2* of all the isolates on both time and geology.

Key words: RT-PCR; restriction enzyme analysis (REA); very virulent IBDV; classical IBDV; variant IBDV; hypervariable region of VP2; molecular epidemiology

鸡传染性法氏囊病 (Infectious bursal disease, IBD) 是由鸡传染性法氏囊病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的一种主要危害幼鸡的急性、高度接触性、杀淋巴细胞性的传染病^[1]。超强毒株 (Very virulent IBDV, vvIBDV)、经典毒株 (Classical IBDV, cIBDV) 和变异株 (Variant IBDV, vIBDV) 等各种致病型病毒的流行使病情变得复杂, 同时它是一种免疫抑制性疾病, 长期、严重的免疫抑制可使鸡群对其它病毒性或细菌性继发感染的敏感性增加, 对各种疫苗的应答能力下降, 甚至引起免疫失败^[2~4]。有资料表明, 对肉鸡和产蛋鸡而言, 1 周龄内感染 vvIBDV 易导致免疫抑制、生产性能差, 且对马立克氏病 (MD) 和呼吸系统疾病 [如新城疫 (ND)、禽流感 (AI) 和传染性支气管炎 (IB)] 的弱毒疫苗初次免疫时的抗体应答水平较差^[5]。目前认为该病毒 VP2 基因高变区氨基酸残基的突变是引起病毒毒力及抗原变异的一个重要因素, 研究表明 IBDV 毒力及抗原变异的 50% 发生在该区域。因此, 分离与鉴定 IBDV 地方流行毒株, 从分子水平对分离毒株进行研究, 分析其核苷酸序列及推导的氨基酸序列, 可更好地了解 and 追踪病毒的基因变异情况, 有助于临床上正确地使用疫苗、研制新型疫苗和建立有效的防治措施。

1 材料与方法

1.1 病料

收集于广西 (包括南宁、北海、玉林 3 个主要养鸡地区)、江苏、浙江、安徽、海南各地的临床疑似 IBD 的病鸡及有肿大、出血以及炎症渗出物等病变的法氏囊, 以及骨髓和脾脏。

1.2 鸡胚

9 日龄健康鸡胚, 分别购自南宁市良凤农牧有限责任公司和广西华桂源种禽有限公司。

1.3 试剂

M-MLV 逆转录酶 (2.5 U/ μ L)、Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L)、dNTPs (25 mmol/L)、MgCl₂ (25 mol/L)、10 \times PCR Buffer 以及组织样品 RNA 抽提的 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 均购自上海生工生物工程有限公司; 限制性内切酶 *Ssp* I (10 U/ μ L) 和 *Sac* I (10 U/ μ L), 购自东洋坊; Agarose Gel DNA Purification Kit, 购自 TaKaRa 公司; 其它所用试剂均为分析纯产品。

1.4 IBDV 商品疫苗毒株及已鉴定的分离株

5 株疫苗株分别从市场购得, 其代号及生产公司见表 1; 分离株 020180 和 YLZF2 为先前实验室分离鉴定并保存^[6]; 毒株 HN0602 为海南省职业技

表 1 参考疫苗株一览表

Table 1 Reference IBDV vaccine strains

毒株 Vaccines	毒力 ^a Virulence	来源 Source
B87(BJ)	中等毒力	商品冻干疫苗 (CEF 毒, 北京海淀中海动物保健科技公司)
B87(in)	中等毒力	商品冻干疫苗 (内蒙古生物制品厂公司)
Bursine-2	中等毒力	商品冻干疫苗 (美国富道动物保健品公司)
FW2512	中等偏强	商品冻干疫苗 (梅里亚动物保健有限公司)
YSLMB	中等偏强	商品冻干疫苗 (雅贝克药物与化学工业有限公司)

a. 产品标注的毒力 a. Virulence of the vaccine

术学院郑继昌先生从临床发病鸡分离鉴定并提供。

1.5 病料核酸的检测

1.5.1 病料处理 剪碎采集的法氏囊、骨髓和脾脏,按 1:5 比例加入灭菌生理盐水制成悬液,反复冻融 3 次,3 000 r/min 离心 5 min,取上清保存备用。

1.5.2 RNA 的抽提 病料悬液的上清使用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒并按其说明进行 RNA 的抽提,最后加入 25 μ L 无 RNA 酶的双蒸水溶解抽提的样品 RNA,立即进行反转录或 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5.3 反转录合成 cDNA 取抽提的 RNA 样品 14.5 μ L,加入随机引物 1 μ L(25 mmol/L),70 $^{\circ}$ C 作用 5 min,置 -20 $^{\circ}$ C 冰浴作用 5 min,然后加入 5 \times RT Buffer 5 μ L、dNTPs 2 μ L、Rnasin 0.5 μ L、M-MLV 逆转录酶 1 μ L,混匀,置 42 $^{\circ}$ C 反转录 1 h,96 $^{\circ}$ C 灭活反转录酶 5 min,即得 cDNA。获得的 cDNA 可直接用于 PCR 扩增或置 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.5.4 *vVP2* 片段的 PCR 扩增 扩增的引物及其反应参数参照韦平等^[6]和龙进学等^[7]的方法进行。引物序列:IBDs 5'-CCCAGAGTCTACACCATA-3',IBDa 5'-TCCTCTTGCCACTCTTTC-3';具体步骤如下:在反应管中加入 3 μ L 经反转录获得的 cDNA、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、MgCl₂ 1.5 μ L、引物各 0.5 μ L (50 mmol/L)、dNTPs 0.5 μ L、DNA 聚合酶 0.6 μ L,加灭菌双蒸水至 25 μ L,按如下程序进行 PCR 扩增:95 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。预期扩增的目的片段大小约 471 bp。

1.5.5 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物 取 6 μ L 扩增产物与 2 μ L 6 \times 加样缓冲液混合,加入含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上以 60~80 V 电压电泳 50~60 min,在凝胶成像系统下观察结果并拍照记录。

1.6 病毒分离

1.6.1 病料处理 取 1.5.1 制备的上清经 0.45 μ m 滤膜过滤除菌或按每毫升悬液 2 000 U 的比例加入双抗(青霉素和链霉素),4 $^{\circ}$ C 过夜,经血平板划线确定无菌后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6.2 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)接种分离病毒 取 1.6.1 中获得的病料处理液按 0.2 mL/枚经 CAM 各分别接种 2 枚 9 日龄鸡胚,置 37 $^{\circ}$ C 孵育,每 12 h 照蛋检查一次,弃去 24 h 内死亡的鸡胚。24 h 后死亡的鸡胚在无菌下剖解,观察鸡胚有无肉眼可见的病变,同时取其尿囊液进行血凝试验(HA)和鲜血

平板的细菌培育,确定为阴性后,连续盲传 2~3 代,直至鸡胚出现死亡和明显病变,收集其尿囊液、绒毛尿囊膜及病变明显的胚体。

1.6.3 接种鸡胚成纤维细胞分离病毒 取 1.6.1 中获得的病料处理液按 0.1 mL/瓶均匀滴加入到预先培养的 CEF 单层,37 $^{\circ}$ C 吸附 40~60 min 后吸去病料液,加入新鲜细胞培养液,每天观察细胞病变(CPE)。

1.6.4 病毒分离物 *vVP2* 的 RT-PCR 鉴定 收集死亡鸡胚的绒毛尿囊膜、胚体以及有 CPE 的细胞培养物,按 1.5 所述方法进行检测。

1.7 分离株 *vVP2* 的限制性内切酶分析

取 1.6.4 获得的 PCR 产物用 *Ssp* I 和 *Sac* I 限制性内切酶进行酶切分析。*Sac* I 酶切反应体系:PCR 产物 5 μ L、10 \times L buffer 1 μ L、*Sac* I 2 U,灭菌双蒸水补足 10 μ L;*Ssp* I 酶切反应体系:PCR 产物 5 μ L、10 \times Basal Buffer 1 μ L、*Ssp* I 2 U,灭菌双蒸水补足 10 μ L。

上述样品混匀后,置 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中消化过夜(>10 h),然后取消化液进行琼脂糖凝胶电泳,观察酶切的结果。

1.8 分离株 *vVP2* 基因序列的测定与分析

1.8.1 PCR 产物的纯化及测序 取 1.6.4 中获得的 *vVP2* 扩增产物,并经琼脂糖凝胶电泳确认后,切取目的带的凝胶采用 TaKaRa 公司的试剂盒 Agarose Gel DNA Purification Kit 并按其说明书进行回收。将纯化后的 PCR 产物交由上海鼎安生物科技有限公司进行 DNA 序列的测定。

1.8.2 *vVP2* 基因序列的比较分析 应用 DNASTAR 软件对本试验所分离到毒株的 *vVP2* 序列与 GenBank 所公布的其他毒株的序列(毒株名及其序列号:FW2512/DQ656499;YSLMB/DQ656512;B87(BJ)/DQ656515;B87(in)/DQ656516;Bursine-2/DQ656517;CU1/D00867;STC/AY819701;GLS/DD187399;OKYM/D49706;DV86/D16675;UK661/AJ878898;JS30-99/AY288048;SD1-97/AY288047;HK46/AY321957;GX8.99/AY305386)进行比较分析,同时绘制其遗传系谱树。

2 结果

2.1 临床病料 IBDV 核酸检测的结果

从具有肿大、出血以及炎症渗出物等病变的法氏囊病料样品中均可直接扩增出 IBDV 特异性的目

的带(471 bp,图略),证实样品中均含有IBDV。

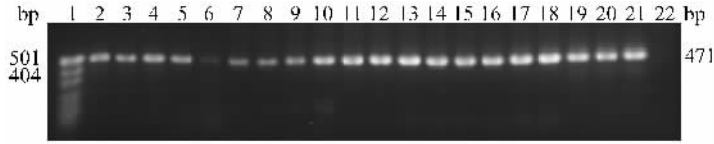
2.2 病毒分离的结果

2.2.1 鸡胚接种的表现 盲传2代后,接种的病料样品均可使鸡胚在接种后44~96 h死亡。取出其尿囊膜及胚体,可见膜增厚并有白色痘斑;胚体表现为全身皮下严重出血,头颈部和四肢末端有出血,剖开胚体偶尔可见肝脏表面有坏死点。对死亡鸡胚尿囊液进行的HA试验和细菌培养检查均为阴性。

2.2.2 CEF培养的结果 病料接种细胞传至第2

代后,病毒开始适应细胞并在接种89 h后开始出现细胞变圆,随后变圆的细胞增多,部分死亡和脱落,瓶底可看到空泡的出现。

2.2.3 分离物RT-PCR的鉴定结果 对死亡的鸡胚或出现细胞病变的细胞分别取其尿囊液和收获的细胞毒进行IBDV的RT-PCR鉴定。结果共有20份样品扩增出471 bp的IBDV特异性目的带(见图1)。初步证实从病料中成功分离到了20株IBDV。



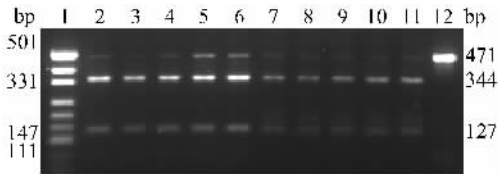
1. pUC19 DNA/ *Msp* I (*Hpa* II) marker; 2. 040124; 3. 040131; 4. YL051; 5. YL052; 6. BH09;
7. BH11; 8. BH15; 9. JS1; 10. JS7; 11. YY1; 12. YY2; 13. YY6; 14. 050045; 15. 050057; 16. 050222; 17. 050258;
18. TSC-1(3); 19. TSC-2(9); 20. A038; 21. TZ(3); 22. Negative control

图1 病毒分离株RT-PCR的鉴定结果

Fig. 1 Results of identification for IBDV by RT-PCR

2.3 分离株PCR产物酶切分析结果

2.3.1 *Sac*I酶切分析的结果 有040124、040131、YL052、BH15、YY2、050045、050057、050258、TSC-1(3)、A038共10个分离株的vVP2基因扩增产物(471bp)被*Sac*I酶切产生344 bp和127bp的2条带(尽管部分样品仍有少量产物未被完全酶切),具有cIBDV的特征(见图2)。

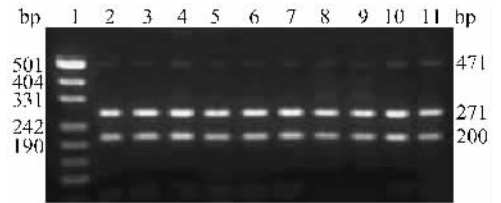


1. pUC19 DNA/ *Msp* I (*Hpa* II) marker; 2. 040124;
3. 040131; 4. YL052; 5. BH15; 6. YY2; 7. 050045; 8. 050057; 9. 050258; 10. TSC-1(3); 11. A038; 12. Undigested control

图2 分离株PCR产物*Sac*I酶切的结果

Fig. 2 The result of the PCR products digested by *Sac* I

2.3.2 *Ssp*I酶切分析的结果 有YL051、BH09、BH11、YY1、YY6、050222、JS1、JS7、TSC-2(9)、TZ(3)共10个分离株的vVP2基因扩增产物(471 bp)被*Ssp*I酶切产生271 bp和200 bp的2条带(尽管仍有极少量产物未被完全酶切),具有vvIBDV的特征(见图3)。



1. pUC19 DNA/ *Msp* I (*Hpa* II) marker; 2. YL051;
3. BH09; 4. BH11; 5. YY1; 6. YY6; 7. 050222; 8. JS1; 9. JS7; 10. TSC-2(9); 11. TZ(3)

图3 分离株PCR产物*Ssp*I酶切的结果

Fig. 3 The result of the PCR products digested by *Ssp* I

2.4 分离株vVP2基因序列测定及对比分析的结果

2.4.1 核苷酸序列测定的结果及分析 23株分离株(包括实验室先前分离的2株及郑继昌先生提供的1株)和5株中等毒力商品疫苗株的vVP2基因的测序结果表明,与已发表的IBDV血清I型毒株相比,没有发现核苷酸的缺失或插入,同源性90.9%~100%,与国内外其它参考株的同源性为88%~100%;其中050222、BH11、BH09、JS1、JS7、TSC-2(9)、TZ(3)、YL051、YY1、YY6、HN0602共11株属于vvIBDV的分离株与日本分离株OKYM及国内分离株JS30-99的核苷酸序列同源性较高,分别为97.5%~100%和97%~98.7%;020180、

050045、050057、050258、A038、TSC-1(3)、YLZF2、YY2、040131、BH15 共 10 株与常用商品疫苗株 B87 (BJ) 的核苷酸序列同源性较高,为 94.03%~100%;040124、YL052 2 株分离株与中等及偏强毒力商品疫苗株 B87(in)、FW2512、Bursine-2 的核苷酸序列同源性在 99.2% 以上。

2.4.2 *vVP2* 推导的氨基酸序列及分析 根据测定的 23 株 IBDV 分离株的核苷酸序列推导出其氨基酸序列,并进行比较分析,结果发现 050222、BH11、BH09、JS1、JS7、TSC-2(9)、TZ(3)、YL051、YY1、YY6、HN0602 共 11 株的 *vVP2* 毒力相关位点的氨基酸分别为 222A、249Q、254G、256I、279D、

284A、294I、299S,均符合 vvIBDV 的特征;BH15、020180、050045、050057、050258、A038、TSC-1(3)、YLZF2、YY2、040131 共 10 株的 *vVP2* 毒力相关位点的氨基酸分别为 222P、249Q、254G、256V、279N、284T、294L、299N,均符合弱毒疫苗株的特征;而分离株 040124、YL052 既具有强毒株的特征,即分别在 326、328、330 和 332 位为丝氨酸的七肽区 (SWSASGS) 和 279D,但同时也具有弱毒株的特征 (284T),另外还具有 242I 的 vvIBDV 特征,与参考毒株 B87(in) 和 FW2512 完全一致。23 个分离株及 5 个参考疫苗株 *vVP2* 毒力及抗原相关位点的特征性氨基酸变化具体见表 2。

表 2 23 个分离株及 5 个疫苗株 *vVP2* 毒力及抗原相关位点的氨基酸

Table 2 Amino acids at the critical sites of *vVP2* of twenty-three isolates and 5 vaccine strains

分离株 Isolates	关键位点 Critical sites								其它位点 Other sites								
	h1		h2		hp												
	222	318	323	324	326	328	330	332	242	249	253	254	256	279	284	294	299
B87(BJ)	A	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
B87(in)	L	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	V	D	T	L	N
Bursine-2	S	G	D	Q	S	S	S	S	I	H	H	G	A	D	T	L	N
FW2512	L	G	D	Q	S	S	S	S	I	H	Q	G	A	D	T	L	N
YSLMB	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	H	Q	G	A	N	A	I	S
040124	L	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	T	L	N
YL052	L	G	D	Q	S	S	S	S	I	H	Q	G	A	D	T	L	N
020180	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
040131	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
050045	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
050057	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
050258	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
A038	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
BH15	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
TSC-1(3)	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
YLZF2	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
YY2	P	G	D	Q	S	S	R	S	V	Q	H	G	V	N	T	L	N
050222	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
BH11	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
BH09	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
JS1	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
JS7	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
TSC-2(9)	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
TZ(3)	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
YL051	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
YY1	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
YY6	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S
HN0602	A	G	D	Q	S	S	S	S	I	Q	Q	G	I	D	A	I	S

h1. 第一亲水区; h2. 第二亲水区; hp. 七肽区

h1. First hydrophilic region; h2. Second hydrophilic region; hp. Heptapeptide region

2.5 遗传系谱树分析

根据测定的核苷酸序列绘制的系谱树发现,23 个 IBDV 分离株可明显分为 2 群,属于 cIBDV 的第 1 群为 10 个弱毒分离株及 2 个中等偏强毒力的分离株,弱毒分离株与美国经典弱毒株 CU1 和中等毒力疫苗株 B87(BJ)、中等偏强毒力分离株与中等及

偏强毒力商品疫苗株 B87(in)、FW2512、Bursine-2 的亲源关系最近;属于 vvIBDV 的第 2 群的 11 个分离株则在另一个分支上,与同属 vvIBDV 的其它地方分离株 JS30-99、JS1、JS7、SD1-97、GX8-99、OKYM、DV86 和 UK661 等的亲源关系较近,见图 4。

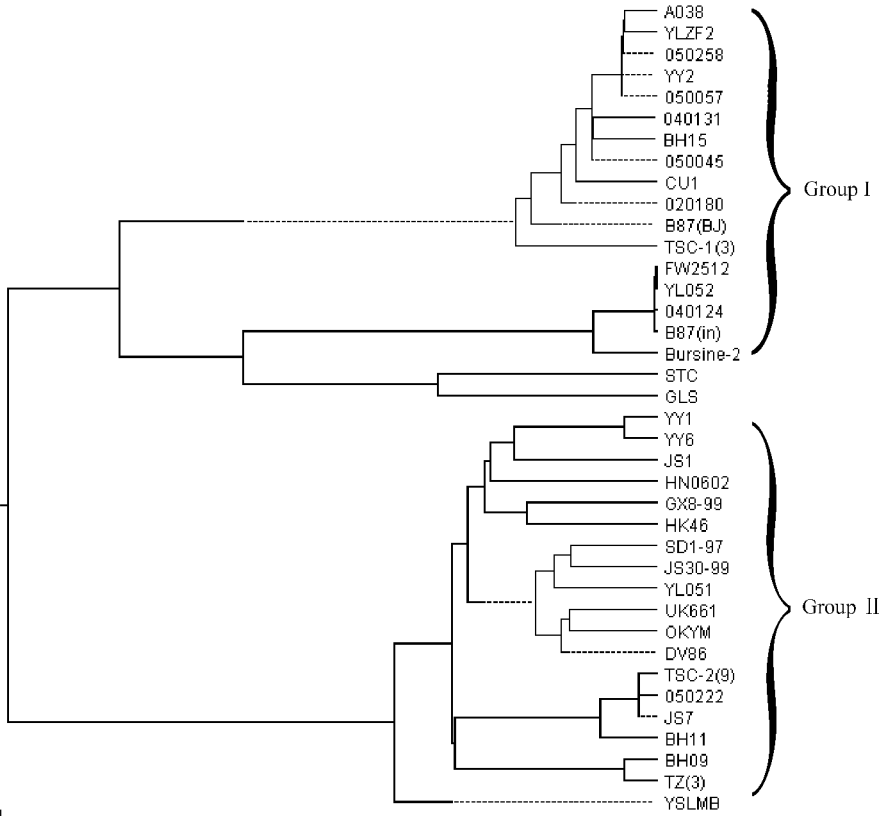


图 4 23 个 IBDV 分离株与参考毒株的系谱树

Fig. 4 Phylogenetic tree of 23 IBDV isolates and some reference strains

2.6 分离株及其来源病例的基本情况分析

分离的 23 株 IBDV 地方流行株及其来源病例的基本情况列于表 3。由表 3 可知,我国广西、江苏、浙江、安徽、海南各地商业鸡群中均有 IBD 的流行,且主要以 vvIBDV 流行为主;发病日龄大多在 60 日龄以前,而且多与其它病毒的二重感染或继发细菌性疾病、球虫病的情况很普遍,比率达 68% (16/23)。

3 讨论

3.1 收集广西、江苏、浙江、安徽、海南 5 个省区临床发生的疑似 IBD 病鸡的法氏囊、脾脏和骨髓,经

RT-PCR 检测为阳性后,用 9 日龄鸡胚或鸡胚成纤维细胞进行病毒分离。盲传 2~3 代后,可使鸡胚在接种后 44~96 h 死亡或产生细胞病变。死亡鸡胚均具有被 IBDV 感染的特征性病变:尿囊液呈淡绿色,膜由于增厚而变得浑浊,胚体表现为全身皮下严重出血,头颈部和四肢末端有出血,剖开胚体偶尔可见肝脏表面有坏死点。经 RT-PCR 鉴定,证实均属于 IBDV 毒株,同时说明 IBDV 的感染广泛存在于鸡群中。

3.2 用来分离病毒的病料有 19 份为法氏囊,且法氏囊都表现为不同程度的肿大、充血、出血,有些甚至呈紫葡萄样,有的有黏液和干酪样渗出物;另外 3

表 3 IBDV 分离株及其来源病例的基本背景情况

Table 3 The background of isolates and their original field cases

分离株 Isolates	分离年份 Isolated years	日龄 Age/d	品种 Breeds	地点 Place	法氏囊及其它病变 Lesions of bursa and other	致病型 Pathotypes	共感染 Co-infection
040124	2004	40	花鸡	广西南宁	出血,腺胃与肌胃交界处出血	cIBDV	<i>E. coli</i> 、NDV
040131	2004	18	白鸡	广西南宁	肿大、出血,有黏液	cIBDV	<i>E. coli</i>
BH09	2004	32	花鸡	广西北海	肿大、充血,有黏液、干酪样物	vvIBDV	CIAV
BH11	2004	32	花鸡	广西北海	严重出血	vvIBDV	CIAV
BH15	2004	32	花鸡	广西北海	肿大	cIBDV	CIAV
JS1	2005	63	三黄鸡	江苏滨海	肿大、出血	vvIBDV	球虫病
JS7	2005	30	土鸡	江苏滨海	肿大、出血	vvIBDV	球虫病
YY1	2005	不详	不详	浙江余姚	肿大、出血	vvIBDV	不详
YY2	2005	不详	不详	浙江余姚	肿大、出血	cIBDV	不详
YY6	2005	不详	不详	浙江余姚	肿大、出血	vvIBDV	不详
YL051	2005	35	蛋鸡	广西玉林	出血,有干酪样渗出物	vvIBDV	MDV
YL052	2005	35	蛋鸡	广西玉林	出血,有干酪样渗出物	cIBDV	MDV
050045	2005	不详	不详	广西南宁	出血	cIBDV	不详
050057	2005	30	乌鸡	广西南宁	肿大,出血	cIBDV	不详
050222	2005	不详	不详	广西玉林	肿大,出血	vvIBDV	AIV
050258	2005	60	三黄鸡	广西玉林	肿大,出血	cIBDV	多杀性巴 氏杆菌、MDV
TSC-1(3)	2005	24	三黄鸡	广西玉林	花斑肾	cIBDV	MDV
TSC-2(9)	2005	25	三黄鸡	广西玉林	花斑肾	vvIBDV	MDV
A038	2003	30	麻鸡	安徽	骨髓脂肪化,颜色为淡黄色	cIBDV	CIAV
TZ(3)	2005	45	三黄鸡	广西南宁	严重出血,紫葡萄样	vvIBDV	MDV
020180	2002	35	不详	广西钦州	肿大,轻微出血	cIBDV	未检测
YLZF2	2000	30	不详	广西玉林	严重出血,紫葡萄样	cIBDV	未检测
HN0602	2006	31	不详	海南	肿大、出血	vvIBDV	不详

份分离病料则为骨髓和脾脏,脾脏表现肿大。法氏囊、骨髓和脾脏均是机体的免疫器官,其中的 B 淋巴细胞是 IBDV 的靶细胞,这必然导致鸡群的免疫器官受到严重损害,从而导致患病鸡的免疫功能受到严重破坏,使鸡的免疫力和抗病力都明显降低^[8~10]。从用来分离病毒的病例临床情况的调查发现,患病鸡群均普遍表现生长阻滞、生产性能下降、疫苗免疫效果不佳等,而且均有不同程度的细菌(如大肠杆菌)继发感染、球虫感染和其它病毒(如 NDV、MDV 和 CIAV)的感染^[11],这是鸡群免疫力和抗病力下降的表现之一,也可能是导致目前临床上鸡群多种疾病易暴发,临床症状复杂,使养禽业的疫病更加严重和复杂的原因之一。

3.3 采用限制性核酸内切酶 *Ssp* I 和 *Sac* I 对 20 个分离株进行分型鉴定,结果有 10 个分离株具有 *Ssp* I 酶切位点而无 *Sac* I 酶切位点,属于 vvIBDV;

另外 10 个分离株则均有 *Sac* I 酶切位点而无 *Ssp* I 酶切位点,属于 cIBDV;而未发现有 vvIBDV 的流行。因此,采用限制性内切酶分析技术可快速对 IBDV 流行毒株的致病型进行初步鉴定,但分离到的 cIBDV 属于强毒株还是弱毒疫苗株还有待进一步的研究。有资料表明具有 *Bst*N I 和 *Sty* I 酶切位点,即 222 位氨基酸未发生变异的毒株是经典强毒株^[12]。

3.4 对从分离自上述 5 个省区的 23 个 IBDV 现场流行株 vVP2 的核苷酸序列(GenBank 登录号分别为 DQ656494~DQ656498、DQ656500~DQ656507、DQ656511、DQ656513、DQ656514、DQ656518 ~ DQ656522、DQ659246、EF423571)及推导的氨基酸序列进行了比较分析。与 cIBDV 毒株相比,11 个 vvIBDV 分离株在一些关键位点发生了与欧洲、日本及中国(大陆、香港)的 vvIBDV 一致的变异,即 222P→A、242 V→I、253H→Q、256V→I、294L→I、

299N→S,与 vvIBDV 的欧洲分离株 DV86、中国香港分离株 HK46、日本分离株 OKYM、中国广西分离株 GX8/99 完全一致,可视为 vvIBDV 的特征性氨基酸,与 vIBDV 的 222T/S/Q、249K、254S 也有差别(见表 2),10 个分离株在七肽区是完全保守的,即为 SWSASGS;而另外 10 个分离株在第 222、242、253、279、284 位特征性氨基酸分别为 P、V、H、N 和 T,与弱毒疫苗株完全一致;余下的 2 个分离株 040124 和 YL052,在 242V→I、253H→Q、279N→D 发生了与 vvIBDV 相一致的变异,七肽区也完全保守,而 222L 与中等及偏强毒力商品疫苗株相同,284T 则符合弱毒疫苗株的特征,与 5 株中等及偏强毒力商品疫苗株以及 GenBank 上发表的其它同类毒株的核苷酸序列同源性在 90.1%~100%,而与其中 B87(in)、FW2512 两个中等偏强毒力商品疫苗株的核苷酸同源性更高达 100%,可能是由于这些中等偏强毒力疫苗株先前在鸡群中使用后,造成场地污染而感染新进栏的易感鸡所致^[13]。

3.5 研究的 23 个 IBDV 分离株分别分离自广西、江苏、浙江、安徽、海南 5 个省,病料采集时间为 2000-2006 年。虽然其中 2003 年的 A038 株在 345 位(A→T),2005 年的 JS1 株在 348 位(P→S)和 350 位(T→P)发生了其它毒株均没有出现的氨基酸位点变化,但不具有毒力差异的特征,所有毒株 VP2 基因高变区的序列在时间和地域上无明显的差异。证明这些地区流行的毒株在过去的这一段时间里其 VP2 基因高变区并没有发生明显的特征性的变异,保持相对的恒定。因此,根据本研究的试验结果可以得出结论:近年来上述省区 IBDV 流行的毒株主要为 vvIBDV,应成为当前 IBDV 的防治重点。

3.6 从法氏囊等器官有病变的个体中分离到的 10 个弱毒疫苗株,笔者认为可能是由于该鸡群先前或同时感染了 vvIBDV 毒株所致,因为笔者在分离到弱毒疫苗株的同一鸡群的不同个体中大多(8/12)同时分离到了 vvIBDV。由于疫苗毒株已经适应鸡胚,所以在采用鸡胚接种来进行病毒的分离时,病料样品中的疫苗毒株在培养的第一代就可致死鸡胚或引起明显的鸡胚病变,而野毒株则需要传 2~3 代适应鸡胚后方可引起类似的病变。

参考文献:

- [1] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 高福,刘文军,主译. 第 10 版. 北京:中国农业出版社,1997.
- [2] 韦平,丁家波. 几种引起家禽免疫抑制的病毒性疾病及其作用机理[J]. 中国预防兽医学报,2000,22(4):316~318.
- [3] 韦平. 家禽病毒性免疫抑制病的危害及其防制策略[J]. 中国家禽,2001,23(22):182~185.
- [4] 王笑梅,王秀荣,邱冬,等. 雏鸡混合感染 IBDV 与 CAV 的研究[J]. 中国预防兽医学报,2000,22(5):321~324.
- [5] Yegani M, Butcher G D, Nilipour A H. Immunosuppression-threat to bird health and welfare [J]. World Poultry,2005,21(2):18~22.
- [6] 韦平,龙进学,阳秀英,等. 传染性法氏囊病病毒(IBDV)快速检测与分型技术[J]. 中国兽医学报,2004,24(4):313~316.
- [7] 龙进学,韦平,阳秀英. 传染性法氏囊病快速诊断技术的建立及其应用[J]. 广西大学学报(自然科学版),2003,28(2):103~108.
- [8] 周继勇,于涟,李双茂. 浙江地区传染性法氏囊病病毒野毒株的血清亚型分析[J]. 中国预防兽医学报,1999,30(6):567~573.
- [9] 周继勇,李建荣. 传染性法氏囊病病毒变异株弱毒的遗传稳定性与免疫原性[J]. 中国兽医学报,2000,20(4):317~320.
- [10] 曹永长,毕英佐,梁志清,等. 超强传染性法氏囊病病毒株保护性抗原的分子特征[J]. 中国兽医学报,1998,18(6):521~526.
- [11] 蒋玲艳,韦平,李莉萍,等. 鸡传染性贫血病毒与其他禽免疫抑制疾病病毒的混合感染[J]. 中国兽医学报,2006,26(6):591~593.
- [12] Jackwood D J, Jackwood R J, Sommer S E. Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant in factious bursal disease viruses [J]. Virus Res,1997,49:131~137.
- [13] 阳秀英,韦平,周祥,等. 传染性法氏囊病病毒 YL051、YL052 的分离及其 VP2 基因高变区序列的比较分析[J]. 广西农业生物科学,2006,25(2):101~106.