

郑欣, 胥焯然, 宫晓, 等. 一株以肝脾白色坏死点为特征的鹅源番鸭呼肠孤病毒的分离鉴定 [J]. 福建农业学报, 2024, 39 (10): 1152–1161.
ZHENG X, XU Z R, GONG X, et al. Isolation and Identification of a Goose-origin Muscovy Duck Reovirus Causing White Pinhead Necrotic Foci on Liver and Spleen in Geese [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (10): 1152–1161.

一株以肝脾白色坏死点为特征的鹅源番鸭呼肠孤病毒的分离鉴定

郑 欣^{1,2}, 胥焯然^{1,2}, 宫 晓³, 江丹丹², 程晓霞², 朱小丽², 郑 敏²,
曾 丽², 肖世峰^{2,3}, 曾显成¹, 陈少莺^{2*}, 陈仕龙^{2*}

(1. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002; 2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013; 3. 青岛易邦生物工程有限公司, 山东 青岛 266000)

摘要:【目的】通过对雏鹅以肝脾白色坏死点为特征的病料进行病原分离与鉴定, 为该病的防控提供科学依据。

【方法】利用 PCR 检测排查病原, 挑选阳性病料接种番鸭胚和番鸭成纤维细胞 (muscovy duck embryo fibroblast cells, MDEF) 进行病毒分离, 对分离毒再进行 RT-PCR 鉴定、病毒关键基因序列分析、动物回归试验验证。【结果】成功分离出一株鹅源番鸭呼肠孤病毒 (goose-origin muscovy reovirus, Go-MDRV), 命名为 JS2022 株。分离毒接种番鸭胚至第 6 代时, 番鸭胚死亡时间稳定在 3~5 d, 胚体出血, 肝脏有大小不一的出血点和坏死灶, 发育受阻。将分离毒尿囊液接种 MDEF, 出现细胞圆缩、崩解等病变。将 JS2022 株 σB 和 σC 基因的核苷酸序列与鹅源番鸭呼肠孤病毒、番鸭呼肠孤病毒 (muscovy duck reovirus, MDRV)、新型鸭呼肠孤病毒 (novel duck reovirus, NDRV) 和禽呼肠孤病毒 (avian reovirus, ARV) 的毒株序列进行同源性比对, 结果显示 JS2022 株与鹅源番鸭呼肠孤病毒毒株的同源性最高, 核苷酸同源性范围分别为 99.1%~99.5% 和 99.3%~99.9%; 动物回归试验成功复制出与临床发病鹅相同的病症。【结论】本试验成功从病死鹅的肝脏和脾脏中分离鉴定 1 株鹅源番鸭呼肠孤病毒 JS2022 株, 为鹅源番鸭呼肠孤病毒病的防治提供参考。

关键词:鹅源番鸭呼肠孤病毒; 分离; 鉴定; σB 基因; σC 基因; 同源性比较

中图分类号: S858.32

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2024) 10-1152-10

Isolation and Identification of a Goose-origin Muscovy Duck Reovirus Causing White Pinhead Necrotic Foci on Liver and Spleen in Geese

ZHENG Xin^{1,2}, XU Zhuoran^{1,2}, GONG Xiao³, JIANG Dandan², CHENG Xiaoxia², ZHU Xiaoli², ZHENG Min², ZENG Li²,
XIAO Shifeng^{2,3}, ZENG Xiancheng¹, CHEN Shaoying^{2*}, CHEN Shilong^{2*}

(1. College of Animal Sciences, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agriculture Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China;
3. Qingdao YeBio Bio-Engineering Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266000, China)

Abstract:【Objective】Pathogen of the disease characterized by white pinhead necrotic foci on the liver and spleen in geese was isolated and identified.【Methods】PCR was used to screen possible pathogens from tissue specimens of diseased birds. Subsequently, the suspect pathogens were inoculated in Muscovy duck embryos and Muscovy duck embryo fibroblasts (MDEF) cells to identify positive isolate for further confirmation by RT-PCR, genes sequencing, and a challenge test on goslings.【Results】A strain of goose-origin Muscovy duck reovirus (Go-MDRV), JS2022, was obtained and inoculated

收稿日期: 2024-08-19 修回日期: 2024-09-20

作者简介: 郑欣 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事兽医免疫学研究, E-mail: zx199991006@163.com

共同第一作者: 胥焯然 (1999—), 女, 博士研究生, 主要从事病毒免疫学研究, E-mail: 530147013@qq.com

* 通信作者: 陈少莺 (1962—), 女, 研究员, 主要从事动物病毒病研究, E-mail: chensy58@163.com; 陈仕龙 (1979—), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物病毒病防控研究, E-mail: cs16116@163.com

基金项目: 福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD2021034); 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目 (XTCXGC2021018、XTCXGC2021012); 福建省农业科学院对外合作项目 (DWHZ2024-05); 福建省科技计划公益类专项 (2021R1026009)

into Muscovy duck embryos causing stunted growth. After 6 viral passages, mortality of the infected embryos stabilized to occur in 3–5 d post-inoculation. Haemorrhagic spots and the typical pinhead necrotic foci were visible on the liver of the dead embryos. On MDEF cells, the inoculation induced cytopathic cell shrinkage and disintegration. By comparing the nucleotides of σB and σC of JS2022 with those of Go-MDRV, Muscovy duck reovirus (MDRV), novel duck reovirus (NDRV), and avian reovirus (ARV), the greatest homology as found between JS2022 and Go-MDRV with the ranges of 99.1%–99.5% on σB and 99.3%–99.9% on σC . In the challenge test, the infected goslings had symptoms identical to those shown in the clinical cases.

【Conclusion】 A strain of Go-MDRV isolated from the diseased geese bearing the specific symptom of white necrotic foci on the liver and spleen was identified and code-named JS2022.

Key words: Go-MDRV; isolation; identification; σB gene; σC gene; homology comparison

0 引言

【研究意义】自2020年以来,我国江苏、山东、福建等鹅养殖地区出现了以雏鹅肝脾白色针尖状坏死点为主要病变特征的新疫病^[1],病原被鉴定为鹅源番鸭呼肠孤病毒(goose-origin muscovy reovirus, Go-MDRV)或新型鹅呼肠孤病毒(novel goose reovirus, NGRV)^[2]。该病发病率和死亡率高,对我国鹅产业的健康发展造成了严重影响。因此,开展鹅源呼肠孤病毒毒株的分离鉴定,有助于更好了解该病的危害及毒株病原情况,为该病预防和控制提供理论基础。【前人研究进展】番鸭呼肠孤病毒(muscovy duck reovirus, MDRV)属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)正呼肠孤病毒属(Orthoreovirus),主要易感宿主为雏番鸭^[3]。1997年以来,我国番鸭养殖场相继暴发了番鸭呼肠孤病毒病,临幊上以肝脾表面和切面大量白色针尖状坏死点为主要病变特征,俗称“番鸭花肝病”或“番鸭肝白点病”^[4]。此病主要在7~45日龄的雏番鸭群中流行,发病率在30%~90%,病死率可高达60%~80%^[5]。有学者从肝脏和脾脏出血的典型病变雏鹅中分离到一株鹅源鸭呼肠孤病毒, σC 基因测定表明是一株鹅源番鸭呼肠孤病毒(Go-MDRV),通过雏番鸭和雏鹅的致病性试验发现Go-MDRV对雏鹅和雏番鸭均有一定的致病性^[6]。根据临床症状和病理变化,可将我国目前流行的水禽呼肠孤病毒分为两种:引起番鸭“肝白点”病的番鸭呼肠孤病毒和引起鸭出血性坏死性肝炎的新型呼肠孤病毒^[3,7]。这两种水禽呼肠孤病毒均能感染鹅,前者感染导致鹅肝脾白点,后者感染肝脾出血坏死样病变。水禽呼肠孤病毒的 σB 蛋白和 σC 蛋白是病毒外衣壳蛋白的成分, σB 蛋白含有群特异性中和抗原表位,能特异性地结合宿主细胞,促进病毒复制位于病毒粒子外衣壳的表面,在病毒的吸附中发挥着重要作用^[8]。 σC 蛋白是病毒外衣壳中最小的一种蛋白,作为吸附蛋白与宿主细胞受体特异性结合,识别并启动宿主病毒感染,是影响病毒宿主

范围和致病性的关键蛋白^[9,10]。水禽呼肠孤病毒作为分节段病毒,病毒复制所需RNA聚合酶矫正功能不强,导致该病毒在复制过程中容易发生基因重组^[11],出现致病性、传染性、致死性和宿主范围有差异的变异株。【本研究切入点】近年来,雏鹅出现软脚、肝、脾白色坏死点样病变的病例逐渐增多^[6,12~15],病原为鹅源番鸭呼肠孤病毒,但是鹅源番鸭呼肠孤病毒与经典的番鸭呼肠孤病毒相比,其全基因与致病性的差异还不明晰,开展鹅源番鸭呼肠孤病毒毒株的分离鉴定,有助于解析番鸭呼肠孤病毒在番鸭和鹅中的进化规律,为致病机制及防控技术研究提供依据。【拟解决的关键问题】为探究江苏省徐州市某鹅养殖场病雏鹅在临床症状上出现肝脏和脾脏白色坏死点、肝脏和肾脏肿大的死亡原因,从病雏鹅肝脏和脾脏中分离得到1株病毒,通过分离鉴定、测序分析和动物回归试验,确定其病原体为鹅源番鸭呼肠孤病毒,为我国番鸭呼肠孤病毒的防控提供分子流行病学研究数据。

1 材料与方法

1.1 病料来源

江苏省徐州市某养殖场,鹅表现出软脚、不愿走动、精神不振等临床症状。发病死亡鹅剖检见肝脏和脾脏有白色坏死点,肝脏和肾脏肿大。

1.2 主要试剂

DL2000 DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶DNA快速回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京擎科生物科技有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂糖均购自Sigma公司;病毒DNA/RNA提取试剂盒、2×Taq Plus Master Mix、5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、反转录试剂盒HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit和RNase-free ddH₂O均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;核酸染料GelStain(10 000×)和大肠杆菌DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司;氨苄青霉素购自生工生物工程(上海)

股份有限公司；切片石蜡和HE染色试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司。

1.3 主要仪器

普通梯度PCR仪(CF-F9677)购自卡尤迪生物科技(北京)有限公司；电泳电源(power600)购自北京百晶生物技术有限公司；凝胶成像分析系统(Tanon-3500)购自上海天能科技有限公司；石蜡切片机(M2235)购自德国徕卡微系统有限公司；超纯水机(UPH-1-10TN)购自四川优普超纯科技有限公司；离心机(TS1520)购自山海天(苏州)科技有限公司；制冰机(IMS-40)购自雪科电器有限公司；高压灭菌锅(MLS-830L)购自普和希健康医疗器械(上海)有限公司。

1.4 试验动物、鸭胚和细胞

番鸭胚和3日龄健康雏鹅购自漳州某养殖场；取孵化15 d的番鸭胚制备番鸭胚成纤维细胞(MDEF)。

1.5 反转录聚合酶链反应RT-PCR检测

将病料组织剪成适当体积，放入研钵，加入3倍组织体积的Hank's液混合研磨成匀浆。随后将病毒组织液于-80℃中反复冻融3次，8000 r·min⁻¹离心10 min，离心后上清液使用0.22 μm滤器过滤，病毒液于-80℃冰箱保存备用。取200 μL病料匀浆上清，按照FastPure Viral DNA/RNA Mini Kit提取试剂盒说明书提取病毒核酸，将提取的RNA按照反转录试剂盒HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书将RNA反转录为cDNA，并置于-80℃中保存备用。

利用Oligo 6引物设计软件，参照GenBank中已发表的MDRV S4序列设计特异性检测引物。同时通过参考相关文献，对鹅细小病毒(goose parvovirus, GPV)^[16]、番鸭细小病毒(muscovy duck parvovirus, MDPV)^[16]、鸭腺病毒B血清2型(duck adenovirus B2, DAdV B2)^[17]、鸭甲型肝炎病毒1型(duck hepatitis A viral, DHAV-1)^[18]、鸭病毒性肠炎病毒(duck virus enteritis, DEV)^[19]、NDRV^[20]、禽流感病毒H9亚型(avian influenza virus H9 subtype, AIV H9)^[21]和禽坦布苏病毒(avian tembusu virus, ATMUV)^[22]等常见鸭源病毒合成检测引物(表1)，由北京擎科生物科技有限公司合成。PCR检测反应体系为2×Taq Plus Master Mix 10 μL，上游引物和下游引物各1 μL，模板2 μL，ddH₂O 6 μL。反应程序为预变性95℃3 min；变性95℃15 s，退火60℃15 s，延伸72℃45 s，共35个循环；彻底延伸5 min后4℃保存。最后取10 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测(1.5%琼脂糖)，使用紫外凝胶成像仪查看结果。

表1 用于病原检测的引物

Table 1 Primers used for pathogen identification

引物名称 Prime name	引物序列 Primers sequence (5'-3')	产物大小 Product size/bp
番鸭呼肠弧病毒 MDRV	F: TTCCTGGCTCGCTAAGATAGA R: ATCCATGCAATCCTGAAGGC	327
鹅细小病毒 GPV	F: GAGGTAGACAGCAACAGAAAA R: GCTCGTCCGTGACCATA	343
番鸭细小病毒 MDPV	F: TAATGGTGGCAGGAATGCACAGTT R: TGTTACCATGATGTCTGAAAT	311
鸭腺病毒B血清2型 DAdV B2	F: TATCCCTACTGGTGGCCCTC R: TCAGTGGCTGCGTACACTTT	581
鸭甲型肝炎病毒1型 DHAV-1	F: CAACTCGACCAATHCCTGG R: CCTGRTGRACCATTGTRACTG	462
鸭病毒性肠炎病毒 DEV	F: TGGGAAGGCTTCGGTCGC R: CATTGCGCCCTTGCTAAATTCTCT	232
新型鸭呼肠弧病毒 NDRV	F: TCGTCACTACTGTCAAGCTC R: TATGTATGAGAGGAGCCACA	594
禽流感病毒H9亚型 AIV H9	F: ACAGAGCATAATGGGATGCT R: GGGCGTCTGGATAGGGTAAT	367
禽坦布苏病毒 ATMUV	F: ATGACGGACACCACCTCCTT R: GGGCTGCGTTACTATTCAACC	200

1.6 病毒分离培养

将PCR鉴定为阳性的研磨液过滤后接种到11日龄的番鸭胚的尿囊腔中，每枚胚接种0.2 mL，接种完后用石蜡封孔，并做好标记。在37℃温箱中培养7 d。每天早晚观察有无死胚，丢弃24 h内死亡胚，在无菌超净台内收集2 d后死亡胚尿囊液，若番鸭胚至第7天还未死亡，则放入4℃冰箱处死后再无菌收集尿囊液，于-80℃保存，之后进行连续传代。将收集到的尿囊液参照上述方法进行核酸提取、反转录，并进行PCR鉴定。

将稳定传代的尿囊液用0.22 μm滤器过滤，取800 μL接种到生长状况良好的MDEF上，置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中，吸附1 h后取出，吸出病毒液，加入2%的维持液，观察细胞状态。当病变达到80%时收集病毒液。经反复冻融后按照同样的方法盲传3代。

1.7 病毒σB和σC基因序列测定及分析

参照GenBank中MDRV σB和σC基因的保守序列设计2对引物(表2)，由北京擎科生物科技有限公司合成。经过RT-PCR扩增基因序列，用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RT-PCR产物。将RT-PCR产物经胶回收试剂盒回收纯化后，按照5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit试剂盒说明书，与载体连接，转化至

DH5 α 感受态细胞, 涂布至含氨苄抗性的LB琼脂平板, 37℃恒温培养箱过夜培养。无菌挑取白色单个菌落, 接种至带有氨苄抗性LB液体培养基中, 37℃摇床220 r·min⁻¹振荡培养8 h, 待菌液浑浊后提取质粒。使用Treliel[®] Plasmid Mini Kit Plus高纯度质粒小提试剂盒, 对提取的质粒进行PCR扩增, 将检测结果为阳性的质粒送往北京擎科生物科技有限公司进行测序, 测序结果在NCBI BLAST网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行比对验证。通过DNAStar 5.0程序包中的MegAlign软件Clustal W方法进行JS2022株 σ B和 σ C基因核苷酸和氨基酸同源性比对, 用MEGA 11软件制作进化树。

表2 扩增番鸭呼肠孤病毒 σ B和 σ C基因的引物
Table 2 Primer used for MDRV σ B and σ C

引物名称 Prime name	引物序列 Primers sequence (5'-3')	产物大小 Product size/bp
σ B-F	GCTTTTGAGCCCTTAGCGTGC	1201
σ B-R	GATGAATACTGAGCCCCGCTGA	
σ C-F	ATGTCGAAACTCCCGCTCC	810
σ C-R	TCAAATGGTCGCAATGGAGA	

1.8 动物回归试验

将16只11日龄健康雏鹅随机分成两组, 攻毒组8羽, 每只在腿肌部位注射1.2 mL病毒尿囊液; 健康对照组8羽, 同样在腿肌部位注射同等剂量的Hank's液。将两组雏鹅分别养在两个动物房内, 饲养14 d, 每天观察记录雏鹅的发病与死亡情况。采集病死鹅的肝脏和脾脏用10%甲醛固定液固定组织用于病理组织切片的制备。

2 结果与分析

2.1 病料的病原检测

如图1所示, 将病料用上述设计的番鸭呼肠孤病毒检测引物以及其他病原检测引物进行PCR扩增, 仅有番鸭呼肠孤病毒特异性引物有扩增条带, 大小为327 bp, 与预期大小相符, 其他病原检测引物均无条带, 初步判断此份临床样品为番鸭呼肠孤病毒感染。

2.2 病毒的鸭胚分离

将病料研磨液经过滤后接种到11日龄番鸭胚, 番鸭胚在传至第2代时开始死亡, 死亡时间在接种后第3天; 传至第6代时番鸭胚死亡时间趋于稳定, 基本稳定在第3~5天。死亡番鸭胚尿囊液清澈, 尿囊膜出现增厚、水肿的现象; 胚体皮肤和皮下出现出血点, 呈鲜红色(图2)。

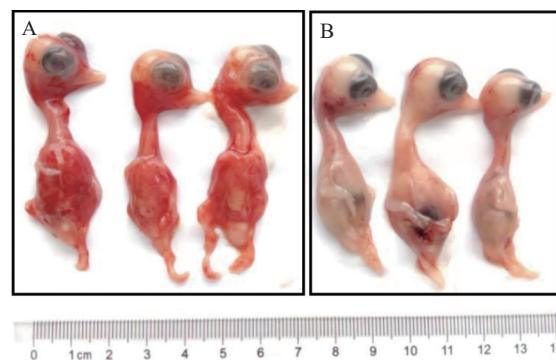


M: DNA分子质量标准; -: 阴性对照; 1~9 检测引物分别为: 番鸭呼肠孤病毒、鹅细小病毒、番鸭细小病毒、鸭腺病毒B血清2型、鸭甲型肝炎病毒1型、鸭病毒性肠炎病毒、新型鸭呼肠孤病毒、禽流感病毒H9亚型、鸭坦布苏病毒; +: 番鸭呼肠孤病毒阳性对照。

M: DL2000 DNA marker; -: negative control; 1~9: detection primers for MDRV, GPV, MDPV, DAdV B2, DHAV-1, DEV, NDRV, AIV H9 and ATMUV, respectively; +: positive control of MDRV.

图1 病料中的病原PCR检测结果

Fig. 1 PCR detection on pathogens in tissue specimens



A: 攻毒组; B: 对照组。

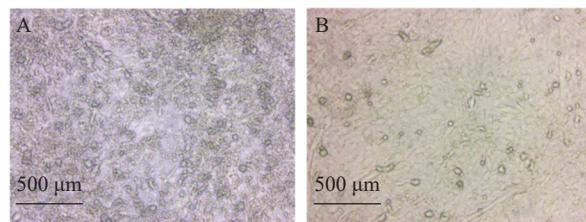
A: infected group; B: control group.

图2 番鸭胚接种分离病毒后3 d 死亡的胚胎病理变化

Fig. 2 Mortality of Muscovy duck embryos 3 d after inoculation

2.3 病毒的细胞分离培养

将稳定传代的尿囊液过滤后接种到生长状况良好的MDEF细胞上, 连续传代, 传至第3代时细胞在第4天开始圆缩、崩解(图3), 传至第6代时趋于稳定。正常对照细胞生长良好, 未出现病变。结果表明成功分离到一株鹅源番鸭呼肠孤病毒, 将该毒株命名为JS2022株。



A: 病变细胞; B: 阴性对照。

A: diseased cells; B: negative control.

图3 尿囊液感染鸭胚成纤维细胞病变

Fig. 3 Pathological changes in MDEF cells treated by allantoic fluid

2.4 σ B和 σ C基因序列测定及分析

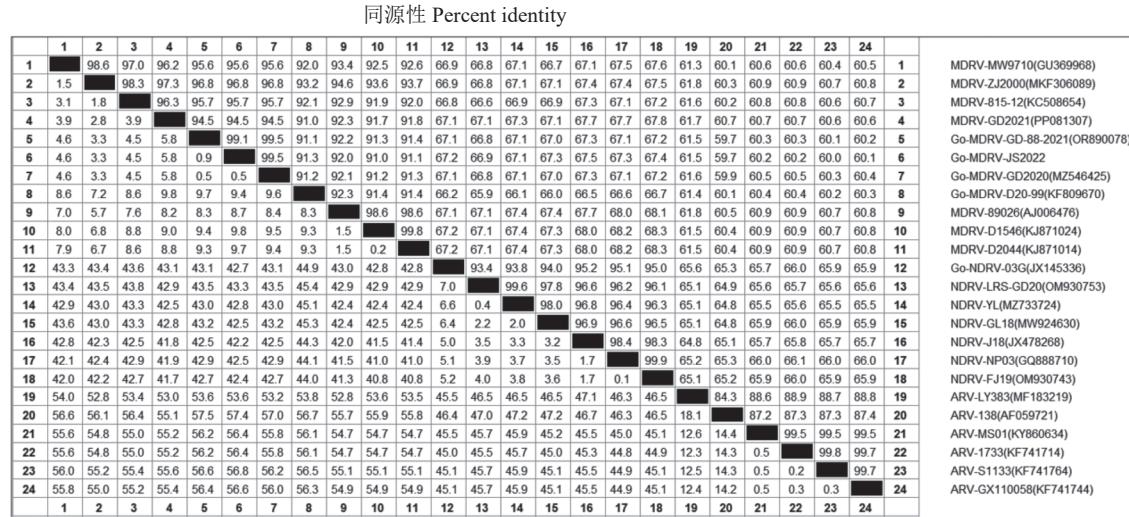
利用DNAStar分析软件进行序列拼接, 并上传

至 GenBank 公共数据库, 登录号为 OP598195~OP598204。JS2022 株 σB 基因片段长度为 1104 bp, 编码 367 个氨基酸; σC 基因片段长度为 810 bp, 编码 269 个氨基酸。通过 DNASTar 5.0 程序包中的 MegAlign 软件 Clustal W 方法进行 JS2022 株 σB 和 σC 基因核苷酸同源性比对(图 4 和图 5)及氨基酸同源性比对(图 6 和图 7), 结果显示 JS2022 株 σB 和 σC 基因序列与鹅源番鸭呼肠孤核苷酸序列的同源性分别为 99.1%~99.5% 和 99.3%~99.9%, 氨基酸序列同源性分别为 92.9%~99.7% 和 92.9%~99.7%; 与禽呼肠孤病毒的同源性最低, 核苷酸同源性分别为 59.7%~61.5% 和 31.4%~33.7%, 氨基酸序列同源性分别为 60.5%~61.3% 和 20.8%~21.4%; 与番鸭呼肠孤病毒的同源性也相对较高, 核苷酸同源性分别

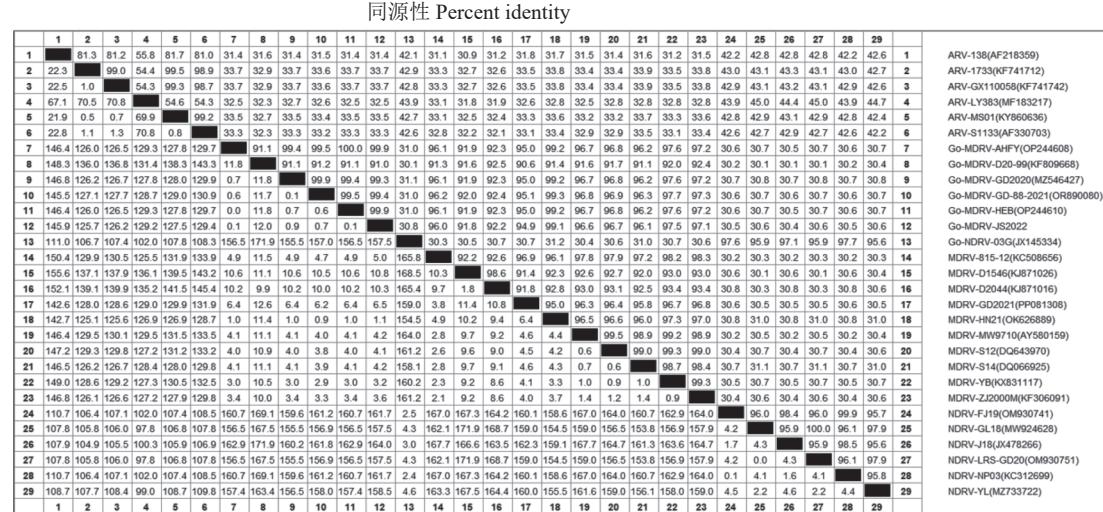
为 91.0%~96.8% 和 91.8%~99.1%, 氨基酸序列同源性分别为 91.8%~97.5% 和 93.6%~99.7%; 与新型鸭呼肠孤病毒的核苷酸同源性分别为 66.9%~67.5% 和 30.4%~30.6%, 氨基酸序列同源性分别为 68.9%~70.6% 和 34.1%~34.7%。

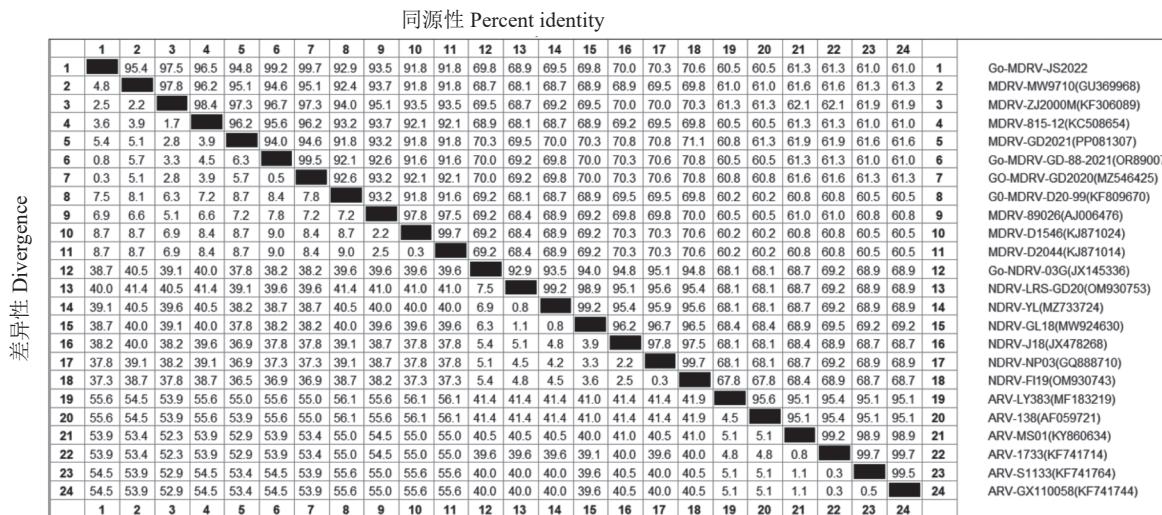
σB 和 σC 基因核苷酸序列同源性结果表明, JS2022 分离株与禽呼肠孤病毒和新型鸭呼肠孤病毒同源性差异较大, 与近年来鹅源番鸭呼肠孤病毒的同源性高, 且 σC 基因与鹅源禽呼肠孤病毒 HEB 株和 AHFY 株同源性高达 99.9%, 核苷酸仅有一个差异位点(A78T), 导致对应的氨基酸位点也发生了变化(E26D), 与鹅源禽呼肠孤病毒 GD2020 株、GD-88/2021 株核苷酸有 6 个差异位点(C17T、A78T、T246C、T405C、T594G、T630C), 对应氨基酸位点

差异性 Divergence

图 4 鹅源番鸭呼肠孤病毒、番鸭呼肠孤病毒、禽呼肠孤病毒和新型鸭呼肠孤病毒毒株的 σB 基因核苷酸序列同源性比对Fig. 4 Homology on nucleotide sequences of σB in Go-MDRV, MDRV, ARV, and NDRV

差异性 Divergence

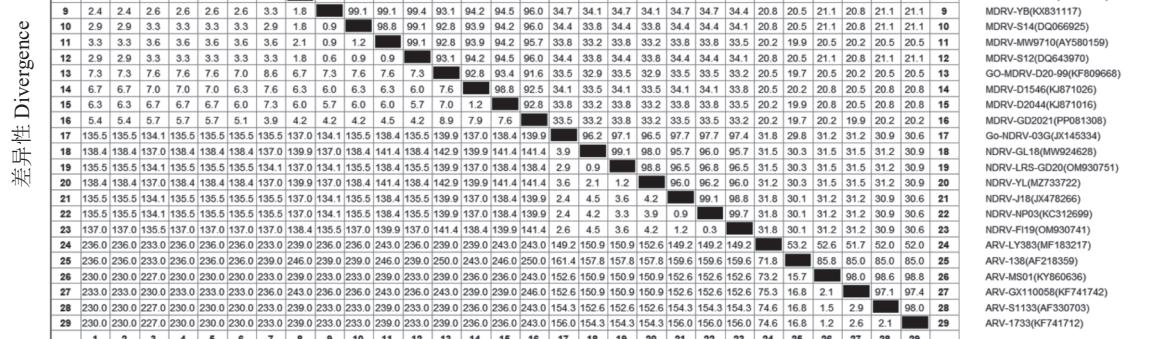
图 5 鹅源番鸭呼肠孤病毒、番鸭呼肠孤病毒、禽呼肠孤病毒和新型鸭呼肠孤病毒毒株 σC 基因核苷酸序列同源性比对Fig. 5 Homology on nucleotide sequences of σC in Go-MDRV, MDRV, ARV, and NDRV

图 6 鹅源番鸭呼肠孤病毒、番鸭呼肠孤病毒、禽呼肠孤病毒和新型鸭呼肠孤病毒毒株 σB 基因氨基酸序列同源性比对Fig. 6 Homology on amino acid sequences of σB in Go-MDRV, MDRV, ARV, and NDRV

有 2 处差异 (A6V、E26D); σB 基因与 GD2020 株、GD-88/2021 株核苷酸有 6 个差异位点 (T33C、C435T、C486A、C819T、A978C、C1098T), 而对应氨基酸位点仅有 1 处差异 (Q326H)。

为了进一步分析 JS2022 株 σB 和 σC 基因序列与其他水禽呼肠孤病毒的进化关系, 根据测序结果用 MEGA 11 软件绘制了 σB 和 σC 基因的系统发育进化树 (图 8 和图 9)。从进化树可看出, 分离株 JS2022

株 σB 基因与 2020 年以来分离到的鹅源禽呼肠孤病毒 GD2020 株、GD-88/2021 株处于同一分支, 与进化树中的所有番鸭呼肠孤病毒株处在同一大分支中, σC 基因也同样与鹅源禽呼肠孤病毒 GD2020 株、GD-88/2021 株、HEB 株、AHFY 株处于番鸭呼肠孤病毒株大分支。表明 JS2022 株与鹅源番鸭呼肠孤病毒的亲缘关系更近, 与禽呼肠孤病毒和新型鸭呼肠孤病毒的亲缘关系较远。

图 7 鹅源番鸭呼肠孤病毒、番鸭呼肠孤病毒、禽呼肠孤病毒和新型鸭呼肠孤病毒毒株 σC 基因氨基酸序列同源性比对Fig. 7 Homology on amino acid sequences of σC in Go-MDRV, MDRV, ARV and NDRV

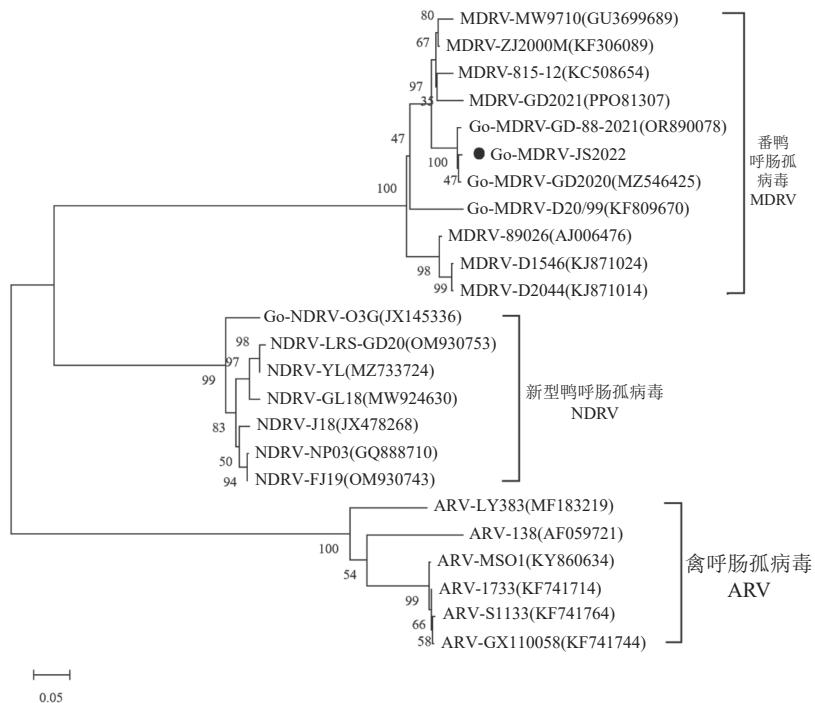
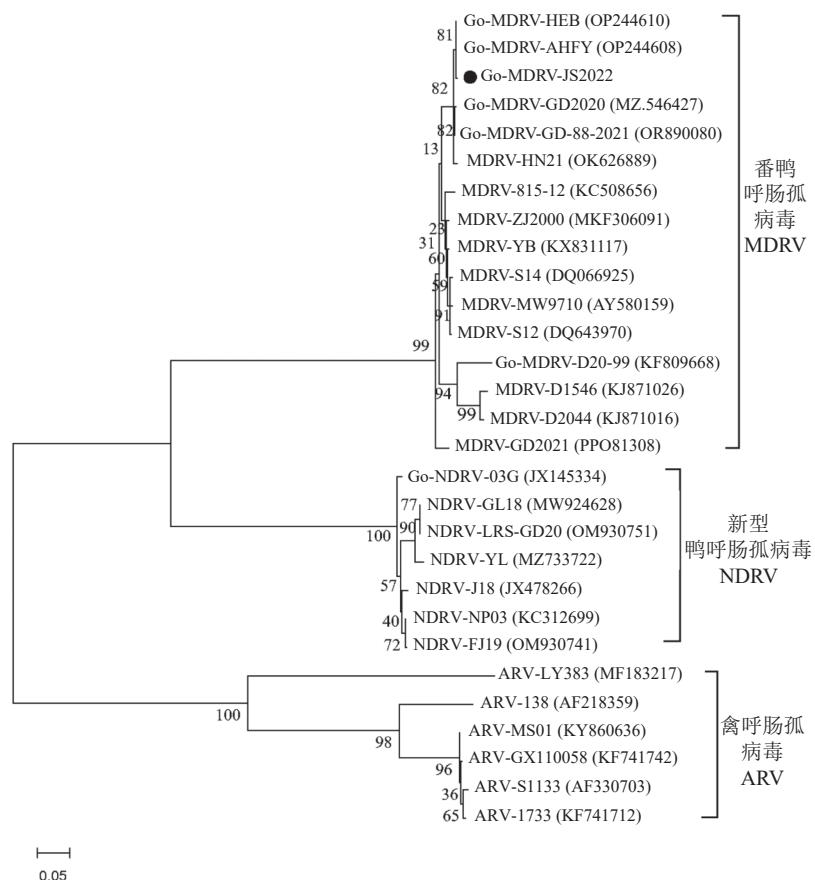
2.5 动物回归试验

在整个试验期间, 对照组雏鹅均未出现任何异常症状。攻毒组在攻毒后第 2 天部分雏鹅开始发病, 感染鹅出现精神沉郁、不愿走动、软脚、拉稀等症状; 攻毒后 5~7 d 死亡 2 羽, 及时剖检感染鹅发现肝脏和脾脏均出现密密麻麻的针尖状白点 (图 10A、B), 肾脏肿大且有白点 (图 10C), 胸腺和法氏囊

萎缩, 胰腺有散在出血点 (图 10D)。攻毒 10 d 后雏鹅状态开始恢复后续无死亡现象, 但是耐过鹅生长发育受阻, 个别鹅成为侏儒鹅。

2.6 病理组织学观察

整个动物试验过程中对照组鹅均无任何异常。病毒感染雏鹅死后及时取其肝脏、脾脏和肾脏进行病理切片制作, 光学显微镜下 (200 \times) 观察可见肝

图8 基于 σB 基因序列绘制的遗传进化树Fig. 8 Phylogenetic tree constructed based on σB sequences图9 基于 σC 基因序列绘制的系统进化树Fig. 9 Phylogenetic tree constructed based on σC sequences

脏发生局灶性坏死，肝小叶内可见大量的坏死肝细胞残体，局部可见淋巴细胞浸润及少量的红细胞

(图 11A 红色箭头)，坏死灶周围的肝细胞呈不同程度的细胞肿胀和脂肪变性 (图 11A 黑色箭头)，

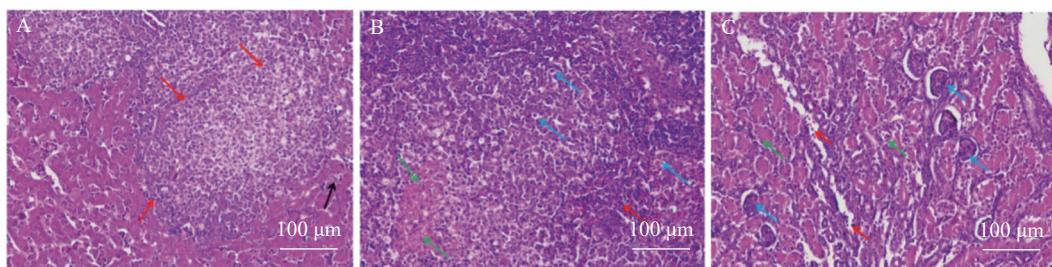


A: 肝脏出现大量针尖状白色坏死点; B: 脾脏肿大, 有大针尖状的白色坏死点; C: 肾脏肿大, 散在的白色坏死灶; D: 胰腺有少量出血点。

A: numerous white pinhead necrotic foci appeared on goose liver; B: splenomegaly with enlarged necrotic foci; C: enlarged kidneys with scattered necrotic foci; D: a small number of hemorrhages on goose pancreas.

图 10 分离毒株的动物回归试验

Fig. 10 Regression test on goselings inoculated with isolated strain of virus



A~C: 攻毒组肝脏、脾脏和肾脏。

A~C: liver, spleen, and kidney of infected geese, respectively.

图 11 病毒感染鹅的组织病理学观察 (200×)

Fig. 11 Microscopic images of organs of virus-infected goose (200×)

肝窦内有红细胞淤积; 脾脏红髓和白髓界限不清, 淋巴滤泡内部分淋巴细胞坏死呈红色均质 (图 11B 绿色箭头), 巨噬细胞数量增多 (图 11B 蓝色箭头), 红髓内血窦扩张 (图 11B 红色箭头); 肾组织中肾小球 (图 11C 蓝色箭头) 未见明显异常, 肾小管可见细胞管型, 肾小管上皮细胞发生广泛的变性、坏死和脱落 (图 11C 绿色箭头), 间质可见少量炎细胞浸润 (图 11C 红色箭头)。

3 讨论

番鸭呼肠孤病毒是导致番鸭“肝白点病”和“花肝病”的病原, 感染后宿主发病率高、传染性强, 发病番鸭临上表现为软脚、精神状态差、拉稀等, 病理剖检典型病变为肝脏和脾脏肿大且表面和实质均有大量针尖状白点^[23]。近年来部分地区鹅养殖场出现了类似疾病, 以肝、脾有白色坏死点为主要病变特征, 给养鹅业造成了重大的经济影响。

本试验从江苏省某鸭场收集了疑似番鸭呼肠孤病毒感染鹅的病料, 通过接种番鸭胚和 MDEF 细胞, 成功分离到一株鹅源番鸭呼肠孤病毒, 并将其

命名为 JS2022 株。JS2022 株与胡奇林等^[3]采用番鸭胚分离的番鸭呼肠孤病毒病变为一致, 均为死亡胚尿囊膜混浊增厚, 尿囊液清澈; 死亡胚周身出血, 呈紫红色, 本试验接毒胚传至第 6 代时番鸭胚死亡时间趋于稳定, 基本稳定在第 3~5 天。通过对 σB 和 σC 全基因序列的核苷酸和氨基酸进行同源性分析, 结果显示, 分离株 JS2022 株 σB 和 σC 基因核苷酸序列都是与鹅源番鸭呼肠孤病毒株的同源性最高, 与禽呼肠孤病毒的同源性最低。从进化树可看出, 进化树被分为了番鸭呼肠孤病毒、新型鸭呼肠孤病毒、禽呼肠孤病毒 3 个不同的进化群, 本分离株存在于番鸭呼肠孤病毒进化群中, 但是其遗传进化关系与鹅源番鸭呼肠孤病毒 GD2020 株更近, 该结果与郑炜鸿等^[6]分离出的 846-Goose-CHN-2020 株 (广东) σC 基因序列遗传关系分析一致, 均是与广东鹅源番鸭呼肠孤病毒分离株相似性最高, 但本分离株来自江苏, 可以推测该分离株可能是当前广东、江苏等地区鹅群中的主要流行毒株之一。动物回归试验结果表明, 在人工感染后第 2 天雏鹅就出现精神沉郁、食欲不佳、拉稀等症状, 病死鹅临床症状、

剖检病变及组织病理学变化与自然发病鹅相似。

基因序列分析、动物回归试验指出本分离株JS2022归属于番鸭呼肠孤病毒大类，并且与鹅源番鸭呼肠孤病毒 σB 和 σC 基因的同源性高于鸭源番鸭呼肠孤病毒 σB 和 σC 基因的同源性，这也可能是番鸭呼肠孤病毒通过番鸭传染给鹅，随着宿主的改变，病毒发生一定程度的突变，增加了水禽易感宿主的种类，因此需要更加注意水禽呼肠孤病毒的流行监测及不同基因型毒株之间的重组情况。

参考文献：

- [1] HUANG Y Z, ZHANG J Q, DONG J W, et al. Isolation and characterization of a new goose orthoreovirus causing liver and spleen focal necrosis in geese, China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(5): 3028–3034.
- [2] ZHANG S, WANG X M, DIAO Y X, et al. Recombinant characteristics, pathogenicity, and transmissibility of a variant goose orthoreovirus derived from inter-lineage recombination [J]. *Veterinary Microbiology*, 2023, 277: 109620.
- [3] 胡奇林, 陈少莺, 林锋强, 等. 番鸭呼肠孤病毒的鉴定 [J]. *病毒学报*, 2004, 20 (3): 242–248.
- HU Q L, CHEN S Y, LIN F Q, et al. The identification of Muscovy duck reovirus [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20(3): 242–248. (in Chinese)
- [4] WANG Q X, WU Y J, CAI Y L, et al. Spleen transcriptome profile of Muscovy ducklings in response to infection with Muscovy duck reovirus [J]. *Avian Diseases*, 2015, 59(2): 282–290.
- [5] 朱小丽, 陈小丽, 程晓霞, 等. 福建省番鸭呼肠孤病毒的生物学特性及基因序列分析 [J]. *中国动物检疫*, 2023, 40 (10): 34–38.
- ZHU X L, CHEN X L, CHENG X X, et al. Biological characteristics and gene sequence analysis of Muscovy duck reovirus in Fujian Province [J]. *China Animal Health Inspection*, 2023, 40(10): 34–38. (in Chinese)
- [6] 郑炜鸿, 王杰煌, 赵丹, 等. 鹅源经典番鸭呼肠孤病毒的分离鉴定及致病性研究 [J]. *养禽与禽病防治*, 2023 (4): 7–17.
- ZHENG W H, WANG J H, ZHAO D, et al. Isolation, identification and pathogenicity of classical Muscovy duck reovirus from goose [J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2023(4): 7–17. (in Chinese)
- [7] 陈少莺, 陈仕龙, 林锋强, 等. 新型鸭呼肠孤病毒的分离与鉴定 [J]. *病毒学报*, 2012, 28 (3): 224–230.
- CHEN S Y, CHEN S L, LIN F Q, et al. The isolation and identification of novel duck reovirus [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2012, 28(3): 224–230. (in Chinese)
- [8] ZHANG W D, WANG M H, YUAN S, et al. Genetic variation analysis of the sigma B protein gene of novel duck reovirus in Southeastern China from 2011 to 2020 [J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 303: 114479.
- [9] 林锋强, 程晓霞, 王劲, 等. 番鸭呼肠孤病毒 σC 基因重组腺病毒载体的构建和鉴定 [J]. *福建农业学报*, 2016, 31 (10): 1015–1019.
- LIN F Q, CHENG X X, WANG S, et al. Construction and certification of recombinant adenovirus vector for σC gene in Muscovy duck reovirus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 31(10): 1015–1019. (in Chinese)
- [10] CHEN Z L, LUO G F, WANG Q X, et al. Muscovy duck reovirus infection rapidly activates host innate immune signaling and induces an effective antiviral immune response involving critical interferons [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 175(2/3/4): 232–243.
- [11] 杨惠湖, 袁远华, 梅堃, 等. 当前水禽呼肠孤病毒病流行特点及防控应对措施 [J]. *养禽与禽病防治*, 2022 (11): 2–6.
- YANG H H, YUAN Y H, MEI K, et al. Epidemic characteristics and control measures of waterfowl reovirus disease at present [J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2022(11): 2–6. (in Chinese)
- [12] 武世珍, 靖吉强, 李舫, 等. 一起鹅源番鸭呼肠孤病毒的分离鉴定 [J]. *山东畜牧兽医*, 2023, 44 (1): 8–11.
- WU S Z, JING J Q, LI F, et al. Isolation and identification of a Muscovy duck reovirus from goose [J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023, 44(1): 8–11. (in Chinese)
- [13] 路晓, 杨晶晶, 丛雁飞, 等. 鹅源番鸭呼肠孤病毒的分离鉴定 [J]. *中国动物传染病学报*, 2023, 31 (1): 134–138.
- LU X, YANG J J, CONG Y F, et al. Isolation and characterization of a Muscovy duck reovirus isolate from a diseased goose [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2023, 31(1): 134–138. (in Chinese)
- [14] 谢守玉, 魏园园, 熊陈勇, 等. 鹅源新型鸭呼肠孤病毒广西株G-NDRV-GX-2022全基因组分子特征的分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2024, 46 (1): 92–98.
- XIE S Y, WEI Y Y, XIONG C Y, et al. Molecular characteristics of the complete genome of goose-origin novel duck reovirus strain G-NDRV-GX-2022 isolated in Guangxi [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2024, 46(1): 92–98. (in Chinese)
- [15] 钱金涵, 朱亭帆, 王强, 等. 变异型高致病性鹅源禽呼肠孤病毒的分离和鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60 (2): 1–8.
- QIAN J H, ZHU T F, WANG Q, et al. Isolation and identification of variant highly pathogenic avian reovirus from goose [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 60(2): 1–8. (in Chinese)
- [16] LIN S, WANG S, CHENG X X, et al. Development of a duplex SYBR Green I-based quantitative real-time PCR assay for the rapid differentiation of goose and Muscovy duck parvoviruses [J]. *Virology Journal*, 2019, 16(1): 6.
- [17] 江丹丹, 林昶, 黄志坚, 等. 鸭腺病毒B血清1型和血清2型双重PCR检测方法的建立及应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44 (8): 855–860.
- JIANG D D, LIN C, HUANG Z J, et al. Establishment and application of duplex PCR assay for detection of duck adenovirus B serotype 1 and serotype 2 [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(8): 855–860. (in Chinese)
- [18] CHEN L L, XU Q, ZHANG R H, et al. Improved duplex RT-PCR assay for differential diagnosis of mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 192(1/2): 12–17.

- [19] 徐丽晶, 赵丽丽, 刘海燕, 等. I型鸭肝炎病毒和鸭瘟病毒一步法双重 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2018, 48 (4): 456-463.
- XU L J, ZHAO L L, LIU H Y, et al. Establishment of one-step duplex RT-PCR for the simultaneous detection of duck hepatitis type I and duck plague virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(4): 456-463. (in Chinese)
- [20] 李海琴, 傅光华, 康昭凤, 等. 新型鸭呼肠孤病毒、新型鹅细小病毒和鸭坦布苏病毒多重 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (1): 1-6.
- LI H Q, FU G H, KANG Z F, et al. Establishment and preliminary application of a multiple PCR assay for NDRV, NGPV, and DTMUV detections [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37(1): 1-6. (in Chinese)
- [21] 李丹, 谢芝勋, 李孟, 等. 鸡细小病毒与 H9 亚型禽流感病毒二重 PCR 检测方法的建立 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48 (9): 113-116.
- LI D, XIE Z X, LI M, et al. Development of a duplex RT-PCR assay for detection of ChPV and AIV H9 subtype [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(9): 113-116. (in Chinese)
- [22] 姚鑫炎, 孙静, 刘宏, 等. 鹅 4 种常见病毒多重 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (11): 2190-2194,2210.
- YAO X Y, SUN J, LIU H, et al. Establishment and preliminary application of multiplex PCR for detection of four common goose viruses [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(11): 2190-2194,2210. (in Chinese)
- [23] 潘晓斌, 胡奇林, 陈少莺, 等. 番鸭呼肠孤病毒病原学研究 [J]. 生物技术通报, 2008, 24 (1): 72-74,78.
- PAN X B, HU Q L, CHEN S Y, et al. Etiologic research of Muscovy duck reovirus disease [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008, 24(1): 72-74,78. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)