

刘文健, 刘吉文, 覃依依, 等. 2株肉鸡源传染性法氏囊病病毒的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56(5): 73-81.

LIU W J, LIU J W, QIN Y Y, et al. Isolation and identification of two strains of infectious bursal disease virus from broiler [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56(5): 73-81.

2株肉鸡源传染性法氏囊病病毒的分离鉴定

刘文健¹, 刘吉文¹, 覃依依², 戴金凤², 闫丽萍^{1*}

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 广西丽诚东生物股份有限公司, 广西 南宁 530100)

摘要: 为了解传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 的流行情况, 监测其优势流行毒株的基因型变化, 对疑似 IBDV 感染的临床病料进行检测, 通过有限稀释法对 IBDV 毒株进行分离纯化, 对分离毒株进行遗传进化分析和致病力分析。结果显示: 从阳性病料中成功分离得到 2 株纯净的 IBDV 毒株; 遗传进化分析结果显示, HN-2022-1 株属于经典株, 其 VP2 蛋白高变区具备经典毒株分子标志; AH-2022-1 株属于 HLJ0504 样超强毒株, 存在节段重配现象, 其 VP2 蛋白高变区除具备超强毒株分子标志外, 还具备经典株、早期变异株分子标志。此外, AH-2022-1 株在 VP2 蛋白第一亲水区还发现了 3 处从未报道过的氨基酸突变, 这导致第一亲水区的亲水性下降, 可能引起该毒株发生毒力变化。致病力分析结果显示, 2 株 IBDV 均可引起严重的法氏囊萎缩, 发病率 100%, 但仅 AH-2022-1 株可引起 20% 死亡率, 与 HLJ0504 样株报道的 60%~80% 死亡率并不一致。提示: IBDV 处于不断进化中, IBDV 经典毒株仍在我国持续流行, 研究结果为我国 IBDV 感染的防控提供了一定参考。

关键词: 传染性法氏囊病病毒; 遗传进化分析; 致病性分析

中图分类号: S825.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)05-0073-09

Isolation and identification of two strains of infectious bursal disease virus from broiler

LIU Wenjian¹, LIU Jiwen¹, QIN Yiyi², DAI Jinfeng², YAN Liping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Guangxi Lichengdong Biological Co., Ltd., Nanning 530100, China)

Abstract: In order to conduct an epidemiological investigation of infectious bursal disease virus (IBDV) and to monitor changes in its dominant epidemic genotypes, clinical material suspected to be infected with IBDV was tested in this study and the IBDV strains were then isolated by finite dilution method. Subsequently, the genetic evolution analysis and pathogenicity analysis were carried out. The results showed that two IBDV strains were successfully isolated from the positive disease materials in this study. The genetic evolution results showed that the HN-2022-1 strain belonged to the classic strain, and its VP2 protein hypervariable region had the molecular markers of the classic strain. The AH-2022-1 strain belonged to the HLJ0504-like very virulent strains, and there was a phenomenon of segmental recombination. It is worth noting that the VP2 protein hypervariable region of AH-2022-1 strain not only had the molecular markers of very virulent strains, but also had the molecular markers of classic strains and variant strains. In addition, we also found three never-reported amino acid mutations in the first hydrophilic region of the VP2 protein of the AH-2022-1 strain, which led to a decrease in the hydrophilicity of the first hydrophilic region of the VP2 protein. This might cause changes in the virulence. The pathogenicity analysis results showed that the above two IBDV strains could cause severe cystic atrophy with an incidence rate of 100%, but only the AH-2022-1 strain could cause 20% mortality rate, which was not consistent with the 60%-80% mortality rate caused by the HLJ0504 very virulent strain. The successful separation of the above two IBDV strains and the results of the pathogenicity analysis suggested that IBDV was still in continuous evolution, and the classic strain of IBDV continued to be epidemic in China. This study provided reference for the prevention and control of IBDV in China.

Keywords: infectious bursal disease virus; genetic evolution analysis; pathogenicity analysis

收稿日期: 2023-08-08; 修回日期: 2024-03-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272994)

第一作者: 刘文健, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 闫丽萍, 博士, 教授, 研究方向为重要疫病病原分子流行病学、致病机理、诊断及基因工程疫苗方面的研究, E-mail: yanliping@njau.edu.cn.

传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 属于双 RNA 病毒科, 禽双 RNA 病毒属, 为不具囊膜的双节段双链 RNA 病毒, 病毒粒子直径约为 60 nm, 呈二十面体结构^[1]。IBDV 的 A 节段约 3.2 kb, 包含 2 个相互重叠的开放阅读框 (ORF)^[2], 小 ORF 编码非结构蛋白 VP5, 该蛋白在病毒的细胞间传播中起到重要作用^[3]; 大 ORF 编码多聚蛋白 VP2-VP4-VP3, 该多聚蛋白在 VP4 蛋白及 VP2 蛋白 C 段 α 结构域的自剪切作用下逐步分离, 形成成熟的 VP2 蛋白, VP3 蛋白可通过与 VP2 蛋白互作辅助成熟的 VP2 蛋白形成病毒粒子^[4-6]。VP2 蛋白为 IBDV 病毒粒子的主要结构蛋白, 是 IBDV 唯一可以诱导机体产生中和抗体的病毒蛋白, 该蛋白高变区决定了 IBDV 的细胞嗜性并包含大量的毒力位点^[7-8], 是 IBDV 发生抗原性变异的主要区域, 常作为 IBDV 遗传进化分析靶点^[9]。IBDV B 节段约 2.8 kb, 只包含 1 个开放阅读框, 该 ORF 编码的 VP1 蛋白具备 RNA 依赖的 RNA 聚合酶活性, 对病毒的体内复制效率有着重要影响, 在一定程度上也决定了 IBDV 毒力^[10]。

IBDV 主要分为 2 个血清型, 血清 I 型、血清 II 型均可感染鸡及其他禽类, 但仅血清 I 型可以引起感染鸡发病^[11]。根据毒力和抗原特性的不同, 血清 I 型又可分为超强毒株、弱毒株、变异毒株、经典毒株等^[12]。除超强毒株外, 血清 I 型其他基因型均不引起发病鸡死亡或死亡率较低^[13]。由于污染环境后难以清除, 不同基因型的混合感染导致节段内部的基因重组, 不同节段的重配不断发生, 这使得非典型基因型 IBDV 不断被报道^[14-16]。目前, 我国 IBDV 的优势流行基因型为 HLJ0504 样超强毒株^[17], 该基因型属于超强 A 独特 B 重配株, 这种重配赋予了该基因型高于传统超强毒株的毒力, 在攻毒剂量相同的情况下, 该基因型可以引起更高的死亡率^[18]。此外, 新型变异株自 2017 年首次报道以来检出率不断升高, 表现出成为优势流行基因型的趋势^[17], 该基因型仅可引起法氏囊萎缩, 发病鸡不表现任何临床症状, 但却能引起肉鸡增重下降和免疫抑制^[19], 且目前主流 IBDV 疫苗并不能对其提供良好保护^[20]。

为更好了解 IBDV 流行情况和毒力变化, 本研究以临床病料分离得到的 2 株 IBDV 为基础, 通过遗传进化分析、动物回归试验详细分析了分离毒株的关键毒力位点变化以及其对 SPF 鸡的致病力情况, 为防控 IBDV 感染提供了一定的参考。

1 材料与方法

1.1 临床样品处理

2022 年 9—10 月, 河南、安徽两省某些肉鸡养

殖场出现部分肉鸡增长缓慢、精神萎靡等异常状况, 死淘率约为 2%, 发病日龄为 25~36 日龄。剖检送检鸡可见法氏囊肿大, 并伴有渗出液、出血, 个别病死鸡可见肾脏尿酸盐沉积。分别取 2 份发病鸡法氏囊病料 (HN-2022-1 和 AH-2022-1) 约 0.1 g, 加入适量无菌 PBS 后冷冻研磨制备组织匀浆, 反复冻融 3 次后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 -80 °C 保存。

1.2 主要试剂与材料

Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、总核酸快速提取试剂盒及核酸提取仪、DNA 凝胶回收试剂盒, 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix、反转录试剂购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; T 载体快速克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司; SPF 鸡胚购自山东赛斯家禽科技有限公司, 致病力试验中使用的 SPF 鸡由购买的 SPF 鸡胚孵化。

1.3 RT-PCR 检测及 A 节段 VP2 基因高变区扩增

取前步制备组织研磨上清液 350 μ L, 参照总核酸快速提取试剂盒说明书提取总核酸, 并反转录为 cDNA。以王雨龙^[9]提出的双节段基因分型方法为基础, 参照 GenBank 中 IBDV SHG352 株 VP2 序列 (登录号 MT179720.1) 设计扩增引物, 利用上游引物 P1 (5'-GTAGCAACATGTGACAGCA-3') 和下游引物 P2 (5'-CTAGTTCAGGATTTGGGAT-3') 进行扩增。参照 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书配制反应体系, cDNA 模板用量为 2 μ L, 反应程序为 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。以 1% 琼脂糖凝胶检测 RT-PCR 产物, 预计长度为 559 bp, 将阳性条带胶回收后连接至 T 载体, 并以菌液形式送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.4 B 节段 VP1 基因 B-Marker 区扩增

以 1.3 中反转录所得阳性样品 cDNA 为基础, 参照 GenBank 中 IBDV SHG352 株 VP1 序列 (登录号 MT179722.1) 设计覆盖 B 节段遗传标志区的扩增引物, 利用上游引物 P3 (5'-CATTGGGGACCAGGAGT-3') 和下游引物 P4 (5'-AAAGCCCGCATGATAAG-3') 进行扩增。参照 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书配制反应体系, cDNA 模板用量为 2 μ L, 反应程序为 95 °C 3min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。以 1% 琼脂糖凝胶检测 RT-PCR 产物, 预计长度为 653 bp, 将阳性条带胶回收后连接至 T 载体, 并以菌液形式送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.5 遗传进化分析

以 1.3、1.4 中测得 A、B 节段遗传标志区序列为基础, 利用遗传进化分析软件 MEGA 11 中的 Clustal W 算法对齐各序列后, 通过邻接法 (Neighbor-Joining) 绘制遗传进化树, 以 Bootstrap 算法 (1 000 次) 检验进化树的可信度, 以对阳性样品中的 IBDV 进行双节段基因分型; 通过 DNASTar 软件包中的 MegAlign 进行 A、B 节段标志区核苷酸序列同源性分析, 并对比 A 节段代表区域氨基酸序列, 以从氨基酸分子水平上分析各分离毒株的毒力变化。各参考毒株详细信息见表 1。

表 1 IBDV 参考毒株信息

毒株名称	毒株表型	GenBank 登录号	
		A 节段	B 节段
Faragher 52/70	经典株	HG974565.1	HG974566
IM	经典株	AY029166.1	AY029165
Variant E	变异株	AF133904.1	AF133905.1
9109	变异株	AY462027.1	AY459321.1
GLS	变异株	AY368653.1	AY368654.1
SHG19	变异株	MN393076.1	MN393077.1
SHG352	变异株	MT179720.1	MT179722.1
SHG358	变异株	MT179721.1	MT179723.1
ZD-2018-1	变异株	MN485882.1	MN485883.1
Gx	超强毒株	AY598356.1	AY705393.2
Harbin-1	超强毒株	EF517528.1	EF517529.1
HLJ0504	超强毒株	GQ451330.1	GQ451331.1
PK2	超强毒株	MF996499.1	MF996500.1
89163	超强毒株	HG974563.1	HG974564.1
BD399	超强毒株	AF362776.1	AF362770.1
D6948	超强毒株	AF240686.1	AF240687.1
HK46	超强毒株	AF092943.1	AF092944.1
HuB-1	超强毒株	KF569805.1	GQ449693
KS	超强毒株	DQ927042.1	DQ927043
OKYM	超强毒株	D49706.1	D49707.1
UK661	超强毒株	NC_004178.1	NC_004179.1
YS07	超强毒株	FJ695138.1	FJ695139.1
CEF94	弱毒株	AF194428.1	AF194429.1
CT	弱毒株	AJ310185.1	AJ310186.1
CU-1	弱毒株	X16107.1	AF362775.1
D78	弱毒株	AF499929.1	AF499930.1
Gt	弱毒株	DQ403248.1	DQ403249.1
HZ2	弱毒株	AF321054.1	AF493979.1
NB	弱毒株	AY319768.2	AY654284.1
P2	弱毒株	X84034.1	X84035.1
OH	血清 II 型	U30818.1	U30819.1

1.6 病毒的 SPF 鸡胚分离

向 1.1 制备的组织研磨上清液加入青霉素-链霉素混合液 (青霉素终浓度 100 U/mL, 链霉素终浓度 0.1 mg/mL), 4 °C 作用 4 h 后以有限稀释法通过绒毛尿囊膜途径接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 每胚接种 0.2 mL, 弃去 24 h 内死胚, 孵化至接毒后 120 h, 收集各胚胚体、尿囊液、绒毛尿囊膜。将上述收集物混合后研磨, 反复冻融 3 次后 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 采用 1.3 中设计的 VP2 蛋白高变区扩增引物进行上清液中 IBDV 的 RT-PCR 检测, 反应体系及反应程序参考 1.3。此外, 利用本实验室建立的外源病毒检测引物库, 通过 PCR 检测制备病毒液中是否存在其他免疫抑制病毒 (禽白血病病毒 J 亚群、鸡传染性贫血病毒、马立克病病毒) 及常见禽病病毒 (禽流感病毒、新城疫病毒、鸡传染性支气管炎病毒、禽腺病毒血清 4 型、减蛋综合征病毒), 反应体系及反应程序参考本文 1.3。取 IBDV 条带明亮、无其他病毒污染的研磨上清液继续按照上述方法在 10 日龄 SPF 鸡代传, 直至胚体病变、死亡时间稳定。此外, 每代胚毒都应进行测序分型, 确保基因型、毒力位点与原始病料中的 IBDV 一致。

1.7 病毒扩增及半数鸡胚致死量 (ELD₅₀) 滴定

以 1.6 中成功分离得到的 IBDV 为基础, 将病毒液稀释 1 000 倍后通过绒毛尿囊膜途径接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 收集病死胚或者接种病毒液 96 h 后的鸡胚胚体、尿囊液、绒毛尿囊膜。将上述收集物混合后研磨, 反复冻融 3 次后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经 0.22 μm 细菌滤器过滤后 -80 °C 保存备用。

以无菌 PBS 将扩增病毒液进行 10 倍倍比稀释, 取 10⁻²~10⁻⁷ 6 个稀释度, 每个稀释度以绒毛尿囊膜途径接种 10 日龄 SPF 胚 5 枚, 逐日观察, 记录死胚情况直至接毒后 144 h, 以 Reed-Muench 法计算扩增病毒液 ELD₅₀。

1.8 SPF 鸡的致病力试验

以 1.7 扩增所得病毒为基础进行 28 日龄 SPF 鸡致病力试验。将 30 只 28 日龄 SPF 鸡随机分成 3 组, 每组 10 只。攻毒 1 组通过点眼、滴鼻的方式接种 HN-2022-1 病毒液 10^{3.0} ELD₅₀, 攻毒 2 组相同方式接种 AH-2022-1 病毒液 10^{4.0} ELD₅₀, 阴性对照组接种等量的无菌 PBS。自攻毒后逐日观察 7 d, 每日采集泄殖腔拭子, 死亡鸡及时剖检, 取法氏囊、脾脏并以 10% 中性甲醛固定液进行组织固定, 计算各存活鸡法氏囊指数 (BBIX)。BBIX = 试验组鸡囊重比/对照组鸡平均囊重比, 囊重比 = (法氏囊重/体重) × 1 000, 当 BBIX < 0.7 时认为法氏囊萎缩。攻毒 7 d 后

处死未死亡鸡，剖检脾脏、法氏囊，同时取部分组织以 10% 中性甲醛固定液固定。通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测泄殖腔拭子、法氏囊病毒载量，以 IBDV A 节段 VP5 基因为基础构建标准质粒，所用扩增引物为 P5 (5'-CACAGGGTCAGG-GCTAA-3')、P6 (5'-TCTGGGCAGTCAGGAGTA-3')^[21]。

2 结果与分析

2.1 病料检测及 A、B 节段标志区扩增

以设计的 A 节段标志区扩增引物为基础进行

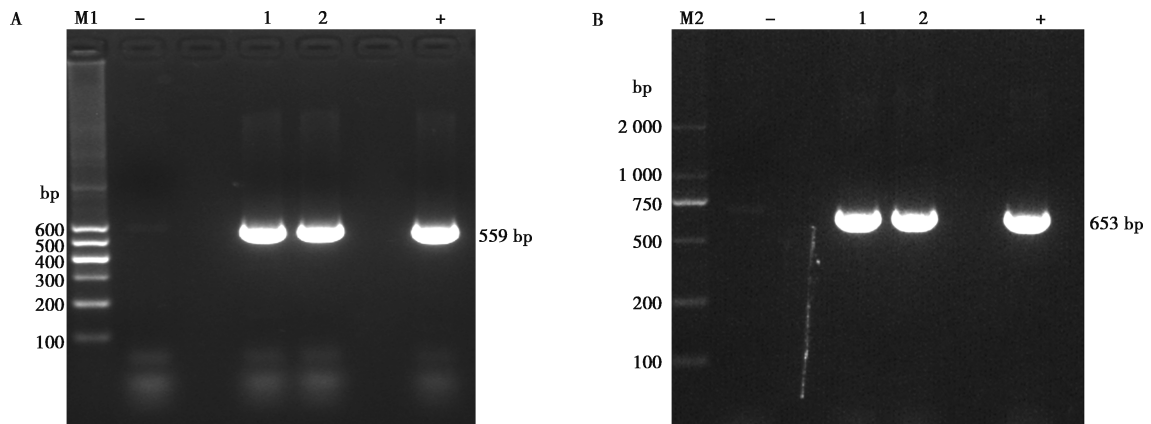


图 1 IBDV A 节段遗传标志区 (A) 和 B 节段遗传标志区 (B) PCR 扩增结果

2.2 遗传进化分析

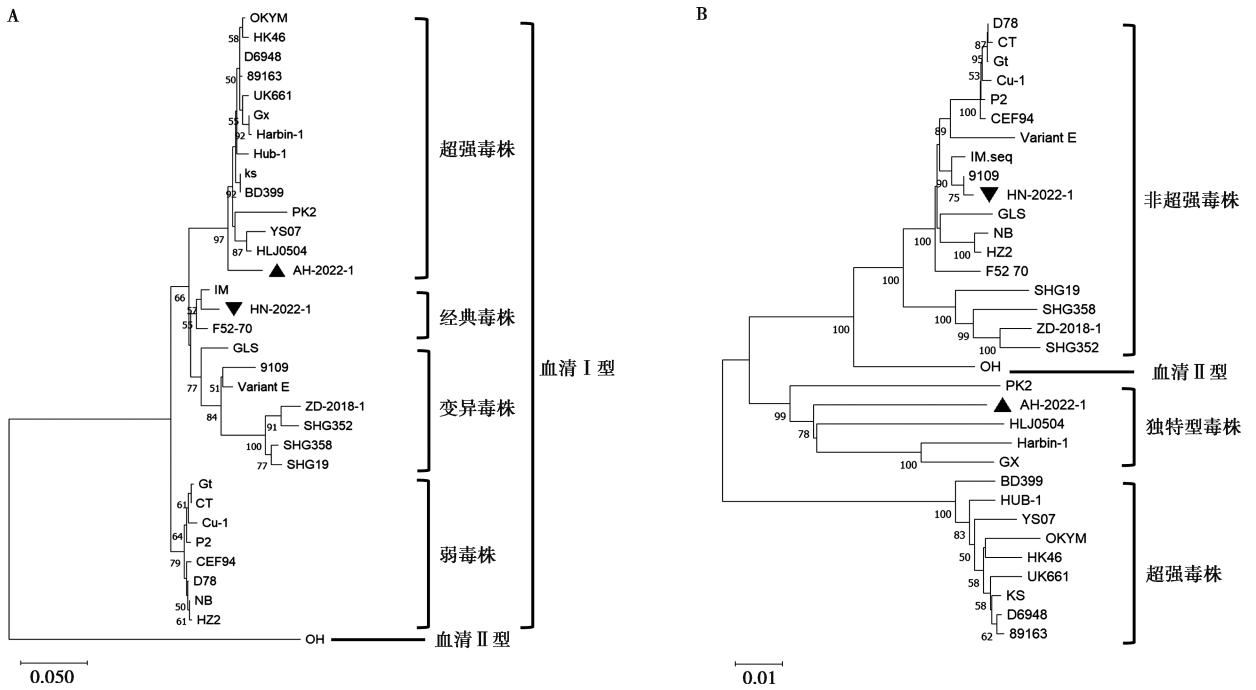
对上述基因序列测序结果进行遗传进化分析。基于 A 节段 VP2 基因高变区序列的遗传进化树显示，IBDV 血清 I 型共形成 4 个分支，分别为超强毒株、经典毒株、弱毒株、变异毒株 (图 2A)。AH-2022-1 株属于超强毒株分支，但与任何一株超强毒株参考序列都不处于同一亚分支。同源性分析结果显示，AH-2022-1 株与超强毒株各参考毒株同源率较高 (95.6%~96.6%)，与欧美超强毒株参考株 D6948、BD399 株亲缘关系及国内早期分离的超强毒株 Hub-1 株的同源性最高 (96.5%~96.6%)。HN-2022-1 株 A 节段属于经典毒株分支，与经典毒株参考株 IM 株同源率高达 98%。

基于 B 节段 VP1 基因 B-Marker 区序列的遗传进化树显示，IBDV 血清 I 型分为超强毒株、非超强毒株、独特型毒株 3 个分支 (图 2B)，AH-2022-1 株属于独特型毒株分支，与 HLJ0504 株、Harbin-1 株等超强 A 独特 B 重配株代表株处于同一分支，同源性分析结果显示，其 B 节段与独特性参考毒株同源率为 92.3%~93.1%，而与其他基因型同源率为

PCR 扩增，安徽、河南两省送检的 2 份疑似感染病料中均可检测到明亮条带，大小约为 559 bp (图 1A)，与预期结果一致，将返回测序结果经 BLAST 验证，属于 IBDV A 节段 VP2 基因高变区序列；继续扩增上述病料的 B 节段遗传标志区基因序列，2 份病料均可检测到明亮条带，大小约为 653 bp (图 1B)，与预期结果一致，将返回测序结果经 BLAST 验证，属于 IBDV B 节段 VP1 基因 B-Marker 区序列。

89.1%~90.8%，与我国主要流行基因型 HLJ0504 样株参考株 B 节段情况一致。HN-2022-1 株 B 节段属于非超强毒株分支，与经典毒株参考株 IM 株同源率高达 99.2%，与早期变异毒株参考株 9109 株同源率高达 99.7%。

基于 VP2 蛋白高变区的氨基酸序列比对结果显示 (表 3)，HN-2022-1 株除第 242 位氨基酸 (I→V)、第 294 位氨基酸 (L→I) 不与经典毒株参考株一致外，其余各主要毒力位点都与经典毒株参考毒株 IM 株、F52/70 株完全一致。相比于典型的超强毒株，AH-2022-1 株在 VP2 蛋白高变区有多个突变位点，在 VP2 蛋白第一亲水区 (212~224 aa) 发现了未见报道的 3 处突变，分别为 213 (D→G)，220 (Y→F)，222 (A→V)。有趣的是，此 3 处均突变为疏水性更强的氨基酸，这可能导致第一亲水区的整体亲水性发生变化。此外，AH-2022-1 株在 VP2 蛋白高变区有与早期变异株相似的氨基酸位点 254S 及与变异毒株、经典毒株、弱毒株等非超强毒株相似的氨基酸位点 299N，而在其余重要氨基酸位点，则具备超强毒株标志性氨基酸位点 256I、294I。



▲代表分离毒株 AH-2-22-1 株，▼代表分离毒株 HN-2022-1 株。

图 2 IBDV A 节段遗传标志区 (A) 及 B 节段遗传标志区 (B) 遗传进化树

表 2 VP2 蛋白高变区关键氨基酸位点分析

毒株	表型	VP2 蛋白高变区关键氨基酸位点													
		213	220	221	222	242	249	252	253	254	256	279	284	294	299
HN-2022-1	经典株	D	Y	Q	P	V	Q	V	Q	G	V	D	A	I	N
AH-2022-1	超强毒株	G	F	*	V	I	*	*	*	S	I	*	*	*	*
F 52/70	经典株	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*	L	*
IM	经典株	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*	L	*
Variant E	变异株	N	*	*	T	*	K	*	*	N	*	N	*	L	*
9109	变异株	N	*	*	T	*	K	*	*	S	*	N	*	L	*
GLS	变异株	*	*	*	T	*	K	*	*	S	*	N	*	L	*
SHG19	新型变异株	N	*	K	T	*	K	I	*	N	*	N	*	L	S
89163	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
BD399	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
D6948	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
OKYM	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
HK46	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
KS	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	N	*	*	S
UK661	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
YS07	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
HLJ0504	超强毒株	*	*	*	A	I	*	*	*	*	I	*	*	*	S
CEF94	弱毒株	*	*	*	*	*	*	*	H	*	*	N	T	L	*
CT	弱毒株	*	*	*	*	*	R	*	H	*	*	N	T	L	*
CU-1	弱毒株	*	*	*	*	*	*	*	H	*	*	N	T	L	*
D78	弱毒株	*	*	*	*	*	*	*	H	*	*	N	T	L	*

续表2

毒株	表型	VP2 蛋白高变区关键氨基酸位点													
		213	220	221	222	242	249	252	253	254	256	279	284	294	299
Gt	弱毒株	*	*	*	*	*	R	*	H	*	*	N	T	L	*
HZ2	弱毒株	*	*	*	*	*	*	*	H	*	*	N	T	L	*
NB	弱毒株	*	*	*	*	*	*	*	H	*	*	N	T	L	*
P2	弱毒株	*	*	*	*	*	R	*	H	*	*	N	T	L	*

注：与 HN-2022-1 株氨基酸一致序列用 * 表示，灰色突出显示部分为 AH-2022-1 株与 IBDV 超强毒株基因型参考毒株不一致的关键氨基酸位点。

2.3 病毒分离及纯化

AH-2022-1、HN-2022-1 原始病料研磨上清液接种 10 日龄 SPF 鸡胚后，均可观察到绒毛尿囊膜增厚，胚体头颈部、四肢均严重出血等典型症状；可在 10 日龄 SPF 鸡胚上稳定传代；在接种后 96~120 h 鸡胚发生死亡，剖检死亡胚可见典型病变，各代次胚体、尿囊液混合研磨上清液 PCR 检测呈 IBDV 阳性。外源病毒 PCR 检测结果显示，各代次病毒液无其他免疫抑制病毒（禽白血病病毒 J 亚群、鸡传染性贫血病毒、马立克病病毒）及常见禽病病毒（禽流感病毒、新城疫病毒、鸡传染性支气管炎病毒、禽腺病毒血清 4 型、减蛋综合征病毒）混合感染；各代次双节段遗传标志区测序及遗传进化分析结果显示，上述分离病毒各代次病毒液无其他 IBDV 基因型污染，双节段遗传标志区核苷酸序列与原始病料测序结果同源率为 100%。由此，将分离获得的 2 株 IBDV 毒株分别命名为 AH-2022-1 株、HN-2022-1 株。

2.4 病毒毒价滴定

取死亡时间、病变稳定的第五代 SPF 鸡胚病毒液为种毒液，在 10 日龄 SPF 鸡胚扩增病毒液、滴定毒价，其中 HN-2022-1 株病毒滴度为 $10^{2.2}$ ELD₅₀/0.2 mL，AH-2022-1 株病毒滴度为 $10^{3.2}$ ELD₅₀/0.2 mL。

2.5 鸡的致病力试验

分离毒株攻毒后，鸡存活率的 BBIX 结果分别见图 3 和图 4。HN-2022-1 株攻毒组 10 只鸡在攻毒后 7 d 内未发生死亡，且观察期间各鸡饮食饮水正常，未见明显精神沉郁。于攻毒后 7 d 剖检未死亡鸡，除脾脏肿大、法氏囊萎缩外未见其他器官病变，各鸡 BBIX < 0.7，平均值为 0.27。AH-2022-1 株攻毒组 10 只分别在攻毒后 3 d、攻毒后 4 d 各死亡 1 只，死亡率为 20%，死亡鸡剖检可见腿肌、胸肌片状出血、花斑肾、法氏囊肿大等 IBDV 超强毒株引起的典型剖检病变。攻毒后 7 d 对未死亡鸡进行剖检，除脾脏肿大、法氏囊萎缩外未见其他器官病变，AH-2022-1 株攻毒组未死亡鸡 BBIX < 0.7，平均值为 0.29。阴

性对照组各鸡剖检未见异常，法氏囊发育正常，HN-2022-1 株攻毒组、AH-2022-1 株攻毒组各鸡法氏囊萎缩严重，故 2 个攻毒组发病率均为 100%。

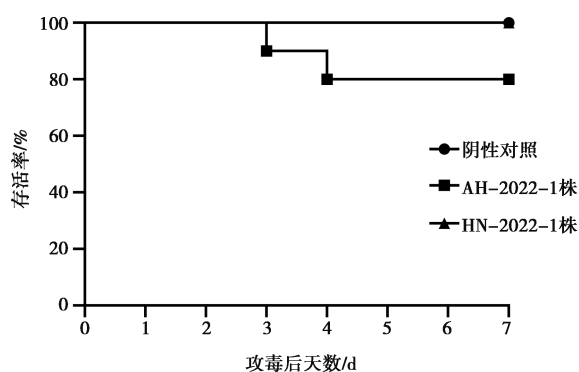


图 3 HN-2022-1 株、AH-2022-1 株攻毒后存活率

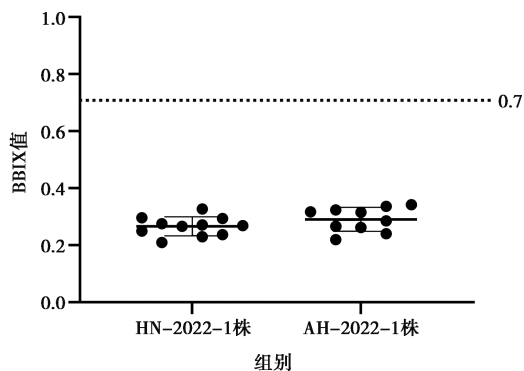
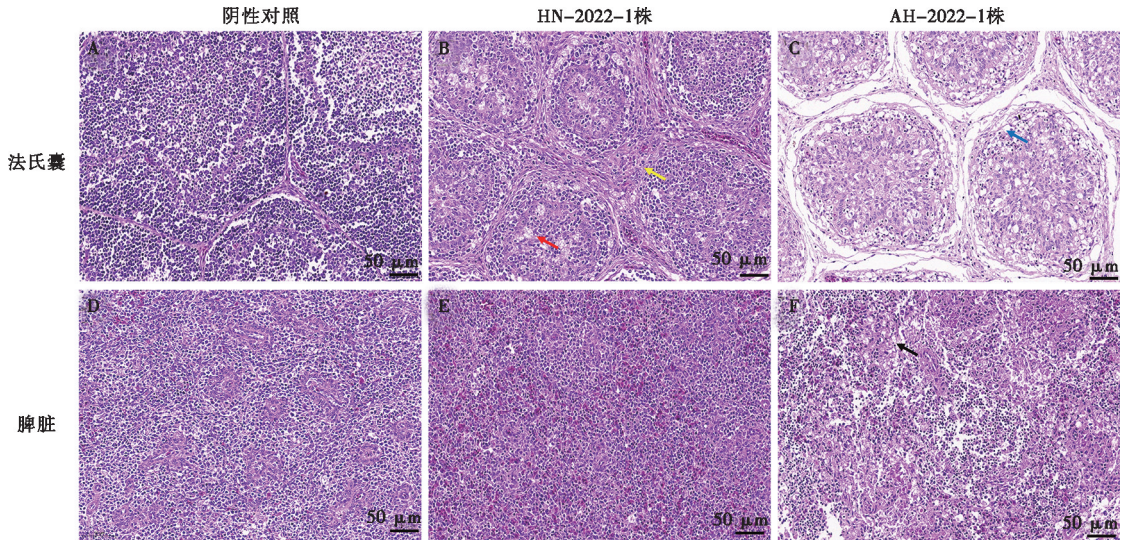


图 4 HN-2022-1 株、AH-2022-1 株 BBIX 统计

法氏囊 HE 病理切片结果显示，阴性对照组法氏囊结构正常，未见病变（图 5A）；HN-2022-1 株感染鸡法氏囊淋巴滤泡间可见纤维组织增生，滤泡的皮质和髓质部出现淋巴细胞坏死，在髓质部形成空腔（图 5B）；AH-2022-1 株引起的法氏囊病变更为严重，各淋巴滤泡间水肿扩张，皮质部几乎消失，髓质部可见淋巴细胞大量坏死，而使髓质部及中央区呈现网状（图 5C）。各组脾脏 HE 病理切片结果显示，阴性对照组脾脏结构正常，未见病变（图 5D）；HN-2022-1 株的脾脏病变较轻，淋巴细胞数量未明显减

少 (图 5E); 而 AH-2022-1 株脾脏病变较为严重, 淋巴细胞变性、坏死, 数量明显减少, 并可观察到淋巴

巴细胞坏死形成的空腔 (图 5F)。



黄色箭头所示为法氏囊各淋巴滤泡间的纤维组织增生现象; 红色箭头所示为法氏囊淋巴滤泡髓质部因淋巴细胞坏死而形成的空腔; 蓝色箭头所指示空白区域为法氏囊因滤泡间水肿及皮质部大量淋巴细胞坏死形成的空腔; 黑色箭头所示为脾脏淋巴细胞坏死形成的空腔。

图 5 HN-2022-1 株、AH-2022-1 株感染鸡法氏囊和脾脏 HE 染色病理切片

依据 IBDV VP5 基因标准质粒建立的 qPCR 标准曲线方程为 $y = -3.535x + 40.057$, $R^2 = 0.9986$ 。在攻毒后 1~3 d, 2 个毒株感染鸡可通过泄殖腔向体外排毒, 并于攻毒后第 2 天达到排毒高峰; 自攻毒后第 4 天, 2 个毒株感染鸡不再通过泄殖腔向体外排毒 (图

6A)。各组未死亡鸡的法氏囊进行病毒载量检测, 可见在攻毒后第 7 天, AH-2022-1 株攻毒组未死亡鸡的法氏囊平均载毒量为 $10^{6.7}$ copies/g, HN-2022-1 株攻毒组未死亡鸡的法氏囊平均病毒载量为 $10^{6.1}$ copies/g, 远高于检测限 ($10^{3.1}$ copies/g) (图 6B)。

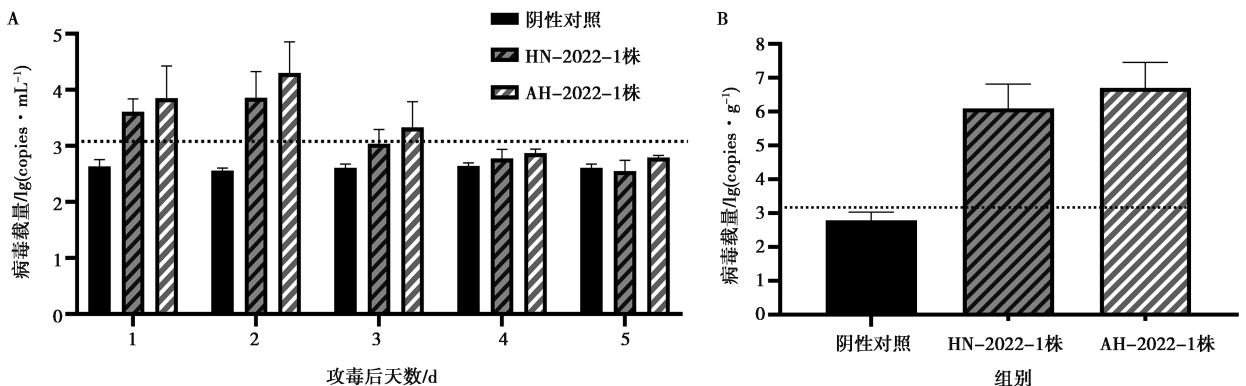


图 6 AH-2022-1 株和 HN-2022-1 株感染鸡泄殖腔拭子 (A) 及法氏囊 (B) 病毒载量检测

3 讨论

由于 IBDV 属于分节段的双链 RNA 病毒, 病毒基因组相对不稳定, 广泛存在的基因突变、节段重配、节段内部基因重组使得不断有新 IBDV 基因型出现^[22]。越来越多的研究证明, IBDV 的毒力并不只取决于 A 节段的 VP2 蛋白, A 节段的 VP3、VP5 蛋白以及 B 节段编码的 VP1 蛋白都对 IBDV 致病力有着重

要的影响^[23-25]。这提示在进行 IBDV 的分子流行病学调查时, 不能只局限于某一节段, 而是要综合 2 个节段的遗传进化分析情况对 IBDV 致病力进行整体分析。此外, 非优势流行基因型 IBDV 的流行也不容忽视, 虽然其田间检出率低、致死率低, 但由于其易潜伏感染, 若其发生抗原漂移突破现有疫苗的免疫保护屏障, 则会使感染鸡成为 IBDV 基因突变、重组、节段重配的反应容器。新型变异株的出现可能来源于潜

伏流行于我国的早期变异株，对其流行情况检测的忽视可能是导致突破现有疫苗免疫屏障的新型变异株出现的原因之一^[26]。

基于此，本研究以 IBDV A、B 节段的遗传标志区为靶基因设计了 IBDV 鉴定及分型引物，并成功从疑似感染 IBDV 的临床病料中检测到 2 份 IBDV 强阳病料，通过 SPF 鸡胚有限稀释法成功分离到 2 株 IBDV，分别命名为 HN-2022-1 株、AH-2022-1 株。基于双节段遗传标志区的遗传进化分析结果显示，自河南省分离到的 HN-2022-1 株属于经典株，且无节段重配现象；自安徽省分离得到的 AH-2022-1 株 A 节段虽具备多处突变，但仍与超强株 A 节段各参考株亲缘关系最近，属于非典型的超强株 A 节段，其 B 节段属于独特型 B 节段，故 AH-2022-1 株属于超强 A 独特 B 节段重配毒株（HLJ0504 样超强毒株）。而 A 节段 VP2 蛋白的高变区关键氨基酸位点分析结果显示，HN-2022-1 株 A 节段遗传标志区氨基酸序列除 242（I→V）、294（L→I）的氨基酸突变外，其余各部分与经典毒株完全一致，属于 IBDV 经典毒株；但其不能引起感染鸡的死亡，这可能与其 VP2 蛋白 242 位氨基酸的突变及攻毒剂量有关。AH-2022-1 株 A 节段虽属于超强毒株分支，但其第一亲水区存在 213（D→G）、220（Y→F）、222（A→V）3 处从未报道的突变，这使得第一亲水区的亲水性发生变化，由于 VP2 蛋白的第一、第二亲水区共同形成 IBDV 的中和表位，这种亲水性的变化很有可能导致 IBDV 产生免疫逃避^[27]，此外，其还存在早期变异株 GLS 株的 254S 位点及经典株、弱毒株的 299N 位点，上述 5 处非典型 IBDV 超强毒株氨基酸位点的出现很有可能是导致 AH-2022-1 仅可引起 20% 死亡率的重要原因。泄殖腔拭子及法氏囊病毒载量检测结果显示，AH-2022-1 株具备更强的体内复制能力，这可能与 AH-2022-1 株 B 节段属于独特型 B 节段有关，该基因型 B 节段编码的 VP1 蛋白具备更高的 RNA 聚合酶活性，这使得 IBDV 可以在入侵细胞后获得更高的病毒滴度^[28]。

另有报道显示，IBDV A 节段的 222、254 位点的氨基酸变异可能导致 IBDV 产生抗原漂移，从而逃避原有疫苗的保护^[27]。因此，现行商品化疫苗是否能够对 AH-2022-1 株提供良好保护值得后续试验探究，与典型 HLJ0504 样毒株的毒力对比试验及抗体中和试验也可以解释 AH-2022-1 株是否发生了抗原特性的变化；此外，反向遗传技术也是了解验证 5 处非典型氨基酸位点对 AH-2022-1 株毒力影响的重要手段。

4 结论

本研究自疑似感染临床病料中成功分离到 2 株 IBDV，分别命名为 HN-2022-1 株和 AH-2022-1 株。遗传进化及致病力分析结果显示，HN-2022-1 株属于经典株，AH-2022-1 株属于非典型 HLJ0504 样株，均可引起 28 日龄 SPF 鸡法氏囊严重萎缩，发病率 100%，HN-2022-1 株感染鸡未见死亡，AH-2022-1 株感染鸡死亡率 20%。上述 2 株 IBDV 的分离鉴定，丰富了我国 IBDV 流行病学信息库，为了解 IBDV 流行情况提供了一定参考。

参考文献：

- [1] DOBOS P, HILL B J, HALLETT R, et al. Biophysical and biochemical characterization of 5 animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes [J]. *J Virol*, 1979, 32 (2): 593-605.
- [2] HUDSON P J, MCKERN N M, POWER B E, et al. Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus [J]. *Nucleic Acids Res*, 1986, 14 (12): 5001.
- [3] MENDEZ F, DE GARAY T, RODRIGUEZ D, et al. Infectious bursal disease virus VP5 polypeptide: a phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0123470.
- [4] ONA A, LUQUE D, ABAITUA F, et al. The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus [J]. *Virology*, 2004, 322 (1): 135-142.
- [5] SAUGAR I, IRIGOYEN N, LUQUE D, et al. Electrostatic interactions between capsid and scaffolding proteins mediate the structural polymorphism of a double-stranded RNA virus [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (6): 3643-3650.
- [6] IRIGOYEN N, CASTON J R, RODRIGUEZ J F. Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (29): 24473-24482.
- [7] QI X, GAO H, GAO Y, et al. Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus [J]. *Antiviral Res*, 2009, 84 (3): 225-233.
- [8] QI X, ZHANG L, CHEN Y, et al. Mutations of residues 249 and 256 in VP2 are involved in the replication and virulence of infectious bursal disease virus [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (7): e70982.
- [9] 王雨龙. 鸡传染性法氏囊病病毒的基因分型及新型变异株亚单位疫苗的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [10] GAO L, LI K, QI X, et al. Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence [J]. *J Gen Virol*, 2014, 95 (Pt 4): 888-897.
- [11] WANG Y, FAN L, JIANG N, et al. Naturally occurring cell-adapted classic strain of infectious bursal disease virus [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 243: 108620.

- [12] JACKWOOD D J, SOMMER-WAGNER S E. Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses: distribution and genetic analysis of newly emerging viruses in the United States [J]. *Avian Dis*, 2005, 49 (2): 220-226.
- [13] BROWN M D, GREEN P, SKINNER M A. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75 (Pt 3) (3): 675-680.
- [14] WU T, WANG Y, LI H, et al. Naturally occurring homologous recombination between novel variant infectious bursal disease virus and intermediate vaccine strain [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 245: 108700.
- [15] WANG Y, JIANG N, FAN L, et al. Identification and pathogenicity evaluation of a novel reassortant infectious bursal disease virus (Genotype A2dB3) [J]. *Viruses*, 2021, 13 (9): 1682.
- [16] FENG X, ZHU N, CUI Y, et al. Characterization and pathogenicity of a naturally reassortant and recombinant infectious bursal disease virus in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (4): e746-e758.
- [17] ZHANG W, WANG X, GAO Y, et al. The over-40-years-epidemic of infectious bursal disease virus in China [J]. *Viruses*, 2022, 14 (10): 2253.
- [18] LI K, COURTILLON C, GUIONIE O, et al. Genetic, antigenic and pathogenic characterization of four infectious bursal disease virus isolates from China suggests continued evolution of very virulent viruses [J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 30: 120-127.
- [19] FAN L, WU T, HUSSAIN A, et al. Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China [J]. *Vet Microbiol*, 2019, 230: 212-220.
- [20] FAN L, WU T, WANG Y, et al. Novel variants of infectious bursal disease virus can severely damage the bursa of fabricius of immunized chickens [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 240: 108507.
- [21] 侯文飞. 传染性法氏囊病病毒-禽腺病毒血清4型重组二联灭活疫苗的免疫效力研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
- [22] 乔远征, 王威威, 施俊, 等. 传染性法氏囊病病毒新型重排毒株 GX-NN200111 的分离鉴定及遗传进化分析 [J]. *中国家禽*, 2023, 45 (5): 39-47.
- [23] WANG X, ZHANG H, GAO H, et al. Changes in VP3 and VP5 genes during the attenuation of the very virulent infectious bursal disease virus strain Gx isolated in China [J]. *Virus Genes*, 2007, 34 (1): 67-73.
- [24] NOUEN C L, TOQUIN D, MULLER H, et al. Different domains of the RNA polymerase of infectious bursal disease virus contribute to virulence [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (1): e28064.
- [25] ESCAFFRE O, LE NOUËN C, AMELOT M, et al. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus [J]. *J Virol*, 2013, 87 (5): 2767-2780.
- [26] 范林进. 鸡传染性法氏囊病病毒新型变异株的鉴定及疫苗株构建 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [27] JACKWOOD D J, SOMMER-WAGNER S E. Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV) [J]. *Virology*, 2011, 409 (1): 33-37.
- [28] 高立, 李凯, 祁小乐, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 B 节段对病毒致病性的影响 [J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36 (7): 510-514.