

郭海涛, 罗娟, 牟瑞营, 等. 一例鹅星状病毒 2 型感染的实验室诊断与分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 118-124.

GUO H T, LUO J, MU R Y, et al. Laboratory diagnosis and analysis of a case of goose astrovirus type 2 infection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 118-124.

## 一例鹅星状病毒 2 型感染的实验室诊断与分析

郭海涛<sup>1</sup>, 罗娟<sup>2</sup>, 牟瑞营<sup>1</sup>, 周纪武<sup>3</sup>, 王淑红<sup>3</sup>, 李阳<sup>2\*</sup>, 刘华雷<sup>2\*</sup>

(1. 临朐县畜牧业发展中心, 山东 潍坊 262600;

2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032;

3. 潍坊诺图生物科技有限公司, 山东 潍坊 262600)

**摘要:** 为查明山东省部分朗德鹅养殖场喂食鹅发病死亡的原因, 本研究取 6 只病死鹅, 剖检观察大体病变, 采集明显病变组织, 利用 PCR 方法进行禽流感病毒、新城疫病毒、鹅星状病毒 2 型 (GoAstV-2)、坦布苏病毒、禽呼肠孤病毒、鹅细小病毒、传染性法氏囊病毒、传染性支气管炎病毒、禽腺病毒的核酸检测, 利用鹅胚进行病毒分离, 并对病毒 ORF1b 基因全长测序。结果: 剖检显示死鹅肾脏肿大, 肠黏膜、泄殖腔出血, 内脏尿酸盐沉积; 结合临床症状、剖检结果、PCR 鉴定结果、遗传进化及同源性分析结果, 确认该病例为 GoAstV-2 感染; 同时, 将病毒分离株感染鹅进行动物致病性试验, 剖检可见感染鹅各组织器官有明显的尿酸盐沉积, 肝脏、肾脏出现病理组织损伤。本文通过对一例 GoAstV-2 感染的实验室诊断进行分析, 为 GoAstV-2 型的进一步研究提供参考。

**关键词:** 鹅星状病毒 2 型; 实验室诊断; 分离; 动物致病性试验

中图分类号: S854 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)03-0118-07

## Laboratory diagnosis and analysis of a case of goose astrovirus type 2 infection

GUO Haitao<sup>1</sup>, LUO Juan<sup>2</sup>, MU Ruiying<sup>1</sup>, ZHOU Jiwu<sup>3</sup>, WANG Shuhong<sup>3</sup>, LI Yang<sup>2\*</sup>, LIU Hualei<sup>2\*</sup>

(1. Linqu County Animal Husbandry Development Center, Weifang 262600, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032 China;

3. Weifang Nuotu Biological Technology Co., Ltd., Weifang 262600, China)

**Abstract:** This study was to determine the causes of morbidity and mortality of feeding geese in some Landaise goose farms in Shandong Province. Six dead geese were selected. Their gross lesions were observed and the obvious lesions were collected. Then, nucleic acid detection of avian influenza virus, Newcastle disease virus, goose astrovirus type 2, Tambusu virus, goose parvovirus, infectious bursal disease virus, infectious bronchitis virus, Avian arc enterovirus and Avian adenovirus were performed using PCR. The viruses were isolated and sequenced using goose embryos. And the ORF1b gene was sequenced. The autopsy results showed that the dead geese had kidney enlargement, intestinal mucosa, cloaca bleeding, viscera urate deposition. Combined with the clinical symptoms, the PCR identification results, the genetic evolution and homology analysis results, the case was confirmed as goose astrovirus type 2 infection. At the same time, the geese were infected with the virus isolate for animal pathogenicity test, and Necropsy showed that the infected geese had obvious urate deposition in various tissues and organs, and pathological tissue damage in their liver and kidney. In this paper, the laboratory diagnosis of goose astrovirus type 2 infection was analyzed, which provided reference for further research on goose astrovirus type 2.

**Keywords:** goose astrovirus type 2; laboratory diagnosis; isolation; animal pathogenicity test

鹅星状病毒 (goose astrovirus, GoAstV) 属于星状病毒科禽星状病毒属, 为无囊膜、单股正链 RNA 病毒, 呈二十面体结构。基因组全长为 6.1 ~

7.9 kb, 由 5' 非翻译区 (UTR)、3 个开放阅读区 (ORF1a、ORF1b、ORF2)、3' 非翻译区 (UTR) 和一个 ploy (A) 尾组成<sup>[1]</sup>。其中 ORF1a 编码非结构蛋白, ORF1b 编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp), ORF2 编码与病毒粒子形成相关的衣壳蛋白<sup>[2]</sup>。目前鹅星状病毒分为鹅星状病毒 1 型 (GoAstV-1) 和鹅星状病毒 2 型 (GoAstV-2), 自 2016 年 11 月以来, 一种以痛风和尿酸盐沉积为主要症状的传染病在我国山东、江苏、安徽、广东、广西

收稿日期: 2024-04-25; 修回日期: 2025-01-28

第一作者: 郭海涛, 男, 研究生, 高级兽医师

\* 通信作者: 李阳, 博士, 高级兽医师, 主要从事重大动物疫病防控技术研究, E-mail: liyang@cahec.cn; 刘华雷, 博士, 研究员, 主要从事重大动物疫病防控技术研究, E-mail: hualeiliuw@163.com。

等地暴发,主要感染5~20日龄的雏鹅,日龄越小,雏鹅的发病率和死亡率越高。随着日龄的提高,其感染率和死亡率也会随之降低<sup>[3]</sup>。感染后主要表现为精神沉郁,采食量减少,死亡率最高可达50%,剖检可见内脏器官尿酸盐沉积,肾炎、脾脏、肾脏出血等<sup>[4]</sup>。2017年2月,在我国山东、江苏、广东、安徽等地暴发,造成养鹅业重大经济损失,对我国养鹅业的健康发展造成严重影响<sup>[5]</sup>。2022年10月开始,山东省潍坊市部分朗德鹅养殖场,70日龄填食鹅在填食第8天左右出现采食减退、消化不良、排红色稀便和自咬等现象,造成翅膀、喙出血。自咬后3d开始出现死亡,死亡率高达55%,对发病鹅全群采用抗病毒中药加西药对症治疗,死亡率降至35%。根据调查及养殖户叙述,发病鹅均免疫过副黏病毒病和禽流感灭活疫苗。本研究采集临床死亡鹅病变组织,根据发病情况及剖检病理变化,初步怀疑可能为禽流感病毒(AIV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性法氏囊病毒(IBDV)、新城疫病毒(NDV)、GoAstV-2、坦布苏病毒(TMUV)、禽呼肠孤病毒(ARV)、鹅细小病毒(GPV)或禽腺病毒(FAv)感染。根据病毒基因PCR检测,鹅胚病毒分离以及动物致病性试验,综合诊断为GoAstV-2感染。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品处理及核酸提取

无菌采集6只病死鹅的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、胃、喉头、气管、脑、肾脏等组织,分别剪碎后研磨,用加双抗的PBS进行稀释,反复冻融3次,10 000 r/min离心5 min。参照病毒DNA/RNA提取试剂盒说明书,提取样品DNA/RNA置于-20℃保存备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

一步法RT-PCR试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;病毒DNA/RNA提取试剂盒购自北京济凡生物科技有限公司;PrimeSTAR Max DNA Polymerase和DNA Mark购自宝生物(大连)有限公司。miniAmp PCR仪购自赛默飞世尔科技公司;高通量组织匀浆机购自德国Retsch公司;电泳仪购自北京市六一仪器厂;UVIDOC HD6凝胶成像系统购自英国UVitec Ltd. Cambridge公司。

### 1.3 引物

GoAstV-2 ORF1b引物参考文献[6]设计合成,GoAstV-2 ORF1a引物由实验室设计,其他引物参照国家、地方标准或文献[7-9]设计合成,相关引物详见表1。

表1 引物信息

引物	序列(5'→3')	产物长度/bp	来源
GoAstV-2 ORF1b F	ACGACAGATGCCGTTACTT	277	[6]
GoAstV-2 ORF1b R	GGTGACATTATCCCTGAG		
GoAstV-2 ORF1a F	AAGATGGTGAGATTTGGGCAG	1 851	实验室设计合成
GoAstV-2 ORF1a R	AGCATATTCATCTTGTGCCA		
AIV-M F	TTCTAACCGAGGTCGAAAC	229	GB/T 18936—2020
AIV-M R	AAGCGTCTACGCTGCAGTCC		
NDV F	ATGGGCYCCAGAYCTTCTAC	535	GB/T 16550—2020
NDV R	CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC		
GPV F	ACAGGAGGAACAGACAACT	440	DB32/T 1460—2009
GPV R	GAGATACGGAGAAGGATG		
IBV F	CCTAAGAACGGTTGGAAT	740	GB/T 23197—2008
IBV R	TACTCTCTACACACACAC		
ARV F	ACGGTGGACTGCTGTAT	209	[7]
ARV R	ACGATGGAAGACACTACG		
IBDV F	AGATTCTGCAGCCACGGTCTCT	594	GB/T 19167—2020
IBDV R	TTGATGACTTGAGTTGATTTT		
TMUV F	GCGGATAAAGAGGACGA	483	[8]
TMUV R	ATTGCACCAGCAGTCTATG		
FAv F	ATGTCAGCAGTAGGCCGAT	1 218	[9]
FAv R	GCCGTCGCTCTAAGGGTC		

## 1.4 临床病料的检测

以提取样品核酸为模板进行 AIV、NDV、GoAstV-2、TMUV、ARV、IBV、IBDV 进行实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 扩增, 扩增体系为 25  $\mu\text{L}$ : 2 $\times$ one step mix 12.5  $\mu\text{L}$ , Enzyme mix 1.25  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 6.25  $\mu\text{L}$ , 样本 3  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为 50  $^{\circ}\text{C}$  30 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。以提取样品核酸为模板进行 FAdV、GPV PCR 扩增, 扩增体系为 25  $\mu\text{L}$ : PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 12.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu\text{L}$ , 样本 3  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 和 RT-PCR 扩增产物均用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

## 1.5 病毒分离

利用 10 日龄鹅胚对检测阳性样本进行病毒分离, 采用绒毛尿囊膜接种, 每隔 12 h 照胚一次, 弃掉 24 h 内死亡鹅胚。接种 10 d 后分别收取尿囊液及胚体 (心脏、肝脏、脾脏、肾脏等), 研磨后取上清液再次接种 10 日龄鹅胚, 按照上述方法盲传 3 代后用 1.3 中 GoAstV-2 引物检测是否成功分离到该病毒, 并进行外源性病毒 AIV、NDV、GPV、TMUV、IBV、IBDV、ARV 检测和病毒半数感染量 ( $\text{EID}_{50}$ ) 测定。

## 1.6 序列测定及遗传进化分析

扩增产物送至青岛睿博兴科有限公司进行测序, 并利用 NCBI 中 BLAST 功能进行比对。利用 MEGA 7

软件, 采用邻接法, Bootstrap 值 (1 000) 构建系统进化树, 对测得的序列进行遗传进化分析, GoAstV-2 参考毒株信息见表 2。

表 2 GoAstV-2 参考毒株信息

参考毒株	分离地	年份
OP764611	中国	2023
OP020131	中国	2022
OL982613	中国	2020
MW592379	中国	2020
MN428645	中国	2020
ON745304	中国	2021

## 1.7 动物致病性试验

为了解该分离株病毒对动物的致病性, 将 7 日龄健康雏鹅随机分为两组, 每组 12 只。第一组雏鹅肌肉注射分离株病毒液, 0.4 mL/只 ( $\text{EID}_{50}$  为  $10^{-3.83}$  / 0.2 mL), 第二组肌肉注射同等剂量的 PBS。观察临床症状及剖检变化, 感染 15 d 每组随机挑选 3 只采集肝脏、肾脏样品进行组织病理学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 病死鹅剖检情况

剖检病死鹅, 可见十二指肠弥漫性出血 (图 1A), 肠道出血、坏死 (图 1B), 泄殖腔出血 (图 1C), 内脏、皮下尿酸盐沉积 (图 1D、1E), 肾脏肿大呈花斑肾 (图 1F)。

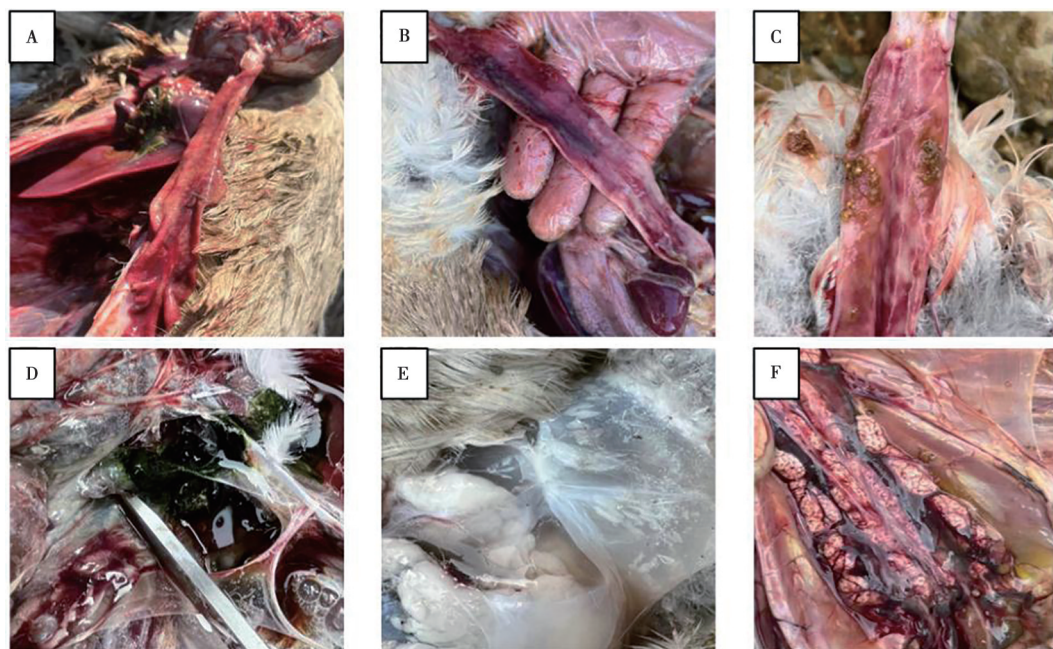


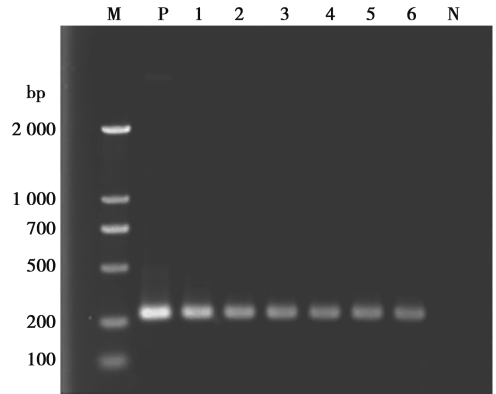
图 1 病死鹅剖检情况

### 2.2 疑似病毒检测

对6份样品进行PCR或RT-PCR扩增,对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,6份样品均为GoAstV-2阳性(见图2),AIV、NDV、TMUV、ARV、FAdV、GPV、IBV、IBDV检测均为阴性。

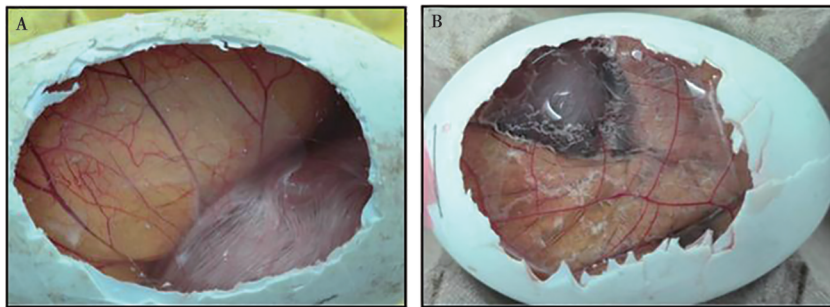
### 2.3 病毒分离

挑选一份GoAstV-2阳性样品进行病毒分离,连续盲传3代接毒10d鹅胚的绒毛尿囊膜出现明显的尿酸盐沉积(见图3),用本实验室已经建立的PCR方法,对盲传3代的样品进行外源性病毒检测,包括AIV、NDV、GPV、IBV、ARV、IBDV、TMUV,结果显示无外源性病毒污染(见图4)。根据Reed-Muench法得到GoAstV-2的EID<sub>50</sub>为10<sup>-3.83</sup>/0.2 mL。



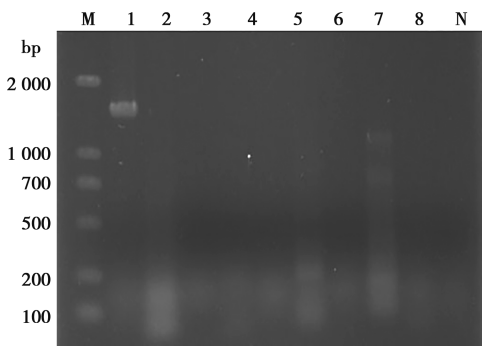
M. DNA Marker DL2000; P. 阳性对照; 1~6. 被检样品; N. 阴性对照。

图2 GoAstV-2 PCR产物电泳情况



A. 空白对照组; B. GoAstV-2接种组。

图3 病毒接种10d绒毛尿囊膜变化

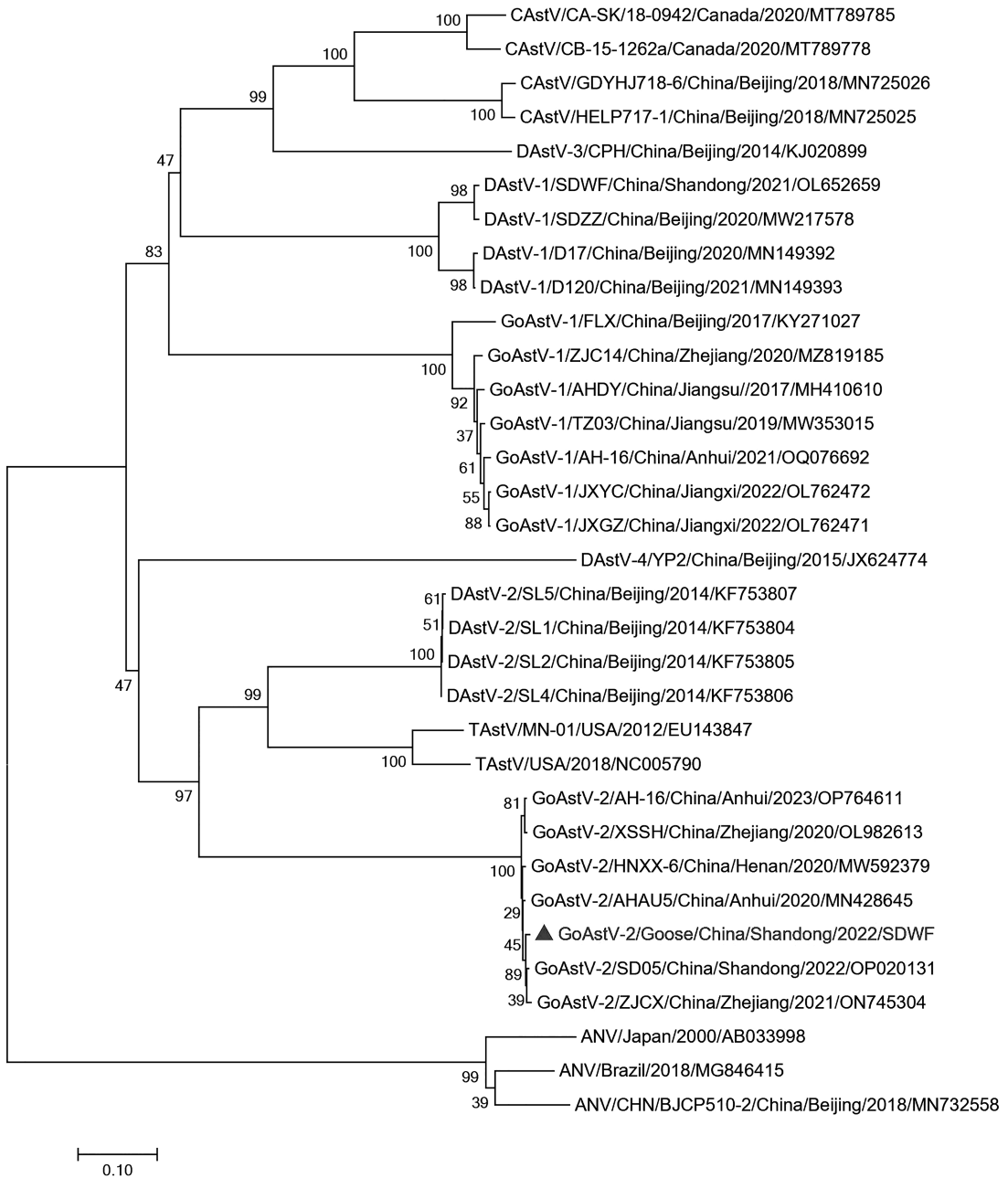


M. DL 2000 DNA Marker; 1. GoAstV-2; 2. AIV; 3. NDV; 4. GPV; 5. IBV; 6. ARV; 7. IBDV; 8. TMUV; N. 阴性对照。

图4 病毒分离样品外源性病毒检测

### 2.4 序列测定分析

使用GoAstV-2 ORF1b基因引物,对阳性的样品进行扩增,并将扩增产物送测序,随后进行遗传进化分析。结果显示,所测毒株的核苷酸序列与GenBank上报道的6株参考株毒株相似性为88.3%~89.0%,其中与参考株OP020131相似性最高,为89.0%。将该分离株命名为GoAstV-2/Goose/China/Shandong/2022,简称SDWF,将测得的ORF1b基因全长序列与GenBank上发表的32株禽星状病毒分离株的ORF1b基因序列进行比对,使用MEGA7软件构建系统发育树。结果显示,该样品与GoAstV-2参考毒株属同一分支,与其他禽类星状病毒亲缘关系较远,不在同一分支上(见图5)。



▲本研究毒株。

图 5 基于 ORF1b 的禽类星状病毒系统发育树

### 2.5 动物致病性试验

SDWF 分离株感染组在 1 d 时精神沉郁，扎堆，采食量减少，排白色稀便症状，并发生死亡，到 15 d

时死亡率为 33.3%。死亡鹅临床剖检可见各组织器官表面有明显的白色尿酸盐沉积，肾脏肿胀，肠管变粗；对照组无明显病变（见图 6）。

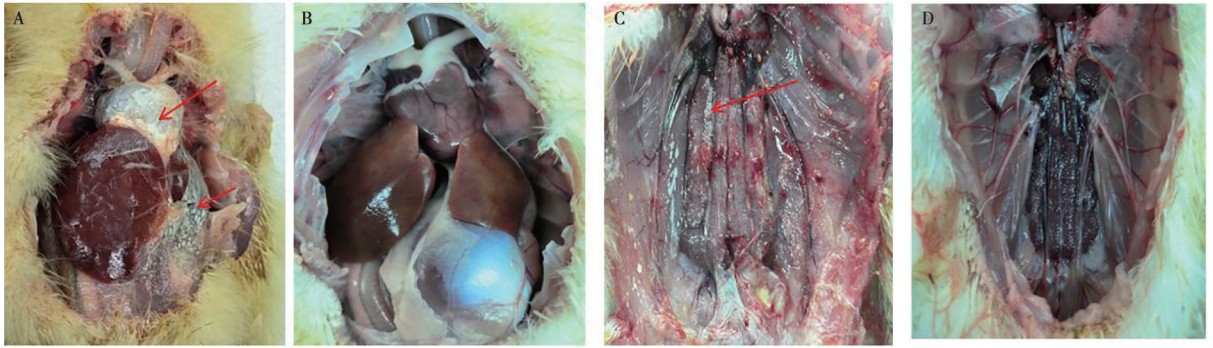


图6 A、C为GoAstV-2感染组剖检图片（红色箭头代表组织器官表面有明显的尿酸盐沉积）；B、D为对照组剖检图。

图6 SDWF分离株感染鹅的临床剖检病变

由图7可知，组织病理学切片显示肝窦间隙及中央静脉周围有炎性细胞浸润（图7A绿色箭头）；肾

小管上皮细胞变性、坏死（图7B绿色箭头），肾小球萎缩，变小（图7B黄色箭头）。

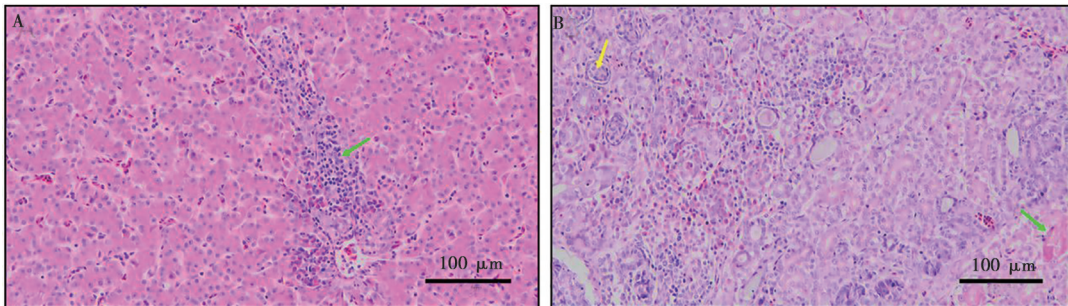


图7 SDWF分离株感染鹅的肝脏（A）和肾脏（B）病理组织学变化

### 3 讨论

自鹅病毒性痛风在我国暴发以来，导致鹅群生长迟缓，死亡率增高，给我国养鹅业带来严重的经济损失。该病多发于1~20日龄雏鹅，在流行早期只感染鹅，但随着鹅病毒性痛风在我国的流行，感染对象也扩展至樱桃谷鸭和鸡等<sup>[10-11]</sup>。目前研究表明其传播途径可能是通过粪-口和生殖道进行传播，但能否通过生殖系统及鹅胚垂直传播给后代还未进行证实<sup>[12]</sup>。临床表现为白色粪便，腿关节肿大伴有尿酸盐沉淀。剖检可见胆囊、膝关节、输尿管、心脏、肝脏、气管、肾脏表面伴有尿酸盐沉积<sup>[13]</sup>。

本病例根据发病情况、临床剖检情况及RT-PCR检测结果，判定该养殖场为GoAstV-2感染。进一步测序结果表明，该养殖场GoAstV-2阳性产物ORF1b测序所得到的核苷酸序列与GenBank上报的参考株毒株OP020131核苷酸相似性最高（为89.0%），构建系统发育树，结果显示该样品与GenBank上已报道的GAstV-2毒株属同一分支，与其他禽类星状病毒亲缘关系较远，不属于同一分支。根据发病鹅出

现采食减退、消化不良等症状，剖检见肾脏肿大，呈花斑肾；内脏尿酸盐沉积；十二指肠弥漫性出血，肠道出血并坏死；喉头、泄殖腔出血等临床症状，结合RT-PCR检测结果确定为GoAstV-2感染。利用鹅胚分离鉴定的病毒进行动物致病性试验，可见各组织器官表面有明显的白色尿酸盐沉积，肠管和肾脏明显肿胀，与临床发病鹅表现一致。已有研究表明大量喂食，鹅群消化不良，尿酸生成过多、排泄障碍，尿酸盐堆积，会导致肝、肾损伤<sup>[14]</sup>，因此我们挑选病变明显的肝脏和肾脏组织制作病理切片，可见肾脏间质有少量红细胞出现，肝窦间隙及中央静脉周围有中度炎性细胞浸润，其病变结果与以往的研究报道基本一致<sup>[15]</sup>。

引起痛风的因素包括传染性支气管炎、禽腺病毒、减蛋综合征及GoAstV。家禽痛风又称尿酸盐沉积，是由于血液中尿酸盐过量导致无法有效从体内消除的高尿酸血症<sup>[16]</sup>。有研究表明，雏鹅饲喂过程中补充过量的高蛋白、高钙饲料，容易导致尿酸产生过多、排泄障碍，引发大量尿酸盐堆积，即所谓的营养代谢性疾病<sup>[17]</sup>。高密度、潮湿的饲养环境、动物活

动不足也有可能引发痛风<sup>[16]</sup>。2021年6月,在浙江省一个商业鹅养殖场发生致命性痛风疾病急性暴发导致70日龄鹅的发病率约为30% (264/880),这是第一次在成年鹅中报道GoAstV暴发。本研究中病例的情况与该养殖场的发病情况基本相似。具体致病机制还需进一步研究。

目前尚未有药物、疫苗及常规的抗菌、抗病毒方法能够治疗或预防GoAstV-2感染。因此在养殖过程中要树立“防重于治,养防结合”的理念,加强饲养管理,做好生物安全防控工作;减少核蛋白和嘌呤含量高的动物性饲料使用,适当增加饲料中维生素A或胡萝卜素的含量<sup>[17]</sup>,科学用药,减少抗生素的使用。同时还要加快鹅病毒性痛风疫苗的研发<sup>[18]</sup>,通过免疫接种提高鹅群的免疫力,促进养鹅业的健康发展。

## 参考文献:

- [1] PANTIN-JACKWOOD M J, STROTHER K O, MUNDT E, et al. Molecular characterization of avian astroviruses [J]. *Arch Virol*, 2011, 156 (2): 235-244.
- [2] ARIAS C F, DUBOIS R M. The astrovirus capsid: a review [J]. *Viruses*, 2017, 9 (1): 15.
- [3] ZHU Y, WANG H, HUA J, et al. Isolation and pathogenicity of a novel goose astrovirus from overfed adult landaise geese in China [J]. *Viruses*, 2022, 14 (12): 2806.
- [4] ZHU Q, SUN D. Goose astrovirus in China: a comprehensive review [J]. *Viruses*, 2022, 14 (8): 1759.
- [5] ZHANG X, REN D, LI T, et al. An emerging novel goose astrovirus associated with gosling gout disease, China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7 (1): 152.
- [6] 王宏宇, 朱寅初, 云涛, 等. 不同基因型鹅星状病毒鉴别诊断 RT-PCR方法的建立 [J]. *浙江农业科学*, 2021, 62 (11): 2299-2302.
- [7] 廖敏, 谢志勤, 刘加坡, 等. 一步法RT-PCR检测禽呼肠弧病毒方法的建立与应用 [J]. *广西畜牧兽医*, 2003 (2): 60-61.
- [8] 曾婷婷, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 4株广西鸭源坦布苏病毒分离及初步鉴定 [J]. *中国动物检疫*, 2013, 30 (6): 31-35.
- [9] 向文彬, 陈俊宏, 严红亚, 等. 云南省禽腺病毒检测与分子流行病学调查 [J]. *云南畜牧兽医*, 2020 (6): 2-5.
- [10] CHEN H, ZHANG B, YAN M, et al. First report of a novel goose astrovirus outbreak in Cherry Valley ducklings in China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67 (2): 1019-1024.
- [11] LI J Y, HU W Q, LIU T N, et al. Isolation and evolutionary analyses of gout-associated goose astrovirus causing disease in experimentally infected chickens [J]. *Poult Sci*, 2021, 100 (2): 543-552.
- [12] 姚鑫炎, 杨惠湖, 李文俊, 等. 鹅星状病毒病原学、流行病学及宿主免疫应答的研究进展 [J]. *中国家禽*, 2022, 44 (6): 107-113.
- [13] XU L, JIANG B, CHENG Y, et al. Molecular epidemiology and virulence of goose astroviruses genotype-2 with different internal gene sequences [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1301861.
- [14] XI Y, HUANG Y, LI Y, et al. Fermented feed supplement relieves caecal microbiota dysbiosis and kidney injury caused by high-protein diet in the development of gosling gout [J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10 (11): 2139.
- [15] WANG A P, ZHANG S, XIE J, et al. Isolation and characterization of a goose astrovirus 1 strain causing fatal gout in goslings, China [J]. *Poult Sci*, 2021, 100 (11): 101432.
- [16] LIU C, SUN M, LIAO M. A review of emerging goose astrovirus causing gout [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 1635373.
- [17] 邓丽, 刘保国, 杭柏林. 鹅痛风型星状病毒感染的诊断与防治研究进展 [J]. *现代畜牧兽医*, 2021 (8): 88-93.
- [18] 姜晓宁, 田家军, 杨晶, 等. 导致雏鹅痛风新型鹅星状病毒的分离鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38 (5): 871-877.