

章丽娇, 黄欣梅, 刘飞, 等. 新型鹅星状病毒 AHQJ18 株的分离鉴定[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1262-1264.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.05.037

新型鹅星状病毒 AHQJ18 株的分离鉴定

章丽娇¹, 黄欣梅¹, 刘飞², 刘青涛¹, 韩凯凯¹, 赵冬敏¹, 杨婧¹, 刘宇卓¹, 李银¹

(1.江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014; 2.山东鲁抗舍里乐药业有限公司, 山东 济宁 272000)

关键词: 痛风; 新型鹅星状病毒; 分离鉴定

中图分类号: S851.34+7.201 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)05-1262-03

Isolation and identification of a novel goose astrovirus AHQJ18

ZHANG Li-jiao¹, HUANG Xin-mei¹, LIU Fei², LIU Qing-tao¹, HAN Kai-kai¹, ZHAO Dong-min¹, YANG Jing¹, LIU Yu-zhuo¹, LI Yin¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Shandong Lukang Shelile Pharmaceutical Co., Ltd. Jining 272000, China)

Key words: gout; novel goose astrovirus; isolation and identification

星状病毒于 1975 年在肠炎患儿的粪便样品中被首次发现^[1], 随着时间的推移和检测技术的不断进步, 星状病毒的种类、宿主及流行范围相继扩大。目前, 星状病毒在全世界不同地区不同种类哺乳动物中的感染非常普遍, 并且还能感染各种禽类^[2]。星状病毒主要引起感染哺乳动物的肠道疾病, 对于感染的禽类, 除肠道炎症外, 还可引发鸡肾脏疾病, 雏鸭的病毒性肝炎等^[3-5]。星状病毒为无囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组变异较大, 全长约 6.1~7.9 kb, 包括 5' UTR, 3 个开放性阅读框 (ORF1a、ORF1b 和 ORF2), 3' UTR 及多聚腺苷酸 (PolyA) 尾, 不同种星状病毒之间存在基因重组现象。星状病毒基因组的高度变异使其对环境和宿主具有很强的适应能力, 甚至可跨种传播, 是威胁人类健康和动物养殖业的重要传染病原之一。

近年来, 中国山东、江苏及安徽等地区养鹅场暴发了一种以痛风为主要症状的致死性传染病。该病主要发生于 5~20 日龄雏鹅, 感染雏鹅精神沉郁、食欲减退、消瘦、四肢瘫痪等, 严重者死亡, 死亡率高达 30%, 剖检可见患病鹅肝脏、心脏、肾脏、翅腿部关节及喙部等处出现严重的白色尿酸盐沉积, 给中国养鹅业造成了严重的经济损失。已有数位学者报道了相关病例, 经研究发现该病由一种新型的星状病毒所引起^[6-9]。2018 年 7 月份, 安徽全椒某养殖场部分雏鹅出现上述相似临床症状和剖检病变, 本研究通过病料采集、鹅胚接种及 RT-PCR 鉴定, 分离到 1 株新型鹅星状病毒, 命名为 AAstV/Goose/CHN/2018/AHQJ (简称 AHQJ18), 并对该分离株进行了序列测定与分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

病料 2018 年 7 月份采集自安徽全椒某养鹅场, 健康鹅胚由常州市四季禽业有限公司鹅业分公司孵化厂提供, RNA 抽提试剂盒购自 Axygen 公司, AMV 反转录酶购自大连宝生物有限公司。

1.2 临床症状与剖检病变

观察并记录发病鹅的临床症状和剖检病变。

收稿日期: 2018-07-04

基金项目: 江苏省青年自然科学基金项目 (BK20180303); 国家重点研发计划项目 (2017YFD0500804); 国家青年自然科学基金项目 (31802200)

作者简介: 章丽娇 (1987-), 女, 浙江德清人, 博士, 助理研究员, 主要从事家禽重大疫病防治研究。(Tel) 025-84390047; (E-mail) zhang62810003@126.com

通讯作者: 李银, (Tel) 025-84391687; (E-mail) muziyin08@163.com

1.3 病料的采集与处理

对患病鹅肝脏、肾脏等尿酸盐沉积严重的脏器进行细菌检验。同时取患病鹅肝脏与肾脏组织,加入无菌 PBS,研磨成匀浆,反复冻融 3 次,离心取上清液,上清液过滤除菌后,经绒毛尿囊膜接种鹅胚,37 °C 孵育,连续观察 5 d,收集尿囊液、病变明显的尿囊膜和组织脏器并混匀。收获的组织处理液继续接种鹅胚,连续传代 3 次,取第三代尿囊液、尿囊膜及组织脏器混合液进行后续检测。

1.4 RT-PCR 鉴定

收集的混合液离心取上清液,提取病毒 RNA 并反转录。以获得的 cDNA 为模板,利用已报道的特异性引物^[10-13]对中国商品鹅中常见的病毒病原——鹅细小病毒(Gooseparvovirus, GPV)、鹅多瘤病毒(Goose polyomavirus, GPoV)、禽呼肠孤病毒(Avianorthoreovirus, ARV)及最近新发现的鹅星状病毒进行 PCR 扩增检测。

1.5 病毒基因组的扩增及序列分析

使用文献[13]报道的包含新型鹅星状病毒全部编码区的特异性引物,以获得的 cDNA 为模板,对分离毒株的基因组进行分段扩增,PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司测序。测序结果拼接后用 Blast 进行比对,同时用 DNASTAR 与其他不同种属星状病毒进行同源性分析,并用 MEGA7.0 构建进化树。

2 结果

2.1 患病鹅的临床症状

雏鹅 5~8 日龄开始发病,发病雏鹅出现精神沉郁、采食量下降、消瘦、四肢瘫痪等临床症状,严重者死亡并可见喙部尿酸盐沉积。剖检部分死亡鹅发现其肝脏和心脏表面被大量白色的尿酸盐渗出物所包裹,肺脏、肾脏、胃、肠道、胸膜、腿部肌肉及腿部关节腔出现点状或者片状尿酸盐沉积。

2.2 病原分离情况

患病鹅肝脏和肾脏组织未检测到细菌,初步排除细菌感染的可能。组织处理液接种鹅胚后,鹅胚未死亡,第三代鹅胚出现尿囊膜增厚,解剖胚体可见肝脏组织坏死。

2.3 RT-PCR 鉴定

第三代鹅胚组织混合液 cDNA 的 PCR 结果显示,GAstV 特异性引物对能够扩增出大小约 500 bp 的目的条带,GPV、GPoV 及 ARV 检测均为阴性,表明分离株为鹅星状病毒,命名为 GAstV AH18 株。

2.4 基因组序列分析

PCR 产物经测序、拼接及分析后结果显示,GAstV AH18 株编码区包含 ORF1a、ORF1b 及 ORF2 3 个开放性阅读框。其中 ORF1a 长 3 255 nt,编码 1 084 个氨基酸,ORF1b 长 1 560 nt,编码 519 个氨基酸,ORF2 长 2 133 nt,编码 704 个氨基酸。将该分离株各 ORF 基因序列与 GenBank 上已发表的 21 株禽源星状病毒和 7 株哺乳动物星状病毒基因序列进

行比对分析,结果显示 3 个 ORF 和 3 株新型鹅星状病毒的核苷酸同源性和氨基酸同源性均在 97% 以上;与其余禽源星状病毒相比,ORF1a 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 45.1%~62.4% 和 26.8%~59.6%,ORF1b 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 57.2%~67.4% 和 52.1%~68.8%,ORF2 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 41.0%~59.0% 和 26.5%~57.3%,其中与火鸡星状病毒基因序列同源性最高;与哺乳动物星状病毒比对,ORF1a 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 34.5%~37.2% 和 14.4%~16.9%,ORF1b 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 46.5%~49.8% 和 37.0%~38.4%,ORF2 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 33.3%~36.2% 和 16.8%~19.6%。

分离株与 GenBank 中 42 株不同种星状病毒的系统发育进化分析结果显示,该分离株与其他近期分离的新型鹅星状病毒同属于一个分支。

3 讨论

星状病毒的宿主范围十分广泛,可感染多种哺乳动物和禽类。对于禽类,星状病毒感染可引发鸡的肾脏疾病,雏鸭的病毒性肝炎以及火鸡的肠炎等,但在鹅群中的感染鲜见报道。近年来,中国山东、江苏、安徽等地区养鹅场相继暴发了一种以内脏和关节腔尿酸盐沉积为显著特征的致死性传染病,给中国的商品鹅养殖业造成了严重的经济损失,该病经研究最终确定其致病病原为一种新型鹅星状病毒^[6-9]。结合相关研究报道,可以发现鹅星状病毒已经广泛存在于广东、福建、江西、安徽、江苏、湖南、河南、山东、河北等地区,最早于 2015 年采集病料中检测到^[6]。本研究根据临床症状和剖检病变初步判断安徽全椒某养鹅场的患病雏鹅为新型鹅星状病毒感染,并通过 RT-PCR 检测得到确认,在此基础上成功分离到 1 株新型鹅星状病毒。造成鹅痛风的原因很多,比如高钙高蛋白饲料引发的蛋白质代谢障碍和肾脏损伤,缺水导致的尿酸血症,磺胺类药物引起的中毒和肾脏损伤等^[14]。经了解,本次研究检测的养殖场饲养环境较为规范卫生,饮水正常,无磺胺类药物用药史,饲料配比科学合理,且在出现鹅痛风症状后,适当增加了青粗饲料的比例,但无明显改善效果。鉴于上述情况,结合该养殖场鹅群发病日龄普遍偏小的现象,合理推测该养殖场发生鹅痛风的主要原因是星状病毒感染,当然这需要后续动物回归试验的进一步验证。

据报道,禽星状病毒基因组全长 6.9~7.9 kb,均包含 3 个开放性阅读框。本研究通过 PCR 分段扩增获得了分离株编码区 3 个 ORF 的基因序列,结果显示 ORF1a 与 ORF1b 之间含有 19 nt 核苷酸的重叠区域,该区域参与核糖体移位信号的形成,这与其他星状病毒一致。基因序列比对分析结果表明,该分离株 ORF1a、ORF1b 及 ORF2 核苷酸和氨基酸序列与 GenBank 上近期发表的中国分离的 3 株新型鹅星状病毒的同源性均在 97% 以上,但与其他禽源星状病毒同源性均

低于70%,表明该分离株属于新型鹅星状病毒。ORF2全长氨基酸序列可以作为星状病毒种间划分的依据^[15],因此本研究选择ORF2氨基酸序列构建系统发育进化树,结果同样显示其与3株新型鹅星状病毒同属于一个分支。

张清水^[13]研究发现新型星状病毒通过皮下注射、滴鼻及口服途径均可感染雏鹅,感染的雏鹅肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、心脏、法氏囊、胸腺等各组织脏器均能检测到病毒存在,并且可通过泄殖腔持续排毒14d,这提示病毒具有较强的传染能力,可以通过消化道和呼吸道进行传播。鉴于其为新发病,目前对该病的流行病学及致病机制等尚缺乏深入研究,也无有效疫苗进行预防。因此,疫苗及相关生物制品是后续研究工作的重点之一。该病毒目前缺乏增殖细胞系,只能通过鹅胚培养,这给灭活或者弱毒疫苗的研制带来了一定的困难。未来,可寻找该病毒适应的细胞系,或者利用分子生物学手段开发基因工程疫苗。此外,严格的生物安全措施也是降低雏鹅星状病毒感染的關鍵。

参考文献:

- [1] APPLETON H, HIGGINS P G. Letter: viruses and gastroenteritis in infants [J]. *Lancet*, 1975, 1 (7919): 1297.
- [2] WOHLGEMUTH N, HONCE R, SCHULTZ-CHERRY S. Astrovirus evolution and emergence [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2019, 69: 30-37.
- [3] FU Y, PAN M, WANG X, et al. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings [J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90 (5): 1104-1108.
- [4] SHIRAI J, TANIMURA N, URAMOTO K, et al. Pathologically and serologically different avian nephritis virus isolates implicated in etiology of baby chick nephropathy [J]. *Avian Diseases*, 1992, 36 (2): 369-377.
- [5] REYNOLDS D L, SAIF Y M. Astrovirus; a cause of an enteric disease in turkey poult [J]. *Avian Diseases*, 1986, 30 (4): 728-735.
- [6] ZHANG Q, CAO Y, WANG J, et al. Isolation and characterization of an astrovirus causing fatal visceral gout in domestic goslings [J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2018, 7 (1): 71.
- [7] YANG J, TIAN J, TANG Y, et al. Isolation and genomic characterization of gosling gout caused by a novel goose astrovirus [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(6):1689-1696.
- [8] LIU N, JIANG M, DONG Y, et al. Genetic characterization of a novel group of avastroviruses in geese [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(4): 927-932.
- [9] ZHANG X, REN D, LI T, et al. An emerging novel goose astrovirus associated with gosling gout disease, China [J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2018, 7(1):152.
- [10] ZADORI Z, STEFANCSIK R, RAUCH T, et al. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2 [J]. *Virology*, 1995, 212 (2): 562-573.
- [11] CORRAND L, GELFI J, ALBARIC O, et al. Pathological and epidemiological significance of goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks [J]. *Avian Pathology*, 2011, 40 (4): 355-360.
- [12] LIU Q, ZHANG G, HUANG Y, et al. Isolation and characterization of a reovirus causing spleen necrosis in pekin ducklings [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148 (2/3/4): 200-206.
- [13] 张清水. 新发肾致病型鹅星状病毒的分离鉴定及弱毒株选育 [D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [14] 王 岩. 鹅痛风的病因、临床表现和治疗措施 [J]. *现代畜牧科技*, 2017(9):94.
- [15] BOSCH A, GUIX S. *Astrovirus* [M]. New York: Springer, 2013.

(责任编辑:陈海霞)