



EGGS
PROGRAM

第12期/2013年12月

一株种鸡进行过常规免疫情况下仍造成法国肉鸡生产 大规模损失的新型呼肠孤病毒的鉴定

S. Troxler, P. Rigomier, I. Bilic, D. Liebhart, I. Prokofieva, B. Robineau, M. Hess

摘要: 在法国出现了很多在地方品系肉鸡和规模化白羽肉鸡养殖场引起高发病率的腱鞘炎病例。其主要临床症状表现为跛行，发育迟缓和体重不均衡。虽然自然死亡率很低，但由于在出栏之前必须将病禽从鸡群中剔除以及胴体品质下降，屠宰平均体重降低所造成的经济损失是巨大的。经病理剖检、细菌学、病毒学和血清学检查鉴定，腱鞘炎的病原为禽正呼肠孤病毒（ARV）。对分离的ARV进行了血清学和遗传分析。对 σ C片段的 RT-PCR产物进行测序和系统进化分析显示其为一种新型的ARV。血清中和试验显示该病毒不能被从疫苗免疫鸡群获得的单价血清所中和。结合发病鸡群的情况，我们重新描述了最近在法国这些呼肠孤病毒爆发的流行情况。可以得出结论，这些呼肠孤病毒株的血清型和基因型不同于作为商业疫苗使用的呼肠孤病毒分离株，这些疫苗不能够防止该疾病的发生。新型呼肠孤病毒的爆发导致了来自免疫种鸡的肉鸡群的重大损失。

简介

人们对由禽正呼肠孤病毒（ARV）引起的病毒性关节炎和腱鞘炎的认识已超过 40 年（Petek and others 1967, Walker and others 1972）。在很多腱鞘炎的爆发中分离鉴定到了该病原，这些爆发主要集中于肉鸡。（Jones 2008）。

然而，在过去的 20 年中，只有极少数的病例报告（Dobson and Glisson 1992, Hemzani and others 1996, de Gussem and others 2010），而且均没有进行分子生物学分析来鉴定这些病毒株，也没有将病毒信息与鸡群的情况进行联系。

ARV 属于呼肠孤病毒科，正呼肠孤病毒属（Attoui 等，2012）。最近基于具有免疫原性的 σ C蛋白的系统发育分析的研究（Wickramasinghe 等，1993）显示，在 ARV 中有很多可归入不同进化树分支的变种的存在（Kant 等，2003, Liu 等，2003, Goldenberg 等，2010）。ARV 的新分离株似乎与在商业疫苗中常用的毒株有所不同（Lublin and others 2011）。尽管只有在子代感染同一血清型的病毒时才能起到完全的保护作用（Rau and others 1980, Wood and others 1986），以通过母源抗体保护而防止后代感染，种鸡接种疫苗是必不可少的（EIDSON 等 1979）。

在这里，我们报告了在法国中部和西部地区尽管在父母代鸡群中进行了常规疫苗接种，仍然爆发的病毒性腱鞘炎的疫情。该报道涉及五个孵化场的鸡群。我们列出了肉种鸡及其子代鸡群的信息，对病毒分离株进行了血清学和遗传学鉴定。本研究的目的是将种鸡与肉鸡群的信息进行联系，总结防止呼肠孤病毒引起的腱鞘炎的未来策略。



EGGS PROGRAM

材料和方法

鸡群信息和临床观察

在法国不同地区出现了大量腱鞘炎病例。为了调查这些疫情，我们使用了来自 17 个肉鸡群及其相应的父母代种鸡的数据。鸡群数据包括遗传学，孵化场和种鸡的疫苗接种情况。为了估算经济损失，我们将 ARV 病毒感染鸡群的表现与同场其余三个鸡群的平均表现进行了对比。

在日常鸡群监测中测定了种鸡和肉鸡群的 ELISA 滴度。在第 23，28，30 和 46 周分别从四个肉种鸡群 A1，A2，A4 和 A5 中收集血清样品，来确定常规接种疫苗后的抗体滴度。在鸡群 A2 和 A4 中，额外在第 40 和第 46 周分别采取血清样品。在种鸡 49 周(A1)，46 周(A2)，40 周(A4)和 59 周(A5)分别采取子代鸡群的血清。肉种鸡群 A2 的血清用 KPL (Gaithersburg, USA) 试剂盒进行了检测，所有其他鸡群（种鸡群 A1，A4，A5 及其子代）使用爱德士 REO 抗体试剂盒进行检测（IDEXX 实验室，威斯布鲁克，美国）。

剖检

将患腱鞘炎的鸡只处死并进行尸体剖检。主要采取肌腱组织，同时也采取肝脏和胰腺进行组织学和细胞培养（表 1）。将肌腱进行福尔马林固定，石蜡包埋，HE 染色后检测病理结果。

细胞培养

根据标准程序 (Schat and Purchase 1998) 使用 13 - 14 日龄 SPF 鸡胚制备原代鸡胚肝 (CEL) 细胞 (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Germany)。用含抗生素的 PBS 缓冲液将肌腱进行匀浆 (20% 重量/体积)，3000rpm 离心 10 分钟，然后将 500 μ l 上清液用于感染培养的细胞。37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 条件下培养六天后，将 500 μ l 澄清的上清液传代于新的细胞培养物中。重复该步骤直到观察到细胞病变 (CPE)，但至多传代三次。

RNA 提取

根据溶液 D 法用 200 μ l 表现出 CPE 的细胞培养物澄清上清液提取 RNA (Chomczynski and Sacchi 1987, Bilic and others 2009)。沉淀步骤 (-80 $^{\circ}$ C 1h，-20 $^{\circ}$ C 过夜) 均用无水乙醇代替 2-丙醇。20 μ l 超纯水溶解产物并储存于 -80 $^{\circ}$ C。

RT-PCR 和 PCR

根据制造商的说明使用一步法 RT-PCR 试剂盒 (Qiagen，德国 Hilden) 进行反转录 PCR (RT-PCR)。将浓度为 25pmol / μ l 的引物 P1 和 P4 和 2 μ l 的模版 RNA 分别加入 master mix 中，最终反应体积为 25 μ l，扩增一部分的 σ C 基因序列 (Kant and others 2003)。循环条件如下：50 $^{\circ}$ C 30 分钟，95 $^{\circ}$ C 15 分钟，95 $^{\circ}$ C 30 秒，35 个循环，58 $^{\circ}$ C 1 分钟，68 $^{\circ}$ C 2 分钟，最后延伸步骤 68 $^{\circ}$ C 10 分钟。



EGGS PROGRAM

将预期大小为1088 bp的PCR产物进行切胶回收。使用QIAquick胶回收试剂盒 (Qiagen, 德国Hilden) 提取DNA, 并发送至LGC Genomics (柏林, 德国) 进行测序。

从细胞培养上清液提取DNA后, 根据制造商的说明, 使用DNeasy血液和组织试剂盒 (Qiagen, Hilden德国) 检测禽腺病毒 (FADV)。

序列分析

使用Accelrys Gene, V. 2. 5软件 (Accelrys, San Diego, USA) 拼接序列并进行序列分析以及氨基酸比对。使用Phylogeny Inference Program package V. 3. 68 (PHYLP package) 进行系统进化分析 (Felsenstein 1993)。在PROTDIST程序中利用Kimura参数模型计算距离矩阵。使用NEIGHBOR程序中的UPGMA应用程序构建系统进化树。

在这项研究中发现独特的毒株的序列号为: 11-12523 (HE985296), 11-12524 (HE985297), 11-12525 (HE985298), 11-12526 (HE985299), 11-17268 (HE985300), 12-1167 (HE985301)。用于系统发育分析的从GenBank检索的序列号为: ISR5225 (FJ793546), ISR5215 (FJ793531), GEL12 98M (AF354225), 601G (AF297217), R2-TW (AF297213), ISR5226 (FJ793547), ISR5220 (FJ793532), 601SI (AF204947), JR1 (EF122836), 2408 (AF204945), 1733 (AF004857), S1133 (L39002), GEL13A 98M (AF354226), GEL13B 98M (AF354227), ISR528 (FJ793523), 916 (AF297214), GEI10 97M (AF354219), ISR5217 (FJ793535), AVS-B (FR694197), NLI12 96M (AF354230), 918 (AF297215), 1017-1 (AF297216), 42653-4/2005 (DQ872801), ISR5223 (FJ793549), ISR525 (FJ793539)。

免疫鸡群对新呼肠孤病毒的血清学反应

从四组进行了不同免疫的 SPF 鸡群和常规免疫的肉种鸡群分别采集血清样本, 分别用于血清中和试验 (SNT) 和 ELISA。五十周龄的 SPF 鸡进行过两次疫苗肌肉注射接种, 并饲养在隔离装置中, 通过 ELISA 评估非免疫 SPF 鸡的抗体水平来确定未受到野毒污染。第 1 组接种含有灭活的 ERS 呼肠孤病毒株的疫苗 1。第 2 组接种了含有灭活的呼肠孤病毒株 S1133, 3005 和 2408 的疫苗 2。第 3 组接种了含有灭活的呼肠孤病毒株 1733 和 2408 的疫苗 3。第 4 组没有接种疫苗。1-4 组分别包含 5 只 SPF 鸡。此外, 对由法国国家农艺研究所 (INRA) 提供的 10 只普通的种鸡血清进行了检查。

进行中和实验之前将血清样品在 56°C 加热灭活 30 分钟。将 100 TCID₅₀/100 微升恒定浓度的禽呼肠孤病毒分离株 11-12523 和 11-17268 分别进行血清中和实验。它是在含有 CEL 细胞的 96 孔板中进行的 (制备过程在“细胞培养”中进行了叙述)。于 37°C, 5% CO₂ 条件下培养五天, 进行细胞病变效应 (CPE) 研究, 并且计算了滴度。

为了检测用于 SNT 的血清中是否含有 ARV 的抗体, 根据制造商的说明用禽呼肠孤病毒抗体检测试剂盒 (BioChek, Reeuwijk, The Netherlands) 进行操作。在 405nm 处测定吸光度, 并使用 Biochek 软件 V. 2010 分别根据在试剂盒中提供的阳性对照和阴性对照计算相对滴度。



EGGS PROGRAM

TABLE 1: List of samples included in this study

Sample no.	Tissue	Incoming date (year-week)	Cell culture passages			PCR Reo (P1/P4)*	Sequence Reo (P1-P4; GQ)*	PCR Adeno (HexA/B)†	Sequence ADENO‡	Histology
			p1	p2	p3					
11-12523	Tendon	2011-36	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
11-12524	Tendon	2011-36	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
11-12525	Tendon	2011-36	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
11-12526	Tendon	2011-36	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
11-13058	Tendon	2011-38	-	+	Not done	+	Cluster 1	+	Not done	
11-13061	Tendon	2011-38	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
11-13062	Tendon	2011-38	+	Not done	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
11-13063	Tendon	2011-38	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	Not applicable
11-13064	Tendon	2011-38	-	+	Not done	+	Cluster 1	+ very weak	Not done	
11-17266	Tendon	2011-50	-	+	Not done	+	Cluster 1	+ weak	Not done	
11-17268	Tendon	2011-50	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
11-17269	Tendon	2011-50	-	+	Not done	+	Cluster 1	+	Spec. Eserot. 8a	
11-17270	Tendon	2011-50	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
12-341	Pancreas	2012-01	-	+	Not done	+	Cluster 1	+ weak	Not done	
12-342	Pancreas	2012-01	-	+	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	
12-1167	Liver	2012-03	-	+	Not done	+	Cluster 1	+	Spec. Eserot. 8b	See section 'Post-mortem examination'
12-1168	Tendon	2012-03	-	-	+	+	Cluster 1	-	Not applicable	
12-1174	Tendon	2012-03	-	+	+	+	Cluster 1	-	Not applicable	
12-1175	Pancreas	2012-03	+	Not done	Not done	+	Cluster 1	-	Not applicable	Not applicable
12-1179	Tendon	2012-03	-	+	Not done	+	Cluster 1	+	Spec. A serot. 1	See section 'Post-mortem examination'
12-1182	Tendon	2012-03	-	+	+	+	Cluster 1	-	Not applicable	

Sample description and laboratory findings are given. The samples originate from broiler flocks in France

*According to Kant and others (2003)

†According to Meulemans and others (2001)

‡According to the International Committee on Taxonomy of Viruses

+Means positive, -means negative

结果

鸡群数据和临床观察

肉鸡

2011年以来，在法国的不同地区的肉鸡中观察到了很多腱鞘炎病例。在六个月内，主要是“Label Rouge”鸡（自由放养的饲养至84日龄的地方肉鸡），也包括属于不同肉鸡生产集团的标准肉鸡受到了感染。肉鸡来源于法国各地的孵化场。无论父母代种鸡是否进行了疫苗接种，几个品种均受到了感染。在表4中列出了由农民提供的一些鸡群数据。

在肉鸡群的临床症状为增重缓慢，跛行和体重不均衡（图1）。症状开始于两周龄的标准肉鸡以及四到五周龄的自由放养的肉鸡。肉鸡表现为单腿或双腿肿胀，特别是在跗关节处（图1）。可触及肌腱肿大，有时可发现腓肠肌肌腱断裂。

肉种鸡

供应种蛋的种鸡群根据商业疫苗的差异进行了不同的接种程序，疫苗包含不同禽呼肠孤病毒毒株（S1133，1733年，3005，2408和ERS）的。商业ELISA检测表明种鸡群呈现持续的较高抗体滴度，同时也将抗体传递给了子代（表2）。



EGGS PROGRAM



图1：（a）在感染鸡群中观察到了生长不良和体重失衡现象。图为81日龄的散养肉鸡分别为980克和637克，而目标体重为2100克。箭头示出了在跗肌腱部位肿胀。（b）肉鸡腿部肿胀，跗肌腱部位增大（箭头）。

表2：肉种鸡及子代鸡群的ELISA抗体滴度

	鸡群	周龄（种鸡）	时间（周/年）	平均滴度	CV（%）
种鸡群	A1	30	13	17118	40
	A2	28	14	3588*	51
		46	32	6224*	29
	A4	23	18	22950	23
		40	35	22706	29
†子代鸡群	A5	46	13	19191	26
	A1	49	32	5235	43
	A2	46	32	6950	37
	A4	40	35	3567	81
	A5	59	26	8879	33

使用 IDEXX REO 抗体检测试剂盒（IDEXX 实验室，威斯布鲁克，美国）测定滴度，除了 A2 鸡群用 KPL (Gaithersburg, USA) ELISA 试剂盒进行测定，以*表示。†表示在 30-40 日龄

经济损失

虽然肉鸡的死亡率低，但经济损失严重。伴随着高发病率，鸡群增重率低，饲料转化率低。许多鸡只由于跛行和发育迟缓而被淘汰。为了估算经济损失，我们将一个呼肠孤病毒感染鸡群的生产数据与同一个农场其余三个鸡群的平均水平数据（表 3）进行了比较。



EGGS PROGRAM

瘸腿和发育不良的鸡只被不断地淘汰。再加上屠宰时的高废弃率，损失了超过20%的鸡只。其超过鸡群平均损失（1.5%）的10倍。此外，越来越多的胴体屠宰品质下降，平均体重较低（表3）。

最大的损失发生在一个自由放养的地方品种肉鸡群，65%的鸡只被淘汰，7%的胴体被废弃。在生长周期短的白羽肉鸡中，临床病理表现总体上是不一致的，但由于高废弃率和低饲料转化率，经济损失仍然相当大。

尸体剖检

病理检查发现单侧或双侧性腱鞘炎，没有或很少见到细菌污染。显著水肿，频繁的腓肠肌腱变性和点状出血（图2）。在慢性跛行病例，可发现肌腱硬化（“钙化”）。没有观察到其他组织特别是在消化道中的病变。

在肌腱的组织学标本中，淋巴细胞灶性积聚突出。此外，可见浆细胞浸润，成纤维细胞增殖和纤维化（图3）。在一个样品中（12-1168），可见关节间隙内滑膜上皮细胞的损失。

细胞培养和RT-PCR

本研究的所有样本送入实验室的时间在2011年第36周和2012年第3周之间。连续三代在细胞培养物中出现单层细胞分离和典型ARV合胞体形成的CPE即为样品阳性。大量样品在两代培养出现阳性，两个样品在第一代表现阳性，两个样本在第三代表现为阳性结果（表1）。为了证实这些结果，并与禽腺病毒进行区分，分别进行了ARV和FAdV的PCR反应。所有的21个样品用引物P1/P4的扩增禽呼肠孤病毒的部分σC蛋白序列呈阳性。七个样品也表现为FAdV阳性（引物HexA / HEXB），对其中3个进行了测序和分类（表1）。

表3：同一农场中腱鞘炎感染肉鸡群和三个正常鸡群的平均性能表现的比较

	鸡只 数量	死淘率%	废弃率%	品质下降 率	屠宰平均 体重 (g)	日龄 (d)	饲料转化 率
ARV感染鸡群	8800	7.09	13.53	8.25	2029	84	3.54
3个正常鸡群平均值	8800	1.13	0.38	5.93	2305	85	3.11

由于生病或死亡而必须从鸡群剔除的百分比被列出。废弃率是指屠宰过程中因质量和卫生标准不合格而被淘汰的比例。同时列出了品质下降胴体百分比以及屠宰的平均体重



EGGS PROGRAM

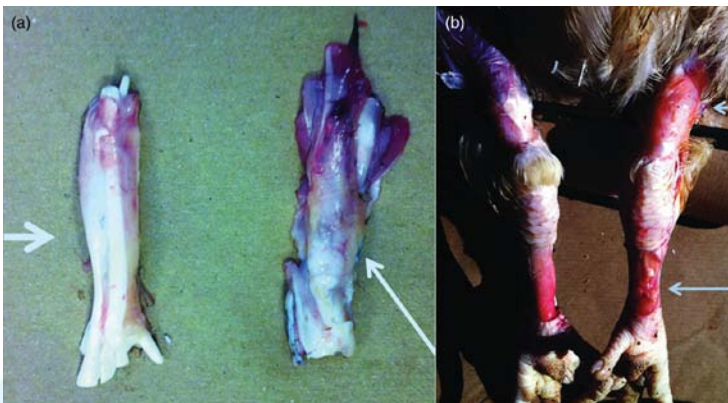


图2 : (a) 腓肠肌和跖跖肌腱变(左侧, 短箭头)和腓肠肌腱变性(右侧, 长箭头) (b) 腓肠肌和跖跖肌腱水肿(箭头所示)

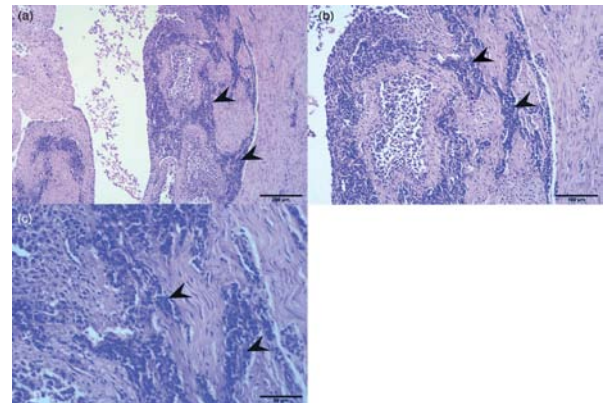


图3 : 肌腱 (12-1168), H&E染色。(a, b) 多发性淋巴细胞和浆细胞积聚(由箭头表示)。滑膜腔填充有细胞碎片, 上皮脱落。(c) 纤维细胞被炎症细胞取代(用箭头表示)

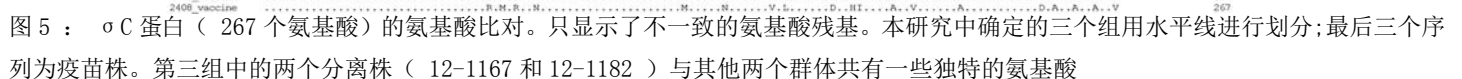
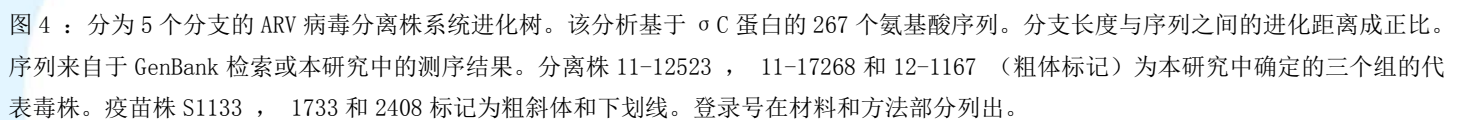
系统发育分析

禽呼肠孤病毒 σ C片段的系统发育分析表明, 本研究中的所有毒株都属于第1群(图4)。第1群包括商品疫苗株S1133, 1733和2408。然而, 在本研究中来自法国的毒株显然与上面提到的疫苗株有所不同, 如图5。此外, 它们与从以色列腱鞘炎病例中分离的两个毒株ISR5225和ISR5215有最密切的关系。无法获得疫苗株ERS的序列数据, 但它属于第5大群(S. van de Zande, personal communication)。

根据基于 σ C蛋白的系统发育分析, 法国分离株可分成3个组(图5)。大多数菌株(21株中的14株)属于第一组。病例爆发中确定的第一株病毒也属于第一组。第二组由五个分离株组成, 而第三组只包含两个毒株。有趣的是, 第三组中的分离株与其他两个组中一些特定氨基酸的特征相同, 这表明在所分析基因的自然发生的突变或基因重组的进化选择中可能存在一个中间步骤。从孵化场A和B分离得到属于第一组的分离株为首次发现, 后来也从孵化场E分离得到。属于第二组的分离株来自于孵化场C和D。属于第三组的分离株是在孵化场A和D分离到的(表4)。



EGGS PROGRAM





EGGS PROGRAM

TABLE 4: Source (hatchery), breed (genetic) and vaccination (of broiler breeders) of broilers affected from reovirus-induced tenosynovitis

Sample	Hatchery	Genetic	Vaccination
11-12523	A	CNN	1xV3+V1*
11-12524	A	JA657	V3+V1*
11-12525	A	JA657	V3+V1*
11-12526	A	JA 957	V3+V1*
11-13058	A	JA957	V1*
11-13061	B	ROSS PM3	V1*
11-13062	B	ROSS PM3	V1*
11-13063	B	ROSS PM3	V1*
11-13064	B	ROSS PM3	V1*
11-17266	C	JV	1x V3
11-17268	C	JV*	n.a.†
11-17269	D	JA957	1xV2+1xV3
11-17270	C	n.a.†	1xV3
12-341	E	Cobb 500	1xV3
12-342	E	Cobb 500	1xV3
12-1167	D	JA957+X552	2xV2+1xV3
12-1168	n.a.†	n.a.†	n.a.†
12-1174	E	M99*	1xV3
12-1175	E	M99*	2xV3
12-1179	n.a.†	M99*	n.a.†
12-1182	A*	n.a.†	n.a.†

According to phylogenetic analysis the avian orthoreovirus isolates can be divided into three groups (Fig 5), here written normal, in *italics* and **bold**. V1 means vaccine 1 (strain ERS), V2 means vaccine 2 (strains S1133, 3005 and 2408) and V3 means vaccine 3 (strains 1733 and 2408)

*Data given as supplied by the farmer

†Not available

表 4：患 ARV 引起的肌腱炎的肉鸡的来源（孵化场），品种（基因型）以及免疫程序（肉种鸡）

疫苗接种鸡群对新型呼肠孤病毒的血清学反应

将接种三种不同的呼肠孤病毒疫苗的SPF鸡的血清用于对呼肠孤病毒分离株11-12523（第1组）和11-17268（第2组）的SNT分析。两株分离株均未检测到与任何免疫三种疫苗的血清的中和反应。这两株毒株也不能被未接种SPF鸡的血清所中和。此外，从10只常规免疫接种的种鸡获得的血清也不能中和这两株病毒，除了分离株11-17268与10份血清中的两份的抗体滴度分别为 1: 8和1 : 16。

为了证实血清中ARV病毒抗体的存在，我们进行了ELISA实验。四组进行了实验性接种的鸡群的平均滴度为9.53，未接种的SPF鸡为 1.00（数据未示出）。

讨论

本研究对法国不同品种肉鸡腱鞘炎爆发病例中分离得到的ARV毒株进行了鉴定，并对鸡群信息进行了分析。总体而言，肉种鸡均进行了标准ARV疫苗的免疫，尽管疫苗有所不同。包括散养地方鸡和规模化养殖肉鸡在内的很多品系鸡都受到了感染，这与其遗传背景无关。然而众所周知的是，肉用型鸡比蛋用型鸡更易受到ARV感染 (Jones and Kibenge 1984)，



EGGS PROGRAM

而且在蛋用型鸡中很少见到由ARV引起的腱鞘炎症状 (Schwartz and others 1976, Macdonald and others 1978, de Gussem and others 2010)。肉鸡中报道了无数腱鞘炎暴发病例 (Olson and Solomon 1968, Johnson and Van der Heide 1971, Johnson 1972, Glass and others 1973, Bains and others 1974, Jones and others 1981, Hieronymus and others 1983, Kouwenhoven and others 1984, Robertson and others 1984, Dhillon and others 1986, Takase and others 1987, Vielitz and others 1989)，但是，在过去20年中只有两份报告 (Dobson and Glisson 1992, Hemzani and others 1996)。此外据我们所知，从来没有人将流行病学资料与病毒分离株的分子特征分析结合起来。

本研究共调查了来自于5个孵化场的17个肉鸡养殖场的21株正呼肠孤病毒。根据部分 σ C蛋白的序列分析可将本研究得到的毒株分为三个组。基因重组是ARV病毒的已知特征 (Liu and others 2003, Su and others 2006, Shen and others 2007)，而且 σ C编码的基因比其它S基因更容易发生重组 (Liu and others 2003)。Sigma-C蛋白在免疫学中起重要作用，并且基因片段的交换可以使病毒继续流行 (Liu and others 2003)。这三个组与不同品种的种鸡或疫苗不具有相关性，然而，我们观察到这三个组与研究中的孵化场及肉种鸡的分布有关。这证明我们所讨论的ARV病毒分离株可能来源于伴随着基因突变和可能的基因重组的垂直和水平传播。垂直传播率是很低的，感染主要发生在随后的水平传播，这在文献中被描述过 (Menendez and others 1975, van der Heide and Kalbac 1975, Al-Muffarej and others 1996)。流行病学数据支持了在孵化场传播的理论。在某些孵化日的肉鸡同时出现临床症状，可以证明雏鸡在出雏器中与受感染种鸡后代接触时受到了感染。我们的实地观察表明，目前ARV病毒的水平传播可能会出现得很早，在孵化后的头几个小时就可能发生。在同一个孵化日，问题涉及到了好几个种鸡来源和肉鸡养殖场。在其中某些鸡场中，我们观察到了一个肉鸡养殖场中隔离饲养的鸡群的“跳跃性感染”，这与该疾病的流行病学特征是不一致的。在我们的研究中，以相同的卡车运输到肉鸡养殖场不是一个危险因素。相反，我们认为交叉感染存在于同一天孵化的不同来源的雏鸡之间。在法国ARV呈现大部分地区的流行可能与交换未成熟的种鸡做法有关，尤其是公鸡，或孵化场之间的鸡蛋流通有关。

在一些样品中发现的禽腺病毒，和临床和病理数据之间没有联系，早期实验数据再次证实了禽腺病毒不能诱发本病的事实 (Jones and Georgiou 1984)。再者，在野外也未观察到禽腺病毒感染的临床症状。

ARV病毒分离株的中和试验和系统发育分析证明了疫苗接种方案的无效。虽然用ELISA法可测得血清中ARV抗体滴度处于正常范围内，研究中的两株病毒分离株在病毒中和实验中不能被中和。由于受到感染的鸡群相互独立，可以排除疫苗免疫操作错误导致的爆发。根据系统发育分析，所有毒株均属于第1大群，也包括疫苗株（除ERS株外）。对第1组更详细的分析显示，在分支上的差异可能是导致免疫保护力低下的原因。

虽然已证明呼肠孤病毒疫苗具有良好的效力 (Eidson and others 1979, van der Heide and Page 1980)，但它只具有针对同源血清型的完全保护作用 (Rau and others 1980, Wood and others 1986)。在肉鸡群中已报道过疫苗接种失败的严重的ARV暴发病例 (Vielitz and others 1989, Dobson and Glisson 1992, Hemzani and others 1996)。体内实验表明，与单独接种单一毒株相比，混合接种四种基因型的ARV病毒可以增加对于四种野毒株中任一毒株和疫苗株感染的保护效力 (Lubl



EGGS PROGRAM

in and others 2011)。

为了估计腱鞘炎爆发的经济损失，我们对于一个鸡群数据进行了详细分析。与同一农场其余三个鸡群的平均水平相比，剔除鸡只和死亡鸡只的比例超过六倍，废弃率超出十倍。这与现有的ARV造成的损失数据相比也是相当巨大的 (Vielitz and others 1989, Dobson and Glisson 1992, De Herdt and others 1999)。此外，我们还必须要考虑平均体重较低和饲料转化率更差导致的经济损失。

总的来说，我们通过对于法国肉鸡的腱鞘炎爆发病例的分析揭示了一种新型的ARV病毒。基于几个参数可以认定这种分离株的高致病性：致病性和在一日龄雏鸡中广泛扩散的能力。感染的后果是法国家禽业的高发病率和遭受的严重经济损失。

结果表明了呼肠孤病毒的垂直和水平传播的发生，同时也出现了σC蛋白序列内的基因突变。这可能是造成法国的肉种鸡的疫苗免疫未能有效保护子代鸡群的事实。为了解决流行的蔓延途径以及避免更大的经济损失，展开对该病毒的基因与血清学关系的研究，以及结合病毒致病性的研究必须得到加强。