



EGGS
PROGRAM

总第14期/2014年4月

埃及 2012 年肉鸡及蛋鸡养殖场传染性支气管炎病毒分离株 分子流行病学特性

Karim Selim a*, Abdel Satar Arafa a, Hussein A. Hussein b, Ahmed A. El-Sanousi

摘要: 鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 的一个关键问题就是新突变株的频繁出现。在本研究中, 自2012年1月至8月期间, 我们从埃及的19个省的肉鸡和蛋鸡场收集了205份气管拭子和组织样品。鸡只表现为呼吸道症状并伴有死亡。在检测的样本中, 通过实时定量RT-PCR检测发现, 其中130个疑似感染农场为IBV阳性 (约64 %)。我们从中选择了13份IBV阳性样品进行进一步的分离和特征鉴定。通过在无特定病原体 (SPF) 鸡胚进行三次连续盲传, 我们对病毒进行了分离, 随后通过RT-PCR对S1蛋白 (SP1) 的高变区进行了扩增并测序, 以此来研究不同病毒分离株之间的遗传多样性。系统发育分析显示, 所获得的13株序列与来自中东和全世界的其他毒株相比, 13株中的11株与以色列突变株 (IS/885和IS/1494/06) 有着密切的关系, 其核苷酸同源性分别为89.9 %和82.3 %。其余两株病毒分别与CR/88121和4/91有着密切的关系, 同源性分别为95 %和96 %。这项研究表明2012年在埃及IBV有两个突变群流行, 第I群类似于以色列突变株IS/885, 但存在区别, 第II群与4/91和CR / 88121疫苗株有关。由于这些毒株分散于全国各地, 两群之间没有地域联系。这些发现证明, 有必要对IBV疫苗接种程序和控制措施进行修改。

1 引言

传染性支气管炎 (IB) 是鸡的一种急性、高度传染性呼吸道疾病。本病的特征是呼吸道症状, 雏鸡常发生严重的呼吸窘迫, 而且会导致蛋鸡产蛋量降低 [1]。直到最近, 鸡被认为是IBV的唯一自然宿主, 并且感染病毒后致病。目前认为雉和其他禽类是IBV的第二自然宿主 [2]。该疾病通过空气途径、鸡只之间的直接接触以及通过机械器具间接传播 [3]。

传染性支气管炎病毒属于Nidovirales病毒目, 冠状病毒科, 冠状病毒属。IBV和火鸡和野鸡等其他禽类冠状病毒被分为冠状病毒第3群, 哺乳动物冠状病毒则构成了冠状病毒1、2和4群。第4群为最近发现的严重急性呼吸道综合征 (SARS) 冠状病毒 [4]。IBV为单链正股RNA囊膜病毒, 含有一个约27.6 kb大小的不分节段的基因组。病毒粒子有四个结构蛋白: 核衣壳蛋白 (N)、膜糖蛋白 (M)、小包膜蛋白 (E) 和糖基化纤突蛋白 (SP) [5]。

由于RNA病毒存在频繁的点突变和重组事件, 目前已报道了多种IBV的血清型。出于这个原因, 对病毒分离株的特性进行鉴定是非常重要的[6]。纤突 (SP) 蛋白是IBV的主要结构蛋白之一, 并被裂解成两个较小的蛋白质, 即SP1和SP2, SP1基因含有两个高变区, 且与中和抗体及血清型特异性抗体的诱导有关 [7]。



EGGS PROGRAM

已在埃及的多个家禽养殖场发现了不同血清型以及与Massachusetts、D3128， D274， D- 08880和4/91基因型相关IBV突变株的存在 [4, 8-10]。因此，IBV野毒株基因分型对于筛选新的突变株以及评价疫苗接种计划非常重要。从表现出呼吸症状和肾脏病变的肉鸡中分离的禽IBV毒株与Beni-Suef/01毒株和IS/885毒株的氨基酸序列同源性分别为89 %和84%，核苷酸序列同源性为88 % [11]。

本研究的目的是对埃及养鸡场中传染性支气管炎病毒的情况进行调查，对分离到的现场样品进行基因型区分，来探索埃及养鸡场中出现的新的变异株情况。

2. 材料与方法

2.1 . 采样

在这项研究中，为了调查IBV的患病率，我们在2012年1月到8月期间对埃及19个省的养鸡场进行了监测，对出现呼吸道症状和死亡的205 个养殖场进行了样品采集，其中肉鸡养殖场179个，蛋鸡场26个。每个临床病例收集10个气管拭子，并从死禽收集组织（气管，肾脏和肺）。

从样品中选取13个代表来自不同省份的阳性病例的病毒分离株（19个省份中的13个为阳性，其中3个省份为PCR阳性，但未分离出病毒，3个省份PCR和病毒分离为阴性）。如表1所示。

表1 IBV分离株信息

No.	毒株名称	省份	养殖场类型	日龄 (天)	免疫程序	采样日期	序列号
1	IBV-EG/1219F	Sharkia	肉鸡	33	1 日龄免疫 H120	11/01/2012	KC776180
2	IBV-EG/1267F	Alexandria	肉鸡	31	1 日龄免疫 H120	02/02/2012	KC776181
3	IBV-EG/1226B	Fayom	肉鸡	29	不详	05/02/2012	KC776182
4	IBV-EG/1236B	Monofia	肉鸡	31	1 日龄免疫 H120	12/02/2012	KC776183
5	IBV-EG/1260B	Bansuif	蛋鸡	490	1 日龄免疫 H120， 21 周免疫灭活疫苗	20/02/2012	KC776184
6	IBV-EG/1284B	Diemetta	肉鸡	30	不详	08/03/2012	KC776185
7	IBV-EG/1290B	Luxor	肉鸡	20	不详	14/03/2012	KC776186
8	IBV-EG/12177F	Giza	肉鸡	26	1日龄免疫H120	20/03/2012	KC776187
9	IBV-EG/12103B	Dakahlia	肉鸡	27	不详	04/04/2012	KC776188
10	IBV-EG/12249F	Behara	肉鸡	28	1日龄免疫H120	20/04/2012	KC776192
11	IBV-EG/12150B	Qaluobia	肉鸡	30	不详	20/05/2012	KC776190
12	IBV-EG/12164B	Ismailia	肉鸡	33	1日龄免疫H120	21/05/2012	KC776191
13	IBV-EG/12105B	Menia	肉鸡	31	不详	08/08/2012	KC776189



EGGS PROGRAM

2.2 通过实时RT-PCR检测IBV

采用实时逆转录聚合酶链反应 (RT - PCR) 检测IBV的非翻译区基因, 以此来检测样品中的病毒以及使用SPF鸡胚进行病毒分离后确认病毒的存在, 从10% w / v的样品悬浮液和尿囊液中提取用于RT - PCR的RNA, 按照制造商的说明使用QIAamp病毒RNA迷你试剂盒 (Qiagen, 德国) 进行病毒RNA的提取。使用正向引物 IBV5_GU391, 5' - ACGTATGACTACCCGAGTATTCA -3' 和反向引物IBV5_GL533, 5' -AGACCAGCCACCATGATTGC -3' 和探针IBV5_G, 5' - FAMCACCACCAGAACCTGTCACC TC-BHQ1 -3' 进行具体目的基因的扩增[12]。用Qiagen公司一步法RT-PCR试剂盒 (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) 在Stratagene热循环仪中进行实时RT-PCR反应。

2.3 选定样本的病毒分离

将选定的13个RT-PCR检测为IBV阳性样品的上清分别接种5个10日龄无特定病原体鸡胚 (Koum0shiem SPF鸡场, 法尤姆, 埃及)。每个鸡胚尿囊腔接种0.2毫升的样品, 37°C培养, 每天照胚。接种后96小时收获尿囊液。连续进行三次盲传。收获尿囊液储存于-70°C并检查胚胎的卷曲和蜷缩情况[13]。

2.4 SP1基因高变区的遗传特征

使用Qiagen一步RT-PCR试剂盒 (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) 对13株分离株的SP1基因的HVR进行常规PCR扩增, 正向引物IBV -S1 -F 5' - CACTGGTAATTTTCAGATGG - 3', 反向引物IBV -S1-R5' - CAGATTGCTTACAACCACC -3' [14], 使用QIA快速凝胶提取试剂盒 (Qiagen, GmbH, and Hilden, Germany) 对扩增产物进行纯化。使用上述引物, 通过Big Dye Terminator v3.1循环测序试剂盒 (Perkin, Elmer, Foster city, CA) 在应用生物系统基因分析仪3130 (美国ABI公司) 上进行测序。

埃及IBV的Sp1基因序列分析

用于本研究中分析比较的序列均来自于美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 传染性支气管炎病毒GenBank资源库 (<http://www.ncbi>)。使用DNASTAR软件计算序列同源性[15], 并通过Mega5构建核苷酸序列的系统发育树[16]。这项研究中使用的GenBank中的序列包括M41 (Acc no. HF674411), MA5 (Acc no. AY561713), H120 (Acc no. JN600610), Connecticut (Acc no. AF094818), CR/88 (Acc no. JN592567), QXIBV (Acc no. GQ253481), 4/91 (Acc no. AF093794), D41 (Acc no. AF036937), D274 (Acc no. X15832), 埃及-F -03 (Acc no. DQ987085), IR/4/2010-S1 (Acc no. JN792558), IBV-Su1/01/09-S1 (Acc no. GQ281656), IS/1366-Sp1 (Acc no. EU350550), IS/236-S1 (Acc no. AY135205), IBV -S1- 1494 (Acc no. HM131453) 和IS- 885 S1 (Acc no. AY279533)。

3 结果

3.1 现场样品传染性支气管炎病毒检测结果

共有205个养鸡场进行了IBV检测, 其中117个肉鸡场和13个蛋鸡场为阳性。Fayom, Ismailia 及 Benisuif省的阳性数最高。然而, 采用实时定量RT -PCR法检测发现Port-Said, North Sinai, Cairo以及 Aswan省的IBV检测结果均为阴性。肉鸡场的IBV阳性率高于蛋鸡场, 高达65.4%, 而蛋鸡养殖场为50%。如表2所示。



EGGS PROGRAM

表2 IBV检测结果

No.	省份	阳性数/总数		阳性数/总数 (阳性率%)
		肉鸡	蛋鸡	
1	Behara	3/5	0/0	3/5 (60%)
2	Dakahlia	6/16	2/3	8/19 (42.1%)
3	Fayoum	37/46	3/5	40/51 (78.4%)
4	Gharbia	2/3	0/0	2/3 (66.7%)
5	Monofia	3/7	0/0	3/7 (42.9%)
6	Qaluobia	12/20	0/1	12/21 (57.1%)
7	Sharkia	6/7	1/3	7/10 (70%)
8	Alexandria	3/4	1/4	4/8 (50%)
9	Aswan	0/1	0/0	0/1 (0%)
10	Beni-suef	9/12	4/5	13/17 (76.5%)
11	Cairo	0/1	0/0	0/1 (0%)
12	Damietta	5/10	1/2	6/12 (50%)
13	Giza	6/7	1/3	7/10 (70%)
14	Ismailia	15/18	0/0	15/18 (83.3%)
15	Kafr El-Sheikh	3/5	0/0	3/5 (60%)
16	Luxor	1/12	0/0	1/12 (8.3%)
17	Menia	2/2	0/0	2/2 (100%)
18	North Sinai	0/1	0/0	0/2 (0%)
19	Port Said	0/1	0/0	0/1 (0%)
总数		117/179 (65.4%)	13/26 (50%)	130/205 (63.4%)

3.2 病毒分离

在进行鸡胚接种盲传3代后，鉴定出13个阳性毒株。接种后的胚胎表现为蜷缩、矮小并伴有皮下出血，如图1所示。

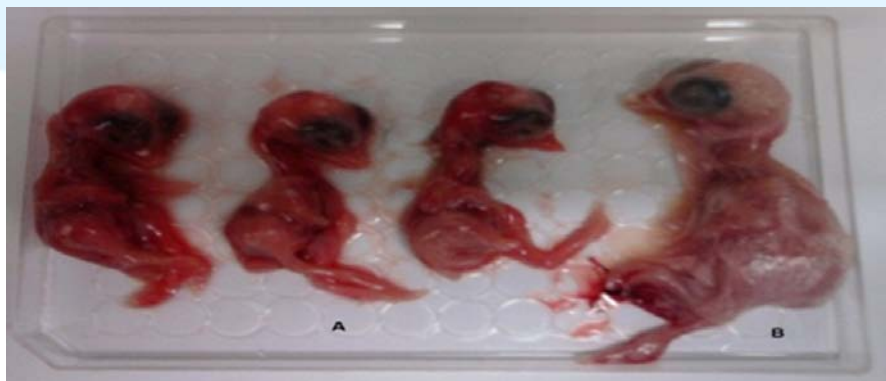


图1 胚胎病变 (A) 鸡胚蜷缩、矮小, (B) 正常



EGGS
PROGRAM

3.3 遗传分析结果

3.3.1 常规PCR结果

收集尿囊液并通过RT-PCR检测确认为IBV阳性，如图2所示。13个选定的毒株均出现特定的400 bp的SP1基因条带。

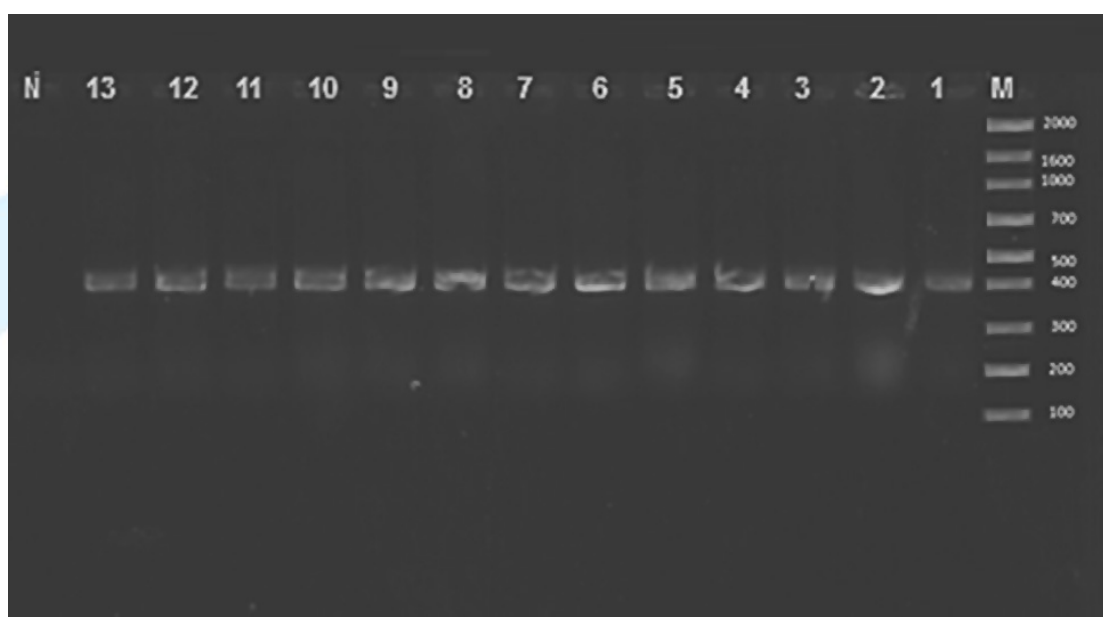


图2 SP1基因常规PCR检测电泳结果

3.3.2 核苷酸同源性

我们选择了6株分离株（表3-SP1基因遗传分析图中的15至20号）。有4株毒株（# 15，16，17，18）彼此之间的同源性介于96 %至100 %之间，与IS/885以色列病毒株的同源性约为89 %。而其余2株分离株（# 19，20）彼此之间的相似性高达97%，与CR88121和4/91毒株的同源性介于93 %至96%之间，同时这2株分离株与其他埃及病毒株（#15 - 18）的相似性较低，为77%。如表3所示。

表3 IBV分离株之间的同源性及差异性



EGGS PROGRAM

Divergence

我们对所选的13株埃及病毒株的SP1基因263-362位的100个氨基酸序列进行了遗传分析，表4显示，与Variant-2株相比，其SP1基因的高变区表现出多个点突变。第I群在该SP1基因高变区部分存在10个氨基酸位点替换，而II群显示出较高的遗传多样性，与以色列Variant-2毒株相比，他们存在15个氨基酸的替换。

Variant-2 ₁	S282 ₁	T285 ₁	V288 ₁	N289 ₁	I291 ₁	N292 ₁	I293 ₁	Q297 ₁	L298 ₁	S301 ₁	F308 ₁	Q318 ₁	K329 ₁	N331 ₁	T336 ₁	A351 ₁	L355 ₁
I群 ^(2,3)	H ₁	N ₁	·	H ₁	·	S ₁	L ₁	H ₁	T ₁	·	·	P ₁	Q ₁	D ₁	·	·	·
II群 ^(2,3)	A/T ₁	S ₁	I ₁	E ₁	F ₁	Q ₁	L ₁	R ₁	T ₁	D ₁	L ₁	P ₁	·	·	N ₁	T ₁	I ₁

b 类Variant1株 (疫苗株)

对13株选定的分离株进行了系统发育分析(图3),结果显示,本研究中的埃及病毒株可分为两个不同的群。第I群包含11株分离株,其中包括EG/1219F, EG/1226B, EG/12164B, EG/12105B, EG/1290B, EG/12249F, EG/1284B, EG/1267F, EG/12103B, EG/12177F和EG/1236B,第I群的分离株属于以色列IBV分离株(CIS/885株)。第II群包含两个分离株EG/1260B和EG/12150B,并与4/91株和CR/88121株存在密切的关系。



EGGS PROGRAM

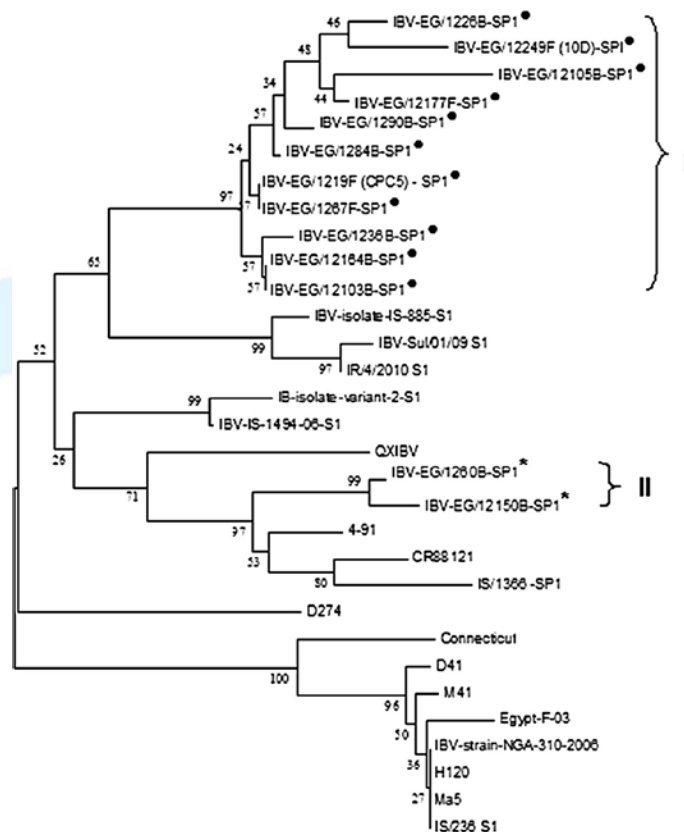


图3 SP1基因系统进化树。黑点 (.) 代表第I群的分离株，而星号 (*) 代表第II群的分离株。

4 讨论

在这项研究中，通过实时RT-PCR检测205个农场中IBV的流行情况，结果表明传染性支气管炎病毒广泛分布于埃及各地。在Beni-sueif, Ismailia 和Fayoum各省的阳性发病率最高（83 %，78 %和76 %）。肉鸡场的IBV阳性率高于蛋鸡场，高达65.4 %，而蛋鸡养殖场为50 %。

通常通过接种SPF鸡胚进行样品的病毒分离。不造成胚胎死亡或病变的样品为阴性，样品应在被定义为阴性之前进行连续3次盲传 [17, 18]。正如表1所示，有13株通过鸡胚成功分离的毒株。该13株分离株在第三次传代后表现出胚胎蜷缩和矮小。SP1基因序列分析对于IBV的基因分型十分重要。通过对SP1基因高变区(HVR)进行序列分析来对IBV进行鉴定和基因分型[13]。在本研究中，对13株分离株SP1基因的HVR片段进行了测序，并对其之间的相似性进行了比较（图3）。埃及分离株与其他来自周边国家如以色列的分离株IS/1494、variant-2以及IS/885的同源性在82 %至90 %之间。由于边境之间居民和走私活动不受控制，这一比较是十分重要的[19, 20]。

IB变异株(Delaware DE072)于1992年首次在美国报道 [21]，其S基因的S1片段与其他美国突变株之间的基因关联性很小；但它与荷兰突变株D1466存在联系。DE072造成的发病率增加导致了美国接种疫苗鸡群的重大疾病问题 [22]。

自20世纪50年代以来埃及已发现IBV突变株[23]，通过中和试验证明，其与荷兰突变株D3128存在密切的关系。



EGGS PROGRAM

之前已经报道了以色列Variant-2株和IS/1494/06株的出现及其SP1基因序列信息(GenBank登录号: EU780077) [24] 。据报道, IS/1494株是导致中东地区如以色列等地IBV感染的主要突变株, 并有可能导致火鸡的疾病[25] 。

目前, 在埃及为控制鸡群中的IBV, 已实施了以MA5和H120为基础的疫苗接种策略。另外近期的突变株疫苗CR/88和4/91株也已经可用于接种。然而, 尽管使用了不同的疫苗, 仍然存在IB疑似病例。还有报告指出, 尽管在肉鸡群中接种了H120疫苗, 仍然存在以色列变异株IS/1494/06 IBV导致的问题, 同时也证明了中东国家存在IS/1494/06突变株。另外, 在伊拉克邻国土耳其, 除IS/1494/06突变株之外, 还报道了一例由肾型IBV造成的疾病 [20] 。

在这项研究中, 13株埃及分离株的系统发育分析显示, 与其他突变株和经典毒株相比较, 可将埃及病毒株分为两群。11株分离株属于第I大群, 其余2株属于第II大群。如表1所示, 在埃及19个省广泛分布的流行毒株不受地域的限制。结果发现, 分离自Luxor, Menia, Sharkia 和 Fayuom省的分离株属于第I群, 从Beni-suif和 Qaluobia省分离的病毒属于第 I I 群。Sp1基因测序可以用来区分不同血清型的IBV。S1基因的多样性可能来自于突变、重组和体内阳性选择压力。IBV的纤突(S)糖蛋白的少量氨基酸变化便可能导致遗传变异株的产生[8]。1 3株埃及分离株的S1纤突蛋白基因高变区分析显示第 I 群属于以色列的IBV毒株 (IS/885), 第 I I 群的两株病毒则与突变株疫苗 (4/91 & CR/88) 有着密切的关系。

5 结论

在这项研究中, 2012年埃及流行的IBV毒株可分为两群。I群明显来自于IS/885的变异, II群更接近病毒疫苗变异株, 如4 /91和 CR/88121 , 这表明IBV在埃及是独立进化的, 以及在国内有多种变异株流行。为了研究病毒株与疫苗株之间的遗传关系, 对 I B V 流行株进行遗传特征的鉴定是非常关键的。这将指导我们选择最佳疫苗以及改进我们控制疫情的效果。