

林裕胜, 刘维巍, 张龙, 等. 2株鸡传染性支气管炎病毒株的分离鉴定及其 *SI* 基因遗传进化分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (11): 1388–1393.
LIN Y S, LIU W W, ZHANG L, et al. Isolation, Identification, and *SI* Gene Sequencing of Two Strains of Avian Infectious Bronchitis Virus [J].
Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2022, 37 (11): 1388–1393.

2株鸡传染性支气管炎病毒株的分离鉴定及其 *SI* 基因遗传进化分析

林裕胜¹, 刘维巍^{1,2}, 张 龙^{1,2}, 江锦秀¹, 张靖鹏¹, 刘庆华², 胡奇林^{1*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要:【目的】了解福建地区鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 的流行及其 *SI* 基因变异情况。【方法】对 2021 年在福建地区鸡群中分离的 2 株病毒, 通过鸡胚致病性试验、电子显微镜观察及 RT-PCR 方法进行鉴定。对 2 株分离株的 *SI* 基因进行克隆、测序并利用生物学软件进行分析。【结果】分离到的 2 株病毒均为 IBV, 分别命名为 FJ-NP01 和 FJ-FZ01; FJ-NP01 株和 FJ-FZ01 株的 *SI* 基因全长分别为 1629 nt 和 1620 nt, 编码 543 aa 和 540 aa。FJ-FZ01 株的 *SI* 基因裂解位点为 HRRRR, 与基因型 I 分支所有参考毒株裂解位点一致; 分离株 FJ-NP01 的 *SI* 基因裂解位点为 HRRKR, 与已报道的基因型 IV IBV 分离毒株的裂解位点不同, 与基因型 VI 参考毒株 TC07-2 的裂解位点一致。FJ-NP01 株和 FJ-FZ01 株之间的核苷酸和氨基酸同源性较低, 分别为 83.2% 和 79.6%; 与中国使用的 Mass 型常规疫苗 H120 和 H52 核苷酸和氨基酸序列同源性仅为 75.7%~76.3% 和 77.1%~83.5%。FJ-NP01 株是由基因型 IV 毒株 CK CH GD LZ12-4 与基因型 I 毒株 L-1148 在 *SI* 基因处发生重组而产生的新毒株, 其核苷酸序列 1438~1506 nt 与推测的亲本毒株 CK CH GD LZ12-4 同源性达 97%, 其他 *SI* 基因核苷酸序列与推测的亲本毒株 L-1148 同源性达 95.9%。【结论】以上结果表明福建地区 IBV 流行较为复杂, 现有 Mass 型疫苗在福建省可能起不到良好的免疫保护作用。

关键词: 鸡传染性支气管炎病毒; 分离; 鉴定; *SI* 基因; 序列分析

中图分类号: S 852.65

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 11-1388-06

Isolation, Identification, and *SI* Gene Sequencing of Two Strains of Avian Infectious Bronchitis Virus

LIN Yusheng¹, LIU Weiwei^{1,2}, ZHANG Long^{1,2}, JIANG Jinxiu¹, ZHANG Jingpeng¹, LIU Qinghua², HU Qilin^{1*}

(1. Institute of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China; 2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: 【Objective】Epidemiology and genetic variations of the infectious bronchitis virus (IBV) in Fujian province were studied. 【Method】Two strains of virus isolated from the diseased chickens in Fujian in 2021 were identified by chicken embryo pathogenicity test, electron microscope observation, and RT-PCR. *SI* genes of the isolates were cloned, sequenced, and analyzed using biological software. 【Result】The two IBV strains were code named FJ-NP01 and FJ-FZ01. The full length of *SI* of FJ-NP01 was 1629 nt encoding 543 amino acids, and that of FJ-FZ01, 1620 nt encoding 540 amino acids. The *SI* gene cleavage site of FJ-FZ01 was HRRRR, same as all reference strains of genotype I branch; while that of FJ-NP01 HRRKR differed from the reported site of IBV isolated from genotype IV but same as that of TC07-2 reference strain of genotype VI. The homology of nucleotide and amino acid between the two isolates was 83.2% and 79.6%, respectively, but merely 75.7%–76.3% and 77.1%–83.5% with the Mass-type conventional vaccines H120 and H52, respectively. Further analysis showed that FJ-NP01 was from a recombination event between CK CH GD LZ12-4 and L-1148, the homology of nucleotide acid between 1438–1506 nt

收稿日期: 2022-02-18 初稿; 2022-09-02 修改稿

作者简介: 林裕胜 (1988–), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: 369807285@qq.com)

共同第一作者: 刘维巍 (1999–), 男, 硕士, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: 2505155891@qq.com)

* 通信作者: 胡奇林 (1963–), 男, 硕士, 研究员, 主要从事动物传染病学和免疫学研究 (E-mail: hql562713@163.com)

基金项目: 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目 (XTCXGC2021008); 福建省科技计划公益类专项 (2021R1026007); 福建省自然科学基金项目 (2021J01484); 福建省农业科学院畜病防控科技创新团队建设项目 (CXTD2021007-2)

of FJ-NP01 with CK CH GD LZ12-4 was 97%, and 95.9% between the other nucleotide acid of *SI* gene with L-1148.

【Conclusion】 It appeared that the IBV epidemic experienced in the province was complex in nature and that the existing Mass vaccines would not provide sufficient immune protection to deter the spread.

Key words: Infectious bronchitis virus; isolation; identification; *SI* genes; sequence analysis

0 引言

【研究意义】鸡传染性支气管炎 (Infectious bronchitis, IB) 是由鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious bronchitis virus, IBV) 感染引起的一种急性、接触性传染病, 被世界兽医局列为禽病 B 类传染病^[1]。根据 IBV 对宿主组织的亲嗜性及引起的主要症状, 可将其划分为呼吸型、肾型和肠型等。IBV 基因型较多且不同类型毒株之间交叉免疫保护的能力弱, 导致该病的防控难度较大, 至今 IB 仍是妨碍世界养鸡业健康发展的主要疫病之一^[2-3]。【前人研究进展】IBV 基因组为不分节的单股正链 RNA, 全长约 27.6 kb, 囊括 6 种亚基因组 mRNA (1~6), 其中 mRNA2、mRNA3、mRNA4 和 mRNA6 分别编码 4 个结构蛋白: 纤突蛋白 (S)、小膜蛋白 (E)、膜蛋白 (M) 和核蛋白 (N)^[4-7]。S 蛋白与宿主细胞膜上的病毒受体结合后被宿主细胞的蛋白酶裂解为 N 端的 S1 蛋白和 C 端的 S2 蛋白^[4]。S1 蛋白是 IBV 产生感染性、致病性及组织嗜性的主要蛋白。不同 IBV 毒株间 *SI* 基因变异较大, 其编码的氨基酸差异在 2%~25%^[8-9]。由于 IBV 复制依赖的 RNA 聚合酶缺乏校正能力, 以及疫苗的频繁使用, 致使病毒在复制过程中容易发生变异或重组^[10-13]。*SI* 基因核苷酸序列的点突变、插入、缺失或重组是导致 IBV 基因型较多的主要原因, 国内外学者开展了许多基于 *SI* 基因的序列差异分析研究工作^[14-17]。国内外学者在 IBV 的病原学、流行与分布、分子遗传变异机制、IBV 诱导的天然免疫应答、体外培养、诊断技术和防控措施等方面都有深入研究。然而, 由于 IBV 自身变异频率高以及频繁地使用疫苗加剧了野毒株的变异压力, 导致病毒进化加快。因此, 对 IBV 的流行病学和分子遗传变异情况进行监测, 已成为有效防控 IBV 的重要组成部分。【本研究切入点】近年来, 福建省 IBV 流行发生频繁, 2021 年福建地区 IBV 的流行及变异情况亟需开展相关研究。【拟解决的关键问题】在福建地区疑似发生 IB 的临床样品中分离到 2 株病毒, 通过对鸡胚致病性试验、电镜观察以及 RT-PCR 进行鉴定确认分离到的 2 株病毒均为 IBV, 并进一步对 2 株 IBV 分离株的 *SI* 基因进行克隆、测序及序列分析, 以期对福建省

有效防控 IB 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 料来源、SPF 鸡胚及主要试剂

2021 年在福州市、南平市鸡场采集疑似 IB 病死鸡脏器组织样品。10 日龄 SPF 鸡胚购自广东大华动物保健品股份有限公司 SPF 实验动物中心; IBV 毒株由本研究室分离、鉴定及保存。核酸提取试剂盒 (EasyPure[®] viral DNA/RNA kit)、反转录试剂盒 (TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix)、克隆试剂盒 (pEASY[®]-Blunt Zero Cloning kit) 均购自北京全式金生物技术有限公司; DNA 纯化回收试剂盒 (TianGen·Universal DNA Purification kit) 购自天根生物技术有限公司; 高保真酶 (2 × CataAmp High Fidelity PCR Mix) 购自爱博泰克生物技术有限公司; DL2000 DNA Marker 购自大连宝生物有限公司。

1.2 引物设计

下载 GenBank 中收录的 IBV *SI* 全基因序列, 利用 Oligo7.0 软件设计 1 对特异性引物, 上游引物 S1F: 5'-ACTGAACAAAAGACCGACT-3'; 下游引物 S1R: 5'-GGCACTATCATCTTTAACGAAC-3', 扩增片段大小为 1 770 bp; IBV 鉴定引物参照参考文献 [17] 设计, 由福州尚亚生物技术有限公司合成。

1.3 样品处理

在生物安全柜中将组织剪碎, 每克组织加入 4 mL 无菌 PBS 溶液研磨; 加入 2000 UI·mL⁻¹ 青霉素和 2000 μg·mL⁻¹ 链霉素, 4 ℃ 作用 4 h, -70 ℃ 冰箱反复冻融 3 次, 6000 r·min⁻¹, 4 ℃ 离心 10 min, 取上清, 分装保存; 取部分上清, 平板划线, 37 ℃ 过夜培养, 确定有无细菌污染, 并将无细菌生长的样品冻存。

1.4 病毒分离与电镜鉴定

将 1.3 中上清经 0.22 μm 过滤器过滤后取 200 μL 接种于 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔中, 置于 37 ℃ 恒温培养箱中孵育。剔除 24 h 内死亡的鸡胚。收取 48~120 h 内死亡的鸡胚, 4 ℃ 冰箱静置 12 h 以上; 无菌收取尿囊液, 将收取的尿囊液在 SPF 鸡胚中盲传 4 代后进行 PCR 鉴定。取第 4 代 PCR 鉴定为阳性的鸡胚尿囊液 2 mL, 参照参考文献 [18] 处理, 电镜下观察病毒形态。

1.5 核酸提取和 RT-PCR 鉴定

按 EasyPure[®] viral DNA/RNA kit 说明书提取尿囊液中的核酸。按照 TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒的操作说明书对提取的 RNA 进行反转录, 反转录后的 cDNA 取 3 μL、2×CataAmp High Fidelity PCR Mix 10 μL, 上/下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, 无菌去离子水补足至 20 μL。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 热变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 15 s, 35 个循环; 72 ℃ 终延伸 7 min。反应结束后取 7 μL 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳条件为 125 V、25 min。

1.6 IBV 分离株 *S1* 基因克隆测序

提取盲传后第 4 代鸡胚尿囊液中的病毒总 RNA。参照 TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix 试剂盒的操作说明对 1.5 中提取的 RNA 进行反转录, 反转录后的 cDNA 取 3 μL、2×CataAmp High Fidelity PCR Mix 10 μL, S1F/S1R 引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, 无菌去离子水补足至 20 μL。反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 30 s, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。反应结束后取 7 μL 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 电泳条件为 125 V、25 min。PCR 产物回收纯化后连接于 pEASY[®]-Blunt Zero 克隆载体上并转化至 Trans1-T1 感受态细胞中, 经菌落 PCR 检测阳性的单个菌落进行扩繁并提取质粒, 阳性质粒送往福州尚亚生物技术有限公司进行测序。

1.7 IBV 分离株 *S1* 基因序列分析

利用 DNASTar Lasergene 7 软件对 2 株 IBV 分离株的 *S1* 基因测序结果进行拼接并上传至 GenBank 数据库。采用 MEGA7.0 软件对 2 株分离株的 *S1* 基因与 GenBank 数据库收录的有代表性的 37 株 IBV 参考株 (表 1) 的 *S1* 基因序列进行比对分析, 构建 *S1* 基因的遗传进化树。使用 SimPlot3.5.1 和 RDP4.101 软件进行分离株 *S1* 基因遗传重组分析。

2 结果与分析

2.1 病毒分离鉴定结果

10 日龄 SPF 鸡胚接种 2 种病料研磨液后, 鸡胚陆续出现死亡。与对照组相比, 接种组表现发育不良、胚体蜷曲、弥漫性出血 (图 1)。分离株 4 代 SPF 鸡胚尿囊液经 1% 磷钨酸负染后电镜下可见直径约 80~120 nm、略呈圆形的病毒粒子, 表面有松散的冠状突起, 与冠状病毒特有的形态学特征相一致 (图 2)。通过 RT-PCR 对 4 代鸡胚尿囊液进行检测, 结果扩增出大小约 800 bp 的目的片段, 而阴性

表 1 IBV 参考毒株
Table 1 IBV reference strains

毒株 Virus	登录号 Locus	毒株 Virus	登录号 Locus
Ma5	AY561713	ZJ971	AF352313
H120	FJ888351	L-1 148	DQ431199
LDT3	AY702975	A2	AY043312
4/91	KF377577	LX4	AY338732
H52	EU817497	HB08	GQ265934
28/86	AY846750	HN08	GQ265940
M41	DQ834384	CK/CH/GD/HY09	HQ018887
G13-1	L14069	CK/CH/HN/HN09	HQ018886
Holte	L18988	CKCHJSLYG1911-8	MW044574
UK/7/93	Z83979	CKCHJSLYG1911-10	MW044575
Italy-02	AJ457137	CKCHJSLYG1911-11	MW044583
TW2575/98	DQ646405	CK/CH/LGX/091109	KF411041
3468/07	EU822336	CK/CH/LDL/07II	EU563940
JP9758	AY296746	X	FJ8298882
TA03	AY837465	CK/CH/LCQ/08II	GQ258305
GX-NN-6	JX291985	ck/CH/LGX/091110	HM194643
TC07-2	GQ265948	CKCHJSLYG1912-1	MW044590
PSH050513	DQ160004	CK CH GD LZ12-4	KC692277
QXIBV	AF193423		



图 1 培养 3 d 病变胚 (A) 和培养 7 d 对照胚 (B)
Fig. 1 Chicken embryos with lesion (A) and control (B)

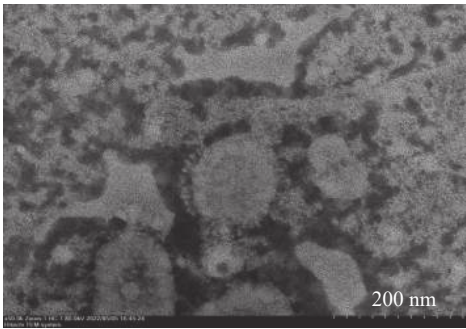


图 2 病毒粒子形态电镜观察
Fig. 2 Morphology of virus under electron microscope

对照无特异性扩增片段 (图 3)。将 2 株分离株分别命名为 FJ-NP01 (南平) 和 FJ-FZ01 (福州)。

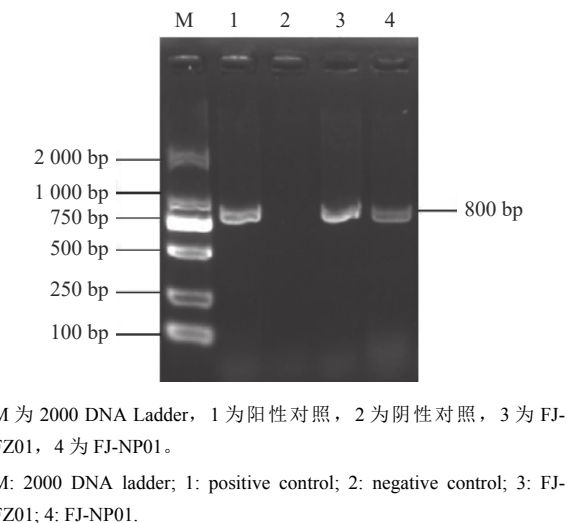


图 3 分离株的鉴定

Fig. 3 Identification of isolates

2.2 IBV 分离株 *S*I 基因克隆测序

利用设计引物对 2 株 IBV 分离株的 *S*I 基因进行扩增, 并设置阴、阳性对照。从图 4 中可见, 在 1 700 bp 左右出现与预期目的条带大小相符的片段。对经 PCR 鉴定为阳性的质粒送往测序公司进行测序, 序列拼接显示 FJ-NP01 株和 FJ-FZ01 株 *S*I 基因长度分别为 1 629 nt 和 1 620 nt, 分别编码 543 aa 和 540 aa。FJ-NP01 株和 FJ-FZ01 株 *S*I 基因序列提交至 GenBank, 获得的登录号分别为 ON548486 和 ON548487。

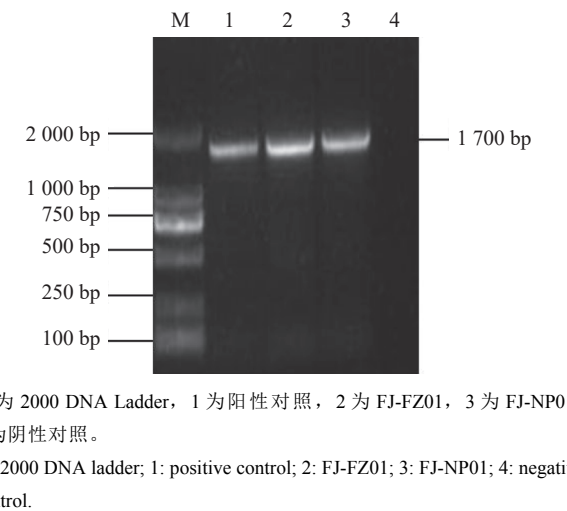


图 4 2 株分离株 *S*I 基因 RT-PCR 扩增电泳图

Fig. 4 RT-PCR amplification electrophoresis of *S*I of two isolates

2.3 IBV 分离株 *S*I 基因遗传进化、同源性及裂解位点分析

将分离株序列与 GeneBank 中下载的 37 株 IBV *S*I 基因参考序列, 利用 MEGA7 软件绘制 *S*I 基因的系统进化树。结果显示: FJ-NP01 株和 FJ-FZ01 株与所有参考毒株共同形成 8 个不同的进化分支; 其中

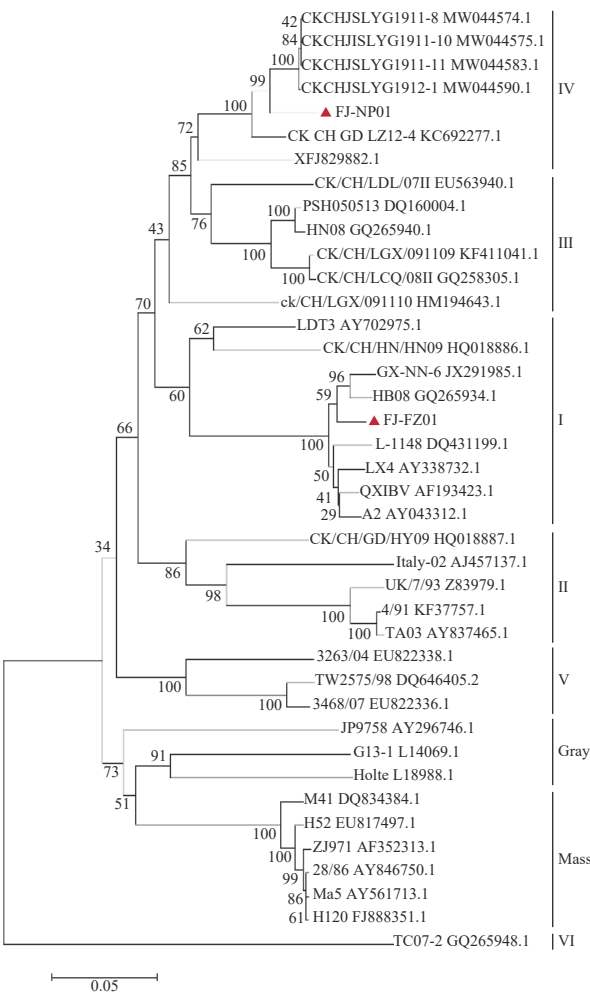


图 5 IBV 分离株与参考毒株 *S*I 基因进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on *S*I from IBV isolates and reference strains

FJ-FZ01 株与 QXIBV 为代表的基因型 I 在同一进化分支中; 分离株 FJ-NP01 在基因型 IV 进化分支中; 2 株分离株与国内常用 Mass 型疫苗株进化距离均较远 (图 5)。核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性比对分析结果显示, 2 株分离株间的核苷酸和氨基酸同源性较低, 分别为 83.2% 和 79.6%; FJ-FZ01 株与基因型 I 分支的所有参考毒株间核苷酸和氨基酸同源性分别为 91.9%~98.1% 和 94.5%~95.6%; FJ-NP01 株与基因型 IV 分支的所有参考株核苷酸和氨基酸同源性分别为 94.3%~95.7% 和 92.5%~94.7%; 2 株分离株与我国使用的 Mass 型常规疫苗核苷酸和氨基酸序列同源性仅为 75.7%~76.3% 和 77.1%~83.5%。推导的氨基酸序列显示, FJ-FZ01 株 *S*I 基因裂解位点为 HRRRRR, 与基因型 I 分支所有参考毒株裂解位点一致; FJ-NP01 株 *S*I 基因裂解位点为 HRRKR, 与已报道的基因型 IV 的 IBV 分离毒株的裂解位点不同, 与基因型 VI 参考毒株 TC07-2 的裂解位点一致。

2.4 IBV 分离株 *S*I 基因重组分析

利用 SimPlot 3.5.1 软件对 2 株分离株的 *S*I 基因

序列进行重组分析，发现 FJ-NP01 株用 SimPlot 和 BootScan 方法分析均可推测亲本毒株 CK CH GD LZ12-4 和 L-1148 出现交叉，预示可能存在基因重组。利用 RDP 4.101 软件对重组事件进行验证，结果显示 FJ-NP01 株是由基因型Ⅳ毒株 CK CH GD LZ12-4 与基因型Ⅰ毒株 L-1148 在 *SI* 基因处发生重组而产

生的新毒株，其核苷酸序列 1438~1506 nt 与推测的亲本毒株 CK CH GD LZ12-4 同源性达 97%，其他 *SI* 基因核苷酸序列与推测的亲本毒株 L-1148 同源性达 95.9%，RDP 4.101 软件分析计算的 *P* 值为 6.974×10^{-8} （表 2）。

表 2 RDP 4.101 软件分析 IBV 分离株的 *SI* 基因遗传重组结果
Table 2 Recombinant results of *SI* of IBV isolate analyzed by RDP 4.101 software

重组 Recombinant		破裂点 Break points		主要亲本 Major parent			次要亲本 Minor parent			<i>P</i> 值 <i>P</i> value
毒株 Strain	基因型 Genotype	头端 Begin/nt	末端 End/nt	命名 Name	基因型 Genotype	同源性 Homology/%	命名 Name	基因型 Genotype	同源性 Homology/%	
FJ-NP01	Ⅳ	1438	1506	CK CH GD LZ12-4	Ⅳ	97%	L-1148	Ⅰ	95.9	6.974×10^{-8}

3 讨论

自 1931 年美国学者 Schalk 和 Hawn 首次报道 IB 以来，该病至今仍是影响世界家禽养殖业发展的重要传染性疾病之一^[14]。究其原因乃是 IBV 出现了越来越多的基因型变异株，以及弱毒苗的广泛使用在某种程度上加快了病毒本身的变异，导致该病的防控难度日益加大，不可否认的是疫苗在控制 IB 的发生中发挥着重要作用，然而随着变异株的不断出现，研制出安全、高效、广谱的疫苗则是今后科研工作者的重要研究方向。

本研究从福建地区疑似发生 IB 的鸡场中分离到了 2 株病毒，通过电镜观察和 RT-PCR 方法进行了鉴定，确认分离到的病毒均为 IBV，分别命名为 FJ-NP01 和 FJ-FZ01；进一步分析发现 FJ-NP01 株属于基因型Ⅳ，FJ-FZ01 株属于基因型Ⅰ。

SI 基因是当前研究 IBV 遗传变异与进化分析的靶标基因，通过分析 *SI* 基因序列有助于监测 IBV 的流行态势^[16]。本研究通过对 FJ-FZ01 株和 FJ-NP01 株 *SI* 基因进行克隆测序分析；系统进化树分析表明 FJ-FZ01 株属于基因型Ⅰ，与位于同一分支的参考毒株相比，核苷酸序列及其推导的氨基酸序列同源性极高，分别在 91.9%~98.1% 和 94.5%~95.6%，且具有典型 HRRRR 裂解位点特征。基因型Ⅰ毒株是我国 IBV 主要流行毒株，据统计 50%~60% 的 IB 病例由基因型Ⅰ引起。李彬等^[16]对 2019–2021 年我国 29 个省级行政区 IBV 分型统计结果显示，基因型Ⅰ仍然是主要流行的毒株，且有不断扩大的趋势。Feng 等^[5]报道对中国 2011–2012 年华南地区分离的 62 株 IBV 有 32 株属于基因型Ⅰ。本研究分离的 FJ-FZ01 株亦属

于基因型Ⅰ，与国内主要流行毒株一致。然而，基因型Ⅰ毒株与现有 Mass 型疫苗株的亲缘关系较远，导致 Mass 型疫苗不能对基因型Ⅰ毒株提供完全保护。基因重组是导致众多 IBV 变异毒株出现的原因之一，重组可发生在疫苗株之间、疫苗毒株与野毒株之间及野毒株之间^[3]。陈彤等^[19]对合肥分离株 CK/CH/GX/LC17-1 的 *SI* 基因重组分析发现，该毒株是由疫苗株 Ark 型 ArkDPI 毒株与 Mass 型 Ma5 毒株 *SI* 基因发生了重组形成的新毒株。吴倩倩等^[20]对河南 IBV 分离株 CK/CH/HN/NY1206/2017、CK/CH/HN/XY911/2017 进行重组分析，发现 2 株分离毒株均是由 4/91（CHⅡ）基因型毒株 LZ07 和 JP/Saitama/2006 重组产生的新毒株。本研究通过 SimPlot 和 RDP 软件对 FJ-NP01 株的 *SI* 基因序列进行遗传重组分析，发现 FJ-NP01 株是由基因型Ⅳ毒株 CK CH GD LZ12-4 与基因型Ⅰ毒株 L-1148 在 *SI* 基因处发生重组而产生的新毒株，其核苷酸序列 1438~1506 nt，与推测的亲本毒株 CK CH GD LZ12-4 同源性达 97.0%，其他 *SI* 基因核苷酸序列与推测的亲本毒株 L-1148 同源性达 95.9%，这类重组变异株在福建地区尚无相关报道。另外，本研究发现重组变异株 FJ-NP01 *SI* 基因裂解位点为 HRRKR，与已报道的基因型Ⅳ分离毒株的裂解位点不同，与基因型Ⅵ参考毒株 TC07-2 的裂解位点一致。因此，后续需进一步进行验证 FJ-NP01 株是否因为基因重组和裂解位点的改变，导致其毒力、致病性和组织嗜性等发生改变。

综上所述，本研究分离鉴定了 2 株 IBV，通过对 *SI* 基因克隆测序分析结果显示，FJ-FZ01 株与国内流行毒株一样，FJ-NP01 株发生了重组变异，表明福建地区 IBV 流行较为复杂，现有 Mass 型疫苗在福

建省可能起不到良好的免疫保护作用。因此, 需加强对福建省 IBV 的流行病学监测, 为新疫苗的研发提供参考资源, 也为福建省 IB 防控提供科学依据。

参考文献:

- [1] REN M T, SHENG J, MA T, et al. Molecular and biological characteristics of the infectious bronchitis virus TC07-2/GVI-1 lineage isolated in China [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 75: 103942.
- [2] REN M T, ZHANG L L, HOU Y T, et al. Genetic, antigenic, and pathogenic characteristics of infectious bronchitis virus GI-7/TW-II in China [J]. *Avian Diseases*, 2020, 64 (2): 183–196.
- [3] XU L W, HAN Z, JIANG L, et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus in China in recent years [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 66: 82–94.
- [4] REN G C, LIU F, HUANG M R, et al. Pathogenicity of a QX-like avian infectious bronchitis virus isolated in China [J]. *Poultry Science*, 2020, 99 (1): 111–118.
- [5] FENG J L, HU Y X, MA Z J, et al. Virulent avian infectious bronchitis virus, People's republic of China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18 (12): 1994–2001.
- [6] BICKERTON E, MAIER H J, STEVENSON-LEGGETT P, et al. The S2 subunit of infectious bronchitis virus beaudette is a determinant of cellular tropism [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(19): e01044–e01018.
- [7] ZHANG Y, XU Z C, CAO Y C. Host antiviral responses against avian infectious bronchitis virus (IBV): Focus on innate immunity [J]. *Viruses*, 2021, 13 (9): 1698.
- [8] QUINTEROS J A, IGNJATOVIC J, CHOUSALKAR K K, et al. Infectious bronchitis virus in Australia: A model of coronavirus evolution - a review [J]. *Avian Pathology*, 2021, 50 (4): 295–310.
- [9] MA T X, XU L, REN M, et al. Novel genotype of infectious bronchitis virus isolated in China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 230: 178–186.
- [10] MANSWR B, BALL C, FORRESTER A, et al. Immunopathogenesis of infectious bronchitis virus Q1 in specific pathogen free chicks [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104535.
- [11] HUANG M J, LIU Y, ZOU C, et al. A highly pathogenic recombinant infectious bronchitis virus with adaptability in cultured cells [J]. *Virus Research*, 2021, 292: 198229.
- [12] VAN BORM S, STEENSELS M, MATHIJS E, et al. Metagenomic sequencing determines complete infectious bronchitis virus (avian *Gammacoronavirus*) vaccine strain genomes and associated viromes in chicken clinical samples [J]. *Virus Genes*, 2021, 57 (6): 529–540.
- [13] LACONI A, WEERTS EAWS, BLOODGOOD JCG, et al. Attenuated live infectious bronchitis virus QX vaccine disseminates slowly to target organs distant from the site of inoculation [J]. *Vaccine*, 2020, 38 (6): 1486–1493.
- [14] MOHARAM I, SULTAN H, HASSAN K, et al. Emerging infectious bronchitis virus (IBV) in Egypt: Evidence for an evolutionary advantage of a new S1 variant with a unique gene 3ab constellation [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 85: 104433.
- [15] 雍璐, 吕迪, 范文胜, 等. 台湾型传染性支气管炎病毒重组株的分离鉴定及S1基因序列和血清型分析 [J]. *中国家禽*, 2022, 44 (4): 29–35.
- YONG L, LYU D, FAN W S, et al. Isolation and identification of Taiwan genotype avian infectious bronchitis virus recombinant strain and analysis of its S1 gene sequence and serotype [J]. *China Poultry*, 2022, 44 (4): 29–35. (in Chinese)
- [16] 李彬, 韩晓青, 刘红祥, 等. 2019—2021年我国29个省级行政区鸡传染性支气管炎流行病学调查 [J]. *中国动物检疫*, 2022, 39 (4): 19–25.
- LI B, HAN X Q, LIU H X, et al. Epidemiological investigation on avian infectious bronchitis in 29 provincial administrative regions of China from 2019 to 2021 [J]. *China Animal Health Inspection*, 2022, 39 (4): 19–25. (in Chinese)
- [17] 何家辉, 封柯宇, 李鸿鑫, 等. 2株鸡传染性支气管炎病毒的分离鉴定与S1、M和N基因序列分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57 (1): 10–14.
- HE J H, FENG K Y, LI H X, et al. Isolation, identification and S1, M and N gene sequence analysis of two strains of avian infectious bronchitis virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2021, 57 (1): 10–14. (in Chinese)
- [18] 闫芳, 岳文斌, 刘娟, 等. 鸡传染性支气管炎病毒地方流行株的分离与鉴定 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29 (7): 845–848.
- YAN F, YUE W B, LIU J, et al. Isolation and biological properties of avian infectious bronchitis virus isolated from Shanxi Province [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2009, 29 (7): 845–848. (in Chinese)
- [19] 陈彤, 刘金, 封柯宇, 等. 2016—2017年广西鸡传染性支气管炎病毒S1基因进化分析 [J]. *中国家禽*, 2019, 41 (12): 22–25.
- CHEN T, LIU J, FENG K Y, et al. Phylogenetic analysis of S1 gene of avian infectious bronchitis virus isolated from Guangxi during 2016 to 2017 [J]. *China Poultry*, 2019, 41 (12): 22–25. (in Chinese)
- [20] 吴倩倩, 许鑫, 陈钦玺, 等. 3株传染性支气管炎病毒蛋鸡源河南株的S1基因序列分析 [J]. *河南农业科学*, 2019, 48 (6): 123–130.
- WU Q Q, XU X, CHEN Q X, et al. Sequence analysis of S1 gene of three avian infectious bronchitis virus strains isolated from layer of Henan Province [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48 (6): 123–130. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)