

I 群禽腺病毒检测方法研究进展

殷国政, 段世豪, 司振书*, 李玉保 (聊城大学农学院, 山东聊城 252000)

摘要 I群禽腺病毒感染可引起鸡的包涵体肝炎(IBH)或包涵体肝炎心包积液综合症(HHS)等疫病,该病毒分布广泛。近年来,我国鸡群发生IBH和HHS的病例较多,严重危害我国养禽业的健康发展,造成巨大的经济损失。综述I群禽腺病毒的分离培养、形态学检测、血清学检测及分子生物学检测方法,以对I群禽腺病毒感染进行有效防控。

关键词 I群禽腺病毒;分离培养;诊断

中图分类号 S852.65⁺7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)30-0021-03

Research Progress of Detection Method of Fowl Adenoviruses Group I

YIN Guo-zheng, DUAN Shi-hao, SI Zhen-shu et al (Institute of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000)

Abstract Fowl adenovirus group I is widely distributed, which can cause inclusion body hepatitis (IBH), hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS) in chicken. In recent years, there are many cases of IBH and HHS in chickens in China, which has seriously damaged to the healthy development of China's poultry industry and caused huge economic losses. The virus isolation and culture, morphological detection, serological detection and molecular biological detection methods of fowl adenovirus group I were reviewed to control it effectively.

Key words Fowl adenovirus group I; Isolation and culture; Diagnosis

I群禽腺病毒(Fowl adenovirus group I, FAV-I)属于腺病毒科禽腺病毒属,在禽群中分布广泛。I群禽腺病毒具有共同的群抗原,其根据分子结构可将血清型分为A、B、C、D、E 5个种,基于交叉中和试验和限制性内切酶酶切分析,又分为A(血清1型)、B(血清5型)、C(血清4、10型)、D(血清2、3、9、11型)、E(血清6、7、8a、8b型)等12个血清型^[1]。其中,鸡腺病毒1型,又名鸡胚致死孤儿病毒(chicken embryo lethal orphan virus, CELO),引致鹌鹑支气管炎;鸡腺病毒4型,可引起鸡心包积液与包涵体肝炎综合征(hepatitis-hydropericardium syndrome, HHS);鸡腺病毒8型,可引致鸡包涵体肝炎(inclusion body hepatitis, IBH)。I群禽腺病毒通过候鸟水禽等传播于世界各地,难以控制,并且可以与其他病毒混合感染,给养禽业造成严重的经济损失。综述国内外I群禽腺病毒的分离培养、形态学检测、血清学检测及分子生物学检测方法,以促进对该类病毒感染进行及时确诊和有效防控。

1 病毒的分离培养

对该病毒进行分离培养,可采取家禽的肝脏等组织、口腔拭子或泄殖腔拭子,处理后接种鸡胚或细胞。

1.1 鸡胚培养 禽腺病毒的培养方法主要有鸡胚培养和细胞培养2种,鸡胚培养通过将处理好的病料组织研磨液,接种到9~11日龄SPF鸡胚的卵黄囊、尿囊膜和尿囊腔中,进行增殖培养;邱丽叶等^[2]将FAV分别接种到SPF鸡胚的卵黄囊、尿囊膜和尿囊腔中,并利用荧光定量PCR方法测定鸡胚组织中FAV的病毒含量,结果发现不同接种途径对FAV在肝脏、尿囊膜和尿囊液中的病毒增殖情况影响较大,其中经卵黄囊途径接种的SPF鸡胚,FAV增殖能力最强。

1.2 细胞培养 细胞培养是通过将FAV接种到原代肾细胞或鸡肝癌细胞中,待细胞变性、形态变圆、脱落,当细胞核内出现明显的包涵体等细胞病变时,将细胞液回收备用^[3]。赵莉等^[4]用不同浓度的血清培养细胞,并以不同接种比例传代。对最佳感染复数下的细胞病变和病毒增殖情况以及病毒接种浓度与蚀斑形成数量之间的关系进行研究。确定了鸡肝癌细胞的最佳培养条件:采用10%FBS的培养基,以1:5比例传代培养;病毒的接种浓度可以直接影响蚀斑形成数量,并且呈线性相关关系,所以鸡肝癌细胞适合腺病毒培养。周斌等^[5]分别用鸡胚成纤维细胞和鸡胚肾细胞培养禽腺病毒江苏分离株,发现鸡胚成纤维细胞接种病毒后没有出现病变。鸡胚肾细胞感染病毒后则表现出很强的聚集性,细胞呈团状或束状、脱落等标志性病变。

2 病毒形态学检测

在鸡胚传代培养中选择有明显病变的鸡胚进行取料,研磨,冻融离心(3 000 r/min, 20 min),收取上清液,放置在铜网上用2%磷钨酸负染,再置于透射电镜下观察,观察到球形、无囊膜、呈二十面体对称的典型腺病毒,直径70~80 nm,可判定为阳性感染^[6];或取尿囊液,先离心(10 000 r/min, 10 min)取上清,再离心(13 000 r/min, 1 h)去上清,留取100 μL悬浊液,混匀后再使用磷钨酸染色,吸干液体,利用透射电镜观察病毒形态结构是否符合腺病毒病原特征^[7]。

3 血清学检测

3.1 病毒中和试验 中和试验是一种以测定病毒的感染性为基础的特异性和敏感性都很高的血清学检测方法,在外界环境下,病毒可以和相应的特异性抗体结合,从而失去其感染能力。Calnek等^[8]通过对FAV不同血清型毒株进行中和和试验研究,根据不同血清型的敏感性不同,建立一种可以准确测定I群禽腺病毒的血清学检测方法。

3.2 琼脂凝胶沉淀试验 琼脂凝胶沉淀试验(agar gel precipitation, AGPT)在禽腺病毒抗体的检测试验中被广泛应用,这种检测方法成本低,并且非常便捷,但是相较于其他检测

基金项目 山东省自然科学基金项目(ZR2016CM40);聊城大学博士启动基金项目(318051310);聊城大学实验技术研究项目(LDSY2014046);聊城大学科研基金项目(318011503)。

作者简介 殷国政(1991—),男,山东东阿人,硕士研究生,研究方向:家禽疫病诊断与防控技术。*通讯作者,副教授,博士,从事预防兽医学研究。

收稿日期 2018-06-09

方法其敏感性较低,通常在琼脂凝胶扩散时,禽腺病毒的抗原和抗体需孵育 2~3 d,才会出现沉淀线^[9]。AGPT 对多种血清型混合感染的商品鸡的腺病毒检测比较敏感,但对 SPF 鸡群感染的腺病毒的敏感性较低^[10]。国纪垒等^[11]采用双向琼脂扩散试验,对分离毒株进行血清学鉴定。4 株病毒均与阳性血清出现沉淀线。智海东等^[12]使用禽腺病毒 I 型 CELOV 株研制琼脂扩散的标准抗原,通过检测该抗原的效价和特异性,并对试验感染鸡抗体的变化以及现有血清样本进行检测。结果表明,该抗原特异性高,不与其他病毒阳性血清反应,而且可与 1:8 稀释的禽腺病毒 I 型阳性血清反应。

3.3 酶联免疫吸附试验 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immuno sorbent assay,ELISA)技术可以对 FAV I 抗体进行精确测定,能更确切地反映病毒感染鸡群的情况。ELISA 技术原理是先将抗原或抗体置于酶标板上,使其与酶标板底部固定物结合,并保持活性,然后再加入抗体或抗原使其结合,形成抗原抗体复合物,再用酶标记的第二抗原与其结合,形成具有免疫学活性和酶的活性的复合物,加入可以与酶产生带色产物的底物,使其显色。产物的量与颜色呈正相关,因此,可以根据产物的颜色及酶标仪的测定结果对受检样品进行定性或定量分析。Calnek 等^[8]通过纯化 10 个不同血清型毒株,制作包被抗原,建立 ELISA 方法检测禽腺病毒抗体。Dawson 等^[13]建立能够快速检测出自然感染的 FAV-I 抗体及 CELO 株抗体的 ELISA 方法。Saifuddin 等^[14]建立可以检测出感染低于 100 TCID₅₀/mL 的 FAd 病毒的组织或血液中抗原的 ELISA 方法,文艳玲^[15]将 Hexon 表达的抗原蛋白作为包被抗原,建立检测 FAV-I 抗体的间接 ELISA 方法,其对免疫的 SPF 及血清中的抗体敏感性很高。Marek 等^[16]运用六邻体表达的重组蛋白作为包被抗原,建立了一种检测 FAdV 的 ELISA 方法和斑点 ELISA 方法,该 ELISA 方法阳性检出率良好。罗思思等^[1]用五邻体表达且纯化的重组原核蛋白作为包被抗原,建立了一种快速检测 FAV-I 抗体的间接 ELISA 方法。

4 分子生物学检测

4.1 聚合酶链式反应 聚合酶链式反应(polymerase chain Reaction,PCR)是一种利用 PCR 仪扩增特定 DNA 片段的一种分子生物学技术。谢芝勋^[17]建立对 3 个群的 FAVI 检测的 PCR 方法,该方法的敏感性为 100 ng;Raue 等^[18]在保守区利用根据 hexon 基因的 4 个变异区设计了特异性引物 H1/H2 和 H3/H4,PCR 扩增了 FAVI 的 12 个血清型的病毒 DNA,均扩出目的片段,但是不能从 EDS 和 HEV 的病毒 DNA 中扩出任何片段;Xie 等^[19]建立了对 3 个群 16 个不同血清型毒株检测的 PCR 方法,敏感性是 100 ng,并对 21 个野毒分离株进行检测,利用分子杂交技术来提高检测的敏感性;李天芝等^[20]根据 Gen Bank 收录的 I 群禽腺病毒的 hexon 基因保守序列,设计引物,并建立检测 I 群禽腺病毒 PCR 方法,然后对它的特异性、敏感性进行研究,对 I 群禽腺病毒检测的灵敏性为 1 pg 总 DNA 量。

4.2 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 是在 PCR 的

反应基础上加入荧光探针或荧光染料,利用产生的荧光信号实时监测整个 PCR 扩增过程,最后通过建立的标准曲线对监测模板进行定量或定性分析的分子生物学技术。文艳玲等^[21]利用的 I 群禽腺病毒的 hexon 基因保守序列设计了引物,并根据不同血清型毒株的保守序列不同建立检测 I 群禽腺病毒 12 个血清型的 SYBR Green I 荧光 PCR 方法;Marek 等^[16]为了对一株 I 群禽腺病毒进行鉴定分析,利用系统进化分析法和 hexon 基因 L1 区的高通量溶解曲线成功鉴定了这株腺病毒;Steer 等^[22]根据 I 群禽腺病毒的 12 个血清型的 hexon 基因进行高通量溶解曲线成功对不同血清型腺病毒进行鉴定。

4.3 限制性片段长度多态性聚合酶链反应技术 限制性片段长度多态性聚合酶链反应(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism,PCR-RFLP)技术,其基本原理是用设计的特异性 PCR 引物扩增出目的基因,再利用不同等位基因的酶切位点分布不同,用限制性内切酶将扩增的 PCR 片段切割成大小不同的多个片段,再用琼脂糖凝胶电泳进行观察。I 群禽腺病毒有 12 个血清型,各血清型的基因组酶切位点不同,因此可利用此方法对其进行区分。Meulemans 等^[23]设计的 hexonA/hexonB 引物,利用 PCR 扩增出了 12 个血清型参考毒株的对应片段,并结合限制性内切核酸酶分析 26 株分离株的血清型;李海英等^[24]利用 3 对基于 Hexon 全基因序列设计合成的引物分别对 I 群禽腺病毒的 12 种血清型毒株进行 PCR 扩增,通过限制性内切酶 Hae II 对扩增产物进行酶切,并进行序列测定和 PCR-RFLP 分析,最后通过琼脂糖凝胶电泳成功区分出 12 个不同的血清型。唐熠等^[25]设计合成了一对根据 I 群禽腺病毒的 Hexon 保守基因序列的引物,通过对 12 种血清型的 Hexon 基因进行 PCR 扩增,并使用酶切技术可以对 I 群禽腺病毒的 12 个血清型进行分型。

4.4 环介导等温核酸扩增技术 环介导等温核酸扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),是日本学者 Notomi 在 2000 年发明的一项恒温核酸扩增新技术,该方法可通过肉眼(能否观察到白色混浊沉淀判定)或在紫外线下(产物中加入 SYBR Green I 染料)判定结果。该检测方法仅需一个水浴锅即可完成反应,简单快速,适合在现场与基层部门应用。唐熠等^[26]根据 I 群禽腺病毒 hexon 基因保守区序列设计了一对特异性环介导等温扩增引物,并建立一种敏感性可达 101copies/pL 适用于 I 群禽腺病毒的 LAMP 快速检测方法。通过对建立的 LAMP 方法与常规 PCR 方法进行效果对比,检出率分别为 58.3% 和 37.5%。表明其建立的 LAMP 方法更加简捷、灵敏、特异性高,适用于 I 群禽腺病毒感染的快速诊断。

4.5 核酸探针技术 核酸探针技术是根据碱基的互补配对的原则,用已知的带有标记核酸序列与被检测的目的序列互补结合,通过监测标记信号来检测目的基因。该方法特异性强,重复性高。董婷婷^[27]制备了地高辛标记的 I 群禽腺病毒血清 1、2、4、8 和 12 型的核酸探针,而且之间无交叉反应,并

应用于临床样本检测。检测结果发现,临床上血清 2 型、4 型和 8 型较为多发。朱后顺^[28]利用地高辛作为标记物,制备 I 群禽腺病毒核酸探针,临床样本进行检测发现该探针能检测出最低 1pg 的病毒,敏感性很高。王凤龙等^[29]用限制酶 *Hind*III 和 *Eco* RI 对鸡包涵体肝炎六邻体蛋白基因片段重组质粒进行双酶切,得到 636 bp 基因片段的重组质粒,用地高辛标记制备了鸡包涵体肝炎病毒 DNA 探针。试验表明该探针对该腺病毒具有良好的灵敏度和特异性,可用于鸡包涵体肝炎病毒的分子病理学研究和特异性诊断。

5 结语

近几年,由 I 群禽腺病毒引起的鸡包涵体肝炎及心包积液综合征对我国养禽业造成很大危害,涉及山东、河南、河北、江苏、湖北、海南、广西等多个省市,不同品种、日龄的鸡群均有报道。I 群禽腺病毒有些毒株易与鸡传染性法氏囊病毒、传染性贫血病毒及 H9 亚型禽流感病毒混合感染,危害严重。目前,在禽腺病毒的流行病学和诊断方面的研究虽已取得较大进展,但在研发特异性高、敏感性强的快速诊断方法以及高效疫苗等重要领域还需更加深入地研究。

参考文献

- [1] 罗思思,谢芝勋,谢志勤,等.I 群禽腺病毒五邻体蛋白间接 ELISA 检测方法的建立[J].中国家禽,2012,34(3):10-13.
- [2] 邱雨叶,李慧昕,王娟,等.不同接种途径对禽腺病毒在鸡胚中增殖的影响[J].中国预防兽医学报,2016,38(4):275-278.
- [3] 何秀苗,张科,秦爱建,等.I 群禽腺病毒江苏分离株(FAVI-JS)的分离鉴定[J].中国预防兽医学报,2005,27(1):42-45.
- [4] 赵莉,周洁,高诚,等.I 型禽腺病毒株 AV208 株在鸡肝癌细胞中增殖规律的研究[J].微生物学通报,2012,39(8):1120-1126.
- [5] 周斌,郑其升,刘华雷,等.禽腺病毒江苏分离株的细胞培养特性[J].南京农业大学学报,2005,28(2):140-143.
- [6] 于可响,黄兵,凌红丽,等.山东省血清 4 型禽腺病毒的分离鉴定[J].中国动物传染病学报,2016,24(5):1-5.
- [7] 梁广成,高巍,谢泉,等.一株高致病性血清 4 型禽腺病毒的分离与鉴定[J].中国家禽,2016,38(19):25-28.
- [8] CALNEK B W, SHEK W R, MENENDEZ N A, et al. Serological cross-reactivity of avian adenovirus serotypes in an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Avian Dis, 1982, 26(4): 897-906.
- [9] MCFERRAN J B. Immunity to adenoviruses [M]. Edinburgh: British Poultry Science, 1981: 187-203.
- [10] MCFERRAN J B, SMYTH J A. Avian adenoviruses [J]. Rev Sci Yech, 2000, 19(2): 589-601.

- [11] 国纪奎,刁有祥,薛聪,等.I 群禽腺病毒山东株的分离鉴定及 hexon 基因的克隆与分析[J].中国兽医学报,2012,32(12):1773-1777.
- [12] 智海东,解生亮,杨志,等.禽腺病毒 I 型琼脂扩散抗原的研制及应用[J].中国兽医学报,2009,39(8):718-722.
- [13] DAWSON G J, ORSI L N, YATES V J, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to avian adenovirus and avian adenovirus associated virus in chickens[J]. Avian diseases, 1980, 24(2): 393-402.
- [14] SAIFUDDIN M, WILKS C R. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect and quantify adenovirus in chicken tissues [J]. Avian Dis, 1990, 34(2): 239-245.
- [15] 文艳玲. 禽腺病毒 hexon 基因克隆表达及间接 ELISA 和荧光 PCR 检测方法的建立[D]. 南京: 广西大学, 2008.
- [16] MAREK A, GÜNES A, SCHULZ E, et al. Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region [J]. Journal of virological methods, 2010, 170: 147-154.
- [17] 谢芝勋. 应用 PCR 检测禽腺病毒[J]. 中国兽医学报, 2000, 20(4): 332-334.
- [18] RAUE R, HESS M. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus [J]. Journal of virological methods, 1998, 73(2): 211-217.
- [19] XIE Z X, FADL A A, GIRSHICK T, et al. Detection of avian adenovirus by polymerase chain reaction [J]. Avian Dis, 1999, 43(1): 98-105.
- [20] 李天芝, 于新友, 王金良, 等. 基于 hexon 基因的群禽腺病毒 PCR 快速检测方法的建立和应用 [J]. 养禽与禽病防治, 2016(9): 5-8.
- [21] 文艳玲, 谢芝勋, 王莹, 等. I 群禽腺病毒 SYBR Green I 荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2008, 38(9): 753-756.
- [22] STEER P A, KIRKPATRICK N C, O'ROURKE D, et al. Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(2): 311-321.
- [23] MEULEMANS G, BOSCHMANS M, BERG T P, et al. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses [J]. Avian pathology, 2001, 30(6): 655-660.
- [24] 李海英, 尹燕博, 徐守振, 等. I 群禽腺病毒 12 个血清型毒株 Hexon 蛋白全基因序列测定和酶切位点分析 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(1): 33-37.
- [25] 唐熠, 谢芝勋, 熊文婕, 等. PCR-RFLP 技术对 I 群禽腺病毒 12 个血清型毒株的分型鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2009, 39(10): 886-889.
- [26] 唐熠, 谢芝勋, 熊文婕, 等. I 群禽腺病毒环介导等温扩增检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2010, 40(7): 713-716.
- [27] 董婷婷. 鸡包涵体肝炎病毒探针的制备及其流行病学调查 [D]. 扬州: 扬州大学, 2011.
- [28] 朱后顺. 鸡包涵体肝炎病毒 DNA 探针的制备及其斑点杂交方法的建立 [D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
- [29] 王凤龙, 葛金英, 郝先谱, 等. 鸡包涵体肝炎病毒 DNA 探针的制备及其原位杂交的应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(6): 434-436.

名词解释

扩展学科扩散指标: 指在统计源期刊范围内, 引用该刊的期刊数量与其所在学科全部期刊数量之比。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{引用刊数}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展学科扩散指标: 指期刊所在学科内, 引用该刊的期刊数占全部期刊数量的比例。

$$\text{扩展学科扩散指标} = \frac{\text{所在学科内引用被评价期刊的数量}}{\text{所在学科期刊数}}$$

扩展被引半衰期: 指该期刊在统计当年被引用的全部次数中, 较新一半是在多长一段时间内发表的。被引半衰期是测度期刊老化速度的一种指标, 通常不是针对个别文献或某一组文献, 而是对某一学科或专业领域的文献的总和而言的。

扩展 H 指数: 指该期刊在统计当年被引的论文中, 至少有 h 篇论文的被引频次不低于 h 次。

来源文献量: 指来源期刊在统计当年发表的全部论文数, 它们是统计期刊引用数据的来源。

文献选出率: 按统计源的选取原则选出的文献数与期刊的发表文献数之比。

参考文献量: 指来源期刊论文所引用的全部参考文献数, 是衡量该期刊科学交流程度和吸收外部信息能力的一个指标。