

鸡细小病毒与 H9 亚型禽流感病毒二重 PCR 检测方法的建立

李丹, 谢芝勋*, 李孟, 罗思思, 谢丽基, 张民秀, 黄娇玲, 范晴, 王盛, 谢志勤, 邓显文, 曾婷婷, 张艳芳

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 广西南宁 530001)

摘要 [目的] 建立一种能够同时诊断鸡细小病毒(chicken parvovirus, ChPV)和 H9 亚型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)的检测方法。[方法] 根据 GenBank 中已发表的 ChPV NS 基因、H9 亚型 AIV HA 基因的保守序列, 分别设计多对引物, 并通过一系列不同组合对温度和反应体系的调整试验, 最终筛选出 2 对最佳特异性引物组合, 建立了 ChPV 和 AIV 二重 PCR 检测方法用于 ChPV 和 H9 亚型 AIV 的检测。[结果] 特异性和敏感性的试验结果表明, 建立的二重 PCR 方法特异性良好, 可以在一管 PCR 反应同时检测 ChPV 和 H9 亚型 AIV。针对 ChPV NS 基因和 H9 亚型 AIV HA 基因的扩增片段大小分别为 558 和 367 bp, 其他常见的禽病原体均未见阳性反应; 该法对 ChPV 和 H9 亚型 AIV 的检测下限均为 5×10^4 拷贝/ μL 质粒; 临床样品检测结果表明, 对 140 份临床样品检测结果与 AIV 分离测序及 ChPV PCR 阳性产物测序结果完全一致。[结论] 建立的 ChPV 和 H9 亚型 AIV 二重 PCR 检测方法不仅特异性良好, 而且检测的灵敏度高, 对 ChPV 和 H9 亚型 AIV 的监测及有效防控具有重要意义。

关键词 鸡细小病毒; H9 亚型禽流感病毒; 二重 PCR

中图分类号 S852.65 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)09-0113-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.09.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Development of a Duplex RT-PCR Assay for Detection of ChPV and AIV H9 Subtype

LI Dan, XIE Zhi-xun, LI Meng et al (Guangxi Veterinary Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract [Objective] In order to establish a method to simultaneously detect chicken parvovirus (ChPV) and avian influenza virus (AIV). [Method] Two pairs of specific primers were designed according to the sequences of ChPV NS genes, H9 subtype AIV HA genes which have been published in GenBank. Multiple pairs of primers were designed respectively, and through a series of experiments to adjust the temperature and reaction system of different combinations, the optimal combination of two pairs of specific primers was finally selected, and the duplex PCR detection method of AIV and ChPV was established for the detection of ChPV and H9 subtype AIV. [Result] The results of specificity and sensitivity test showed that the established triple PCR method was specific and good, and could simultaneously detect ChPV and H9 subtype AIV in one tube of PCR reaction. The amplified fragment size of the NS genes sequences of ChPV and HA genes sequences of H9 were 558 and 367 bp. The lower limit of detection for ChPV and H9 subtype AIV was 5×10^4 copies/ μL plasmid. The results of clinical samples test showed that 140 clinical samples were completely consistent with the results of AIV isolation sequencing and ChPV PCR positive products sequencing. [Conclusion] The duplex-PCR detection method for ChPV and H9 subtype AIV established in this study has not only good specificity, but also high detection sensitivity, which is of great significance for the monitoring and effective prevention and control of ChPV and H9 subtype AIV.

Key words Chicken parvovirus; H9 subtype avian influenza virus; Duplex PCR

鸡细小病毒是引发鸡群肠道疾病的重要病毒之一, 临床上以腹泻、呈现精神抑郁和生长迟缓及料肉比增加等为特征^[1]。ChPV 主要侵害雏鸡, 造成患病鸡腹泻和发育不良, 在某些鸡群中普遍存在, 有研究发现在发育障碍与矮小综合征鸡群的血清中能检测出 ChPV DNA^[2]。流行病学调查表明, 其在商品肉鸡感染率较高, 蛋鸡或种鸡次之^[3]。近年来研究表明, ChPV 在全球多个国家鸡群中普遍存在, 且近年相继在北美的美国和巴西、东欧的波兰、匈牙利、克罗地亚及亚洲的韩国和我国^[4-6]等国家发现报道。

H9 亚型禽流感病毒自 1966 年在美国被首次发现, 随后我国广东地区也于 1994 年首次在发病鸡体内发现了该亚型 AIV^[7]。研究表明, H9 亚型 AIV 容易与其他病原(病毒和细菌等)混合感染, 进而给我国养禽业造成更为严重的损失; 与其他不同亚型 AIV 混合感染时, 毒株间容易发生基因片段重组, 并产生一些不可预知的新型禽流感病毒, 进而可能引

起新型禽流感病毒的大流行。2013 年以来的部分报道还表明, 其可为 H5N6 和 H7N9 等高致病性亚型 AIV 提供内部基因^[8-10]。由上述报道可见, H9N2 亚型 AIV 与 ChPV 都对家禽养殖业造成了严重的危害。

由于 ChPV 在正常鸡胚和细胞培养中难以大量增殖, 因此应用病毒分离及电镜观察等方法对该病进行诊断的难度很大。传统 AIV 检测及诊断方法主要包括血清学鉴定、电镜观察和免疫荧光试验等^[11], 这几种方法各有优势, 但都存在检测时间长、准确性差和敏感度低等缺点。PCR 技术可以直接检测组织或培养物中是否存在目标病原的核酸, 快速且准确的判断样品有无该病原体感染。另外, 多重 PCR 具有同时对多种病原体混合感染进行检测的优点, 克服了常规单一 PCR 需要对混合感染样品进行逐项检测耗时长缺点, 且经过不断完善和改进后, 该技术已被用于多种禽病及其他动物病原混合感染的诊断。为此, 该研究根据 ChPV 的 NS 基因及 H9 亚型 AIV HA 基因的保守序列, 设计 2 对针对 2 种病毒的特异性引物, 建立了 ChPV 与 H9 亚型 AIV 二重 PCR 检测方法, 不仅可以快速准确的鉴别上述 2 种不同病原的混合感染, 而且为 ChPV 与 H9 亚型 AIV 的有效防控提供技术支撑。

基金项目 广西科技基地和人才专项项目(桂科 AD17195083); 广西科技重大专项(桂科 AA17204057); “广西八桂学者”专项

(2019-79); 国家“万人计划”领军人才专项(2016-37-88)。

作者简介 李丹(1990—), 女, 广西临桂人, 硕士, 研究方向: 病原分子生物学。* 通信作者, 研究员, 从事预防兽医学研究。

收稿日期 2019-10-08

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂。PCR 仪购自美国 Bio-Rad Laboratories 公司;超微量分光光度计购自美国 Thermo 公司;2×PCR Super Mix, DNA/RNA 共提试剂盒、小量质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、感受态细胞、PCR 产物快速连接载体和 DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;M-MLV、随机引物、dNTP 及 RNA 抑制剂购自宝生物(北京)有限公司。其他试剂均购自商业公司。

1.1.2 毒株。AIV 毒株(H3N2、H6N2、H9N2、NDV、IBV、ARV、ILTV、ChPV、Adv4、RTV、aMPV、CAV、AHEV 和 MDV)均由广西兽医生物技术重点实验室保存;AIV(H7N2)的 cDNA 模板由美国宾夕法尼亚州立大学惠赠;AIV 毒株(H5N1) cDNA 模板均由美国康涅狄格州立大学惠赠。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成。根据 GenBank 中已经发表的 ChPV NS 基因和 H9 亚型 AIV HA 基因的核苷酸序列,采用 DNASTar 软件将下载的 ChPV 和 AIV 目的基因进行比对,进而筛选出它们的特异性保守区域,利用 Primer6.0 和 Oligo6.0 软件设计出 2 对特异性引物,然后通过 NCBI BLAST 对其特异性进行在线验证,引物设计的序列见表 1。引物由赛默飞广州分公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primers	引物序列(5'→3') Primer sequences	扩增产物大小 Amplification product size/bp
H9-F	ACAGAGCATAATGGGATGCT	367
H9-R	GGCGCTCTTGGATAGGTAAT	
ChPV-F	GCAGCTGCAATCAGAGCAAG	558
ChPV-R	CTCCACCGTCAGATCGCTTT	

1.2.2 病毒 RNA/DNA 的提取与 RNA 的反转录。参照 DNA/RNA 抽提试剂盒使用说明书对 AIV、NDV、IBV、ARV、ILTV、ChPV、Adv4、RTV、aMPV、CAV、AHEV 和 MDV 的 DNA/RNA 进行抽提,抽提后的 DNA/RNA 用 33 μL DEPC 水溶解。RNA 病毒的抽提产物参照反转录酶说明书进行反转录合成 cDNA,所有产物置-30℃冰箱保存。

1.2.3 二重 RT-PCR 反应体系及条件的优化。该方法运用 25 μL PCR 反应体系:2×TransTaq-T PCR SuperMix 12.5 μL, ChPV DNA 和 H9 亚型 AIV cDNA 共 2 μL 作为模板,引物 ChPV-F、ChPV-R、H9-F 和 H9-R(25 pmol/μL)各加入 0.1~1.0 μL,10 个梯度进行引物浓度的优化,最后用超纯水补足至 25 μL。根据试验效果对退火温度及时间进行优化,最终确定最佳反应体系及条件。

1.2.4 特异性试验。运用所建立的二重 RT-PCR 检测方法按照优化好的反应条件对 H3N2、H5N1、H6N2、H7N2、H9N2、NDV、IBV、ARV、ILTV、ChPV、Adv4、RTV、aMPV、CAV、AHEV 和 MDV 的 RNA/DNA 进行检测,验证该方法的特异性。

1.2.5 标准品的制备。参考文献[12]的方法,用 ChPV NS 基因和 H9N2 HA 全长基因的引物,分别以 H9N2 与 ChPV 为模板进行 RT-PCR 扩增,得到其 HA 和 NS 基因的全长目的片段,并将这 3 个基因片段分别链接到 pMD18-T 的载体上。将含有 H9 亚型 AIV 的 HA 基因和 ChPV NS 基因片段的正确序列重组载体分别命名为 H9-T 和 NS-T。用质粒抽提试剂盒提取 H9-T 和 NS-T 的质粒,并用微量核酸检测仪对其进行核酸浓度的测定,根据分子质量和核酸浓度计算对应的拷贝数,将 H9-T 和 NS-T 等拷贝数混合,并进行 10 倍倍比稀释,以得到 H9-T 和 NS-T 质粒 DNA 浓度均为 $5 \times 10^1 \sim 5 \times 10^9$ 拷贝/μL 的标准品。

1.2.6 敏感性试验。运用所建立的 ChPV 和 H9 亚型禽流感病毒二重 RT-PCR 的检测方法对 H9-T 和 NS-T 质粒浓度为 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^7$ 拷贝/μL 的样品进行特异性扩增,检测该方法的敏感性。

1.2.7 临床样品检测。运用建立的二重 PCR 检测方法对活禽市场采集的 140 份鸡咽喉及泄殖腔拭子进行检测鉴定,同时将病料处理后接种 SPF 鸡胚进行病毒分离鉴定,并进行 HA 基因全长扩增。同时经 ChPV NS 基因阳性 PCR 产物和 HA 基因全长克隆送测序公司进行测序,然后将上述结果进行比较,验证二重 RT-PCR 的检测结果。

2 结果与分析

2.2 二重 RT-PCR 条件的优化 通过对 H9 亚型 AIV HA 基因和 ChPV NS 基因 2 种引物浓度的测定及扩增温度时间等的优化,最终确定二重 PCR 最佳反应体系:2×TransTaq-T PCR SuperMix 12.5 μL, H9 亚型 AIV cDNA 和 ChPV DNA 各 1 μL 作为模板,引物 H9-F 和 H9-R(25 pmol/μL)各加入 0.5 μL,引物 ChPV-F 和 ChPV-R(25 pmol/μL)则分别加入 0.8 μL,最后用超纯水补足至 25 μL。最终优化的反应条件为:95℃ 5 min;进入 95℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 min,共 35 个循环;然后再 72℃ 延伸 10 min。

2.2 特异性试验 该法对 H9 及 ChPV 混合感染样品检测出 2 条特异性的条带,分别为 558(ChPV)及 367 bp(H9 亚型);对 ChPV 检测结果仅出现 1 条特异性条带,片段大小为 558 bp;对 H9N2 亚型 AIV 进行扩增检测出 1 条特异性条带,片段大小为 367 bp;对其他亚型 AIV 未出现特异性条带,其他常见的禽病病原体均未扩增出任何条带,结果表明该方法具有良好的特异性(图 1)。

2.3 敏感性试验 由图 2 可见,运用该方法针对 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^7$ 拷贝/μL 的 H9 亚型 AIV HA 基因和 ChPV NS 基因质粒模板进行扩增,结果显示,对浓度为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^7$ 拷贝/μL 的 H9 亚型 AIV HA 基因和 ChPV NS 基因质粒均有 2 条明显的特异性扩增条带出现,片段大小分别为 367 和 558 bp;对浓度小于或等于 5×10^3 拷贝/μL 的 H9 亚型 AIV HA 基因和 ChPV NS 基因质粒均无扩增条带。由此可见,该法最低能检测到 5×10^4 拷贝/μL 的 H9 亚型 AIV HA 基因和 ChPV NS 基因质粒。

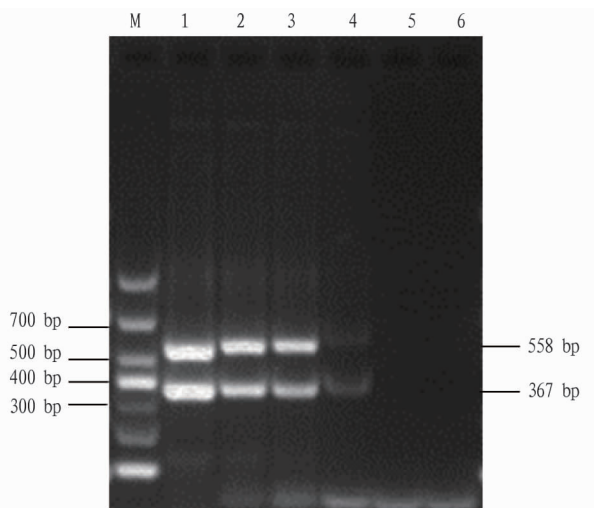


注: M. DNA 标准 DL2000; 1. H9N2+ChPV; 2. ChPV; 3. H9N2; 4. H6N2; 5. H3N2; 6. H5N1; 7. H7N2; 8. 鸡传染性贫血病毒; 9. 禽 I 群腺病毒 4 型; 10. 禽轮状病毒; 11. 禽偏肺病毒; 12. 禽戊型肝炎病毒; 13. 鸡传染性支气管炎病毒; 14. 禽呼肠孤病毒; 15. 鸡传染性喉气管炎病毒; 16. 鸡新城疫病毒; 17. 马立克病毒; 18. 阴性对照

Note: M. DL2000 DNA Marker; 1. H9N2+ChPV; 2. ChPV; 3. H9N2; 4. H6N2; 5. H3N2; 6. H5N1; 7. H7N2; 8. CAV; 9. Adv4; 10. RTV; 11. aMPV; 12. AHEV; 13. IBV; 14. ARV; 15. ILTV; 16. NDV; 17. MDV; 18. Negative control

图 1 特异性试验结果

Fig. 1 The results of specificity test



注: M 为 DNA 标准 DL1000; 1 为 5×10^7 拷贝/ μL ; 2 为 5×10^6 拷贝/ μL ; 3 为 5×10^5 拷贝/ μL ; 4 为 5×10^4 拷贝/ μL ; 5 为 5×10^3 拷贝/ μL ; 6 为阴性对照

Note: M. DNA Marker DL1000; 1. 5×10^7 copies/ μL ; 2. 5×10^6 copies/ μL ; 3. 5×10^5 copies/ μL ; 4. 5×10^4 copies/ μL ; 5. 5×10^3 copies/ μL ; 6. Negative control

图 2 敏感性试验结果

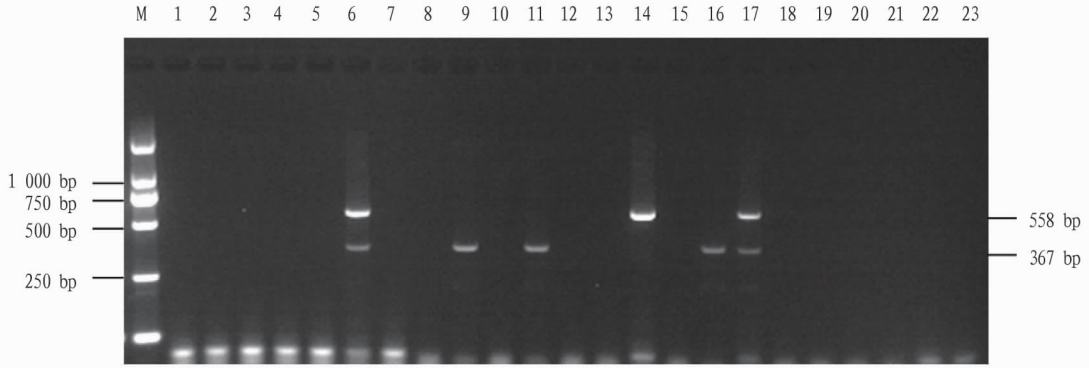
Fig. 2 The results of sensitivity test

2.4 临床样品检测 运用该方法对广西兽医生物技术重点实验室从南宁活禽市场采集的 140 份鸡口腔及泄殖腔的棉拭子样品进行了检测,检测结果显示有 2 份样品能同时扩增出 367 和 558 bp 的目的条带,为 H9 亚型 AIV 和 ChPV 混合感染阳性,有 3 份样品能扩增出 367 bp 的目的条带,为单一 H9 亚型 AIV 阳性,15 份样品仅能扩增出 558 bp 的目的条带,为 ChPV 单一感染阳性,部分临床样品检测结果见图 3。上述结果与病毒分离鉴定和 HA 基因测序结果 100% 相符,说明该方法有一定的实用性。

3 小结与讨论

AIV 基因组由 8 个独立节段组成,分别为 HA、NA、M、PB1、PB2、PA、NP 和 NS^[13]。H9 亚型 AIV 属于 LPAIV,该病毒主要引起鸡群呼吸道、消化道和生殖系统的疾病,进而造成鸡的生长缓慢和产蛋率下降等不良影响,是目前影响我国养禽业的主要 AIV 亚型。大部分野禽、水禽和家禽携带该病毒时均不表现出任何明显的临床症状,但该病毒会对其机体造成一定的损伤^[14]。AIV 抗原在自然条件下容易发生变异,临床上易导致新亚型 AI 的出现,而且会发生多种亚型 AIV 的混合感染,其引起的症状又极其相似,给精确鉴别诊断造成了巨大困扰。在 AIV 的各种基因片段中,HA 基因的变异最大,同时也变异最频繁,因此 HA 基因的分型鉴定引物需要不断的根据其变异进行更新。目前,鸡的肠道疾病也是危害养鸡业健康发展的重要问题之一,其中由 ChPV 等病毒引起的鸡肠炎及腹泻等症状在临床上也十分常见^[15]。ChPV 感染会造成鸡群发生腹泻,也可能是隐性感染或者与其他病毒及细菌混合感染,进而引起鸡生长发育受阻,出现“僵鸡”及饲料肉比下降等,给养鸡业造成了严重的经济损失^[16]。另外由于 ChPV 引起的临床症状与其他病毒较相似,且在临床上极易呈现混合感染的病例,给临床鉴别诊断带来困难。目前尚无有效的疫苗防治 ChPV 感染。研究还发现,ChPV 具有垂直传播的潜在可能,可能造成种蛋的孵化率下降及鸡胚发育不良增加。目前,国内虽没有关于 ChPV 暴发和流行的相关报道,但该试验对不同品种和日龄鸡群监测的结果表明,ChPV 在某些品种和日龄鸡群的感染率依然很高。因此,对于 ChPV 的监测及防控也十分迫切和必要,建立一种快速鉴别诊断方法可以为该病混合感染的监测、鉴别及防控提供有力的技术支撑。

HA 和 HI 方法也是目前世界卫生组织(WHO)和世界动物卫生组织(OIE)监测流感采用的一般方法,但是由于该方法需要对抗原和血清进行分型和标准化处理,而且其前期制



注: M 为 DNA 标准 DL2000; 14 为 ChPV 阳性产物; 9、11、16 为 H9 亚型 AIV 阳性产物; 6、17 为 H9 亚型 AIV 与 ChPV 的阳性产物; 其余为阴性产物

Note: M. DNA Marker DL2000; 14. Positive products of ChPV; 9, 11, 16. Positive products of H9 subtype AIVs; 6, 17. Positive products of H9 subtype AIVs and ChPV; the others were negative products

图3 部分临床样品检测结果

Fig. 3 The detection results of some clinical samples

备繁琐, 成本高, 加之禽流感病毒变异性强, 血清的广谱性效果差, 因此该方法的特异性和准确性有所欠缺^[17]。目前利用 RT-PCR 方法对 AIV 进行鉴定与分型, 也是 WHO 与 OIE 推荐的方法之一^[18]。该方法快速准确、操作简便、平均样品检测成本相对较低, 得到了广泛的认可与应用推广。近年来, 国内外已有检测 ChPV 的 PCR 诊断技术和方法的研究, 而且同时检测多种病原体混合感染的多重 PCR 技术也有不少报道^[19-20]。该研究建立 H9 亚型 AIV 与 ChPV 二重 PCR 检测方法, 不仅可以快速诊断和鉴别上述 2 种疾病混合感染, 也可快速诊断 H9 亚型 AIV 亚型或者 ChPV 单独感染。该方法的特异性试验结果显示, 多种病毒混合感染时依然能特异扩增出目的基因条带; 同时敏感性试验结果表明, 当 2 种病毒混合感染的含量很低时, 该方法还能清晰扩增出目的片段, 说明建立的 H9 亚型 AIV 和 ChPV 二重 PCR 检测方法能够直接检测临床样品, 可为临床上 2 种病毒性疾病的快速鉴别诊断提供技术支撑。

参考文献

- [1] GUY J S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry[J]. *Poult Sci*, 1998, 77(8): 1166-1175.
- [2] FINKLER F, LIMA D A, CERVA C, et al. Chicken parvovirus and its associations with malabsorption syndrome[J]. *Res Vet Sci*, 2016, 107: 178-181.
- [3] 奉彬, 谢芝勋, 张艳芳, 等. 鸡细小病毒半巢式 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(5): 1295-1301.
- [4] PALADE E A, KISARY J, BENYEDA Z, et al. Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks [J]. *Avian Pathol*, 2011, 40(2): 191-197.
- [5] BIDIN M, LOJKIC I, BIDIN Z, et al. Identification and phylogenetic diversity of parvovirus circulating in commercial chicken and turkey flocks in Croatia [J]. *Avian Dis*, 2011, 55(4): 693-696.
- [6] FENG B, XIE Z X, DENG X W, et al. Genetic and phylogenetic analysis of a novel parvovirus isolated from chickens in Guangxi, China[J]. *Arch Virol*, 2016, 161(11): 3285-3289.
- [7] 徐倩. 广西 H9 亚型禽流感病毒全基因组序列分析及疫苗候选株的筛选[D]. 南宁: 广西大学, 2015.
- [8] LIU D, SHI W F, SHI Y, et al. Origin and diversity of novel avian influenza A H7N9 viruses causing human infection; Phylogenetic, structural, and coalescent analyses[J]. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1926-1932.
- [9] XU W, LI X D, BAI T, et al. A fatal case of infection with a further reassortant, highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N6 virus in Yunnan, China[J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 40: 63-66.
- [10] LIU D, SHI W F, GAO G F. Poultry carrying H9N2 act as incubators for novel human avian influenza viruses[J]. *Lancet*, 2014, 383(9920): 869.
- [11] SAIF Y M. 禽病学[M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 等译. 12 版. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [12] 李丹, 谢芝勋, 宋德贵, 等. H9 和 H6 亚型禽流感病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(12): 3101-3106.
- [13] 秦爱建. 禽流感病毒[M]//韦平, 秦爱建. 重要动物病毒分子生物学. 北京: 科学出版社, 2008: 3-27.
- [14] 顾敏, 彭大新, 刘秀梵. 我国 H9N2 亚型禽流感病毒的流行和进化特点[J]. *生命科学*, 2015, 27(5): 531-538.
- [15] 奉彬, 谢芝勋, 邓显文, 等. 鸡细小病毒与禽呼肠病毒二重 PCR 检测方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(11): 14-18.
- [16] 邓雯. 肉鸡发育障碍与矮小综合征[J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(1): 78-84.
- [17] 杜景娇, 薛强, 邹明强, 等. 禽流感病毒检测技术的研究新进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(5): 232-236.
- [18] 但晓雅, 董英, 邹明强, 等. 禽流感病毒分子生物学检测技术研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(3): 213-216.
- [19] ZSÁK L, STROTHER K O, DAY J M. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection of chicken and turkey parvoviruses[J]. *Avian Dis*, 2009, 53(1): 83-88.
- [20] 王洪光. 猪呼吸道病毒性疾病多重 PCR 方法的建立与应用研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2015.