

研究报告

新城疫弱毒活疫苗中 FAdV-4 的分离鉴定及分子特征

刘亮亮¹ 王娟² 李慧昕³ 刘胜旺³ 马得莹^{1*}

(1. 东北农业大学动物科学技术学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

(2. 东北农业大学生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150030)

(3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 禽传染病研究室
黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:【目的】当前我国鸡群禽腺病毒(Fowl adenovirus, FAdV)感染严重, 该病毒既可水平传播也可经卵垂直传播, 因此鸡胚源禽用弱毒活疫苗是否存在 FAdV 污染, 进而造成疫病的传播尚不清楚。检测我国商品化新城疫 La Sota 弱毒活疫苗中是否存在 FAdV 污染, 探讨国内鸡群中 FAdV 感染和流行的可能原因。【方法】应用本实验室建立的 FAdV PCR 检测方法检测商品化新城疫 La Sota 弱毒活疫苗, 并进行 FAdV 分离鉴定。经序列比对和进化分析, 鉴定分离毒株所属种、血清型及进化特征。【结果】分离到一株禽腺病毒, 命名为 L160962。基因分析表明, 分离株 L160962 的 52k 和 hexon 基因片段序列与 C 种内的血清 4 型毒株相似性最高, 其中与中国毒株 HN/151025 和 CH/HNJZ/2015 的相似性为 99.9%–100%, 与奥地利毒株 KR5 的相似性为 99.3%, 但与 A、B、D 和 E 种 FAdV 的相似性分别为 79.0%–83.3%。系统进化分析表明, L160962 与 C 种内的血清 4 型禽腺病毒在同一分支, 核苷酸相似性在 99.9% 以上, 应划分为血清 4 型 FAdV。基于分离株 L160962 的 hexon 基因构建的系统进化树的拓扑结构, 分离株 L160962 与中国毒株亲缘关系最近, 提示疫苗源分离株 L160962 与我国当前流行毒株相近。【结论】我国商品化的新城疫 La Sota 弱毒活疫苗中存在血清 4 型 FAdV 污染, 这可能是我国鸡群中 FAdV 大面积感染和流行的原因之一。

关键词: 禽腺病毒, La Sota 疫苗, 分离鉴定

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0500105); Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2015BAD12B03); Central Public-interest Scientific Institution Basal Fund of China (No. 1610302017003)

*Corresponding author: Tel: 86-451-51051698; E-mail: madeying@neau.edu.cn

Received: July 07, 2017; **Accepted:** September 19, 2017; **Published online** (www.cnki.net): October 16, 2017

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2017YFD0500105); 国家科技支撑计划项目(No. 2015BAD12B03); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(No. 1610302017003)

*通讯作者: Tel: 86-451-51051698; E-mail: madeying@neau.edu.cn

收稿日期: 2017-07-07; **接受日期:** 2017-09-19; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-10-16

Identification and molecular characteristic of fowl adenovirus serotype 4 isolated from a live Newcastle disease virus vaccine

LIU Liang-Liang¹ WANG Juan² LI Hui-Xin³ LIU Sheng-Wang³ MA De-Ying^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

(2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

(3. Division of Avian Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: [Objective] Fowl adenovirus (FAdV) infection in chicken flocks is very common in China currently. Because FAdV transmits both horizontally and vertically in chickens, it is essential and urgent to determine the contamination of attenuated vaccines produced in chicken embryo eggs by FAdV and its risk to induce epidemic of Hepatitis-Hydropericardium syndrome (HHS) caused by FAdV. The objectives were to ascertain the contamination of an attenuated live Newcastle disease virus (NDV) vaccine produced by Chinese veterinary drug company by FAdV and to investigate the possible reasons for current prevalence of HHS caused by FAdV in chicken flocks in China. [Methods] FAdV-specific PCR was employed to detect FAdV from the attenuated live vaccine of NDV La Sota strain. PCR positive samples were inoculated into chicken embryo eggs for the isolation of FAdV. Sequencing, identity analysis and the phylogenetic tree construction were performed to analyze the molecular characteristics, genotyping and serotyping of the isolates. [Results] A FAdV strain was obtained and named L160962 that shared the highest identity with serotype 4 FAdVs in the 52k and hexon genes according to homology analysis. Among the strains investigated, isolate L160962 shared identities at a level of 99.9%–100% with Chinese strains HN/151025 and CH/HNJZ/2015, 99.3% with Austrian strain KR5, and only 79.0%–83.3% with members in species A, B, D and E in the sequences of 52k and hexon. Phylogenetic analysis showed that isolate L160962 was clustered into serotype 4 within the species C with an identity higher than 99.9% and most close to the Chinese strains, suggesting that isolate L160962 is similar to the prevalent strains in China. [Conclusion] Our studies observed contamination of attenuated vaccines produced in chicken embryo eggs by serotype 4 of FAdV, which may be one of the reasons that lead to FAdV infection prevalent in chicken flocks in China.

Keywords: Fowl adenovirus, La Sota vaccine, Isolation and identification

禽腺病毒(Fowl adenovirus, FAdV)在鸡群中广泛存在, 肉鸡和蛋鸡都可感染 FAdV, 通常 3–5 周龄鸡最为易感^[1]。FAdV 血清型众多, 根据血清学试验可将 FAdV 分为 12 个血清型, 包括血清型 1–8a、8b–11^[2]。不同血清型的 FAdV 均可感染鸡, 临床上表现出不同程度的肝炎症状^[3–4]。与 FAdV 感染相关的疾病主要有鸡包涵体肝炎(Inclusion body hepatitis, IBH)、心包积水综合征(Hydropericardium syndrome, HPS)和肌胃糜烂(Gizzard erosions, GE)等。IBH 主要发生于 3–5 周龄肉鸡, 发病鸡以肝炎为主要特征, 病理学检查可见核内包涵体, 死亡率在 10%左右^[5]。HPS 主要由血清型 4 型 FAdV 感染

所致, 剖检以淡黄色心包积液或者心包内胶冻状物为特征, 肝脏有出血点及肝炎病变, 因此也常称为肝炎-心包积水综合征(Hepatitis-Hydropericardium syndrome, HHS), 死亡率高达 30%–90%^[6], 病鸡表现为突然发病, 迅速死亡。GE 主要由血清 1 型 FAdV 感染所致, 主要病原为鸡胚致死孤儿病毒(Chicken embryo lethal orphan virus, CELO)^[7], 剖检以肌胃糜烂为主要特征。

第九次国际病毒分类报告将禽腺病毒划分为腺病毒科禽腺病毒属。根据病毒基因组特征, 可将 FAdV 分为 5 个种: FAdV A–E。FAdV A–E 包含 12 个血清型^[2]: 其中 A 种包括血清 1 型, B 种包括

血清 5 型, C 种包括血清 4 型和血清 10 型, D 种包括血清 2、3、9 和 11 型, E 种包括血清 6、7、8a 和 8b 型。FAdV 由二十面体对称的蛋白质外壳包裹核酸构成, 外壳蛋白由 3 种蛋白构成, 包括六邻体(Hexon)、五邻体(Penton)和纤维蛋白(Fiber), 其中 Hexon 蛋白含有主要的特异性抗原决定簇, 具有血清型特异性^[8-10]。FAdV 基因组为双股线性 DNA, 基因组大小约为 43–45 kb^[11], FAdV 5 个种的病毒基因组结构不完全相同, FAdV-A 和 FAdV-C 基因组中编码 2 个 Fiber 蛋白, 而 FAdV-B、D 和 E 基因组中编码 1 个 Fiber 蛋白。同一种内的不同血清型病毒基因组结构相似, 并且基因组序列相对保守。不同血清型禽腺病毒的部分基因在序列上相对保守, 其中 52k 基因和 *hexon* 基因常作为 FAdV PCR 检测用靶基因^[12]。Hexon 蛋白的 L1 loop 序列具有血清型特异性, 因此 *hexon* 基因通常用于 FAdV 基因型(种)和血清型的分类。

自 2013 年以来, 我国鸡群陆续暴发以肝炎及肝脏坏死为特征的鸡包涵体肝炎。至 2014 年, 我国部分鸡群突然表现出心包出现典型的淡黄色心包积液、严重时呈淡黄色胶冻样物为特征的心包积水综合征, 同时伴有严重的肝炎症状。随后, 该病在我国各地区鸡群中大面积暴发, 病鸡出现突然死亡, 死亡率达 30%–90%^[6]。目前, 我国鸡群流行的 FAdV 主要以 C、D、E 种为主^[13]。血清流行病学调查表明, 我国大部分鸡群血清抗体阳性, 说明我国鸡群一直存在 FAdV 感染, 鸡群呈带毒而不发病状态。FAdV 在进化的过程中突然出现致病力增强, 导致鸡群严重发病和死亡, 但病毒毒力增强的机制尚不清楚。研究表明, FAdV 以水平传播为主, 也可经卵垂直传播^[14]。目前, 我国鸡胚源商品化疫苗多数使用非免疫鸡胚制备, FAdV 是否经带毒鸡胚污染疫苗并经疫苗传播尚不清楚。《中华人民共和国兽药典》(2015 年版)列出禽源制品应进行外源性病毒检测, 包括鸡传染性支气管炎病毒、鸡新城疫病毒、禽 A 型流感病毒、鸡传染性喉气管炎病毒、禽呼肠孤病毒、鸡传染性法氏囊病病毒、禽网状内皮

增生症病毒、禽白血病病毒、鸡马立克氏病病毒、禽脑脊髓炎病毒、鸡痘病毒和禽腺病毒(有血凝性)。这里所列禽腺病毒为有血凝性病毒, 采用血凝抑制试验进行检测, 与我国当前流行的 FAdV 不是同一类病毒, 因此 FAdV 不在外源病毒检测范围内。目前 FAdV 在我国鸡群中大范围流行, 我国商品化禽用疫苗中是否存在 FAdV 的污染, 其污染程度如何尚需进一步调查研究。本研究从我国当前使用的商品化 La Sota 弱毒活疫苗中检测并分离 FAdV, 进而对商品化弱毒活疫苗存在禽腺病毒污染进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 疫苗和细胞

两家中国某兽药生物制品企业生产的商品化 La Sota 弱毒株活疫苗购自某兽药市场; LMH 细胞由本实验室保存; 新城疫病毒阳性血清(HI 效价为 10log₂)由本实验室制备并保存。

1.2 载体、菌株、试剂及主要仪器

克隆载体 pMD18-T、Premix ExTaq 购自宝生物工程(大连)有限公司; 感受态细胞 TG1 由本实验室制备; DNA 提取试剂盒购自 Axygen 公司; DMEM 和胎牛血清购自 GIBCO 公司。TP600 型梯度 PCR 仪购自宝生物工程(大连)有限公司; Micro 17 小型台式离心机、生物安全柜(A2 型)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 引物合成

研究使用的 FAdV 检测用引物 HF2/HR2^[13]由本实验室自行设计, 52k-fw/52k-rv 引用文献[12]发表序列, 上述引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。HF2: 5'-CCARATGGCSACSAACTACAA-3'; HR2: 5'-TVGCGAAAGGCGTACGGAAG-3', 预期扩增片段长度为 593 bp。52k-fw: 5'-ATGGCKCAGA TGGCYAAGG-3'; 52k-rv: 5'-AGCGCCTGGGTCAA ACCGA-3', 预期扩增片段长度为 176 bp。

1.4 病毒基因组 DNA 的提取

分别对两个厂家生产的同一批次 La Sota 弱毒活疫苗随机抽检 3 支, 经无菌 PBS 稀释, 将 3 支疫

苗混合后取 200 μL , 用于基因组 DNA 的提取, 病毒基因组 DNA 提取方法按 Axygen DNA 提取试剂盒说明书进行。

1.5 PCR 检测及序列测定

以上述提取的 DNA 为模板, 用引物 52k-fw/52k-rv 和 HF2/HR2 分别进行 PCR 检测。PCR 反应体系(25 μL): 2 \times Premix ExTaq 12.5 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 5 μL , ddH₂O 5.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR 产物用胶回收试剂盒回收纯化, 回收产物连接至 pMD18-T 载体, 将连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 h 后挑取单个菌落, 经 PCR 鉴定为阳性的克隆送北京六合华大基因科技有限公司测序。

1.6 病毒分离

将 PCR 检测 FAdV 核酸阳性的新城疫 La Sota 弱毒株活疫苗用无菌 PBS 稀释, 取 500 μL 与等体积 NDV 阳性血清混合, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 以中和疫苗中的 NDV。抗原/抗体混合物经 0.22 μm 滤器过滤, 接种长成单层的 LMH 细胞, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 吸附 2 h, 弃去上清液, 换含 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养, 每日观察。培养 5 d 后反复冻融 3 次, 收获培养液, 置-70 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

按上述方法, 病毒分离物继续在 LMH 细胞中连续传代至第 3 代。每代病毒提取病毒基因组 DNA, 经 PCR 检测病毒核酸并进行序列测定(方法同 1.4 和 1.5)。

1.7 血凝试验

按常规方法制备 1% 鸡红细胞, 按常规血凝试验方法对新城疫 La Sota 弱毒活疫苗株和每代病毒分离物进行血凝试验(HA)检测^[15], 以分离物是否具有红细胞凝集活性判定新城疫病毒是否中和完全。

1.8 序列比对及系统发育进化分析

扩增得到的 52k 和 hexon 基因的部分核苷酸序列经 NCBI 在线 BLAST 分析, 与国内外 FAdV 毒株的 52k 和 hexon 基因序列进行比对, 比较分离株与已报道毒株的差异, 利用分子生物学软件 MEGA 6.0 对分离毒株和参考毒株进行系统发育进化分析, 用最大似然法(Maximum Likelihood)绘制系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 FAdV 检测和病毒分离

采用本研究室建立的 FAdV PCR 检测方法, 检测两家中国某兽药生物制品企业生产的新城疫 La Sota 弱毒活疫苗, 结果表明, 受检的两家企业生产的新城疫 La Sota 弱毒活疫苗中, 其中一家兽药生物制品企业生产的新城疫 La Sota 弱毒活疫苗中 FAdV 检测核酸阳性(图 1A, 检测 FAdV 核酸阴性结果未显示)。

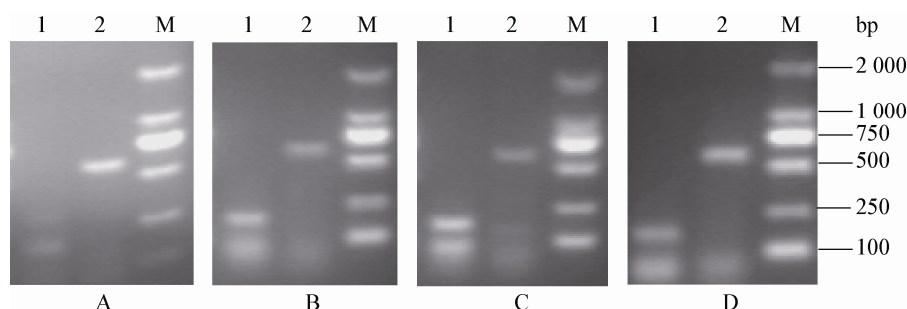


图 1 FAdV PCR 检测及病毒分离鉴定

Figure 1 Detection of FAdV by PCR method and the identification on the isolate

注: 1: 52k-fw/52k-rv PCR 扩增产物; 2: HF2/HR2 PCR 扩增产物; M: DNA 分子质量标准 DL2000。A: La Sota 弱毒活疫苗 PCR 检测; B: 分离株 F1 代 PCR 检测; C: 分离株 F2 代 PCR 检测; D: 分离株 F3 代 PCR 检测。

Note: 1: PCR amplification by 52k-fw/52k-rv; 2: PCR amplification by HF2/HR2; M: DL2000 DNA marker. A: PCR detection on attenuated live NDV vaccine of the La Sota strain; B: PCR detection on the passage 1 of isolate; C: PCR detection on the passage 2 of isolate; D: PCR detection on the passage 3 of isolate.

将 FAdV 检测核酸阳性的新城疫 La Sota 弱毒活疫苗经 NDV 阳性血清中和,在 LMH 细胞上连续传代 3 代,每代接种前均使用 NDV 阳性血清中和。对 3 代病毒分离物用 FAdV PCR 检测方法检测,均扩增出与目的片段预期大小一致的条带,目的片段大小分别为 176 bp 和 593 bp (图 1B、1C 和 1D)。序列测定结果表明,扩增的 2 个基因片段序列均为禽腺病毒基因组序列。表明从商品化新城疫 La Sota 弱毒活疫苗中分离到一株 FAdV,命名为 L160962。

2.2 血凝试验

对 PCR 检测 FAdV 核酸阳性的新城疫 La Sota 弱毒活疫苗株的 HA 效价进行检测,该弱毒活疫苗中 NDV 的 HA 效价平均为 8log2。此疫苗株经 HI 滴度为 10log2 的 NDV 阳性血清中和后进行病毒分离。对 L160962 分离株连续传代 3 代后收获的病毒储液按常规方法分别进行血凝试验检测,结果显示,L160962 分离株 3 代病毒储液都不具有红细胞凝集活性。表明经 NDV 阳性血清进行 3 次中和传代后,NDV 病毒已经被完全中和,分离物中已无

NDV 存在。

2.3 序列分析

扩增得到的 52k 和 hexon 基因部分序列 GenBank 登录号分别为 MF981080 和 MF981081。经 NCBI 在线 BLAST 分析及序列比对,L160962 与血清 4 型 FAdV 参考毒株相似性最高,参考毒株背景和核苷酸相似性比较结果见表 1。分离株 L160962 52k 基因片段序列与近几年中国、印度、加拿大和墨西哥等国家分离的血清 4 型 FAdV 分离株的相似性最高,为 99.9%;与奥地利分离株 KR5 毒株的相似性为 99.3%;但与 A、B、D 和 E 种 FAdV 的相似性分别为 83.3%、83.3%、79.0%和 81.9%。该分离株的 hexon 基因片段序列与血清 4 型 FAdV 的相似性较高,为 99.3%–100%。其中 L160962 与 2015 年分离的血清 4 型中国分离株 HN/151025 和 CH/HNJZ/2015 的相似性为 100%,与奥地利分离株 KR5 的相似性为 99.3%。分离株 L160962 与 A、B、D 和 E 种 FAdV 的相似性分别为 77.7%、74.3%、69.7%–73.0%和 77.9%–79.3%。

表 1 分离株 L160962 与参考毒株 52k 和 hexon 基因片段的核苷酸相似性

Table 1 Nucleotide sequence identities of the 52k and hexon genes of isolate L160962 compared to the reference strains

毒株 Strain	登录号 GenBank accession No.	种 Species	血清型 Serotypes	分离国家 Country of origin	相似性 Identity (%)	
					52k	hexon
CELO	U46933	FAdV-A	FAdV-1	Australia	83.3	77.7
340	NC_021221	FAdV-B	FAdV-5	Ireland	83.3	74.3
HN/151025	KU245540	FAdV-C	FAdV-4	China	99.9	100
B1-7	KU342001	FAdV-C	FAdV-4	India	99.8	99.8
CH/HNJZ/2015	KU558760	FAdV-C	FAdV-4	China	99.9	100
KR5	HE608152	FAdV-C	FAdV-4	Austria	99.3	99.3
ON1	GU188428	FAdV-C	FAdV-4	Canada	99.9	98.9
MX-SHP95	KP295475	FAdV-C	FAdV-4	Mexico	99.9	98.7
685	KT862805	FAdV-D	FAdV-2	United Kingdom	79.0	72.8
A-2A	AF083975	FAdV-D	FAdV-9	Canada	79.0	69.7
380	KT862812	FAdV-D	FAdV-11	United Kingdom	79.0	73.0
HBQ12	KM096545	FAdV-D	FAdV-11	China	79.0	73.0
SR49	KT862807	FAdV-D	FAdV-3	Japan	79.0	69.7
MX95-S11	KU746335	FAdV-D	FAdV-11	Mexico	79.0	73.0
CR119	KT862808	FAdV-E	FAdV-6	Japan	81.9	78.1
YR36	KT862809	FAdV-E	FAdV-7	Japan	81.9	77.9
764	KT862811	FAdV-E	FAdV-8b	United Kingdom	81.9	79.3
HG	GU734104	FAdV-E	FAdV-8b	Canada	81.9	79.3

2.4 系统发育进化分析

对分离株 L160962 的 52k 和 hexon 基因部分序列与已报道的 FAdV 毒株同源基因进行系统发育进化分析, 用最大似然法(Maximum Likelihood)构建系统发育进化树。根据 52k 和 hexon 基因的系统发育进化树, FAdV 分为 5 个主要分支, 分别为 FAdV A-E (图 2 和图 3)。在 52k 基因的系统发育进化树中, 分离株 L160962 划分为 C 种, 与血清 4 型 FAdV 在同一分支, 与 FAdV A、B、D 和 E 种毒株亲缘关系较远(图 2)。在 hexon 基因的系统发育进化树中, 分离株 L160962 的分类与 52k 基因系统发育进化分析一致, 分离株划分为禽腺病毒 C 种内的血清 4 型,

与中国分离株 HN/151025、JSJ13 和 FAdV-N22 以及印度毒株(KC 和 RC 株)亲缘关系较近, 与 FAdV A、B、D、E 种毒株亲缘关系较远(图 3)。基于两个基因的系统发育进化分析, 表明 L160962 与 C 种血清 4 型 FAdV 同源关系较近, 可归类为禽腺病毒 C 种内的血清 4 型。

2.5 分离株分子特征分析

基于系统发育进化分析结果, 对分离株 L160962 的 52k 基因部分序列与血清 4 型 FAdV 参考毒株进行比对, 参考毒株选取中国流行强毒株 (HN/151025、JSJ13)和国外毒株(强毒株 MX-SHP95, 弱毒株 ON1 和 KR5), 毒株背景见表 1。分离株的

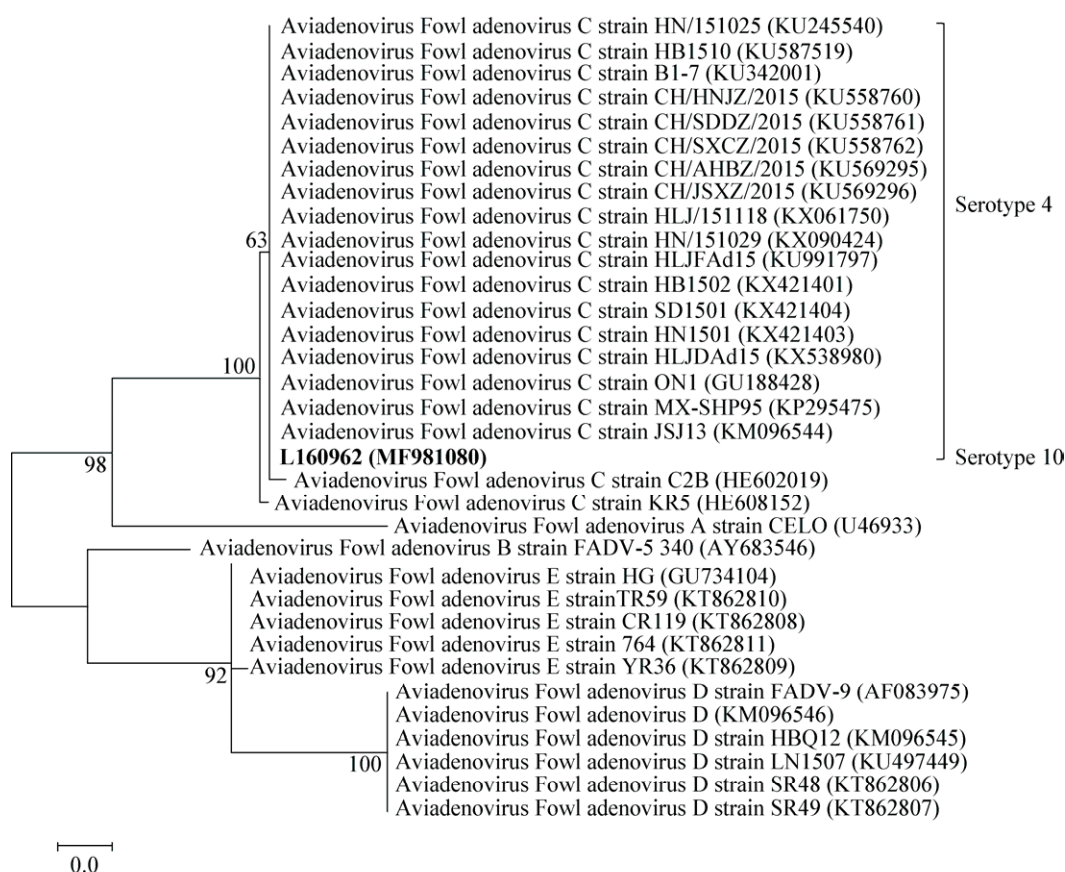
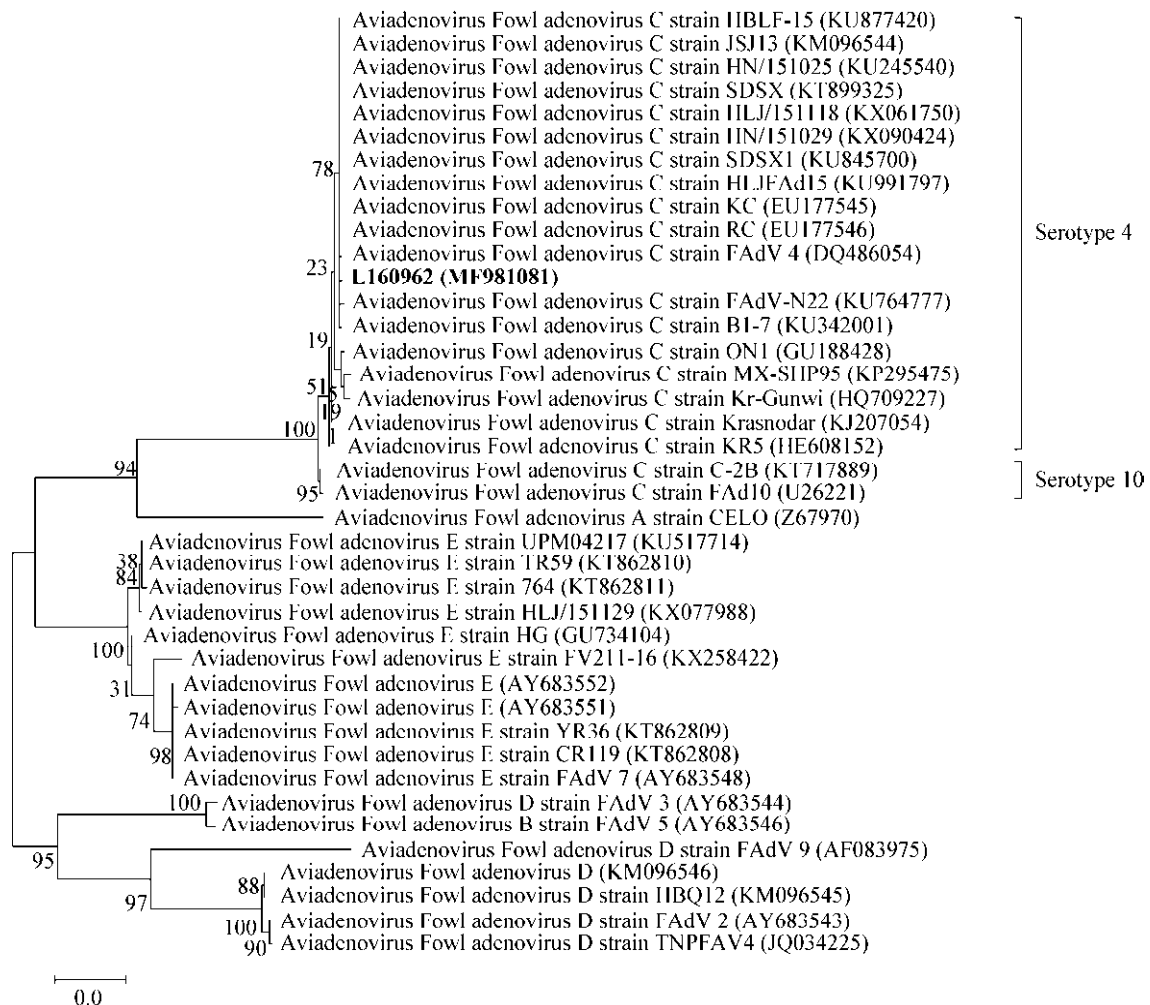


图 2 52k 基因系统发育进化树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 52k gene

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算形成该节点的百分比; 括号内为 GenBank 登录号; 标尺长度代表遗传距离。
Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar represents the evolution of the 52k gene sequences.

图3 *hexon* 基因系统发育进化树Figure 3 Phylogenetic tree based on partial sequence of *hexon* gene

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算形成该节点的百分比; 括号内为 GenBank 登录号; 标尺长度代表遗传距离。
 Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar represents the evolution of the *hexon* gene sequences.

52k 基因片段存在两处点突变, 位点 1 (site1) 有单核苷酸突变(T→C), 该位点处, 中国分离株和国外分离株均为 T; 位点 2 (site2) 与位点 1 一样, 也是单核苷酸突变(T→C), 参考毒株在该位点均为 T (图 4A)。

对分离株 L160962 扩增得到的 *hexon* 基因部分序列与参考序列进行比对, 分离株 L160962 在 *hexon* 基因 593 bp 片段中主要有 3 处位点的差异: 位点 1

(site1) 有单个核苷酸的突变(C→G), 该位点处中国流行毒株和国外参考毒株均为 C; 位点 2 (site2) 和位点 3 (site3) 处, 分离株 L160962 与已经报道的中国分离毒株(JSJ13 和 HN/151025)一致, 与国外毒株(MX-SHP95、ON1 和 KR5)不同(图 4B), 提示这两处位点是 FAdV-4 中国流行毒株的分子特征之一, 疫苗源 FAdV 分离株 L160962 与中国当前流行毒株分子特征相近。

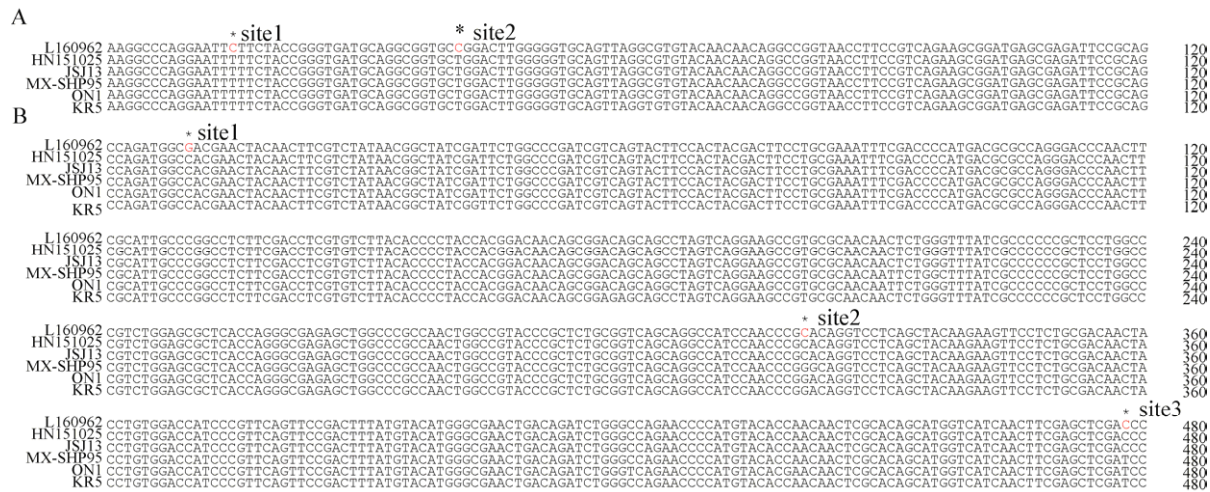


图4 分离株 L160962 52k 和 hexon 基因片段分子特征

Figure 4 Molecular characteristic of the partial sequence of 52k and hexon gene of isolate L160962

注: A: 分离株 L160962 52k 基因片段序列比对; B: 分离株 L160962 hexon 基因片段序列比对。

Note: A: Multiple alignment based on the partial sequence of 52k gene of isolate L160962; B: Multiple alignment based on the partial sequence of hexon gene of isolate L160962.

3 讨论

过去 FAdV 很少引发鸡群大面积发病, 而且鲜有高死亡率的报道, 因此很少受到人们的关注。近年来, FAdV 感染鸡群呈普遍现象, 甚至呈地区性流行^[16], 尤以血清 4 型 FAdV 所致的肝炎-心包积水综合征最为严重且死亡率较高。FAdV 可经粪口途径水平传播, 也可经鸡胚进行垂直传播。用于疫病防控的生物制品一旦经感染鸡胚污染 FAdV, 不仅会导致 FAdV 的广泛传播, 而且会对感染鸡的免疫系统造成很大损伤, 使感染鸡的免疫力下降, 若存在其它病原混合感染, 则易引发大面积发病并伴有不同程度的死亡。由 FAdV 引发的 IBH 死亡率约为 10%–30%, HPS 的死亡率高达 30%–90%。我国自 2013 年开始陆续有 HPS 的报道, 至 2014 年该病在我国各地鸡群大面积暴发。然而, 鸡群突然暴发 HPS 的原因尚不清楚, 是鸡群中本就存在高致病力的 FAdV 还是 FAdV 在进化过程中突然出现致病力增强导致鸡群严重发病和死亡, 又或是鸡胚源弱毒活疫苗的污染致使病毒经疫苗传播且在鸡群中经过传代致使病毒的致病力增强仍是需要解答的问题。为调查近年来我国鸡群中 FAdV 大面积暴发

的原因, 本研究对某些商品化弱毒活疫苗进行监测, 以查明我国目前使用的弱毒活疫苗是否存在禽腺病毒的污染。

禽腺病毒 Hexon 蛋白是 FAdV 的主要免疫保护性蛋白, 含有主要的血清型特异性抗原决定簇^[8]。Hexon 蛋白包括 Loop1、Loop2 及 P1 区三部分, 此区域有大量抗原和亲水性集团聚集, 具有血清型特异性, 是 FAdV 基因型(种)和血清型分类的主要依据^[9-10]。52k 基因在各血清型的 FAdV 基因组中较为保守, 适合用于不同血清型/种禽腺病毒的 PCR 检测。因此, 本研究对分离株 L160962 的 52k 和 hexon 基因扩增并测序鉴定, 经 BLAST 在线分析, L160962 毒株的 52k 和 hexon 基因与 C 种血清 4 型 FAdV 在核苷酸序列上具有较高的相似性。与国内外 FAdV 代表毒株的相应序列进行相似性分析和系统发育进化分析, 结果表明, L160962 毒株与 FAdV 血清 4 型中国分离株的相似性最高, 高达 100%。系统发育树拓扑结构表明, 分离毒株与中国流行毒株位于同一分支, 均为血清 4 型, 且其亲缘关系最近。相似性比对发现, 疫苗中分离的 L160962 株与当前中国分离株存在某些点的分子差异, 但是该分离株是否是我国当前流行的 FAdV-4 基因组序列存

在差异需经进一步基因组解析来说明。

已有报道,许多禽用弱毒疫苗可被一些外源病毒污染,最为常见的是 ALV 和 REV 污染^[17-18]。造成这一现象的主要原因是弱毒疫苗在生产过程中使用的鸡胚被外源病毒污染,这些外源病毒主要是一些能够垂直传播的病毒。研究表明,FAV 以水平传播为主,也可经卵垂直传播^[14],最近有关疫苗中 FAdV 污染的报道^[19]证实了我国现有疫苗中存在 FAdV 的污染。对本研究分离的 L160962 毒株与已发表的从新城疫疫苗中分离的血清 4 型 FAdV-N22 (KU764777)毒株 *hexon* 基因同源序列进行比对,相似性高达 99.64%,在进化树中位于同一分支。本研究组对禽腺病毒感染进行血清流行病学研究发现,未经免疫的鸡群或者 1 日龄雏鸡抗体水平较高(数据未发表),提示 FAdV 可能经卵垂直传播,这种传播方式也对鸡胚源疫苗的制备产生安全隐患。

本研究组对我国鸡群感染 FAdV 进行流行病学调查,血清 4 型 FAdV 在我国鸡群中分布广泛,我国东北、华东和华中地区鸡群有 FAdV-4 的感染和流行^[13]。感染 FAdV-4 后的康复鸡可长期经粪便等排泄物排毒,对环境造成污染;反之,污染的环境又可导致鸡群感染,形成污染-感染的循环链。一旦种鸡群发生感染,病原可经卵垂直传播,进而感染鸡胚以及鸡胚源生物制品。疫苗的污染又可造成鸡群感染和环境的污染,进而形成疫病传播源。因此建议,鸡胚源禽用疫苗生产和质检过程中,应加强对 FAdV 外源病毒污染的检测。

参 考 文 献

- [1] Asthana M, Chandra R, Kumar R. Hydropericardium syndrome: current state and future developments[J]. Archives of Virology, 2013, 158(5): 921-931
- [2] Hess M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review[J]. Avian Pathology, 2000, 29(3): 195-206
- [3] Mittal D, Jindal N, Tiwari AK, et al. Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens[J]. Virusdisease, 2014, 25(1): 114-119
- [4] Vera-Hernández PF, Morales-Garzón A, Cortés-Espinosa DV, et al. Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl Aviadenovirus serotype 4[J]. Avian Pathology, 2016, 45(1): 73-81
- [5] Mase M, Nakamura K, Minami F. Fowl adenoviruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Japan, 2009-2010[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2012, 74(8): 1087-1089
- [6] Kim JN, Byun SH, Kim MJ, et al. Outbreaks of hydropericardium syndrome and molecular characterization of Korean fowl adenoviral isolates[J]. Avian Diseases, 2008, 52(3): 526-530
- [7] Gjevre AG, Kaldhusdal M, Eriksen GS. Gizzard erosion and ulceration syndrome in chickens and turkeys: a review of causal or predisposing factors[J]. Avian Pathology, 2013, 42(4): 297-303
- [8] Meulemans G, Couvreur B, Decaesstecker M, et al. Phylogenetic analysis of fowl adenoviruses[J]. Avian Pathology, 2004, 33(2): 164-170
- [9] Pichla-Gollon SL, Drinker M, Zhou XY, et al. Structure-based identification of a major neutralizing site in an adenovirus hexon[J]. Journal of Virology, 2007, 81(4): 1680-1689
- [10] Raue R, Gerlach H, Müller H. Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus (PsAdV)[J]. Archives of Virology, 2005, 150(10): 1933-1943
- [11] Marek A, Nolte V, Schachner A, et al. Two fiber genes of nearly equal lengths are a common and distinctive feature of Fowl adenovirus C members[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 156(3/4): 411-417
- [12] Günes A, Marek A, Grafl B, et al. Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAV-A to FAV-E)[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 183(2): 147-153
- [13] Li HX, Wang J, Qiu LY, et al. Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis-hydropericardium syndrome in chickens in China[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2016, 45: 230-241
- [14] Li HY, Yin YB, Guo YY, et al. Isolation and PCR identification of 12 strains of inclusion body hepatitis virus from clinical broilers[J]. Chinese Veterinary Science, 2010, 40(7): 722-727 (in Chinese)
李海英, 尹燕博, 郭妍妍, 等. 12 株肉仔鸡包涵体肝炎病毒的分离和 PCR 鉴定[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(7): 722-727
- [15] He XM, Zhang K, Qin AJ, et al. Identification of an isolate of fowl adenovirus group I virus[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2005, 27(1): 42-45 (in Chinese)
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
- [16] Zhao J, Zhong Q, Zhao Y, et al. Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133073
- [17] Li JP, Dong X, Yang CH, et al. Isolation, identification, and whole genome sequencing of reticuloendotheliosis virus from a vaccine against Marek's disease[J]. Poultry Science, 2015, 94(4): 643-649
- [18] Zhao P, Dong X, Cui ZZ. Isolation, identification, and gp85 characterization of a subgroup A avian leukosis virus from a contaminated live Newcastle Disease virus vaccine, first report in China[J]. Poultry Science, 2014, 93(9): 2168-2174
- [19] Li Y, Fu JY, Chang S, et al. Isolation, identification, and hexon gene characterization of fowl adenoviruses from a contaminated live Newcastle disease virus vaccine[J]. Poultry Science, 2017, 96(5): 1094-1099