

# 鸡包涵体肝炎病原检测及病理学观察

王 婉, 王彦红, 刘 伊, 金文杰, 石火英\*

(扬州大学兽医学院病理教研室, 禽类预防医学教育部重点实验室, 扬州 225009)

**摘 要:** 取临床疑似鸡包涵体肝炎病例的肝组织, 接种 SPF 鸡胚获取尿囊液, 对获取的尿囊液进行 PCR 扩增和基因测序分析, 成功分离并鉴定出 1 株鸡包涵体肝炎病毒, 同时对送检病例采样进行病理组织学观察。将病死鸡肝组织研磨后, 经尿囊腔接种 9 日龄的 SPF 鸡胚, 用获得的尿囊液提取病毒 DNA, 成功获得 DNA 模板。根据已发表的 I 群禽腺病毒 *hexon* 全基因的保守区域设计并合成 1 对引物, 用这对引物对病毒的 DNA 模板进行 PCR 扩增, 结果扩增出与目的基因大小一致的片段。病理学观察见肝组织淤血, 细胞核浓缩, 发生坏死, 核内出现包涵体, 伴有脂肪变性。测序分析表明, 分离株与 I 群禽腺病毒中血清 4 型相似性为 98.6%, 与其他血清型的相似性为 68.7%~96.9%, 与 II 群禽腺病毒的鸡出血性肠炎病毒和 III 群禽腺病毒的减蛋综合征病毒的相似性为 44.6%, 最终确定分离病毒为 I 群禽腺病毒, 为进一步鉴定和分离 I 群禽腺病毒提供了依据。

**关键词:** 鸡包涵体肝炎; 禽腺病毒; 分离; 鉴定; *hexon* 基因

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)02-0273-06

## Pathogenic Detection and Pathological Observation of Inclusion Body Hepatitis in Chicken

WANG Wan, WANG Yan-hong, LIU Yi, JIN Wen-jie, SHI Huo-ying\*

(Key Lab for Avian Preventive Medicine of Ministry of Education, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** One strain of the inclusion body hepatitis virus (IBHV) was isolated and identified based on pathological changes, PCR and sequence analysis in sick chicken. The DNA of the IBHV was extracted from allantoic fluid obtained from SPF egg, which was inoculated with the sick chicken liver. The primers were designed based on the conserved *hexon* sequence of avian adenovirus. The PCR product of avian adenovirus was amplified and sequenced. The fatty degeneration, karyopyknosis, cell necrosis and basophilic inclusion bodies were observed in liver tissue from sick chicken. The sequencing results indicated that the virus shared 98.6% identity with FAV-4 in group I and 68.7%-96.9% identity with other serotypes in group I, and 44.6% identity with hemorrhagic enteritis virus in group II and egg drop syndrom virus in group III. These results confirmed that the isolated virus is a member of fowl adenovirus groups, and can cause chicken inclusion body hepatitis. Our research provides the basis for isolation and identification of group I avian adenovirus.

**Key words:** inclusion body hepatitis; fowl adenovirus; isolation; identification; *hexon* gene

禽腺病毒 (fowl adenovirus, FAV) 属于禽腺病 毒科禽腺病毒属, 根据其抗原性的不同可分为 3 个

收稿日期: 2014-06-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31172300); 江苏省高校自然科学基金重大项目 (12KJA230002); 高等学校博士学科点专项科研基金 (博导类) (20133250110002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD); 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心

作者简介: 王 婉 (1989-), 女, 甘肃白银人, 硕士生, 主要从事禽传染病方面的研究, E-mail: wangjiawanyun@126.com

\* 通信作者: 石火英, E-mail: hyshi@yzu.edu.cn

群,其中从鸡分离的 I 群 FAV 有 12 个血清型 (FAV1~12)。II 群 FAV 包括火鸡出血性肠炎病毒 (HEV)、大理石脾病病毒和鸡大脾病病毒,它们与 I 群 FAV 无抗原相关性。III 群 FAV 有减蛋综合征病毒 (egg drop syndrom virus, EDSV) 和从鸭分离到的腺病毒,它们与 I 群 FAV 只有部分共同抗原。I 群 FAV 含有相同的群抗原,其中比较著名的病毒株有鸡胚致死孤儿病毒 (CELO virus)、鹌鹑支气管炎病毒、鸡包涵体肝炎病毒<sup>[1]</sup>。而由 I 群 FAV 引起的鸡包涵体肝炎,作为一种散发病,虽时有发生,但若无并发症,死亡率并不高,尚未引起广泛关注,加之目前国内尚无有效的疫苗,该病时有发生,给养殖环境带来了潜在威胁<sup>[2]</sup>。鸡包涵体肝炎 (inclusion body hepatitis in chicken, IBH) 又称鸡贫血综合征 (anemia syndrome), 是由 FAV 引起的鸡的一种急性传染病,主要侵害雏鸡,多呈急性经过。IBH 潜伏期一般 23 d,特征是发病后 34 d 突然出现死亡,高峰期一般第 5 天停止,但偶尔也持续 2~3 周。发病率低,病鸡呈卷曲姿势,羽毛粗乱,在 2 d 内死亡或康复,死亡率为 10%~30%,与传染性法氏囊病、鸡新城疫、禽白血病、马立克病、网状内皮增生症、大肠埃希菌病等发生混合感染时可导致鸡群较高的死亡率<sup>[3]</sup>。正常情况下 IBH 多见于 3~7 周龄的肉鸡,但早至 7 日龄,晚到 20 周龄也有发病。

本试验通过观察鸡的大体病变,病理学观察,用鸡肝病料接种 SPF 鸡胚分离病毒,提取 DNA,再经 PCR 鉴定,最终通过对 FAV *hexon* 基因进行序列及遗传进化分析,确定该病毒为鸡包涵体肝炎病毒 (IBHV),为 I 群 FAV 的诊断提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要设备及试剂

SW-CJ-1F 型单人双面净化工作台、特种净化工作台均购自苏州净化设备有限公司,隔水式电热恒温培养箱购自上海跃进医疗器械厂,离心机、单道移液器均购自 Eppendorf,高压蒸汽灭菌器购自基因有限公司,基因扩增仪购自 Applied Biosystems,显微镜购自德国 ZEISS,医用冷冻箱购自 SANYO, DYY-8C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂。测序公司为南京金斯瑞公司。

超纯水,5×buffer,10×buffer,dNTP,上游引物,下游引物,cDNA 模板,MgCl<sub>2</sub>,高保真酶,20 mg·mL<sup>-1</sup>蛋白酶 K,10%SDS,苯酚,氯仿,无水乙

醇,70%乙醇,PBS,四抗 PBS 等。

### 1.2 病料及处理

疑似鸡包涵体肝炎的病死肉鸡,由江苏省某地区的鸡场送检。

采病死鸡的肝,在灭菌研钵中用剪刀剪碎,加含有抗生素的 PBS (含青霉素、庆大霉素、卡那霉素、链霉素) 进行研磨,分装到 1.5 mL 指形管中,反复冻融 3 次后,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液作为待检样品,放到 -20 °C 保存。

采病死鸡肝于 15% 福尔马林溶液 (5.55%~6% 甲醛溶液) 中固定。

### 1.3 病理学观察

常规制备石蜡切片,HE 染色,中性树脂封片,观察病变并拍照。

### 1.4 鸡胚接种

10 日龄 SPF 鸡胚购自北京梅里亚公司。取 2 SPF 鸡胚,分别进行标记,照胚画出气室及接种部位,经碘酒、酒精消毒后,用镊子开孔。经尿囊腔接种上述病毒分离液 0.2 mL,置 37 °C 孵化,每日观察 1 次,连续 7 d。收集 17 d 后冻死胚的尿囊液,做病毒鉴定。

### 1.5 病毒 DNA 的提取

取接种疑似鸡包涵体肝炎病毒的尿囊液 437.5 μL,经 90 °C 水浴 10 min 作预处理后,加入 20 mg·mL<sup>-1</sup> 蛋白酶 K 12.5 μL (终质量浓度为 500 μg·mL<sup>-1</sup>)、10% SDS 50 μL (终相对体积质量浓度为 1%),置 56 °C 水浴作用 40 min,再加入等体积的苯酚和氯仿各 200 μL,充分混匀,10 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 离心 5 min,小心取上层液体置于另一指型管中,再加入 2 倍体积的无水乙醇,混匀,-20 °C 沉淀 20~30 min。取出后以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 离心 15 min,弃上清,70% 乙醇洗涤一次,室温干燥,用 30 μL 超纯水悬浮,-20 °C 保存备用。

### 1.6 引物设计和合成

根据 GenBank 发表的 FAV I 群的 *hexon* 基因保守序列,设计一对引物。上游引物为 5'-ATGT-CAGCAGTAGGCGATTGT-3'; 下游引物为 5'-CCCGTCATGCCGTCGCTCTCTAAGGGT-3'; 预期扩增片段 2 914 bp。引物由上海生工生物工程公司合成。

### 1.7 鸡包涵体肝炎病毒 *hexon* 基因的扩增

以 1.5 提取的 DNA 为模板,扩增 *hexon* 目的基因。采用 25 μL 体系,PCR 反应条件:98 °C 预变

性 2 min;98 °C 变性 10 s,51 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 15 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.8 测序和分析

将 1.7 中的 PCR 产物送至金斯瑞公司测序,应用 DNASTar 软件 MegAlign 的 Clustal W 方法将序列与禽腺病毒各群 *hexon* 核苷酸和推测的氨基酸序列进行分析,比较其相似性及差异性,找出不同血清型之间的序列差异和氨基酸差异,从而通过 *hexon* 的全基因序列区分出不同血清型。

## 2 结 果

### 2.1 大体病变结果

对病死鸡进行剖检,可见心包积液,蓄积大量黄褐色液体(图 1);肝出现明显的出血斑和出血点。

### 2.2 病理学观察结果

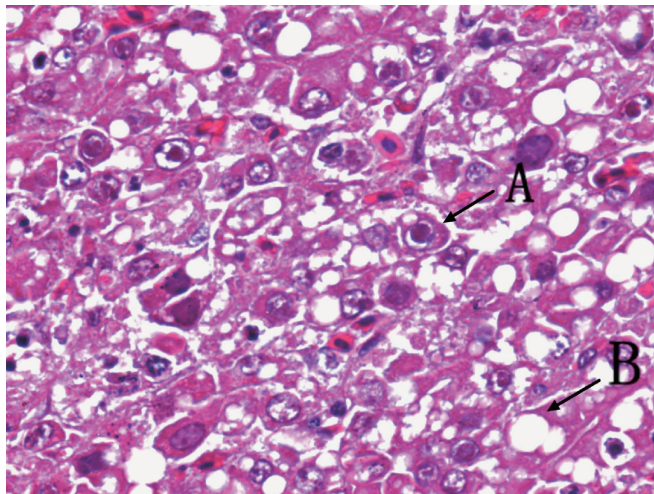
将病死鸡肝组织用福尔马林进行固定,制作切



图 1 病鸡心包积液

Fig. 1 Pericardial effusion in sick chicken

片,HE 染色后观察发现,肝细胞发生脂肪变性(图 2),肝组织淤血,并可见炎性细胞浸润;部分肝细胞发生坏死。胞质溶解呈空网状,组织界限不清,正常结构消失;肝细胞中出现嗜碱性包涵体(图 2)。



A. 病鸡肝细胞内有嗜碱性包涵体; B. 病鸡肝细胞脂肪变性

A. Basophilic inclusion bodies of liver cell in sick chicken; B. Fatty degeneration of liver cell in sick chicken

图 2 病鸡肝组织病理变化 (HE 染色) 1 000×

Fig. 2 Histopathological changes of liver in sick chicken (HE staining) 1 000×

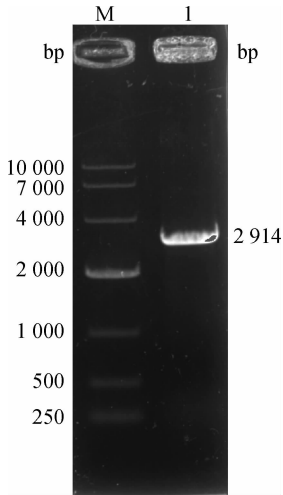
### 2.3 PCR 检测结果

提取 SPF 鸡胚尿囊液的 DNA 进行 PCR 扩增。根据鸡包涵体肝炎病毒的 *hexon* 基因组序列设计的特异性引物,以来自疑似病料的基因组 DNA 做模板进行扩增。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察,得到特异性扩增条带,与预期设计的扩增片段大小相符,长度约为 2 914 bp(图 3)。

### 2.4 测序结果

经金斯瑞公司测序和拼接,得知该 IBHV *hex-*

*on* 基因序列有 2 914 bp,约编码 900 个氨基酸,简称 BHT-2N。从 GenBank 中下载已经登陆的其他 FAV 相关毒株(相应毒株登录号为 FAV1: U46933. 1; FAV4: NC-015323. 1; FAV8: GU734104. 1; FAV9: AF083975. 2; FAV10: U26221. 1; HEV: AF074946. 1; EDS: Y09598. 1) 的 *hexon* 基因序列,通过 DNASTar 软件 MegAlign 工具 ClustalW 方法对测序结果进行多序列比较分析。分析表明,分离株与 I 群 FAV 中血清 4 型相似性为 98.6%,与其他血清型



M. DL10000 DNA 相对分子质量标准; 1. 病毒 DNA 的 PCR 扩增产物

M. DL10000 DNA marker; 1. PCR amplification results of DNA

图 3 病毒 DNA 的 PCR 扩增产物

Fig. 3 PCR amplification results of Inclusion Body Hepatitis virus DNA

的相似性为 68.7%~96.9%，与 II 群 FAV 的 HEV 和 III 群 FAV 的 EDSV 相似性为 44.6% (图 4)。遗传进化分析显示 (图 5)，本试验分离株与 I 群 FAV 亲缘关系最近，特别是与血清 4 型和 10 型的 FAV 更接近，与血清 8 型、9 型和 1 型相对较远，与 II 群 FAV 的 HEV 和 III 群 FAV 的 EDSV 明显属于不同分支，亲缘关系最远，结果显示，分离株为 I 群禽腺病毒。

### 3 讨论

鸡包涵体肝炎的病理特征是变质性肝炎，最显著的变化是肝大，呈土黄色至褐色，质地脆弱，没有光泽，被膜下散在出血点或出血斑，并有针尖大黄白色坏死灶<sup>[4]</sup>。同时，心包积液也是禽类的一种疾病<sup>[5-6]</sup>，通过病毒分离，用电子显微镜可以确定其与禽腺病毒有关<sup>[7-8]</sup>。许多造成心包积液的病毒属于 FAV 4 型，并且是高致病性的<sup>[9]</sup>。在该病例中，肝

		Percent identity									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Divergence	1	■	51.7	74.3	98.6	74.2	68.7	96.9	37.5	1	BHT-2N
	2	81.8	■	5.4	5.1	5.4	5.6	46.7	30.5	2	EDS
	3	30.7	129.4	■	38.5	40.5	39.5	74.6	5.2	3	FAV-1
	4	1.5	137.3	72.9	■	40.4	37.9	97.0	4.7	4	FAV-4
	5	32.1	130.0	62.2	70.3	■	65.5	74.8	5.0	5	FAV-8
	6	40.4	125.9	65.7	74.7	35.8	■	70.5	5.8	6	FAV-9
	7	2.9	83.8	31.8	2.8	33.5	40.5	■	33.3	7	FAV-10
	8	93.4	79.3	123.5	134.1	128.3	121.7	97.2	■	8	HEV
		1	2	3	4	5	6	7	8		

图 4 分离的 FAV 毒株与其他毒株 hexon 基因氨基酸和核苷酸序列的相似性比较

Fig. 4 The nucleotides homology comparison of the isolated virus and other viruses

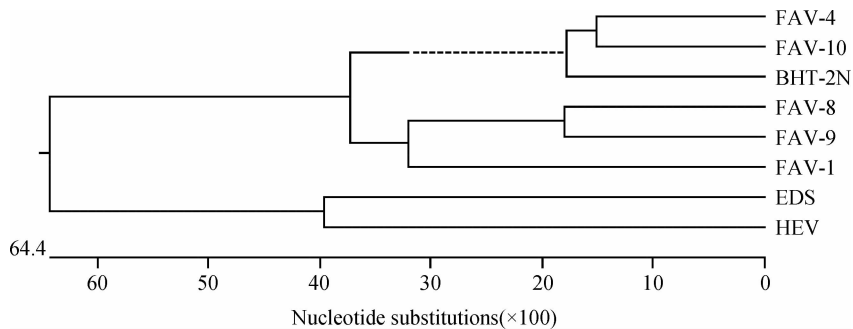


图 5 FAV hexon 基因核苷酸序列系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on FAV hexon nucleotides

出现出血点,心包积液,肝和心同时发生病变可能是造成鸡感染鸡包涵体肝炎病毒后死亡的原因。

最具有诊断意义的镜检病变也在肝<sup>[6]</sup>,该病例组织切片中肝细胞坏死,发生脂肪变性,细胞核溶解消失,在肝细胞的核中出现嗜碱性小体,这是鸡包涵体肝炎镜检的典型病变。

FAV 在肝、胰腺及肠管中的含量最高,一般不感染异种动物。I 群 FAV 可以在鸡胚中增殖,因此用鸡胚来扩增病毒可以很好地分离 I 群 FAV。本试验尝试用肝组织直接提取 DNA,进行 PCR 鉴定后,没有分离到病毒,通过 SPF 鸡胚进行病毒扩增后,从尿囊液中提取 DNA,进行 PCR 鉴定后分离到病毒。但是病毒分离株对鸡胚没有明显致病作用,鸡胚接种病毒后未见眼观的病变,这与 I 群 FAV 其他分离株的特性不完全一致,通常鸡胚的病变包括胚体充血或出血、发育不良、胚体卷曲、不同程度肝炎和脾大等。另外,病毒的增殖没有致死鸡胚,在鸡胚 17 日龄将其冻死,取尿囊液提取 DNA。

Hexon 蛋白是 FAV I 的主要结构蛋白,它与五邻体蛋白和纤维蛋白一起构成 FAV I 的外壳,Hexon 蛋白含有主要的属和亚属特异性抗原决定簇和次要的种特异性抗原决定簇,是中和抗体的靶目标和主要保护性抗原基因,与致病性密切相关,因此作为诊断抗原具有良好的应用前景<sup>[10]</sup>。hexon 基因开放阅读框长约 2 829 bp,编码 943 个氨基酸,是病毒引起宿主免疫应答的重要保护性抗原决定簇,含有大量的保守性区,抗原性强,暴露性好,并具有群特异性,是 Hexon 蛋白的主要抗原区<sup>[11]</sup>。据报道,hexon 基因编码的六邻体蛋白带有主要的属和亚属特异性抗原决定簇和次要的种特异性抗原决定簇<sup>[12]</sup>,可以引起极强的中和反应,当六邻体被替代或突变将导致中和免疫缺失<sup>[13]</sup>。本研究通过对分离毒株的 hexon 基因进行序列分析,比较该毒株与禽腺病毒 4 型标准毒株的核苷酸序列,发现本试验分离到的病毒有的基因发生了突变,该突变基因是否与病毒的中和反应有关尚需进一步研究。

目前,在该病毒的基因中,hexon 是研究范围最广的,具有群与型的特异性,包括 4 个可变环 L1-L4 结构<sup>[14,15]</sup>,不同毒株的 hexon 序列均已公布,因此,选取该基因进行克隆与序列分析<sup>[16-17]</sup>,可鉴定出分离株属于 FAV 哪个群<sup>[18]</sup>,并可区分同一个群的不同血清型。本试验中,用 hexon 基因序列组设计的引物进行 PCR 扩增与克隆,测序片段包括了该基

因的全序列,分离株与 I 群 FAV 同源性最高,亲缘关系最近,特别与血清 4 型最接近,而与 II 群、III 群 FAV 亲缘关系最远,属于不同的进化支。本研究为进一步研究鸡包涵体肝炎病毒打下坚实的基础。

### 参考文献 (References):

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京:科学出版社,1997:1104-1129.  
YIN Z, LIU J H. Animal virology [M]. Beijing: Science Press, 1997: 1104-1129. (in Chinese)
- [2] 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.  
LI H Y, YIN Y B, GUO Y Y, 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)
- [3] 周 斌,刘华雷,曹瑞兵,等. 污染疫苗的禽腺病毒分离和鉴定 [J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(3): 78-80.  
ZHOU B, LIU H L, CAO R B, et al. Isolation and identification of avian adenovirus of contaminated vaccine [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2004, 27(3): 78-80. (in Chinese)
- [4] 马学恩,孔小明,王凤龙,等. 家畜病理学 [M]. 北京:中国农业出版社, 2007: 49-410.  
MA X E, KONG X M, WANG F L, et al. Pathology of domestic animals [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 49-410. (in Chinese)
- [5] ABE T, NAKAMURA K, TOJO H, et al. Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of hydropericardium syndrome in adult broiler breeders and broiler chicks [J]. *Avian Dis*, 1998, 42(3): 606-612.
- [6] MASE M, NAKAMURA K, IMADA T. Characterization of Fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens with hydropericardium syndrome based on analysis of the short fiber protein gene [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2010, 22(2): 218-223.
- [7] CHANDRA R, SHUKLA S K, KUMAR M, et al. Electron microscopic demonstration of an adenovirus in the hepatocytes of birds experimentally infected with hydropericardium syndrome [J]. *Vet Rec*, 1997, 140 (3): 70-71.
- [8] DAHIYA S, SRIVASTAVA R N, HESS M, et al. Fowl adenovirus serotype 4 associated with outbreaks of infectious hydropericardium in Haryana, India [J]. *Avian Dis*, 2002, 46(1): 230-233.
- [9] MITTAL D, JINDAL N, TIWARI A K, et al. Charac-

- terization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens [J]. *Virus Dis*, 2014, 25(1): 114-119.
- [10] PICHLA-GOLLON S L, DRINKER M, ZHOU X, et al. Structure-based identification of a major neutralizing site in an adenovirus hexon [J]. *J Virol*, 2007, 81(4): 1680-1689.
- [11] GANESH K, SURYANARAYANA V, RAGHAVAN R, et al. Nucleotide sequence of L1 and part of P1 of hexon gene of fowl adenovirus associated with hydropericardium hepatitis syndrome differs with the corresponding region of other fowl adenoviruses [J]. *Vet Microbiol*, 2001, 78(1): 1-11.
- [12] 国纪垒, 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.  
GUO J L, DIAO Y X, XUE C, et al. Isolation and identification of inclusion body hepatitis and hexon gene cloning and analysis. [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(12): 1773-1777. (in Chinese)
- [13] 戴志红, 谢 磊, 赵 耘. 腺病毒的生物学特性 [J]. *中国兽药杂志*, 2007, 41(2): 36-39.  
DAI Z H, XIE L, ZHAO Y. Biological characteristics of adenovirus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2007, 41(2): 36-39. (in Chinese)
- [14] XU L, BENSON S D, BURNETT R M. Nanoporous crystals of chicken embryo lethal orphan (CELO) adenovirus major coat protein, hexon [J]. *J Struct Biol*, 2007, 157(2): 424-431.
- [15] STEER P A, O'ROURKE D, GHORASHI S A, et al. Application of high-resolution melting curve analysis for typing of fowl adenoviruses in field cases of inclusion body hepatitis [J]. *Aust Vet J*, 2011, 89(5): 184-192.
- [16] MASE M, MITAKE H, INOUE T, et al. Identification of group I-III avian adenovirus by PCR coupled with direct sequencing of the hexon gene [J]. *J Vet Med Sci*, 2009, 71(9): 1239-1242.
- [17] NAKAMURA K, MASE M, YAMAMOTO Y, et al. Inclusion body hepatitis caused by fowl adenovirus in broiler chickens in Japan, 2009-2010 [J]. *Avian Dis*, 2011, 55(4): 719-723.
- [18] 罗思思, 谢芝勋, 邓显文, 等. I 群禽腺病毒分离鉴定及 hexon 基因的序列分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2012, 44(1): 52-56.  
LUO S S, XIE Z X, DENG X W, et al. Isolation and identification of group I fowl adenovirus and genetic analysis of its hexon gene [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2012, 44(1): 52-56. (in Chinese)

(编辑 白永平)