

吴 双, 张 聪, 袁慧莎, 等. 血清 4 型禽腺病毒 *TaqMan* 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 江苏农业学报, 2023, 39( 1 ): 134-141.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.01.016

## 血清 4 型禽腺病毒 *TaqMan* 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用

吴 双<sup>1</sup>, 张 聪<sup>1,2</sup>, 袁慧莎<sup>1,2</sup>, 戴利霞<sup>2</sup>, 林梦舟<sup>1</sup>, 吴 植<sup>1</sup>, 朱善元<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300; 2. 和盛食品集团有限公司, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 为建立快速检测血清 4 型禽腺病毒病( Fowl aviadenovirus serotype 4, FAdV-4) 的基于 *TaqMan* 探针的 Quantitative real-time PCR (qPCR) 检测方法, 本研究根据 *Hexon* 基因序列, 设计相关的 qPCR 特异性引物和探针, 经特异性、敏感性和重复性试验以及反应程序等系列优化后, 最终建立荧光定量检测方法并应用于临床样品的病原检测。FAdV-4 的 qPCR 结果表明, 优化后标准曲线决定系数( $R^2$ ) 为 0.998, 扩增效率( $E$ ) 为 95.226%, 该方法效果良好。利用该方法, 除 FAdV-4 外其他禽类常见病原均未检测到, 该方法具有良好的特异性。该 qPCR 方法检出阳性的最低拷贝数为 100 个拷贝, 而普通 PCR 方法检出阳性的最低拷贝数为 10 000 个拷贝, 说明其具有良好的灵敏度。组内和组间变异系数均  $\leq 0.22\%$ , 该方法的重复性较高。对 180 份从江苏、安徽、江西和广西等省份采集的临床疑似样品进行检测, 结果显示, qPCR 方法检出率为 51.1%, 而普通 PCR 方法检出率为 32.8%; 同时基于 qPCR 引物的检出符合率为 100.00%, 而基于普通 PCR 特异性引物检出的符合率为 82.35%, 表明该 qPCR 方法针对临床疑似样品的检测准确性更高。该方法的建立有助于推动禽腺病毒病的分子流行病学研究和防控。

**关键词:** 血清 4 型禽腺病毒; 荧光定量 PCR; 临床应用

**中图分类号:** S831.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)01-0134-08

## Establishment and application of quantitative real-time PCR detection method for fowl aviadenovirus serotype 4 based on *TaqMan* probe

WU Shuang<sup>1</sup>, ZHANG Cong<sup>1,2</sup>, YUAN Hui-sha<sup>1,2</sup>, DAI Li-xia<sup>2</sup>, LIN Meng-zhou<sup>1</sup>, WU Zhi<sup>1</sup>, ZHU Shan-yuan<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Veterinary Bio-pharmaceutical High-Tech Research, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. Hesheng Food Group Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

**Abstract:** To establish rapid detecting method for fowl aviadenovirus serotype 4 (FAdV-4) detection based on quantitative real-time PCR (qPCR) with *TaqMan* probe, specific primers and *TaqMan* probe for qPCR were designed based on

*Hexon* gene sequence of FAdV-4 in GenBank. After a series of optimization operations of specificity, sensitivity, repetitive experiments and reaction procedure, the fluorescence quantitative detection method was finally established and was applied to the pathogen detection of clinical samples. qPCR results of FAdV-4 showed that, coefficient of determination ( $R^2$ ) of the optimized standard curve was 0.998, and the amplification efficiency ( $E$ ) was 95.226%, which indicated that the method had good

收稿日期: 2022-05-22

基金项目: 江苏高校“青蓝工程”项目[苏教师函(2020)10号]; 江苏省高等学校自然科学研究重大项目(21KJA230001); 江苏省 2019 年度高校优秀科技创新团队项目

作者简介: 吴 双(1983-), 女, 江苏徐州人, 博士, 教授, 主要从事动物传染病的防控工作。(Tel) 0523-86356818; (E-mail) 108570936@qq.com。张聪为共同第一作者

通讯作者: 朱善元, (E-mail) jstzsy@126.com

effect. Other common avian pathogens were not detected except for FAdV-4 by using the detecting method. The lowest copy for detecting sensitivity by qPCR method was 100, while the lowest copy for detecting sensitivity by conventional PCR method was 10 000, which indicated that the qPCR method had good sensitivity. The variation coefficients between and within groups were all  $\leq 0.22\%$ , which showed high repeatability of the method. 180 clinical suspected samples collected from Jiangsu province, Anhui province, Jiangxi province and Guangxi Zhuang Autonomous Region were detected. The results showed that, positive detection rate of qPCR method was 51.1%, while the value of conventional PCR method was 32.8%. The positive detection rate based on qPCR primers was 100.00%, and the value based on conventional PCR specific primers was 82.53%, which revealed that the qPCR method had higher positive detection rate for clinical suspected FAdV-4 sample detection. The establishment of quantitative real-time PCR with *TaqMan* probe detection method is conducive to promote molecular epidemiological investigation and control of fowl aviadenovirus.

**Key words:** fowl aviadenovirus serotype 4; fluorescent quantitative PCR; clinical application

禽腺病毒(Fowl adenovirus, FAdV)属于腺病毒科禽腺病毒属,是无囊膜的双链 DNA 病毒<sup>[1]</sup>。FAdV 分为 A~E 5 个种,1~7、8a、8b、9~11 等 12 个血清型<sup>[2]</sup>,其中血清 4 型禽腺病毒致病能力较强,临床表现为心包积液综合征和/或包涵体肝炎,可以垂直传播及水平传播,没有明显的季节性,主要感染 3~6 周龄的鸡,死淘率高达 30%~80%,是目前给养鸡业造成巨大损失的重要病原之一<sup>[3-5]</sup>。

然而,目前针对 FAdV-4 的研究成果较少,能用于临床的有效免疫防控措施更少,国内商品化禽腺病毒灭活苗仅有新流腺三联灭活疫苗。因此,效率高、速度快、特异性强的病原诊断方法对该病的防控十分重要。目前已有的 FAdV-4 的检测方法有血清学检测、病毒的分离培养、普通 PCR 等,这些方法存在易出现假阳性、特异性低等缺点<sup>[6]</sup>。敏感性好和特异性高是 *TaqMan* 探针实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法的独特亮点,因此常被用于病原核酸检测<sup>[7]</sup>。由于 FAdV-4 给养禽业造成日益严重的经济损失且相关检测方法匮乏,因此本研究旨在建立一种能特异针对 FAdV-4 *Hexon* 基因的病原快速检测以及病毒载量测定的 qPCR 方法,为该病的防控提供新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物材料

特异性验证试验中涉及的生物材料包括商品化活疫苗毒:新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)、传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)、鸡传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus, IBDV)、鸡痘病毒(Fowlpox virus, FPV)、传染性喉气管炎病毒(Infectious laryngotra-

cheitis virus, ILTV)。以及本实验室鉴定、分离和保存的毒株:血清 4 型禽腺病毒(Fowl aviadenovirus serotype 4, FAdV-4)、H9 亚型禽流感病毒(Avian influenza virus of type H9, H9N2-AIV)、禽白血病病毒(Avian leukemia virus, ALV)和传染性贫血病病毒(Chicken anaemia virus, CIAV)。

### 1.2 试剂和仪器

本研究所用试剂和仪器主要包括:南京诺唯赞生物科技有限公司生产的凝胶回收、质粒提取试剂盒;康为世纪生物科技有限公司生产的病毒核酸提取试剂盒;宝生物工程有限公司生产的 Premix *Taq* (品名: TaKaRa *Taq* version 2.0 plus dye) DNA 酶、反转录试剂盒、Premix *Ex Taq*、DH5 $\alpha$ 、克隆载体 pMD<sup>®</sup> 19-T Vector、DNA marker;美国 ABI 公司生产的 QuantStudio<sup>®</sup> Q3 实时荧光定量 PCR 系统;美国 MP 公司生产的高速组织破碎仪。

### 1.3 引物和探针的设计与合成

参考 GenBank 数据库中的 FAdV-4 基因序列(登录号:MN102413.1),用 BioEdit 软件对其进行比对分析,针对 *Hexon* 基因序列的保守区,利用 Primer Express 设计 1 对 qPCR 引物与探针序列以及 1 对标准品引物,同时参考文献[8]合成 1 对普通 PCR 特异性引物,引物序列见表 1。本研究所涉及引物和探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.4 核酸提取及反转录

选取疑似阳性的新鲜临床样品 0.2 g 加入到 2 ml 研磨管中,然后加入 9 倍量的含有 4 种常用抗生素的 PBS (磷酸盐缓冲液),使用匀浆机将样品打碎,10 min, 12 000 r/min 高速离心后吸取上清液。参照病毒核酸提取试剂盒、反转录试剂盒说明书,进行核酸提取并对其中的 RNA 病毒核酸进行反转录。

提取的核酸和反转录产物低温保存备用。

### 1.5 重组质粒标准品制备

以提取的 FAdV-4 核酸为模板进行 *Hexon* 基因扩增,回收条带后电泳检测正确的条带。将回收产物与 pMD<sup>®</sup> 19-T Vector 连接后,转化至感受态细

胞,经蓝白斑平板筛选后挑取白斑进行扩增培养并进行菌落 PCR 鉴定。提取菌液 PCR 阳性质粒,测定浓度并进行双酶切鉴定,由南京擎科生物科技有限公司对检测合格的质粒进行测序,剩余质粒 -80 ℃ 保存,备用。

表 1 根据 *Hexon* 基因设计的 FAdV-4 引物序列及探针序列

Table 1 Primer and probe sequences of FAdV-4 designed based on *Hexon* gene

名称	引物/探针	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
标准品	FAdV-4-F	GTACCCTCCTACGAAATCGA	258
	FAdV-4-R	CCAGTTTCTGTGCTGTTGAAGGGGTT	
荧光定量 qPCR	FAdV-4-F122	GGTTCAGGGATAACTTCATT	122
	FAdV-4-R122	GAGCTCGGTATTCCGGTCGG	
	FAdV-4-P122	VIC-CTGTATCAGCACTCCGGCGTGTGC-DBQ1	
普通 PCR	FAdV-4-F	CAACTACATCGGGTTACAGGATAACTTC	667
	FAdV-4-R	CCAGTTTCTGTGCTGTTGAAGGGGTT	

### 1.6 qPCR 方法的建立与优化

1.6.1 反应条件优化 进行反应体系与反应条件的系列优化,确定最佳引物浓度、最适退火温度以及最合理的探针浓度。

1.6.2 标准曲线验证 质粒拷贝数 =  $6.02 \times 10^{23} \times$  质粒质量浓度 / (质粒 DNA 长度  $\times$  660), 重组质粒质量浓度为 120 ng/ $\mu$ l, 按公式换算可知重组质粒拷贝数为 1  $\mu$ l  $3.89 \times 10^{10}$  拷贝。首先将重组质粒稀释至 1  $\mu$ l  $1 \times 10^{10}$  拷贝,再按照 10 倍梯度进行倍比稀释,分别取 1  $\mu$ l  $1 \times 10^{10}$  拷贝至 1  $\mu$ l 10 拷贝浓度质粒作为模板,按上述优化的反应条件进行 qPCR 扩增。最终以质粒拷贝数的对数值为 X 轴,循环数(*Ct* 值)为 Y 轴,建立标准曲线<sup>[9]</sup>。

1.6.3 特异性验证 分别取 NDV、IBV、IBDV、FPV、ILTV、FAdV-4、H9N2-AIV、ALV、CIAV 的 DNA 或 cDNA,按照最优反应条件进行 qPCR 检测,用灭菌超纯水作阴性对照。阳性判定标准为有“S”形扩增曲线且 *Ct*  $\leq$  35, 阴性判定标准为无“S”形扩增曲线且 *Ct*  $>$  35, 当阴性和阳性对照检测结果均成立时样品结果才有效。

1.6.4 灵敏度验证

1.6.4.1 阳性质粒灵敏度验证 以 10 倍梯度稀释的阳性质粒(1  $\mu$ l  $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$  拷贝)作为模板进行 qPCR,确定其检测限,即灵敏度。

1.6.4.2 病料灵敏度 提取阳性新鲜病料的 DNA,

按已建立的标准曲线进行定量,然后进行 10 倍梯度倍比稀释,用作模板验证灵敏度。

1.6.5 重复性试验 使用 1  $\mu$ l  $1 \times 10^4$  拷贝、1  $\mu$ l  $1 \times 10^5$  拷贝、1  $\mu$ l  $1 \times 10^6$  拷贝 3 个浓度的标准质粒来验证重复性。

### 1.7 临床样品检测

对 2020 年 9 月至 2022 年 4 月来自江苏盐城、安徽阜阳、江西赣州、广西南宁等地区规模化养鸡场的疑似具有鸡心包积液-肝炎综合征(Hydropericardium hepatitis syndrome, HHS)的病鸡组织样(共计 180 份)分别应用 qPCR 方法和普通 PCR 方法进行检测分析。其中样品采集严格按照 2016 年修订的兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范(NY/T 541-2016)要求进行<sup>[10]</sup>。比较 2 种方法的阳性率,同时用普通 PCR 特异性引物对疑似样品进行检测,对扩增产物进行测序分析,比较普通 PCR 特异性引物与 qPCR 引物的精确性。

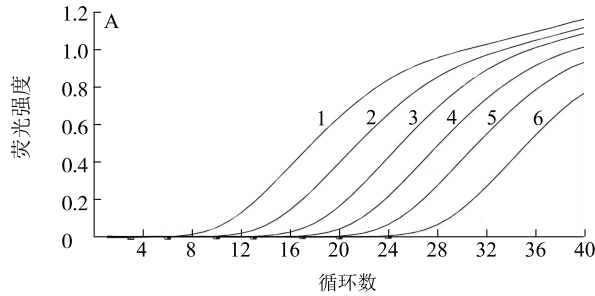
## 2 结果与分析

### 2.1 qPCR 反应条件的优化

首先将引物和探针均稀释至 10  $\mu$ mol/L,经矩阵法进行系列优化,qPCR 的最佳引物浓度为 0.3  $\mu$ mol/L,最佳探针浓度为 0.3  $\mu$ mol/L。最佳反应程序为:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 31 s,共计 40 个循环。

## 2.2 标准曲线的绘制

以标准质粒作为模板,浓度为  $1 \mu\text{l}$   $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^{10}$  拷贝,按照优化的反应条件进行 qPCR,其标准曲线见图 1,其线性关系表达式为  $Y = -3.442x +$

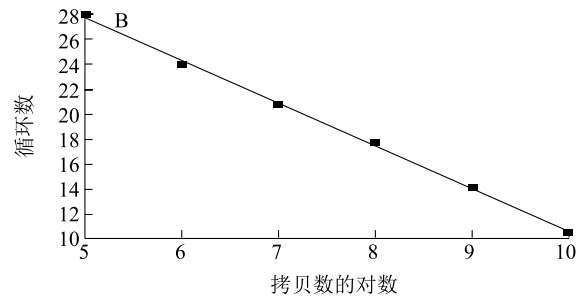


1~6 分别为  $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^5$  拷贝的标准质粒。

图 1 FAdV-4 的 qPCR 扩增曲线(A)与标准曲线(B)

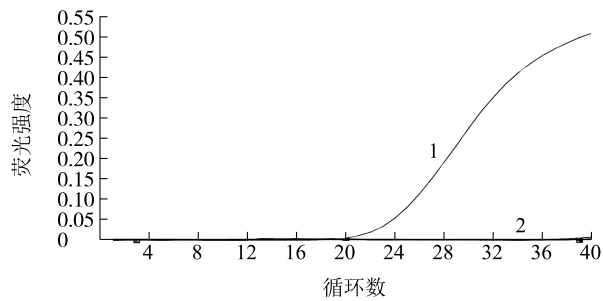
Fig.1 Amplification curve (A) and standard curve (B) of qPCR for FAdV-4

44.991,  $R^2 = 0.998$ , 扩增效率( $E$ ) = 95.226%, 可见该 qPCR 方法效果良好<sup>[11]</sup>,可以用来标定测试品的拷贝数。



## 2.3 qPCR 的特异性验证

应用 qPCR 方法对 NDV、IBV、IBDV、FPV、ILTV、FAdV-4、H9N2-AIV、ALV、CIAV 的 DNA 或 cDNA 进行检测,结果显示,出现典型“S”形扩增曲线且  $C_t \leq 35$  的病毒仅有 FAdV-4(图 2),其他病毒均无“S”形扩增曲线,证明此 qPCR 检测 FAdV-4 的方法具有特异性。



1: FAdV-4; 2: 阴性对照和其他病原。

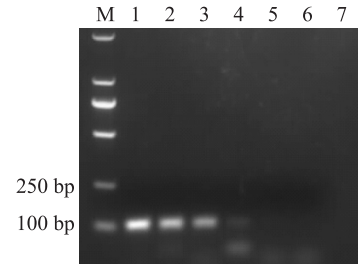
图 2 qPCR 特异性验证

Fig.2 Specificity test of qPCR

## 2.4 qPCR 的灵敏度检测

**2.4.1 检测标准质粒灵敏度** 以浓度为  $1 \mu\text{l}$   $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$  拷贝的标准质粒为模板,进行普通 PCR 检测与 qPCR 检测。结果发现 FAdV-4 的普通 PCR 检测灵敏度为  $1 \times 10^4$  拷贝(图 3),qPCR 检测灵敏度为  $1 \times 10^2$  拷贝(图 4)。

**2.4.2 检测病料灵敏度** 将 FAdV-4 阳性病料的 DNA 按已建立的标准曲线进行定量,并稀释得到浓度为  $1 \mu\text{l}$   $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^6$  拷贝的病料 DNA。结果(图



M: DL2000 DNA Marker; 1~6:  $1 \mu\text{l}$   $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^1$  拷贝的标准质粒; 7: 阴性对照。

图 3 FAdV-4 普通 PCR 检测标准质粒的灵敏度

Fig.3 Sensitivity of conventional PCR of FAdV-4 in detecting standard plasmids

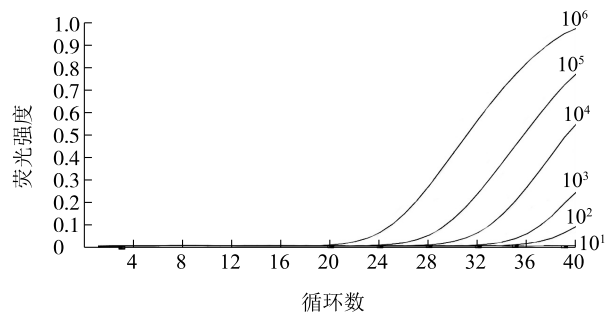
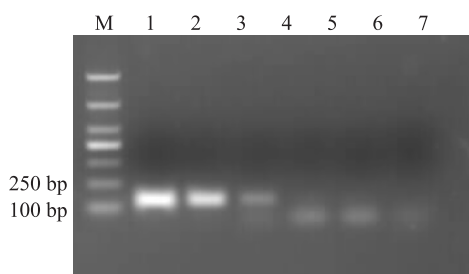


图 4 FAdV-4 qPCR 检测标准质粒的灵敏度

Fig.4 Sensitivity of qPCR of FAdV-4 in detecting standard plasmids

5、图 6) 显示,普通 PCR 检测病料灵敏度在  $1 \mu\text{l}$   $1 \times 10^4$  拷贝,qPCR 检测灵敏度为  $1 \mu\text{l}$   $1 \times 10^2$  拷贝,qPCR 检测灵敏度比普通 PCR 提升 100 倍,说明本方法能有效提高临床检测的灵敏度。





M: DL2000 DNA marker; 1~6:  $1 \mu\text{l}$   $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^1$  拷贝的模板; 7: 阴性对照。

图 5 FAdV-4 普通 PCR 检测组织病料的灵敏度

Fig.5 Sensitivity of conventional PCR of FAdV-4 in detecting diseased materials

## 2.5 FAdV-4 qPCR 的重复性试验

以不同浓度的标准质粒为模板, 进行 3 次平行重复 qPCR, 该试验重复 3 个批次, 最终验证组内和组间变异系数。结果(表 2)显示, 组内变异系数最大为 0.18%, 组间变异系数最大为 0.22%, 说明该方法重复性良好。

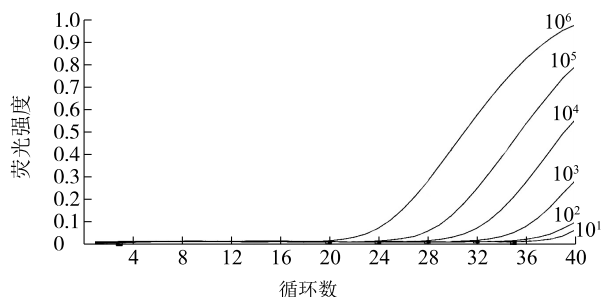


图 6 FAdV-4 qPCR 检测组织病料的灵敏度

Fig.6 Sensitivity of qPCR of FAdV-4 in detecting diseased materials

表 2 FAdV-4 qPCR 重复性试验测定的变异系数

Table 2 Coefficient of variation tested by repetitive experiments of qPCR

拷贝数	组内		组间	
	$X \pm SD$	$CV(\%)$	$X \pm SD$	$CV(\%)$
$1 \times 10^4$	$33.083 \pm 0.061$	0.18	$33.048 \pm 0.072$	0.22
$1 \times 10^5$	$29.008 \pm 0.080$	0.02	$29.048 \pm 0.061$	0.21
$1 \times 10^6$	$24.397 \pm 0.026$	0.11	$24.444 \pm 0.053$	0.22

$X$  是平均值,  $SD$  是标准差,  $CV$  是变异系数。

## 2.6 临床样品检测

应用本研究建立的 qPCR 检测方法和普通的 PCR 方法对临床疑似样品进行检测。结果显示, qPCR 的 FAdV-4 检出率为 51.1% (92/180), 普通

PCR 方法的 FAdV-4 检出率为 32.8% (59/180), 其中 qPCR 阳性且普通 PCR 阳性样品 50 份, 仅 qPCR 阳性样品 42 份, 仅普通 PCR 阳性样品 9 份, 具体结果见表 3。

对 59 份普通 PCR 检测为阳性的病料的扩增产物进行测序分析, 同时取仅 qPCR 阳性的 42 份样品和 10 份双阳性样品中的 qPCR 扩增产物进行测序分析, 以确定本研究建立的 qPCR 方法的准确性, 并比较普通 PCR 引物与本研究设计的 qPCR 引物的特异性。结果显示, 普通 PCR 的 59 份扩增产物中 51 份测序成功, 通过 BLAST 比对分析发现, 其中 9 份扩增片段比目的片段长 18 bp, 且与 GenBank 中收录的 FAdV-3 或 FAdV-9 序列相似度较高, 最高可达 98.83%。另外仅 qPCR 阳性的 42 份样品 BLAST 比对分析结果显示, 片段大小为 667 bp, 且与 GenBank 中收录的 FAdV-4 毒株相似, 相似度高达 100.00%。综上可知, 普通 PCR 特异性引物检出符合率为 82.35%, 而选取的 52 份 qPCR 扩增产物测序成功 49 份, BLAST 比对分析结果显示, 目的条带大小一致, 均为 122 bp, 且与 GenBank 中收录的 FAdV-4 序列相似度达 100%。qPCR 特异性引物检出的符合率为 100.00%。

## 3 讨论

鸡心包积液-肝炎综合征, 又称“安卡拉”病, 1986 首次暴发于巴基斯坦安卡拉地区<sup>[12]</sup>。该病症状典型, 流行较快, 病原为 FAdV-4。相关病例在世界上多个国家相继被报道<sup>[13-14]</sup>。2015 年以来 FAdV 感染在国内多个省份的鸡群中暴发, 山东省、河南省、江苏省、安徽省等养殖大省无一幸免<sup>[15-16]</sup>, 极大地增加了中国鸡群的饲养难度。

目前, 禽腺病毒不仅多血清型共流行且相对应的诊断方法有限<sup>[17-18]</sup>, 临床症状还与鸡包涵体肝炎病极为相似, 这提高了该病的临床诊断难度。雪上加霜的是禽类感染禽腺病毒后又能继发感染大肠杆菌病、禽流感、传染性法氏囊病等<sup>[19]</sup>, 此时单凭简单临床诊断手法难以确诊。此外, 禽腺病毒不同的血清型的同源性存在差异, 相同血清型的不同毒株也存在致病性的不同, 阻碍了疫苗研制的步伐, 目前中国仅有 1 种商品化灭活疫苗用于该病的免疫预防<sup>[20]</sup>。及时发现并确诊 FAdV 的感染, 准确评估流行趋势, 是防范此病流行的最有利措施之一, 再加上

表 3 临床病料中 FAdV-4 核酸检测结果

Table 3 Nucleic acid detection results of FAdV-4 in clinical samples

编号	检测结果		编号	检测结果		编号	检测结果		编号	检测结果	
	qPCR	PCR		qPCR	PCR		qPCR	PCR		qPCR	PCR
20200923-2	-	-	20210513	+	-	20220318-3	+	+	202112-62	-	-
20201029-1	-	-	20210516	-	+	20220320-1	-	-	202112-63	-	-
20201029-2	-	-	20210525	-	+	20220320-2	-	-	202112-66	+	+
20201111	-	-	20210530	+	-	20220320-3	-	-	202112-67	+	-
20201126	-	-	20210602	+	-	20220323	+	+	202112-71	+	-
20201211	-	-	20210605	-	-	20220324	+	+	202112-72	+	+
20201216	+	+	20210615	-	-	20220330	+	-	202112-73	-	-
20201217-1	+	-	20210621	-	-	20220406	-	-	202112-74	+	+
20201217-2	+	+	20210627	-	-	202106-1	-	-	202112-75	+	+
20210104-1	+	-	20210705	-	-	202106-2	-	-	202112-80	-	-
20210104-2	+	-	20210723	-	-	202106-3	-	-	202112-81	-	-
20210104-3	+	-	20210805	-	-	202106-7	+	+	202112-90	+	+
20210104-4	+	+	20210806	+	+	202106-9	-	-	202112-93	-	-
20210106	-	+	20210812	-	-	202106-10	-	-	202112-94	-	-
20210108	-	-	20210830	-	-	202106-13	+	-	202112-100	+	-
20210111-1	+	-	20210910	-	-	202109-7	-	+	202112-120	-	+
20210111-2	+	-	20210924	-	-	202109-12	+	-	202201-33	-	-
20210111-3	-	-	20210929	+	-	202109-24	+	-	202201-34	+	+
20210111-4	-	-	20211006	-	-	202109-30	-	-	202201-46	-	-
20210112-1	+	-	20211009	-	-	202109-42	-	-	202201-53	-	-
20210112-2	+	+	20211015	-	+	202109-61	+	-	202201-68	+	+
20210119	-	-	20211103	+	-	202110-8	-	+	202201-89	-	-
20210121	-	-	20211109	-	-	202110-17	-	-	202201-95	+	+
20210124-1	+	+	20211116	+	+	202111-1	-	-	202201-96	-	-
20210124-2	+	+	20211206-1	+	-	202111-12	-	-	202202-46	-	-
20210124-3	+	-	20211206-2	+	+	202111-34	+	+	202202-47	+	-
20210124-4	+	-	20211209	-	-	202111-37	+	-	202202-78	+	+
20210201	+	+	20211212	-	-	202112-1	-	-	202202-79	-	-
20210204-1	+	+	20211217	+	+	202112-9	+	+	202202-90	+	+
20210204-2	+	-	20211220	+	+	202112-12	-	-	202202-91	-	-
20210224	+	-	20211229-1	+	-	202112-16	+	-	202202-92	+	+
20210304	-	+	20211229-2	+	+	202112-21	+	-	202202-93	-	-
20210309	-	-	20211231-1	+	-	202112-24	-	-	202202-115	+	+
20210312	-	-	20211231-2	+	-	202112-25	+	+	202202-116	-	-
20210317	+	+	20220111-1	+	+	202112-28	+	+	202202-117	+	+
20210324-1	+	-	20220111-2	+	+	202112-30	-	-	202202-118	-	-
20210324-2	+	-	20220213	-	-	202112-31	-	-	202202-119	+	+
20210324-3	+	-	20220222	-	-	202112-38	-	+	202202-120	-	-
20210324-4	+	+	20220224	-	-	202112-45	+	-	202202-121	-	-
20210326	+	+	20220302	+	-	202112-48	+	+	202202-122	+	+
20210409	-	-	20220308	-	-	202112-49	+	-	202202-130	+	-
20210416	-	-	20220310	-	-	202112-50	+	-	202202-131	+	+
20210425	+	+	20220315	+	+	202112-51	+	-	202202-136	-	-
20210503	-	-	20220318-1	+	+	202112-57	-	-	202202-137	+	+
20210511	+	-	20220318-2	+	+	202112-59	+	+	202202-138	-	-

“+”代表阳性,“-”代表阴性。

存在临床症状类似的疾病发生,因此,建立一种高效、灵敏的检测方法显得十分重要<sup>[11]</sup>。相较于普通 PCR 检测特异性差、灵敏度低等问题<sup>[21]</sup>,qPCR 优势更为突出,定性与定量兼顾且耗时更短,适用于大规模样品检测<sup>[22]</sup>。六邻体蛋白(Hexon)是腺病毒最主要的结构蛋白,带有血清型特异性抗原决定簇,学者常以此为靶标设计 qPCR 检测方法<sup>[23-24]</sup>。在已报道的研究中,张云丹等<sup>[9]</sup>发现普通 PCR 检测灵敏度只有约 $1 \times 10^5$ 拷贝;刘琳等<sup>[7]</sup>开发的 FAdV-4 的 qPCR 检测方法,检测限为 1  $\mu$ l 50 拷贝,组内和组间重复试验的变异系数分别为 0.75%~1.71%和 0.60%~1.74%;窦砚国<sup>[25]</sup>建立了一种针对 FAdV-4 的 qPCR 检测方法,检测灵敏度为 20 拷贝,其组内和组间重复试验的变异系数分别为 0.12%~0.39%和 0.30%~0.60%。本研究中建立的 qPCR 检测方法线性关系良好,灵敏度为 100 拷贝,组内变异系数均 $\leq 0.18\%$ ,组间变异系数均 $\leq 0.22\%$ ,本研究建立的 qPCR 检测方法的重复性更高。

为了评估该方法,对 2020 年 9 月至 2022 年 4 月来自江苏盐城、安徽阜阳、江西赣州、广西南宁等地区的疑似感染样品进行检测,结果显示,FAdV-4 检出率为 51.1%,且抽取测序成功的 49 份样品测序结果与目的序列一致。上述试验结果证明,该 qPCR 检测方法比常规 PCR 具有更强的灵敏度、更高的重复性以及更好的准确性。因此,本研究建立的 qPCR 检测方法,可作为一种检测和诊断 FAdV-4 感染的可靠工具,有助于对血清 4 型禽腺病毒进行临床诊断和防控。

#### 参考文献:

- [1] ASTHANA M, CHANDRA R, KUMAR R, et al. Hydropericardium syndrome: current state and future developments[J]. Archives of Virology, 2013, 158(5):921-931.
- [2] MITTAL D, JINDAL N, TIWARI A K, et al. Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens[J]. Virus Disease, 2014, 25(1):114-119.
- [3] JONG N K, SEONG H B, JEONG K M A L. Outbreaks of hydropericardium syndrome and molecular characterization of Korean fowl adenoviral isolates[J]. Avian Diseases, 2008, 52(3):526-530.
- [4] DOMANSKA-BLICHARZ K, TOMCZYK G, SMETANKA K, et al. Molecular characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens with gizzard erosions[J]. Poultry Science, 2011, 90(5):983-989.
- [5] 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):1-14.
- [6] 黄婷婷. 禽腺病毒血清 4 型检测、分离鉴定及抗体的制备[D]. 重庆:西南大学, 2020.
- [7] 刘琳,何春辉,王赛楠,等. 血清 4 型禽腺病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(5):928-932.
- [8] YE J Q, LIANG G C, ZHANG J J, et al. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China[J]. Emerg Microbes Infect, 2016, 5(5):1-2.
- [9] 张云丹,杨源,王军,等. I 群禽腺病毒血清 4 型 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 西北农业学报, 2019, 28(6):868-876.
- [10] 吴双,姜勇,徐建生,等. 鸭坦布苏病毒、鸭肠炎病毒和番鸭细小病毒 TaqMan 三重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与临床应用[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3):626-633.
- [11] 林梦舟,吴双,徐建生,等. 鸭甲型肝炎病毒 1 型与 3 型双重 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(11):3149-3156.
- [12] 薛晓岩,张振兴,季佳,等. 禽腺病毒 4 型的研究现状[J]. 动物医学进展, 2022, 43(4):102-106.
- [13] SUN J, ZHANG Y Y, GAO S, et al. Pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in chickens[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 75:1-10.
- [14] MASE M J, NAKAMURA K Y, MINAMI F J, et al. Fowl adenoviruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Japan, 2009-2010[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2012, 74(8):1087-1089.
- [15] NIU Y J, SUN W, ZHANG G H, et al. Hydropericardium syndrome outbreak caused by fowl adenovirus serotype 4 in China in 2015[J]. The Journal of General Virology, 2016, 97(10):2684-2684.
- [16] YU G L, LIN Y, DOU Y G, et al. Prevalence of fowl adenovirus serotype 4 and co-infection by immunosuppressive viruses in fowl with hydropericardium hepatitis syndrome in Shandong province, China[J]. Viruses, 2019, 11(6):517-526.
- [17] 杨晶晶,金红岩. I 群禽腺病毒套式 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(9):71-77.
- [18] STEER-COPE P A, SAND J R, O'ROURKE D, et al. DVaccination with FAdV-8a induces protection against inclusion body hepa-

- titis caused by homologous and heterologous strains [J]. *Avian Pathol*, 2019, 48(5):396-405.
- [19] 何秀苗,官丁明,禰金彩,等. 传染性腔上囊病病毒与禽腺病毒混合感染的分子鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(3):223-226.
- [20] 袁 枫,宋慧琦,侯 磊,等. 禽腺病毒血清 4 型 Fiber-2 蛋白在毕赤酵母中的优化表达及其免疫原性分析[J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27(2):132-142.
- [21] 郭慧芳,李 宁,王白玉,等. 禽腺病毒血清 4 型感染鸡组织中 *NLRP3* 基因转录水平的实时荧光定量 PCR 分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(1):195-201.
- [22] 宋玲玲,于可响,王友令,等. 禽腺病毒 4 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(8):118-122.
- [23] 汪 凯. 新型 I 群禽腺病毒分离株生物学特性及其致病性研究[D]. 合肥:安徽农业大学, 2017.
- [24] 陈田田,刘 琳,赵玉杰,等. 禽腺病毒 W 株 *Hexon* 基因的分子特征及其致鸡胚体儒化研究[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(9):81-86.
- [25] 窦砚国. 血清 4 型 I 群禽腺病毒的分离鉴定及流行病学调查[D]. 泰安:山东农业大学, 2017.

(责任编辑:陈海霞)