

H9亚型禽流感病毒DJ15株的分离与鉴定

朱小甫

(咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所, 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 从临床发病鸡群中采集病料, 进行了鸡胚接种、HA-HI试验以及RT-PCR鉴定。结果表明分离到的病毒能凝集鸡红细胞, 但是该血凝性仅能被AIV H9阳性血清所抑制, 不能被NDV、EDS76和AIVH5阳性血清所抑制; AIV H9特异性RT-PCR诊断结果为阳性, 最终确定分离到H9亚型禽流感病毒, 命名为DJ15株。

关键词: H9亚型; 禽流感; DJ15株; 分离; 鉴定

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2016)02-038-03

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由A型流感病毒 (Avian Influenza Virus, AIV) 引起家禽或野禽的感染综合征^[1]。自1878年禽流感在意大利被首次确认以来, 此病一直是严重威胁世界养鸡业的重大传染病, 引起鸡只发病死亡、产蛋量下降以及蛋品质低劣, 造成重大经济损失。AIV属于正黏病毒科, 为8片段单股负链RNA病毒, 依据AIV表面血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 的不同可分为多种亚型^[2,3]。其中低毒力的H9亚型流感病毒主要引起家禽轻微的呼吸道疾病及蛋禽产蛋量下降, 但如果存在细菌继发感染则引起鸡群死亡率上升^[4]。本试验从铜川某蛋鸡场发病鸡群采样, 进行了病毒分离、血凝-血凝抑制试验和RT-PCR方法鉴定, 确诊为H9 AIV感染, 为临床控制疫情提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 铜川市某规模蛋鸡场发生的一起以呼吸困难、死亡率上升、产蛋下降以及蛋壳颜色变浅为特征的病例, 从该发病鸡场中采集了病死鸡的气管、肺、肝脏和脾脏等组织。

1.1.2 SPF鸡胚 SPF鸡蛋由瑞普生物药业有限公司提供, 咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室孵化至9日龄。

1.1.3 试剂及引物 NDV、EDS76、AIV H5和AIV H9标准阴、阳性血清购自中国兽医药品监察所。TRIzol Reagent购自Invitrogen公司; AMV反转录酶 ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、RNA酶抑制剂 ($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、DEPC处理水、rTaq酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 和dNTP (各成分均为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 等均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。H9禽流感RT-PCR方法由咸阳职业技术学院动物疫病分子生物学诊断实验室设计, 引物由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 上游引物H9-F: AAAGCTCGTCAGCGGTCCTACT, 下游引物H9-R: TCGGTAGGAGGATGGTATAC, 预期条带大小为282bp。其余所用试剂均为国产分析纯。

1.1.4 红细胞 血液采自3只健康非免疫公鸡, 用生理盐水稀释后2000r/min离心5min, 共洗涤3次, 最后用生理盐水配制成1%的鸡红细胞。

1.2 方法

1.2.1 病料处理 将气管、肺等组织按照1:5比例加生理盐水盐水剪碎, 在组织研磨器中研磨呈糊状, 12000r/min离心10min, 取上清液, 上清液中加入青、链霉素至终浓度含青霉素1000U/mL, 链霉素1mg/mL, 同时加入等体积的NDV标准阳性血清混匀, 4℃静置2h备用。

1.2.2 病毒分离 将处理好的上清液样品经尿囊腔接种9日龄SPF鸡胚, 共接种10枚鸡胚 (0.2ml/枚), 置37℃孵育, 12h照胚1次, 24h内非特异性死亡的

收稿日期: 2016-04-09

作者简介: 朱小甫 (1977—), 男, 硕士, 助教, 执业兽医师, 研究方向: 动物疫病分子病原学与免疫学。

鸡胚弃去, 收集24h~72h死亡及72h未死亡鸡胚的尿囊液, 放置-70℃冻结保存备用。将收获的尿囊液10倍稀释加双抗和NDV标准阳性血清处理后再次接种9日龄鸡胚继续传代, 共盲传3代。

1.2.3 病毒鉴定

1.2.3.1 HA-HI试验 用血凝试验(HA)测定收集的尿囊液具有血凝性后, 再用抗H9AIV标准阳性血清与分离株进行血凝抑制试验(HI), 同时用NDV、EDS76和AIVH5标准阳性血清进行血凝抑制试验, 记录血凝抑制结果。

1.2.3.2 病毒RT-PCR鉴定 按照TRIzol Reagent试剂说明提取尿囊液总RNA, 自然干燥。反转录反应液体系为DEPC处理水10.5 μL, 上游引物H9-F1.0 μL, dNTP4.0 μL, 5×AMV Buffer4.0 μL, AMV0.25 μL, RNA酶抑制剂0.25 μL, 总体积20.0 μL。

用反转录反应液充分溶解核酸, 置42℃水浴反转录90min, 获得第一链cDNA。PCR反应体系为cDNA2.0L, 超纯水16.25 μL, 10×PCR Buffer2.5 μL, MgCl₂ 2.0 μL, dNTP1.0 μL, AIVH9-F、IVH9-R各0.5 μL, rTaq酶0.25 μL, 总体积25.0 μL; 条件为: 95℃预变性5min, 94℃30s, 55℃30s, 72℃45s共30个循环, 最后72℃充分延伸10min。取5.0 μL扩增产物, 15g·L⁻¹琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶成像系统中照相观察。

2 结果与分析

2.1 病毒分离

第1代接种后72h未见鸡胚死亡; 冷冻后收获尿囊液接种第2代后60~72h内死亡1枚, 其它9枚于接种72h未见死亡; 第3代接种后36~48h内死亡1枚, 48~60h内死亡4枚, 其它5枚于接种60~72h内死亡。剖检死亡鸡胚, 可见胚体全身出血较为严重, 尿囊膜上可见小的出血点。

2.2 HA-HI试验

将收获的鸡胚尿囊液进行HA试验, 结果表明分离的病毒能凝集鸡红细胞, 病毒血凝价达到8log₂。HI试验结果表明, H9禽流感病毒标准阳性血清能抑制分离病毒的血凝性, 且HI效价高达7log₂。NDV、EDS76和AIVH5阳性血清不能抑制分离病毒的血凝性, HI效价均为0log₂。证实分离到

的病毒为H9流感病毒。

2.3 RT-PCR检测

H9AIVRT-PCR鉴定结果表明, 待检病毒能被扩增出一个282bp的特异性条带, 表明分离到的病毒确为H9亚型禽流感病毒, 命名为DJ15株。

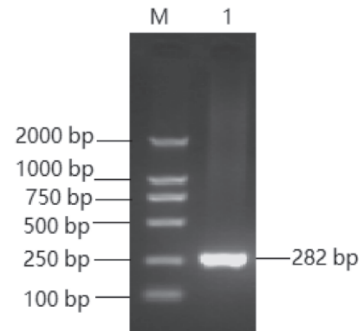


图1 DJ15株尿囊液H9 RT-PCR扩增结果

M: DNA分子质量标准(100 bp~2000 bp);

1: DJ15株尿囊液

Fig.1 The result of cloning H9 gene of DJ15 strain

M: DNA Marker (100bp~2000bp);

1: AIV H9 DJ15 strain

3 讨论

H9亚型禽流感病毒在我国鸡群中广泛存在, 能引起免疫抑制, 继发细菌感染, 造成生产力下降^[5]。本试验从临床病料中分离DJ15株, 其对鸡红细胞具有血凝性, 但是该血凝性仅能被AIVH9阳性血清所抑制, 不能被NDV、EDS76和AIVH5阳性血清所抑制。通过咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所动物疫病分子生物学诊断实验室建立的AIVH9特异性RT-PCR诊断方法鉴定, 最终确定DJ15株病毒为H9亚型禽流感病毒, 分离结果和申翰钦等^[6]、钟植文等^[7]基本一致。在病毒分离过程中, 病料上清液和每一代收获的尿囊液中加入NDV标准阳性血清是一个关键处理步骤, 因为在鸡群中普遍存在新城疫疫苗毒, 必须用阳性血清进行多次中和, 否则由于新城疫疫苗毒其良好的鸡胚适应性会迅速繁殖而导致H9病毒分离失败。本试验获得了DJ15株, 为进一步研究其分子变异和抗原性特点奠定了基础。

参考文献

- [1]甘孟侯. 禽流感[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社. 2002.
- [2]殷震, 陈景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社. 1997.
- [3]张伟, 徐怀英, 孟芳, 等. 1999~2013年山东H9N2亚型禽流感

- 感病毒HA基因的演化和HI抗原性差异分析[J].中国科学:生命科学,2015,45:190-199.
- [4]王友令,袁小远,徐怀英,等.高抗体水平肉种鸡H9N2的分离鉴定及HA基因序列分析[J].华北农学报,2010,3:23-27.[5]田国斌,赵增连,唐秀英.鸭源禽流感病毒的分离和鉴定[J].中国预防兽医学报,1999,21(01):1-3.
- [6]申翰钦,曾凡桂,严专强,等.广东一株重组H9N2亚型禽流感病毒的鉴定及个基因组序列分析[J].中国预防兽医学报,2013,35:607-612.
- [7]钟植文,冼望强,黎先伟,等.1株鸡H9亚型禽流感病毒的分离鉴定和HA基因序列分析[J].中国兽药杂志,2015,49(3):12-16.

[编辑、校对:王军利]

Isolation and Identification on DJ15——H9 Subtype of Avian Influenza Virus

ZHU Xiao-fu

(Xianyang Vocational and Technical College, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: The epidemic materials collected from the clinical onset of chickens, the chicken embryo inoculation, HA - HI test and RT-PCR identification showed that the isolated virus can agglutinate chicken red blood cells, but the blood clot only can be suppressed by AIV H9, not by NDV, EDS76 and AIVH5; AIV H9 specific rt-pcr diagnosis result is positive, then H9 subtype of avian influenza virus was named DJ15 strains.

Key words: H9 subtype; the bird flu. DJ15 strains; separation; identification

(上接第26页)

Research on Problems and Countermeasures of laboratory management in Higher Vocational Colleges

XU Bing

(Xianyang Vocational and Technical College, Xianyang Shaanxi 712046)

Abstract: In view of the problems existing in the current higher vocational college laboratory management, some basic ideas and specific measures can be found in the paper on organization, responsibility for security, experiment and training, equipment, consumables, human resources, capital and archives.

Key words: Higher vocational colleges; experimental training room; management