



CHICK
PROGRAM

总第14期/2014年3月

血清4型禽腺病毒分离株的致病性和细胞因子基因表达模式

Helena Grgić, Zvonimir Poljak, Shayan Sharif, Éva Nagy

摘要

心包积液-肝炎综合征（HHS）是一种最近出现的禽类疾病，是由血清4型禽腺病毒（FADV -4）的一些毒株引起的。在本研究中，通过给SPF鸡进行口服和肌注（IM）接种病毒，观察临床症状和大体组织学病变，我们评估了一株命名为FADV -4 ON1的加拿大FADV 4型毒株的致病性。在盲肠扁桃体中检测到了最高的病毒DNA拷贝数，且与接种途径无关。我们对整个研究期间采集的口服接种和肌注接种的鸡的泄殖腔拭子的病毒滴度进行了比较，两组实验鸡只在病毒滴度上有显著的差异（ $P < 0.001$ ），口服组的病毒滴度更高。使用腺病毒特异性ELISA检测感染鸡的抗体应答显示，口服接种和肌注接种的鸡之间存在显著的统计学差异（ $P < 0.001$ ）。肌注接种的鸡比口服接种的鸡的抗体水平更高（ $P < 0.001$ ）。在感染后第14天从两组鸡中采集的血清样品均可完全中和FADV -4 ON1病毒。此外，我们进行了针对FADV -4 ON1感染对鸡的多种细胞因子的转录影响的体内研究。在感染早期，肝脏中干扰素（IFN） $-\gamma$ ，白细胞介素（IL） -10 经诱导刺激后表达量显著升高。因此，FADV -4 ON1分离株具有作为活疫苗抵御HHS和开发成为疫苗载体的潜力。

FAdV-4 ON1序列的 GenBank/EMBL/DDBJ收录号是 GU188428。

简介

心包积液肝炎综合征（HHS）是肉鸡感染的一种非常重要的疾病，其主要病因为血清4型禽腺病毒（FADV -4）。HHS于1987年在巴基斯坦首次出现 [23]，随后，在印度，中东，日本，墨西哥，秘鲁，厄瓜多尔和智利也有相关疫情的报道 [3, 10, 20, 40]，造成了家禽业的显著损失。然而，在加拿大还没有HHS的报道。本病多见于3 - 6周龄肉鸡。感染的鸡可能不会表现出其他临床症状，只表现为高达75 %的高死亡率 [18]。主要的大体病变是心包积液，其特征为心包中凝胶状物



CHICK PROGRAM

质的积聚。心脏出现畸形和松弛，心包顶端呈流动性[4, 26]。组织学检查最一致的表现是肝脏的小的点状坏死及单核细胞浸润，包括肝细胞出现嗜碱性核内包涵体，由一个界限清晰的环包围或填充整个细胞核[27]。可以通过接种疫苗减少HHS的相关损失。可以使用从感染鸡获得的灭活肝匀浆和灭活的繁殖病毒的细胞培养物和/或鸡胚源疫苗，但是它们的保护力差异较大[6, 25]。最近， Schonewille等报道了一种FADV - 4活疫苗（2010），但缺乏中和抗体。

虽然在加拿大HHS并没有流行历史，但2004年从一只无HHS临床症状的肉种鸡中首次分离到了一株血清4型禽腺病毒。格里芬和纳吉测定了该病毒（FADV - 4 ON1）的全序列[18]。FAdVs是优良的疫苗载体，而且FADV - 8 [38, 22]和FADV - 9 [7, 8, 28]已经被开发成了疫苗载体。这个新发现的FADV - 4 ON1不仅可以作为针对HHS的活疫苗病毒，也可以作为载体病毒。

本研究的目的是：1）确定FADV - 4 ON1分离株对无特定病原体（SPF）鸡的致病性。2）研究病毒在组织中的传播，泄殖腔拭子病毒滴度和抗体反应。3）检测FADV - 4 ON1感染后，干扰素（IFN） - γ ，白细胞介素（IL） - 10和IL - 18以及IL-8的基因表达动态。

材料和方法

病毒

该FADV - 4型病毒于2004年由圭尔夫大学动物健康实验室分离。该样本来自加拿大无HHS临床症状的肉种鸡。将该病毒进行噬斑纯化，然后将该病毒（FADV - 4 ON1）在鸡肝癌细胞系中进行传代和病毒滴定（CH - SAH，苏威动物保健，门多塔海茨，明尼苏达州，美国）[5]。对该病毒进行了全基因组序列的测定[18]，GenBank / EMBL / DDBJ登录号为GU188428。

实验用鸡和笼舍

白来航SPF鸡胚是从渥太华的加拿大食品检验局获得的，并在圭尔夫大学的阿克伦家禽站进行孵化。雏鸡在隔离装置中进行养殖，并严格按照圭尔夫大学动物保护协会规定和加拿大动物保护协会的实验动物护理和使用指南进行操作。

致病性评估

根据圭尔夫大学动物保护委员会法规，进行了FADV - 4 ON1分离株的致病性评估实验。实验方案经圭尔夫大学动物保护委员会通过（动物使用方案号08R126）。将100只雏鸡随机分为4组：第I组（FADV - 4）口服，第II组（FADV - 4）



CHICK PROGRAM

肌肉注射，第III组（对照组）口服，第IV组（对照组）-肌注。I和II组每组30只雏鸡，阴性对照组（III，IV）每组20只雏鸡。小鸡在9日龄进行翅膀标记和采集血样。由于刚孵出的雏鸡中没有HHS的报道，I组和II组的每只雏鸡在10日龄接种了 2×10^8 空斑形成单位（PFU）的病毒。对照组（模拟感染）的雏鸡则接种磷酸盐缓冲盐水（PBS）。为了提供可以诱发临床症状以及模拟圈舍内持续感染的足够剂量的病毒，I和II组于14日龄重新接种了相同剂量的病毒。每天观察雏鸡的临床症状。在感染后0，3，5，7，14，21和28天（dpi），从对照组随机选择3只雏鸡，从处理组随机选择4只雏鸡进行剖检。按照圭尔夫大学动物保护委员会规定，对雏鸡用二氧化碳气体进行安乐死，并检测大体病变的存在。采集胸腺，肺，心脏，肾脏，肝脏，法氏囊和盲肠扁桃体组织。每种组织分为两个部分：一部分置于10%福尔马林中，另一部分被储存在 -80°C ，进行定量聚合酶链反应（定量PCR）。在0，3，5，10，14，21，28 dpi收集了泄殖腔拭子，通过空斑试验来确定其病毒滴度。采集血液样品，并通过ELISA和病毒中和试验测定抗体滴度。

血清学检测

通过FADV特异性抗体（Abs）检测试剂盒检测0，7，14，21和28 dpi收集的血清样品 [29]。简言之，将FADV -4抗原用N-月桂酰肌氨酸钠处理，以200ng/孔的浓度涂布在微量滴定板上（Becton-Dickinson公司，富兰克林湖，新泽西州，美国），并用3%牛血清白蛋白封闭。用抗鸡免疫球蛋白的碱性磷酸酶标记的山羊IgG（Kirkegaard和Perry实验室，盖瑟斯堡，马里兰州，美国）和Sigma快速磷酸对硝基苯酯（Sigma化学公司，圣路易斯，密苏里州，美国）检测结合抗体。

根据每个样本的平均光密度（OD₄₀₅）读数计算样品阳性率（S / P）来表示结果。

同时也通过病毒抗体中和实验检测血清样品 [32]。简言之，将含有100 pfu 病毒的100 μl 细胞培养基与等体积的1:50稀释的Abs相混合。将混合物孵育1小时，随后将样品加入到CH-SAH细胞中。经过1小时的吸附后，以0.6%的琼脂糖覆盖细胞。在5%CO₂，37 $^\circ\text{C}$ 孵育72小时后，再次覆盖一层含有0.02%中性红的染料，随后观察空斑。与阴性对照血清样品相比，抑制了50%以上的空斑生长的样本被认为是阳性。

测定细胞因子mRNA表达的实验设计

将40只10日龄雏鸡随机分为两组。I组25只，II组（阴性对照）15只。I组的每只雏鸡肌注接种 2×10^8 PFU / ml的病毒，对照组雏鸡则接种PBS。在感染后第1，3，5，7，10天从感染组随机选择5只雏鸡，对照组随机选取3只雏鸡进行剖检。选择这些时间点的理由是，在一个时间点进行一次免疫往往不能提供足够的保护。此外，FADV感染24小时后会导致两



CHICK PROGRAM

个病毒血症高峰，第一个为第2天，而另一个在第7天[36]。雏鸡进行安乐死处置，采集其脾脏，盲肠扁桃体和肝，并浸没在RNAlater中（Qiagen公司，米西索加，ON，加拿大），并贮存于-80℃直至进行RNA提取。

DNA提取和组织中病毒DNA定量测定（略）

RNA提取及 real-time 定量 PCR测定细胞因子基因表达（略）

数据分析

为了评估不同组织中病毒的拷贝数，进行了Kruskal-Wallis检验。口服组和肌注组的数据分别进行了Kruskal-Wallis检验，以评估组织中的病毒拷贝数的差异。当检测到统计学差异显著的P值时，采用Mann-Whitney U检验对不同组织之间进行两两比较。P < 0.05被认为是统计学差异显著。

根据参照文献计算实时定量PCR的效率 [35]，并且以 β -肌动蛋白基因表达作为参照，计算了mRNA的相对表达量[31]。采用Mann-Whitney U检验评估不同组之间细胞因子表达的差异，P < 0.05被认为具有显著差异。

结果

临床症状，大体病变及组织学变化

HHS的特征性临床症状是抑郁、在角落挤作一团与羽毛竖起，其特征性姿势是胸部和嘴接触地面，雏鸡未见任何临床症状。未见心包积液，肝脏苍白，肿胀，易碎等特征性肉眼病变。在感染鸡中也未检测到 HHS的特征性组织学病变，如肝细胞内存在核内包涵体。

组织中的病毒基因拷贝数

通过qPCR测定肝脏，法氏囊和盲肠扁桃体中的病毒基因组的拷贝数，并将结果总结在表1中。接种前或空白组的鸡只的任何组织中均未检测到病毒DNA。不论任何接种途径，盲肠扁桃体中具有最高的病毒拷贝数，其次是肝脏，最后是法氏囊。对于口服接种的鸡只，盲肠扁桃体中的病毒拷贝数明显高于肝脏（P = 0.0207），和法氏囊（P = 0.0001），而肝脏中的病毒拷贝数仅略高于法氏囊（P = 0.0759）。对于肌注接种的鸡只，盲肠扁桃体的病毒拷贝数明显高于法氏囊（P = 0.0154），而其他器官之间无显著性差异（P > 0.25）。



CHICK PROGRAM

表1. 接种FAdV-4病毒鸡只组织样本阳性数及病毒基因组拷贝数

感染天数	组织	接种途径			
		口服		肌注	
3	肝	3.4 ^a	3/4 ^b	7.5	2/4
	法氏囊	5.6	2/4	5	1/4
	盲肠扁桃体	26	4/4	530	4/4
5	肝	140	3/4	8.3	4/4
	法氏囊	6.1	4/4	12	2/4
	盲肠扁桃体	570	4/4	130	4/4
7	肝	2.2	2/4	2.3	2/4
	法氏囊	0	0/4	6	2/4
	盲肠扁桃体	24	1/4	3.5	3/4
14	肝	2.8	4/4	5.9	2/4
	法氏囊	4.9	3/4	4.6	2/4
	盲肠扁桃体	12	4/4	8.6	4/4
21	肝	11	4/4	24	4/4
	法氏囊	23	3/4	310	4/4
	盲肠扁桃体	6400	4/4	360	3/4
28	肝	650	4/4	350	4/4
	法氏囊	1.4	2/4	74	1/4
	盲肠扁桃体	170	4/4	650	4/4

a=通过定量PCR测定的10ug总DNA中的病毒基因组拷贝数

b=组织阳性数/组织总数

病毒的排出

没有在接种前和对照组的任何时间点的任何鸡只的泄殖腔拭子中检测到病毒（数据未显示）。接种FAdV -4 ON1的鸡的泄殖腔拭子中的病毒滴度在表2中列出。

以Mann -Whitney U检验发现，在3和5 dpi，口服和肌注接种的鸡之间的病毒滴度统计学差异显著（ $P < 0.001$ ）。口服免疫组的病毒滴度较高。在整个实验过程中（28 dpi）肌注组鸡持续有病毒排出，而口服免疫组的病毒排出结束于21 dpi。



CHICK PROGRAM

表2. 接种FAdV-4病毒鸡只的泄殖腔拭子的病毒滴度

感染天数	接种途径		P值
	拭子平均病毒滴度（pfu/ml）		
	排出病毒的鸡只比例（%） ^a		
	口服	肌注	
3	9.9*10 ³ (93)	1.4*10 ³ (25)	≤0.001
5	1.2*10 ⁴ (83)	1.2*10 ³ (32)	≤0.001
10	1.3*10 ² (13)	6.8*10 ² (20)	0.49
14	3.9*10 ¹ (27)	2.5*10 ¹ (13)	0.26
21	3.3*10 ¹ (20)	2.5*10 ¹ (10)	0.25
28	0 (0)	1.2*10 ¹ (10)	0.34

通过空斑实验测定病毒滴度。

口服组和肌注组之间比较数据的P值<0.05被认为是有意义的。

a 在第3天有26只鸡，第5天有22只鸡；在第10天有18只鸡，第14天有14只鸡；在第21天有10只鸡，第28天有6只鸡。

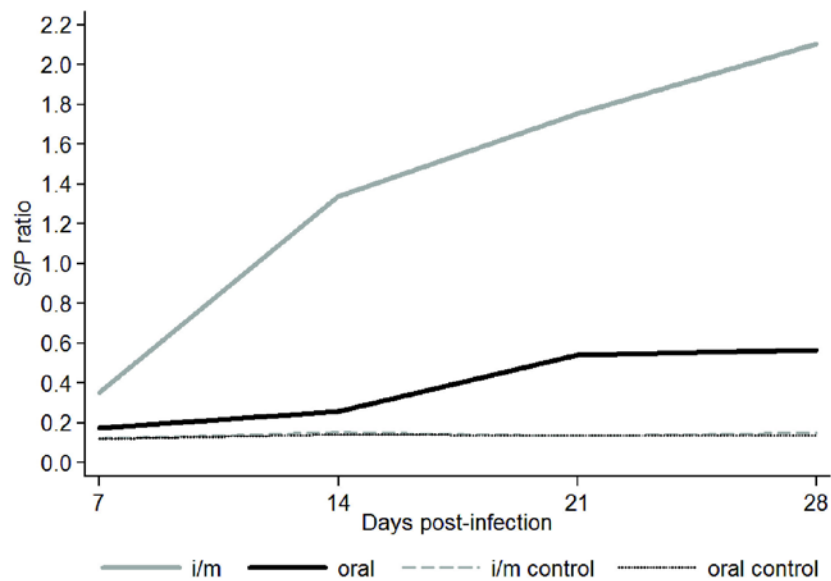
抗体应答

没有在接种前和对照组的任何鸡只中检测到FADV特异性Ab。针对FADV -4的抗体反应出现在7 dpi，如图1所示，在14，21和28 dpi，接种组和阴性对照组之间统计学差异显著 (P < 0.001)。肌注接种鸡只比口服接种鸡只的抗体水平更高 (P < 0.001)。当使用另一血清型的病毒，FADV -9检测同一血清时，结果类似，但是抗体水平略低 (数据未显示)。

图1: 通过S / P比值衡量经口服和肌注途径接种FADV - 4病毒雏鸡以及空白对照组雏鸡对病毒蛋白的抗体反应。感染后7，14，21和28天采集血清样品。灰色和黑色的线分别代表肌注和口服接种鸡。灰色虚线和黑色虚线代表空白对照的鸡。检测到在感染后的第14，21及28天，空白对照组和感染组鸡之间存在显著差异。



CHICK PROGRAM



病毒中和试验

在攻毒前未从任何鸡只中检测到中和抗体。

在病毒中和试验中，感染后14天从口服免疫组和肌注免疫组采集到的所有血清样本在1:50稀释后可以完全中和FADV - 4 ON1。而且，整个研究阶段阴性对照组的鸡只均为阴性。

细胞因子基因表达

肌注接种FADV -4 ON1病毒后，检测盲肠扁桃体，肝和脾中细胞因子基因的mRNA表达。

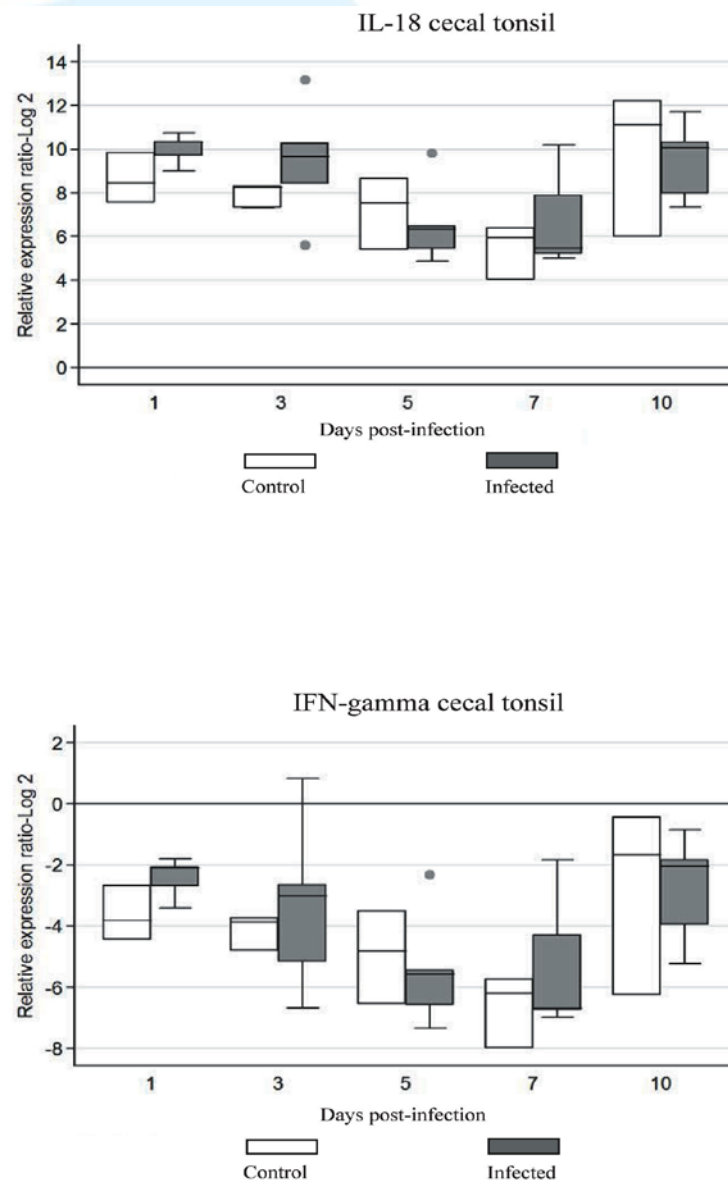
与未感染组相比，盲肠扁桃体的IFN- γ 和IL-18 mRNA的表达量没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 2)。IFN- γ ， IL-18， IL-10 和IL-8 基因的表达情况在图3中显示。与未感染组相比，在3 dpi的感染鸡只的IFN- γ 基因表达量在统计学上显著升高 ($P < 0.05$)。在3 dpi，感染组 IL-10的表达量显著高于未感染组 ($P < 0.05$)。感染组和未感染组之间IL-8和IL-18的表达无显著差异 ($P > 0.05$)。

所有时间点都在脾脏中检测到了IFN- γ 和IL-18的mRNA (图4)。在 10 dpi，检测到感染组脾脏中的IFN- γ 和IL-18均出现统计学显著性下调 ($P < 0.05$)。



CHICK PROGRAM

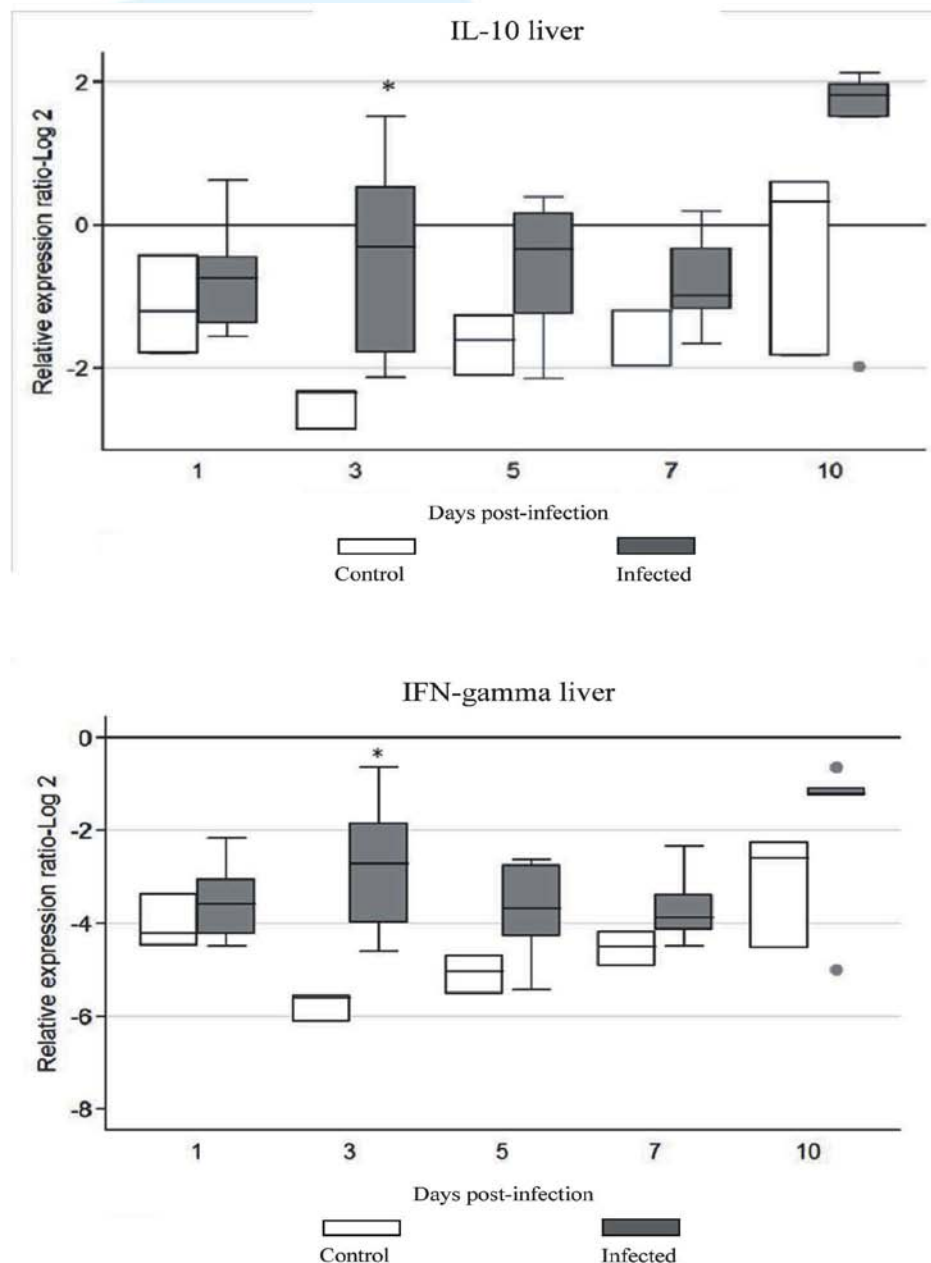
图2: 感染FADV - 4病毒鸡只盲肠扁桃体细胞因子mRNA表达情况。分组为: 未感染(阴性对照)组, 以及FADV - 4肌注射接种组。使用SYBR Green实时定量RT-PCR检测靶基因和参照基因的表达情况。靶基因的表达情况通过 β -肌动蛋白的相对表达量呈现出来, 并通过校准机制进行统一。方块代表了四分位差, 而直线表示极值。Mann-Whitney检验显示无统计学显著差异($P > 0.05$)。●符号表示其被确定为异常值。





CHICK PROGRAM

图3：感染FADV - 4病毒鸡只肝脏中细胞因子mRNA表达情况。分组为：未感染（阴性对照）组，以及FADV - 4 肌注接种组。使用SYBR Green实时定量RT-PCR检测靶基因和参照基因的表达情况。靶基因的表达情况通过 β -肌动蛋白的相对表达量呈现出来，并通过校准机制进行统一。方块代表了四分位差，而直线表示极值。Mann-Whitney检验显示统计学差异显著 ($P < 0.05$)。●符号表示其被确定为异常值。





CHICK PROGRAM

图4: 感染FADV - 4病毒鸡只脾脏细胞因子mRNA表达情况。分组为: 未感染(阴性对照)组, 以及FADV - 4肌注接种组。使用SYBR Green实时定量RT-PCR检测靶基因和参照基因的表达情况。靶基因的表达情况通过 β -肌动蛋白的相对表达量呈现出来, 并通过校准机制进行统一。方块代表了四分位差, 而直线表示极值。Mann-Whitney检验显示统计学差异显著($P \leq 0.05$)。●符号表示其被确定为异常值。

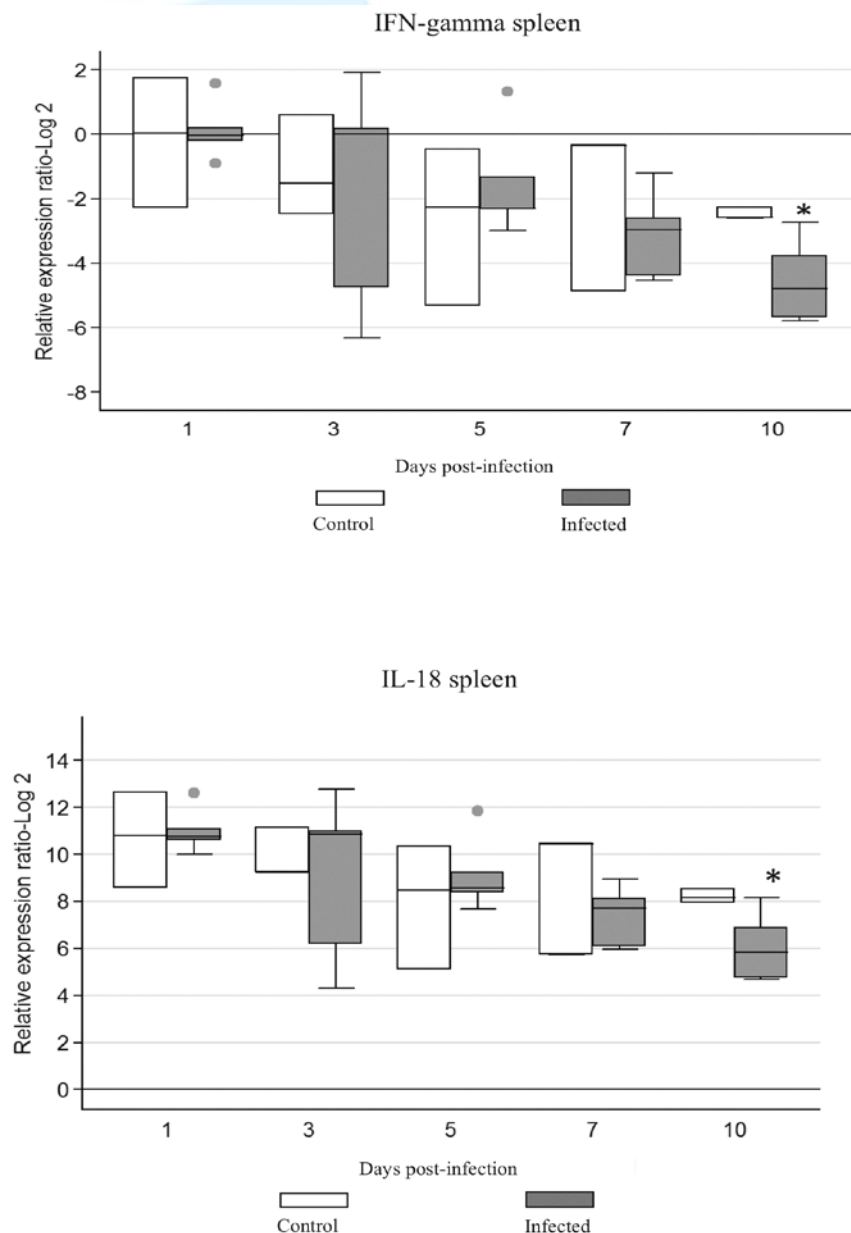


Fig.4.



**CHICK
PROGRAM**

讨论

即使接种了高剂量的病毒，目前还没有在两种途径接种的鸡中发现任何临床症状，或大体病变以及病理组织学病变，可以认为它是非致病的。

缺少病理表现的原因不是病毒复制的缺乏，因为在FADV - 4感染鸡只的组织 and 泄殖腔拭子中检测到了病毒，尽管其复制量比之前报道的FADV -8和FADV - 9更低[16, 11]。在口服和肌注接种组，盲肠扁桃体中检测到的病毒基因组拷贝数最多，与我们之前关于FADV-8的研究相一致[16]。Ojkic和Nagy [29]报道，另一血清型病毒（ FADV -9）的复制和组织中的分布会受到接种途径的影响。由于FADV -4是通过粪口途径水平传播的[9]，我们将肌注接种和天然口服途径感染进行了比较。总体上，口服接种组具有更高的病毒基因拷贝数，这与我们之前关于FADV -8的研究相反[16]，在之前研究中发现肌注接种的雏鸡的病毒基因组拷贝数更高。出现该差异的原因可能是由于在这两个研究中所用的病毒血清型不同。肌注接种组可以在整个研究过程中（28 dpi）从泄殖腔拭子分离到FADV -4 ON1，而口服组的病毒排出只持续到21 dpi。在所有时间点，口服接种的鸡的粪便的病毒滴度都显著高于肌注接种组。FADV -8病毒也报道了类似的排毒情况，可以在28dpi仍有排毒[16]。为了增加结果的真实性，在进一步研究中应考虑到鸡的不同品种和来源。

肌注接种FADV - 4的雏鸡的抗体应答显著高于口服接种雏鸡。当鸡只通过肌注途径感染FADV-8和FADV - 9时，也可产生较高的抗体水平[16, 29]。并且尽管S / P比值较低，通过ELISA检测异源FADV血清型—FADV -9的血清结果为阳性，这些结果证实了已发布的数据，说明异源病毒可以被用来检测其他血清型的腺病毒抗原 [33, 13]。重要的是，我们证明了FADV - 4 ON1具有免疫原性，并且可以诱导鸡的中和抗体。因此，该分离株可以作为活疫苗病毒。

FADV-4最显著的特征是它的大小和两种fiber基因的存在。根据以往的研究[18]， FADV - 4 ON1基因组的长度是45667 bp，为目前报道过的最大的AdV基因组。两个fiber基因位于基因组中央区域且彼此相邻，表现出类似于FADV -1 fiber1和fiber2基因的 β -链结构[19, 12]。作者推测， FADV -4 fiber2基因可能与受体结合并决定了FADV - 4的组织嗜性，而不是与CAR（科萨奇-腺病毒受体）结合，这可能导致FADV -4强毒感染具有独特的临床特征 [18]。

我们对与I型辅助性T细胞有关，具有促炎、调节作用的细胞因子基因，也就是IFN- γ ， IL-18， IL-10和IL-8基因在肝脏、脾脏和盲肠扁桃体中的表达情况进行了研究，结果显示了感染早期基因的激活情况。在之前的研究中报道了FADV -8感染后细胞因子的表达情况[15]，但本研究是第一个关于FADV -4感染后细胞因子表达情况的报道。我们发现IFN- γ 在肝中的表达



CHICK PROGRAM

增强，尤其是在3 dpi，其表达显著增强。IFN- γ 被认为在对多种病原体的宿主防御中起到了重要作用。例如IFN- γ 可以通过诱导一氧化氮合成抑制马立克氏病病毒（MDV）的复制 [41]，降低球虫的复制[24]，抑制Rous肉瘤病毒的src癌基因诱导的肿瘤生长[34]。IFN- γ 也可以通过转录相关机制抑制体外腺病毒载体转基因表达[39]。

与阴性对照组相比，感染组肝脏中的IL-10在3 dpi 时表达量显著上调。我们发现，FADV - 4感染后IL- 10上调与以前的报道是一致的[15]，这可能显示出病毒在逃避宿主免疫应答时存在免疫逃避机制，从而使病毒可以持续存在。 IL-10在适应性免疫系统细胞中同时具有免疫抑制和免疫刺激作用 [20]。也有报道显示感染猪繁殖与呼吸综合征病毒后，IFN- γ 和IL-10会同时表达 [21]。最近Parvizi等[30]报道在MDV 易感鸡群中IFN- γ 和IL- 10的持续上调。在人类中，IFN- γ 和IL-10的上调均与IL-12刺激CD4⁺和CD8⁺ T细胞表达直接相关 [14] 。

总之，由于缺乏临床症状，大体病变及组织病变，表明FADV - 4 ON1是一株非致病性毒株。然而，结果显示病毒可以在组织中复制并引起强烈的抗体应答。病毒长期排出可能对于接种疫苗的鸡群来说是有利的，它可以确保鸡群长期均匀的接触病毒。感染该病毒后，肝脏中的IFN- γ 和IL- 10的表达增加，而脾中的IFN- γ 和IL- 18的表达下降，这提供了关于参与抵抗病毒感染免疫反应的重要介质的有益信息。我们的研究表明， FADV -4 ON1具有成为抵抗HHS的活疫苗和开发作为疫苗载体的潜力。但是，还需要进一步研究来证实该候选疫苗毒株的保护性。