

动物疫病鉴别检测技术 第3部分：禽腺病毒 I 群与禽腺病毒 III 群

Animal disease identification and detection technology—Part 3: Group I Avian adenoviruses and Group III Avian adenoviruses

地方标准信息服务平台

2024 - 12 - 30 发布

2025 - 01 - 30 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是DB37/T 4754《动物疫病鉴别检测技术》的第3部分。DB37/T 4754 已经发布了以下部分：

- 第1部分：猪瘟强毒与猪瘟疫苗弱毒；
- 第2部分：兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒2型；
- 第3部分：禽腺病毒I群与禽腺病毒III群。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由山东省畜牧兽医局提出并组织实施。

本文件由山东省畜牧业标准化技术委员会归口。

地方标准信息服务平台

引 言

动物疫病是影响山东省畜牧业健康发展的重要因素之一。不同病原或者相同病原的不同血清型/基因型引起疫病的临床病症具有一定程度的相似性，同时，有些疫病弱毒疫苗的使用干扰了病原的检测。动物疫病鉴别检测技术标准的建立，规定了对不同病原、相同病原的不同血清型/基因型以及弱毒疫苗株的鉴别检测，为山东省动物疫病精准防控提供了技术支持，对于促进畜牧业健康发展具有重要意义。

禽腺病毒（Avian adenovirus）分为3个属：禽腺病毒属（*Aviadenovirus*）、唾液腺病毒属（*Siadenovirus*）和腺胸腺病毒属（*Atadenovirus*）。禽腺病毒 I 群包括A~E 5个种12个血清型（FAdV-1~8a、8b~11）为禽腺病毒属成员，感染鸡、火鸡、鸭、鹅、鸽子以及珍珠鸡、雉鸡、鸚鵡、鸵鸟等野生禽类并引起心包积水综合征、包涵体肝炎、坏死性胰腺炎和肌胃糜烂症以及呼吸道疾病等典型临床病症；禽腺病毒 II 群为唾液腺病毒属，成员包括火鸡出血性肠炎病毒、雉鸡大理石脾病毒、鸡脾肿大病毒等，其中火鸡出血性肠炎病毒主要危害火鸡养殖；禽腺病毒 III 群唯一成员减蛋综合征病毒（Egg drop syndrome virus, EDSV），又称为鸭腺病毒A种，为腺胸腺病毒属，该病毒来源于鸭，易感宿主包括鸡、鸭、鹅等禽类，导致产蛋下降及产色浅、壳薄和无壳蛋，也可引起雏鹅呼吸道病征。我国养禽业主要包括鸡、鸭、鹅、鸽子等，禽腺病毒 I 群和 III 群易感宿主均包括鸡、鸭、鹅等，是影响我国养禽业健康发展的重要病原，且二者具有部分相同群抗原，因此，有必要针对禽腺病毒 I 群与 III 群开展鉴别检测，对于精准防控禽腺病毒感染具有重要意义。《动物疫病鉴别检测技术》拟由三个部分构成：

- 第 1 部分：猪瘟强毒与猪瘟疫苗弱毒。目的在于规范猪瘟强毒与猪瘟疫苗弱毒 SYBR Green I 荧光 RT-PCR 鉴别检测技术的操作，便于检测技术在猪瘟临床诊断、流行病学调查、检验检疫、猪瘟疫苗质量控制等方面的稳定应用。
- 第 2 部分：兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒 2 型。目的在于规范兔出血症病毒经典型与兔出血症病毒 2 型实时荧光 RT-PCR 鉴别检测技术的操作，便于检测技术在兔出血症临床诊断、流行病学调查、检验检疫等方面的稳定应用。
- 第 3 部分：禽腺病毒 I 群与禽腺病毒 III 群。目的在于规范禽腺病毒 I 群与 III 群 PCR 鉴别检测技术的操作，便于检测技术在禽腺病毒病临床诊断、流行病学调查、检验检疫等方面的稳定应用。

动物疫病鉴别检测技术 第3部分：禽腺病毒 I 群与禽腺病毒 III 群

1 范围

本文件描述了禽腺病毒 I 群与 III 群聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 的鉴别检测方法。

本文件适用于含有禽腺病毒 I 群与 III 群的鉴别检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 试验原理

PCR 技术是在 Taq DNA 聚合酶作用下，以靶 DNA 为模板、靶 DNA 序列 5' 端与 3' 端互补的且长度一般为 18 bp~27 bp 的特异性寡核苷酸为引物、dNTP 为反应原料，按照碱基配对及半保留复制原理，经变性、退火、延伸循环多次，DNA 扩增产物呈指数型上升，并通过琼脂凝胶电泳获知扩增产物的分子量从而判定结果。本文件对禽腺病毒 I 群与 III 群靶基因进行 PCR 扩增，并通过特异性扩增产物分子量差异，用于禽腺病毒 I 群与 III 群的鉴别检测。

5 试剂或材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 10 000×核酸荧光染料 (GelRed/GelGreen)。

5.3 DL 2 000 DNA 分子标准：包括 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1 000 bp、2 000 bp 分子量标准。

5.4 PCR 反应试剂：10×Taq DNA 聚合酶缓冲液、Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)、dNTP (2.5 mmol/L)；2×PCR 反应预混液 (2×Taq PCR Mix)。

5.5 磷酸盐缓冲液 (PBS)：0.01 mol/L、pH7.4。

称取氯化钠 (NaCl) 8.0 g、氯化钾 (KCl) 0.2 g、磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 0.2 g、磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O) 2.9 g，依次溶于 800 mL 水中，用盐酸调 pH 值至 7.4，于高压灭菌锅 121 °C 灭菌 20 min，4 °C 保存。

5.6 0.5 mol/L EDTA 溶液：pH8.0。

称取EDTA 18.61 g, 加灭菌水至80 mL, 用氢氧化钠调pH至8.0, 充分溶解, 定容至100 mL, 室温保存。

5.7 1×TAE 缓冲液。

取20 mL 50×TAE电泳缓冲液, 加灭菌水至1 000 mL, 室温保存。

5.8 1.5%琼脂糖凝胶。

称取琼脂糖1.5 g, 放入100 mL 1×TAE电泳缓冲液中, 加热融化, 温度降至50 ℃~60 ℃时, 加入10 μL 10 000×核酸荧光染料 (GelRed/GelGreen), 均匀铺板, 厚度为3 mm~5 mm。

5.9 6×核酸电泳加样缓冲液。

称取EDTA 4.4 g、溴酚蓝0.25 g、二甲苯腈蓝FF 0.25 g, 依次溶于200 mL灭菌水中, 加入180 mL甘油, 调pH值至7.0, 定容至500 mL, 分装室温保存。

5.10 病毒 DNA 提取试剂盒。

5.11 无核酸酶离心管 (1.5 mL)。

5.12 PCR 检测反应管 (0.2 mL)。

5.13 禽腺病毒 I 群 4 型、禽腺病毒 III 群 EDSV 阳性对照样品和阴性对照样品, 均-20 ℃保存。阳性对照: 禽腺病毒 I 群 4 型、禽腺病毒 III 群 EDSV 基因组 DNA; 阴性对照: SPF 鸡肝脏组织。

5.14 引物: 引物名称和序列按照附录 A 执行。

6 仪器设备

6.1 A 型 II 级生物安全柜。

6.2 电子天平: 精度 0.01 g。

6.3 高速冷冻离心机: 转速 \geq 12 000 r/min。

6.4 微型低速离心机: 转速 \leq 6 000 r/min。

6.5 冰箱: -20 ℃。

6.6 PCR 检测仪。

6.7 凝胶成像仪。

6.8 电泳仪、电泳槽。

6.9 高压灭菌锅。

7 样品

样品采集、保存和运输按照NY/T 541执行。

8 试验步骤

8.1 样品处理

8.1.1 肝脏组织样品

在A型 II 级生物安全柜中处理。使用电子天平称取 $1.00 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ 样品, 剪碎后与PBS按1:5 (W/V) 比例混合, 研磨成组织匀浆, 装入1.5 mL无核酸酶离心管, 置于高速冷冻离心机, 4 ℃、12 000 r/min 离心5 min, 取上清液提取核酸。

8.1.2 拭子样品

置于500 μL 的PBS中充分震荡浸润，反复挤压拭子3次，4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min离心5 min，取上清液提取核酸。

8.1.3 病毒培养物样品

收获的病毒细胞培养液、禽胚尿囊液或卵黄液，直接提取核酸。

8.1.4 阴性对照样品

处理同8.1.1。

8.1.5 检毕样品

按照NY/T 541处理。

8.2 核酸提取

按照病毒DNA提取试剂盒说明书，提取待检样品、阴性对照样品的DNA。提取的DNA样品应立即检测，否则应-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存30 d。

8.3 PCR 检测

8.3.1 反应体系配置

PCR检测反应体系见表1。也可使用等效的商品化2 \times PCR反应预混液配制PCR扩增体系。

表1 PCR 检测反应体系

PCR反应液组分	1个检测反应体系的使用量 μL
10 \times <i>Taq</i> DNA聚合酶缓冲液	2.5
2.5 mM dNTP	0.5
禽腺病毒 I 群上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
禽腺病毒 I 群下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
禽腺病毒 III 群上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
禽腺病毒 III 群下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
DNA样品	2.0
<i>Taq</i> DNA聚合酶	0.5 (2.5U)
水	15.5
总体积	25.0

8.3.2 加样

将制备的阴性对照与待检样品DNA、阳性对照基因组DNA样品溶液产物各2 μL 依次分别加入对应PCR检测反应管中，扣紧管盖，混匀后置于微型低速离心机离心10 s。

8.3.3 扩增

PCR检测仪反应程序：

——第一阶段：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；

——第二阶段：94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，共 35 个循环；

——第三阶段：72℃ 10 min。

8.3.4 琼脂糖凝胶电泳

取5 μL扩增样品，与1 μL 6×核酸电泳加样缓冲液混匀（若使用含有染料的PCR预混液进行扩增，省略该环节），加样至1.5%琼脂糖凝胶样品孔，置于电泳槽TAE缓冲液中，并设DL 2 000 DNA分子标准电泳泳道，按照5 V/cm设置电泳仪电压，电泳30 min。电泳结束后，置于凝胶成像仪拍摄图片，根据分子量标准判断PCR扩增产物。

9 结果判定

9.1 质控标准

扩增产物经电泳检测，质控标准同时满足以下条件试验有效，否则无效：

- a) 阴性对照无特异性PCR扩增产物；
- b) 阳性对照能够扩增禽腺病毒I群4型494 bp与禽腺病毒III群EDSV 308 bp特异性扩增产物。

9.2 结果描述及判定

若被检样品PCR产物含有大小为494 bp的特异性条带，则判定为禽腺病毒I群核酸检测阳性，若被检样品PCR产物含有大小为308 bp的特异性条带，则判定为禽腺病毒III群核酸检测阳性，若被检样品PCR产物同时含有大小分别为494 bp、308 bp的特异性条带，则判定为禽腺病毒I群、III群核酸检测阳性；若被检样品无特异性PCR产物，则判定为禽腺病毒I群、III群核酸检测阴性。电泳图见附录B。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(规范性)
引物

引物名称和序列见表A.1。

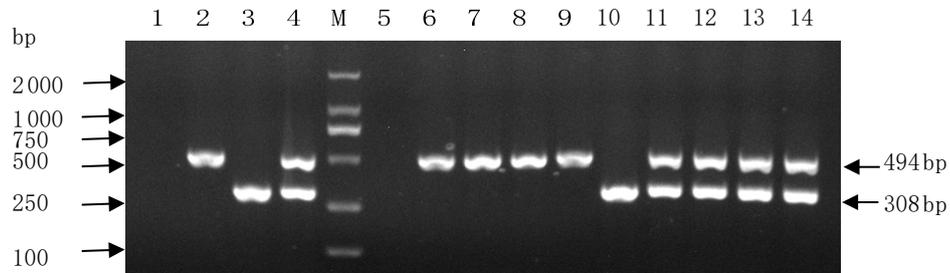
表A.1 引物名称和序列

病毒名称	序列名称	序列 (5' —3')
禽腺病毒 I 群	上游引物	GTGGTRTCCATGTTGGT
	下游引物	ATGTACGCYTCCGCCCTC
禽腺病毒III群	上游引物	CTGGTGAGTCTAGCTTGTCT
	下游引物	CACAATCAGTAGCAACACC
注：引物溶解于DEPC水，浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ ， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存；根据需要配制10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。		

地方标准信息服务平台

附 录 B
(资料性)
PCR 产物扩增电泳图

PCR扩增产物电泳图见图B.1。



标引字母、序号说明：

M——DL 2 000 DNA分子标准；

1——阴性对照；

2——禽腺病毒 I 群阳性对照；

3——禽腺病毒 III 群阳性对照；

4——禽腺病毒 I 群、III 群阳性混合样品；

5——禽腺病毒 I 群、III 群阴性样品；

6——禽腺病毒 I 群 A 种（1 型）临床样品；

7——禽腺病毒 I 群 C 种（4 型）临床样品；

8——禽腺病毒 I 群 D 种（11 型）临床样品；

9——禽腺病毒 I 群 E 种（8b 型）临床样品；

10——禽腺病毒 III 群临床样品；

11——禽腺病毒 I 群 A 种（1 型）、禽腺病毒 III 群临床混合样品；

12——禽腺病毒 I 群 C 种（4 型）、禽腺病毒 III 群临床混合样品；

13——禽腺病毒 I 群 D 种（11 型）、禽腺病毒 III 群临床混合样品；

14——禽腺病毒 I 群 E 种（8b 型）、禽腺病毒 III 群临床混合样品。

图B.1 PCR 扩增产物电泳图