

王海燕, 刘昊, 杜皓云, 等. 犬腺病毒 1 型 BJ 株的纤突蛋白基因特征与致病性 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 62-68.

WANG H Y, LIU H, DU H Y, et al. Characterization of fiber protein gene and pathogenesis of the canine adenovirus type 1 strain BJ [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 62-68.

## 犬腺病毒 1 型 BJ 株的纤突蛋白基因特征与致病性

王海燕<sup>1,2</sup>, 刘昊<sup>2</sup>, 杜皓云<sup>2</sup>, 赵锐<sup>2</sup>, 姜平<sup>1\*</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014;

2. 兆丰华生物科技(南京)有限公司北京生物医药科技中心, 北京 102600)

**摘要:** 为了解犬腺病毒 1 型 (CAV-1) 病原特点及其致病性, 采集北京 2 月龄患肝炎死亡犬肝脏和肺脏组织, 接种犬肾细胞 (MDCK), 进行血清中和试验、免疫荧光试验、血凝试验及 PCR 鉴定, 并进行病毒纤突蛋白 (Fiber) 基因测序分析和动物攻毒试验。结果: 该分离毒株在 MDCK 细胞上产生葡萄串状细胞病变; CAV-1 血清中和试验、免疫荧光试验和 PCR 检测均为阳性, 证明该分离病毒为 CAV-1 毒株, 命名为 BJ 株; 经过细胞培养后病毒含量为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL; 该分离毒株 Fiber 基因序列与国内外 23 个毒株同源性 98% 以上; 比格犬人工接种分离毒株后均表现出明显传染性肝炎临床症状, 并且全部死亡, 证明该分离病毒为 CAV-1 强毒株。本研究结果明确了分离株 BJ 的 Fiber 序列特征和强毒特性, 为 CAV-1 研究奠定了基础。

**关键词:** 犬腺病毒 1 型; 分离株; 致病性; 纤突蛋白

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)11-0062-07

## Characterization of fiber protein gene and pathogenesis of the canine adenovirus type 1 strain BJ

WANG Haiyan<sup>1,2</sup>, LIU Hao<sup>2</sup>, DU Haoyun<sup>2</sup>, ZHAO Rui<sup>2</sup>, JIANG Ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. Beijing Biomedical Science and Technology Center, Zhao Feng Hua Biotechnology (Nanjing) Co., Ltd., Beijing 102600, China)

**Abstract:** To understand the pathogeny and pathogenicity of canine adenovirus type 1 (CAV-1), in this study, a clinical lung and liver tissues sample from a dog that died of hepatitis in Beijing was inoculated into MDCK cells. And a CAV-1 strain BJ was isolated and identified by serum neutralization test, immunofluorescence assay, hemagglutination test, PCR, viral fiber protein gene sequencing, and animal challenge experiment. The isolate caused CPE with grape-like lesions in the MDCK cells. Their virus titer was  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL. The Fiber gene sequence of the isolate had more than 98% homology with those of 23 domestic and abroad CAV strains. The Beagle dogs challenged with the isolate showed symptoms of infectious hepatitis and died eventually. This indicated that the strain was a virulent strain of CAV-1. The present research results clarified the sequence characteristics of the Fiber protein and the virulent properties of the isolated strain, which laid a foundation for future research on CAV-1.

**Keywords:** canine adenovirus type 1; isolate; pathogenesis; fiber protein

犬腺病毒 (canine adenovirus, CAV) 是已发现的哺乳动物腺病毒属中致病性最高、感染动物最广的线性双股 DNA 病毒<sup>[1]</sup>。该病毒分为 CAV-1 和 CAV-2 血清型, 其中 CAV-1 即犬传染性肝炎病毒, CAV-2 即犬传染性喉气管炎病毒<sup>[2]</sup>。1947 年 Rubarth 首先发

现了犬传染性肝炎。1959 年 Kapsenberg 分离到该病毒, 称为犬传染性肝炎病毒, 即 CAV-1。1961 年 Dutchfield 等分离到仅限于引起呼吸道症状而不引起肝炎的腺病毒, 即多伦多 A26/61 株, 后来将其命名为犬传染性喉气管炎病毒, 即 CAV-2。我国 1983 年夏咸柱等首次报道 CAV, 1991 年郑海发首次分离到 CAV-2。此后, 我国陆续有学者分离了 CAV-1 并建立 CAV 检测方法<sup>[3-6]</sup>。同时, 世界各地发现了不同的 CAV 感染<sup>[7-8]</sup> 以及与犬瘟热病毒混合感染的情况<sup>[9-10]</sup>。本研究在进行 CAV 感染的流行病学调查时, 从北京的疑似肝炎患犬肝肺组织病料中分离出 1 株

收稿日期: 2025-02-24; 修回日期: 2025-09-02

基金项目: 兆丰华生物科技(南京)有限公司北京生物医药科技中心自立项目 (20120002)

第一作者: 王海燕, 女, 博士研究生

\* 通信作者: 姜平, 博士, 教授, 主要从事动物传染病学研究,

E-mail: jiangp@njau.edu.cn。

CAV-1, 经犬攻毒试验, 证明其为 CAV-1 强毒株。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞和病料

犬肾细胞 (MDCK) 由本实验室保存, 疑似 CAV 感染病料采自北京某犬场。

### 1.2 主要试剂

MEM 培养基购自 Hyclone 公司; 牛血清购自 GIBCO 公司; 胰酶购自 Sigma 公司, 由本实验室配制 0.25% 工作浓度; DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; CAV 特异性血清 (中和抗体效价 1:1 024, 本实验室自制); CAV 荧光抗体购自 VMRD 公司。

### 1.3 实验动物

筛选 6 只 CAV 抗原和 CAV 中和抗体阴性的 2 月龄比格犬用于试验, 购自北京日新科技有限公司。

### 1.4 病料采集与处理

2 月龄雌性幼犬, 生前出现鼻流脓涕、厌食、腹部有按压痛等症状, 剖检见其肝质脆, 胆囊水肿, 未进行相关药物治疗。取犬肝脏组织 1.0~2.0 g, 经无菌 PBS (0.01 mol/L, pH = 7.4) 冲洗表面后, 研磨, 然后用 10 倍体积的 PBS 制备成组织悬液, 反复冻融 3 次后, 经 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 置 -70 °C 保存备用。

### 1.5 病毒分离

将上述肝脏组织悬液按细胞培养液体积的 10% 接种 MDCK 细胞单层, 37 °C 吸附 1 h 后弃残液, 加入维持液置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3~5 d, 逐日观察细胞是否出现肿胀变圆并形成腺病毒典型的葡萄串状病变。如无细胞病变则于 3~5 d 收取上清液, 细胞按照常规传代, 至第 5 代仍未出现病变视为分离阴性。当出现细胞病变时, 冻融后收集病毒液并采用 MDCK 细胞连续培养 3 代, 收获病毒液, 置 -20 °C 以下保存, 待鉴定。

### 1.6 病毒含量测定

将出现病变的培养物用 MEM 培养基作 10 倍系列稀释, 取 10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup> 共 8 个稀释度, 分别接种 96 孔细胞培养板, 每个稀释度接种 6 个孔, 每孔 100 μL, 同时设不接毒对照孔, 每孔加入 MEM 培养基 100 μL, 向所有孔中加入 MDCK 细胞悬液 100 μL, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 观察 96~120 h, 记录出现典型的葡萄串状细胞病变孔数。按 Reed-Muench 法计算半数组织细胞感染量 (TCID<sub>50</sub>)。

### 1.7 血清中和试验

将分离病毒液用 MEM 培养基 1:100 倍稀释后, 分成 2 份, 其中一份作为未中和病毒对照, 另一份与

等量 1:10 倍稀释的抗 CAV 阳性血清 (实验室自制, 中和抗体效价 1:1 024) 混合, 经 37 °C 作用 60 min, 接种 96 孔板 6 个孔, 每孔接种 100 μL, 同时设细胞对照组和病毒对照组各 6 孔, 每孔分别接种 MEM 培养基和未中和病毒液 100 μL。接种后每孔加入 MDCK 细胞悬液 100 μL, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 连续观察 96~120 h, 记录是否出现细胞病变。

### 1.8 免疫荧光试验

将分离病毒液用 MEM 培养基 1:100 倍稀释后, 接种 96 孔板 6 孔, 每孔接种 100 μL, 同时设立细胞对照 (每孔接种 MEM 培养基 100 μL) 和 CAV 病毒对照 (本实验室保存, 每孔病毒液 100 μL), 接种后每孔加入 MDCK 细胞悬液 100 μL, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 96 h, 弃细胞营养液, 用 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 80% 丙酮液 50 μL, 2~8 °C 固定 40 min, 每孔加入 CAV 荧光抗体 50 μL, 37 °C 作用 1 h, 吸弃荧光抗体液, 用 PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜观察, 是否出现特异性荧光。

### 1.9 血凝试验

采用微量血凝法, 分别用 0.5% 的鸡、猪、大鼠、豚鼠、兔和人 “O” 型红细胞悬液测定病毒液的血凝 (HA) 效价, 以 50% 以上红细胞凝集判为凝集阳性。

### 1.10 PCR 检测

DNA 提取参照天根生化科技 (北京) 有限公司 DNA 提取试剂盒操作说明进行。引物序列 (CAV-F: 5'-CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC-3', CAV-R: 5'-CTTCGTGTCCGCTTCATG-3') 根据文献 [11] 设计, 由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。反应体系: *rTaq* 0.13 μL, 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 引物各 1 μL, 模板 2 μL, 加入 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 反应 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.11 纤突蛋白 (Fiber) 测序分析

引物序列 (Fiber-F: 5'-ATGAAGCGGACACGAAGTGCT-3', Fiber-R: 5'-TCATTGATTTTCCCCACATAGGTGAAG-3') 根据已有文献 [7] 设计, 由上海英潍捷基生物技术有限公司合成, PCR 体系: 引物各 0.5 μL, 模板 1 μL, 2×*Taq* Master Mix (Dye Plus) 12.5 μL, 加入 ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 反应 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 经凝胶电泳回收连接至 pMD19-T 载体, 转化

DH 5 $\alpha$ , 送北京擎科生物科技股份有限公司测序。

利用 DNASTar 软件将分离毒株序列与 GenBank 中 CAV 参考毒株 (表 1) Fiber 基因进行序列相似性比

对分析, 并用 MEGA 11.0 软件中 Clustal W 方法对 Fiber 基因序列绘制遗传进化树。

表 1 CAV-1 参考毒株序列信息

毒株名称	分离时间	地区	GenBank 登录号
CAdV-1 1798/2022	2022	意大利	PP551653.1
CAV-1/Bear/CAD/722/22/IVRI	2022	印度	OR466090.1
CAdV-1-JL2021	2021	中国	ON164651.1
D43	2020	日本	LC557010.1
undefined	2020	美国	NC_001734.1
V_3_7589	2019	印度	MT880782.1
Civet/India-Assam/2019/0199	2019	印度	MW876861.1
IZSSI_PA34446_19	2019	意大利	MW650927.1
IZSSI_RG17627_19	2019	意大利	MW650926.1
IZSSI_PA11822_19	2019	意大利	MW650925.1
IZSSI_PA8775_19	2019	意大利	MW650924.1
undefined	2018	美国	AC_000003.1
IZSSI_CL8747_17	2017	意大利	MW650923.1
F1301	2017	中国	MW345521.1
13-0067	2015	澳大利亚	KT853097.1
Wolf/835/2015/FRA	2015	法国	MH048659.1
CAdV-1 ITL2015	2015	意大利	KX545420.1
574-2013-RS	2013	意大利	KP840548.1
417-2013-L	2013	意大利	KP840546.1
13-0086	2013	澳大利亚	KT853096.1
113-5L	2011	意大利	KP840544.1
RI261	1996	英国	Y07760.1
GLAXO	1991	加拿大	M60937.1

## 1.12 致病性试验

将 CAV-1 BJ 株接种比格犬 3 只, 每只 4.0 mL ( $4 \times 10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>), 其中肌肉注射 2.0 mL, 滴鼻 2.0 mL, 同时设对照犬 3 只, 同条件隔离饲养观察 14 d, 每日观察临床症状和测定体温, 并于 14 d 对所有犬进行剖检, 观察器官肉眼病变, 采集肝、脾、肠、淋巴结等组织, 采用 PCR 方法检测 CAV-1。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒分离与鉴定

#### 2.1.1 病毒分离

病料经过无菌处理后接种 MDCK 细胞, 盲传 3 代后细胞出现肿胀变圆、聚集成葡萄串状等病变 (图 1)。将该病毒分离株命名为 BJ 株。

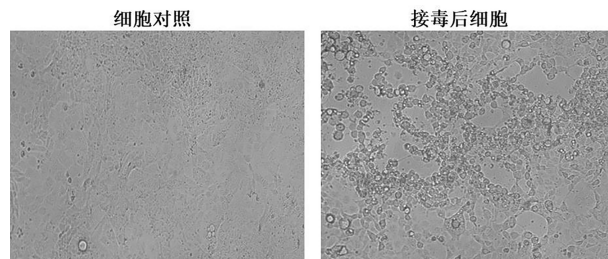


图 1 分离株接种在 MDCK 细胞上的病变 (200 $\times$ )

#### 2.1.2 血清中和试验

病毒对照孔出现典型的葡萄串状细胞病变, 细胞对照孔、分离株与 CAV 阳性血清中和试验孔细胞未见细胞病变 (图 2)。

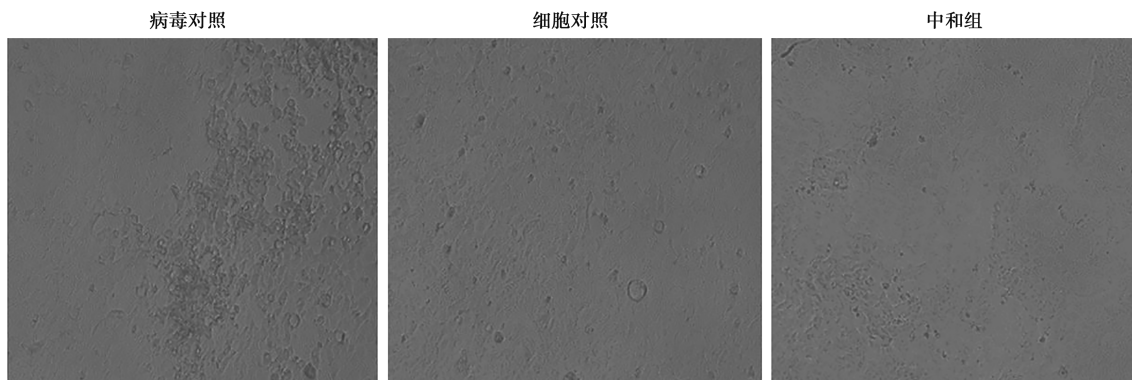


图2 分离株 BJ 与阳性血清的中和试验检测结果 (200×)

2.1.3 免疫荧光试验

将分离株 BJ 感染细胞进行免疫荧光染色, 结果见图 3。细胞对照孔无 CAV 特异性绿色荧光, 病毒

对照孔和病毒分离株孔出现 CAV 特异性绿色荧光, 呈明显的细胞核着色, 表明该分离毒株具有 CAV 抗原特性。

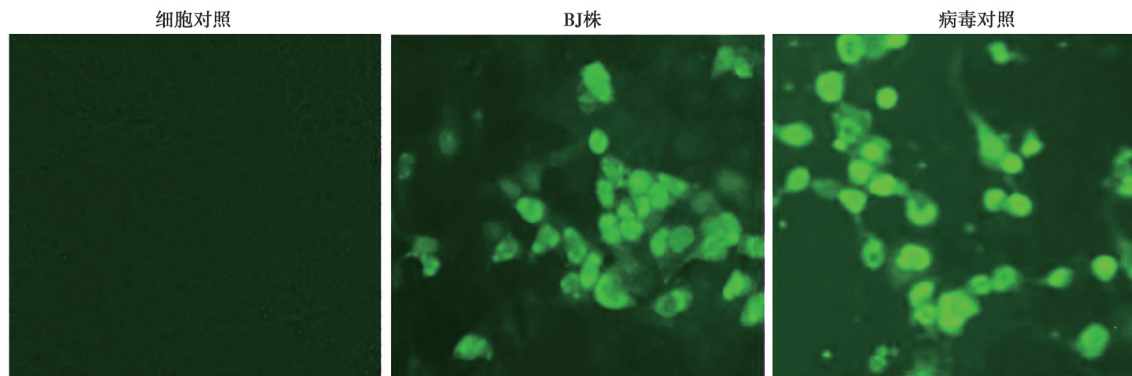


图3 BJ 株感染细胞的免疫荧光染色检测 (400×)

2.1.4 PCR 鉴定

以细胞培养物提取 DNA 作为模板, 病毒分离株 PCR 检测阳性, 扩增片段与 CAV-1 参考毒株的片段大小一致, 约 500 bp, 基因测序结果与 CAV-1 (序列号 Y07760.1 与 M60937.1) 序列一致。确定该分离毒株为 CAV-1 (图 4)。

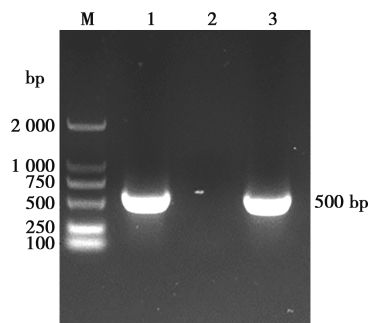
2.1.5 病毒血凝性与效价测定

分离的病毒对豚鼠、人“O”型红细胞的 HA 效价分别为 1 : 8、1 : 32; 对鸡、大鼠、猪和兔红细胞 HA 效价均小于 1 : 2。病毒含量为 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>/mL。

2.2 分离毒株 Fiber 基因测序分析

采用 PCR 方法扩增分离株 BJ 株 Fiber 基因, 克隆后测序分析, 结果显示, 该分离株 Fiber 基因大小为 1 632 bp, 基因进化树上属于分支 2 (图 5)。推导的氨基酸序列与意大利分离株 (KP840546.1) 同源

性达 99.4%, 与中国毒株的同源性达 99.5% (图 6)。



M. DL2000 DNA Marker; 1. BJ 分离株; 2. 阴性对照; 3. 阳性对照。

图4 BJ 分离株 PCR 产物电泳

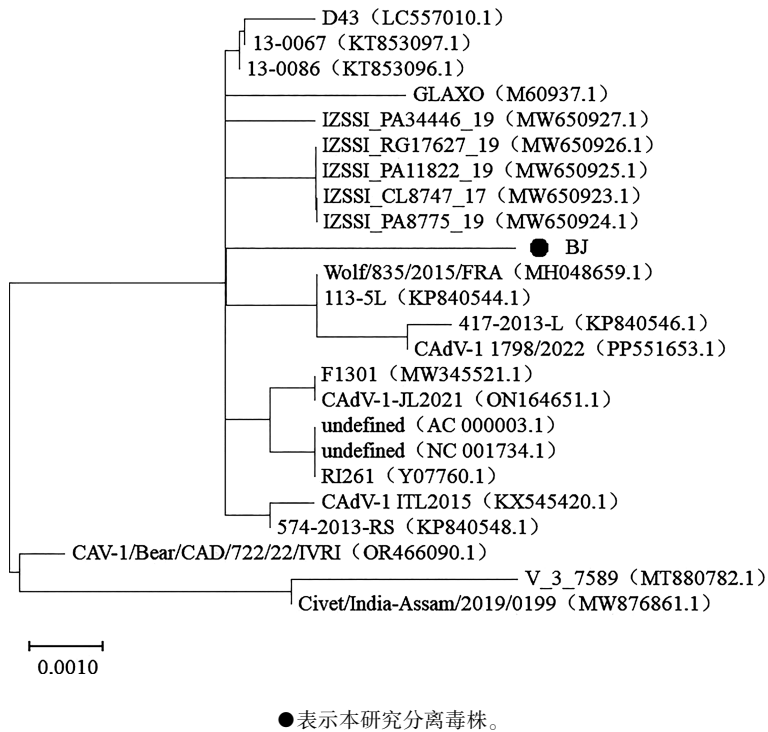


图5 CAV Fiber 基因遗传进化树分析

		同源性/%																										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
变异度/%	1	■	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	100.0	100.0	99.8	98.9	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	1	IZSSI_PA34446_19 (MW650927.1)	
	2	0.2	■	100.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	100.0	100.0	99.8	98.9	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.2	99.7	99.5	100.0	99.5	2	IZSSI_RG17627_19 (MW650926.1)	
	3	0.2	0.0	■	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	100.0	100.0	99.8	98.9	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.2	99.7	99.5	100.0	99.5	3	IZSSI_PA11822_19 (MW650925.1)	
	4	0.2	0.0	0.0	■	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	100.0	100.0	99.8	98.9	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.2	99.7	99.5	100.0	99.5	4	IZSSI_CL8747_17 (MW650923.1)	
	5	0.2	0.2	0.2	0.2	■	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	100.0	100.0	99.8	98.9	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	5	D43 (LC557010.1)	
	6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	■	99.8	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	98.9	99.8	99.8	99.8	99.8	100.0	99.2	99.9	99.5	99.8	99.5	6	Wolf/835/2015/FRA (MH048659.1)	
	7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	■	99.8	99.8	99.6	99.7	99.7	99.8	98.9	99.8	99.8	99.8	99.9	99.6	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	7	CAAdV-1 ITL2015 (KX545420.1)
	8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	■	100.0	99.6	100.0	100.0	99.9	98.9	100.0	99.9	99.8	99.6	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	8	undefined (AC_000003.1)	
	9	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	■	99.6	100.0	100.0	99.9	98.9	100.0	99.9	99.8	99.6	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	9	undefined (NC_001734.1)	
	10	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	■	100.0	100.0	99.6	98.8	99.6	99.6	99.7	99.4	99.6	99.1	99.5	99.4	99.6	99.4	10	GLAXO (M60937.1)	
	11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	■	100.0	99.8	99.4	100.0	99.8	99.8	99.7	99.8	99.4	99.8	99.2	100.0	99.7	11	13-0067 (KT853097.1)	
	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	■	99.8	99.4	100.0	99.8	99.8	99.7	99.8	99.4	99.8	99.2	100.0	99.7	12	13-0086 (KT853096.1)	
	13	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.4	0.2	0.2	■	98.9	99.9	100.0	99.8	99.6	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	13	F1301 (MW345521.1)	
	14	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	0.6	0.6	1.1	■	98.9	98.9	99.0	98.7	98.9	99.7	98.8	99.3	98.9	98.6	14	V_3_7589 (MT880782.1)	
	15	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.4	0.0	0.0	0.1	1.1	0.1	■	99.9	99.8	99.6	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	15	RI261 (Y07760.1)	
	16	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.4	0.2	0.2	0.0	1.1	0.1	■	99.8	99.6	99.8	99.2	99.7	99.5	99.8	99.5	16	CAAdV-1-JL2021 (ON164651.1)	
	17	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	1.1	0.2	0.2	■	99.6	99.8	99.3	99.7	99.6	99.8	99.5	17	574-2013-RS (KP840548.1)	
	18	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.4	0.4	0.4	0.6	0.3	0.3	0.4	1.3	0.4	0.4	0.4	■	99.8	99.0	99.9	99.3	99.6	99.4	18	417-2013-L (KP840546.1)	
	19	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	1.1	0.2	0.2	0.2	0.2	■	99.2	99.9	99.5	99.8	99.5	19	113-5L (KP840544.1)	
	20	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.6	0.6	0.8	0.3	0.8	0.8	0.7	1.0	0.8	■	99.1	99.6	99.2	99.0	20	Civet/India-Assam/2019/0199 (MW876861.1)	
	21	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3	0.3	0.5	0.2	0.2	0.3	1.2	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.9	■	99.4	99.7	99.6	21	CAAdV-1 1798/2022 (PP551653.1)	
	22	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.8	0.8	0.5	0.7	0.5	0.5	0.4	0.7	0.5	0.4	0.6	■	99.5	99.3	22	CAV-1/Bear/CAD/722/22/IVRI (OR466090.1)	
	23	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.0	0.0	0.2	1.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.8	0.3	0.5	■	99.5	23	IZSSI_PA8775_19 (MW650924.1)		
	24	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.3	0.3	0.5	1.4	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5	1.1	0.4	0.7	0.5	■	24	BJ		

图6 CAV-1 BJ 株与国内外 CAV 流行毒株 Fiber 基因同源性分析

### 2.3 致病性试验

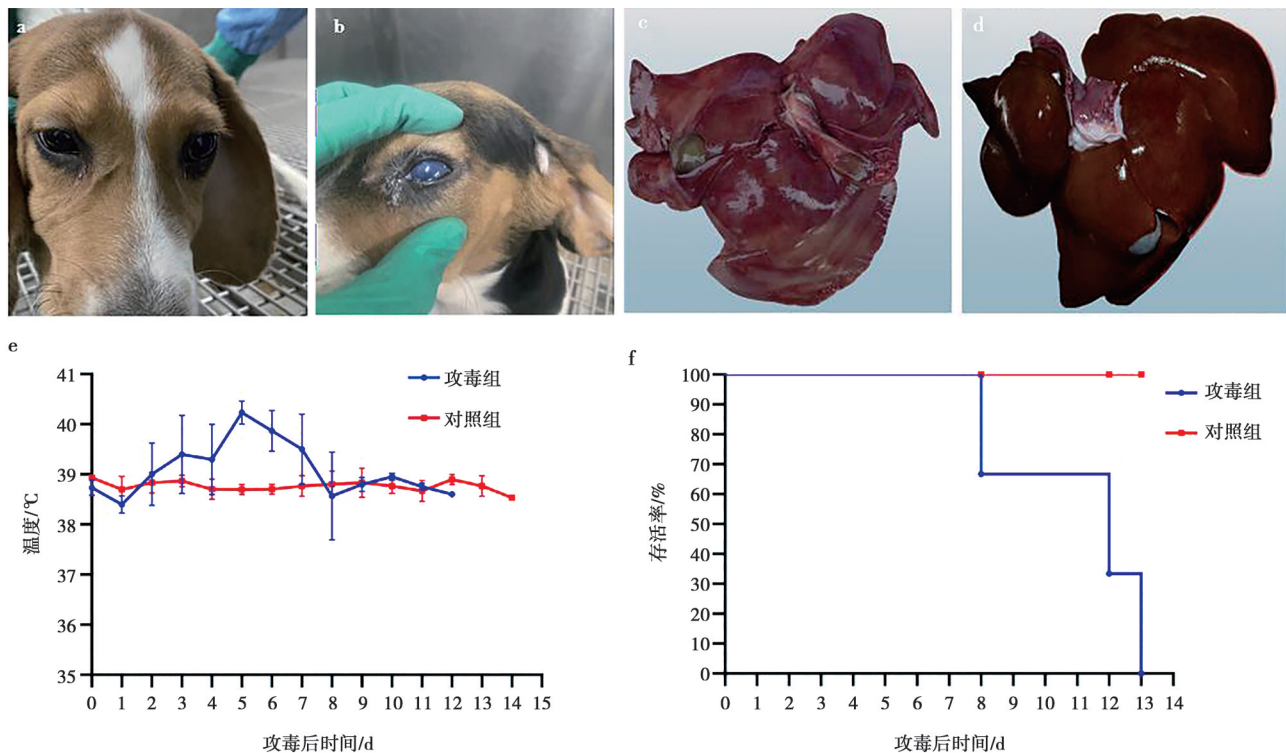
#### 2.3.1 临床症状

为了探究分离株的致病性，取 F5 代病毒液接种犬后连续观察 14 d，对照组 3 只犬体温正常，饮水、食欲、精神状态良好（图 7a）。攻毒组犬在病毒接种后第 3~5 天出现体温升高至 40℃ 以上，并维持 1~2 d，第 4~12 天出现水样或黏液样鼻液和眼泪、腹部压痛、拉稀或便血以及呕吐、精神沉郁、厌食，其中 2 只犬在第 4~8 天出现角膜混浊（图 7b），剖检

后发现死亡犬均出现肝脏肿大（图 7c），胆囊壁水肿，肠系膜淋巴结充血、肿胀。对照组犬均无可见病变（图 7d）。观察期内，攻毒组犬体温出现先升高，后正常（图 7e），但 3 只攻毒犬 3 d 内全部死亡（图 7f）。具体临床症状统计结果见表 2。

#### 2.3.2 感染动物组织中 CAV-1 的 PCR 检测

将攻毒组和对照组犬的肝、脾、肠、淋巴结等组织进行 PCR 鉴定，攻毒组均为 CAV-1 阳性，结果见图 8。



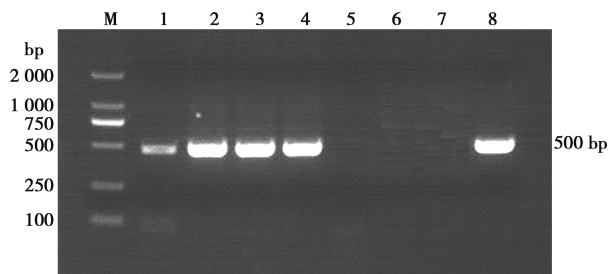
a. 空白对照组犬眼睛正常; b. 攻毒组犬眼睛蓝眼; c. 攻毒组犬肝脏肿大; d. 对照组犬肝脏正常; e. 体温测定结果; f. 动物存活率。

图7 CAV-1/BJ 株攻毒试验结果分析

表2 CAV-1/BJ 株攻毒犬的临床症状统计

组别	编号	攻毒后不同时间/d													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
攻毒	01	-	-	-	-	-	A	A	BCF	BDF	BD	BDE	BDE	BDE	/
	02	-	-	-	-	B	AB	A	B	BC	BD	BCD	BC	/	
	03	-	-	-	A	F	AF	BF	BCF	/					
对照	04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: -表示健活, 无临床症状; A 表示体温升高至 40 °C 以上; B 表示有水样鼻液和眼泪; C 表示呼吸脉搏增速、食欲不振、腹部压痛; D 表示出现血便; E 表示呕吐; F 表示角膜混浊或蓝眼; / 表示死亡。



M. DL2000 DNA Marker; 1~4. 攻毒组犬脾、肝、肠、淋巴结; 5~6. 阴性对照组犬肝脏和脾脏组织; 7. 阴性对照; 8. BJ 株对照。

图8 犬组织中 CAV-1 感染的 PCR 检测

### 3 讨论

CAV-1 感染宿主广泛, 且在世界范围内传播流行。根据已有报道, 目前已在犬、狐、狼、熊、貉、负鼠和臭鼬等多种动物中发现该病毒感染的证据<sup>[3-6,12-14]</sup>。Lial 等<sup>[15]</sup>发现巴西地区的灰狐同时感染 CAV-1 和犬瘟热病毒, 且群体内 CAV-1 流行率较高。本研究从北京地区的疑似 CAV 感染的犬肝脏中进行了病毒分离, 经过 CAV-1 特异性血清中和试验、免疫荧光试验以及 PCR 鉴定和序列测定分析, 确定分离得到 1 株 CAV-1 毒株, 并命名为 BJ 株。

CAV 是一种线状、非分节段的双链 DNA 病毒,其基因组全长约 31 kb,因血清型不同,其基因组大小也存在差异。CAV 主要衣壳蛋白包括六邻体、五邻体和纤突蛋白 3 种结构蛋白。Fiber 蛋白是暴露于腺病毒最表面的结构蛋白,其抗原决定簇决定了病毒的特异性和亚属的特异性。CAV 感染过程中, Fiber 蛋白与宿主细胞受体相互作用<sup>[16-17]</sup>。本研究的 CAV-1 分离株 BJ 株与 23 个参考毒株 Fiber 核苷酸序列同源性达 98.6%~99.7%,与国外文献报道的 CAV Fiber 蛋白的基因序列分析相一致<sup>[18]</sup>。

CAV-1 感染可引起犬出现以病毒性肝炎为主,并伴有体温升高、精神沉郁、食欲下降、饮水增加、鼻眼分泌物增加、呕吐等多种临床症状表现。研究报道,5 周龄幼犬感染 CAV 后,动物出现以转圈、共济失调和精神迟钝等神经症状为主要特征的症状<sup>[19]</sup>。王东<sup>[20]</sup>从发病死亡犬分离获得 CAV-1 毒株,研究发现多数犬在攻毒后第 2 天开始出现体温升高、呕吐等多种临床症状。本研究对犬进行了 CAV-1/BJ 毒株的攻毒感染试验,结果显示,试验组犬在病毒接种后 3 d 出现明显体温升高,并有黏液样鼻液、角膜混浊、拉稀、便血和呕吐等症状,观察期内全部死亡。死亡犬均出现肝脏肿大、肠系膜淋巴结充血肿胀等典型病变,表明分离的 CAV-1 毒株是以肝损伤为主的强毒毒株。

综上,本研究成功分离到 1 株 CAV-1 毒株,为该病毒研究奠定了重要基础。

## 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 1113-1116.
- [2] 扈荣良. 现代动物病毒学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 675-677.
- [3] 乔军,孟庆龄,夏咸柱,等. 犬 I 型腺病毒 TN 株的分离鉴定 [J]. 动物医学进展, 2001, 22 (4): 97-99.
- [4] 王东,王承宇,何东伟,等. 一株犬 I 型腺病毒强毒株的分离与鉴定 [C]. 第十三次全国养犬学术研讨会. 泰州, 2009.
- [5] 扈荣良,黄耕,林庆年,等. PCR 检测犬腺病毒方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 1994, 14 (3): 260-263.
- [6] WANG B, XU J, ZHANG H, et al. Establishment of ELISA method for canine adenovirus type 1 [J]. Front Vet Sci, 2024, 11: 1440124.
- [7] MIRA F, PULEIO R, SCHIRÒ G, et al. Study on the canine adenovirus type 1 (CAV-1) infection in domestic dogs in southern Italy [J]. Pathogens, 2022, 11 (11): 1254.
- [8] WRIGHT N G. Canine adenovirus: its role in renal and ocular disease: a review [J]. J Small Anim Pract, 1976, 17 (1): 25-33.
- [9] K C. Dual infection with canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus (canine adenovirus type 1) in a dog [J]. J Vet Med Sci, 1993, 55 (4): 699-701.
- [10] SILVA M L, CAIAFFA M G, DA COSTA A L M, et al. Canine distemper virus and canine adenovirus type 1 co-infection in a free-living hoary fox (*Lycalopex vetulus*) from Brazil [J]. Braz J Microbiol, 2023, 54 (1): 587-595.
- [11] 王雷,夏咸柱,卫广森,等. 犬腺病毒、犬细小病毒联合 PCR 方法的建立与应用 [J]. 病毒学报, 2003, 19 (3): 262-266.
- [12] BALBONI A, TRYLAND M, MØRK T, et al. Unique genetic features of canine adenovirus type 1 (CAV-1) infecting red foxes (*Vulpes vulpes*) in northern Norway and Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard [J]. Vet Res Commun, 2019, 43 (2): 67-76.
- [13] OLEAGA A, BALSEIRO A, ESPÍ A, et al. Wolf (*Canis lupus*) as canine adenovirus type 1 (CAV-1) sentinel for the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos arctos*) [J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69 (2): 516-523.
- [14] ZHU Y, SUN J, YAN M, et al. The biological characteristics of the canine adenovirus type 1 from fox and the transcriptome analysis of the infected MDCK cell [J]. Cell Biol Int, 2021, 45 (5): 936-947.
- [15] LIAL H C, NAVAS-SUÁREZ P E, EWBANK A C, et al. Adenovirus surveillance in wild carnivores from Brazil [J]. Infect Genet Evol, 2022, 99: 105246.
- [16] SCHOEHN G, EL BAKKOURI M, FABRY C M S, et al. Three-dimensional structure of canine adenovirus serotype 2 capsid [J]. J Virol, 2008, 82 (7): 3192-3203.
- [17] WANG B, WANG M, ZHANG H, et al. Canine adenovirus 1 isolation bioinformatics analysis of the fiber [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 879360.
- [18] VERIN R, FORZAN M, SCHULZE C, et al. Multicentric molecular and pathologic study on canine adenovirus type 1 in red foxes (*Vulpes vulpes*) in three European countries [J]. J Wildl Dis, 2019, 55 (4): 935-939.
- [19] HORNSEY S J, PHILIBERT H, GODSON D L, et al. Canine adenovirus type 1 causing neurological signs in a 5-week-old puppy [J]. BMC Vet Res, 2019, 15 (1): 418.
- [20] 王东. 犬 I 型腺病毒强毒株的分离与鉴定及其对犬的实验感染初步研究 [D]. 长春: 长春理工大学, 2009.