

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.06.01

# 禽腺病毒的分离鉴定及 LMH 细胞适应毒的生物学特性研究

陈玲<sup>1</sup>, 张兵<sup>1</sup>, 宋亚芬<sup>1</sup>, 刘月焕<sup>2</sup>, 蒋桃珍<sup>1\*</sup>

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 北京市农林科学院, 北京 100097)

[收稿日期] 2017-08-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 06-0001-06 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为了对采集自北京平谷某养殖场发病鸡中出现心包积液综合征症状的病料进行病毒分离和鉴定, 将病料接种 LMH 细胞进行病毒分离, 并在 LMH 上连续传代, 取 C5 和 C15 代细胞毒分别接种 3 周龄 SPF 鸡进行致病性试验。根据分离病毒在 LMH 上的 CPE 特征、病毒血清中和试验、Hexon 基因序列比对分析、SPF 鸡致病性回归试验, 表明从发病鸡病料中分离的一株病毒为血清 4 型禽腺病毒; 病毒在 LMH 细胞盲传 3 代后, 就能很好地适应细胞培养, 出现禽腺病毒典型的 CPE; 培养至第 10 代, 病毒在接种后 72 h, 病毒含量即可达到  $10^{7.4}$ TCID<sub>50</sub>/0.1mL 的峰值滴度; 接种细胞毒的 SPF 鸡出现 4 型禽腺病毒导致的典型临床症状和特异性剖检病理变化, 两组接种鸡的死亡率分别为 100% 和 70%。结果表明, 研究分离到的 4 型禽腺病毒毒株对 SPF 鸡具有高致死率, 但病毒经过细胞连续传代后对鸡的致死率降低。

**[关键词]** 禽腺病毒; 鸡肝癌细胞; Hexon 基因; 致病性

## Isolation and Identification of a Fowl Adenovirus and the Biological Characteristics of LMH-adapted Virus Strain

CHEN Ling<sup>1</sup>, ZHANG Bing<sup>1</sup>, SONG Ya-fen<sup>1</sup>, LIU Yue-huan<sup>2</sup>, JIANG Tao-zhen<sup>1\*</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100097, China)

Corresponding author: JIANG Tao-zhen, E-mail: taozhen\_jiang@163.com

**Abstract:** To isolate and identify the virus from a case of sick chickens with hydropericardium syndrome. The suspected sample was inoculated on LMH for viral isolation and then passaged for 15 times, and the pathogenicity of C5 and C15 were performed on 3-week SPF Chickens. A serotype 4 fowl adenovirus was identified by cytopathology effect on LMH, serum neutralization, sequence analysis of Hexon and pathogenicity regression test. The virus could adapt to LMH after three blind passages, and LMH infected with isolate strain showed obvious cytopathology effects, the virus titer of the 10<sup>th</sup> passage was up to  $10^{7.4}$ TCID<sub>50</sub>/0.1ml after 72 h inoculated. 3-week SPF Chickens inoculated with C5 and C15 had typical clinical symptoms and specific autopsy pathological changes

基金项目: 国家微生物资源平台(NIMR-5)

作者简介: 陈玲, 硕士, 从事种毒鉴定相关工作。

通讯作者: 蒋桃珍。E-mail: taozhen\_jiang@163.com

with a morbidity of 100% and 70%, respectively. The study demonstrated that the serotype 4 fowl adenovirus could cause high mortality to SPF chickens, but after continuous passage on LMH, the mortality rate was reduced.

**Key words:** Fowl Adenovirus; LMH; Hexon; pathogenicity

禽腺病毒属 (Aviadenovirus) 原称为 I 群禽腺病毒 (Group I avian adenovirus), 主要宿主为鸡、火鸡和鹅。病毒分类学第九次报告<sup>[1]</sup>将禽腺病毒 (Fowl adenovirus, FAdV) 分为 A、B、C、D、E 5 个种, 12 个血清型, 火鸡腺病毒 (TAAdV) 和鹅腺病毒 (GOAdV) 各划分为一个种。以前的研究表明, 腺病毒在鸡体内普遍存在, 但常呈隐形感染, 很少出现临床症状, 当与其它致病病原混合感染时才导致一些临床症状。最早报道的禽腺病毒感染是 1949 年发现的鹌鹑支气管炎, 1957 年确认的鸡胚至死孤儿病毒<sup>[2]</sup>。但近年来, FAdV 已成为鸡的一种重要的致病病原之一, 如 FAdV-1 (A) 感染后, 可以引起肌胃糜烂; FAdV-4 (C) 是心包积液综合症 (hydropericardium syndrome, HS) 的主要病原, 该病于 1987 年首先在巴基斯坦卡拉奇附近的安卡拉村发现, 因此也称为“安卡拉”病<sup>[3-4]</sup>; D 和 E 种的某些毒株可以造成严重的肝脏损伤, 导致包涵体肝炎 (inclusion body hepatitis, IBH)<sup>[4]</sup>。

自 2013 年起, 国内鸡群出现由 FAdV 引起的心包积液、包涵体肝炎症状的病例开始增多, 到 2015 年, 国内多个省份的许多养禽场流行 FAdV 感染, 感染鸡群出现以心包积液、肝脏肿大等病理变化为主的高死亡率的临床疾病, 给国内养鸡业带来了严重的经济损失<sup>[5-6]</sup>。试验通过对一株 FAdV 田间分离毒株的 Hexon L1 基因进行序列分析、在 LMH 细胞适应后的生物学特性分析及不同代次毒液对 SPF 鸡的致病性变化研究, 为进一步开展 FAdV 流行毒株分子流行病学调查研究及弱毒疫苗毒株的培育与筛选提供研究基础。

## 1 材料与方法

1.1 病料、标准 4 型禽腺病毒、4 型禽腺病毒阳性血清和 LMH 细胞 北京平谷养鸡场疑似 FAdV 感染的鸡肝组织, 由北京市农林科学院刘月焕研究员提供; 标准 4 型禽腺病毒 (AV211)、4 型禽腺病毒阳

性血清和 LMH 细胞由中国兽医药品监察所制备和保存。

1.2 SPF 鸡 3 周龄 SPF 鸡购自北京梅里亚维通实验动物有限公司。

1.3 主要试剂 大肠杆菌 JM109 感受态细胞、RNA 提取试剂盒、DNA Marker 为 Takara 产品; Reverse Transcription System 为 Invitrogen 公司产品; pfu 高保真聚合酶为 Promega 公司产品; pGEM-T 载体购于 Promega 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 Omega 产品; DMEM/F12 (1:1), Foetal Bovine Serum 为 GIBCO 产品。

1.4 病毒培养和传代 将肝脏组织剪成小块后置于研钵中, 倒入适量液氮, 充分研磨, 按 1:5 的体积比加入含双抗 (1000 U/mL) 的 PBS (1/15M pH 7.2), -80 °C 反复冻融三次, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 接种已长成单层的 LMH 细胞, 37 °C 培养 3 d, 收获后接种新的 LMH 细胞, 并在 LMH 上连续传至第 15 代 (C1-C15)。

## 1.5 病毒鉴定

1.5.1 PCR 鉴定 参照文献<sup>[7]</sup>, 用 PCR 方法扩增 Hexon L1 序列。

表 1 Hexon L1 引物

Tab 1 Hexon L1 primers

引物名称	序列 (5' to 3')	位置
Hexon A	CAARTTCAGRCAGACGGT	114-161
Hexon B	TAGTGATGMC GSGACATCAT	1041-1021

参照 Takara MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 说明书, 提取 4 型标准毒株和 C3、C7、C11、C15 代病毒基因组, 以 Hexon A/Hexon B 为引物进行 PCR 扩增。反应体系: 2×Ex Taq Mix 25 μL, HexonA/HexonB (10 uM/L) 各 2 μL, 模板 5 uL, ddH<sub>2</sub>O 16 μL; 反应条件: 94 °C 2 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。取 5 μL PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电

泳检查 PCR 扩增结果。

将 PCR 产物回收后,与 pGEM-T 载体连接,转化到 JM109 细胞,取 100  $\mu$ L 涂布含有氨苄的 LB 琼脂,37  $^{\circ}$ C 过夜培养。利用菌落 PCR 的方法鉴定重组子,挑选阳性克隆送往上海立菲生物技术有限公司测序。

**1.5.2 中和试验-特异性鉴定** 用含 DMEM/F12 培养液将 C5 代毒稀释至 200TCID<sub>50</sub>/0.1mL,取 1 mL 与等量的 4 型禽腺病毒阳性血清混合,同时设病毒对照,37  $^{\circ}$ C 作用 1 h,病毒中和组和对照组各接种 5 孔 LMH 细胞,每孔接种 0.2 mL。同时设 LMH 细胞对照 5 孔,每孔加入 0.2 mL 含 1% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液。将 48 孔板置 37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 5~7 d,观察细胞病变。

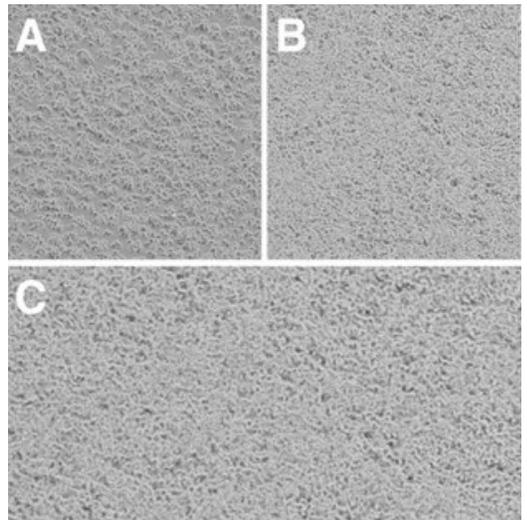
**1.6 病毒在 LMH 上的生长特性研究** 测定 C1-C15 各代病毒的滴度,以传代次数为横坐标,log TCID<sub>50</sub>/0.1mL 为纵坐标,绘制病毒在 LMH 上的生长曲线。

将 C10 稀释 10000 倍,取 1 mL 接种已长满单层的 LMH 细胞,37  $^{\circ}$ C 吸附 1 h 后,补充 9 mL 维持液。分别在接种培养的 12、24、36、48、60、72、84、96、108 和 120 h 取出细胞瓶,反复冻融三次,收获病毒。取病毒悬液按 Reed-Meunch 方法计算不同收毒时间的 TCID<sub>50</sub>,并绘制 C10 在 LMH 上的生长曲线。

**1.7 致病性试验** 将 30 只 3 周龄 SPF 鸡随机分为 3 组,每组 10 只。第一组鸡腿部肌肉接种 0.1 mL C5 代毒,其病毒含量为 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1mL;第二组鸡接种 0.1 mL C15 代毒,病毒含量为 10<sup>7.4</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1mL;第三组为阴性对照,注射等量的生理盐水。每天观察和记录试验鸡的发病和死亡情况。

## 2 结果

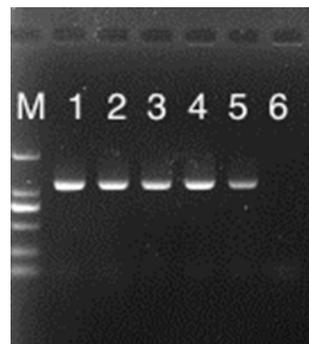
**2.1 LMH 细胞培养结果** 肝脏组织病料在 LMH 上盲传 3 代后,在 LMH 产生明显的细胞病变,其特征为细胞变大变圆,聚集成不规则的葡萄串状,聚团外的细胞间隙明显增大,与 4 型腺病毒标准毒株 (AV211) 出现同样特征的细胞病变 (图 1)。



A 正常的 LMH 细胞;B 禽腺病毒标准毒 (AV211); C 分离毒株。  
A normal LMH; B FAdV standard strain (AV211); C isolated strain  
**图 1 标准毒株 (AV211) 和分离毒株在接种 LMH 细胞后 48 h 细胞病变情况 (10X)**

**Fig1 CPE on LMH caused by standard strain (AV211) and isolated strain 48 h post-inoculation (10X)**

**2.2 PCR 鉴定** 4 型标准毒株和 C3、C7、C11、C15 代病毒均可以扩增出大小约为 900 bp 的 Hexon L1 片段 (图 2)。与 ATCC FAdV 12 个血清型标准毒株的 Hexon L1 片段进行比对后,绘制核苷酸进化树 (图 3)。可以看出分离毒株扩增出的保守序列大小与 4 型禽腺病毒标准毒株完全一致,且与 4 型 FAdV 处于同一分支。



M: DL1000,分子量大小从上到下依次为 1000、700、500、400、300、200 bp;1-6 依次为 4 型标准毒株、C15、C11、C7、C3 和阴性对照  
M:DL1000, Molecular weight from top to bottom are 1000,700,500,400,300, 200 bp; 1-6:serotype 4 standard strain,C15,C11,C7,C3 and negative control  
**图 2 标准毒株和各代次病毒 Hexon L1 片段电泳图**

**Fig 2 Hexon L1 electrophoresis chart of standard strain and different generations of isolated strain**

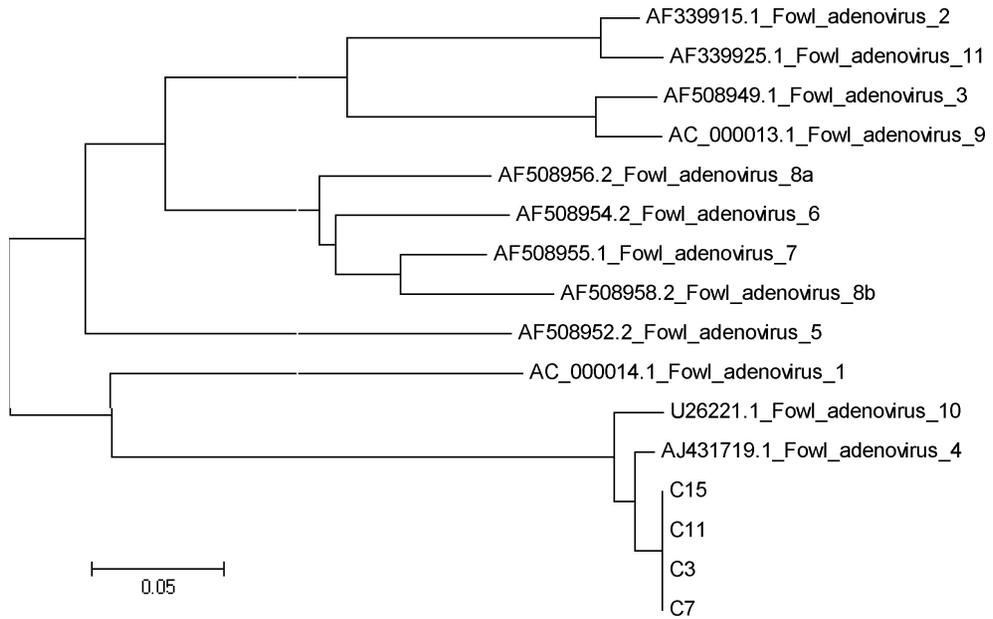


图 3 各代次分离毒株与 4 型标准毒株、FAdV 12 个血清型标准毒株的 Hexon L1 核苷酸序列进化树  
 Fig 3 Hexon L1 nucleic acid sequence evolution tree of different generations of isolated strain, serotype 4 standard strain and 12 serotype standard strains of FAdV

2.3 中和试验结果 分离毒株与 4 型禽腺病毒标准阳性血清中和后接种 LMH 细胞,不产生细胞病变,而病毒对照组都出现细胞病变,说明分离株能被 4 型禽腺病毒阳性血清完全中和。

表 1 中和试验结果

Tab 1 The result of serum neutralization test

	出现 CPE 孔数	未出现 CPE 孔数	鉴定结果
病毒对照组	5	0	能被 4 型禽腺病毒阳性血清完全中和
中和组	0	5	
细胞对照组	0	5	

2.4 致病性试验结果 C5 和 C15 细胞毒接种 SPF 鸡后,均在第 2 d 开始出现死亡,且鸡只死亡时间集中在 2~4 d。死亡鸡剖检,可见心包腔中有淡黄色清亮的积液;心包有斑点状出血;肝脏肿大、出血(图 4)。C5 和 C15 引起的死亡率分别为 100% 和 70%,C15 组未死亡鸡精神沉郁、羽毛蓬松,10 d 后恢复正常。说明分离毒株经细胞适应后,仍可致 3 周龄 SPF 鸡 100%,且 C5 可致 SPF 鸡 100% 死亡。

表 2 C5 和 C15 毒液对 SPF 鸡的致病性试验结果

Tab 2 The pathogenic result of C5 and C15 on SPF chickens

	接种后死亡数量			死亡率	发病率
	2d	3d	4d		
C5	2	5	3	100%	100%
C15	1	5	1	70%	100%
对照组	0	0	0	0	0

2.5 病毒在 LMH 上的培养结果 随着病毒在 LMH 上的传代增加,其对细胞的适应性逐渐增加,病毒滴度呈现上升趋势,至第 8 代,病毒培养滴度趋于稳定,8~15 代培养物的病毒含量均在  $10^{7.2} \sim 10^{7.4} \text{TCID}_{50}/0.1\text{mL}$ ,详见图 5。

病毒在 LMH 上的滴度在感染后 72 h 达到峰值  $10^{7.4} \text{TCID}_{50}/0.1\text{mL}$ ,随后略微下降,详见图 6。

### 3 讨论与小结

鸡感染禽腺病毒出现心包积液综合症的病例首次报道于 1987 年,该病发生在巴基斯坦的安卡拉地区。上世纪 90 年代,在伊拉克、印度、墨西哥、厄瓜多尔、秘鲁、智利、美国和俄罗斯等国家都相继报道有该病的发生和流行<sup>[8]</sup>。牛登云等<sup>[9]</sup>在 2014~2016 年期间,对我国鸡群中禽腺病毒感染情况进行



A 心包腔有淡黄色清亮液体; B 心包斑点状出血; C 肝脏脂肪黄染, 肿大  
A amber colored liquid in the pericardial sac; B mottling hemorrhage on pericardium; C swelling liver with yellow color

图 4 死亡鸡心脏和肝脏大体病变

Fig 4 Heart and liver lesion of dead chicken

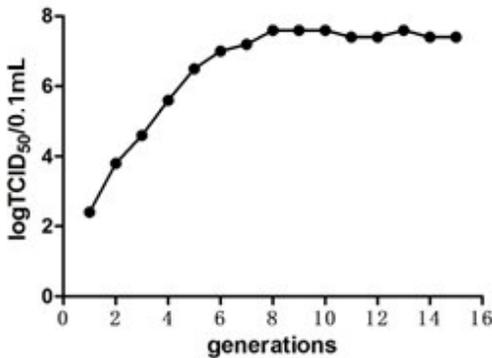


图 5 不同代次病毒在 LMH 上的增殖滴度

Fig 5 The virus titer of different passages on LMH

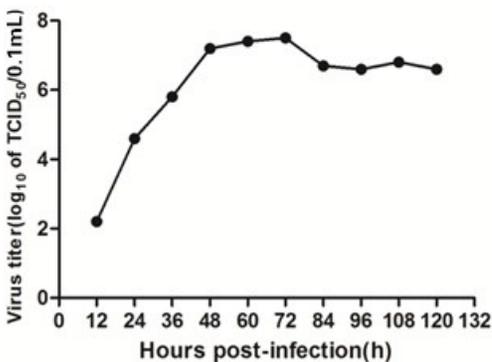


图 6 不同培养时间病毒在 LMH 上的增殖滴度

Fig 6 The virus titer on LMH at different point of time

了调查,发现我国大部分地区鸡群普遍存在禽腺病毒感染,且引起鸡群的发病和死亡,发病和死亡鸡的主要剖检变化表现为包涵体肝炎和心包积液综合征。从高发病地区的血清型调查结果来看,包涵体肝炎主要以 FAdV8a/b(E) 感染为主,而引起心包积液综合症的主要是 FAdV-4 型(C)。临床上心包积液的病例大多数存在着与鸡传染性贫血病毒(CAV)、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)等病原混合感染的情况<sup>[10]</sup>,这也是禽腺病毒感染后导致高发病率和死亡率的一个重要因素。但是,在研究的致病性试验中,采用纯净的 FAdV-4 型分离株接种 SPF 鸡,C5 代毒仍能导致其 100% 发病和死亡,表明禽腺病毒田间分离株可以直接导致感染鸡发病和死亡,其近期分离毒株的毒力已明显高于早期分离毒株。

FAdV 一般采用鸡胚肾细胞(CEK)和鸡胚肝细胞(CEL)两种原代细胞进行分离和培养<sup>[11]</sup>,但原代细胞制备繁琐、易污染,不利于实验操作;LMH 作为一种肝癌细胞系,可以无限传代,用于 FAdV 培养时,可以产生明显的细胞病变且病毒滴度高<sup>[12]</sup>。因此,研究直接采用 LMH 细胞对疑似禽腺病毒感染发病鸡的临床病料进行病毒分离培养,获得了一株 FAdV 毒株。通过血清学试验、基因序列分析等鉴定结果,表明分离到的病毒为 4 型禽腺病毒。此外,该 4 型禽腺病毒细胞适应毒的培育,为进一步开展禽腺病毒的研究工作奠定了基础。

细胞或组织连续传代培养一直是传统弱毒疫苗研发的主要技术之一。例如,鸡传染性支气管炎弱毒疫苗 W93 株就是由其亲本强毒毒株在鸡胚上连续传代致弱获得的<sup>[13]</sup>;日本乙型脑炎弱毒疫苗株 SA 14-14-2 是强毒株 SA14 在原代地鼠肾(PHK)细胞连续传代的产物<sup>[14]</sup>;通过鸡胚成纤维细胞(CEF)和 BHK-21 连续传代的方式可以获得鸭坦布苏病毒的弱毒株<sup>[15]</sup>。试验中将分离的 FAdV 在 LMH 上连续传 15 代后,其 C15 代毒对 SPF 鸡的毒力明显低于 C5。C5 代毒以每只鸡 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub> 接种后可导致接种鸡 100% 死亡而 C15 代毒以高于 C5 代毒约 10 倍剂量(10<sup>7.4</sup>TCID<sub>50</sub>/每只)接

种 SPF 鸡后,引起的死亡率则为 70%。该结果表明 FAAdV 经 LMH 细胞连续传代后,可明显降低病毒毒力。因此,可以推测,将分离到 4 型禽腺病毒在 LMH 细胞经过连续传代致弱,有可能获得一株弱毒疫苗候选株,为今后进一步开展弱毒疫苗的研发提供了研究基础。

## 参考文献:

- [1] King A M Q, Adams M J, Carstens E B, *et al.* Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego: Elsevier/ Academic Press, 2012: 133-134.
- [2] 珍妮·布鲁格-皮尤,让·皮埃尔-瓦尔兰科特. 禽病手册 [M] (陈小玲等译). 香港: 凸版印刷利丰雅高. 2015 年. Jenny Brugge-Pew, Jean-Pierre Wallanco, *et al.* Poultry Disease Manual [M]. HongKong: Toppan Leefung PTE. LTD. 2015.
- [3] Anjum A D, Sabri M A, Iqbal Z. Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan. *Vet Rec.* 1989, 124 (10): 247-248.
- [4] David E. Swayne. Diseases of Poultry [M]. Singapore: Markono, 2013: 290-300.
- [5] Ye J, Liang G, Zhang J, *et al.* Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 25(5): 45-50.
- [6] Zhao J, Zhong Q. 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): e0133073.
- [7] Meulemans G, Boschmans M, Van den Berg T P, *et al.* Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses [J]. *Avian Pathology*, 2010, 30(6): 655-660.
- [8] Ganesh K, Raghavan R. Hydropericardium hepatitis syndrome of broiler poultry: current status of research [J]. *Research in Veterinary science*, 2000, 68: 201-206.
- [9] 牛登云,沈元,王蕊,等. 2015 年我国 I 群禽腺病毒分子流行病学调查 [J]. *中国家禽*, 2016, 38(9): 65-68. Niu D Y, Shen Y, Wang R, *et al.* Molecular Epidemiological Survey of Group I Fowl Adenoviruses in China in 2015 [J]. *China Poultry*, 2016, 38(9): 65-68.
- [10] 扈荣良. 现代动物病毒学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2014: 325-344. Hu R L. *Modern Animal Virology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 325-344.
- [11] McFerran, J B, Adair B M. Avian adenoviruses—A review [J]. *Avian Pathol*, 1977, (6): 189-217.
- [12] 赵莉,周洁,高诚,等. I 型腺病毒 AV208 株在鸡肝癌细胞中增殖规律的研究 [J]. *微生物学通报*, 2012, 39(8): 1120-1126. Li Z, Zhou J, Gao C, *et al.* Growth pattern of fowl adenovirus type I - AV208 strain on chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH [J]. *Microbiology China*, 2012, 39(8): 1120-1126.
- [13] Philip D M. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges [J]. *Virology*, 2015, 47(9): 370-392.
- [14] Halstead S B, Thomas S J. Japanese encephalitis: new options for active immunization. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 50(8): 1155-1164.
- [15] Li G, Gao X, Xiao Y, *et al.* Development of a live attenuated vaccine candidate against duck Tembusu viral disease. *Virology*, 2014, 233(1): 450-451.

(编辑:陈希)