

魏燕鸣, 龚文孝, 杨影, 等. 鸡源禽腺病毒的 LMH 细胞传代及细胞传代毒株对 SPF 鸡的致病性[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(2): 95-101.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.02.013

鸡源禽腺病毒的 LMH 细胞传代及细胞传代毒株 对 SPF 鸡的致病性

魏燕鸣¹, 龚文孝¹, 杨影², 马季¹, 邹忠¹, 金梅林¹

1. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070; 2. 武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070

摘要 为建立禽腺病毒 4 型的禽源细胞感染模型, 并考察细胞培养毒株对动物的致病性, 将实验室 2014—2017 年间分离的 5 株血清 4 型禽腺病毒接种鸡肝癌细胞 (leghorn male hepatocellular cells, LMH) 并盲传, 选取各病毒的 LMH 细胞培养物, 按一定剂量经腿部肌肉注射接种 4 周龄 SPF 鸡; 记录试验动物的发病情况, 剖检采集发病或死亡鸡的脏器并制作病理切片, 观察并分析病毒细胞培养物感染 SPF 鸡的组织病理变化。结果发现: 5 株血清 4 型禽腺病毒在 LMH 细胞上盲传至第 4 代时开始出现 I 群禽腺病毒所致的特异性细胞病变, 提取培养物中病毒核酸并进行 PCR 鉴定, 均能扩增出大小约 564 bp 的特异性扩增片段, 表明病毒能在 LMH 细胞上稳定增殖。选取各病毒第 10 代细胞培养物进行 SPF 鸡回归试验, 发现细胞培养上清接种 4 周龄 SPF 鸡后第 3 天开始, 有部分鸡开始精神沉郁, 食欲消退, 卧地不起瘫痪并迅速死亡, 病理剖检及病理组织切片结果显示 HB-1、HB-2、HB-3 和 SD-1 毒株保持对 4 周龄 SPF 鸡的致病性, 病死鸡中能观察到典型的组织病理学变化, 而对照组不出现任何临床症状及病理变化。以上结果表明, LMH 细胞可用于禽腺病毒增殖传代, 是开展禽腺病毒分子致病机制研究的理想细胞模型。

关键词 禽腺病毒; 鸡肝癌细胞; 包涵体; 心包积水; 病毒传代; 细胞感染模型; 灭活疫苗; 弱毒活疫苗

中图分类号 S 852.65⁺7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)02-0095-07

鸡包涵体肝炎 (inclusion body hepatitis, IBH) 和心包积水肝炎综合征 (hepatitis hydropericardium syndrome, HHS) 是由 I 群禽腺病毒引起的对鸡群危害严重的 2 种疾病^[1]。I 群禽腺病毒可分为 5 个种 (A~E) 和 12 个血清型 (1~8a 和 8b~11), 包括 A (CELO)、B (5)、C (4、10)、D (2、3、9、11)、E (6、7、8a、8b), 其所有的 12 个血清型都与包涵体肝炎密切相关^[2-3]。该病毒主要对 3~5 周龄鸡致病, 主要症状为肝脏坏死出血, 组织病理学变化主要表现为大量嗜酸性或嗜碱性核内包涵体聚集^[1]。血清 4 型禽腺病毒是心包积水肝炎综合征的主要病原, 部分毒株致死率高达 100%, 其典型症状是 3~5 周龄肉鸡突然死亡, 剖检心包显示大量透明或琥珀色水样或凝胶状液体聚集, 肝脏出血坏死和肝细胞镜检到大量嗜碱性核内包涵体^[4]。

自 2014 年江苏省首次报道禽腺病毒的暴发, 本病已在全国多地集中暴发, 给养禽业造成巨大的经

济损失^[5-8]。虽然国内禽腺病毒感染日益增多^[9-10], 但主要的研究局限于分子流行病学调查等, 对禽腺病毒的致病机制研究较少^[11]。缺少禽腺病毒的细胞感染模型是相关研究滞后的原因之一。本试验通过对 5 株田间分离血清 4 型禽腺病毒在鸡肝癌细胞 (leghorn male hepatocellular cells, LMH) 上进行适应传代后建立禽腺病毒的禽源细胞感染模型, 并研究细胞培养毒株对 SPF 鸡的致病性, 以期为进一步开展致病机制研究及疫苗研制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

5 株 I 群禽腺病毒 4 型 (HB-1 株、HB-2 株、HB-3 株、SD-1 株、HN-1 株) 由笔者所在研究室人员分离、鉴定并完成基因组测序, NCBI 基因组序列登录号分别为 KX421400.1、KX421401.2、KX421402.1、KX421404.2、KX421403.2。

收稿日期: 2019-04-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0501600)

魏燕鸣, 工程师, 研究方向: 动物病原分子生物学. E-mail: 370551650@qq.com

通信作者: 金梅林, 博士, 教授, 研究方向: 动物病原分子生物学. E-mail: jml8328@126.com

鸡肝癌细胞(leghorn male hepatocellular cells, LMH)购于 ATCC,由华中农业大学预防兽医学实验室保存。

1.2 实验动物及主要试剂

无特定病原(SPF)鸡购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

病毒基因组 DNA 提取试剂盒系北京全式金生物科技股份有限公司产品;F12 培养基为 Hyclone 公司产品;新生牛血清系内蒙古金源康生物工程有限公司产品;胰酶为美国 GIBCO 公司产品。

1.3 细胞传代

鸡肝癌细胞(LMH)培养是在含 10%新生牛血清的 F12 培养基中 37℃、5% CO₂ 温箱中培养,按常规方法将长满单层的 LMH 细胞用胰酶消化后,用 F12 生长液吹散,调整细胞密度至 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 接种细胞板或细胞瓶。

1.4 病料处理

采集病鸡的肝脏、心脏等组织,剪碎后转入研磨器中,加入灭菌的 PBS 研磨成 10%的组织悬液,反复冻融 3 次,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后,用 1 mL/管分装后置 -70℃ 冰箱保存。

1.5 病毒分离

将病料悬液 1 mL 接种已长成单层的 LMH 细胞,并加入 1 mL 的细胞维持液,37℃ 吸附 1 h 后,吸弃接种物,加入 F12 细胞维持液(包含有 1%胎牛血清的 F12 培养基)5 mL,37℃ 培养 3 d,每天观察,如出现细胞病变即及时收毒,如无细胞病变出现,则在培养 72 h 时收取培养上清,并继续盲传,如盲传 5 代后仍无病变者弃去不要。

1.6 分子遗传进化分析

利用生物信息学软件 DNASTar 7.0 和 MEGA6 对选取的禽腺病毒 A、B、C、D 和 E 各型参考毒株基因组序列及分离毒株的基因组序列进行分子遗传进化分析^[12]。

1.7 病毒的 PCR 鉴定

根据 GenBank 中已发表的 I 群禽腺病毒 A-2A 基因核酸序列(Gene ID:1476582)的 hexon 基因设计引物,上游引物 FAdV-F:5'-TGCTCGTTGTG-GATGGTGAA-3',下游引物 FAdV-R:5'-CTC-CGTGTTGGGCTGGTC-3'。

按照试剂盒说明书提取肝脏研磨上清或细胞培养物中病毒 DNA,用 20 μL TE 缓冲液进行洗脱,

取 4 μL 加入干净的 PCR 管中,依次加入 20 μmol/L 的上/下游引物各 1.5 μL,Trans Tag DNA 聚合酶 0.5 μL,10×Trans Tag buffer 2.5 μL,10 μmol/L 的 dNTPs 2 μL,然后加水补充体积至 25 μL。混匀后按照以下程序进行 PCR 扩增:95℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;最后整体延伸 10 min。PCR 结束后取 5 μL 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

1.8 病毒 TCID₅₀ 测定

将 LMH 细胞在 96 孔细胞培养板上培养至单层,将分离毒株的第 5、8 和 10 代毒株用 F12 培养液作 10 倍倍比稀释,取原液、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 9 个稀释度,接种 96 孔板,每个稀释度 8 孔,100 μL/孔,置 37℃ 温箱,5% CO₂ 孵育 1 h,然后每孔补加 100 μL 细胞维持液,培养 7 d,记录细胞病变,按 Reed-Muench 法计算病毒 TCID₅₀。

1.9 SPF 鸡回归试验

3 周龄 SPF 鸡 60 只随机分为 6 组,每组 10 只,其中 5 组为攻毒组,1 组为对照组。攻毒组通过腿部肌肉注射接种分离毒株 0.2 mL/只^[12],对照组接种 0.2 mL 灭菌 PBS,所有 SPF 鸡均饲养于实验动物中心负压隔离器,每日观察记录鸡群发病死亡情况及临床症状。

1.10 病理组织学观察

剖检病死鸡及对照组的鸡,观察脏器大体病理变化,并取病死鸡及对照鸡的心脏、肝脏和肾脏,按照常规方法制作石蜡切片,在光学显微镜下观察病理组织学变化。

2 结果与分析

2.1 分离病毒的遗传进化分析

如图 1 所示,所有 5 个毒株均与 C 型禽腺病毒有着很高的同源性,从 98.3%至 99.9%不等,且与血清 4 型流行毒株 JSJ13 在同一遗传分支,同源性高达 99.9%(表 1)。

2.2 病毒的分离与鉴定

将疑似禽腺病毒感染的病鸡肝脏匀浆,匀浆上清接种已长满单层的 LMH 细胞,结果有 5 份样品在传到第 4 代时开始出现病变,主要表现为细胞变圆、聚集、拉网,并最终脱落、裂解,与 I 群禽腺病毒 4 型所致的病变一致(图 2)。

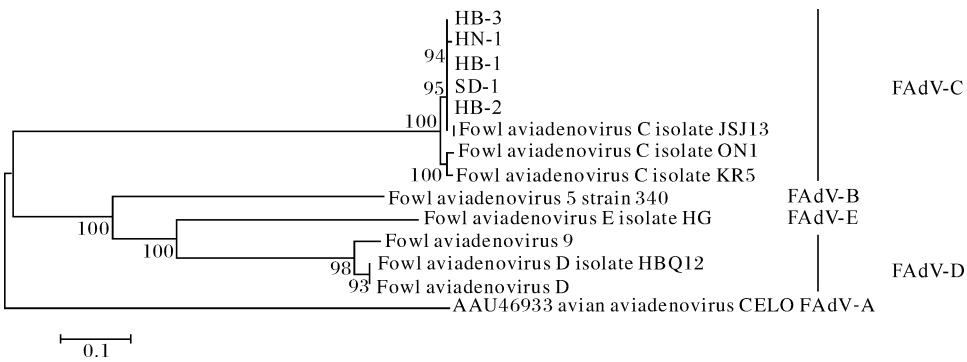


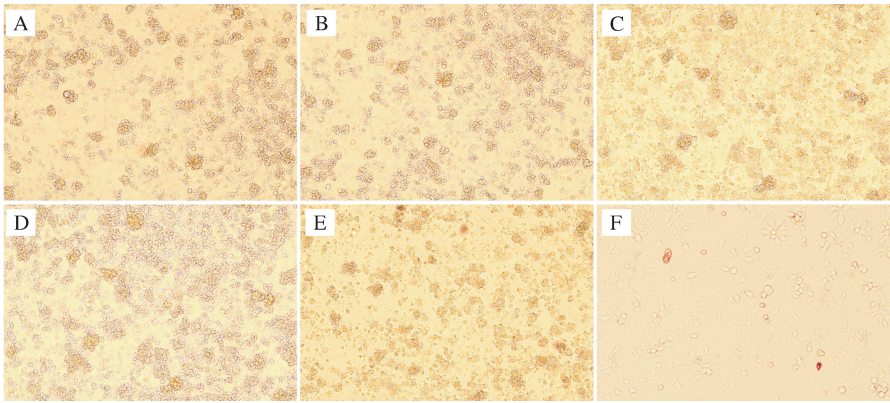
图 1 分离病毒基因组的遗传进化分析

Fig.1 Genetic evolutionary analysis of isolated virus genomes

表 1 分离病毒基因组的同源性比较

Table 1 Homology comparison of isolated virus genomes

基因型 Genotype	毒株 Strain	序列号 Seq. ID	同源性/% Homology				
			HB-1	HB-2	HB-3	HN-1	SD-1
FAdV-A	CELO	U46933	54.3	54.3	54.3	54.3	54.3
FAdV-B	340	NC_021221	56.0	56.0	55.9	55.9	56.0
FAdV-C	ON1	GU188428	98.3	98.3	98.3	98.2	98.3
FAdV-C	KR-5	HE608152	98.5	98.5	98.5	98.4	98.5
FAdV-C	JSJ13	KM096544	99.9	99.9	99.9	99.8	99.9
FAdV-D	A-2A	AF083975	55.8	55.8	55.8	55.8	55.8
FAdV-D	HBQ12	KM096545	56.2	56.2	56.2	56.1	56.2
FAdV-D	BJH13	KM096546	56.1	56.1	56.1	56.0	56.1
FAdV-E	HG	GU734104	56.9	56.9	56.9	56.9	56.9



A:HB-1; B: HB-2; C:HB-3; D:HN-1; E:SD-1; F:对照 Control.

图 2 匀浆组织上清接种 LMH 细胞后出现细胞病变

Fig.2 The cytopathic effect of LMH cells inoculated with homogenate tissue supernatant

将第 4 代细胞培养物反复冻融 3 次，离心取上清，用商品化的病毒 DNA 提取试剂盒提取核酸，洗脱核酸作为模板进行 PCR 扩增，结果表明上述 5 份培养物均出现大小约 564 bp 的 DNA 片段（图 3）。

2.3 LMH 细胞培养病毒 TCID₅₀的测定

将 5 个分离毒株在 LMH 细胞上进行连续传代，选取各毒株培养物的第 5 代、第 8 代和第 10 代，测定其细胞半数感染剂量，结果如表 2 所示，禽腺病毒分离毒株均能在 LMH 细胞上增殖，每毫升传

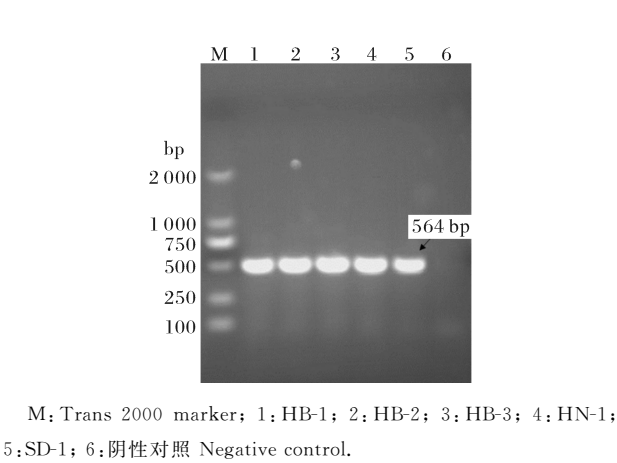


图 3 第 4 代细胞培养物的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of the 4th generation cell culture by PCR

代毒株(第 10 代)细胞半数感染剂量均大于 5。

2.4 SPF 鸡回归试验

选取第10代细胞培养病毒进行SPF鸡回归试

验,使用无血清的 F12 培养基调整病毒量为 10^4 EID₅₀/mL,每株病毒分别感染 10 只 SPF 鸡,腿部肌肉注射 0.2 mL/只。攻毒后连续观察 10 日,记录试验动物的发病和死亡情况(表 3)。

表 2 分离毒株的 TCID₅₀ 测定

Table 2 Determination the TCID₅₀ of isolated strains

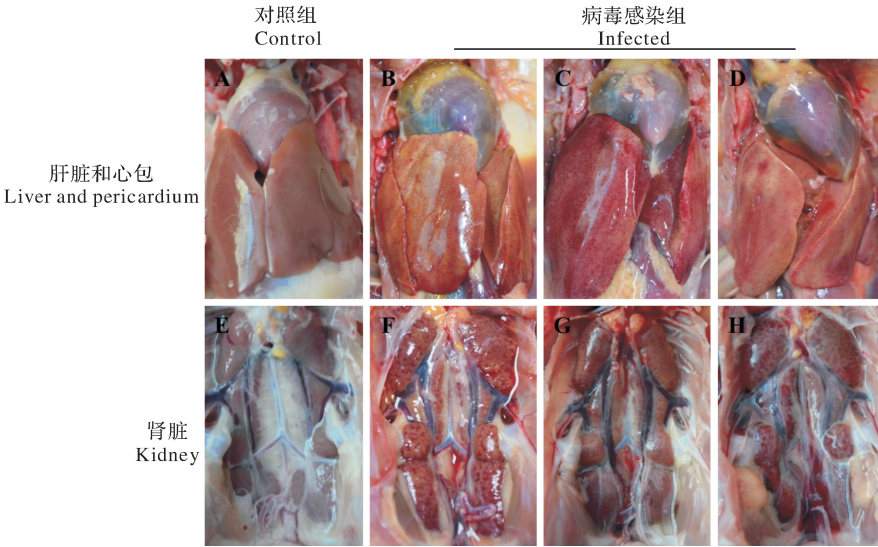
代次 Generation	毒株 Strain				
	HB-1	HB-2	HB-3	HN-1	SD-1
5 th	10 ^{3.4}	10 ^{5.3}	10 ^{3.5}	10 ^{4.7}	10 ^{3.8}
8 th	10 ^{4.9}	10 ^{5.6}	10 ^{5.1}	10 ^{4.9}	10 ^{4.5}
10 th	10 ^{5.7}	10 ^{6.2}	10 ^{5.5}	10 ^{5.6}	10 ^{5.8}

攻毒后第 2~3 天有部分鸡开始精神沉郁,第 3 天开始死亡,剖检病死鸡能观察到心包积液或者肝脏出血的症状(图 4)。取 HB-2 感染组病死鸡及正常对照鸡的心脏、肝脏和肾脏,按照常规方法制作石蜡切片,在光学显微镜下观察病理组织学变化。如图 5A、5B 和 5C 所示,对照组鸡心脏、肝脏和肾脏无

表 3 试验动物的发病和死亡情况记录 (n=10)

Table 3 Records of infected and dead chicken (n=10)

攻毒毒株 Infected virus	感染后死亡数 Death number post infection				总死亡动物数 Total number of dead chickens	死亡率/% Mortality rate
	3 d	4 d	5 d	6 d		
HB-1	1	3	2	1	7	70
HB-2	1	4	2	3	10	100
HB-3	1	3	1	1	6	60
HN-1	0	0	0	0	0	0
SD-1	2	3	1	2	8	80
对照组	0	0	0	0	0	0



A、E:对照组; B、F:HB-1 感染组; C、G:HB-2 感染组; D、H:SD-1 感染组; A, E:Control group; B, F:HB-1 infected group; C, G:HB-2 infected group; D, H:SD-1 infected group.

图 4 病死鸡的器官病理变化

Fig.4 Pathological changes of infected chickens

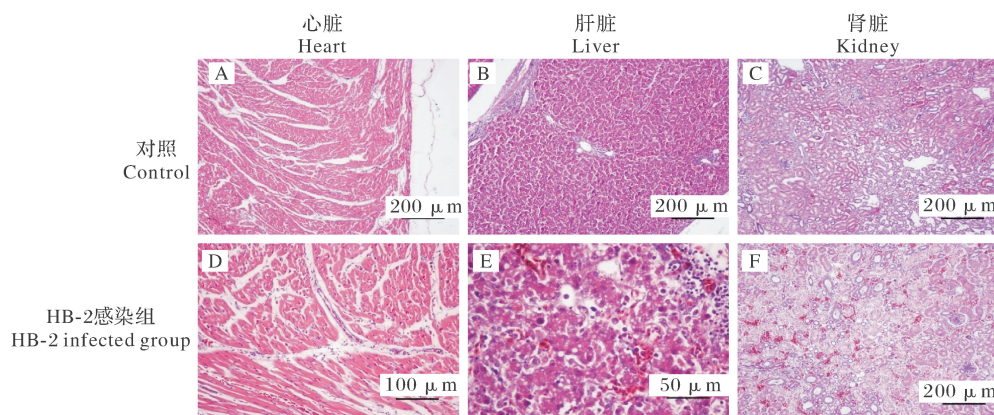


图5 HB-2感染组病死鸡及正常对照鸡的心脏、肝脏和肾脏的组织病理学变化

Fig.5 Histopathological changes of heart,liver and kidney in dead chickens infected with HB-2 and normal control chickens

明显组织病理学变化。病死鸡心脏心肌细胞出现少量淋巴细胞浸润(图5D);肝细胞脂肪变性,肝窦扩张、充满红细胞,肝细胞出现嗜碱性核内包涵体(图5E);肾血管扩张、充满红细胞、淤血,肾小管上皮细胞坏死,细胞核浓缩、破碎(图5F)。其中肝细胞出现嗜碱性核内包涵体是心包积水肝炎综合征的典型病理组织学变化。

3 讨论

禽腺病毒感染是近年来影响世界养禽业的重要传染病之一^[13]。近年来,I群禽腺病毒引起的心包积水综合征和包涵体肝炎的临床病例数量在世界各地明显增加,给许多国家养禽业造成巨大经济损失^[14-16]。2015年以来,我国多地区鸡群暴发主要由I群血清4型禽腺病毒引起的心包积液综合征和鸡包涵体肝炎疫情^[6-7,17],且致病性呈增强趋势^[8,18-19]。

LMH细胞是鸡肝癌细胞,是鸡源传代细胞系,可用于一些鸡病毒的分离、传代及致病机制研究^[20]。禽腺病毒是一种疫病病原,主要感染家禽,引起心包积水等典型病变特征。在本研究中采集临床上收集到的以心包积水为典型病变特征的病鸡肝脏、心脏等病料5份,将匀浆上清接种LMH细胞,盲传4代后出现细胞变圆、聚集、拉网,并最终脱落、裂解等特征性细胞病变,建立了禽腺病毒感染的LMH细胞的模型,可为后期的研究打下基础。

病毒的细胞增殖及传代也是疫苗研究的重要手段。一方面,相较于鸡胚增殖,病毒疫苗的细胞

培养更加有利于质量的控制,并适应大规模发酵罐培养工艺^[21]。SPF鸡回归试验结果表明,5株细胞培养毒株中有1株对SPF鸡无致病性,其他4株均能引起SPF鸡发病,HB-2毒株感染鸡群死亡率达100%,剖检后可见心包积液等特征性病理变化^[22],表明HB-2毒株细胞适应性较好,保持对鸡的高致病性。

另一方面,疫病病毒在细胞上的连续传代适合培养增殖滴度高、致病力减弱的弱毒活疫苗^[23]。在本研究中,将细胞传代的第10代毒株进行SPF鸡回归试验,进一步确定了病毒的致病性,对禽腺病毒灭活疫苗及弱毒活疫苗的研究奠定了基础。

参考文献 References

- [1] 塞弗 Y M. 禽病学[M]. 11版. 苏敬良,高福,索勋,译. 北京: 中国农业出版社,2005:518-578.SAIF Y M. Poultry disease [M]. 11th edition. SU J L,GAO F,SUO X, translated. Beijing:China Agricultural Press,2005:518-578(in Chinese).
- [2] 楚电峰,刘相娥,薄智勇,等. I群禽腺病毒的流行病学和防控研究现状[J]. 中国动物检疫,2017,34(5):86-89.CHU D F, LIU X E,BO Z Y,et al. Research progress on the epidemiology and prevention and control of fowl adenovirus group I [J]. China animal health inspection,2017,34(5):86-89 (in Chinese with English abstract).
- [3] 尹燕博. 我国I群禽腺病毒主要流行血清型及其防控[J]. 中国家禽,2018,40(3):1-5.YIN Y B. Investigation on dominant circulating serotypes of group I fowl adenovirus in China and the control[J]. China poultry,2018,2018,40(3):1-5 (in Chinese with English abstract).
- [4] 吴烨挺,杨志远,林健,等. 禽腺病毒4型人工感染SPF鸡动态病理学观察[J]. 中国家禽,2018,40(8):25-29.WU Y T,

- YANG Z Y, LIN J, et al. Dynamic pathological observation of SPF chicken post experimental infection with fowl adenovirus type 4[J]. China poultry, 2018, 40(8): 25-29 (in Chinese with English abstract).
- [5] 李敏, 马玉峰, 杨振, 等. I 型禽腺病毒在我国鸡群中的流行情况和防控措施[J]. 兽医导刊, 2017(1): 30-32. LI M, MA Y F, YANG Z, et al. Epidemic situation and control measures of avian adenovirus type I in chicken flocks in China [J]. Veterinary orientation, 2017(1): 30-32 (in Chinese).
- [6] 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 investigation of group I avian adenovirus in China in 2015 [J]. China poultry, 2016, 38(9): 65-68 (in Chinese).
- [7] 刘东, 刘红祥, 于静, 等. I 亚群腺病毒在我国鸡群的流行病学调查[J]. 中国家禽, 2015, 37(15): 70-73. LIU D, LIU H X, YU J, et al. Epidemiological investigation of subgroup I adenovirus in chicken flocks in China [J]. China poultry, 2015, 37(15): 70-73 (in Chinese).
- [8] 刘新鑫, 费亦东, 陶志, 等. 禽腺病毒血清 4 型吉林株的分离鉴定与遗传变异分析[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(5): 878-882. LIU X X, FEI Y D, TAO Z, et al. Isolation and identification and genetic variance analysis of aviadenovirus serotype 4 Jilin strain [J]. Chinese journal of veterinary science, 2018, 38(5): 878-882 (in Chinese with English abstract).
- [9] 王晓东. 鸡包涵体肝炎的流行特点及防控措施[J]. 养殖与饲料, 2017(2): 75-76. WANG X D. Epidemic characteristics and control measures of inclusion body hepatitis in chicken [J]. Animals breeding and feed, 2017(2): 75-76 (in Chinese).
- [10] 赵继勋. I 群禽腺病毒感染的流行病学探究与防控认识[J]. 北方牧业, 2017(6): 18-19. ZHAO J X. Study on epidemiology and understanding of prevention and control of avian adenovirus infection in group I [J]. Northern animal husbandry, 2017(6): 18-19 (in Chinese).
- [11] 朱庆贺, 张鹏宇, 王观悦, 等. 血清 4 型禽腺病毒研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(11): 80-85. ZHU Q H, ZHANG P Y, WANG G Y, et al. The development of fowl adenovirus serotype 4 [J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2018, 52(11): 80-85 (in Chinese with English abstract).
- [12] 陈玲, 张兵, 宋亚芬, 等. 禽腺病毒的分离鉴定及 LMH 细胞适应毒的生物学特性研究[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(6): 1-6. CHEN L, ZHANG B, SONG Y F, et al. Isolation and identification of a fowl adenovirus and the biological characteristics of LMH-adapted virus strain [J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2018, 52(6): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [13] SCHACHNER A, MATOS M, GRAFL B, et al. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control: a review on the current global situation [J]. Avian Pathol, 2018, 47: 111-126.
- [14] NICZYPORUK J S. Phylogenetic and geographic analysis of fowl adenovirus field strains isolated from poultry in Poland [J]. Arch Virol, 2016, 161: 33-42.
- [15] LIM T H, LEE H J, LEE D H, et al. Identification and virulence characterization of fowl adenoviruses in Korea [J]. Avian Dis, 2011, 55: 554-560.
- [16] OJKIC D, KRELL P J, TUBOLY T, et al. Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada [J]. Can J Vet Res, 2008, 72: 236-241.
- [17] CHEN L, YIN L, ZHOU Q, et al. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015-2018 [J/OL]. BMC Vet Res, 2019, 15: 271 [2019-04-01]. <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-1969-7>.
- [18] 申祖杰, 黎世彬, 林华源, 等. 禽腺病毒血清 4 型广东株的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(6): 722-728. SHEN Z J, LI S B, LIN H Y, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of fowl adenovirus serotype 4 from Guangdong [J]. Chinese veterinary science, 2018, 48(6): 722-728 (in Chinese with English abstract).
- [19] 梁广成, 高巍, 谢泉, 等. 一株高致病性血清 4 型禽腺病毒的分离与鉴定[J]. 中国家禽, 2016, 38(19): 25-28. LIANG G C, GAO W, XIE Q, et al. Isolation and identification of a highly pathogenic serotype 4 fowl adenovirus [J]. China poultry, 2016, 38(19): 25-28 (in Chinese with English abstract).
- [20] 罗洋洋, 招丽婵, 李群辉, 等. I 群禽腺病毒血清 4 型广东株的分离鉴定及分子特性[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(6): 27-33. LUO Y Y, ZHAO L C, LI Q H, et al. Isolation, identification and molecular characteristics of group I fowl adenovirus serotype 4 from Guangdong, China [J]. Journal of South China Agricultural University, 2017, 38(6): 27-33 (in Chinese with English abstract).
- [21] 陈宏, 杨柳, 宋海, 等. 岩悬浮 MDCK 细胞的驯化与 H5 亚型禽流感病毒的培养[J]. 中国农业科学, 2018, 51(17): 3405-3414. CHEN H, YANG L, SONG H, et al. Domestication of suspended MDCK cells and cultivation of H5 subtype avian influenza virus [J]. Scientia agricultura sinica, 2018, 51(17): 3405-3414 (in Chinese with English abstract).
- [22] 殷国政, 司振书, 刘延伟, 等. 禽腺病毒感染 SPF 鸡的病变和病毒分布初步研究[J]. 中国家禽, 2019, 41(1): 54-57. YIN G Z, SI Z S, LIU Y W, et al. Preliminary study on pathological change and distribution of fowl adenovirus in SPF Chicken [J]. China poultry, 2019, 41(1): 54-57 (in Chinese with English abstract).
- [23] 楚电峰, 刘文亭, 冯嫣芳, 等. I 群禽腺病毒疫苗研究进展[J]. 中国家禽, 2017, 39(12): 44-47. CHU D F, LIU W T, FENG Y F, et al. Research progress on the vaccine against group I fowl aviadenovirus [J]. China poultry, 2017, 39(12): 44-47 (in Chinese with English abstract).

Passage of chicken avian adenoviruses in LMH cells and pathogenicity of cell culture strain to SPF chicken

WEI Yanming¹, GONG Wenxiao¹, YANG Ying², MA Ji¹, ZOU Zhong¹, JIN Meilin¹

1.College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Wuhan Keqian Biological Limited Company, Wuhan 430070, China

Abstract In order to establish an avian original cells infection model of the avian adenovirus type 4, and investigate the pathogenicity of the cell culture viruses to chicken, five serotype 4 avian adenovirus isolated in our laboratory from 2014 to 2017 were inoculated into the LMH cells and transmitted blindly, and supernatants of the LMH cell cultures of each virus were selected and injected into the 4-week-old SPF chickens through the leg muscle at a certain dose. The incidence of experimental animals was recorded, the organs of the diseased or dead chickens were collected and pathological sections were made. The histopathological changes of SPF chickens infected by virus were observed and analyzed. The results showed that specific cytopathic effect caused by the group I avian adenovirus began to appear when 5 strains of serotype 4 avian adenovirus were blindly transmitted into the LMH cells. The viral nucleic acid was extracted from the culture and identified by PCR, and a specific amplification fragment of about 564 bp was amplified, indicating that the virus can proliferate stably in the LMH cells. Supernatants of the 10th generation cell culture of each virus were selected for SPF chicken regression test. The results showed that from the 3rd day after the 4-week-old SPF chickens were infected, some chickens began to depressed, lost their appetite, became paralyzed and died quickly. Observations of the pathological examination and pathological sections showed that the LMH passaged viruses of HB-1, HB-2, HB-3 and SD-1 maintained the pathogenicity to the 4-week-old SPF chickens. Typical histopathological changes were observed in the sick and dead chickens, while there were no clinical symptoms and pathological changes in the control group. These results suggest that the LMH cells can be used for the proliferation and passage of avian adenovirus, and it is an ideal cell model for study of the molecular pathogenesis of avian adenovirus.

Keywords avian adenovirus; leghorn male hepatocellular cells(LMH); inclusion body; pericardial hydrops; virus passage; cell infection model; inactivated vaccine; attenuated living avian

(责任编辑:边书京)