

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.4.01

血清 4 型禽腺病毒强毒株 GY 株的 分离鉴定和致病性研究

侯力丹^{1,2}, 王嘉¹, 刘丹¹, 陈晓春¹, 翟天舒¹, 杨承槐¹,
杨汉春², 毛娅卿^{1*}, 李俊平^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

[收稿日期] 2020-11-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 04-0001-10 [中图分类号] S855.3

[摘要] 从山东某疑似感染禽腺病毒的发病鸡群中采集病料并分离到一株禽腺病毒, 克隆纯化后进行 PCR 检测和序列分析, 鉴定该毒株为血清 4 型禽腺病毒, 命名为 GY 株。用 LMH 细胞繁殖的 GY 株病毒滴度可以达到 $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 mL, 并建立了纯净稳定的种子批。动物致病性试验结果显示, 攻毒鸡只 8/10 死亡, 剖检均出现心包积液, 肝脏肿大、出血或坏死, 表明该毒株为强毒株。就攻毒途径、攻毒剂量等方面研究发现, GY 株经胸部肌肉注射后发病率和发病时间相对颈部皮下注射途径更有优势, 确定攻毒途径为肌肉注射; 通过比较不同剂量 ($5 \times 10^{3.0} \sim 5 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀) GY 株病毒攻击 SPF 鸡的致病性, 将攻毒剂量定为 $5 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀。研究表明, GY 株可作为禽腺病毒 4 型攻毒用强毒株。

[关键词] 禽腺病毒; 分离; 鉴定; 致病性

Isolation, Identification and Pathogenicity Study of Fowl Adenovirus Serotype 4 GY Strain

HOU Li-dan^{1,2}, WANG Jia¹, LIU Dan¹, CHEN Xiao-chun¹, ZHAI Tian-shu¹,
YANG Cheng-huai¹, YANG Han-chun², MAO Ya-qing^{1*}, LI Jun-ping^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Corresponding author: MAO Ya-qing, E-mail: wepmyq@163.com; LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: A strain of fowl adenovirus was isolated from suspected infected chickens in flock of Shandong province. After cloning and purification, the strain was identified as fowl adenovirus serotype 4 by PCR and

基金项目: 国家重点研发计划“畜禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”重点专项(2016YFD0500800, 2016YFD0500809); 中国兽药药品监察所公益性专项(2021012015)

作者简介: 侯力丹, 助理研究员, 从事病毒类生物制品检验及研究。

通讯作者: 毛娅卿, E-mail: wepmyq@163.com; 李俊平, E-mail: lijunping03@163.com

sequence analysis, which was named as GY strain. The titer of GY strain propagated by LMH cells could reach $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 mL, and a batch of pure and stable seed was established. The results of animal pathogenicity test showed that 8/10 of challenged chickens died, pericardial effusion and liver enlargement, hemorrhage or necrosis could be found in necropsy examination, indicating GY strain was a high virulence strain. Different dosages and routes of infections were tested, showing chest intramuscular injection to be the most effective route of infection, and $5 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀ to be the optimum dosage of infection. The results showed that the GY strain could be used as a high virulence strain for challenge of fowl adenovirus type 4.

Key words: fowl adenovirus; isolation; identification; pathogenesis

禽腺病毒(Fowl Adenovirus, FAdV)是鸡、鸭等禽体内常见的传染性病毒之一。自2015年6月以来,我国山东、河南、河北等省份的部分地区鸡群中发生了以心包积液和肝脏肿大为特征的传染病。经过大量的研究,确定该病是由血清4型的I群FAdV所引起^[1]。在我国五个省市的家禽养殖场,发现至少有三种FAdV(FAdV-C、FAdV-D、FAdV-E)的流行,并且在包涵体肝炎(Inclusion body hepatitis, IBH)和心包积水综合征(Hepatitis-hydropericardium syndrome, HPS)病例中的混合感染很常见^[2-4]。Chen等^[5]在2015-2018年收集我国15个省市共计280份病料,发现155份存在有腺病毒感染,其中FAdV-4型占比79.4%,FAdV-8a型占比13.5%,FAdV-8b型占比3.9%。

近年来,为了防控禽腺病毒病,我国通过不同的方式开展了疫苗研制工作,而在疫苗研制过程中标准化且毒力稳定的检验强毒株是评价疫苗的重要标准物质。本研究于2016年从山东地区发生心包积液的疑似腺病毒感染鸡群中采集病料进行了病毒分离鉴定,获得1株血清4型FAdV GY株,并对其进行了纯化、鉴定、种子批的建立和致病力的测定,以期通过研制提供可靠的检验用强毒株,为疫苗的研制和评价奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 病料来源及样本处理 2016年,山东某鸡场疑似发生禽腺病毒感染,发病鸡剖检表现为严重的心包积液,呈透明的淡黄色或浅褐色,肝脏肿大、变脆、出血或坏死,采集其肝、脾等组织。将从剖检见

肝脏病变坏死病鸡中采集的肝脏组织3~4 g,按肝脏组织(g):PBS(mL)为1:5的比例加入无菌PBS,放入匀浆器中,经-80℃反复冻融3次,4℃12000 r/min离心5 min,收取上清,用0.22 μm的细菌滤器过滤,分装于1.5 mL离心管中备用。

1.2 PCR检测与测序 提取病料样本的DNA,用针对FAdV的Hexon基因ORF设计如下特异性引物进行PCR扩增,上游引物P1:5'-GAGATGGT-GACGGAGGTG'-3';下游引物P2:5'-AAGCGGT-GACGAGGATGC-3',目的片段大小为3139 bp。通过琼脂糖凝胶电泳检测后,对PCR产物送生工生物工程(上海)有限公司测序,测序结果与表1中FAdV的12种血清型参考毒株序列进行同源性比对和遗传进化分析。

表1 FAdV的12种血清型参考毒株信息

Tab 1 Information of 12 serotypes of reference strains of FAdV

不同血清型毒株	基因序列号	缩写
fowl adenovirus 1 (CELO)	U46933	FAdV-1
fowl adenovirus 2 (SR48)	KT862806	FAdV-2
fowl adenovirus 3 (SR49)	KT862807	FAdV-3
fowl adenovirus 4 (KR5)	HE608152	FAdV-4
fowl adenovirus 5 (TR22-CK8)	AF508953	FAdV-5
fowl adenovirus 6 (CR119)	KT862808	FAdV-6
fowl adenovirus 7 (YR36)	KT862809	FAdV-7
fowl adenovirus 8a (TR-59)	KT862810	FAdV-8a
fowl adenovirus 8b (764)	KT862811	FAdV-8b
fowl adenovirus 9 (A-2A)	AF083975	FAdV-9
fowl adenovirus 10 (C2B)	KT717889	FAdV-10
fowl adenovirus 11 (380)	KT862812	FAdV-11

1.3 病毒分离纯化与鉴定 将 1.1 制备的样品按 5% 的剂量,接种长满单层的 LMH 细胞,吸附 1 h 后,补充含 1% 胎牛血清的 DMEM,置于 37 °C 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,逐日观察,72 h 收获。反复冻融 3 次后离心收获上清,作 100 倍稀释后,取 1 mL 上清加入 0.5 mL 氯仿,于 4 °C 摇床中振摇 1 h,12000 r/min 离心 20 min,轻轻取出离心管,吸取上层液体 0.5 mL,于生物安全柜中开口放置 30 min (用于挥发残留的氯仿)备用。处理好的病毒液,再进行 10 倍系列稀释,取 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 3 个稀释度,每个稀释度接种 2 孔长满单层的 LMH 细胞板,0.1 mL/孔,吸附 1 h,弃去上清,1% 琼脂糖覆盖后,倒置培养 72 h。倒置显微镜下观察,在出现细胞病变的最高稀释度孔中,选取单个细胞病变斑 3 个,每个斑无菌挑取至 1 mL DMEM 中,冻融 3 次后,离心取上清进行 10 倍、100 倍稀释,将原倍、10 倍、100 倍稀释的病毒液按前述方法进行继续克隆,上一代克隆获得的每个克隆后续克隆挑取 1 个克隆,共克隆 3 代。最后 1 代每个克隆分别接种 1 个 25 cm² 的 LMH 细胞瓶,待细胞病变达 70% 以上后置 -70 °C 以下保存,为 C0 代。纯化获得的克隆病毒按 1.2 方法进行 Hexon PCR 扩增,测序分析。

1.4 种子批的建立与检定 将 FAdV - GY 株 C0 代毒接种 2 个长满 LMH 单层的 175 cm² 细胞瓶中,每个接种 1 mL,37 °C 继续培养,待细胞病变达 80% 以上后 -70 °C 以下保存,为 FAdV - GY 株 C1 代。收获的病毒按《中国兽药典》附录进行病毒含量测定、无菌检验和支原体检验。用制备的病毒液制备成灭活疫苗第一次免疫,皮下注射免疫 3 周龄 SPF 鸡 20 只,0.3 mL/只。21 d 后,将制备的病毒液 10 倍稀释进行第二次免疫,每只鸡点眼、滴鼻各 1 滴,加肌肉注射三种途径共 0.5 mL。第二次免疫 21 d 后按第二次免疫的方法进行第三次免疫,第三次免疫后 21 d 翅静脉采血分离血清,按《中国兽药典》附录 3305 外源病毒检验中鸡检查法进行抗体检测(表 2),以确定是否存在其他外源病毒。

表 2 外源病毒检测种类及检测方法

Tab 2 Methods of exogenous virus detection

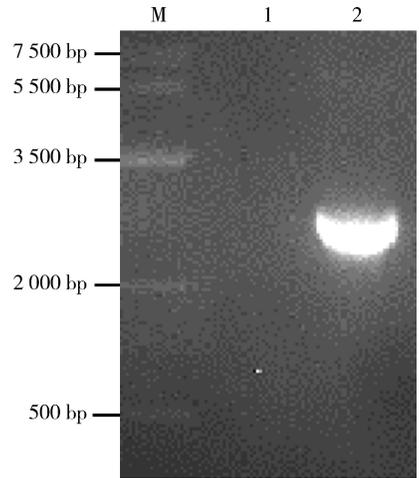
编号	检测项目	检测方法
1	新城疫病毒(NDV)	HI
2	H5 亚型禽流感病毒(AIV - H5)	HI
3	H7 亚型禽流感病毒(AIV - H7)	HI
4	H9 亚型禽流感病毒(AIV - H9)	HI
5	产蛋下降综合症病毒(EDSV)	HI
6	禽痘病毒(FPV)	临床观察和 AGP
7	马立克氏病毒(MDV)	AGP
8	禽腺病毒(FAdV)	AGP
9	传染性支气管炎病毒(IBV)	ELISA
10	传染性法氏囊病毒(IBDV)	ELISA
11	禽脑脊髓炎病毒(AEV)	ELISA
12	禽呼肠孤病毒(ARV)	ELISA
13	禽肺病毒(APV)	ELISA
14	鸡传染性贫血病毒(CAV)	ELISA
15	禽白血病毒(ALV)	ELISA
16	禽网状内皮组织增生症病毒(REV)	ELISA
17	禽传染性喉气管炎病毒(ILTV)	ELISA

1.5 GY 株致病性研究 将 FAdV - GY 株 C1 代毒种用灭菌生理盐水分别稀释至病毒含量为:10^{6.0} TCID₅₀/0.1mL、10^{5.0} TCID₅₀/0.1mL、10^{4.0} TCID₅₀/0.1mL、10^{3.0} TCID₅₀/0.1mL 共 4 个病毒含量梯度,每个病毒含量梯度经胸部肌肉接种 4、8 周龄 SPF 鸡各 5 只,每只 0.5 mL,同时 4、8 周龄 SPF 鸡分别设生理盐水接种对照 5 只。攻毒后观察 14 d,详细记录接种鸡的发病和死亡情况,死亡鸡立即进行剖检,观察到期后未死亡鸡处死剖检,以判定不同攻毒剂量对不同周龄 SPF 鸡的致病性。取 GY 株 C1 代病毒液,稀释至 10^{5.0}TCID₅₀/0.1mL,胸部肌肉注射和皮下注射两种途径分别接种 8 周龄 SPF 鸡,每只 0.5 mL,每组 5 只,同时设 5 只不接种作为对照,攻毒后观察 14 d,详细记录接种鸡的发病和死亡情况,死亡鸡立即进行剖检,观察到期后未死亡鸡进行处死剖检,以判定不同攻毒途径对 SPF 鸡的致病性。另将 GY 株 C1 代病毒液,稀释至 10^{5.0}TCID₅₀/0.1mL,经胸部肌肉接种 SPF 鸡 20 只,每只 0.5 mL,平均分 2 组,同时设同日龄 SPF 鸡

10 只不攻毒作为对照。攻毒后 1 组观察 7 d, 另一组观察 14 d, 详细记录接种鸡的发病和死亡情况, 死亡鸡立即进行剖检, 观察到期后将未死亡鸡处死剖检, 观察发病规律和剖检病理变化。

2 结果与分析

2.1 分离病毒的 PCR 检测和测序结果 针对 FAdV 的 Hexon 基因特异性引物对病料样品提取核酸进行 PCR 检测, 可扩增出约 3139 bp 大小的预期目的片段(图 1), 初步判断分离物中含有 FAdV。PCR 回收产物测序结果与表 1 所列 12 个血清型代表毒株 Hexon 序列比对结果表明, 分离病毒与 FAdV 血清 4 型的同源性最高, 达 98.7%, 与同一基因型的血清 10 型序列同源性次之为 97.4%, 与其他基因型代表毒株的同源性为 67.9% ~ 76.8%, 与血清 4 型处于同一个分支(图 2), 初步判定临床分离病毒为 I 群 FAdV 基因 C 型, 血清 4 型。



M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: 样品

M: Marker; 1: Negative control; 2: Sample

图 1 分离病毒 PCR 检测结果

Fig 1 PCR detection results of isolated virus

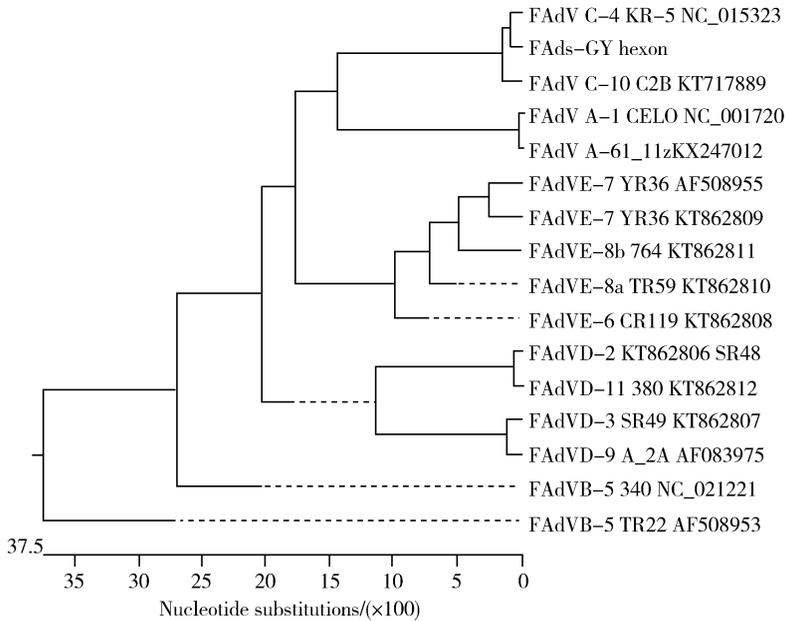


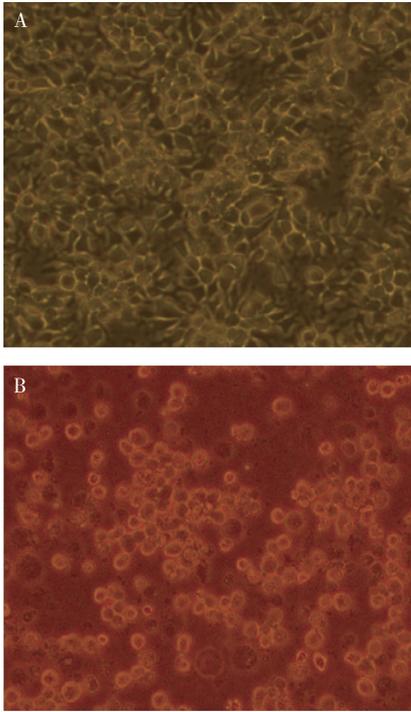
图 2 FAdV 不同血清型参考毒株 hexon 基因遗传进化分析

Fig 2 Genetic evolution analysis of Hexon gene of different serumtypes reference strains of FAdV

2.2 病毒的分离纯化与鉴定 处理后的样品接种 LMH 细胞后第一代即观察到明显的细胞病变, 约在接种后 48 h 后开始出现疑似细胞病变, 72 h 后细胞病变明显。第一代培养物按 10% 剂量接种第

二代后 36 h 80% 以上细胞出现细胞病变, 主要表现为细胞圆缩、脱落、聚集成团、细胞破损(图 3)。收获病毒液置于 -70 °C 以下保存。

氯仿处理后的病毒液经 3 代琼脂覆盖筛选蚀



A: 正常的 LMH 细胞对照; B: 感染 GY 株的 LMH 细胞

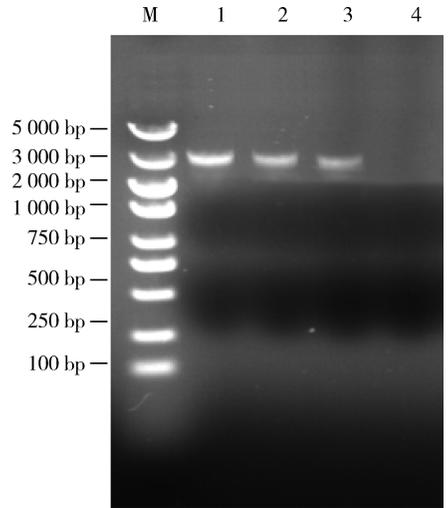
A: Normal LMH cell control; B: LMH cells infected by GY strain

图 3 分离病毒在 LMH 细胞上导致的细胞病变

Fig 3 Cytopathic effect of isolated virus on LMH cells

斑, 获得 3 个克隆株病毒, 分别命名为 FAdV - GY 株 C0 - 1、FAdV - GY 株 C0 - 2 和 FAdV - GY 株 C0 - 3。纯化获得的三株病毒 Hexon 基因 PCR 扩增结果一致, 均出现约 3139 bp 左右特异条带 (图 4), PCR 测序结果与 2.1 初步分离鉴定序列同源率为 100%, 初步说明克隆获得的 3 个克隆株为同一株病毒。将 FAdV - GY 株 C0 - 1 克隆株病毒接种 2 个 175 cm² 的 LMH 单层, 收获 150 mL 病毒液, 标记为 FAdV - GY 株 C1 代, 收获病毒的病毒含量测定结果为 10^{7.5} TCID₅₀/0.1 mL, 表明实验室分离到的 FAdV - GY 株病毒能适应 LMH 细胞。纯净性检验结果表明, FAdV - GY 株 C1 代病毒液无细菌、霉菌及支原体污染。按《中国兽药典》鸡检查法对 FAdV - GY 株 C1 代病毒液进行外源病毒检验, 结果显示接种 SPF 鸡检测抗体除禽腺病毒抗体阳性外, 其它病原抗体的检测结果均为阴性, 表明 FAdV - GY 株 C1 代病毒无外源病毒污染。

2.3 不同攻毒剂量对不同周龄 SPF 鸡的致病性



M: DNA 分子质量标准 DL5000; 1: FAdV - GY 株 C0 - 1; 2: FAdV - GY 株 C0 - 2; 3: FAdV - GY 株 C0 - 3; 4: 阴性对照
M: Marker DL5000; 1: FAdV - GY C0 - 1; 2: FAdV - GY C0 - 2; 3: FAdV - GY C0 - 3; 4: Negative control

图 4 不同克隆株病毒 PCR 检测结果

Fig 4 PCR detection results of different cloned viruses

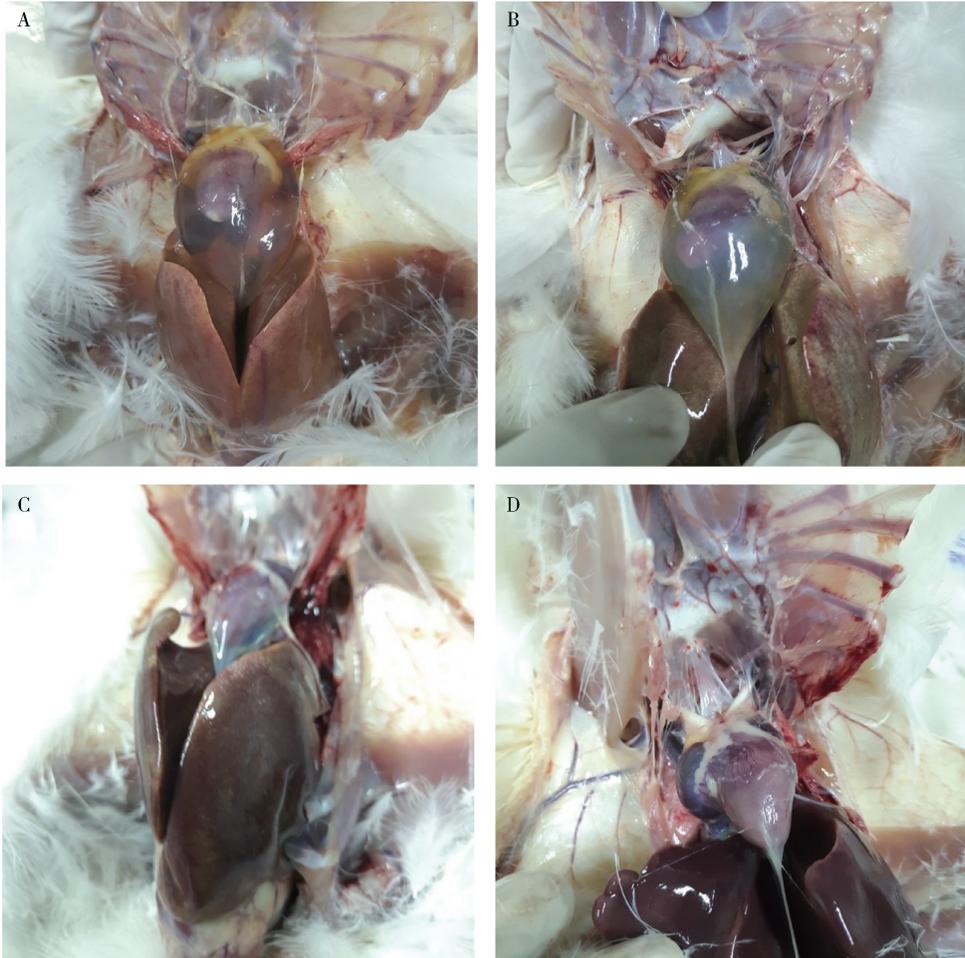
用不同剂量的 GY 株 C1 代病毒液分别经胸部肌肉接种 4 周龄和 8 周龄 SPF 鸡, 攻毒后观察 14 d。试验结果显示, 不同周龄 SPF 鸡攻击 5 × 10^{3.0} TCID₅₀/0.1mL 及以上的 GY 株病毒液后引起不同程度的感染和死亡, 攻击 5 × 10^{4.0} TCID₅₀/0.1mL 的 GY 株病毒液可以引起 5/5 发病, 死亡率不低于 4/5。发病鸡主要表现为精神不振、不愿行走、羽毛蓬松、嗜睡等; 死亡鸡剖检主要表现为心包积液、肝脏出血或坏死; 有临床症状未死亡鸡剖检病变不明显, 部分鸡出血心包少量积液或心包膜轻度浑浊; 未出现临床症状鸡剖检无肉眼可见病变。对照鸡均无临床症状和剖检病变。结果见表 3、图 5、图 6。

2.4 不同攻毒途径对 SPF 鸡的致病性 取 GY 株 C1 代病毒液分别经胸部肌肉注射和皮下注射两种途径接种 8 周龄 SPF 鸡, 每只 0.5 mL (含 5 × 10^{5.0} TCID₅₀), 攻毒后观察 14 日。结果显示, 肌肉注射途径 SPF 鸡发病率为 5/5, 死亡率为 5/5; 皮下注射途径发病率为 4/5, 死亡率 4/5。肌肉注射途径 SPF 鸡的死亡时间为攻毒后 2 ~ 4 日, 比皮下注射途径的死亡时间 (3 ~ 5 日) 略早, 对照鸡 5/5 正常。

表 3 GY 株不同攻毒剂量对 4 周龄和 8 周龄 SPF 鸡的致病性研究结果

Tab 3 Pathogenicity of different challenge doses of GY strains on 4 weeks and 8 weeks SPF chickens

检测项	4 周龄				8 周龄			
	$5 \times 10^{3.0}$	$5 \times 10^{4.0}$	$5 \times 10^{5.0}$	$5 \times 10^{6.0}$	$5 \times 10^{3.0}$	$5 \times 10^{4.0}$	$5 \times 10^{5.0}$	$5 \times 10^{6.0}$
发病比例	3/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	5/5
死亡比例	3/5	4/5	5/5	5/5	2/5	5/5	4/5	5/5



A: 攻毒后 50 h 死亡鸡; B: 攻毒后 72 h 死亡鸡; C: 发病但未死亡鸡; D: 对照鸡

A: Dead chickens 50 h after challenge; B: Dead chickens 72 h after challenge; C: Chickens with disease but not death; D: Control chickens

图 5 4 周龄 SPF 鸡攻毒剖检照片

Fig 5 Profile of challenged SPF chickens aged 4 weeks

2.5 发病规律和剖检病变研究 GY 株 C1 代病毒液经胸部肌肉攻击 8 周龄 SPF 鸡。临床观察结果显示,攻毒后 2~3 日开始表现临床症状,主要表现为精神沉郁、羽毛蓬乱、不愿走动、闭眼嗜睡等,发病率达 20/20。攻毒后 24 h 开始发现攻毒鸡出现临床症状,死亡集中在 3~5 日,死亡鸡严重心包积

液,肝脏有肿大、出血或坏死。攻毒后观察 7 日和 14 日组,死亡率均为 9/10。观察 7 日组未死亡鸡剖检心包有明显积液,肝脏有明显坏死灶;观察 14 日组未死亡鸡临床症状减轻至消失,剖检心包未见积液,但心包有轻度浑浊,肝脏未见明显病变(图 7)。

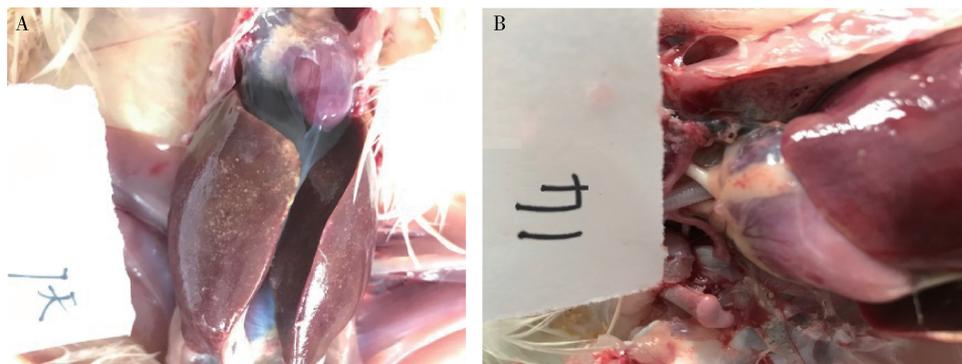


A: 攻毒后 72 h 死亡鸡; B: 攻毒后 97 h 死亡鸡; C: 攻毒后 120 h 死亡鸡; D: 对照鸡

A: Dead chickens 72 h after challenge; B: Dead chickens 97 h after challenge; C: Dead chickens 120 h after challenge; D: Control chickens

图 6 8 周龄 SPF 鸡攻毒剖检照片

Fig 6 Profile of challenged SPF chickens aged 8 weeks



A 攻毒后 7 d 未死亡鸡; B 攻毒后 14 d 未死亡鸡

A: Dead chickens 7 days after challenge; B: Dead chickens 14 days after challenge

图 7 8 周龄 SPF 鸡攻毒剖检照片

Fig 7 Profile of challenged SPF chickens aged 8 weeks

3 讨论与结论

FAdV 是全世界家禽和野禽常见的垂直传播性病毒之一,自 1987 年,巴基斯坦首次报道心包积液综合征后^[6],美国等多个国家也相继出现该病的报道^[7]。在我国鸡心包积液-肝炎综合征的临床病例中,血清 4 型最为流行。本研究在 2016 年也从山东某疑似感染鸡群中经 LMH 细胞分离鉴定到一株血清 4 型的 FAdV 并定名为 GY 株,以期在充分观察其致病性基础上探索其作为标准强毒株的可能性。

FAdV 的血清型众多,不同的血清型致病性不同,因此对血清型的分离鉴定及致病性的研究显得尤为重要。随着分子生物学技术的发展,核苷酸序列测定与比对已被广泛应用于 FAdV 的检测与分型^[7,8]。Hexon 蛋白是 FAdV 的主要结构蛋白,通过对 Hexon 基因进行测序与遗传进化比对,可准确区分 FAdV 不同的血清型^[9],因此常被作为 FAdV 基因分型的靶基因^[10-11]。本研究在接种 LMH 细胞进行病毒分离培养基础上进一步对该毒株的 Hexon 基因进行同源性比对及遗传进化分析,发现该株病毒与其他血清 4 型参考株属于同一分支,确定分离的毒株属于血清 4 型 FAdV。

许多 FAdV 可在健康禽体内复制,症状非常轻微或不出现感染症状,但有一些因素,特别是与其它病原并发感染时,FAdV 可作为继发病原引起鸡群发病和死亡。特别是与鸡传染性贫血病毒等免疫抑制病毒发生混合感染后可增强 FAdV 的毒力,如有研究表明,在使用含有 FAdV 和 CIAV 共污染的新城疫疫苗后,CIAV 能协助 FAdV 破坏母源抗体的保护作用,引起机体发病,而单污染则不会引起明显症状^[12-13]。这提示我们,要客观评价 FAdV 的致病性,首先需要确保其纯净性。为此,本研究首先经 3 代琼脂覆盖筛选蚀斑,获得 3 个 FAdV - GY

株克隆株病毒,纯化获得的 FAdV - GY 株 C0 - 1、FAdV - GY 株 C0 - 2、FAdV - GY 株 C0 - 3 病毒 Hexon 基因 PCR 扩增结果一致,均出现约 3139 bp 左右特异条带,初步证实纯化的毒株具有较好的特异性。不仅如此,本研究还严格按《中国兽药典》鸡检查法对 C1 代 FAdV - GY 株病毒液进行了针对多达 17 种外源病毒的检验,证实 FAdV - GY 株 C1 代病毒无外源病毒污染,建立了纯净度高的 FAdV - GY 株种子批。

开发安全有效的疫苗是防控 FAdV 感染的当务之急,对此国内外已经有大量的研究报道^[14-16],而评价疫苗是否有效的关键因素之一是需要有经过毒力验证的标准检验用强毒株。近期,已有多个报道对血清 4 型的 FAdV 致病性和发病规律开展了观察^[17-19]。本研究则利用经过纯化和外源病毒检测的 FAdV - GY 株 C1 代种子批对其致病性开展了系统研究,特别是从不同感染途径和不同感染剂量等方面进行了相对全面的观察。结果证实,经胸部肌肉注射后发病率和发病时间相对于颈部皮下注射途径更有优势,确定将攻毒途径定为肌肉注射。在四个不同梯度感染剂量中,以不低于 $5 \times 10^{4.0}$ 的剂量攻毒,可引起 100% 的 4 周龄和 8 周龄 SPF 鸡发病,80% 以上死亡,为确保攻毒试验结果稳定可靠,将攻毒剂量定为每只鸡 $5 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀。在多次实验中,SPF 鸡于攻毒后 2 日开始有鸡出现精神不振、羽毛蓬乱、不愿走动、闭眼嗜睡等临床症状,出现上述症状后 1~2 d 大部分发病鸡死亡,有的试验鸡未见明显的临床症状死亡,死亡鸡剖检均可见心包积液及肝脏肿大、出血或坏死等病变;对出现临床症状未死亡的鸡在攻毒后 7 日进行剖检,亦可见典型的心包积液及肝脏肿大、出血等病变;出现临床症状未死亡鸡观察至攻毒后 14 d,发病鸡临床症状减轻或消失,心包积液及肝脏肿大、出血

等病变不明显,可见攻毒后观察 7 d 未死亡鸡剖检病变更明显。依据多次攻毒试验临床观察和剖检制定了该强毒株的发病判定标准,即出现任意一项即判为发病:(1)死亡;(2)鸡只出现精神不振、羽毛蓬乱、不愿走动、嗜睡等任两项临床症状;(3)剖检出现心包积液或肝脏肿大、出血或坏死等病理变化。

本研究完成了 FAdV - GY 株的分离鉴定、种子批建立、纯净性和致病性的研究,确定 FAdV GY 株作为攻毒用毒的攻毒途径、剂量和发病标准,成功制备了可用于评判 FAdV 相关生物制品有效性的标准强毒株,为 FAdV 生物制品的研发奠定物质基础。

参考文献:

[1] Liu Y K, Wan W Y, Gao D S, *et al.* Genetic characterization of novel fowl aviadenovirus 4 isolates from outbreaks of hepatitis - hydropericardium syndrome in broiler chickens in China [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2016, 5(11). DOI:10.1038/emi.2016.115.

[2] Pan Q, Liu L, Wang Y, *et al.* The first whole genome sequence and pathogenicity characterization of a fowl adenovirus 4 isolated from ducks associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome[J]. *Avian Pathol*, 2017, 46(5): 571 - 578.

[3] Zhang T, Jin Q, Ding P, *et al.* Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak - associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China[J]. *Virology Journal*, 2016, 13(1): 188.

[4] Ye J, Liang G, Zhang J, *et al.* Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China [J]. *Emerging Microbes Infect*, 2016, 25(5): 50.

[5] Chen L, Yin L, Zhou Q, *et al.* Epidemiological investigation of fowl adenovirus in poultry in China during 2015 - 2018[J]. *BMC Vet Res*, 2019, 15(1):271.

[6] Akhtar S. Hydropericardium syndrome in broiler chickens in Pakistan[J]. *World Poultry Sci J*, 1994, 50(2): 177 - 182.

[7] Jiang P, Ojick D, Tuboly T, *et al.* Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses[J]. *Can J Vet Res*, 1999, 63(2): 124 - 128.

[8] Meulemans G, Boschmans M, Berg T P, *et al.* Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses[J]. *Avian Pathol*, 2001, 30(6): 655 - 660.

[9] McFerran J B, Connor T J. Further studies on the classification of fowl adenoviruses[J]. *Avian Diseases*, 1977, 21(4): 585 - 595.

[10] Pichla - Gollon S L, Drinker M, Zhou X Y, *et al.* Structure - based identification of a major neutralizing site in an adenovirus hexon[J]. *J Virol*, 2007, 81(4): 1680 - 1689.

[11] Raue R, Gerlach H, Muller H. Phylogenetic analysis of the hexon loop 1 region of an adenovirus from psittacine birds supports the existence of a new psittacine adenovirus(PsAdV)[J]. *Arch Virol*, 2005, 150(10): 1933 - 1943.

[12] Su Q, Li Y, Meng F F, *et al.* Newcastle disease virus - attenuated vaccine co - contaminated with fowl adenovirus and chicken infectious anemia virus results in inclusion body hepatitis - hydropericardium syndrome in poultry [J]. *Vet Micro*, 2018, 218: 52 - 59.

[13] Su Q, Li Y, Zhang Y W, *et al.* Chicken infectious anemia virus helps fowl adenovirus break the protection of maternal antibody and cause inclusion body hepatitis - hydropericardium syndrome in layers after using co - contaminated Newcastle disease virus - attenuated vaccine[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(2): 621 - 628.

[14] 刘建勋,陈田田,王赛楠,等. 重组血清 4 型禽腺病毒 (FADV - 4) Fiber - 2 蛋白免疫原性[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(4): 686 - 690.

Liu J X, Chen T T, Wang S N, *et al.* Immunogenicity of recombinant serum fowl adenovirus type 4 (FADV - 4) fiber - 2 protein[J]. *Chinese J Vet Sci*, 2020, 40(4): 686 - 690.

[15] 赵蕾,张建伟,李林,等. I 群 4 型禽腺病毒 DC 株灭活苗对毒株的保护力试验[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(9): 34 - 37.

Zhao L, Zhang J W, Li L, *et al.* The protection test of group I

- serotype 4 fowl adenovirus DC strain inactivated seedlings against the pandemic strain[J]. *Advances in Animal Medicine*, 2019, 40(9): 34-37.
- [16] Kim M S, Lim T H, Lee D H, *et al.* An inactivated oil-emulsion fowl adenovirus serotype 4 vaccine provides broad cross-protection against various serotypes of fowl adenovirus [J]. *Vaccine*, 2014, 32(28): 3564-3568.
- [17] Zhao J, Zhong Q, Zhao Y, *et al.* 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): 1-14.
- [18] 栾勇娇, 谢芝勋, 王盛, 等. 血清 4 型禽腺病毒感染 SPF 鸡体内各组织中病毒的动态分布及排毒规律研究[J/OL]. [2020-08-05]. *中国兽医学报*: 1-7. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1234.S.20200722.0958.002.html>.
- Luan Y J, Xie Z X, Wang S, *et al.* Study on dynamic distribution and detoxification of virus in SPF chickens infected with serotype 4 fowl adenovirus [J/OL]. [2020-08-05]. *Chinese J Vet Sci*: 1-7. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1234.S.20200722.0958.002.html>.
- [19] 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.
- Wei Y M, Gong W X, Yang Y, *et al.* The pathogenicity of LMH cell passage and cell passage strains of fowl adenovirus to SPF chickens[J]. *J Huazhong Agri Uni.* 2020, 39(2): 95-101.

(编辑:李文平)