

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.11.12

血清 4 型禽腺病毒研究进展

朱庆贺¹, 张鹏宇², 王观悦¹, 王 爽¹, 陈 曦¹, 杨旭东¹, 史同瑞^{1*}

(1. 黑龙江省兽医科学研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161000; 2. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江大庆 163000)

[收稿日期] 2018-08-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 11-0080-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 近年来, 血清 4 型禽腺病毒 (FAdV-4) 在我国爆发, 造成家禽行业严重的经济损失。病毒感染引起死亡率高, 临床剖检可见明显的心包积液综合征的症状。病毒极具传染性, 可垂直及水平传播, 通过受感染肝脏组织匀浆可以分离和检测病毒。目前实验室诊断主要通过琼脂扩散试验、酶联免疫吸附试验、限制酶分析、聚合酶链式反应、实时荧光定量 PCR、高分辨率的融化曲线分析等进行检测。疾病预防主要通过灭活疫苗的接种, 而减毒活疫苗和亚单位疫苗也相继被开发。对 FAdV-4 的流行病学、发病特征、病毒诊断方法以及预防策略等方面进行了综述, 以期对 FAdV-4 的深入研究奠定基础。

[关键词] 4 型禽腺病毒; 流行; 诊断; 疫苗

The Development of Fowl Adenovirus Serotype 4

ZHU Qing-he¹, ZHANG Peng-yu², WANG Guan-yue¹, WANG Shuang¹,CHEN Xi¹, YANG Xu-dong¹, SHI Tong-rui^{1*}

(1. Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China;

2. Heilongjiang August First Agriculture University, Daqing, Heilongjiang 163000, China)

Corresponding author: SHI Tong-rui, E-mail: systr@sina.com

Abstract: Fowl adenovirus serotype-4 (FAdV-4) had erupted in China in recent years, caused serious economic losses to the poultry industry, usually showed symptoms of hydropericardium syndrome (HPS), and high mortality rate. The virus had strong infectious, could be transmitted vertically and horizontally. The virus could be isolated from infected liver homogenates and detected by several laboratory diagnostic methods (including an agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assays, indirect immunofluorescence assays, counter immunoelectrophoresis, restriction endonuclease analyses, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, and high-resolution melting-curve analyses). Inactivated vaccines had been deployed widely to control the disease, and more attractive vaccine candidates such as attenuated live vaccines and subunit vaccines also had been developed. By reviewing epidemiology, pathogenesis, diagnosis methods, and vaccine strategies of FAdV-4, hope to lay the foundation for further research and clinical prevention of FAdV-4.

Key words: FAdV-4; epidemiology; diagnose; vaccine

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划 (sczzn2017-2)

作者简介: 朱庆贺, 男, 助理研究员, 硕士研究生, 从事兽药及兽用生物制品研究。

通讯作者: 史同瑞。E-mail: systr@sina.com

4 型禽腺病毒(Fowl avianadenovirus serotype 4, FAdV-4)主要是以心包积水为主要临床症状的鸡急性传染病,临床中又称为“鸡心包积水综合征(Hydropericardium syndrome, HPS)”。该病发病急,传播速度快,主要引起 4~8 周龄肉鸡感染,死亡率可达 40%~90%。该病最早于巴基斯坦的安卡拉被报道,由此又成为“安卡拉病”。近年来,我国河南、山东、安徽、辽宁、吉林、江西和湖北等省份出现大面积爆发,给我国养鸡业造成了严重的经济损失。本文综述了目前 FAdV-4 的相关研究进展,希望能为 FAdV-4 的进一步研究以及临床防控提供参考。

1 病毒分类、结构和理化性质

腺病毒科(Adenoviridae)因最初从腺体组织分离,故名腺病毒,而根据形态结构、免疫学特性和宿主范围可划分为两个属:哺乳动物腺病毒属(Mastadenivirus)和禽腺病毒属(Avianadenovirus)。禽腺病毒属根据其抗原性的不同可分为 3 个群。FAdV-4 隶属于腺病毒科禽腺病毒属 I 亚群,亚群已鉴定了 5 个禽腺病毒种,其名称用字母 A~E 表示,根据其血清型测试分为 12 个血清型。FAdV-4 属于禽腺病毒 C 种血清 4 型。病毒粒子无囊膜,直径 70~90 nm,呈 20 面体对称,由衣壳(Capsid)、纤突(Fibre)、核酸芯髓(Core)及相关蛋白构成。其衣壳由 252 个壳粒(Capsomere)组成,其中 20 面体顶角上为 12 个五邻体(Penton),每个五邻体有两条纤突,长 100A~370A,直径 2 nm,纤突由五邻体蛋白为基底在衣壳表面伸出,纤突顶端形成头节区(Knob)。头节区可与细胞表面的病毒受体结合。其余 240 个非顶角壳粒为六邻体蛋白(Hexon)构成 20 面体的面和棱的大部分,六邻体成棱柱状,直径 7~11 nm。病毒粒子在感染细胞核内经常呈晶格状排列。病毒核酸为双股 DNA,占据整个病毒的 11.3%~13.5%^[1]。病毒对脂溶剂,如乙醚、氯仿、脱氧胆酸钠、胰蛋白酶、2%酚以及 50%乙醇等具有抵抗力,同时可耐受 pH3~9,但在浓度 1:1000 的甲醛中可被灭活。另外,病毒的增殖也可被 DNA 抑制剂 BuDR 所抑制^[2]。

2 流行病学

FAdV-4 感染主要以鸡包涵体肝炎和心包内出现淡黄色透明液体为主要临床症状,因此也被称为 HPS。HPS 最早在巴基斯坦靠近卡拉奇的安卡拉首先被报道^[3]。其后,在土耳其、斯洛伐克、印度、墨西哥、秘鲁、俄罗斯、孟加拉国、韩国相继出现该病^[4]。2006 年第一次在中国被报道^[5],但直到 2015 年 7 月开始在中国的河南、河北、辽宁、吉林、黑龙江、新疆、安徽、山东、江西、湖北和江苏等省份迅速传播^[6-7]。该病主要发生在炎热、湿润的夏季,但其他季节也可零星发生,发病率和死亡率可高达 40%~90%。疾病主要 4~8 周黄羽肉鸡中爆发,2~3 周龄偶发,通常经过一个 24~48 h 的潜伏期。特征性症状为心包出现淡黄色透明液体,肝脏肿胀,肾脏水肿,尿酸盐沉积。通过扩增中国分离的 12 株 FAdV-4 Hexon 基因并遗传进化树分析序列显示这些毒株可能来源于之前的印度株^[8-9]。

测序结果表明,FAdV-4 中国株与澳大利亚、墨西哥、加拿大的 KR5、ON1、MX-SH90 对比分析显示存在 ORF19 基因缺失。已有研究证明,ORF19 基因缺失毒株比 ORF19 完整毒株具有更高的致病性,ORF19 基因的缺失也被认为是 FAdV-4 在中国造成大量流行的主要原因^[10]。另外,还发现这些 2015 年分离的 FAdV-4 中国株与 2013 年分离的中国株的 ORF29 基因出现了 33 nt 和 6 nt 的基因缺失,可能暗示近年来爆发的 FAdV-4 株适应了中国的宿主和环境^[11]。

最近报道称,在麻鸭中发现了 FAdV-4 发生,病毒感染 25 日龄麻鸭,病鸭呈现出与心包积液病鸡相似的临床症状,死亡率达 40%^[12]。然而,雏鸭并未出现死亡情况。另外,鸵鸟中也有 I 群禽腺病毒分离的报道,利用 12 种标准毒阳性血清鉴定,确定分离株为 FAdV-4,血清鉴定结果也与基因系统进化树分析相符合^[13]。利用基因序列分析进行流行病学数据调查对于阐述 FAdV-4 在不同宿主之间进化关系,以及 FAdV-4 的预防和控制具有重要意义。

3 发病特征

已有研究证明,纯化的 FAdV-4 毒株攻毒 SPF

雏鸡 24~48 h 后可引起死亡,病鸡表现精神沉郁,闭目嗜睡,出现临床症状 24 h 内死亡,剖检可见明显的心包积液症状。不同的肉鸡毒株在田间呈现相似的敏感性。鸡胚卵黄囊接种 FAdV-4 出现鸡胚发育迟缓,出血,最终以胚胎死亡而告终。研究人员通过皮下注射,口服的方式均能复制出 HPS^[14],FAdV-4 对肉鸡表现出很强的致病性,在临床中能够横向通过粪便途径在鸡群甚至农场间传播。在产蛋母鸡被感染后,其后代可能出现先天性感染,进一步促进了病原的广泛传播。

野生鸟类 FAdV-4 抗体检测结果显示,乌鸦和鸽子的血清样本的阳性率较高,这表明野生鸟类可能是病原的携带者^[15],在自然条件下可能成为疾病传播的特定宿主。另外,有研究表明,FAdV-4 毒株对淋巴组织有偏好,能够导致 B、T 细胞的耗竭,从而导致免疫抑制^[16]。而 HPS 发生时常常伴发其他病毒如传染性法氏囊 (IBD) 及鸡传染性贫血病毒 (CIA) 的感染,这可能与免疫抑制有关^[17]。

4 诊断方法

4.1 临床及病理诊断 临床中 4~8 周龄的肉鸡死亡率较高。对濒死鸡分析表明,受感染病鸡精神沉郁,24 h 内突然死亡,外观没有明显的临床症状,剖检可见心包内出现一种淡黄色透明液体,肝脏肿胀,偶尔可见肾炎症状。病理组织切片分析显示,攻毒试验鸡出现心肌淋巴细胞浸润,肝脏中肝细胞坏死及出现嗜碱性核内包涵体,其中嗜碱性核内包涵体可作为 FAdV-4 感染的典型特征^[18]。

4.2 病毒分离 病鸡肝脏是主要的感染相关器官,病毒载量最高。因此,FAdV-4 可以通过受感染的肝脏组织悬液接种鸡胚尿囊腔或卵黄囊的方式进行分离和纯化,也能在鸡胚胎肾细胞、鸡胚胎肝细胞、鸡胚成纤维细胞以及鹤鹑成纤维细胞 (QT-35) 上分离^[19],细胞感染后呈现明显的细胞病变,细胞脱落,感染细胞内存在包涵体。经纯化的病毒在透射电镜下与肝脏组织切片具有相同的形态学特征。

4.3 电镜 利用电镜可以对病毒、细菌、原生动物和真菌进行超微结构检查,在微生物的诊断中起着

至关重要的作用,从受感染动物的血液、体液或组织中观察到病毒粒子存在是确诊病毒感染的金标准,通过对 HPS 病例中肝脏匀浆、肝细胞或病毒颗粒进行染色,利用透射电镜可以观察纯化后的腺病毒粒子,说明 FAdV-4 是 HPS 的致病病原^[20]。在受感染的肝细胞核中观察病毒颗粒直径约 75 nm,无囊膜、六边形、二十面体等典型特征,有助于对该病进行确诊。

4.4 分子生物学技术 分子生物学实验技术是实验室诊断最常用的检测方式。如限制性内切酶分析 (REA)、DNA 探针原位杂交、聚合酶链式反应 (PCR)、实时荧光定量 PCR^[21] 和高分辨率熔解曲线 (high-resolution melting, HRM), 均可用于 FAdV-4 的检测和鉴别。

酶切分析 (REA) REA 最初用于对 FAdV 不同毒株进行分组和鉴别。根据 DNA 的基因组相似性通过 *Bam*H I 和 *Hind* III 消化后,可从 17 株 FAdV 中得到 11 种血清型^[22]。虽然 FAdV-4 型和 10 型之间存在交叉中和,但利用 *Hind* III、*Dra* I、*Xba* I、*Not*I、*Sfi* I、*Bgl* II、*Sma* I 和 *Nae* I 酶切分析能够揭示其中的差异^[23]。PCR 方法是检测 FAdV-4 的最常用的方法。禽腺病毒 PCR 检测的主要优点是快速、简便、灵敏度高。Hexon 基因常被研究人员用来设计引物,通过测序分析可将病毒的 A~E 种区分开来,并定位到种内特定的血清型^[24],通过 PCR 结合 REA 的方法可以检测和分化 12 株 FAdV 的参考菌株^[25]。此外,Fiber 基因因为其编码特定类型的亚基因中和表位也被用于禽腺病毒的检测。应用 *Alu* I 氏酶能够建立针对 Fiber 基因的聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 方法,可用于鉴别出现心包积液症状与不出现心包积液症状的 FAdV-4 毒株^[26]。

利用荧光定量 PCR 方法可以达到检测和量化 FAdV-4 的目的。以 Hexon 基因 L1 区设计引物,可建立一种 HRM-curve 检测方法,用于 FAdV-4 的基因检测和血清分型^[27]。

4.5 血清技术 琼脂扩散试验作为一种经典血清学检测方法,也被用于检测 FAdV-4,该方法操作简

便,实验要求较低,适于较为简单的临床及实验室检测。

FAdV-4 不具备使鸡、大鼠以及小鼠红细胞凝集的能力,但 Manzoor S 利用人 O 型红细胞血凝抑制试验检测了野生鸟类中 FAdV-4 血清抗体情况^[15],得到了很好的试验结果。当然,最准确的诊断手段依然是病毒的中和试验(VN),但试验要求较高,费时费力且价格比较昂贵。

ELISA 检测是 FAdV-4 血清学诊断的重要方法,早期研究中应用全病毒包被抗原检测自然感染和试验感染的鸡血清样本中 FAdV 的抗体。但是病毒抗原的制备相对繁琐且效率低下,敏感性和特异性较低。后期研究人员利用 Hexon 蛋白具备抗原决定簇的特点,利用 FAdV-4 的 Hexon 蛋白包被抗原,建立了 FAdV-4 的抗体检测方法,但由于 Hexon 蛋白是群禽腺病毒的群特异性抗原,可能影响血清型特异性的鉴别^[28]。因此,研究人员利用 FAdV-4 的 Fibre 蛋白进行表达并作为包被抗原,能够做到针对 4 型禽腺病毒检测的目的^[29],另外,非结构蛋白 100K、33K 等也都有成功表达并做为包被抗原建立 ELISA 检测方法的报道^[30]。基于重组蛋白包被建立的间接 ELISA 被证明是敏感、特异和准确的,但更重要的是,这些方法更容易标准化,因此适合大规模推广应用。

5 预防策略

做好养殖场所以及养鸡设备的消毒工作,适当的温度、湿度、通风处理,均能影响鸡心包积水的发生情况,但由于引发鸡 HPS 的主要病原 FAdV-4 存在,所以最行之有效的控制该病的发生仍然是疫苗的预防。目前,已报道的用于预防 FAdV-4 的疫苗主要分为灭活苗、弱毒苗以及基因亚单位疫苗三类。

5.1 灭活疫苗 Afzal 等^[31]利用感染 HPS 病鸡的肝脏组织制备灭活疫苗,田间试验结果表明,接种疫苗组死亡率为 0.52%,而未接种疫苗的禽类死亡率为 5.34%。另外,在疾病爆发时紧急接种灭活疫苗结果显示,未接种疫苗组死亡率达到 10.27%,接种疫苗组后死亡率仅为 2.33%。韦悠等^[32]利用 FAdV-4 和 FAdV-8 制备了禽腺病毒的双价油乳剂

灭活苗,免疫保护期可达 6 个月以上。

Kim M S 等^[33]通过对不同 FAdV-4 毒株相关免疫原性等方面进行鉴定,筛选了适合制备全病毒灭活疫苗的优势毒株,并研制了 FAdV-4 油乳剂灭活苗。通过免疫攻毒试验证实,FAdV-4 油乳剂灭活苗能够产生对血清 4 型,8a 型以及 11 型的多血清型交叉保护。Pan Q 等^[34]针对在中国爆发的 FAdV-4 型毒株,分离制备了灭活疫苗,疫苗免疫后能够产生高水平的抗体,其中,Th2(白细胞介素-4)免疫应答优于 Th1(γ 干扰素)。

5.2 弱毒疫苗 Mansoor M K 等^[35]利用鸡胚连续传代 12 次后致弱一株 FAdV-4 毒株,并与商品化的组织灭活苗共同免疫 14 日龄无母源抗体的肉鸡,24 日龄时应用 10 倍剂量 ELD₅₀ 进行攻毒实验,结果表明,弱毒疫苗比商品化灭活苗保护率更高,肝脏、心脏等组织器官伤害性更小,也证明了该弱毒疫苗具备免疫原性,有制备商品化弱毒苗的潜质。

2004 年,一株没有 HPS 临床症状的 FAdV-4 毒株被分离出来,命名为 FAdV-4 ON1,SPF 鸡经口服和肌肉内感染接种 FAdV-4 ON1 后,都能产生强烈的抗 FAdV-4 特异性抗体反应。同时,禽类抗感染细胞因子如干扰素(IFN)和白细胞介素(IL)-10 在肝脏中的表达量也明显增加^[36]。

目前,灭活疫苗的接种是防治 HPS 较为有效的方式,具备制备简单、免疫效果确实的优点,但是同时也存在刺激机体产生抗体时间短,需重复免疫的缺点。弱毒疫苗维持免疫时间长,但可能存在弱毒毒力返强,遗传不稳定的缺点。为了解决这个问题,研究人员试图开发一种亚单位疫苗,即利用大肠杆菌原核表达系统表达 FAdV-4 的 Penton 蛋白,肉鸡的免疫原性及攻毒保护试验证实原核表达的 Penton 蛋白能够提供 90% 的保护力^[37]。

6 结 语

FAdV-4 对肉鸡有很高的致病性,目前已经扩散至亚洲、中美洲、南美洲以及一些欧洲国家,鉴于其扩散迅速,FAdV-4 对肉鸡养殖业造成的巨大损失,受影响的各个国家和地区应制定预防方案,避免更严重的损失。

增强鸡对 FAdV-4 的感染抵抗力是控制 HPS 发生的关键。一方面,环境因素起着至关重要的作用,控制好饲养环境温度、湿度以及通风情况能够有效地控制心包积液症状的发生,另外做好鸡舍环境的整体消毒工作,能够减少 FAdV-4 在环境中的数量,抑制疾病的爆发。另一方面,疫苗接种仍是控制该病爆发的最有效方式,目前,研究人员正致力于灭活疫苗、弱毒疫苗以及亚单位疫苗的研究,并取得了一定的研究进展,更有研究人员指出,可以尝试利用减弱沙门氏菌菌株为载体制备口服疫苗,口服疫苗对于鸡群免疫具备独特的优势,鸡群免疫通常费时费力,如果口服疫苗能够研制成功,相信一定具备广阔的应用市场。

除了针对 FAdV-4 的应用研究外,对于 FAdV-4 的基础研究也不应忽视,ORF19 基因缺失导致致病性增高还有待进一步研究证实。新分离 FAdV-4 中国株 ORF29 出现了 33nt 和 6nt 的基因缺失,是否为适应中国宿主与环境的表现也需要继续探索。

参考文献:

- [1] 塞 弗. 禽病学[M]. 苏敬良, 高 福, 索 勋, 主译. 北京: 中国农业出版社, 2012.
Y M Saif. Diseases of poultry [M]. Su J L, Gao F, Suo X, translated. 12ed. Beijing: China Agriculture Press, 2012.
- [2] Xia J, Yao K C, Liu Y Y, *et al.* Isolation and molecular characterization of prevalent Fowl adenovirus strains in southwestern China during 2015–2016 for the development of a control strategy [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6(11): e103.
- [3] Jaffery M S. A treatise on Angara disease (hydropericardium pulmonary oedema – hepatonephritis syndrome) [J]. *J Pakistan Vet Med Asso*, 1988, 31–33.
- [4] 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.
- [5] 张希兵. 肉鸡心包积水-肝炎综合征的诊治报告[J]. 中国禽业导刊, 2006, 23: 25.
Zhang X B. A report of the hydropericardium syndrome in broiler [J]. *Guid Chin Poul*, 2006, 23: 25.
- [6] 刘新富, 马凤洲. 心包积液-肝炎综合征的诊断和防治[J]. 兽医导刊, 2015, 11: 32–33.
Liu X F, Ma F Z. Diagnosis and protection of the hydropericardium syndrome[J]. *Veterinary Orientation*, 2015, 11: 32–33.
- [7] Li H J, Wang L, Qiu Z, *et al.* Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis – hydropericardium syndrome in chickens in China[J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 45: 230–241.
- [8] Li C J, H Y, Li D D, *et al.* Characterization of Fowl adenovirus isolated between 2007 and 2014 in China [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 197: 62–67.
- [9] Zhang T Q, Jin P, Ding Y, *et al.* Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak – associated serotype 4 Fowl adenovirus isolates in central China[J]. *Virol J*, 2016, 13: 188.
- [10] Ye J Q, Liang G C, Zhang J J, *et al.* Outbreaks of serotype 4 Fowl adenovirus with novel genotype, China[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2016, 5(5): e50.
- [11] Li L T, Luo L, Luo Q P. Genome sequence of a Fowl adenovirus serotype 4 strain lethal to chickens, isolated from China [J]. *Genome Announc*, 2015, 4(2): e00140–16.
- [12] 刘吉山, 肖跃强, 于 雪, 等. 麻鸭感染 1 群禽腺病毒 4 型的致病及防治研究[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(9): 1112–1117.
Liu J S, Xiao Y Q, Yu X, *et al.* Prevention and treatment of the disease in shelduck result from a Fowl adenovirus type 4 infection Chinese veterinary science [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(9): 1112–1117.
- [13] 李昌静, 王冬冬, 王建琳, 等. 鸵鸟 I 群禽腺病毒的分离鉴定、血清型鉴定以及 Hexon 蛋白基因序列分析[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(12): 14–20.
Li C J, Wang D D, Wang J L, *et al.* Gene sequence analysis of hexon protein and separation identification and serotype identification of Fowl adenovirus group I in ostrich[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(12): 14–20.
- [14] Mazaheri A, Prusas C, Voss M, *et al.* Some strains of serotype 4 Fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens[J]. *Avian Pathol*, 1998, 27(3): 269–276.
- [15] Manzoor S, Hussain Z, Rahman S U, *et al.* Identification of antibodies against hydropericardium syndrome in wild birds [J]. *British Poultry Science*, 2013, 54(3): 325–328.
- [16] Schonewille E A, Singh T W, *et al.* Fowl adenovirus (FAdV) serotype 4 causes depletion of B and T cells in lymphoid organs in specific pathogen-free chickens following experimental infection [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2008, 121(1/2): 130–139.
- [17] Manu A, Rajesh C, Rajesh K. Hydropericardium syndrome: current state and future developments[J]. *Arch Virol*, 2013,

- 158(5): 921–931.
- [18] Liu Y, Wan W Y, Gao D S, *et al.* Genetic characterization of novel Fowl adenovirus 4 isolates from outbreaks of hepatitis–hydropericardium syndrome in broiler chickens in China [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2016, 5(11): e117.
- [19] Schonewille E, Jaspers R, Paul G, *et al.* Specific pathogen–free chickens vaccinated with a live FAdV–4 vaccine are fully protected against a severe challenge even in the absence of neutralizing antibodies[J]. *Avian Dis*, 2010, 54(2): 905–910.
- [20] Ganesh K R, Raghavan R N, Gowda M L. Purification and characterization of the aetiological agent of hydropericardium hepatitis syndrome from infected liver tissues of broiler chickens[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2002, 34(1): 7–17.
- [21] 魏晓锋, 蔡晓尧, 熊 炜. 荧光定量 PCR 检测 FAdV–4 型禽腺病毒的引物对、探针、试剂盒及方法 [P]. 中国, 106811551, 2017–10–17.
- Wei X F, Cai X Y, Xiong W. Primer pair, probe, kit and method for detecting FAdV–4 Fowl adenovirus by real–time PCR [P]. China, 106811551, 2017–10–17.
- [22] Erny K, Pallister J, Sheppard M, *et al.* Immunological and molecular comparison of Fowl adenovirus serotypes 4 and 10[J]. *Arch Virol*, 1995, 140(3): 491–501.
- [23] Masaji M, Kikuyasu N, Tadao I. Characterization of Fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens with hydropericardium syndrome based on analysis of the short fiber protein gene [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2010, 22(2): 218–223.
- [24] 王 娟, 刘亮亮, 李慧昕. 禽腺病毒血清 4 型的分离鉴定及遗传演化分析[J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(6): 755–761.
- Wang J, Liu L L, Li H X. Isolation, Identification and phylogenetic analysis of Fowl adenovirus serotype 4[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 47(6): 755–761.
- [25] Raue R, Hess M. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of Fowl adenovirus and egg drop syndrome virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 1998, 73(2): 211–217.
- [26] Masaji M, Kikuyasu N, Tadao I. Characterization of Fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens with hydropericardium syndrome based on analysis of the short fiber protein gene [J]. *Vet Diagn Invest*, 2010, 22(2): 218–223.
- [27] Penelope A S, Naomi C, Kirkpatrick D O. Classification of Fowl adenovirus serotypes by use of high–resolution melting–curve analysis of the Hexon gene region [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(2): 311–321.
- [28] 朱庆贺, 张鹏宇, 崔红玉, 等. 4 型禽腺病毒抗体间接 hexon–ELISA 检测方法的建立[J]. *中国兽药杂志*, 2018, 52(8): 7–11.
- Zhu Q H, Zhang P Y, Cui H Y, *et al.* Establishment of an indirect Hexon–ELISA method for the detection of antibodies against Fowl adenovirus serotype 4 [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2018, 52(8): 7–11.
- [29] Schachner A, Marek A, Jaskulska B, *et al.* Recombinant FAdV–4 fiber–2 protein protects chickens against hepatitis–hydropericardium syndrome (HHS) [J]. *Vaccine*, 2014, 32(9): 1086–1092.
- [30] Xie Z, Luo S, Fan Q, *et al.* Detection of antibodies specific to the non–structural proteins of Fowl adenoviruses in infected chickens but not in vaccinated chickens [J]. *Avian Pathol*, 2013, 42: 491–496.
- [31] Afzal M, Ahmad I. Efficacy of an inactivated vaccine against hydropericardium syndrome in broilers [J]. *Vet Rec*, 1990, 126: 59–60.
- [32] 韦 悠, 谢芝勋, 范 晴, 等. I 群禽腺病毒双价油乳剂灭活疫苗的研究 [J]. *南方农业学报*, 2011, 42(12): 1550–1554.
- Wei Y, Xie Z X, Fan Q, *et al.* Development of bivalent inactivated oil–emulsion vaccine for Fowl adenovirus group–I [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(12): 1550–1554.
- [33] 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.
- [34] Pan Q, Yang Y C, Gao Y L. An inactivated novel genotype Fowl adenovirus 4 protects chickens against the hydropericardium syndrome that recently emerged in China [J]. *Viruses*, 2017, 9(8): e216.
- [35] Mansoor M K, Hussain I, Arshad M, *et al.* Preparation and evaluation of chicken embryo–adapted Fowl adenovirus serotype 4 vaccine in broiler chickens [J]. *Tropical Animal Health Production*, 2011, 43(2): 331–338.
- [36] Helena G, Zvonimir P, Shayan S, *et al.* Pathogenicity and cytokine gene expression pattern of a serotype 4 Fowl adenovirus isolate [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e77601.
- [37] Shah M S, Ashraf A, Rahman M, *et al.* A subunit vaccine against hydropericardium syndrome using adenovirus penton capsid protein [J]. *Vaccine*, 2012, 30(50): 7153–7156.