

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2019.08.01

I 群禽腺病毒 4 型 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

张启龙¹, 孙丹², 韦海涛¹, 宋彦军¹, 周德刚¹, 冯小宇¹, 王林^{1*}

(1. 北京市动物疫病预防控制中心, 北京 102629; 2. 北京市兽药监察所, 北京 102629)

[收稿日期] 2019-05-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 08-0001-07 [中图分类号] S852.65

[摘要] 利用纯化的 I 群禽腺病毒 4 型重组 Hexon 蛋白, 通过各反应条件筛选, 建立了 I 群禽腺病毒 4 型 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法。结果显示, 抗原最佳包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 最佳封闭液为 1% 牛血清白蛋白; 待检血清最佳作用浓度是 400 倍稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min; 酶标抗体的最佳作用条件为稀释度 1:8000, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min; 最佳显色时间为 10 min。用所建方法对 160 只临床鸡只进行检测, 同时与拭子 PCR 检测对比, 一致性较好, 表明该方法可有效用于临床检测。

[关键词] I 群禽腺病毒 4 型; Hexon 蛋白; 间接 ELISA; 检测

Establishment of an Indirect ELISA for the Detection of IgG Antibody of Group I Fowl Adenovirus Serotype 4

ZHANG Qi-long¹, SUN Dan², WEI Hai-tao¹, SONG Yan-jun¹,ZHOU De-gang¹, FENG Xiao-yu¹, WANG Lin^{1*}

(1. Beijing Center for Animal Disease Control and Prevention, Beijing 102629, China;

2. Beijing Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 102629, China)

Corresponding author: WANG Lin, E-mail: Lwang0631@163.com

Abstract: With various reaction conditions being screened, an indirect ELISA was established for detection of group I Fowl adenovirus serotype 4 IgG antibody by using the purified recombination Hexon protein. The results showed that the optimal concentration of the coating antigen was 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the best blocking solution was 1% bovine serum albumin; the optimal concentration of the serum to be tested was 400-fold dilution, and the optimal incubation time of the serum was 60 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$; the optimal conditions of the enzyme-labeled antibody were 1:8000 dilution, and incubated for 60 minutes at 37 $^{\circ}\text{C}$; the optimal chromogenic time was 10 minutes. The established method was used to detect 160 clinical chickens and compared with the swab PCR test, the results were consistent, indicating that the proposed method can be used for clinical detection effectively.

Key words: group I Fowl adenovirus serotype 4; Hexon protein; indirect ELISA; detection

基金项目: 北京市农业农村局农业科技项目(20170130)

作者简介: 张启龙, 兽医师, 硕士研究生, 从事动物疫病诊断与流行病学研究。

通讯作者: 王林。E-mail: Lwang0631@163.com

肝炎-心包积液综合征 (Hepatitis and hydro-pericardium syndrome, HHS) 是由禽腺病毒 4 型 (Fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 新基因型引起的以禽心包积液、肝脏黄染、肿大和出血为特征的传染病^[1]。HHS 首次于 1987 年在巴基斯坦的安卡拉地区发生, 又名安卡拉病, 随后在亚洲、欧洲和南美洲等地区流行^[2-4]。2013 年以来该病在我国河南、山东、江苏、河北、陕西等地大面积流行, 给家禽养殖业造成了巨大经济损失^[5-7]。FAdV-4 属于禽腺病毒 I 群, 呈二十面体对称结构, 病毒粒子大小在 70~90nm^[8]。FAdV-4 病毒粒子有 252 个衣壳粒, 包含 240 个六邻体 (Hexon) 和 12 个五邻体 (顶点衣壳粒)^[9]。研究表明, Hexon 蛋白是特异性抗原决定簇, 可以引发极强的中和反应, 当六邻体发生变异将导致中和免疫的缺失, 可作为诊断型和群的首选蛋白^[10-11]。FAdV-4 的 Hexon 抗原表位主要集中在前段、中段, 推测其具有型和群特异性表位^[12-13]。为此, 本试验利用前期重组表达的 FAdV-4 Hexon 蛋白作为包被抗原, 通过一系列条件的优化, 建立 I 群 FAdV-4 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法, 为临床检测和有效防控提供技术支撑。

1 材料

1.1 抗原与对照抗体 纯化重组 Hexon 蛋白, 由北京市动物疫病预防控制中心制备; I 群 FAdV-4 IgG 阴、阳性对照抗体, 由河北农业大学提供。

1.2 试剂 0.05 mol/L PBS、PBST 均购自 Thermo Scientific 公司; HRP-兔抗鸡二抗购自 Sigma 公司; 底物溶液购自湖州生物技术有限公司; PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 临床样品 临床样品由北京市动物疫病预防控制中心采集。

2 方法

2.1 FAdV-4 抗体间接 ELISA 操作基本方法 将纯化的重组 Hexon 蛋白用 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液稀释后包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h 后 2~8 $^{\circ}$ C 作用 14~18 h。弃去孔中的包被液, 每孔加入 250 μ L PBST 洗涤酶标板 5 次, 每次 3 min。按每孔 200 μ L 加入封闭液, 37 $^{\circ}$ C 封闭

2 h 后弃去, 每孔加入 250 μ L PBST 洗涤酶标板 1 次, 每次 3 min。加入待检样品, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30~120 min。弃去液体, 每孔加入 250 μ L PBST 洗涤酶标板 5 次, 每次 3 min。加入稀释的 HRP-兔抗鸡二抗, 100 μ L/孔, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30~120 min。弃去液体, 每孔加入 250 μ L PBST 洗涤酶标板 5 次, 每次 5 min。每孔加入底物显色液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 5~15 min, 然后每孔加入 2 mol/L H_2SO_4 溶液 50 μ L, 终止反应。利用酶标仪测定每孔 OD_{450nm} 吸光值。

2.2 抗原最佳包被浓度及最佳样品稀释度的确定 用棋盘法对重组 Hexon 蛋白包被浓度和 FAdV-4 IgG 抗体阴、阳性对照稀释度进行优化: 包被液浓度从 8 μ g/mL 倍比稀释至 0.5 μ g/mL, 100 μ L/孔。FAdV-4 IgG 抗体阴、阳性对照分别以 PBST 做 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释, 做方阵试验。根据 P/N 值 (阳性样品 OD_{450nm}/阴性样品 OD_{450nm}) 筛选出抗原最佳包被浓度和样品最佳稀释度。

2.3 最佳封闭液的选择 在不包被 Hexon 蛋白和包被 Hexon 蛋白后, 分别以 1% 牛血清白蛋白 (BSA)、5% 脱脂乳、10% 马血清和 1% 明胶作为封闭液进行封闭。检测 FAdV-4 IgG 抗体阴、阳性对照, 根据 P/N 值选择最佳封闭液。

2.3.1 直接封闭 不包被任何蛋白, 每孔加入 300 μ L 相应封闭液, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。

2.3.2 包被后封闭 以 1 μ g/mL 的纯化重组 Hexon 蛋白包被 ELISA 板, 分别用不同的封闭液封闭, 每孔加 300 μ L, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。

2.4 样品孵育时间的优化 将 FAdV-4 IgG 抗体阴、阳性对照的孵育时间设置 30 min、60 min、90 min、120 min 四个梯度, 分别进行 FAdV-4 ELISA 试验, 根据 P/N 值结果筛选出最佳样品孵育时间。

2.5 HRP-兔抗鸡二抗最佳工作浓度的测定 将 HRP-兔抗鸡二抗分别进行 1:2000、1:4000、1:8000 和 1:16000 倍稀释, 按照以上操作程序进行 FAdV-4 ELISA 试验, 根据 P/N 值结果筛选出二抗最佳工作浓度。

2.6 HRP-兔抗鸡二抗最佳孵育时间的优化 将二抗以 1:8000 稀释后分别孵育 30 min、60 min、90 min、120 min,按照以上操作程序进行 FAdV-4 ELISA 试验,根据 P/N 值结果筛选纯化二抗最佳工作时间。

2.7 底物(TMB)反应时间的优化 将底物的作用时间分别设置为 5 min、7 min、10 min、15 min,按照以上操作程序进行 FAdV-4 ELISA 试验,根据 P/N 值结果筛选出底物最佳作用时间。

2.8 临床样品检测 采集 160 只临床鸡只血清进行新建间接 ELISA 方法检测,同时对鸡只采集拭子依据《I 群血清 4 型禽腺病毒核酸 PCR 检测技术

规程》(DB 34/T 3121-2018)进行 PCR 检测,对比两种方法的一致性。

3 结果与分析

3.1 抗原最佳包被浓度及最佳样品稀释度的确定 不同浓度的抗原和不同稀释度的 FAdV-4 IgG 抗体阴、阳性对照按正交试验的方法进行组合,每组设置 2 个重复取平均值。由表 1 可知,在抗原包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,FAdV-4 IgG 抗体阴、阳性对照稀释 400 倍时,P/N 值最大,非特异性最小,试验的灵敏度最高,所以确定包被抗原的浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,FAdV-4 IgG 抗体阴、阳性对照稀释 400 倍时检测效果最佳。

表 1 包被浓度和样品稀释度的确定

Tab 1 Determination of coating concentration and sample dilution

对照稀释度	测定项	8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
1:100	阴性样品 OD _{450nm}	0.803	0.721	0.561	0.425	0.316
	阳性样品 OD _{450nm}	1.92	1.755	1.601	1.42	1.211
	P/N	2.39	2.43	2.85	3.34	3.83
1:200	阴性样品 OD _{450nm}	0.383	0.332	0.258	0.231	0.222
	阳性样品 OD _{450nm}	1.862	1.515	1.281	1.42	1.061
	P/N	4.86	4.56	4.97	6.15	4.78
1:400	阴性样品 OD _{450nm}	0.325	0.261	0.201	0.106	0.182
	阳性样品 OD _{450nm}	1.32	1.255	1.251	1.096	0.811
	P/N	4.06	4.81	6.22	10.34	4.46
1:800	阴性样品 OD _{450nm}	0.233	0.201	0.141	0.099	0.139
	阳性样品 OD _{450nm}	1.22	1.205	1.201	0.921	0.767
	P/N	5.24	6.00	8.52	9.30	5.52
1:1600	阴性样品 OD _{450nm}	0.203	0.181	0.131	0.091	0.089
	阳性样品 OD _{450nm}	1.196	1.165	1.101	0.762	0.691
	P/N	5.89	6.44	8.40	8.37	7.76

3.2 最佳封闭液的选择 如表 2 所示,在不包被任何蛋白的情况下,用 1% 明胶、10% 马血清封闭时,FAdV-4 IgG 抗体阳性对照的 OD_{450nm} 值较高,都在 0.5 以上,表明 FAdV-4 IgG 抗体阳性对照与封闭液之间存在非特异性结合。而用 5% 脱脂奶和 1% BSA 封闭时,FAdV-4 IgG 抗体阳性对照的 OD_{450nm} 值基本都在 0.2 以下,表明 FAdV-4 IgG 抗

体阳性对照与这两种封闭液之间的非特异性结合程度较小。在包被 Hexon 蛋白抗原后,用 1% BSA 和 5% 脱脂奶进行封闭,阴阳性区分明显,表明 1% BSA 和 5% 脱脂奶作为封闭液时对抗原抗体特异性结合干扰较小,选择 P/N 值较大的 1% BSA 作为最佳封闭液。

表 2 最佳封闭液的确定

Tab 2 Determination of the optimal sealing fluid

抗原	测定项	封闭液			
		1% BSA	5% 脱脂乳	1% 明胶	10% 马血清
未包被蛋白	阳性样品 OD _{450nm}	0.142	0.162	0.561	0.852
	阴性样品 OD _{450nm}	0.131	0.170	0.603	0.764
	P/N	1.08	0.95	0.93	1.11
包被蛋白	阳性样品 OD _{450nm}	1.205	0.966	1.562	1.602
	阴性样品 OD _{450nm}	0.146	0.153	0.699	0.788
	P/N	8.25	6.31	2.23	2.03

3.3 样品孵育时间的优化 在以上优化的基础上,按确定的抗原包被条件、样品稀释度及最佳封闭液,将抗原和抗体作用的时间分别设为 30 min、60 min、90 min 和 120 min,其他条件相同,选择样品最佳孵育时间。结果见表 3,发现样品作用时间为 30 min 时 P/N 值最小,作用 60 min、90 min 和 120 min 时 P/N 接近,考虑到 ELISA 反应时间越短越便利,因此选择 60 min 为最佳样品孵育时间。

3.4 HRP-兔抗鸡二抗最佳稀释度的确定 将酶标二抗按 1:2000、1:4000、1:8000 和 1:16000 倍稀释加入酶标板中,其他条件相同,选择最佳二抗稀释度,结果发现 HRP-兔抗鸡二抗稀释度为 1:8000 时,P/N 的比值最大,因此 HRP-兔抗鸡二抗抗体的最佳稀释度为 1:8000,结果见表 4。

3.5 HRP-兔抗鸡二抗最佳反应时间的确定 在以上优化的条件下,试验酶标二抗不同孵育时间的 P/N 值。结果如表 5 所示,当酶标二抗反应时间为 60 min 时,P/N 值最大,因此酶标二抗最佳反应时间为 60 min。

3.6 底物(TMB)显色时间的确定 结果如表 6 显示,当显色反应为 10 min 时,P/N 的值最大,因此底物(TMB)最佳显色时间为 10 min。

3.7 阴、阳性标准临界值的确定 取 50 份 FAdV4 抗体为阴性的血清样品,按照确定的条件进行间接 ELISA,用酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值,计算 OD_{450nm} 的平均值及标准方差(*s*),为消除每次间接 ELISA 检测时,试验环境及操作的影响,每次检

表 3 样品反应时间的优化

Tab 3 Optimization of sample reaction time

一抗作用时间	阳性样品 OD _{450nm}	阴性样品 OD _{450nm}	P/N
30min	0.801	0.135	5.93
60min	1.211	0.139	8.71
90min	1.302	0.151	8.62
120min	1.522	0.186	8.18

表 4 HRP-兔抗鸡二抗最佳稀释度的确定

Tab 4 Determination of the optimal dilution of HRP - rabbit anti - chicken secondary antibody

HRP-兔抗鸡二抗	阳性样品 OD _{450nm}	阴性样品 OD _{450nm}	P/N
1:2000	1.866	0.321	5.81
1:4000	1.421	0.281	5.05
1:8000	1.101	0.122	9.02
1:16000	0.786	0.109	7.21

表 5 HRP-兔抗鸡二抗最佳反应时间的确定

Tab 5 Determination of HRP - rabbit anti - chicken second antibody optimal reaction time

HRP-兔抗鸡二抗反应时间	阳性样品 OD _{450nm}	阴性样品 OD _{450nm}	P/N
30min	0.722	0.131	5.51
60min	1.213	0.143	8.48
90min	1.321	0.166	7.96
120min	1.339	0.181	7.40

测时加入标准阳性血清和标准阴性血清作为对照,阳性血清 OD_{450nm} 约等于 1.0, 否则结果无效;经计算,50 份阴性血清 OD_{450nm} 的平均值为 0.174, 标准差 *s* 为 0.0764, 因此间接 ELISA 阴阳性的临界值(平均值 + 3*s*) 为 0.403 (表 7), 为计算方便定为 0.4。因此,当样品 OD_{450nm} ≥ 0.4 时,判定 I 群 FAdV 抗体水平为阳性,当样品 OD_{450nm} < 0.4 时,判定 I 群 FAdV 抗体阴性。

表 6 底物最佳显色时间的确定

Tab 6 Determination of optimal color rendering time of substrates

显色时间	阳性样品 OD _{450nm}	阴性样品 OD _{450nm}	P/N
5min	0.601	0.096	6.26
7min	0.888	0.106	8.38
10min	1.188	0.131	9.06
15min	1.324	0.191	6.93

表 7 阴阳性标准临界值的确定

Tab 7 Determination of negative and positive standard critical value

样品	OD _{450nm}						
阴性血清 1	0.289	阴性血清 15	0.071	阴性血清 29	0.099	阴性血清 43	0.216
阴性血清 2	0.242	阴性血清 16	0.071	阴性血清 30	0.105	阴性血清 44	0.15
阴性血清 3	0.224	阴性血清 17	0.238	阴性血清 31	0.126	阴性血清 45	0.157
阴性血清 4	0.164	阴性血清 18	0.326	阴性血清 32	0.079	阴性血清 46	0.117
阴性血清 5	0.109	阴性血清 19	0.046	阴性血清 33	0.141	阴性血清 47	0.174
阴性血清 6	0.143	阴性血清 20	0.367	阴性血清 34	0.192	阴性血清 48	0.115
阴性血清 7	0.146	阴性血清 21	0.222	阴性血清 35	0.151	阴性血清 49	0.122
阴性血清 8	0.126	阴性血清 22	0.204	阴性血清 36	0.229	阴性血清 50	0.315
阴性血清 9	0.173	阴性血清 23	0.146	阴性血清 37	0.133	标准阳性	1.062
阴性血清 10	0.129	阴性血清 24	0.156	阴性血清 38	0.224	标准阴性	0.102
阴性血清 11	0.1	阴性血清 25	0.108	阴性血清 39	0.239	平均 OD 值	0.174
阴性血清 12	0.14	阴性血清 26	0.211	阴性血清 40	0.141	标准差	0.0764
阴性血清 13	0.109	阴性血清 27	0.309	阴性血清 41	0.31	阴阳性临界值	0.403
阴性血清 14	0.095	阴性血清 28	0.321	阴性血清 42	0.193	-	-

3.8 临床样品 I 群 FAdV - 4 抗体的检测 对 160 份临床鸡血清样品,按照确定的条件进行间接 ELISA 检测以及拭子 PCR 检测,结果见表 8。经分析统计两者 kappa 值为 0.924 (*P* < 0.001), 结果表明两种检测方法一致性较好。160 份血清样本用建立的间接 ELISA 进行检测有 46 份样本为阳性,血清阳性率为 28.75%,说明北京市部分鸡群中存在 I 群 FAdV - 4 感染。

表 8 两种方法检测临床样品的一致性结果

Tab 8 Test results of clinical samples

新建间接 ELISA 检测	PCR 检测	
	阳性/份	阴性/份
阳性/份	44	2
阴性/份	3	111

4 讨论与结论

HHS 是主要由 FAdV - 4 引起的一种具有高度传染性和高死亡率的新型家禽疾病。2000 年前后,国内报道的 FAdV 病毒的血清型主要为 1 型、2 型、8 型、9 型、10 型和 12 型。2012 年 FAdV - 4 引起的 HHS 在我国许多地区零星散发,2013 年呈现出暴发式增长^[14-16],2015 - 2018 年国内报道的 FAdV 的血清型仍然主要是 4 型^[17-20]。

FAdV - 4 病毒衣壳蛋白主要由六邻体、纤突蛋白、五邻体和五邻体周围蛋白等构成。六邻体是腺病毒最丰富的结构蛋白,含有大量的型特异性抗原,同时也是病毒对免疫压力最弱的地方^[21]。本研究利用前期分离到 I 群 FAdV - 4 新基因型克隆表达的 Hexon 蛋白作为包被抗原,建立了 FAdV - 4

ELISA 检测方法,并对该检测方法的各个步骤进行了条件优化,确定该检测方法的最适条件:样品稀释 400 倍检测;抗原最佳包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$;最适合的封闭液为含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液;最适合的样品孵育时间为 1 h;最适合的二抗稀释浓度和反应时间为 1:8000 稀释反应 1 h;最适合的底物显示时间为 10 min。取 50 份 FAdV4 抗体为阴性的血清样品进行 ELISA 检测,通过平均值 + 3s 的方法计算确定本 ELISA 方法的临界值为 0.4。

目前国内 I 群 FAdV-4 尚没有相关血清学检测标准,根据专业知识,血清学检测与病原学检测存在较大相关性,故本研究在临床样品检测阶段与现有 PCR 方法进行了一致性比较,结果较好。在当前我国尚未使用疫苗对 HHS 进行普遍防疫的情况下,加强 HHS 血清流行病学调查,可为 HHS 早期有效的防控措施提供指导。ELISA 具有快速、可操作性强、高通量等优点,常被作为血清流行病学调查的主要方法。部分临床样品检测表明北京市鸡群存在 FAdV-4 感染,应当引起重视,及时采取有效防控措施。

参考文献:

- [1] 袁万哲,李玉保,王建昌,等. 鸡心包积液-肝炎综合征的初步研究[J]. 中国兽医科学, 2016(2): 157-160.
Yuan W Z, Li Y B, Wang J C, *et al.* Preliminary study on chicken pericardial effusion-hepatitis syndrome[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016(2): 157-160.
- [2] Griffin B D, Nagy E. Coding potential and transcript analysis of fowl adenovirus 4: insight into upstream ORFs as common sequence features in adenoviral transcripts[J]. Journal of General Virology, 2011, 92(Pt 6):1260-1272.
- [3] Niczyporuk J S. Phylogenetic and geographic analysis of fowl adenovirus field strains isolated from poultry in Poland [J]. Archives of Virology, 2016, 161(1):33-42.
- [4] Mittal D, Jindal N, Tiwari A K, *et al.* Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens[J]. Virus Disease, 2014, 25(1): 114-119.
- [5] Li H, Wang J, Qiu L, *et al.* Fowl adenovirus species C serotype 4 is attributed to the emergence of hepatitis-hydropericardium

- syndrome in chickens in China. [J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2016, 45: 230-241.
- [6] 刁有祥. I 群禽腺病毒感染的流行情况与防控[J]. 北方牧业, 2016(10): 21-21.
Diao Y X. Epidemic situation and prevention and control of group I avian adenovirus infection [J]. Northern Animal Husbandry, 2016(10): 21-21.
- [7] 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 avian adenovirus in China in 2015 [J]. China Poultry, 2016, 38(9): 65-68.
- [8] Chandr R, Gomez-Villamandos J C. Ultrastructural changes in the liver of birds experimentally infected with the agent of hydropericardium syndrome[J]. Acta Virologica, 2001, 45(2):129.
- [9] Horst L, Christopher R, Roland W, *et al.* Hydropericardium syndrome: current state and future developments[J]. Archives of Virology, 2013, 158(5): 921-931.
- [10] Cai F, Weber J M. Organization of the avian adenovirus genome and the structure of its endopeptidase [J]. Virology, 1993, 196(1): 358-362.
- [11] 文艳玲,谢芝勋,黄琦,等. 禽腺病毒 1 型和 4 型六邻体蛋白抗原表位和密码子偏爱性分析[J]. 动物医学进展, 2007, 28(11): 17-20.
Wen Y L, Xie Z X, Huang Q, *et al.* Epitope and codon preference analysis of avian adenovirus type 1 and type 4 Hexon proteins [J]. Progress in Animal Medicine, 2007, 28(11): 17-20.
- [12] 刘延珂,万文妍,王贝贝,等. 禽腺病毒 4 型抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2017(11): 902-906.
Liu Y K, Wan W Y, Wang B B, *et al.* Establishment of an indirect ELISA method for detection of avian adenovirus type 4 antibody [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017(11): 902-906.
- [13] 国纪奎,刁有祥. I 群禽腺病毒山东株的分离鉴定及 Hexon 基因的克隆与分析 [C]//中国畜牧兽医学学会 2011 学术年会, 2011: 1773-1777.
Guo J L, Diao Y X. Isolation and identification of avian adenovirus I strain from Shandong province and cloning and analysis of Hexon gene [C]//2011 Annual Meeting of Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Science, 2011:1773-1777.
- [14] 吴焯挺. 禽腺病毒 4 型的分离鉴定及毒种免疫原性研究

- [D]. 内蒙古农业大学, 2017.
- Wu Y T. Isolation and identification of avian adenovirus type 4 and study on its immunogenicity [D]. Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [15] Ye J, Liang G, Zhang J, *et al.* Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2016, 5(5): e50.
- [16] 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): e0133073.
- [17] 汪凯, 蔡晓垚, 叶建强, 等. 新型鸡心包炎—包涵体肝炎病毒的分离及鉴定 [J]. *中国动物传染病学报*, 2016, 24(4): 1-6.
- Wang K, Cai X J, Ye J Q, *et al.* Isolation and identification of novel chicken pericarditis -- inclusion body hepatitis virus [J]. *Chinese Journal of Zoonotic Diseases*, 2016, 24(4): 1-6.
- [18] 赵静, 冯金玲, 靳继惠, 等. 2016 年鸡重要疫病流行动态分析 [J]. *中国家禽*, 2016, 38(12): 69-72.
- Zhao J, Feng J L, Jin J H, *et al.* Dynamics analysis of important chicken epidemic in 2016 [J]. *China Poultry*, 2016, 38(12): 69-72.
- [19] 吴爱华. 禽腺病毒流行与危害 [J]. *中国畜禽种业*, 2018, 14(9): 160-161.
- Wu A H. Prevalence and harm of avian adenovirus [J]. *China Livestock and Poultry Seed Industry*, 2018, 14(9): 160-161.
- [20] Teng Z, 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.
- [21] Yu B, Dong J, Wang C, *et al.* Characteristics of neutralizing antibodies to adenovirus capsid proteins in human and animal sera [J]. *Virology*, 2013, 437(2): 118-123.

(编辑:李文平)