

## 研究报告

## 一株樱桃谷鸭源鸭腺病毒 B2 毒株的分离与鉴定

江丹丹<sup>#1,3</sup>, 郭博伦<sup>#1,2</sup>, 程晓霞<sup>1,3</sup>, 林昶<sup>1</sup>, 游广炬<sup>1,3</sup>, 肖世峰<sup>1,3</sup>, 朱小丽<sup>1,3</sup>, 王劭<sup>1,3</sup>, 陈少莺<sup>\*1,3</sup>, 陈仕龙<sup>\*1,3</sup>

- 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013
- 福建农林大学 动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002
- 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013

江丹丹, 郭博伦, 程晓霞, 林昶, 游广炬, 肖世峰, 朱小丽, 王劭, 陈少莺, 陈仕龙. 一株樱桃谷鸭源鸭腺病毒 B2 毒株的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3581-3596.

JIANG Dandan, GUO Bolun, CHENG Xiaoxia, LIN Chang, YOU Guangju, XIAO Shifeng, ZHU Xiaoli, WANG Shao, CHEN Shaoying, CHEN Shilong. Isolation and identification of a duck adenovirus B2 strain from Cherry Valley ducks[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3581-3596.

**摘要:**【背景】2014 年以来, 鸭腺病毒(duck adenovirus, DAdV) B2 感染引起的番鸭“白肝病”在我国番鸭群广泛流行, 其他品种肉鸭未见发病, 本研究发现两起樱桃谷鸭疑似“白肝病”的病例。【目的】鉴定樱桃谷鸭“白肝病”的病原。【方法】对送检鸭的肝脏等内脏样品进行 PCR 或 RT-PCR 检测、病原分离鉴定、序列测定及动物回归试验。【结果】内脏组织 PCR 检测 DAdV B2 阳性, 并成功分离到一株 DAdV B2 毒株, 命名为 DAdV B2/BG19。该分离株 BG19 感染的鸡肝癌细胞(leghorn male hepatoma cell line, LMH)变大变圆、最后崩解, 形成特征性细胞病变。分离株 BG19 有 2 个 *fiber* 基因, 主要功能基因如 *hexon*、*fiber 1*、*fiber 2* 及 DNA polymerase 基因与国内 DAdV B2 分离株核苷酸相似性均达 98.26%以上, 与 DAdV B1 代表株 GR 对应基因的核苷酸相似性分别为 77.12%、30.8%、34%和 99.78%; 所有 DAdV B1 和 DAdV B2 分离株的 DNA polymerase 基因处于同一个进化分支; 分离株 BG19 的 *ORF67* 基因从起始密码子往后的第 133 位碱基为 T, 造成提早产生终止密码子, 导致 *ORF67* 基因编码蛋白比国内早前流行代表株 CH-GD-12-2014 少了 14 个氨基酸。分离株 BG19 人工感染 2 日龄樱桃谷鸭和番鸭的发病率分别为 50.0%和 87.5%, 死亡率分别为 12.5%和 37.5%, 病死鸭可见与自然感染病例相似的临床症状和病理变化。【结论】从樱桃谷鸭白肝病病例成功分离鉴

资助项目: 福建省农业科学院“5511”协同创新工程(XTCXGC2021018, XTCXGC2021012); 福建省农业科学院创新团队项目(CXTD2021034); 福建省农业科学院科技专项(ZYTS202421, DWHZ2024-21); 福建省公益类科研院所专项(2019R1026-11)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the Fujian Academy of Agricultural Sciences “5511” Collaborative Innovation Project (XTCXGC2021018, XTCXGC2021012), the Innovation Team Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (CXTD2021034), the Science and Technology Special Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (ZYTS202421, DWHZ2024-21), and the Special Fund of Scientific Research in the Public Interest of Fujian Province (2019R1026-11).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Shaoying, chensy58@163.com; CHEN Shilong, csl6116@163.com

Received: 2024-05-16; Accepted: 2024-07-03; Published online: 2024-07-29

定一株 *ORF67* 蛋白截短表达的 DAdV B2 强毒株, 发现 DAdV B2 能感染樱桃谷鸭。

关键词: 樱桃谷鸭; 白肝病; 鸭腺病毒 B2; 分离鉴定

## Isolation and identification of a duck adenovirus B2 strain from Cherry Valley ducks

JIANG Dandan<sup>#1,3</sup>, GUO Bolun<sup>#1,2</sup>, CHENG Xiaoxia<sup>1,3</sup>, LIN Chang<sup>1</sup>, YOU Guangju<sup>1,3</sup>, XIAO Shifeng<sup>1,3</sup>, ZHU Xiaoli<sup>1,3</sup>, WANG Shao<sup>1,3</sup>, CHEN Shaoying<sup>\*1,3</sup>, CHEN Shilong<sup>\*1,3</sup>

1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian, China

2 College of Animal Science (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou 350013, Fujian, China

**Abstract:** **[Background]** Pale liver disease caused by duck adenovirus B2 (DAdV B2) infection has been widely prevalent in Muscovy duck flocks in China since 2014, and no incidence has been observed in other duck breeds. In this study, two suspected cases of pale liver disease were reported in Cherry Valley ducks. **[Objective]** To identify the causative agent of pale liver disease in Cherry Valley ducks. **[Methods]** PCR or RT-PCR and pathogen isolation were carried out with the internal organ samples of diseases ducks. The isolate was identified, sequenced, and used for the challenge in ducklings. **[Results]** The internal organ samples were DAdV B2 positive, and a strain named DAdV B2/BG19 was successfully isolated. The LMH cells infected with BG19 developed a characteristic cytopathic effect (CPE) with cell enlargement, rounding, and final disintegration. The isolate BG19 carried two *fiber* genes, and its sequences of *hexon*, *fiber-1*, *fiber 2*, and DNA polymerase gene shared the sequence identity above 98.26% with those of the DAdV B2 isolates submitted in GenBank, whereas these genes had the sequence identity of 77.12%, 30.8%, 34%, and 99.78%, respectively, with those of the DAdV B1 isolate GR. All the strains of DAdV B1 and DAdV B2 shared the same clade in the phylogenetic tree built based on DNA polymerase gene. The mutation G133T in the *ORF67* gene of BG19 resulted in a premature stop codon, which led to a truncated *ORF67* protein 14 residues shorter than that of previous prevalent strain CH-GD-12-2014. BG19 was pathogenic to 2-day-old Cherry Valley ducklings and Muscovy ducklings, with the morbidities of 50.0% and 87.5% and the mortalities of 12.5% and 37.5%, respectively. The clinical symptoms and pathological changes of dead ducks were similar to those of clinical cases. **[Conclusion]** A highly virulent strain of DAdV B2 with truncated *ORF67* protein expression was successfully isolated and identified from a case of pale liver disease in Cherry Valley ducks. This was the first report about the pathogenicity of DAdV B2 in Cherry Valley ducks.

**Keywords:** Cherry Valley duck; pale liver disease; duck adenovirus B2; isolation and identification

危害肉鸭的腺病毒主要有鸭腺病毒 A 型 (duck adenovirus A, DAdV A)、禽腺病毒 4 型 (fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4) 和鸭腺病毒 B 型 (duck adenovirus B, DAdV B)。DAdV A 的代表株为 DAdV-1, 也称为产蛋下降综合征病毒 (egg drop syndrome virus, EDSV), 是富 AT 碱基腺病毒属的成员。禽腺病毒血清 4 型 (FAdV-4) 主要造成肉鸭的肝炎-心包积液综合征 (hepatitis and hydropericardium syndrome, HHS)<sup>[1]</sup>。DAdV B 型是禽腺病毒属的一个种, 包括 DAdV B1 (DAdV-2) 和 DAdV B2 (DAdV-3) 两个血清型。

DAdV B1 感染最早报道于 1977 年的法国某番鸭场, 表现为 30 多日龄雏番鸭消瘦、跛行、急性死亡, Bouquet 等<sup>[2]</sup>明确病原为腺病毒, 但经中和试验, 发现该病毒株 GR 与已知禽腺病毒血清型都不相同; 2014 年, Marek 等<sup>[3]</sup>测定了 DAdV-2 GR 株全基因序列, 建议列入鸭腺病毒 B 型, 得到了国际病毒学分类委员会的采纳。

2014 年以来, 我国雏番鸭群新发一种俗称“白肝病”的新疫病, 其主要特征为肝脏肿大、发白、表面斑驳状广泛出血, 脾脏肿大, 肾脏大出血<sup>[4-7]</sup>, 其病原是一种与 DAdV-2 GR 株核苷酸序列高度同源的鸭腺病毒。我国学者根据国内分离株含有 2 个纤维基因 (*fiber 1* 和 *fiber 2*), 而 GR 株只有 1 个纤维基因 (*fiber*), 将国内分离株命名为鸭 II 型腺病毒、DAdV-2、DAdV-2 变异株或 DAdV-3 等<sup>[4-8]</sup>。DNA polymerase 基因差异及遗传距离是腺病毒分类的重要依据, 我们团队发现番鸭“白肝病”分离的番鸭腺病毒 DNA polymerase 基因与 GR 株的氨基酸相似性在 99% 以上, 遗传距离小于 0.004, 并且处在一个单独的遗传进化分支, 但国内株和国外株抗原交叉中和活性和关键致病基因存在差异<sup>[9]</sup>, 因此, 我们建议将番鸭“白肝病”分离的番鸭腺病毒称为鸭腺病毒 B 血清 2 型或基因 2 型 (DAdV B2),

而 DAdV-2 GR 株为鸭腺病毒 B 血清 1 型或基因 1 型 (DAdV B1)<sup>[9-10]</sup>。

临床仅有番鸭感染 DAdV B2 的报道, 其他品种鸭未见发病。Shi 等发现 *ORF67* 基因从起始密码子往后第 133 位碱基突变, 造成提早产生终止密码子的 DAdV B2 突变株的致病性更强<sup>[11]</sup>。2019 年, 本实验室发现 2 份樱桃谷鸭疑似白肝病病料, 本文开展了病原分离鉴定研究, 以期确定樱桃谷鸭“白肝病”的病原, 为 DAdV B2 遗传进化及致病差异研究提供素材和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料处理

2 份疑似“白肝病”病死的樱桃谷鸭病料由福建省农业科学院畜牧兽医研究所畜禽疾病诊疗中心送检。取适量肝、脾、肾组织与无菌 Hank's 缓冲液充分匀浆, 制成 1:4 组织悬液, 反复冻融 3 次, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清经 0.22 μm 滤器过滤除菌, 分装后于 -80 °C 冻存备用。

### 1.2 病毒、细胞及试验动物

DAdV B2 分离株 BG61 由本团队分离、鉴定、保存<sup>[9]</sup>; 鸡肝癌细胞 (leghorn male hepatoma cell line, LMH), 广州昂飞生物科技有限公司; 2 日龄健康樱桃谷鸭、番鸭, 漳州某肉鸭养殖场, 经 ELISA 检测挑选 DAdV B2 抗体为阴性的鸭用于感染试验。

### 1.3 主要试剂和仪器

病毒 DNA/RNA 提取试剂盒、胶回收提取试剂盒和质粒 DNA 小提试剂盒, 南京诺唯赞科技有限公司; 一步法 RT-PCR 试剂盒, 北京全式金生物技术股份有限公司; DL2000 DNA Marker、DL5000 DNA Marker 和 pMD18-T Vector, 宝生物工程(大连)有限公司; Super GelBlue™ 核酸染料, 苏州优逸兰迪生物科技有限公司; 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 生工生物工程(上海)股份有限公司;

DMEM, CORNING 公司; Dream Taq Green PCR 预混液(2×)和 TRYPsin 0.25% EDTA, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 胎牛血清, Sigma 公司; 2×T5 Super PCR Mix (Colony), 北京擎科生物科技股份有限公司。梯度 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

#### 1.4 引物设计及合成

参考 GenBank 中 DAdV B2 分离株 GTL (MN551586)和分离株 CH-GD-12-2014 (KR135164) 的基因组序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 *hexon*、*fiber 1*、*fiber 2* 和 DNA polymerase 基因的全基因扩增引物, 其中 DNA polymerase 全基因序列分 3 段进行扩增(表 1), 参照文献[10] 合成检测 DAdV B2 *fiber 1* 基因的特异性引物, 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

#### 1.5 PCR 或 RT-PCR 检测

取 200 μL 1.1 中的匀浆上清, 按照病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取病毒核酸。以提取的核酸为模板, 按照对应参考文献的引物, 对番鸭小鹅瘟病毒(Muscovy duck-origin goose parvovirus, MDGPV)<sup>[12]</sup>、番鸭细小病毒(Muscovy

duck parvovirus, MDPV)<sup>[12]</sup>、鸭腺病毒 B1 (duck adenovirus B1, DAdV-B1)<sup>[10]</sup>、鸭腺病毒 B2 (duck adenovirus B2, DAdV-B2)<sup>[10]</sup>、禽 4 型腺病毒(fowl adenovirus serotype 4, FAdV-4)<sup>[11]</sup>进行 PCR 检测, 对鸭副黏病毒(duck paramyxovirus, PMV)<sup>[13]</sup>、鸭肝炎病毒(duck hepatitis A virus-1/-3, DHAV-1/-3)<sup>[14]</sup>、禽坦布苏病毒(avian Tembusu virus, ATMUV)<sup>[15]</sup>、番鸭呼肠孤病毒(Muscovy duck reovirus, MDRV)<sup>[16]</sup>和新型呼肠孤病毒(novel duck reovirus, NDRV)<sup>[17]</sup>进行 RT-PCR 检测; PCR 反应体系(20 μL): Dream Taq Green PCR 预混液(2×) 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 按照各自文献中的引物退火温度退火 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。按照文献[18-19]合成真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACC TGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTATT GATATGC-3'), 以及细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')进

表 1 引物序列信息表

Table 1 The information of primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	产物大小 Product size (bp)
DAdV-B2-fiber 1-F	TATCCCTACTGGTGGCCCTC	59.9	581
DAdV-B2-fiber 1-R	TCAGTGGCTGCGTACACTTT		
hexon-F	ATGGCCGCTCTGACCCCTGACTT	63.7	2 814
hexon-R	TTACACCGCGTTACCTGTAGCG		
fiber 1-F	ATGCTCTGTCCGTTTAGATT	54.1	1 380
fiber 1-R	TTATACAATCTTCGCTAGGTAC		
fiber 2-F	ATGAAACGGACCAACAGATC	55.5	1 443
fiber 2-R	CTAATTAACATTTGATGGGTTGCT		
DNA polymerase-1-F	ATGGATTCCGACGATCCGAACA	59.2	1 397
DNA polymerase-1-R	TCGGACATGGTATTGATGCCTT		
DNA polymerase-2-F	CAAGGAGGACTATCCCAAAG	56.8	1 462
DNA polymerase-2-R	CTGAAAGAGCGAATTGATGG		
DNA polymerase-3-F	ACAAGACTTAACCAAAGACGACC	58.5	1 459
DNA polymerase-3-R	TTAGATGGACCATTCATGGTTGTC		
ORF67-F	ATGTACGCAATTCCATTCTCA	49.8	174
ORF67-R	GTTACAAATTAACCTTTTGAA		

行 PCR 检测, PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ T5 Super PCR Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  100 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 排查感染情况。

## 1.6 病毒的分离与鉴定

参考 Shi 等方法<sup>[11]</sup>取 DAdV B2 为阳性的匀浆经过滤后接种于单层 LMH 细胞, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中吸附 1 h 后吸弃接毒液, 加入维持液培养, 同时设置阴性对照。连续观察细胞 7 d, 当出现 80% 以上细胞病变(cytopathic effect, CPE)时收获细胞病毒液, 反复冻融 3 次, 在 LMH 细胞中盲传 5 代。

## 1.7 分离株部分关键基因的扩增和序列分析

取 200  $\mu\text{L}$  1.6 中的 F5 代细胞病毒液, 按照病毒 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取病毒核酸, 以提取的核酸为模板, 按照表 1 中的引物对 hexon-F/R、fiber 1-F/R、fiber 2-F/R、DNA polymerase-1-3-F/R、ORF67-F/R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): Dream Taq Green PCR 预混液(2 $\times$ ) 25  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 17.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1.25  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), DNA 模板 5  $\mu\text{L}$ 。回收目的片段, 连接到 pMD18-T Vector, 提取质粒后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。从 GenBank 下载禽腺病毒相关基因的氨基酸序列, 利用 DNASTar MegAlign 软件对测序结果进行相似性及遗传进化分析, 利用 MEGA 7.0 邻接(neighbor-joining)法运算 1 000 次, 构建基因的氨基酸系统发育树。

## 1.8 动物试验

将第 5 代细胞病毒液继续传代培养至第 10 代, 用无血清的培养基进行 10 倍梯度稀释后, 接种单层的 LMH 细胞 96 孔板, 每个梯度重复 8 孔, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 同时设置阴性对照, 再置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养, 按照 Karber 方法<sup>[20]</sup>

测定病毒半数细胞培养物感染量(50% tissue culture infectious dose, TCID<sub>50</sub>)。2 日龄樱桃谷鸭和番鸭分别分为攻毒组和对照组, 每组 8 羽, 攻毒组每羽通过腿肌注射 0.5 mL 的第 10 代细胞毒, 对照组每羽注射相同剂量的无菌 Hank's 液, 每组隔离饲养, 每天记录各组鸭的临床表现, 记录 14 d, 同时在 7 d 和 14 d 称重并记录。对死亡鸭及时解剖, 记录剖检病理变化, 无菌采集病死鸭的肝脏、脾脏和肾脏组织, 按照文献[10] DAdV-B2 的特异性引物(fiber 1-F/R)进行 PCR 检测, PCR 反应体系和条件同 1.5。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 检测结果

对 2 份临床样品进行水禽常见的病毒、真菌和细菌的病原 PCR 或 RT-PCR 检测, 仅感染 DAdV B2 (图 1)。其他病毒如番鸭小鹅瘟病毒、番鸭细小病毒、禽 4 型腺病毒、鸭副黏病毒、鸭肝炎病毒、禽坦布苏病毒、番鸭呼肠孤病毒和新型呼肠孤病毒核酸检测均为阴性; 用细菌 16S rRNA 基因通用引物检测到 1 506 bp 的阳性条带(图略), 经测序比对细菌为大肠杆菌, 而真菌通用引物 PCR 扩增为阴性, 初步判断 2 份临床样品为 DAdV B2 感染合并细菌感染。

### 2.2 病毒的分离与鉴定结果

将 2 份阳性病料上清液接种于单层 LMH 细胞, 其中一份盲传 5 代无 CPE (图 2A), 另一份在第 3 代出现典型的 CPE (图 2B), 在感染 72–120 h 后出现明显的细胞病变, 表现为细胞逐渐变圆变大, 折光性增强, 间距增大, 部分细胞聚成不规则葡萄状, 最后细胞崩解死亡。细胞毒连续传 5 代后细胞病变稳定, 将收获的第 5–10 代细胞病毒液进行 PCR 检测, 显示为 DAdV B2 阳性, 结果表明成功分离到一株 DAdV B2, 命名为 DAdV B2/BG19, 简称 BG19。

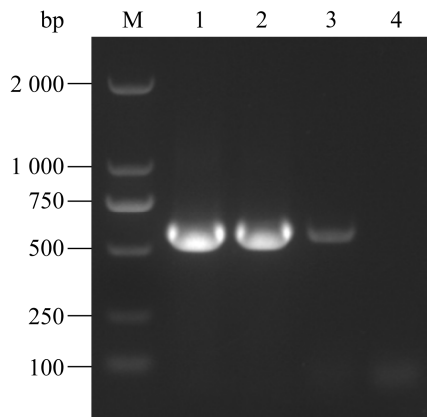


图1 临床样品的PCR检测 M: DL2000 DNA Marker; 1: DAdV B2分离株BG61; 2-3: 临床样品; 4: 阴性对照

Figure 1 PCR detection of the clinical samples. M: DL2000 DNA Marker; 1: DAdV B2/BG61 positive control; 2-3: Clinical samples; 4: Negative control.

### 2.3 分离株部分关键基因的扩增和序列分析结果

提取分离株BG19的病毒DNA,用PCR扩增 *hexon*、*fiber 1*、*fiber 2*、DNA polymerase 基因和 *ORF67* 基因,如图3所示,在2 814 bp处

出现 *hexon* 基因目的条带,在1 400 bp附近出现 *fiber 1*、*fiber 2* 及分段扩增的3条DNA polymerase 基因目的条带,在174 bp处出现 *ORF67* 基因目的条带,条带与预期大小一致。

对目的片段进行测序及拼接,用MegAlign软件比对,BG19的DNA polymerase 基因与国内DAdV B2毒株核苷酸及氨基酸的相似性分别为99.82%–100%和99.68%–100%,与GR株的核苷酸及氨基酸的相似性分别为99.78%和99.55%。用MEGA构建系统发育树显示,所有鸭腺病毒B毒株在DNA polymerase 基因处于同一个进化分支(图4)。

分离株BG19与DAdV B1法国GR株 *hexon* 核苷酸及氨基酸相似性分别为77.12%和86.33%,与国内DAdV B2分离株(TZ193、GMH、GTL、FJGT01和CH-GD-12-2014株等)的亲缘关系最近,核苷酸相似性为99.82%–100%。系统发育树显示,国内DAdV B2分离株在 *hexon* 基因处于一个小进化分支,法国GR株处于另一个小进化分支(图5)。

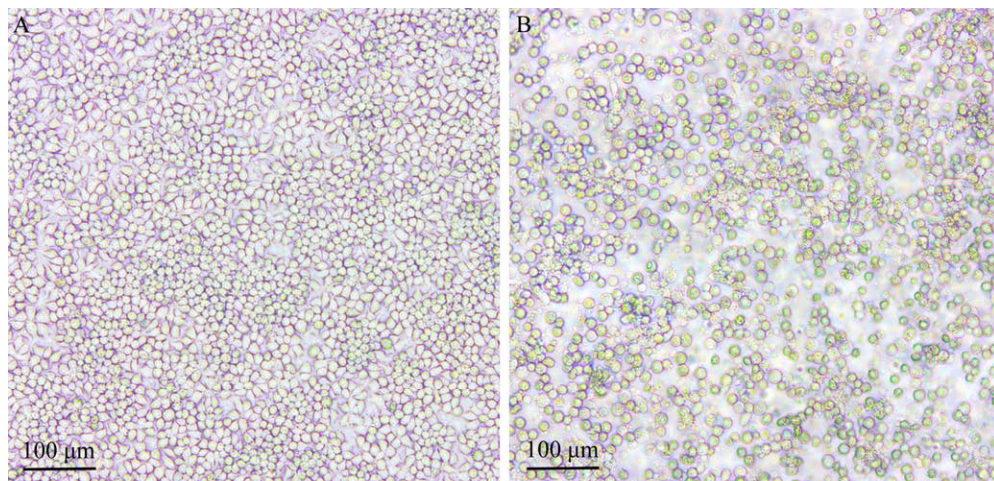


图2 LMH细胞的细胞病变(100×) A: 正常LMH细胞; B: DAdV B2/BG19接种LMH细胞4 d后的致细胞病变效应

Figure 2 Cytopathic effect of the infected LMH cells (100×). A: Uninfected LMH cell; B: CPE of LMH cells after inoculated with DAdV B2/BG19 for 4 days.



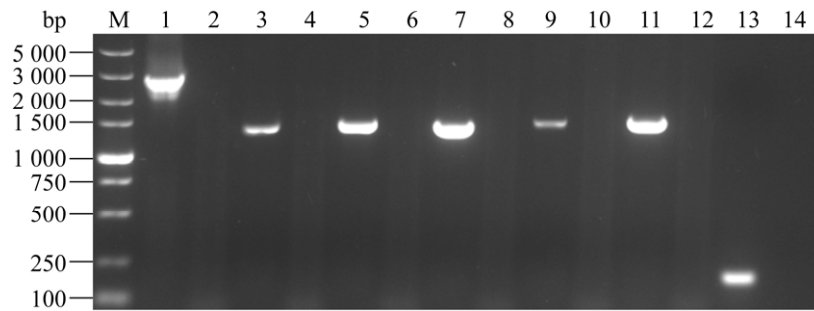


图3 分离株 BG19 的部分关键基因的 PCR 扩增结果 M: DL5000 DNA Marker; 1: *hexon*; 2: *hexon* 的阴性对照; 3: *fiber 1*; 4: *fiber 1* 的阴性对照; 5: *fiber 2*; 6: *fiber 2* 的阴性对照; 7: *DNA polymerase-1*; 8: *DNA polymerase-1* 的阴性对照; 9: *DNA polymerase-2*; 10: *DNA polymerase-2* 的阴性对照; 11: *DNA polymerase-3*; 12: *DNA polymerase-3* 的阴性对照; 13: *ORF67*; 14: *ORF67* 的阴性对照

Figure 3 The amplification results of some key genes of BG19 isolate. M: DL5000 DNA Marker; 1: *hexon*; 2: Negative controls of *hexon*; 3: *fiber 1*; 4: Negative control of *fiber 1*; 5: *fiber 2*; 6: Negative control of *fiber 2*; 7: *DNA polymerase-1*; 8: Negative control of *DNA polymerase-1*; 9: *DNA polymerase-2*; 10: Negative control of *DNA polymerase-2*; 11: *DNA polymerase-3*; 12: Negative control of *DNA polymerase-3*; 13: *ORF67*; 14: Negative control of *ORF67*.

分离株 BG19 的 *fiber 1* 基因与国内 DAdV B2 分离株的核苷酸相似性为 98.26%–100%，由于 DAdV B1 GR 株仅有 1 个 *fiber* 基因，BG19 与 GR 株的 *fiber 1* 基因核苷酸相似性只有 30.8% (图 6)。BG19 *fiber 2* 基因与国内 DAdV B2 毒株的核苷酸相似性为 99.93%–100%，但与 GR 株的相似性只有 34% (图 7)。系统发育树显示国内 DAdV B2 分离株的 *fiber 1* 和 *fiber 2* 毒株与 GR 株处于不同的进化分支(图 6 与图 7)。

相较于国内最早流行的代表株 CH-GD-12-2014, 分离株 BG19 的 *ORF67* 基因在第 41 nt 位置碱基由 C 到 A 的突变, 即从起始密码子往后第 133 位碱基由 G 突变为 T, 造成提早产生终止密码子 TGA, 导致 *ORF67* 蛋白较国内早前流行毒株少了 14 个氨基酸, 这种突变与致病性增强的 TZ193 等毒株在 *ORF67* 上突变位置相同, 因此 BG19 为 *ORF67* 突变株(图 8)。

## 2.4 动物回归试验

第 10 代 LMH 细胞毒的  $TCID_{50}$  毒价为  $10^{-5.125}/0.1$  mL, 将其用于雏鸭感染试验。2 日

龄樱桃谷鸭经腿肌攻毒后第 3 天开始出现精神沉郁(图 9A), 食欲不振, 第 4 天出现死亡, 剖检可见肝脏肿大、表面有弥漫性出血点, 脾脏肿大, 肾肿大出血(图 9B–9D), 发病率为 50.0%, 死亡率为 12.5% (图 10)。采集死亡鸭肝、脾等内脏按照 1.5 的方法进行 PCR 检测, 结果仅 DAdV B2 为强阳性。2 日龄雏番鸭攻毒后第 2 天开始发病, 出现精神萎靡, 食欲不振(图 9E), 第 3 天开始死亡, 发病率在 87.5%, 死亡率为 37.5% (图 10); 死亡鸭剖检可见肝脏肿大、发白, 脾脏肿大, 肾脏有出血点(图 9F–9H); 樱桃谷鸭内脏病理切片显示肝、脾、肾组织均出现大量病理损伤, 肝细胞肿大、脂肪样变性、炎性细胞浸润(图 9I), 脾淋巴细胞减少, 骨髓和红髓界限不清(图 9J), 肾小管细胞变性、上皮细胞脱离基底层, 产生脱落、炎性细胞浸润(图 9K)。死亡鸭内脏 PCR 检测 DAdV B2 为强阳性, 病变与自然感染病例症状相同, 确认樱桃谷鸭白肝病的病原是 DAdV B2。雏番鸭的发病率和死亡率高于雏樱桃谷鸭, 攻毒耐过鸭的体重增长受到显著抑制(表 2)。

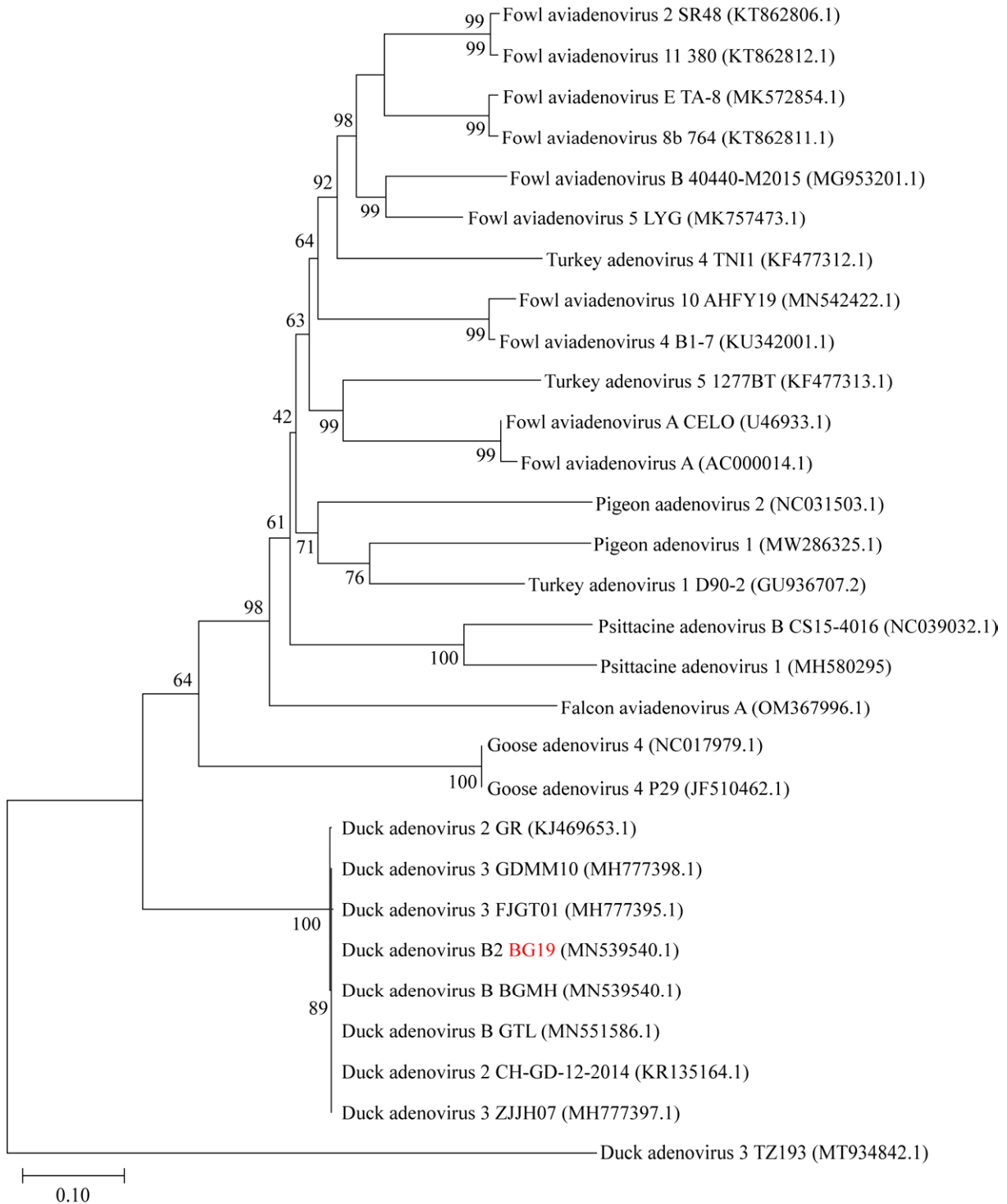


图4 DNA polymerase 基因系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号;分支点上的数字表示置信度;标尺表示进化距离单位

Figure 4 Phylogenetic tree of DNA polymerase gene. The serial number in parentheses is the GenBank accession number; Branch point number indicates confidence; Scale indicates evolution distance.



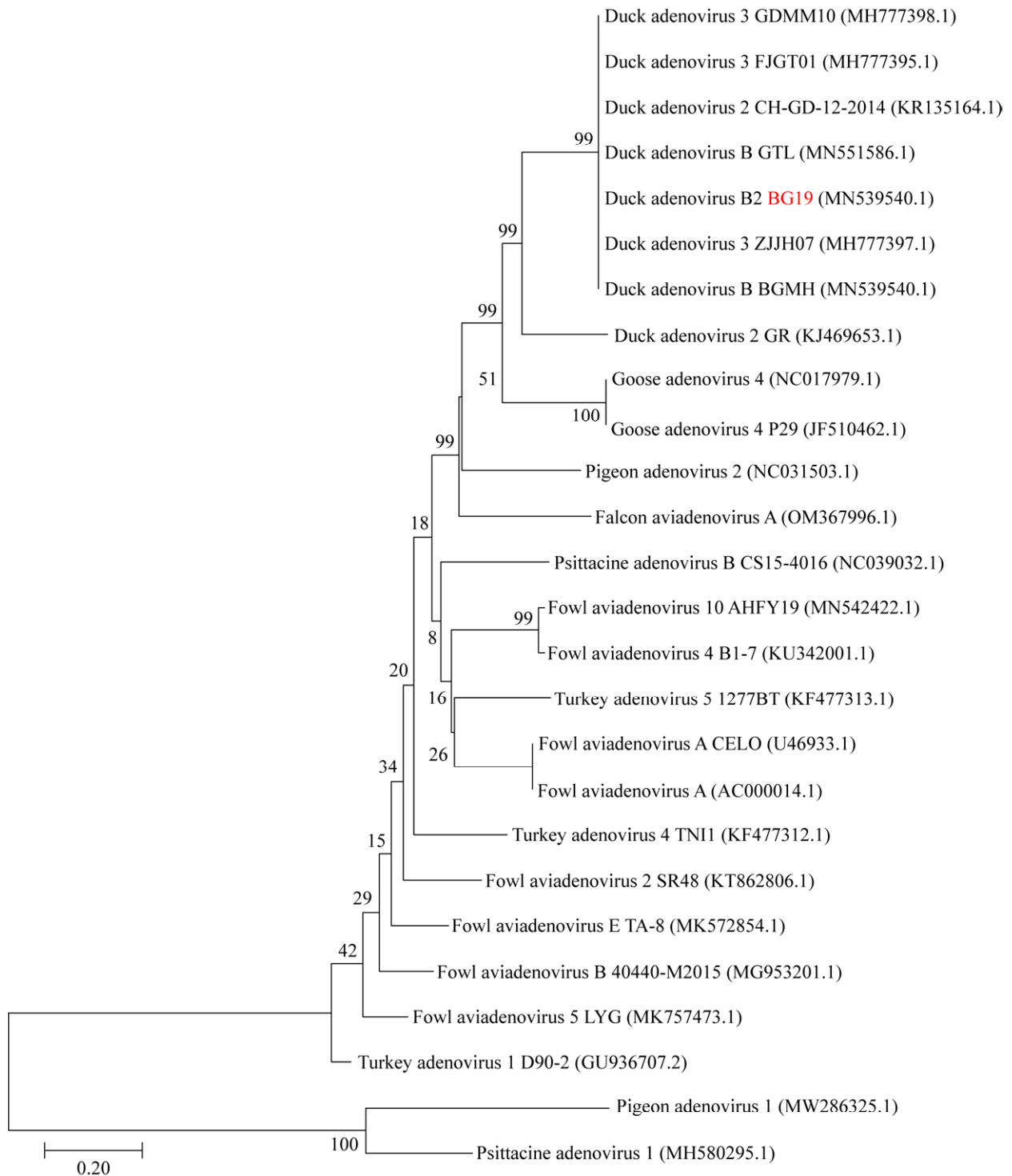


图 5 *hexon* 基因系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号；分支点上的数字表示置信度；标尺表示进化距离单位

Figure 5 Phylogenetic tree of *hexon* gene. The serial number in parentheses is the GenBank accession number; Branch point number indicates confidence; Scale indicates evolution distance.

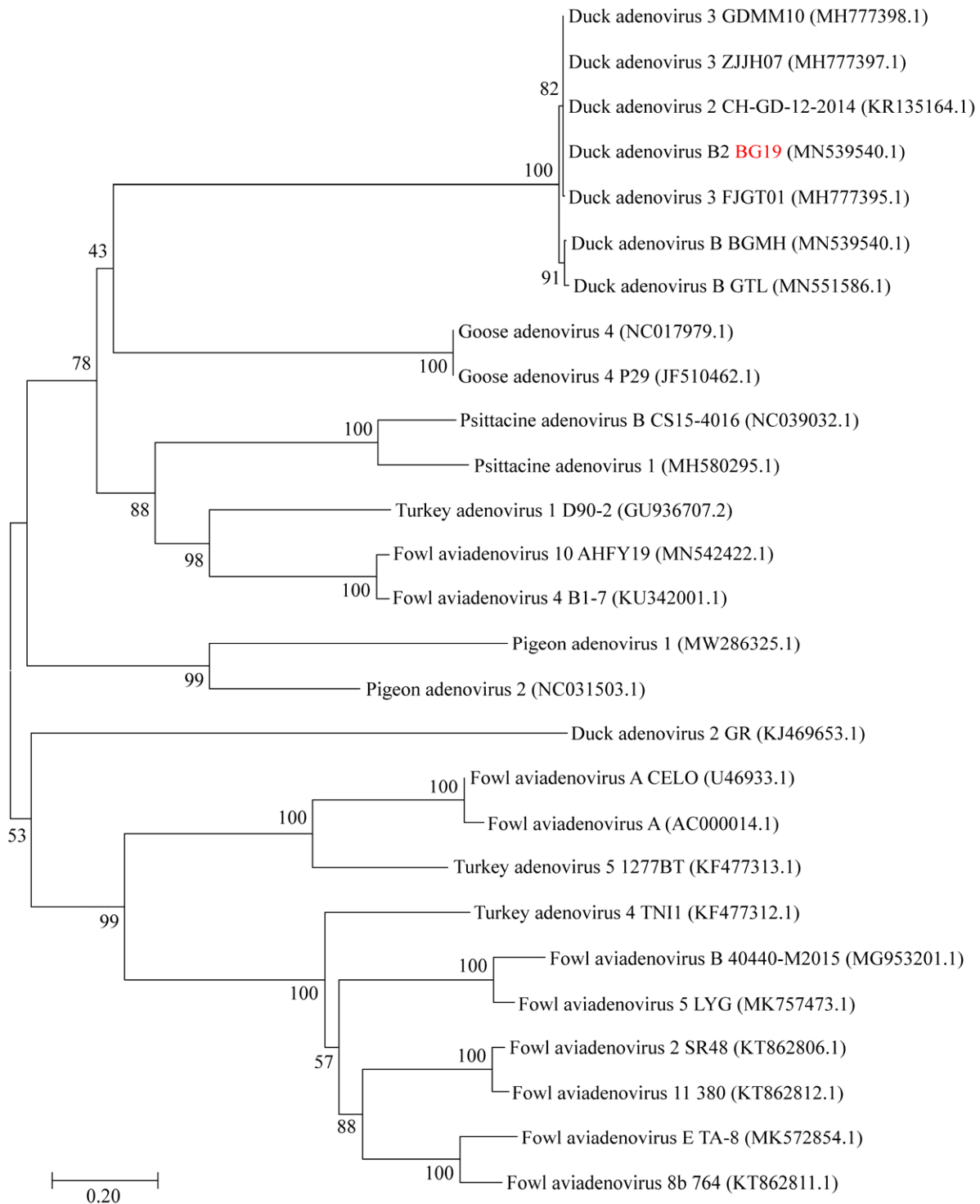


图 6 *fiber 1* 基因系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示置信度; 标尺表示进化距离单位

Figure 6 Phylogenetic tree of *fiber 1* gene. The serial number in parentheses is the GenBank accession number; Branch point number indicates confidence; Scale indicates evolution distance.

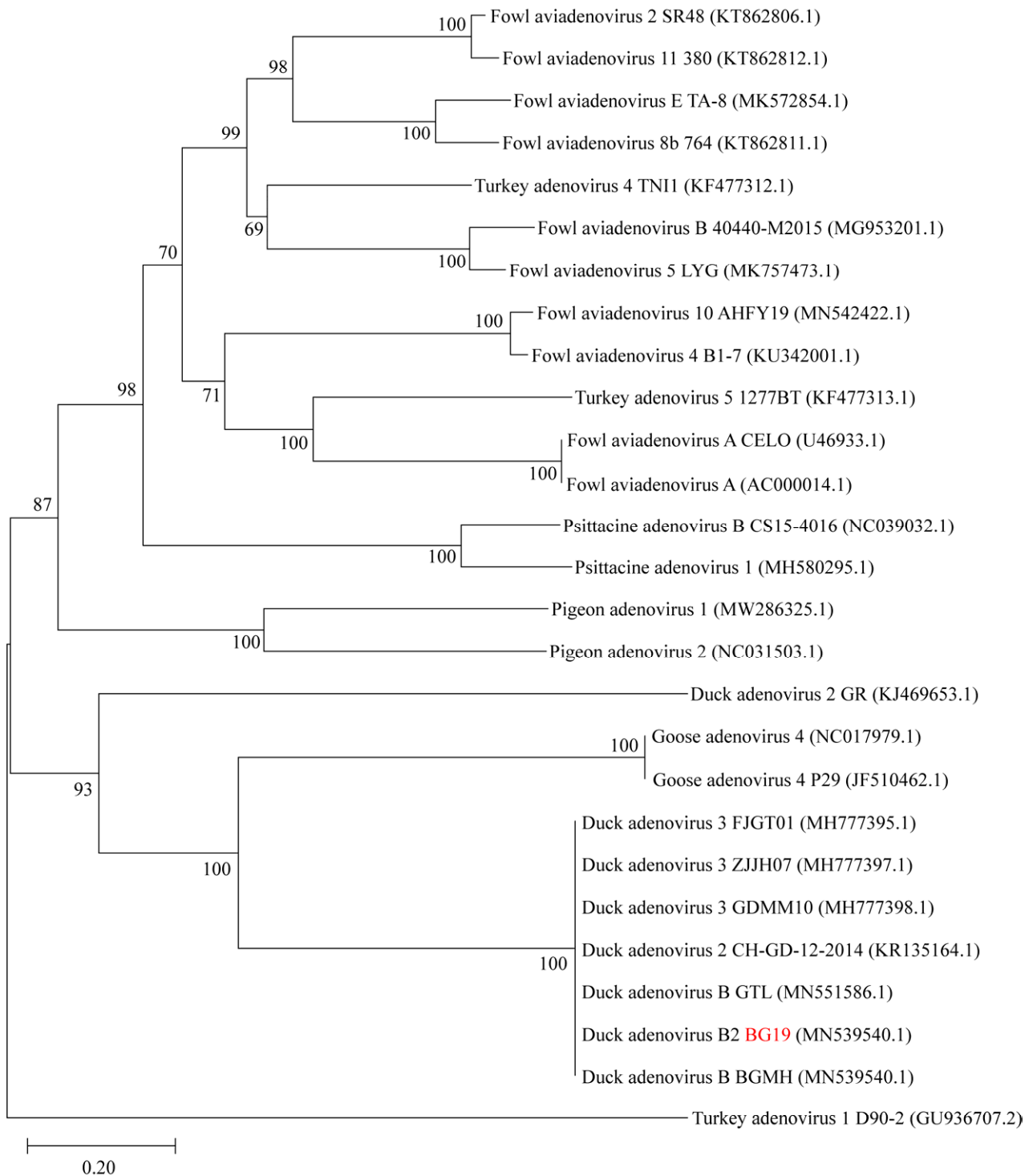


图 7 *fiber 2* 基因系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示置信度; 标尺表示进化距离单位

Figure 7 Phylogenetic tree of *fiber 2* gene. The serial number in parentheses is the GenBank accession number; Branch point number indicates confidence; Scale indicates evolution distance.

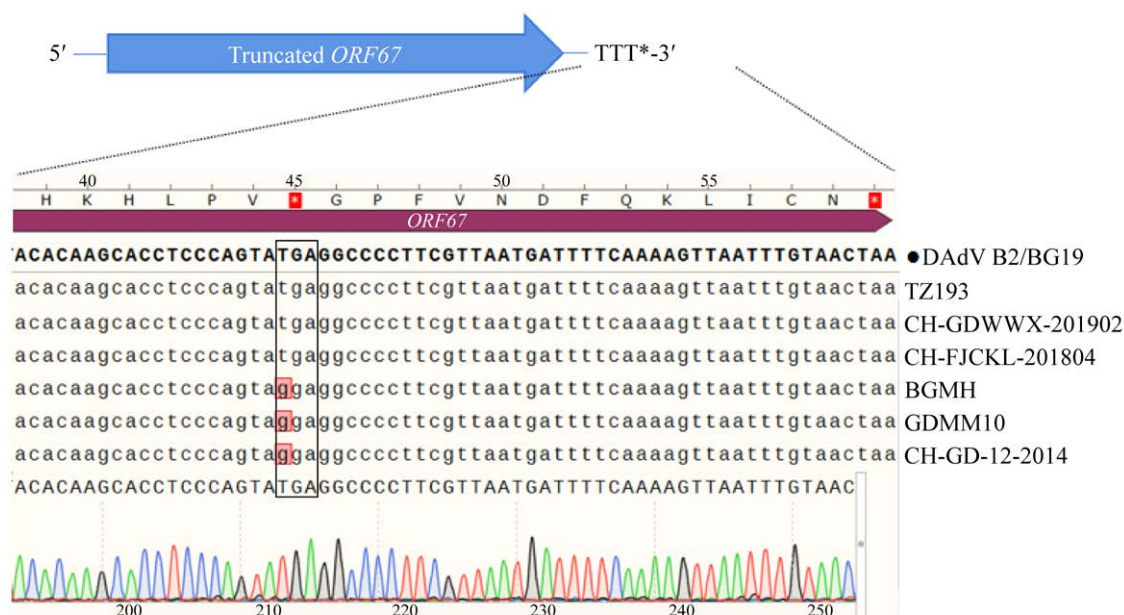


图8 *ORF67* 基因比对图 TZ193、CH-FJCKL-201804、CH-GDWXX-201902 与本分离株 BG19 均为 *ORF67* 蛋白截短表达的突变株, BGMH、GDMM10 和 CH-GD-12-2014 为 *ORF67* 基因未突变毒株, 黑色框是点突变区

Figure 8 Map of *ORF67* gene alignment. TZ193, CH-FJCKL-201804, CH-GDWXX-201902 and DAdV B2/BG19 were mutant strains with truncated expression of *ORF67*. BGMH, GDMM10 and CH-GD-12-2014 were *ORF67* unmutated strains. The mutation region was highlighted in the black box.

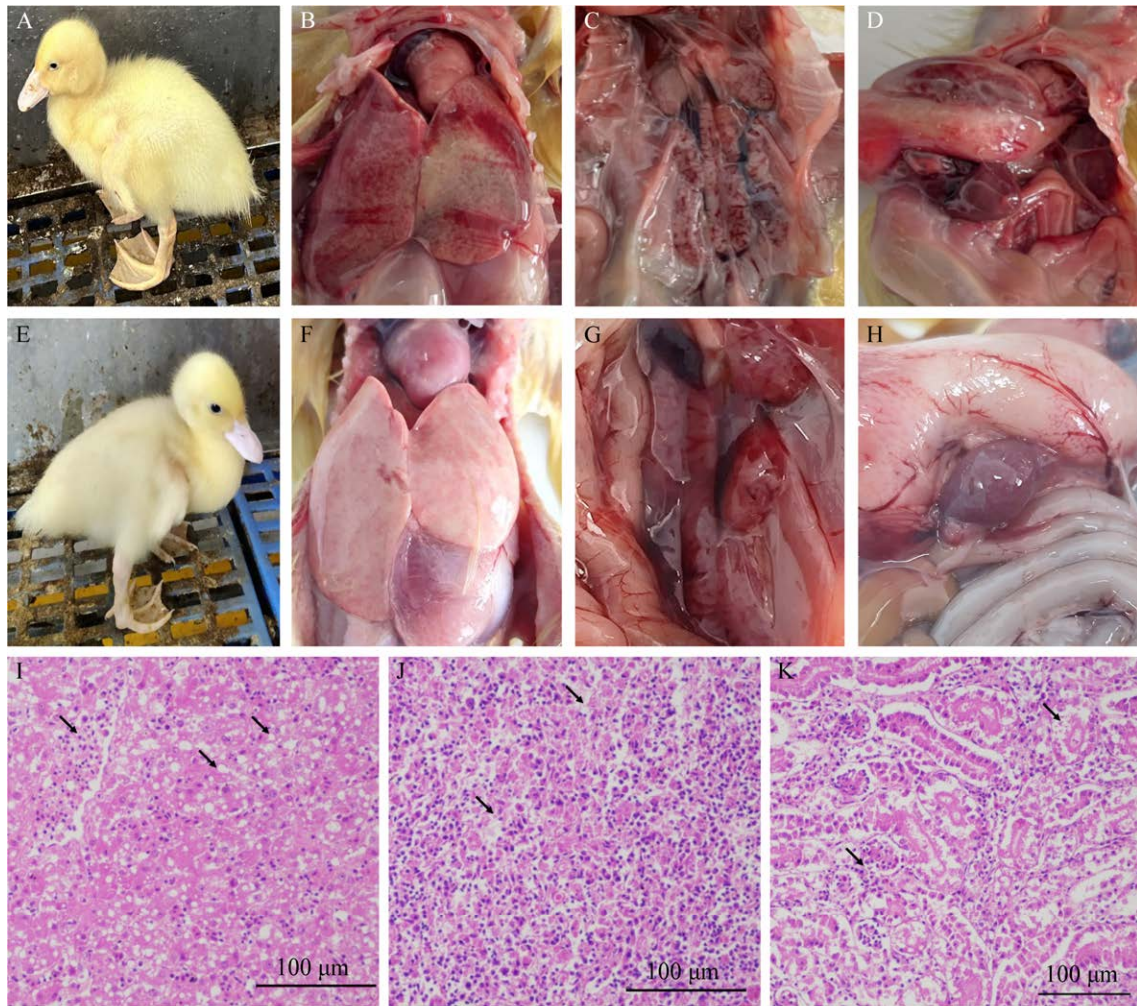
### 3 讨论与结论

鸭腺病毒(duck adenovirus, DAdV)是一种无囊膜的线状双链 DNA 病毒,呈二十面体立体对称结构,病毒 DNA 包裹于蛋白衣壳内,衣壳由 252 个衣壳粒组成,其中 240 个衣壳粒是六邻体蛋白(hexon),12 个是五邻体复合物,位于顶点处,包括五邻体蛋白(penton)基底和 1、2 条的纤维蛋白突起(fiber),一般认为纤维蛋白的长度与抗原性有关<sup>[21]</sup>,两种纤维蛋白在介导感染和诱导免疫应答中起重要的作用<sup>[22]</sup>。通常采用鸡胚成纤维细胞(chicken embryo fibroblast cell, CEF)、鸡胚肾细胞(chicken embryo kidney cell, CEK)、雏鸡肾细胞(chicken kidney cell, CK)和鸡胚肝细胞(chicken embryonic liver cell, CEL)

4 种原代细胞分离和增殖禽腺病毒,但原代细胞存在制备烦琐、易污染等缺点,而选择禽源性肝癌细胞 LMH 细胞有较好的增殖效果<sup>[23]</sup>。本团队在前期研究中发现 DAdV B2 在 LMH 细胞中增殖的滴度比在番鸭胚成纤维细胞(Muscovy duck embryo fibroblasts cell, MDEF)高,所以本试验用 DAdV B2 阳性病料匀浆接种 LMH 细胞,成功分离到一株樱桃谷鸭源的 DAdV B2 毒株,命名为 DAdV B2/BG19。

番鸭“白肝病”最早报道于广东,谢青梅团队在 GenBank 提交了 DAdV B2 分离株 CH-GD-12-2014 的全基因序列,其 *ORF67* 基因不存在截短表达<sup>[4]</sup>。此后,国内 DAdV B2 感染在我国广东、福建与广西等番鸭主产区暴发。Yin 等在 2018–2020 年从番鸭感染病例中分离到 12 株





**图 9** 樱桃谷鸭和番鸭人工感染后临床症状及病理变化 A: 樱桃谷鸭攻毒后缩头、精神沉郁; B: 攻毒死亡樱桃谷鸭肝脏弥漫性出血; C: 攻毒死亡樱桃谷鸭肾脏肿大、出血; D: 攻毒死亡樱桃谷鸭脾脏肿大; E: 番鸭攻毒后缩头、精神沉郁; F: 攻毒死亡番鸭肝脏肿大发白; G: 攻毒死亡番鸭肾脏肿大出血; H: 攻毒死亡番鸭脾脏肿大; I-K: 攻毒死亡樱桃谷鸭肝脏、脾脏、肾脏病理变化(400×)

Figure 9 Clinical and pathological changes of Cherry Valley duck and Muscovy duck after artificial infected with BG19. A: Shrunken head and fatigue of challenged Cherry valley duck. B: Liver diffuse hemorrhage of challenge cherry valley duck. C: Kidney enlargement and hemorrhage of challenged Cherry valley duck. D: Spleen enlargement of challenged Cherry valley duck. E: Shrunken head and fatigue of challenged Muscovy duck. F: Pale and hemorrhagic liver of challenged Muscovy duck. G: Kidney enlargement and hemorrhage of challenged Muscovy duck. H: Spleen enlargement of Muscovy duck. I-K: Pathological Changes of liver, Spleen and Kidney in Dead Cherry Valley Ducks (400×).

DAv B2 毒株, 其中 9 株是 *ORF67* 截短表达的突变株<sup>[24]</sup>。2022 年, Shi 等分离到的 7 株 DAv B2 毒株均是 *ORF67* 蛋白截短表达的突变株, 并且发现截短表达的突变株比未截短表达的突变株的

致病性更强<sup>[11]</sup>。然而 Tan 等分离到的 HF-AN-2020 不仅存在 *ORF67* 翻译的提前终止, 还发现 *ORF19B* 有 1 个氨基酸位点差异, *ORF66* 有 2 个氨基酸位点差异<sup>[25]</sup>。本团队也分离到 *ORF67* 基因未突

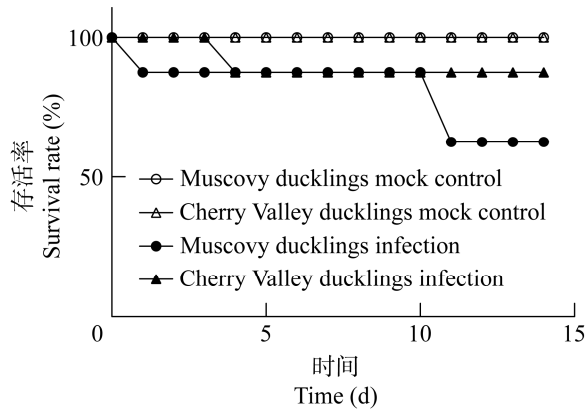


图 10 番鸭和樱桃谷鸭攻毒后的存亡曲线

Figure 10 The survival curve of challenged Muscovy ducks and Cherry Valley ducks.

变的毒株 BG48, BG48 基因组在 *pX* 基因区域中有 3 bp 的插入,在 *ORF19B* 基因区域有 33 bp 的插入,在 *ORF64* 和 *ORF67* 基因区域的交界处有 42 bp 的缺失<sup>[26]</sup>。因此,根据 *ORF67* 基因的差异,国内流行两种 DAdV B2 毒株,并且 *ORF67* 蛋白截短表达突变株已经成为优势流行毒株。

本研究分离鉴定了一株樱桃谷鸭源的 DAdV B2 毒株 BG19,其 *ORF67* 基因第 133 位碱基发生了由 G 到 T 突变,导致 *ORF67* 蛋白比国内以 CH-GD-12-2014 为代表的早前流行毒

株少 14 个氨基酸,是提早产生终止密码子的 *ORF67* 蛋白截短表达突变株。BG19 毒株编码的重要蛋白如 *hexon*、*fiber 1*、*fiber 2* 和 *pX* 与同样是 *ORF67* 截短表达的 TZ193 毒株相比无差异,*ORF64* 和 *ORF67* 之间的非编码区序列也相同;但两毒株 DNA polymerase 基因第 852 nt 碱基不同,对应的氨基酸位点 BG19 毒株为苏氨酸,而 TZ193 毒株为丙氨酸<sup>[11]</sup>。人工感染试验证实 BG19 对雏番鸭和雏樱桃谷鸭均有较强的致病性,并且对雏番鸭致病性更高,表明 *ORF67* 截短表达的毒株可能更容易导致扩宿主感染,这与 Shi 等<sup>[11]</sup>报道 *ORF67* 基因突变株致病性更强的结果一致。由于 DAdV B2 基因组较大,编码蛋白较多,其致病性增强及易感宿主的扩大是否仅与 *ORF67* 基因有关,需要进一步研究证实。Zhang 等<sup>[4]</sup>用分离株 CH-GD-12-2014 感染 1 日龄 SPF 雏鸡,虽然无明显临床症状,但肝脏、肾脏的器官出现病理损伤。曹秀芸等<sup>[27]</sup>发现 DAdV B2 YN 株能够诱导法氏囊与脾脏等免疫器官的细胞凋亡从而影响番鸭免疫功能,增加其他病原的共感染风险,加剧其他病原在番鸭体内的致病性。本研究发现 DAdV B2 对雏樱桃谷鸭也具有致病性,但易感性低于番鸭,表明

表 2 DAdV B2/BG19 分离株对樱桃谷鸭与番鸭的致病性

Table 2 The pathogenicity of DAdV B2/BG19 to Cherry Valley ducklings and Muscovy ducklings

组别 Groups	发病率 Morbidity (%)	死亡率 Mortality (%)	攻毒后 7 d 存活鸭体重 The weight of the surviving ducks at 7 days after infection±SD (g)	攻毒后 14 d 存活鸭体重 The weight of the surviving ducks at 14 days after infection±SD (g)
番鸭对照组 Muscovy duck mock control	0.0	0.0	146.4±25.7	431.3±45.6
雏番鸭攻毒组 Muscovy duck infection	87.5	37.5	127.6±12.6	273.2±67.2*
樱桃谷鸭对照组 Cherry Valley duck mock control	0.0	0.0	261.5±20.7	426.4±27.7
雏樱桃谷鸭攻毒组 Cherry Valley duck infection	50.0	12.5	167.7±17.8*	294.4±31.2*

\*:  $P < 0.05$ .

DAdV B2 在自然界中突变后, 容易跨宿主感染与致病。后续流行病学调查不仅针对番鸭, 也需监视半番鸭、樱桃谷鸭、鸡等禽类带毒及感染情况, 加快疫苗等生物制品的研制, 为该病的综合防控提供技术支持。

## REFERENCES

- [1] YU XL, WANG ZZ, CHEN H, NIU XY, DOU YG, YANG J, TANG Y, DIAO YX. Serological and pathogenic analyses of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) strain in Muscovy ducks[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1163.
- [2] BOUQUET JF, MOREAU Y, McFERRAN JB, CONNOR TJ. Isolation and characterisation of an adenovirus isolated from Muscovy ducks[J]. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 1982, 11(2): 301-307.
- [3] MAREK A, KAJÁN GL, KOSIOL C, HARRACH B, SCHLÖTTERER C, HESS M. Complete genome sequences of pigeon adenovirus 1 and duck adenovirus 2 extend the number of species within the genus *Aviadenovirus*[J]. *Virology*, 2014, 462/463: 107-114.
- [4] ZHANG XH, ZHONG YJ, ZHOU ZH, LIU Y, ZHANG HM, CHEN F, CHEN WG, XIE QM. Molecular characterization, phylogeny analysis and pathogenicity of a Muscovy duck adenovirus strain isolated in China in 2014[J]. *Virology*, 2016, 493: 12-21.
- [5] 陈亮, 黄路生, 刘晓文, 刘玲, 陈芳艳, 王林川. 鸭 2 型腺病毒的分离鉴定及 *hexon* 基因的序列分析[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(12): 1538-1542.
- CHEN L, HUANG LS, LIU XW, LIU L, CHEN FY, WANG LC. Isolation and identification of duck adenovirus 2 and sequence analysis of *hexon* gene[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(12): 1538-1542 (in Chinese).
- [6] 陈峰, 招丽婵, 覃健萍, 周庆丰, 罗玉子, 林丽苗, 操胜, 李海燕. 应用宏基因组学鉴定国内第一株鸭 2 型腺病毒[J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(12): 903-907.
- CHEN F, ZHAO LC, QIN JP, ZHOU QF, LUO YZ, LIN LM, CAO S, LI HY. Identify a duck adenovirus 2 never reported outside of France by using of metagenomic analysis[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2015, 37(12): 903-907 (in Chinese).
- [7] 陈仕龙, 俞博, 肖世峰, 江斌, 程晓霞, 林锋强, 王劭, 朱小丽, 黄梅清, 陈秀琴, 陈少莺. 鸭 2 型腺病毒感染导致番鸭“肝白化病”的研究[J]. *福建农业科技*, 2017(8): 1-3.
- CHEN SL, YU B, XIAO SF, JIANG B, CHENG XX, LIN FQ, WANG S, ZHU XL, HUANG MQ, CHEN XQ, CHEN SY. Primary study on duck adenovirus 2 infection resulted in Muscovy ducklings' pale liver disease[J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2017(8): 1-3 (in Chinese).
- [8] 蔺文成, 戴振凯, 张新珩, 周振海, 毕英佐, 谢青梅. 1 株鸭 II 型腺病毒的分离与鉴定[J]. *养禽与禽病防治*, 2016(1): 10-11.
- LIN WC, DAI ZK, ZHANG XH, ZHOU ZH, BI YZ, XIE QM. Isolation and identification of a duck type II adenovirus[J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2016(1): 10-11 (in Chinese).
- [9] CHEN SL, LIN FQ, JIANG B, XIAO SF, JIANG DD, LIN C, WANG S, CHENG XX, ZHU XL, DONG H, CHEN XQ, YU B, ZHANG SZ, CHEN SY. Isolation and characterization of a novel strain of duck aviadenovirus B from Muscovy ducklings with acute hepatitis in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(5): 2769-2778.
- [10] 江丹丹, 林昶, 黄志坚, 肖世峰, 王劭, 林锋强, 程晓霞, 朱小丽, 陈秀琴, 董慧, 陈少莺, 陈仕龙. 鸭腺病毒 B 血清 1 型和血清 2 型双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国预防兽医学报*, 2022, 44(8): 855-860.
- JIANG DD, LIN C, HUANG ZJ, XIAO SF, WANG S, LIN FQ, CHENG XX, ZHU XL, CHEN XQ, DONG H, CHEN SY, CHEN SL. Establishment and application of duplex PCR assay for detection of duck adenovirus B serotype 1 and serotype 2[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(8): 855-860 (in Chinese).
- [11] SHI XJ, ZHANG XY, SUN HW, WEI CQ, LIU YN, LUO JG, WANG XB, CHEN ZY, CHEN HJ. Isolation and pathogenic characterization of duck adenovirus 3 mutant circulating in China[J]. *Poultry Science*, 2022, 101(1): 101564.
- [12] LIN S, WANG S, CHENG XX, XIAO SF, CHEN XQ, CHEN SL, CHEN SY, YU FS. Development of a duplex SYBR Green I-based quantitative real-time PCR assay for the rapid differentiation of goose and Muscovy duck parvoviruses[J]. *Virology Journal*, 2019, 16(1): 6.
- [13] 王静静, 于晓慧, 蒋文明, 李阳, 刘华雷, 王志亮. 2016–2019 年我国 I 类新城疫病原学监测与遗传进化分析[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(11): 1-5.



- WANG JJ, YU XH, JIANG WM, LI Y, LIU HL, WANG ZL. Pathogenic surveillance and phylogenetic analysis on class I Newcastle disease virus during 2016 to 2019 in China[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(11): 1-5 (in Chinese).
- [14] CHEN LL, XU Q, ZHANG RH, YANG L, LI JX, XIE ZJ, ZHU YL, JIANG SJ, SI XK. Improved duplex RT-PCR assay for differential diagnosis of mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings[J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 192(1/2): 12-17.
- [15] YAO M, ZHANG XY, GAO YF, SONG SQ, XU DN, YAN LP. Development and application of multiplex PCR method for simultaneous detection of seven viruses in ducks[J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 103.
- [16] 林锋强, 胡奇林, 欧阳岁东, 陈仕龙, 朱小丽, 程晓霞. 番鸭呼肠病毒的分离与 RT-PCR 鉴定[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(11): 64-65.
- LIN FQ, HU QL, OUYANG SD, CHEN SL, ZHU XL, CHENG XX. Isolation and Identification of Muscovy duck reovirus by RT-PCR[J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2005, 26(11): 64-65 (in Chinese).
- [17] 王劭, 陈少莺, 陈仕龙, 程晓霞, 林锋强, 朱小丽, 江斌, 李兆龙. 新型鸭呼肠孤病毒 RT-PCR 方法的建立与应用[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(2): 388-392.
- WANG S, CHEN SY, CHEN SL, CHENG XX, LIN FQ, ZHU XL, JIANG B, LI ZL. Establishment and Its Application of RT-PCR for Detection of Novel duck reovirus[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2011, 19(2): 388-392 (in Chinese).
- [18] 薛文慧, 赵千惠, 梁天, 王明迪, 孙鹏, 霍书英, 李永. 禽源烟曲霉菌和黄曲霉菌的分离鉴定及几种中药抑菌作用研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(1): 375-385.
- XUE WH, ZHAO QH, LIANG T, WANG MT, SUN P, HUO SY, LI Y. Isolation and Identification of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* from Poultry and Bacteriostasis of Several Traditional Chinese Medicines [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2022, 49(1): 375-385 (in Chinese).
- [19] 朱俊辉, 陈小庆, 郑东, 张双, 赵健, 胡桂学. 鸭疫里默菌的分离鉴定与动物回归实验[J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(7): 22-24, 27, 66.
- ZHU JH, CHEN XQ, ZHENG D, ZHANG S, ZHAO J, HU GX. Isolation, identification of *Rimemrella anatipestifer* and the animal regression test[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(7): 22-24, 27, 66 (in Chinese).
- [20] Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula[J]. *World Journal of Virology*, 2016, 5(2): 85-86.
- [21] RUSSELL WC. Adenoviruses: update on structure and function[J]. *The Journal of General Virology*, 2009, 90(Pt 1): 1-20.
- [22] LIN Y, ZHANG WY, XIE J, WANG WK, XIE Q, LI TF, SHAO HX, QIN AJ, WAN ZM, YE JQ. Identification of novel B cell epitopes in Fiber-2 protein of duck adenovirus 3 and their application[J]. *AMB Express*, 2023, 13(1): 62.
- [23] 赵蕾, 史爱华, 李林, 张建伟, 习硕, 沈佳, 姜北宇, 章振华. I群 4 型禽腺病毒 DC 株在 LMH 细胞的增殖工艺研究[J]. *中国家禽*, 2018, 40(20): 18-22.
- ZHAO L, SHI AH, LI L, ZHANG JW, XI S, SHEN J, JIANG BY, ZHANG ZH. Proliferation of group I fowl adenovirus serotype 4 DC strain in LMH cells[J]. *China Poultry*, 2018, 40(20): 18-22 (in Chinese).
- [24] YIN LJ, ZHOU Q, MAI KJ, YAN ZQ, SHEN HQ, LI QH, CHEN L, ZHOU QF. Epidemiological investigation of duck adenovirus 3 in Southern China, during 2018–2020[J]. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 2022, 51(2): 171-180.
- [25] TAN Y, RAHEEM MA, RAHIM MA, XIN H, ZHOU YH, HU XR, DAI Y, ATAYA FS, CHEN FF. Isolation, characterization, evaluation of pathogenicity, and immunomodulation through interferon production of duck adenovirus type-3 (DAvV-3)[J]. *Poultry Science*, 2024, 103(3): 103411.
- [26] 郭博伦, 李雅汝, 郑欣, 江丹丹, 曾丽, 陈少莺, 马燕梅, 陈仕龙. 一株具有插入和缺失突变特征鸭腺病毒 B2 毒株的分离鉴定[J]. *福建农业学报*, 2024, 39(2): 125-130.
- GUO BL, LI YR, ZHENG X, JIANG DD, ZENG L, CHEN SY, MA YM, CHEN SL. Isolation and identification of a new duck adenovirus B2 with insertion and deletion mutations[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39(2): 125-130 (in Chinese).
- [27] 曹秀芸, 刘吉文, 汤智辉, 郑紫怡, 闫丽萍, 宋素泉. 一株鸭腺病毒 3 型的分离、鉴定及致病性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(5): 2050-2061.
- CAO XY, LIU JW, TANG ZH, ZHENG ZY, YAN LP, SONG SQ. Isolation, identification and pathogenicity analysis of a duck adenovirus type 3[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(5): 2050-2061 (in Chinese).