

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.04.03

一株鸡传染性贫血病毒的分离鉴定及其致病性研究

陈 玲, 宋亚芬, 张 兵, 蒋桃珍*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2020-02-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 04-0017-07 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 从北京某鸡场发生疑似鸡传染性贫血病毒(CAV)感染的鸡只病料中分离到了一株 CAV, 通过 PCR 和全基因组测序等方法对其进行了鉴定, 命名为 AV1550。将其全基因组序列与 NCBI 上的参考毒株序列进行同源性比对和进化分析, 结果显示 AV1550 株与 CAV 参考毒株的同源性在 91.7% ~ 99.7%, 与中国分离株 LN15170 的亲缘关系最近。VP1 序列分析表明 AV1550 在 75、89、125、141 和 394 位氨基酸均为强毒株特征。1 日龄 SPF 鸡经胸部肌肉途径接种含 10000 EID₅₀ 的 AV1550 病毒液后, 接种鸡只出现明显的贫血症状, 增长迟缓, 死亡率高达 50%, 表明 AV1550 是一株具有较强致病性的 CAV 野毒株。

[关键词] 鸡传染性贫血病毒; 致病性; 序列分析

Isolation, Identification and Pathogenicity of a Chicken Infectious Anemia Virus

CHEN Ling, SONG Ya-fen, ZHANG Bing, JIANG Tao-zhen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Tao-zhen, E-mail: taozhen_jiang@163.com

Abstract: A CAV strain, named AV1550, was isolated from suspected CAV infection in a chicken farm in Beijing and identified by PCR and whole genome sequencing. Homology comparison and evolutionary analysis were conducted with the reference strain sequences on NCBI, the result showed that the homology between AV1550 strain and CAV reference strains was 91.7% ~ 99.7%, and it was closest to the Chinese isolate LN15170. Besides, AV1550 was of virulent characteristic amino acids at the position of VP1 75, 89, 125, 141 and 394. The dose of 10000 EID₅₀ virus was inoculated with 1-day-old SPF chickens through chest muscles, causing significant anemia and growth retardation, and the mortality reached as high as 50%, indicating that AV1550 was a wild CAV strain with strong pathogenicity.

Key words: chicken infectious anemia virus; pathogenicity; sequence analysis

基金项目: 国家微生物资源平台(NIMR-5)

作者简介: 陈 玲, 助理研究员, 从事种毒鉴定和兽用生物制品检验工作。

通讯作者: 蒋桃珍。E-mail: taozhen_jiang@163.com

鸡传染性贫血(Chicken infectious anemia)是由鸡传染性贫血病毒(Chicken infectious anemia virus, CAV)引起,其病原 CAV 属于圆环病毒科,基因组由单链、环状、共价封闭的负链 DNA 组成^[1-2]。该病最早由 Yuasa 等^[3]报道,主要特征是导致感染鸡出现再生障碍性贫血和伴有免疫抑制的胸腺萎缩和淋巴细胞流失,并伴随着病毒、细菌或真菌感染。自从鸡传染性贫血病毒在日本首次分离以来^[4],该病毒已在几乎所有拥有家禽产业的国家被分离出来。除了贫血和相关症状外,在商品鸡群中经常观察到无贫血但死亡率增加的亚临床 CAV 感染^[5]。

自 2014 年以来,从我国黑龙江、吉林、辽宁、宁夏、江苏等地的鸡群中分离出 CAV 的报道增加,且毒株多从混合感染鸡病料中分离,这些研究报道表明我国部分地区商品鸡中 CAV 感染比例较高,且可能也是导致鸡群一些相关疫病发生的诱因。但是在相关研究人员的报道中,没有发现对近些年分离毒株致病性的研究数据^[6-7]。为进一步了解近期国内 CAV 分离株的分子生物学特征和对鸡的致病力,本研究采用 2016 年从北京平谷某鸡场死亡鸡肝脏中分离的一株 CAV 对 1 日龄 SPF 鸡进行致病性研究,同时进行了全基因组测序和特征性氨基酸位点分析。

1 材料与方法

- 1.1 病料 北京平谷某鸡场死亡鸡肝脏。
- 1.2 SPF 鸡胚和鸡 6 日龄 SPF 鸡胚和 1 日龄 SPF 鸡,均购自北京勃林格殷格翰维通实验动物有限公司。
- 1.3 引物设计与合成 参照美国 CVB《外源性鸡传染性贫血病毒检测和鉴定的 PCR 方法》^[6],设计一对 CAV 特异性引物 CAV F/R;根据 GenBank 中 CAV 全基因组,设计两对引物 CAV F1/R1 和 CAV F2/R2,引物序列见表 1,由中美泰和生物技术有限公司合成。
- 1.4 主要试剂 大肠杆菌 JM109 感受态细胞、病毒 DNA 提取试剂盒、DNA Marker、Ex Taq Mix 购自 Takara 公司;pGEM-T 载体购自 Promega 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Omega 公司。

表 1 PCR 扩增的引物序列

Tab 1 Primer sequences for PCR amplification		
引物名称	引物序列(5'-3')	扩增片段长度/bp
CAV F	AGATCTGCAACTGCGGA	419
CAV R	CCTTGGGAAGCGGATAGTCA	
CAV F1	CGAGTG GTTACTATTCCATCACCA	1539
CAV R1	TCCCTGGGAGAGAAGACTCG	
CAV F2	TCACCCTAAGCAAATGACCCT	902
CAV R2	ATTTGCTGCATTTATTGAGTGCTAT	

1.5 病毒分离 将肝脏组织剪成小块后置于研钵中,倒入适量液氮,充分研磨,按 1:5 的体积比加入含双抗(1000 U/mL)的生理盐水,-80 ℃反复冻融三次,8000 r/min 离心 10 min,取上清,经 0.22 μm 滤膜过滤除菌。取研磨液经卵黄囊接种 6 日龄 SPF 鸡胚,0.2 mL/胚。37 ℃继续孵育 14 d,无菌收获胚体放入匀浆杯中,加入适量生理盐水(25 mL/胚),10000 r/min 匀浆 2 min,间隔 1 min,再次以相同速度匀浆 2 min,经 64 目铜网过滤,收获含毒滤液,标记为 CAV E1。将收获滤液再次接种鸡胚,并连续进行 5 次传代(CAV E1-E5),每个代次病毒分装后保存在-80 ℃。

1.6 病毒鉴定和特异性检测

- 1.6.1 PCR 检测 CAV 病毒 参照 Takara MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0 说明书,提取 CAV E2-E4 代病毒基因组。以 CAV F/R 为引物检测鸡传染性贫血病毒,反应体系:2 × Ex Taq Mix 25 μL,CAV F/CAV R(10 μmol/L)各 1 μL,模板 10 μL, ddH₂O 13 μL;反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,51.5 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。取 5 μL PCR 产物,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增结果。
- 1.6.2 纯净性检测 取 CAV E4 病毒液经滴鼻、点眼接种 20 只 3 周龄 SPF 鸡,0.2 mL/只,同时肌肉注射,0.5 mL/只。21 d 后按上述方法和计量重复接种一次。试验期间进行临床观察,第一次接种后 42 d 采血,参照《中国兽药典》方法,进行相关病毒(表 2)的抗体检测。

表 2 相关病毒抗体检测方法

病原	检测方法
鸡传染性支气管炎病毒	ELISA
鸡新城疫病毒	HI
减蛋综合征病毒	HI
禽 A 型流感病毒(H5、H7、H9)	HI
鸡传染性喉气管炎病毒	ELISA
禽呼肠孤病毒	ELISA
鸡传染性法氏囊病病毒	ELISA
禽网状内皮组织增生症病毒	ELISA
禽白血病病毒(AB/J)	ELISA
禽脑脊髓炎病毒	ELISA
鸡传染性贫血病毒	ELISA
鸡痘病毒	临床观察

1.7 致病性试验 将 60 只 1 日龄 SPF 鸡随机分为 3 组,每组 20 只。第 1 组和第 2 组为试验组,分别经胸部肌肉接种 100 和 10000 EID₅₀ CAV E4 病毒,第 3 组为空白对照组,接种等量的生理盐水。分别在接种当天、接种后 7 d、14 d、24 d、28 d 和 35 d 对试验鸡进行称重,并在接种后 14 d 时采血测定其红细胞压积。

1.8 病毒全基因组的扩增、克隆和测序 以 CAV E4 DNA 为模板,分别以 CAV F1/R1 和 CAV F2/R2 为引物进行 PCR 扩增,将 PCR 产物回收后,与 pGEM-T 载体连接,转化到 JM109 细胞,取 100 μL 涂布含有氨苄的 LB 琼脂,37 ℃ 过夜培养。利用菌落 PCR 的方法鉴定重组子,挑选 3 个阳性克隆送往中美泰和生物技术有限公司测序。

1.9 序列比对与分析 将 CAV E4 的全基因组序列和 VP1、VP2、VP3 序列分别与国内外已发表的 CAV 分离株(毒株信息见表 3)进行比对和分析^[4]。

2 结果与分析

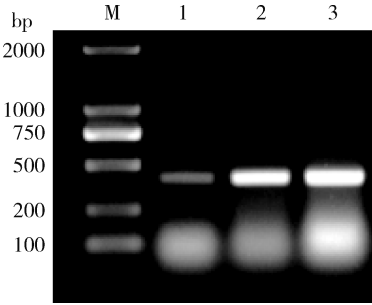
2.1 PCR 鉴定 CAV E2-E4 代病毒均能扩增出特异性的 419 bp 条带(图 1)。

2.2 纯净性检测 接种的所有鸡除产生 CAV 特异性抗体外,其他所检测病原抗体均为阴性,也无鸡痘临床症状,表明所分离的 CAV 毒株是纯净的,

表 3 序列信息表

毒株名称	分离地	分离时间	序列号
Cux-1	USA	1991	NC_001427
10	UK	1997	U66304
TJBD40	China	2004	AY846844
LF4	China	2005	AY839944
BJ0401	China	2005	DQ124934
AH6	China	2005	DQ124935
SH11	China	2005	DQ141670
GD-1-12	China	2012	JX260426
1636TW	TaiWan	2016	MK376316
1705PT	TaiWan	2016	MK386570
SDLY08	China	2008	FJ172347
22	TaiWan	2014	KJ728830
SC-PS	China	2014	KM496310
FAdV-N22	China	2016	KU845734
LN1410	China	2014	KU641013
SD1507	China	2015	KU645507
HLJ15108	China	2015	KY486137
JL15120	China	2015	KY486149
CAV-EG-4	Egypt	2017	MH001554
A2	Japan	1999	AB031296
SMSC-1_P60	Malaysia	2001	AF390102
3-1P60	Malaysia	2003	AY040632
98D02152	USA	2016	AF311892
GD-101	China	2015	KU050680
CI4V89-69	South_Korea	1991	JF507715
C369	Japan	2001	AB046590
GD-103	China	2015	KU050678
SD22	China	2015	DQ141673
SD24	China	2015	AY999018
SD1403	China	2014	KU221054
TR20	Japan	1990	AB027470
704	Australia	1996	U65414
SMSC-1	Malaysia	2000	AF285882
LN15170	China	2015	KY486155
SD15	China	2015	KX811526

无其他病毒性病原污染。因此将毒株命名为 AV1550,真空冷冻干燥后保藏在中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC)。



M: DNA Marker; 1-3:CAV E2、E3、E4 的 CAV 特异性片段
M: DNA Marker; 1-3:CAV specific fragment of E2、E3、E4

图 1 CAV E2、E3 和 E4 PCR 检测

Fig 1 Identification of CAV E2、E3、E4 by PCR

2.3 致病性试验

2.3.1 临床观察 攻毒后 2 d,对照组 1 只鸡出现非特异性死亡。10000 EID₅₀感染组在攻毒后 8 d 开始出现死亡,在观察期内死亡率为 50%;100 EID₅₀感染组在攻毒后 13 d 开始出现死亡,在观察期内死亡率为 25%。接种鸡出现死亡的高峰期在 13~20 d。结果见表 4。

表 4 1 日龄 SPF 鸡接种后死亡结果

攻毒时间/d	死亡数量/只		
	对照组	100 EID ₅₀ 组	10000 EID ₅₀ 组
1-10	1	0	2
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	1	0
14	0	1	0
15	0	1	5
16	0	0	0
17	0	1	1
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	1	1
21	0	0	0
22	0	0	0
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	1
26	0	0	0
27	0	0	0
28-35	0	0	0
死亡率	1/20	5/20	10/20

2.3.2 攻毒后不同时间试验鸡体重变化 不同剂量接种后 7 d,各组试验鸡平均体重无明显差异。10000 EID₅₀感染组在接种后 14~35 d 间,平均体重与对照组相比,具有极显著性差异($P<0.01$);100 EID₅₀感染组在接种后 21 d~28 d,平均体重与对照组相比,具有显著性差异($P<0.05$),接种后 14 d 和 35 d 平均体重也低于对照组,但差异不显著($P>0.05$)。具体数据见表 5。

表 5 不同时间鸡体重结果(n=10)

时间/d	体重/g		
	对照	100EID ₅₀	10000EID ₅₀
0	35.53 ± 1.48 ^A	35.39 ± 1.90 ^A	34.77 ± 2.50 ^A
7	71.44 ± 5.93 ^A	79.94 ± 9.25 ^A	77.63 ± 8.23 ^A
14	125.16 ± 10.84 ^A	117.90 ± 20.30 ^A	96.02 ± 17.82 ^{B*}
21	190.01 ± 16.79 ^A	169.07 ± 34.43 ^B	130.35 ± 29.39 ^{B*}
28	272.32 ± 23.95 ^A	239.51 ± 44.27 ^B	195.33 ± 38.22 ^{B*}
35	362.12 ± 34.34 ^A	343.01 ± 53.77 ^A	268.17 ± 49.90 ^{B*}

不同的大写字母表示差异显著($P<0.05$),*表示差异极显著($P<0.01$)
Different capital letters indicate significant differences ($P<0.05$),
* means the difference is very significant($P<0.01$)

2.3.3 对 SPF 鸡的致贫血作用 攻毒后 14 d 采血测定红细胞数量和压积(表 6),10000 EID₅₀感染组红细胞数量及红细胞压积与对照组相比具有极显著性差异($P<0.01$);100 EID₅₀感染组红细胞数量也低于对照组,但差异不显著,红细胞压积与对照组相比具有显著差异($P<0.05$)。

表 6 红细胞数量和红细胞压积结果(n=10)

组别	红细胞计数/10 ¹²	红细胞压积/%
对照	2.35 ± 0.18 ^A	30.04 ± 1.81 ^A
100EID ₅₀	2.15 ± 0.20 ^A	26.92 ± 2.38 ^B
10000EID ₅₀	1.07 ± 0.08 ^{B*}	13.76 ± 1.06 ^{B*}

不同的大写字母表示差异显著($P<0.05$),*表示差异极显著($P<0.01$)
Different capital letters indicate significant differences ($P<0.05$),
* means the difference is very significant($P<0.01$)

2.4 AV1550 全基因组序列分析 AV1550 E4 基因组全长为 2298 bp,非编码区含有 4 个 21 bp 的直

接重复序列 (Direct Repeat, DR), 编码区有 3 个部分重叠的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), 分别编码 VP2 (651 bp)、VP3 (366 bp) 和 VP1 (1350 bp)。CAV 参考株全基因组序列可分为 A、B 和 C

3 个群 (图 2), AV1550 株属于 A 群, 基因同源性分析显示, AV1550 株与中国分离株 LN15170 的亲缘关系最近, 基因同源性为 99.7%, 与 TR20 株亲缘关系最远, 同源性仅 91.7%。

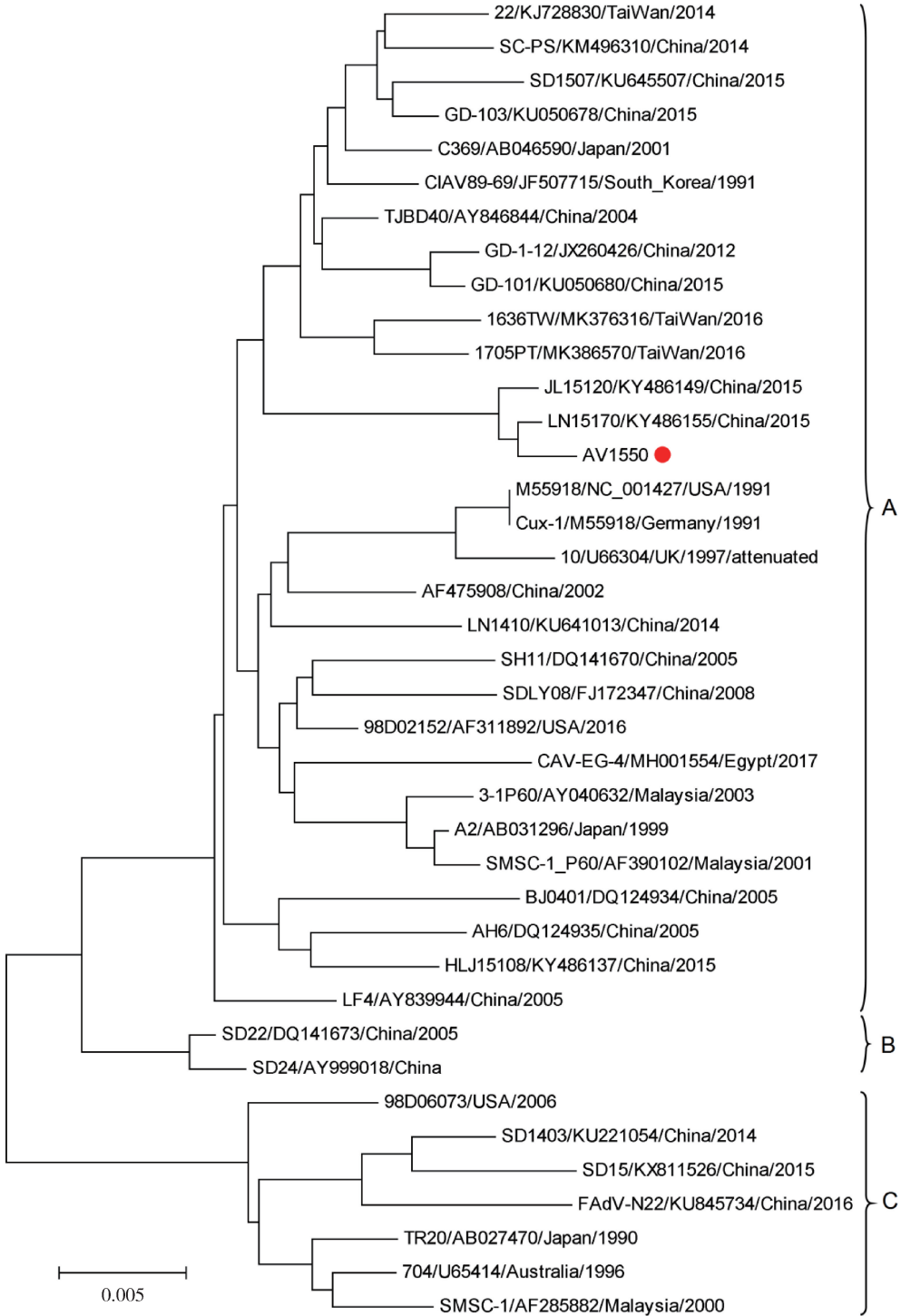


图 2 AV1550 毒株的全基因组进化树

Fig 2 Phylogenetic tree based on whole genome of AV1550 and reference strains

2.5 AV1550 与其它 CAV 参考株 VP1、VP2 和 VP3 序列比较 将 AV1550 株与 NCBI 上其它 CAV 毒株的 VP1、VP2 和 VP3 核苷酸和氨基酸序列进行同源性分析,VP1 核苷酸序列与已发表的 CAV 毒株的同源性在 94.0% ~99.6% 之间,同源性最高的毒株为 LN15170,最低的为 FAdV - N22 株;VP2 核苷酸同源性在 98.9% ~99.8% ;VP3 核苷酸同源性为 98.9% ~100%。VP1 氨基酸与已发表的 CAV 毒株的同源性在 96.7% ~99.6% ,同源性最高的毒株为 LN15170,最低的为 SH11 株和 SDLY08 株;VP2 氨基酸同源性在 98.2% ~99.5% ;VP3 氨基酸同源性为 97.5% ~99.2%。CAV 毒株的 VP2 和 VP3 序列非常保守,基因差异主要在 VP1 编码区。

2.6 AV1550 株特征性氨基酸位点分析 AV1550 株在 VP1 的 75、89、125、141 和 394 位均为强毒株特征性氨基酸;在 VP1 的高变区(aa139 - aa151)的 139 和 144 位氨基酸分别为 K 和 E,推测该毒株有较高的复制和传播能力。AV1550 株 VP1 上特征性氨基酸位点见表 7。

表 7 AV1550 VP1 特征性氨基酸位点

Tab 7 Characteristic amino acids on VP1 of AV1550

毒株	VP1 上的氨基酸位置						
	75	89	125	139	141	144	394
AV1550	V	T	L	K	Q	E	Q

3 讨论与结论

自 Yuasa 等^[9]发现鸡 T 淋巴细胞系(如 MDCC - MSB1)和 B 淋巴细胞系(如 LSCC - 1104B1)可用于培养 CAV 以来,细胞培养已成为 CAV 分离和繁殖的优选方法^[5]。但不同亚型的 MSB1 对 CAV 感染的敏感性不同,部分 CAV 毒株(如 CIA - 1)不能在 MSB1 上复制^[11];此外,MSB1 细胞有时经连续传代后对 CAV 的敏感性降低,甚至仅传代 8 周后病毒就不能在其上增殖^[12]。有些通过细胞培养或 PCR 检测为阴性的样品,接种 1 日龄易感鸡后可产生 CAV 感染临床症状,已有研究表明用 1 日龄易感鸡进行病毒分离的敏感性是细胞培养的 100 倍以上。本研究采用鸡胚卵黄囊接种的方法成功分

离出一株 CAV 毒株,且增殖的病毒滴度较高,这为某些不能适应细胞培养的田间 CAV 毒株的分离提供参考。

AV1550 毒株的基因组大小为 2298 bp,与国内外其它 35 个毒株的核苷酸相似性在 91.7% ~99.7% 之间,与国内分离的大多数毒株的同源性均较高,与辽宁分离株 LN15170 同源性最高(99.7%)。不同毒株 VP1 核苷酸同源性在 94.0% ~99.6% 之间,VP2 核苷酸同源性在 98.9% ~99.8% 之间,VP3 核苷酸同源性为 98.9% ~100%。总体而言,CAV 全基因及 VP1、VP2 和 VP3 的序列分析,表明其基因组变异很小,且 VP2 和 VP3 高度保守,VP1 作为唯一的结构蛋白且刺激宿主免疫应答反应,其氨基酸差异相对较大^[5],这与国内外学者的研究报道一致。

Yamaguchi 等^[13]报道 VP1 中 394 位的氨基酸可能是毒力的主要决定因素。如果该位点为谷氨酰胺(Q),则该分离毒株可能具有较高的致病性,如果该位点为组氨酸(H),则其致病性相对较低。林欢等^[14]对 CAV 全基因组序列分析后发现,除日本毒株 C369 外,绝大部分毒株在 394 位氨基酸均为 Q。早期研究报道^[15],75V、89T、125I、141Q 和 144Q 氨基酸同时发生突变,毒力会明显减弱,不会引起贫血、骨髓和胸腺萎缩。本研究中,为进一步明确氨基酸序列与致病性之间的关系,对分离鉴定的 AV1550 毒株进行了测序和致病性试验,AV1550 毒株 394 位的氨基酸为 Q,仅在 125L 和 144E 发生基因突变,表明毒株可能具有较高的致病性,且毒力不会发生明显减弱。而 1 日龄鸡的致病性试验证实 AV1550 毒株低剂量和高剂量接种组都可以导致鸡发病死亡,且高剂量组(每只鸡接种 10000 EID₅₀)可引起 50% 的死亡率,明显高于一般毒株感染引起的死亡率(通常不超过 30%),试验鸡有明显的贫血症状,增重迟缓。初步研究试验结果也表明,毒株的致病性与 VP1 特定位点的氨基酸具有相关性。

Renshaw 等^[16]报道 VP1 蛋白跨 13 个氨基酸(139 - 151)的高变区(HVR)中 139 和 144 位的氨

基酸在病毒的生长和传播中起重要作用,如果 VP1 Q-139 和/或 Q-144 时,病毒的复制和传播效率就会有所下降。AV1550 毒株在 139 和 144 位氨基酸分别为赖氨酸(K)和谷氨酸(E),推测其在机体的复制和传播能力可能较强,但毒株的该生物学特性还需要进一步试验研究。

参考文献:

- [1] King A M Q, Lefkowitz E, Adams M J, *et al.* Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. New York, Academic Press, 2011.
- [2] Noteborn M H, De Boer G F, Van Roozelaar D J, *et al.* Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle[J]. Journal of Virology, 1991, 65 (6): 3131-3139.
- [3] Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks[J]. Avian Diseases, 1979, 23:366-385.
- [4] Yuasa N. Propagation and infectivity titration of the Gifu-1 strain of chicken anemia agent in a cell line (MDCC-MSB1) derived from Marek's disease lymphoma[J]. National Institute of Animal Health Quarterly, 1983, 23 (1): 13-20.
- [5] Saif Y M, Fadly A M, Glisson J R, *et al.* Diseases of Poultry [M]. John Wiley & Sons, 2011.
- [6] Yao S, Tuo T, Gao X, *et al.* Molecular epidemiology of chicken anaemia virus in sick chickens in China from 2014 to 2015[J]. PloS One, 2019, 14: e0210696.
- [7] 王 鹏,史静柯,袁慧莎,等. 一株鸡传染性贫血病毒的分离鉴定及全基因组分析[J]. 中国家禽, 2019,41(5):57-60.
Wang P, Shi J K, Yuan H S, *et al.* Isolation and identification of a chicken infectious anemia virus and its whole genomic sequence analysis[J]. China Poultry, 2019, 41(5): 57-60.

- [8] United States Department of Agriculture Center for Veterinary Virologics. Polymerase chain reaction assay for detection and identify of extraneous chicken anemia virus(CAV) VIRPRO0118.05[S].
- [9] Yuasa N, Taniguchi T, Goda M, *et al.* Isolation of chicken anemia agent with MDCC-MSB1 cells from chickens in the field[J]. National Institute of Animal Health Quarterly,1983, 23 (3): 75-77.
- [10] Lucio B, Schat K A, Shivaprasad H L. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States [J]. Avian Diseases, 1990, 34: 146-153.
- [11] Calnek B W, Lucio-Martinez B, Cardona C, *et al.* Comparative susceptibility of Marek's disease cell lines to chicken infectious anemia virus[J]. Avian Diseases, 2000, 44: 114-124.
- [12] Yamaguchi S, Imada T, Kaji N, *et al.* Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus[J]. The Journal of General Virology, 2001, 82 (5): 1233-1238.
- [13] 林 欢, 么 帅, 脱添蓓, 等. 一株鸡传染性贫血病毒的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39 (6): 435-438.
Lin H, Gou S, Tuo T B, *et al.* Isolation and Identification of a chicken infectious anemia virus and its whole genomic sequence analysis[J]. China Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39 (6): 435-438.
- [14] Todd D, Scott A N, Ball, N W, *et al.* Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates[J]. Journal of Virology, 2002,76 (16): 8472-8474.
- [15] Renshaw R W, Soine C, Weinkle T, *et al.* A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture[J]. Journal of Virology, 1996, 70 (12): 8872, 8878.

(编辑:李文平)