

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.10.04

# 传染性法氏囊病病毒超强毒株 ZHA001 株的分离及鉴定

于雷,潘雨,高洁,迟鑫,刘硕

(北京中海生物科技有限公司,北京 100081)

[收稿日期] 2022-04-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 10-0018-07 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为研究某 817 肉鸡群发生传染性法氏囊病 (IBD) 原因,从病料中进行病毒分离,通过 RT-PCR 扩增分离株 VP2 基因后进行相关分析,并对分离株的致病性进行测定。结果显示,分离到一株传染性法氏囊病病毒 (IBDV),将其命名为 ZHA001 株;ZHA001 株 VP2 基因序列与超强毒株 (vvIBDV) 的同源性为 97.5% ~ 99.1%,氨基酸序列同源性大于 99.3%;具有超强毒株的特征性氨基酸位点;遗传进化分析发现,ZHA001 株属于超强毒株分支;致病性试验中,发病率为 100%,致死率为 90%。试验结果表明引起该鸡群 IBD 的病原为超强毒病毒,致病力强。

**[关键词]** 传染性法氏囊病病毒;VP2 基因;序列分析;超强毒株;致病性

## Isolation and Identification of Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Strain ZHA001

YU Lei, PAN Yu, GAO Jie, CHI Xin, LIU Shuo

(Beijing Zhonghai Biotic Co. Ltd, Beijing 100081, China)

**Abstract:** To elucidate the reasons of infectious bursal disease (IBD) infection in the 817 broiler flocks, virus isolation was performed, the VP2 gene was amplified and determined, and the pathogenicity evaluation of isolation were carried out. The results showed that an infectious bursal disease virus (IBDV) strain designated as ZHA001 was isolated. The VP2 gene sequence of ZHA001 had 97.5% to 99.1% homology with the reference very virulent IBDV (vvIBDV) strains, and the homology of the amino acid sequence was above 99.3% with the vvIBDV strains. The VP2 amino acid sequence of IBDV ZHA001 strain was consistent with the characteristics of other vvIBDV strains. Phylogenetic analysis showed that ZHA001 belonged to the branch of vvIBDV strains. The mortality and morbidity of the infected SPF chickens was 90% and 100%. The results showed that the layers were infected with very virulent strain of IBDV, with high pathogenicity.

**Key words:** infectious bursal disease virus (IBDV); vp2 gene; sequence analysis; very virulent strain; pathogenicity

传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的一种危害青年鸡的烈性、高度接触性的病毒病<sup>[1]</sup>, 1957 年首次出现于美国<sup>[2]</sup>。我国自 1979 年发现该病以来<sup>[3]</sup>, 全国各地陆续有该病发生和流行的报道。

IBDV 属于双 RNA 病毒科, 其基因组由 A、B 两节段组成, 编码 5 种蛋白, 分别为 VP1、VP2、VP3、VP4 和 VP5<sup>[4]</sup>。其中 VP2 是 IBDV 的主要结构蛋白和宿主保护性抗原, 还与病毒毒力、抗原变异及细胞凋亡等有关<sup>[5]</sup>。目前已把 VP2 作为基因工程亚单位疫苗的主要目的基因进行研究。

依据致病性和抗原性的差异, 血清 I 型 IBDV 野毒株可分为经典毒株、变异毒株和超强毒株 (very virulent IBDV, vvIBDV)<sup>[6]</sup>。自 1990 年以来, 我国和其它国家及地区不断分离到 vvIBDV, 它能突破由经典毒株致弱的活疫苗或灭活疫苗提供的保护作用, 导致雏鸡发病<sup>[7]</sup>。vvIBDV 的高致死率给养禽业造成了巨大经济损失<sup>[8]</sup>。

山东某肉鸡场在 B87 活疫苗免疫后仍发生疑似传染性法氏囊病的病例。从发病死亡的鸡只上采集病料组织, 进行病毒分离鉴定, 分离到一株 vvIBDV, 对 VP2 基因进行了克隆和序列分析, 从分子水平研究其毒力和基因变异情况, 并对其致病性等进行了研究, 解释免疫鸡群发病的原因, 以期为该病的防治提供参考。

## 1 材料与方 法

1.1 病料 采自山东某 817 肉鸡场疑似法氏囊病的病鸡法氏囊组织。

1.2 SPF 鸡胚和 SPF 鸡 购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司。

1.3 标准品 IBDV 阳性血清、IBDV 琼扩抗原等由北京中海生物科技有限公司提供。

1.4 主要试剂及试剂盒 病毒核酸提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 试剂盒、DNA 凝胶回收提取试剂盒、*pEASY*<sup>®</sup>-T1 Cloning Kit 等均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.5 引物设计与合成 VP2 基因扩增引物参照文

献<sup>[9]</sup>, 上游引物为 5'-CGAATTCATGACAAACCTG-CAAGAT-3', 下游引物为 5'-CCGCTCGAGTCAC-CTTAGGGCCCGGATTAT-3'。由北京三博远志生物技术有限公司合成。

1.6 病料处理 采集出现典型症状和病理变化的病死鸡法氏囊组织。将法氏囊组织剪碎, 称重后按照 1:5 比例 (*m/V*) 加入灭菌生理盐水 (加入终浓度为 2000 单位/mL 的青、链霉素), 放入研磨器中研磨, 得到匀浆液; 冻融 3 次; 加入等体积氯仿, 低温振荡作用过夜; 4 ℃、10000 g 离心 5 min, 取上清液。-70 ℃ 冷冻保存备用。

1.7 病毒分离 将上清液点眼接种 4 周龄 SPF 鸡 5 只, 0.1 mL/只。接种后每天观察, 死鸡随时剖检, 无菌采集法氏囊; 接种后 96 h 剖检存活鸡, 收集病变法氏囊。法氏囊组织按照 1:5 比例 (*m/V*) 加入灭菌生理盐水研磨, 冻融 3 次后 10000 g 离心 5 min, 取上清液作为试验用毒种, -70 ℃ 冷冻保存备用。

1.8 琼脂扩散试验 (AGP) 按常规方法进行; 琼脂板用梅花打孔器打孔, 中间孔加入 IBDV 阳性血清, 周围孔分别加入分离株病毒液、标准 IBDV 琼扩抗原及生理盐水对照, 37 ℃ 湿盒中孵育 36 h, 观察结果。

1.9 病毒 RNA 的提取 试验用毒种融化后用试剂盒提取病毒 RNA。

1.10 VP2 基因扩增及克隆与测序 以提取的病毒 RNA 为模板, 通过下游引物进行反转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板, 通过上、下游引物, 经 PCR 扩增 VP2 基因。反应条件为: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 57.8 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的基因, 与 *pEASY*<sup>®</sup>-T1 载体连接后转化 Trans 5α 感受态细胞, 挑选阳性克隆, 提取质粒, 送北京三博远志生物技术有限公司测序。

1.11 VP2 基因的序列分析 利用 DNASTar 软件对分离株及 GenBank 上其他毒株 (表 1) 的 VP2 基因进行核苷酸序列和氨基酸序列比对, 采用 MEGA 软件中 Neighbor - Joining (NJ) 方法进行遗传演化分析, 并绘制系统进化树。

表 1 IBDV 参考毒株信息

Tab 1 Information of reference IBDV strains

毒株名称	毒株表型	GenBank 登录号	毒株名称	毒株表型	GenBank 登录号
HK46	超强毒株	AF092943	Gt	弱毒株	DQ403248
Gx	超强毒株	AY444873	B87	弱毒株	DQ906921
UK661	超强毒株	X92760	D78	弱毒株	EU162087
OKYM	超强毒株	D49706	P2	弱毒株	X84034
D6948	超强毒株	AF240686	T1	早期变异株	AF281238
SH95	超强毒株	AY134874	7 Ohio	早期变异株	MF142583
HLJ19 - 6101	超强毒株	MW682898	9109	早期变异株	AY462027
HB20 - 4401	超强毒株	MZ766384	GLS	早期变异株	AY368653
IM	经典毒株	AY029166	Variant E	早期变异株	AF133904
STC	经典毒株	D00499	SHG19	新型变异株	MH879092
Cu - 1 wt	经典毒株	AF362747	SHG120	新型变异株	MH879110
A - BH83	经典毒株	JF811920	SHG350	新型变异株	MH879129
52/70	经典毒株	D00869	HLJ19 - 11003	新型变异株	MN900963
CEF94	弱毒株	AF194428	OH	血清 II 型毒株	U30818

1.12 鸡胚半数致死量(ELD<sub>50</sub>)的测定 试验用毒种用灭菌生理盐水进行 10 倍系列稀释,取 10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>-6</sup> 共 5 个稀释度,每稀释度经绒毛尿囊膜途径接种鸡胚 5 枚,0.2 mL/枚,置 37 °C 孵育 168 h,记录各组鸡胚死亡情况及胚体病变,根据 Reed - Muench 法计算 ELD<sub>50</sub>。

1.13 外源病毒检验 用灭菌生理盐水将试验用毒种稀释至 10<sup>3.5</sup>ELD<sub>50</sub>/0.1 ml,与等量鸡传染性法氏囊病阳性血清混合,37 °C 作用 60 min。按照《中国兽药典》2020 年版三部附录 3505 外源病毒检验法中“1 禽源制品及其细胞的检验”<sup>[10]</sup>中“1.2 鸡胚检查法”和“1.3 细胞检查法”进行。

1.14 致病性试验 用 4 周龄 SPF 鸡 15 只,随机分成 2 组,第 1 组 10 只,各点眼接种试验用毒种 10<sup>4.0</sup>ELD<sub>50</sub>(0.1 mL);第 2 组 5 只,不接种作为对照。两组鸡在相同条件下隔离饲养,连续观察 96 h,观察各组鸡临床表现,对病死鸡进行剖检,并记录死亡数量及病理变化。

## 2 结果与分析

2.1 病毒的分离与鉴定 IBDV 病料接种 SPF 鸡进行病毒分离,96 h 内死亡 3 只,剖检可见法氏囊充血,肿胀,外观似紫葡萄样;2 只存活鸡 96 h 时精神沉郁,羽毛蓬松,剖检法氏囊出现胶冻样肿胀。无菌采集所有鸡只法氏囊,经处理后作为试验用毒种。对其进行 RT - PCR 检测和琼脂扩散试验,核酸电泳后出现一条约 1400 bp 的条带,与预期大小相符(图 1);琼脂扩散试验中,待检毒种与阳性血清孔间出现了一条乳白色沉淀线,与标准 IBDV 琼扩抗原阳性对照相同,而生理盐水阴性对照无沉淀,结果表明 IBDV 阳性。将该 IBDV 分离株命名为 ZHA001 株。

2.2 序列测定结果及同源性分析 测序结果表明,ZHA001 株 VP2 基因大小为 1356 bp,编码 452 个氨基酸。利用 DNASTar 软件对该毒株及血清 I 型参考毒株的 VP2 基因核苷酸及推导的氨基酸序列进行同源性分析。结果显示,ZHA001 株与其他 IBDV 毒株的核苷酸同源性超过 90.1%,其中与

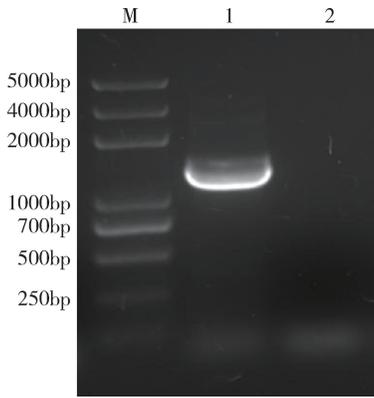


图 1 RT-PCR 扩增 VP2 基因

Fig 1 Amplification of VP2 gene with RT-PCR

超强毒株 UK661 和 OKYM 株的同源性为 97.9%，与超强毒株 HLJ19-6101 株的同源性最高，为 99.1%；与超强毒株氨基酸序列的同源性均大于 99%。

2.3 ZHA001 株 VP2 高变区氨基酸分析 对 ZHA001 株 VP2 高变区的氨基酸进行分析，与参考毒株的特征性氨基酸位点进行比较，发现 ZHA001 株与超强毒特征性氨基酸位点相一致(表 2)，七肽区(326 ~ 332)也与超强毒株完全相同，为“SWSASGS”。

表 2 IBDV VP2 基因高变区氨基酸比对结果

Tab 2 The amino acid alignment of IBDV VP2 gene hypervariable region

毒株	类型	VP2 蛋白氨基酸位点																
		213	221	222	242	249	252	253	254	256	279	284	286	294	299	318	323	330
HK46	超强毒	D	Q	A	I	Q	V	Q	G	I	D	A	T	I	S	G	D	S
Gx	超强毒	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
UK661	超强毒	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
OKYM	超强毒	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
D6948	超强毒	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
SH95	超强毒	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
HLJ19-6101	超强毒	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
HB20-4401	超强毒	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ZHA001	/	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
52/70	经典毒	*	*	P	*	*	*	*	*	V	*	*	*	L	N	*	*	*
IM	经典毒	*	*	P	*	*	*	*	*	V	*	*	*	L	N	*	*	*
STC	经典毒	*	*	P	V	*	*	*	*	V	*	*	*	L	N	*	*	*
Cu-1 wt	经典毒	*	*	P	*	*	*	*	*	V	*	*	*	L	N	*	*	*
A-BH83	经典毒	*	*	P	V	*	*	*	*	V	*	*	*	L	N	*	*	*
P2	弱毒株	*	*	P	V	R	*	H	*	V	N	T	*	L	N	*	*	R
CEF94	弱毒株	*	*	P	V	*	*	H	*	V	N	T	*	L	N	*	*	R
Gt	弱毒株	*	*	P	V	R	*	H	*	V	N	T	*	L	N	*	*	R
B87	弱毒株	*	*	P	V	*	*	H	*	V	N	T	*	L	N	*	*	R
D78	弱毒株	*	*	P	V	*	*	H	*	V	N	T	*	L	N	*	*	R
9109	早期变异株	N	*	T	V	K	*	N	V	N	A	I	L	N	N	*	*	
T1	早期变异株	N	*	T	V	K	*	N	V	N	A	I	L	N	N	*	*	
7 Ohio	早期变异株	*	*	T	V	K	*	E	S	V	N	A	I	L	N	*	*	
GLS	早期变异株	*	*	T	V	K	*	S	V	N	A	T	L	N	*	*		
Variant E	早期变异株	N	*	T	V	K	*	S	V	N	A	T	L	N	D	E	*	
SHG19	新型变异株	N	K	T	V	K	I	*	N	V	N	A	I	L	S	D	E	*
SHG120	新型变异株	N	K	*	V	K	I	*	N	V	N	A	I	L	S	D	E	*
SHG350	新型变异株	N	K	T	V	K	I	*	N	V	N	A	I	L	S	D	E	*
HLJ19-11003	新型变异株	N	K	T	V	K	I	*	N	V	N	A	I	L	S	D	E	*

“\*”表示与 HK46 株一致

2.4 遗传进化分析 基于 VP2 基因的核苷酸序列遗传进化树显示，血清 I 型的 IBDV 毒株可分为经典毒株、超强毒株、弱毒株和变异毒株等不同分支；

IBDV ZHA001 株与超强毒株(UK661、OKYM、Gx、HK46、D6948、HLJ19-6101、HB20-4401、SH95 等)在同一进化树分支(图 2)。

2.5 鸡胚半数致死量测定 将试验用毒种系列稀释后接种 10 日龄鸡胚,根据接种后鸡胚的死亡情况,计算出 ZHA001 株的  $ELD_{50}$  为  $10^{-4.38}/0.2$  mL。死胚表现为绒毛尿囊膜增厚,胚体水肿、脑部充血,剖检可见肝脏斑驳状病变。

2.6 外源病毒检验 试验用毒种与特异性阳性血清中和后接种 SPF 鸡胚和鸡胚成纤维细胞,培养后进行判定。结果,鸡胚检查法中两种途径接种的鸡胚胎均发育正常,绒毛尿囊膜无病变,取接种鸡胚的鸡胚液进行红细胞凝集试验,结果均为阴性;细胞检查法中,接种的细胞无细胞病变,对细胞进行红细胞吸附试验,未出现红细胞吸附现象。上述结果表明该试验毒种无外源病毒污染,毒种纯净。

2.7 毒力试验 IBDV ZHA001 株接种 SPF 鸡后 36 h,部分鸡只精神沉郁,拉白色或绿色稀便。48 h,所有接种鸡精神沉郁,羽毛蓬松。48 ~ 96 h 内死亡 9 只,剖检见法氏囊呈紫葡萄样(图 3A)。1 只鸡濒死,剖检法氏囊出现充血、肿胀。非接种对照组 5 只鸡均健活,剖检法氏囊无异常(图 3B)。结果表明 ZHA001 株为超强毒株。

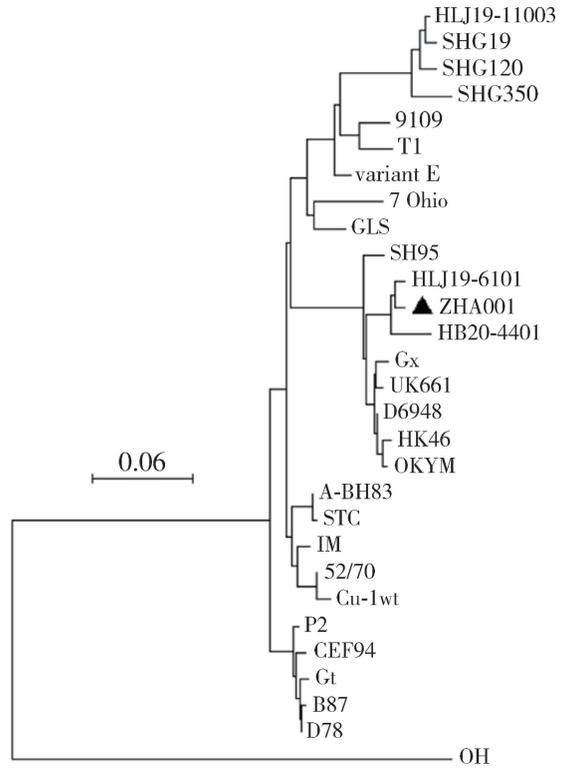


图 2 ZHA001 株 VP2 基因进化树分析

Fig 2 Phylogenetic analysis of ZHA001 based on VP2



图 3 ZHA001 株致病性试验

Fig 3 Challenge test of IBDV ZHA001

### 3 讨论与小结

传染性法氏囊病病毒主要侵害鸡,尤其是超强毒株,自 20 世纪 90 年代以来对我国养禽业造成重大经济损失。然而,随着饲养环境的改善和疫苗的广泛应用,超强毒株得到了很好的控制,仅呈现点发<sup>[11]</sup>。2017 年以来不同于早期变异株的新型法氏囊变异株在国内开始流行<sup>[12-13]</sup>,且流行范围仍在扩大<sup>[6]</sup>。本次超强毒株的分离,也表明了目前新型变异毒株流行的同时超强毒株并未消失。

目前对 IBDV 分子流行病学研究集中在该病毒 VP2 基因的高变区,VP2 基因与病毒中和抗体的

诱导、抗原的变异以及毒力有关<sup>[14]</sup>,VP2 高变区氨基酸变化较大,因此对该区域的分子特征进行研究不仅可以发现 IBDV 的抗原性变化,还可提供 IBDV 毒株遗传进化信息。本研究克隆了 IBDV ZHA001 株 VP2 基因,并对其与 NCBI 上其他 IBDV 毒株进行比较分析。结果表明,分离毒株与其他 IBDV 超强毒株的核苷酸相似性均超过 97.6%,氨基酸相似性均超过 99.3%,并且具有 222A、242I、279D、256I、284A、294I 和 299S 等超强毒株特征性氨基酸<sup>[15-17]</sup>,从分子水平说明 ZHA001 株为 IBDV 超强毒株;从进化树也可以看出,ZHA001 株与 8 个超强

毒的参考毒株位于同一个大的分支。致病性试验中,SPF 鸡感染率 10/10,死亡率 9/10,符合超强毒株特性<sup>[18]</sup>,与 VP2 基因序列分析和进化树分析一致。

分离 ZHA001 株的养鸡场在发生 IBD 前免疫过 B87 活疫苗,如果不是免疫失误,那么可能是超强毒突破疫苗保护所致,因为 IBDV 超强毒株能够突破高水平抗体的保护,导致鸡群高死亡率<sup>[1]</sup>。当然也不排除与抗原变异有关,ZHA001 株 VP2 第 212 位氨基酸(D→N),384 位氨基酸(V→I)发生改变,尤其第 212 位氨基酸位于 VP2 的第一亲水区(212 ~ 224AA),该区域氨基酸的改变可能引起 VP2 抗原性改变,造成抗原变异。这种改变是否会造成抗原的剧烈改变还需进一步研究。

本次从免疫传染性法氏囊病活疫苗的发病肉鸡群分离到一株 IBDV,命名为 ZHA001 株,经鉴定为超强毒株。本研究可为传染性法氏囊病的防控提供参考。

## 参考文献:

[1] Saif Y M. Disease of Poultry [M]. 12th Edition. Victoria: Blackwell Publishing, 2008; 185 - 208.

[2] Cosgrove A S. An apparently new disease of chickens; avian nephrosis [J]. Avian diseases, 1962, 6(3): 385 - 389.

[3] 周 蛟, 刘福致, 陈丽永, 等. 北京地区鸡传染性法氏囊病病原分离[J]. 中国兽医杂志, 1982, 7: 25 - 26.

Zhou J, Liu F Z, Chen L Y, *et al.* Isolation of infectious bursal disease virus (IBDV) in Beijing [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1982, 7: 25 - 26.

[4] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 578 - 587.

Yin Z, Liu J H. Animal Virology [M]. Beijing: Science Press, 1997: 578 - 587.

[5] Byaliss C D, Spies U, Shaw K. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2 [J]. J Gen Virol, 1990, 71: 1303 - 1312.

[6] 姜 楠, 王雨龙, 张文英, 等. 雪山草鸡感染传染性法氏囊病毒新型变异株的鉴定[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(5):

119 - 125.

Jiang N, Wang Y L, ZH W Y, *et al.* Identification of novel variant strain of infectious bursal disease virus in Xueshan chicken [J]. China Animal Health Inspection, 2021, 38 (5): 119 - 125.

- [7] Jack wood D H, Saif Y M. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses [J]. Avian Diseases, 1987, 31: 766 - 770.
- [8] 祁小乐, 高 立, 王笑梅. 传染性法氏囊病病毒的自然重组 [J]. 微生物学报, 2016, 56(5): 740 - 746.
- Qi X L, Li G, Wang X M. Naturally occurring reassortants of infectious bursal disease virus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(5): 740 - 746.
- [9] 于 雷. 传染性法氏囊病病毒高变区序列分析及 BC6/85 全基因测序及亚单位疫苗的研制 [D]. 北京: 中国兽药药品监察所, 2012.
- Yu Lei. Sequence analysis of the VP2 gene hypervariable region of infectious bursal disease virus and the complete genomic of IBDV BC6/85 with preliminary study of IBDV subunit vaccine [D]. Beijing: China Institute of Veterinary Drug Control, 2012.
- [10] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版三部 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 附录 25 - 26.
- National Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume III, 2020) [S]. Beijing: China Agricultural Press, 2020: Appendix 25 - 26.
- [11] 崔 平, 牛晓赛, 董新荣, 等. 蛋鸡源传染性法氏囊病病毒变异株的分离, 鉴定及攻毒保护试验 [J]. 中国家禽, 2020, 42(9): 35 - 39.
- Cui P, Niu X S, Dong X R, *et al.* Isolation, identification and immune challenge experiment of infectious bursal disease virus variant strains isolated from laying hens [J]. China Poultry, 2020, 42(9): 35 - 39.
- [12] Fan Linjin, Wu Tiantian, Altaf Hussain, *et al.* Novel variant strains of infectious bursal disease virus isolated in China [J]. Veterinary Microbiology, 2019, 230: 212 - 220.
- [13] 范林进, 王雨龙, 吴甜甜, 等. 我国传染性法氏囊病病毒新型变异株分析研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(11): 1164 - 1169.
- Fan L J, Wang Y L, Wu T T, *et al.* The prevalence of novel variant strains of infectious bursal disease virus in China [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41 (11): 1164 - 1169.
- [14] Mundt E. Tissue culture infectivity of different strains of

- infectious bursal disease virus if determined by distinct amino acids in VP2 [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 2067 - 2076.
- [15] Brown M D, Green P, Skinner M A, *et al.* VP2 sequence of recent European “very virulent” isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of “classical” strains [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75: 675 - 680.
- [16] 宇文延青, 高玉龙, 高宏雷, 等. 中国部分地区传染性法氏囊病毒分子流行病学调查[J]. *中国家禽*, 2009, 31(12): 11 - 14.
- Yuwen Y Q, Gao Y L, Gao H L, *et al.* Investigation on molecular epidemiology of infectious bursal disease in parts of China [J]. *China Poultry*, 2009, 31(12): 11 - 14.
- [17] Gallardo R A, Carrasco - Medanic R, Zhou Hao - zhe, *et al.* Effects of challenge with very virulent infectious bursal disease virus reassortants in commercial chickens [J]. *Avian Dis*, 2014, 58 (4): 579 - 586.
- [18] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2021 chapter 3. 12 infectious bursal disease ( Gumboro disease ) [ EB/OL ]. [https://www.oie.int/ileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.03.12\\_IBD.pdf](https://www.oie.int/ileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.12_IBD.pdf).

( 编辑:李文平 )