

传染性法氏囊病不同代次细胞毒免疫效果的研究*

崔言顺^{1,2}, 李建亮², 孙淑红², 杨萍萍², 姜世金², 崔治中², 张彦明^{1**}

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018)

Immune Effects of Different Generation Cellular Virus for Infectious Bursal Disease

CUI Yan-shun^{1,2}, LI Jian-liang², SUN Shu-hong², YANG Pin-pin², JIANG Shi-jin²,
CUI Zhi-zhong², ZHANG Yan-ming^{1**}

(1. College of Animal science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: An infectious bursal disease virus (IBDV), isolated from Dongying city in Shandong province, was propagated several generations in SPF embryos and then turned to cell culture. The chickens were immunized by 20th, 21st, and 25th generation cell viruses in different doses at the age of 7 d and 14 d, and then were challenged at the age of 35 d. The titers of antibody to IBDV were detected before inoculation and challenge. According to the titers of antibody against IBDV after inoculation, the morbidity and mortality after challenge, the ratios of immune organ to body weight, the damage of immune organ, the results demonstrated that all the viruses had good immunogenicity when the chickens were vaccinated at 14d with the dose of 3000 TCID₅₀ by the primary vaccine, and the chickens gained better immune protection. The 20th generation had durative pathogenicity to chickens when inoculated at 7d and caused immunosuppression to ND immune responses while 21st and 25th had transitory tissue damnification and immunosuppression. All these three generations had good immune protects when the chickens were inoculated at the age of 14d.

Key words: Infectious bursal disease virus (IBDV); Maternal antibody; ELISA; Immunosuppression

摘要: 将从山东省东营分离到的 1 株传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 野毒 (暂命名 IBDV SDDY 株, 经鉴定该株与 IBDV STC 株具有较高的同源性) 经 SPF 鸡胚传代, 然后转为细胞培养, 取第 20 代、21 代、25 代毒, 以 1 倍剂量 (3000 TCID₅₀/0.2 mL) 和 5 倍剂量不同的免疫剂量, 分别在 7 日龄、14 日龄对商品代海蓝褐蛋鸡进行免疫, 并于免疫前用 IBD-ELISA 试剂盒检测 IBDV 母源抗体水平, 于 35 日龄用传染性法氏囊病病毒超强毒 (very virulent Infectious Bursal Disease Virus, vvIBDV) GX 8/99 攻毒, 在攻毒前再次检测 IBDV 的抗体水平, 攻毒后观察记录各分组鸡的致病率和死亡率, 并计算免疫器官体重指数, 观察免疫器官的组织损伤情况。试验结果表明: 3 代毒都具有较高免疫原性, 但是 20 代毒仍具有较大的毒性, 7 日龄接种会引起法氏囊的萎缩, 造成持续的组织损伤; 21 代毒、25 代毒保护率高, 无免疫抑制, 是比较理想的疫苗来源; 7 日龄免疫较 14 日龄免疫更易造成组织损伤和免疫抑制, 14 日龄免疫较为合适。

关键词: 传染性法氏囊病病毒 (IBDV); 母源抗体; 酶联免疫吸附试验; 免疫抑制

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0050-05

鸡传染性法氏囊病 (IBD) 是由传染性法氏囊病病毒 (Infectious bursal disease virus, IBDV) 引起的一种急性、高度接触性传染病^[1], 主要侵害 3~6 周

龄的雏鸡和青年鸡。该病不但会使感染鸡致病死亡, 生产性能下降, 而且还会引起严重免疫抑制, 从而导致疫苗免疫失败, 国外的学者形象地称该病为

收稿日期: 2004-07-28, 修回日期: 2004-09-22

* 基金项目: 国家自然科学基金重大项目资助课题 (39893290 # -4)

作者简介: 崔言顺 (1959-), 男, 山东莱芜籍, 教授, 博士研究生, 主要从事分子病原学与兽医公共卫生学研究。

** 通讯作者: 张彦明 (1956-), 男, 陕西南郑籍, 教授, 博士, 主要从事分子病原学与兽医公共卫生学研究。

Corresponding author. Tel: 029-87092040 Email: ylzhangyanming@163.net

鸡的“艾滋病”^[2]。尤其是20世纪80年代中期以后出现的vvIBDV,能使感染鸡死亡率达到60%以上^[3]。给世界养禽业带来了严重的经济损失^[4-7]。本试验将我们分离的1株IBDV SDDY强毒株的不同代次细胞毒以不同的免疫程序对试验鸡进行免疫,于35日龄以IBDV超强毒GX8/99进行攻毒,通过观察传代毒对鸡的免疫保护作用,探讨IBDV在细胞培养传代过程中对鸡的毒性和免疫效果的变化,并探讨预防有母源抗体蛋鸡感染vvIBDV的免疫程序问题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

IBDV SDDY20代、21代和25代3种细胞毒,本室研制;参考苗(购自市场的国内商品IBDV中等毒力苗B87);攻毒所用毒株为IBDV超强毒株GX8/99鸡胚毒(山东省畜禽疫病防治工程技术研究中心提供);1日龄健康商品代海蓝褐蛋鸡(泰安岱岳种鸡场生产);IBD-ELISA诊断试剂盒(美国IDEXX公司生产);自动酶标仪(澳大利亚Tecan公司生产)。

1.2 实验分组

将540只鸡随机分成15组,其中14个为试验组,每组35只,对照组50只。在1周龄时以IBDV SDDY株20代毒1倍剂量(3000TCID₅₀/0.2mL)、20代毒5倍剂量、21代毒1倍剂量、21代毒5倍剂量、25代毒1倍剂量、25代毒5倍剂量、参考苗(B87)推荐剂量免疫前7个组,2周龄时以同样的方法免疫另外7个组,免疫方式为点眼滴鼻各0.1mL。全部鸡都在自然洁净环境中饲养。

1.3 母源抗体水平和免疫后抗体效价的检测

分别在雏鸡1周龄、2周龄免疫之前和5周龄攻毒之前采血,分离血清,按照IBD-ELISA试剂盒说明进行操作,最后用酶标仪进行测定,用Flock-check软件处理数据,抗体滴度以log₂表示,并计算各组抗体的阳性率和抗体滴度的平均值。

1.4 计算免疫器官指数及观察病理组织切片

分别在免疫接种后3d、7d、14d从各免疫组和对照组中随机取出5只鸡,剖杀,取其法氏囊称重,在42日龄时将所有的鸡剖杀,亦取法氏囊称重,计算免疫器官指数,并分别取一小块法氏囊组织保存于10%中性福尔马林中固定,常规法石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,观察法氏囊的病理组织学变化。囊重比和囊指数计算公式如下:

$$\text{囊重比} = (\text{法氏囊重} / \text{体重}) \times 1000$$

囊指数(BBIX) = 试验鸡囊重比/空白对照组鸡囊重比

当BBIX < 0.7时,判为法氏囊萎缩。

1.5 人工感染用毒株及攻毒途径

在35日龄对所有免疫鸡用IBDV超强毒株GX8/99进行攻毒,每只鸡接种超强毒株GX8/99病毒液0.2mL,点眼、滴鼻各0.1mL(60EID₅₀/0.2mL),同时用同一批次未经免疫的对照组作对照。连续7d观察所有鸡只的临床症状,记录鸡只的发病和死亡情况,计算发病率和死亡率。

1.6 统计学处理

应用SPSS11.0统计软件分析数据。

2 结果

2.1 母源抗体水平与免疫后的IBDV抗体效价

利用美国IDEXX公司生产的IBD-ELISA试剂盒检测抗体效价,测得7日龄(210只)和14日龄(210只)的IBDV母源抗体效价和35日龄(240只)攻毒前各组的IBDV的抗体效价,见表1。

从表1可以看出商品鸡的IBD母源抗体在不同时期的变化。在1周龄时,商品鸡具有较高的母源抗体水平,而且阳性率比较均匀,最高的达83.3%,最低的也有70%,在2周龄时,各免疫组阳性率普遍下降,母源抗体效价也在下降,最高的才有40%。免疫以后的鸡,在35日龄攻毒之前,抗体效价都有所上升,各组的阳转率都达到了100%,这3代毒都具有较好的免疫原性。同一时间免疫,20代毒免疫原性较差,与其它组比较差异性显著($p < 0.05$),21代最强,25代次之,但是差异并不显著($p > 0.05$)。从总体上说,5倍剂量的免疫剂量要优于1倍剂量的免疫,但是差异也不显著($p > 0.05$)。

2.2 3种疫苗免疫后对免疫器官的影响

2.2.1 囊重比与囊指数:分别在免疫接种后3d、7d、14d从各免疫组和对照组中随机取出5只鸡,扑杀,取其法氏囊观察病变并称重,计算囊重比和囊指数,结果见表2。

从表2可以看出,雏鸡在1周龄免疫接种后,商品疫苗和所有的鸡胚毒都引起法氏囊的萎缩(BBIX < 0.7),这种萎缩在2周之内尚不能恢复。其中20代毒引起的萎缩最为严重。这可能是因为该细胞毒和商品疫苗B87都属于中等毒力的疫苗,接种小日龄雏鸡容易引起免疫器官法氏囊的损伤。同样的疫苗在2周龄接种,大部分只是引起可逆的萎缩,即经过两周的时间,法氏囊又能恢复到正常的大小,组织切片观察法氏囊组织结构又恢复正常。

表 1 IBDV 母源抗体水平及免疫接种后抗体效价检测

Vaccination time	Virus Generation	Virus Doses (TCID ₅₀ /0.2mL)	ET of 1		ET of 2		ET of 5	
			weeks(log ₂)	Ratio of Positive (%)	weeks(log ₂)	Ratio of Positive (%)	weeks(log ₂)	Ratio of Positive (%)
1 weeks	20th	3 000	11.8 ±0.9	80.0	-	-	10.9 ±0.9	100
		15 000	11.2 ±0.5	76.7	-	-	11.1 ±0.6	100
	21st	3 000	11.4 ±0.5	83.3	-	-	11.5 ±0.6	100
		15 000	11.5 ±0.4	80.0	-	-	11.8 ±0.6	100
	25th	3 000	11.2 ±0.7	70.0	-	-	11.3 ±0.8	100
		15 000	11.5 ±0.6	83.3	-	-	11.7 ±0.9	100
	B87	Commended	11.6 ±0.6	80.0	-	-	11.9 ±0.7	100
	2 weeks	20th	3 000	-	-	9.1 ±0.9	40.0	11.0 ±0.5
15 000			-	-	9.0 ±0.6	33.3	11.1 ±0.4	100
21st		3 000	-	-	8.8 ±0.7	33.3	11.9 ±0.6	100
		15 000	-	-	9.1 ±0.5	36.7	11.8 ±0.6	100
25th		3 000	-	-	8.9 ±0.5	33.3	11.5 ±0.5	100
		15 000	-	-	9.4 ±0.7	40.0	11.7 ±0.7	100
B87		Commended	-	-	9.2 ±0.4	36.7	11.6 ±0.6	100
Control				-	-	9.2 ±0.5	36.7	7.6 ±0.8

Note: In ELISA test, the titers > 396 were judged as positive according to the instruction of the commercial kit. It is to say that when titer is larger than 8.629 log₂, the result is positive. The sign of "-" means that the index was not be measured. ET means ELISA titers.

表 2 IBDV SDDY 株不同代次毒引起雏鸡的囊指数变化

Table 2 BBIX of chicken immunized by different generation viruses

Vaccination time	Virus Generation	Virus Doses (TCID ₅₀ /0.2mL)	Bursa weight/body weight			BBIX		
			3d	7d	14d	3d	7d	14d
7 days	20th	3 000	0.95	1.01	2.22	0.42	0.33	0.46
		15 000	0.79	1.17	2.32	0.35	0.38	0.48
	21st	3 000	1.20	1.81	3.09	0.53	0.59	0.64
		15 000	1.06	1.69	3.04	0.47	0.55	0.63
	25th	3 000	1.18	1.72	2.99	0.52	0.56	0.62
		15 000	1.31	1.87	2.99	0.58	0.61	0.62
	B87	Commended	1.22	1.69	2.99	0.54	0.55	0.62
	Control			2.26	3.07	4.83	1	1
14 days	20th	3 000	2.52	3.73	4.83	0.59	0.77	0.95
		15 000	2.73	3.83	4.93	0.64	0.79	0.97
	21st	3 000	2.65	3.64	4.67	0.62	0.75	0.92
		15 000	2.35	4.12	4.93	0.55	0.85	0.97
	25th	3 000	2.69	3.69	4.88	0.63	0.76	0.96
		15 000	2.61	3.78	4.78	0.61	0.78	0.94
	B87	Commended	2.52	3.66	5.12	0.59	0.75	1.01
	Control			4.27	4.85	5.08	1	1

Note: 3d,7d,14d mean 3 days,7days,14days after vaccination respectively.

2.2.2 免疫器官的组织损伤:免疫接种之后,法氏囊见有出血点,胸腺有出血点,脾脏显著增大。病理组织切片表明,各种疫苗都造成组织损伤,但损伤程度不同。20代毒免疫组,法氏囊组织损伤尤为严重,表现为滤泡内形成囊状空腔,淋巴滤泡体积缩小,淋巴滤泡内淋巴细胞坏死,间隙有结缔组织增生,且有淋巴细胞浸润,出血。21代毒、25代毒免疫组及商品疫苗组,组织病变较轻,经过动态观察,接种后造成的组织损伤,在接种后14d内可以恢复,即组织损伤是可逆的。1周龄免疫,20代毒造成的组织损伤在4周之内尚不能恢复。1周龄免疫的试验组中,20代毒、21代毒、25代毒和商品疫苗造成的组织损伤都比2周龄免疫组严重,其中20代毒造成的病理损伤经过4周时间仍不能恢复,其造成的损伤可能是永久性的,说明过早地接种疫苗,可造成免疫器官的损伤。不同剂量免疫造成的差别不显著。

2.3 不同代次细胞毒对攻毒的免疫保护作用

在35日龄时,用vvIBDV GX 8/99对试验鸡进行攻毒,攻毒后连续观察7d,记录发病情况和死亡情况。其免疫保护作用见表3。

攻毒后第3d,部分鸡开始发病,表现为典型的法氏囊病症状,发病鸡精神高度沉郁,颈部羽毛蓬乱,全身羽毛松乱、无光泽,皮肤干燥,采食量下降,饮水增多,排白色或黄色水样粪便,有的排奶油样粪便。发病鸡自啄肛门羽毛,颈、躯干部震颤,步态不稳,头下垂,闭目缩颈,鸡消瘦,脱水,最后衰竭而死。病死鸡剖杀后可见胸腺萎缩,脾脏出血,胸肌和腿肌片状或条纹状出血,肌胃和腺胃交界处有条状出血点,肾水肿,法氏囊水肿和出血,浆膜覆盖淡黄色胶样渗出物,囊由正常的白色变为奶油黄色,严重者法氏囊肿大为正常体积的2~3倍。但是在发病后期,法氏囊呈现严重萎缩。病鸡呈尖峰式死亡,攻毒后

3~5d为死亡高峰期。7日龄20代毒两免疫组出现鸡只死亡,死亡率分别为10%和15%,其余各免疫组攻毒后没有鸡死亡,说明这些疫苗具有很高的免疫保护作用,但是发病率有所不同,7日龄免疫接种攻毒后的发病率普遍高于14日龄免疫接种,而同一时间接种20代毒免疫组发病率较其它组高。接种不同剂量则发病率和死亡率差异不大。

2.4 对新城疫疫苗免疫应答的免疫抑制

7日龄接种IBD疫苗后,9日龄同时进行ND

油乳剂灭活苗和系苗接种,20代毒引起较强的免疫抑制($P < 0.05$),直到接种后4周,HI抗体效价仍不能上升到同期对照组的水平。21代毒和25代毒表现为一过性的免疫抑制,在接种后3周左右,HI抗体效价已经与对照组无显著差异($P > 0.05$),参考苗B87没有表现出明显的免疫抑制(表4)。14日龄接种IBDV疫苗组在9日龄接种ND疫苗后,IBDV细胞毒没有表现出对NDV免疫应答的抑制作用(表5)。

表3 3代细胞毒对攻毒的免疫保护作用

Table 3 Protective efficacy against vvIBDV in chickens vaccinated with three kinds of viruses

Vaccination Time	Virus Generation	Virus doses (TCID ₅₀ /0.2mL)	Inoculated Number	Incidence of disease	Death	Morbidity (%)	Mortality (%)
7 days	20th	3 000	20	10	2	50.0	10.0
		15 000	20	12	3	60.0	15.0
	21st	3 000	20	7	0	35.0	0
		15 000	20	8	0	40.0	0
	25th	3 000	20	8	0	40.0	0
		15 000	20	6	0	30.0	0
14 days	B87	Commended	20	4	0	20.0	0
	20th	3 000	20	4	0	20.0	0
		15 000	20	6	0	30.0	0
	21st	3 000	20	2	0	10.0	0
		15 000	20	2	0	10.0	0
	25th	3 000	20	3	0	15.0	0
		15 000	20	3	0	15.0	0
	B87	Commended	20	3	0	15.0	0
Control			20	9	16	80.0	45.0

表4 9日龄接种ND疫苗后各组的HI效价

Table 4 HI antibody titers post vaccination of NDV (log₂)

Generation	Virus doses (TCID ₅₀ /0.2mL)	Vaccination post 1 weeks	Vaccination post 2 weeks	Vaccination post 3 weeks	Vaccination post 4 weeks
20th	3 000	3.2 ±0.2	3.8 ±0.3	4.0 ±0.3	4.2 ±0.7
	15 000	3.4 ±0.3	3.6 ±0.4	3.8 ±0.2	4.0 ±0.4
21st	3 000	3.4 ±0.4	3.8 ±0.5	5.2 ±0.4	4.8 ±0.7
	15 000	3.6 ±0.2	4.0 ±0.5	5.0 ±0.4	5.1 ±0.3
25th	3 000	3.6 ±0.5	4.8 ±0.3	5.1 ±0.8	4.8 ±0.6
	15 000	3.4 ±0.4	4.6 ±0.6	5.3 ±0.3	5.0 ±0.5
B87	Commended	3.6 ±0.5	4.8 ±0.6	5.2 ±0.4	4.8 ±0.7
Control		3.8 ±0.4	5.0 ±0.5	5.4 ±0.6	5.0 ±0.4

表5 14日龄接种IBD细胞毒后各组的HI效价

Table 5 HI antibody titer post vaccination of IBDV (log₂)

Generation	Virus doses (TCID ₅₀ /0.2mL)	Vaccination post 1 weeks	Vaccination post 2 weeks	Vaccination post 3 weeks
20th	3 000	4.9 ±0.3	5.4 ±0.4	4.8 ±0.2
	15 000	5.0 ±0.2	5.3 ±0.3	5.0 ±0.3
21st	3 000	5.2 ±0.5	5.6 ±0.7	5.1 ±0.5
	15 000	5.1 ±0.3	5.4 ±0.6	4.9 ±0.6
25th	3 000	4.8 ±0.6	5.3 ±0.6	5.0 ±0.4
	15 000	4.9 ±0.4	5.5 ±0.3	5.2 ±0.5
B87	Commended	4.8 ±0.3	5.6 ±0.7	5.2 ±0.6
Control		5.0 ±0.5	5.4 ±0.6	5.0 ±0.4

3 讨论

20世纪80年代末以后,我国先后分离到vvIB-

DV^[8-10]。由于vvIBDV与经典疫苗株在抗原上并无差异,从理论上讲,经典疫苗能提供对vvIBD保护力。本试验利用从地方分离到的IBDV SDDY株先通过

SPF 鸡胚传代,然后转到 CEF 培养,选其中的第 20 代、第 21 代、第 25 代毒,对商品代蛋鸡进行免疫接种,然后用超强毒株 GX8/99 攻毒,结果有几个免疫程序可以提供 100% 的保护率,而且造成的病理损伤是可逆的。这表明只要选择合适的免疫接种时间和接种剂量,该弱毒苗免疫商品代蛋鸡后能够提供对超强毒 IBV GX 8/99 攻毒的 100% 的保护率。

制定免疫程序时,必须充分考虑到母源抗体的影响。本试验应用美国 IDEXX 公司生产的 IBV-ELISA 诊断试剂盒,严格按照其使用说明书对所有鸡进行了抗体滴度的准确检测。在 1 周龄时,商品鸡具有较高的 IBV 母源抗体水平,各免疫组都有较高的阳性率,而且有的抗体效价很高,此时不适合接种疫苗。2 周龄时,抗体滴度明显降低。攻毒后,除 7 日龄 20 代毒两免疫组外,别的免疫组都没有鸡只死亡,但是试验结果表明,2 周龄免疫组发病率低于 1 周龄免疫组,攻毒前的抗体效价与免疫保护力成正相关。Lucio 等也曾经(1979)用中和试验,Fahney 等(1987)用 ELISA, Nakamura 等(1994)用乳胶凝集试验证实抗体与攻毒保护有明显的相关性^[11]。从免疫组接种后的抗体效价看,5 倍剂量免疫组的效价都要高于 1 倍剂量免疫组,但是差异并不显著($P > 0.05$)。

20 代毒由于毒性较强,对法氏囊的损伤较大,影响了 B 细胞在法氏囊分化成熟后向外周组织扩散的能力,从而影响了 IBV 的免疫应答,引起对 ND 疫苗体液免疫的抑制,出现抗体效价低的现象。

据崔治中报道,人工接种 vvIBV GX 8/99 于 4 周龄和 5 周龄的商品代蛋鸡,死亡率分别为 81.6 ~ 94.3% 和 93.9 ~ 94%^[10]。该试验中,攻毒用的病毒剂量较其低,故对照组死亡率只有 45%。7 日龄接种,虽然有些代次细胞毒能达到 100% 的保护率,但是会引起法氏囊不可逆的萎缩,14 日龄接种时,21 代毒、25 代毒虽然会引起免疫器官暂时的萎缩,但是确实能够保护免疫鸡 100% 免于死亡,从免疫原性看是一种合适的疫苗来源,但是要制作成疫苗,还需要作进一步的动物回归试验,观察其遗传稳定性。有人建议在 7 日龄或者更提前接种 IBV 疫苗,以使雏鸡更早地接触弱毒,与环境中的野毒进行竞争。本试验在免疫原性、造成的组织损伤、引起免疫抑制等方面的结果都表明,7 日龄接种 IBV 疫苗不如 14 日龄免疫效果理想,这可能与所用疫苗的毒力有关。因此,在计划 7 日龄接种疫苗时,应该弄清所用疫苗的毒力,以免引起免疫抑制和组织损伤。

目前,IBD 的防制主要依靠疫苗接种。现在新

兴的重组亚单位疫苗、病毒样颗粒、重组活载体疫苗、高压失活病毒、核酸疫苗等由于免疫原性、保护性及生产成本等诸方面的因素,目前尚未广泛应用。新技术新方法在未来较长一段时间内仍难以取代常规疫苗^[12]。本试验选择出现细胞病变后的几代传代毒,作为疫苗进行免疫,并应用不同的免疫剂量和免疫时间与一中等毒力商品疫苗进行比较,发现从 20 代毒到 21 代毒,在动物试验上是一个转折点。20 代毒具有一定的毒性,使用后造成免疫器官严重萎缩,而且 4 周之内尚不能恢复。21 代毒、25 代毒引起可逆的、一过性的病理损伤,免疫原性也比较好,所以 21 代毒到 25 代毒都是比较合适的选择。野毒株在细胞上传代的过程中,免疫原性和致病性的变化是否与 IBV 基因序列相关,我们正在研究之中。

参考文献

- [1] Lukert P D, Saif Y M. Diseases of Poultry[M]. Tenth edition, edited by Calnek B W, Iowa State University Press, Ames, USA, 1997. 721-738.
- [2] 曾祥伟,王笑梅,高宏雷,等. 传染性法氏囊病超强毒 Gx 株的致病研究[J]. 中国预防兽医学报[J], 2003, 25:140-144.
- [3] Chetle N, Stuart J C, Wyeth P J. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia[J]. Vet Rec, 1989, 125:271-272.
- [4] Di Fabio J, Rossini L I, Etteradossi N, et al. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil[J]. Vet Rec, 1999, 145:203-204.
- [5] Cao Y C, Yeung W S, Law M, et al. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains[J]. Avian Dis, 1998, 42:340-351.
- [6] Chen H Y, Zhou Q, Zhang M F, et al. Sequence M analysis of the VP2 hyper variable region of nine infectious bursal disease virus isolates from mainland China[J]. Avian Dis, 1998, 42:762-769.
- [7] To H, Yamaguchi T, Nguyen N T. Sequence comparison of the VP2 variable region of infectious bursal disease virus isolates from Vietnam[J]. Vet Med Sci, 1999, 61:429-432.
- [8] 李德山,武志强,陈冠春,等. 鸡传染性法氏囊病超强毒株的分离和初步鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1991, (6):3-6.
- [9] 曹永长,毕英佐,梁志清,等. 超强传染性法氏囊病毒毒株宿主保护抗原的分子特征[J]. 中国兽医学报, 1998, 18:521-526.
- [10] 崔治中,孙淑红,单忠芳,等. 鸡传染性法氏囊病病毒超强毒株 GX8/99 株的致病性[J]. 病毒学报[J], 2002, 18:162-166.
- [11] 黄忠,伍惠卿,杜伟贤,等. 应用 ELISA 评价鸡传染性法氏囊病的免疫效果[J]. 中国兽医杂志, 1997, 23:8-9.
- [12] 于涟,黄耀伟,丁红梅,等. 新技术防治传染性法氏囊病的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2001, 21:413-420.