

张晗玥, 杨盛华, 李立, 等. 1 株鸡源呼肠孤病毒的分离鉴定与致病性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (11): 80-85.

ZHANG H Y, YANG S H, LI L, et al. Isolation, characterisation and pathogenicity analysis of a strain of chicken-derived avian reovirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (11): 80-85.

# 1 株鸡源呼肠孤病毒的分离鉴定与致病性研究

张晗玥<sup>#</sup>, 杨盛华<sup>#</sup>, 李立, 郭亚伟, 余水兰, 尹丽娟<sup>\*</sup>, 蔺文成<sup>\*</sup>

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州, 510642)

**摘要:** 为了确定福建省某商品肉鸡场出现的腿病病原, 同时了解其病原的遗传进化特征和致病特点, 对送检病鸡组织样品进行病原分离, 并经 PCR 检测、测序分析等方法进行鉴定。结果: 成功分离到 1 株呼肠孤病毒 (ARV), 命名为 FJZQH23。该分离株在鸡肝癌细胞 (LMH) 上能够良好增殖, 且有明显的细胞病变。ARV 主要保护性抗原基因  $\sigma$ C 的遗传进化分析结果显示, 分离株 FJZQH23 与 I 型参考株 4599 隶属同一分支, 两者亲缘关系较近。基于  $\sigma$ C 基因的氨基酸序列同源性分析发现, 分离株 FJZQH23 与参考株 4599 相似度较高为 86.9%, 而与疫苗株 S1133 相似度为 80.1%。对 14 日龄肉鸡致病性试验结果表明, 分离株 FJZQH23 能够引起跗关节和脚垫出血。研究表明, 基因 I 型 ARV 感染为该肉鸡场的发病病原。本研究结果为该肉鸡场 ARV 感染的综合防控措施制定提供了依据。

**关键词:** 鸡呼肠孤病毒; 分离; 鉴定; 肉鸡; 致病性

中图分类号: S813 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)11-0080-06

## Isolation, characterisation and pathogenicity analysis of a strain of chicken-derived avian reovirus

ZHANG Hanyue<sup>#</sup>, YANG Shenghua<sup>#</sup>, LI Li, GUO Yawei, YU Shuilan, YIN Lijuan<sup>\*</sup>, LIN Wencheng<sup>\*</sup>

(College of Animal Science of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** In order to determine the pathogen of leg disease in a commercial broiler farm in Fujian Province, and at the same time to understand the genetic evolutionary features and pathogenic characteristics of the pathogen, this study was conducted to isolate the pathogen from the tissue samples of diseased chickens sent for examination, and a strain of avian reovirus (ARV) named FJZQH23 was successfully isolated, which was identified by PCR assay, sequencing analysis, etc. The results of genetic evolutionary analysis showed that the main protective antigen gene  $\sigma$ C of ARV was able to proliferate well on LMH cells. The isolate was able to proliferate well on LMH cells with obvious cytopathic lesions. The genetic evolution analysis of  $\sigma$ C, the main protective antigen gene of ARV, showed that the isolate FJZQH23 belonged to the same branch as the type I reference strain 4599, and the two strains were relatively close to each other. Based on the amino acid sequence homology analysis of the  $\sigma$ C gene, the isolate FJZQH23 was 86.9% similar to the reference strain 4599 and 80.1% similar to the vaccine strain S1133. Pathogenicity tests on 14-day-old broilers showed that the isolate FJZQH23 was able to cause bleeding symptoms in the hock and foot pads. This study demonstrated that genotype I ARV infection was the pathogenic agent of the disease in this broiler farm, which provides a reference for the development of comprehensive preventive and control measures.

**Keywords:** avian reovirus; isolation; identification; broilers; pathogenicity

禽呼肠孤病毒 (avian reovirus, ARV) 是呼肠孤病毒科正呼肠孤病毒属成员<sup>[1-2]</sup>, 为双股 RNA 病毒, 无囊膜, 直径大小 70~80 nm<sup>[3]</sup>。研究表明, 纯化会

影响 ARV 病毒粒子的构成, 被纯化的病毒粒子只含有 RNA 和蛋白质<sup>[4]</sup>。ARV 病毒基因组较为复杂, 由 10 个基因片段组成, 其中 S1 基因片段中的  $\sigma$ C 基因编码一个较小的外壳蛋白, 参与病毒侵入细胞的过程, 由于免疫接种后的选择压力,  $\sigma$ C 蛋白成为 ARV 中最容易突变的蛋白<sup>[5-7]</sup>。 $\sigma$ C 蛋白的变异可能会对 ARV 致病力产生影响<sup>[8]</sup>。有研究报道, 在转染的过程中,  $\sigma$ C 蛋白的表达可能会导致细胞的凋亡<sup>[9]</sup>。

ARV 具有高度传染性和致病性, 在全球如中国<sup>[7]</sup>、伊朗<sup>[10]</sup>、韩国<sup>[11]</sup>和日本<sup>[12]</sup>等地均有报道。近几年, 鸡群中病毒性关节炎的发病率持续上升, 并

收稿日期: 2024-07-22; 修回日期: 2024-09-07

基金项目: 云浮市科技计划项目 (231106177915638)

第一作者: 张晗玥, 女, 学士; 杨盛华, 男, 蒙古族, 硕士。<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup> 通信作者: 蔺文成, 博士, 教授, 主要从事动物健康养殖与安全生产研究, E-mail: wenchenglin@scau.edu.cn; 尹丽娟, 博士, 高级兽医师, 主要从事动物健康养殖与安全生产研究, E-mail: 1016180911@qq.com。

且每年都在增加<sup>[13]</sup>。这表明,由 ARV 引起的病毒性关节炎已经逐渐发展成为危害养禽业发展最重要的疾病之一,有可能对我国畜牧业造成严重的经济损失。ARV 感染后会导致家禽出现病毒性关节炎、发育迟缓、肝炎、心肌炎和骨质疏松等疾病<sup>[14]</sup>。临床症状以关节肿胀为主要特征,降低鸡的生产性能,对禽类养殖业造成影响。由于 ARV 多节段基因片段的复杂性,所以更容易产生基因重组,从而导致 ARV 变异株的产生<sup>[15]</sup>。

基于  $\sigma$ C 基因位点可将 ARV 分为 6 种基因型,且不同的基因型可能存在着致病力差异。2019 年, Zhang 等<sup>[7]</sup>对中国提取的 18 个 ARV 毒株中的  $\sigma$ C 基因进行了遗传进化的研究后,将 ARV 基因划分为 6 个不同的基因型,同时使用获得的分离株与 S1133 疫苗株进行动物感染试验,并对比其致病情况,发现 III 型的 GX150816 分离株与 S1133 疫苗株的致病力相当, I 型的 RPT-74 分离株致病力较强, VI 的 SD150806 分离株致病力最高。这都表明  $\sigma$ C 基因在 ARV 的致病力方面发挥着相应的作用<sup>[9,16-17]</sup>。目前 ARV 疫苗在家禽中有着广泛的生产和应用,但由于 ARV 具有易突变的特点,导致商品化疫苗并不能对接种鸡群进行完全的免疫保护,依然威胁着全球家禽产业的发展<sup>[18-19]</sup>。为应对这一情况,需进行 ARV 流行病学调查,从生物学特性角度分析 ARV,了解其致病特点,为 ARV 感染的综合防控提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

病毒核酸提取试剂盒购自标允生物科技(广东)有限公司,一步法 RT-PCR 试剂盒和探针法 RT-PCR 试剂盒均购自 TaKaRa(大连)有限公司,细胞培养液 DMEM 购自 Gibco(美国)公司,胎牛血清购自 LONSERA(上海)有限公司, PBS 粉末购自 Biosharp 生物科技有限公司,生理盐水购自广州硕普生物科技有限公司,琼脂糖购自赛默飞世尔科技公司。

### 1.2 细胞及试验动物

鸡肝癌细胞(leghorn male hepatoma cell, LMH cell)(CRL-2117)购于美国菌种保藏中心(ATCC);14日龄818肉杂鸡购自温氏食品集团股份有限公司的簕竹榄根鸡场。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品来源与处理

样品来自福建某肉鸡场,14日龄818肉杂鸡。患病鸡出现跛行、跗关节肿胀变形等症状。将获得的患病鸡腿进行剖检,取肌腱、关节软骨等组织加入适

量生理盐水置于研磨机上4℃进行匀浆处理,充分研磨后,于-80℃超低温冰箱反复冻融3次。将上述处理样品置于离心机12000 r/min,离心6 min,放于-20℃冰箱中储存备用。

#### 1.3.2 病毒分离

无菌操作收取1.3.1上清液,通过0.22 μm的滤器过滤除菌,接种在LMH细胞中,同时设立空白对照组。置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养3~5 d。每日观察细胞病变情况,当细胞病变达80%~85%时,冻融3次,在4℃离心机中以3000 r/min离心25 min去除细胞碎片,吸取上清液,冷冻保存。

使用PBS将病毒液进行10倍稀释,设立10<sup>-3</sup>~10<sup>-9</sup>共7个稀释度,每个稀释度的病毒液分别接种在96孔板的LMH细胞中,接种量为0.1 mL/孔,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养5 d。每日观察并记录细胞病变的情况,按Reed-Muench方法计算半数组织细胞感染量(TCID<sub>50</sub>)。

#### 1.3.3 病毒的RT-PCR鉴定

取细胞培养后的病毒液,根据核酸抽提试剂盒说明书提取病毒核酸,然后按照TaKaRa的一步法RT-PCR试剂盒说明书进行反转录。使用针对ARV的特异性引物进行检测,引物由本实验室设计,具体为ARV-F(5'-AGTATTTGTGAGTACGATTG-3')和ARV-R(5'-GGCGCCACACCTTAGGT-3')。反应体系25 μL: PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 1 μL, 2×1 Step Buffer 12.5 μL, ARV-F 1 μL, ARV-R 1 μL, RNase Free ddH<sub>2</sub>O 7.5 μL, 模板2 μL。反应程序为:50℃ 30 min; 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 60 s, 32个循环; 72℃ 10 min, 4℃终止。RT-PCR扩增产物使用1%琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统进行分析,将琼脂糖凝胶电泳后条带正确的样品送往广州华大基因科技有限公司进行测序。

#### 1.3.4 $\sigma$ C蛋白基因序列测定及进化分析

使用DNASTAR中的Seqman软件将1.2.3中的测序结果进行拼接和整理。在NCBI上下载ARV参考毒株基因组与获得整理后的测序结果进行比对分析,具体网址如下(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>),参考毒株信息如表1所示。将获得的所有基因序列用MEGA 7.0分析软件中的ClustalW方法进行多序列比对,同时进行氨基酸位点分析,再使用邻位相接法(Neighbor-Joining),设置自展值检测重复次数为1000次,其他设置采用系统默认,进行 $\sigma$ C基因的系统发育分析并构建进化树。此外,运用MegAlign软件分析各毒株间 $\sigma$ C基因高变区的核苷酸和氨基酸序列同源性。

表 1 ARV 参考毒株信息

名称	基因型	登录号
MS01	I	KY860636
526	I	KF741702
1733	I	KF741712
C78	I	KF741722
S1133	I	KF741762
T-98	I	EF057398
4599	I	KX398298.1
PHC-2020-0545	II	MW174790
Reo-PA-Turkey-22342-13	II	KP173689
D1007	II	KR476804
AHZJ19	III	OK077999
Reo-PA-Layer-01224A-14	III	KT428304
K1600657	IV	MK583337
SDYT2020	IV	MW394462
LY383	V	MF183217
SD26	V	MW244848
3211-V-02	VI	KX398278
03200	VI	KP727785

### 1.3.5 ARV 病毒感染试验

将 28 只 14 日龄健康状况一致的肉鸡平均分为对照组和攻毒组。对照组单侧脚垫注射 0.2 mL 生理盐水；攻毒组使用获得的病毒分离株，采取单侧脚垫注射方式进行攻毒，剂量为 0.2 mL ( $10^6$  TCID<sub>50</sub>)。此后每天观察记录鸡只的临床症状。于攻毒后 10 d 将剩余鸡全部解剖，观察关节、腱鞘和脚垫病变（炎症、增生、出血和黏液等症状）。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床诊断及剖检病变

福建某肉鸡场送检的患病鸡出现跛行、跗关节肿胀变形等症状，剖检可见关节腔内出血（图 1）。

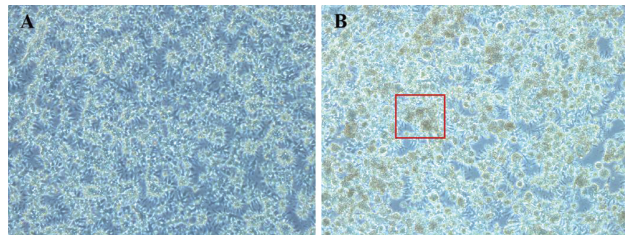


A. 跛行；B. 跗关节肿胀变形；C. 关节腔内出血。

图 1 患病鸡临床症状及剖检病变

### 2.2 病毒分离

将组织研磨液过滤后接种 LMH 细胞，连续盲传 3 代，于接种 48 h 后，LMH 细胞发生病变，出现细胞聚团、细胞粘连和脱落现象（图 2）。

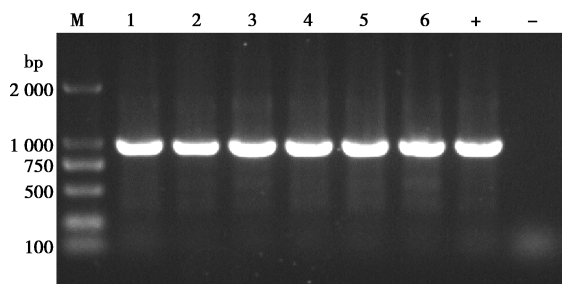


A. 正常细胞状态；B. 分离毒感染 LMH 细胞 48 h，红框内为细胞聚团、细胞粘连和脱落。

图 2 分离毒株感染 LMH 细胞后的细胞病变（100×）

### 2.3 RT-PCR 检测

使用 ARV 引物进行检测鉴定，部分结果如图 3 所示，条带大小为 1 088 bp，符合预期。同时，阳性对照出现与样品大小一致的条带，且阴性对照无特异性条带，表明成功分离到 ARV，将分离株命名为 FJZQH23。



M. DNA Marker; 1-6. ARV 样品；+. 阳性对照；-. 阴性对照。

图 3 分离毒 σC 基因 PCR 检测

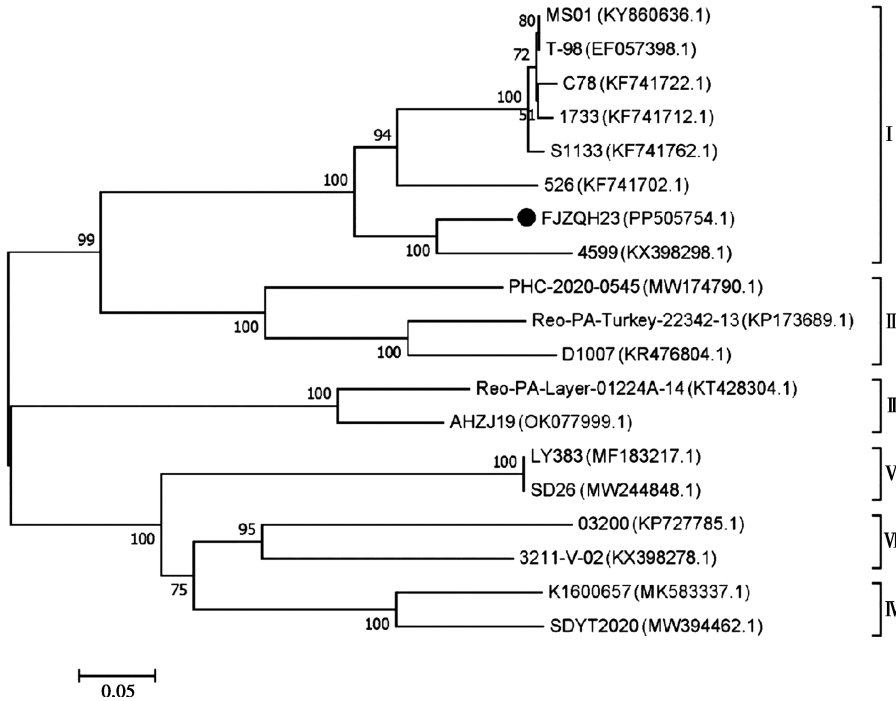
### 2.4 ARV 分离株 σC 基因遗传进化分析

为了解本研究中所获得的 ARV 分离株与国内外其他代表分离株的遗传进化情况，使用 MEGA 软件对本研究获得的分离株 FJZQH23 与 18 株参考毒株序列进行遗传进化分析（图 4）。结果表明，本研究所获分离株 FJZQH23 与 I 型代表株 4599 在同一分支，表明其具有较近的亲缘关系，与同为 I 型的 MS01 株亲缘关系较远。同时，与其他基因型的参考株亲缘关系较远。

使用 MegAlign 软件对分离株 FJZQH23 与 18 株参考毒株序列进行序列同源性分析。σC 基因核苷酸同源性分析显示（图 5A），FJZQH23 株与参考株 4599 的核苷酸相似度最高为 85.6%，与疫苗株 S1133 的核

昔酸相似度为 77.5%，与参考株 03200 的相似度最小为 53.1%。 $\sigma$ C 基因氨基酸同源性分析显示（图 5B），FJZQH23 株与参考株 4599 的氨基酸相似度最高为 86.9%，氨基酸序列存在 42 个突变位点；与疫

苗株 S1133 的氨基酸相似度为 80.1%，氨基酸序列存在 65 个突变位点；与参考株 SDYT2020 的氨基酸相似度最低为 50.2%。



● 为本研究所获分离株。

图 4 FJZQH23 分离株  $\sigma$ C 基因氨基酸序列遗传进化分析

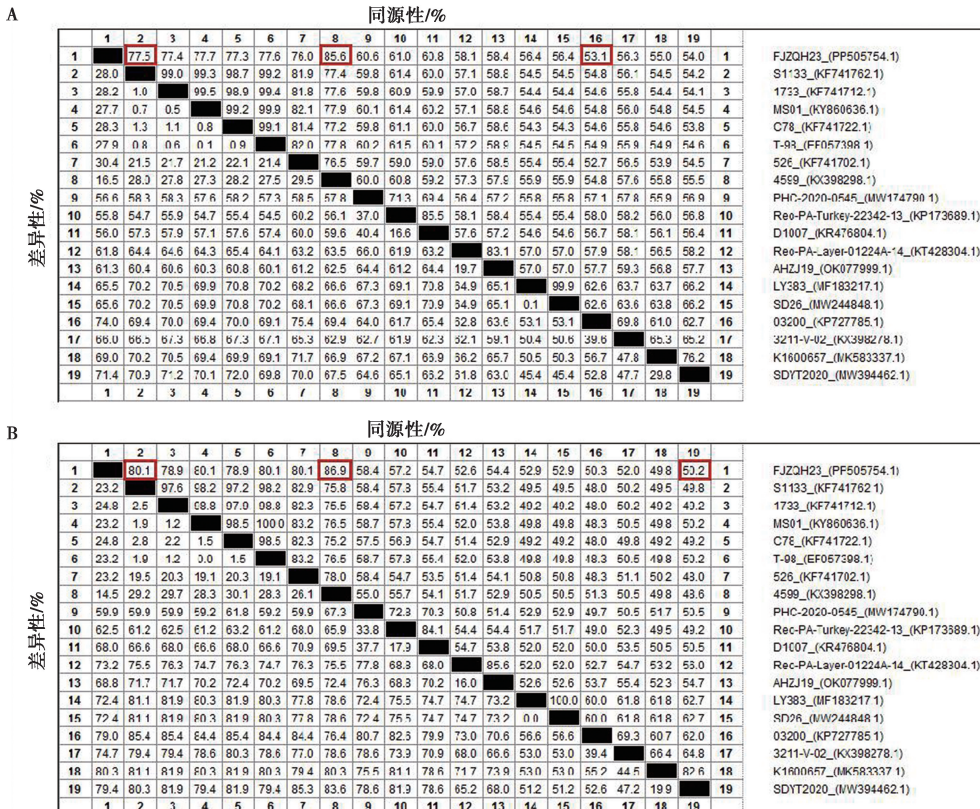


图 5 FJZQH23 分离株  $\sigma$ C 基因核苷酸 (A) 与氨基酸 (B) 序列比对分析

## 2.5 ARV 分离株对肉鸡的致病性试验

攻毒后每天观察各组试验鸡临床症状, 对照组表现正常 (图 6A), FJZQH23 株攻毒组试验鸡出现脚垫肿胀、关节变色等临床症状 (图 6B)。临床症状统计显示, 跗关节和脚垫发病率分别为 85.7% (12/14) 和 100% (14/14)。于攻毒后 10 d, 对所有试验鸡进行剖检观察, 结果显示, 对照组无病变 (图 6C), 而攻毒组试验鸡出现关节炎、腱鞘炎, 脚垫增生、出血、黏液等剖检变化 (图 6D)。对所有鸡只剖检病变结果统计显示, 跗关节和脚垫发病率分别为 92.8% (13/14) 和 100% (14/14)。

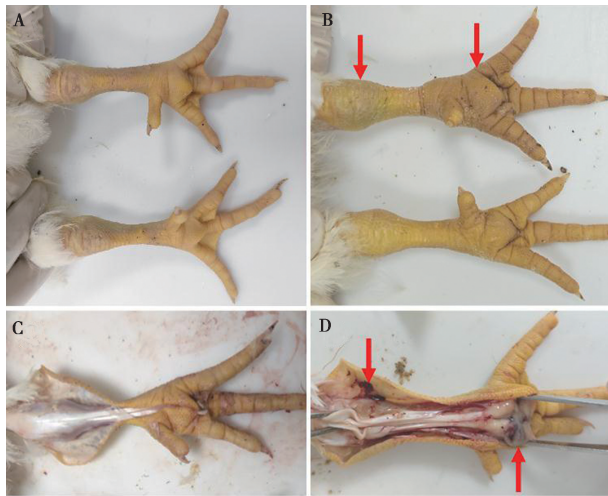


图 6 FJZQH23 株攻毒后 10 d 部分鸡关节的临床病变  
A. 对照组关节外观; B. 攻毒组脚垫和关节肿胀; C. 对照组关节剖检; D. 攻毒组脚垫和关节出血。

图 6 FJZQH23 株攻毒后 10 d 部分鸡关节的临床病变

## 3 讨论

鸡关节疾病的诱发因素较多, 根据感染病原的不同, 可将其分为病毒性关节炎、大肠杆菌性关节炎、葡萄球菌性关节炎和鸡滑液囊支原体病等多种<sup>[20]</sup>。病毒性关节炎由 ARV 引起, 解剖患病鸡腿可见, 腓肠肌水肿, 滑囊内出现充血和点状出血, 关节腔内见渗出物, 并且常常发生肌腱断裂等症状<sup>[21]</sup>。大肠杆菌性关节炎的患病鸡症状多为跗关节内有黄色积液, 滑膜囊内存在淡红色或灰白色干酪样渗出物<sup>[22]</sup>。葡萄球菌性关节炎则会导致患病鸡一侧关节肿大, 外观呈紫红色或黑紫色<sup>[23]</sup>。鸡滑液囊支原体病的患病鸡早期出现关节、腱鞘处的滑膜炎, 分泌物多呈灰白色黏液或黄白色干酪样物质等症状<sup>[24]</sup>。通过对本研究样品进行临床剖检诊断, 初步断定其可能为 ARV 引起的疾病, 后续通过对样品进行分子生物学鉴定, 验证了此前的猜测, 即该肉鸡场出现的鸡关节疾病是由

ARV 导致的病毒性关节炎。

ARV 对外部环境具有较高的抵抗能力, 在自然界和集约化养殖场中广泛存在。该病毒主要感染各种禽类和哺乳动物, 在产蛋鸡和肉鸡的感染最为常见<sup>[25]</sup>, 其主要通过消化道传播, 感染途径为接触带毒禽或蛋, 也可以进行垂直传播, 但相比之下水平传播更为常见<sup>[26]</sup>。目前, 随着集约化养殖以及养殖户的养殖数量逐步增加, ARV 的感染率也逐渐升高<sup>[27]</sup>, 被感染的鸡出现包括病毒性关节炎和腱鞘炎等症状<sup>[13]</sup>。此外, 感染 ARV 的鸡群会出现多种亚临床症状, 如非特异性并发症、继发病等, 这些症状可能进一步加重鸡的病情并导致其死亡<sup>[28]</sup>。针对这一病原, 疫苗接种防控是最为有效的手段, 目前市场上销售的主流疫苗是基因 I 型疫苗株 S1133 和 ZJS。基于  $\sigma$ C 基因位点, 我国已经报道了 6 种基因型<sup>[27, 29-32]</sup>。对本研究所获得的 FJZQH23 分离株和其他具有代表性的参考株进行遗传进化分析后发现, 分离株 FJZQH23 与 I 型的 4599 参考株具有较近的亲缘关系, 因此, 确定该肉鸡场感染的 ARV 毒株为 I 型。此外, 基于该位点进行核苷酸同源性和氨基酸同源性分析发现, 分离株 FJZQH23 与参考株 4599 和疫苗株 S1133 的核苷酸相似度较高, 且氨基酸序列的突变位点均在 70 个以下。由此可见, 本研究分离的毒株与参考株 4599 和疫苗株 S1133 具有高度同源性, 尤其是与疫苗株 S1133 的同源性结果与此前钟丽<sup>[4]</sup>的研究相似。此外, 有学者进行动物致病性试验后发现, 与疫苗株 S1133 的  $\sigma$ C 基因有 46.8% 同源性的分离株, 其在鸡只上表现出很强的致病性<sup>[7]</sup>, 表明基因的突变是导致 ARV 致病性变化的原因之一<sup>[33-34]</sup>。

随着养禽业的快速发展, ARV 在我国感染愈加广泛, 其导致的临床症状对养禽业造成了巨大损失<sup>[35]</sup>。因此, 亟需开展针对这一病原的流行病学调查, 在进一步了解该病原流行特征的同时, 也要持续丰富 ARV 毒株的基因组数据, 确定其致病机制, 为此后的变异株疫苗研发提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] NIBERT M L. Structure of mammalian orthoreovirus particles [J]. *Curr Top Microbiol*, 1998, 233 (Pt 1): 1-30.
- [2] ATTOUI H, BILLOIR F, BIAGINI P, et al. Complete sequence determination and genetic analysis of Banna virus and Kadipiro virus: proposal for assignment to a new genus (*Seadornavirus*) within the family *Reoviridae* [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (Pt 6): 1507-1515.
- [3] BENAVENTE J, MARTÍNEZ-Costas J. Avian reovirus: structure and biology [J]. *Virus Res*, 2007, 123 (2): 105-119.

- [4] 钟丽. 禽呼肠孤病毒流行株的进化及致病性研究 [D]. 哈尔滨: 中国农业科学院, 2017.
- [5] PETEK M, FELLUGA B, BORCHI G, et al. The crawley agent: an avian reovirus [J]. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, 1967, 21 (3): 413-424.
- [6] 王蕾. 禽呼肠孤病毒野毒株  $\sigma$ C 基因、抗原性及致病性比较研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [7] ZHANG X, LEI X, MA L, et al. Genetic and pathogenic characteristics of newly emerging avian reovirus from infected chickens with clinical arthritis in China [J]. *Poult Sci*, 2019, 98 (11): 5321-5329.
- [8] MARTÍNEZ-COSTAS J, GONZÁLEZ-LÓPEZ C, VAKHARIA V N, et al. Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein sigmaA in the resistance of avian reovirus to interferon [J]. *J Virol*, 2000, 74 (3): 1124-1131.
- [9] SHIH W L, HSU H W, LIAO M H, et al. Avian reovirus sigmaC protein induces apoptosis in cultured cells [J]. *Virology*, 2004, 321 (1): 65-74.
- [10] MIRZAZADEH A, ABBASNIA M, ZAHABI H, et al. Genotypic characterization of two novel avian orthoreoviruses isolated in Iran from broilers with viral arthritis and malabsorption syndrome [J]. *Iran J Vet Res*, 2022, 23 (1): 74-79.
- [11] KIM S W, CHOI Y R, PARK J Y, et al. Isolation and genomic characterization of avian reovirus from wild birds in South Korea [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 794934.
- [12] MASE M, GOTOU M, INOUE D, et al. Genetic analysis of avian reovirus isolated from chickens in Japan [J]. *Avian Dis*, 2021, 65 (3): 346-350.
- [13] 康昭凤, 谢金防, 韦启鹏, 等. 江西省主要养鸡地区 4 种鸡免疫抑制病的血清学调查 [J]. *江西农业学报*, 2010, 22 (11): 125-127.
- [14] ZHANG J, LI T, WANG W, et al. Isolation and molecular characteristics of a novel recombinant avian orthoreovirus from chickens in China [J]. *Front Vet Sci*, 2021, 8: 771755.
- [15] DANDÁR E, BÁLINT A, KECSKEMÉTI S, et al. Detection and characterization of a divergent avian reovirus strain from a broiler chicken with central nervous system disease [J]. *Arch Virol*, 2013, 158 (12): 2583-2588.
- [16] LIN P Y, LIU H J, CHANG C D, et al. Avian reovirus S1133-induced DNA damage signaling and subsequent apoptosis in cultured cells and in chickens [J]. *Arch Virol*, 2011, 156 (11): 1917-1929.
- [17] ZHANG Z, LIN W, LI X, et al. Critical role of eukaryotic elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1) in avian reovirus sigma-C-induced apoptosis and inhibition of viral growth [J]. *Arch Virol*, 2015, 160 (6): 1449-1461.
- [18] ZHONG L, GAO L, LIU Y, et al. Genetic and pathogenic characterization of 11 avian reovirus isolates from Northern China suggests continued evolution of virulence [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35271.
- [19] NOH J Y, LEE D H, LIM T H, et al. Isolation and genomic characterization of a novel avian orthoreovirus strain in Korea, 2014 [J]. *Arch Virol*, 2018, 163 (5): 1307-1316.
- [20] 张春燕, 冯金玲, 徐美玉, 等. 鸡关节炎病的辨别诊断技术 [J]. *吉林畜牧兽医*, 2022, 43 (6): 52-53.
- [21] 杨金生, 李琳, 刘云志, 等. 鸡病毒性关节炎的诊断与综合防控 [J]. *科学种养*, 2018 (10): 48-49.
- [22] 张松岩. 肉鸡关节炎型大肠杆菌病的临床特征、诊断和防控 [J]. *现代畜牧科技*, 2020 (5): 108-109.
- [23] 田秀云. 鸡葡萄球菌病感染的综合诊治 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2019 (9): 149.
- [24] 马爽, 郭莉莉, 宋新宇, 等. 鸡滑液囊支原体感染的流行病学调查与分析 [J]. *中国家禽*, 2016, 38 (23): 68-71.
- [25] WALKER E R, FRIEDMAN M H, OLSON N O. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis [J]. *Journal of Ultrastructure Research*, 1972, 41 (1): 67-79.
- [26] SCHWARTZ L D, GENTRY R F, ROTHENBACHER H, et al. Infectious tenosynovitis in commercial white leghorn chickens [J]. *Avian Dis*, 1976, 20 (4): 769-773.
- [27] 李彬, 韩晓青, 刘平, 等. 2020—2021 年我国部分省份禽呼肠孤病毒分子流行病学调查 [J]. *中国动物检疫*, 2022, 39 (8): 6-11.
- [28] MONTGOMERY R D, VILLEGAS P, DAWE D L, et al. Effect of avian reoviruses on lymphoid organ weights and antibody response in chickens [J]. *Avian Dis*, 1985, 29 (2): 552-560.
- [29] 张敏敏, 提金凤, 李秀丽, 等. 禽痘病毒的分离与鉴定 [J]. *中国家禽*, 2016, 38 (7): 64-66.
- [30] 李璐瑶. 一株鸡源呼肠孤病毒的分离鉴定及防污染 RT-LAMP 检测法的建立 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [31] PALOMINO-TAPIA V, MITRVSKI D, INGLIS T, et al. Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012-2017 based on partial sigma ( $\sigma$ ) C gene [J]. *Virology*, 2018, 522: 138-146.
- [32] 孙美玉. 禽呼肠孤病毒检测方法的建立及病毒分离鉴定 [D]. 哈尔滨: 中国农业科学院, 2012.
- [33] JONES R C. Avian reovirus infections [J]. *Rev Sci Tech Oie*, 2000, 19 (2): 614-625.
- [34] SELLERS H S. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 206: 152-156.
- [35] 梁英, 吴异健, 李文迹, 等. 禽呼肠孤病毒鸡源分离株的鉴定与人工感染试验 [J]. *中国兽医科学*, 2007 (4): 295-300.