

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.07.02

一株牛病毒性腹泻/黏膜病毒株的分离与鉴定

范娟¹, 吴华伟^{2*}, 郎洪武^{2*}, 郝雪斌³, 陈晓春², 刘国英³,高金源², 赵丽霞³, 邓永², 范秀丽³

(1.扬州优邦生物药品有限公司, 扬州, 225008; 2.中国兽医药品监察所, 北京, 100081; 金宇保灵生物药品有限公司, 呼和浩特, 010030)

[收稿日期] 2017-12-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 07-0008-08 [中图分类号] S852.65

[摘要] 从云南某牛场疑似 BVDV 感染的病料通过接种 MDBK 细胞分离到 1 株 BVDV, 为了解分离毒株的特性, 进行了病原学和分子生物学研究。该分离毒株连传 15 代均不产生 CPE, 为 NCP 型 BVDV。通过电镜检测可观察到直径为 40~60 nm 病毒粒子。该分离病毒能被牛病毒性腹泻标准阳性血清中和, 且能被 BVDV IFA 荧光抗体识别; 采用 BVDV 5'-UTR 基因特异性引物, 经 RT-PCR 可扩增出 288 bp 特异性片段。将该片段测序后与 GenBank 已发表的 30 株 BVDV 5'-UTR 序列进行同源性比较, 同源性为 68.7%~89.2%。与我国分离的 BJ1202 株(登陆号: KF925514.1) 和 Y2 株(登陆号: KY964311.1) 同源关系最近, 均为 89.2%。与 2014 年以来我国分离的 BVDV 毒株亲缘关系在 88% 左右。5'-UTR 遗传进化分析证实该分离毒株为 BVDV-1 型。动物回归试验显示, 该分离毒株可引起出现体温升高、腹泻、粘膜病等典型的 BVD/MD 症状。结果表明, 分离的毒株为 BVDV, 命名为 BVDV/W 株。

[关键词] 牛病毒性腹泻/黏膜病病毒; 分离; 鉴定

Isolation and Identification of One Bovine Viral Diarrhea Virus/Mucosal Disease Virus (BVDV/MDV) Strain

FAN Juan¹, WU Hua-wei^{2*}, LANG Hong-wu^{2*}, HAO Xue-bin³, CHEN Xiao-chun², LIU Guo-ying²,GAO Jin-yuan², ZHAO Li-xia³, DENG Yong², FAN Xiu-li³

(1. Yangzhou Youbang Bio-Pharmaceutical Co Ltd., Yangzhou 225008, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

3. JinYu Bio-Pharmaceutical Co Ltd, Huhehaote, 010030, China)

Corresponding authors: WU Hua-wei, E-mail: wuhuawei@ivdc.org.cn; LANG Hong-wu, E-mail: langhongwu@ivdc.org.cn

Abstract: One BVDV strain was isolated from a cattle farm in Yunnan province by cultivated in MDBK cell. Pathogenicity and molecular biology were progressed in order to realize characters of the isolated strain. It was identified as a NCP biotype since no CPE showed after 15 times passages, and the virus particles with diameter of 40~60 nm were observed under the electron microscopic. This virus can be neutralized by the positive serum of bovine viral diarrhea, and also can be identified by BVDV IFA fluorescent antibody. Using 5'-UTR as the specific

作者简介: 范娟, 博士研究生, 从事兽用生物制品生产和研究。

通讯作者: 吴华伟, wuhuawei@ivdc.org.cn; 郎洪武, langhongwu@ivdc.org.cn

primer, 288bp of DNA fragment was amplified by RT-PCR and sequenced. Compared with the 5'-UTR of 30 strain reference sequences in GenBank, the nucleotide homology is within 68.7%~89.9%, and this strain showed 89.2% identity to BVDV BJ1202 strain (GenBank ID: KF925514.1) and Y2 strain (GenBank ID: KY964311.1) isolated in China. The similarity of this virus was approximately 88% to the isolated virus which reported since 2014 in China. Phylogenetic tree depended on 5'-UTR was verified that the strain was affiliated to BVDV-1. The animal regression experiment revealed that the infected cattle presented typical BVD/MD symptoms such as fever, diarrhea, and mucosal lesions. All of these results revealed that this virus was a BVDV strain, and named BVDV W strain.

Key words: Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV); isolation; identification

牛病毒性腹泻/黏膜病 (Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease, BVD/MD) 是黄病毒科瘟病毒属牛病毒性腹泻病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 引起的以发热、粘膜糜烂溃疡、白细胞减少、腹泻、咳嗽及怀孕母牛流产或产出畸形胎儿为主要特征的一种传染病^[1-2]。目前, 该病在世界范围内广泛流行。我国于 1983 年首次分离到了 BVDV^[3]。近年来, 流行病学调查表明我国牛、羚羊、鹿、猪等均不同程度的感染 BVDV^[1,4-5], 该病已严重影响着我国畜牧业的健康发展。研究从云南某牛场疑似感染 BVDV 病例的牛肿大出血的肠系膜淋巴结和脾脏样品中成功分离一株 BVDV 毒株, 并对该病毒进行了病原学和分子生物学研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料和细胞 从云南省某牛场采集的疑似 BVDV 感染发病牛肿大出血的肠系膜淋巴结和脾脏, 于灭菌 MEM 营养液中冻存, 低温运至实验室; MDBK 细胞和 Vero 细胞由中国微生物菌种保藏管理委员会兽医微生物中心提供; 绵羊睾丸细胞由中国兽医药品监察所提供。

1.1.2 毒种与血清 牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) 标准毒株 Oregon C24V 株、BVD 标准阳性血清和标准阴性血清, 由中国微生物菌种保藏管理委员会兽医微生物中心提供。

1.1.3 主要试剂 DMEM 营养液为 Gibco 公司产品; 胎牛血清为 Hyclone 公司产品; Ex-Taq 酶为宝

生物工程 (大连) 有限公司产品; Trizol 为 Invitrogen 公司产品; IPTG、X-gal 为北京索莱宝科技有限公司; 低熔点琼脂糖、中性红溶液为 Sigma 公司; BVDV 抗原检测 ELISA 试剂盒为 IDEXX 公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒为天根生化科技 (北京) 有限公司; T 载体和感受态细胞为 Tansgen 公司; BVDV 间接免疫荧光试剂盒为中国微生物菌种保藏管理委员会兽医微生物中心产品; 抗蓝舌病病毒 (BTV) FITC 结合荧光抗体为美国 VMRD 公司。

1.1.4 主要仪器 PCR 仪 (Biometra)、1500 型酶标仪 (Thermo)、电泳仪、紫外成像仪、倒置荧光显微镜 (莱卡) 等。

1.2 方法

1.2.1 病料的处理 将肿大出血的肠系膜淋巴结和脾脏混合样品反复冻融 3 次, 经组织研磨匀浆后, 10000 r/min 离心 15 min, 取上清, 用孔径为 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 将滤过液 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.2 病料的初步检测 取 1.2.1 处理好的病料, 按 IDEXX BVDV 抗原检测 ELISA 试剂盒进行检测和判定, 检测结果为 BVDV 阳性的病料用以病毒分离。

1.2.3 病毒的分离 将经 1.2.2 检测结果为 BVDV 阳性的上清液 3.0 mL, 接种已长成单层的 MDBK 细胞培养瓶 (75 cm^2), 37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h, 补加含 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液 (庆大霉素 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、两性霉素 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 至 30.0 mL, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳的培养箱培养 5 日, 每天观察细胞病变。如此盲传 15 代, 如未出现细胞病变效应 (Cytopathic Effect,

CPE), 且经 IDEXX 牛病毒性腹泻/黏膜病病毒抗原检测试剂盒和 RT-PCR 检测结果均为阳性, 则视为非致细胞病变型 BVDV; 如有 CPE, 则视为致细胞病变型 BVDV。

1.2.4 病毒分离株的病毒含量测定 将 1.2.3 病毒株细胞 F15 代培养液, 用不含血清的 DMEM 营养液进行 10 倍系列稀释, 取 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 九个稀释度, 每个稀释度接种 4 孔已长成单层的 96 孔细胞板, 每孔 0.1 mL, 37 °C 吸附 1 h, 补加 2% 胎牛血清的 DMEM 营养液培养 5 日, 同时设正常细胞对照, 采用间接荧光方法判定是否感染, 按 Reed-Muench 法^[6] 计算 TCID₅₀。

1.2.5 纯净性检测 按照《中国兽药典》2015 年版三部附录方法分别进行无菌检验、支原体检验和外源病毒检验。

1.2.6 特异性检测

1.2.6.1 鉴别试验 将毒种用 DMEM 营养液稀释为 100 TCID₅₀/0.1 mL, 与等量 BVDV 特异性阳性血清混合, 在 37 °C 下中和作用 1 h 后, 接种 96 孔板单层 MDBK 细胞各 8 孔, 每孔 100 μL, 同时设立正常细胞对照和病毒对照各 8 孔。接种后在 37 °C 下吸附 1 h, 再补加含 2% 新生牛血清的 DMEM 维持液 100 μL, 置 37 °C 二氧化碳培养箱培养 96 h, 采用间接荧光抗体法判定结果。

1.2.6.2 间接荧光抗体检测 按 1.2.4 方法培养 72 h, 弃去培养液, 用 80% 冷丙酮乙醇溶液固定 30 min, 然后按照 BVDV 间接荧光试剂盒说明书进行荧光抗体检测, 倒置荧光显微镜下观察。

1.2.6.3 RT-PCR 检测 根据 BVDV 国际标准毒株基因序列, 在其最保守的 5' 端非编码区序列设计合成一对引物, 引物序列如下:

上游引物: 5'-CATGCCCATAGT AGGAC-3';

下游引物: 5'-CCATGTGCCATGTACAG-3'。

引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成, 预期片段为 288 bp。

按病毒基因组 RNA 提取试剂盒说明, 从分离毒株的细胞培养液和 BVDV 标准毒株 Oregon C24V 株

细胞培养物中提取 RNA。反转录合成 cDNA 反应体系为: AMV RT 5×Buffer 4 μL, dNTP (各 2.5 mmol/L) 2.5 μL, RNasin (40 U/μL) 1 μL, 反转录酶 (5 U/μL) 1 μL、下游引物 (25 μmol/L) 各 1 μL、模板 RNA 5 μL, 补充 DEPC 水至 20 μL, 混匀后瞬离, 42 °C 反转录 60 min。PCR 扩增反应体系为: 模板 cDNA 1 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 1 μL, dNTP (各 2.5 mmol/L) 1 μL, 上游引物和下游引物 (25 μmol/L) 各 1 μL, 10×Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL, 补充 DEPC 水至 25 μL, 混匀后瞬离。PCR 循环条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min; 最后 4 °C 保温。用 1.5% 琼脂糖平板 (溴化乙铵终浓度 0.5 μg/mL) 凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.2.7 基因型序列测定 将 1.2.6.3 的 PCR 产物目的片段的凝胶块切下后, 按商品化 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行 DNA 回收, 克隆到 pMD18-T 载体上, 送北京六合华大基因科技股份有限公司进行序列测定, 然后与 Genbank 中已发表的 30 株 BVDV 毒株的 5' 端非编码区序列使用 MEGA 软件进行遗传进化分析。采用的 BVDV 参考毒株信息见表 1。

1.2.8 电镜形态观察 取 F15 代病毒培养物 200 mL, 反复冻融三次后 10000 r/min 离心 30 min, 取上清液 50000 r/min 离心 5 h, 弃上清液, 沉淀物用 0.5 mL 去离子水溶解, 用 2% 磷钨酸钠负染 30 min, 室温下自然干燥后, 在透射电镜下观察。

1.2.9 动物回归试验 选取 BVDV 抗原、BVDV 抗体均为阴性 (血清中和抗体效价不高于 1:4) 的牛 7 头, 分为 2 组, 1 组 2 头, 1 组 5 头。将分离到的牛病毒性腹泻/黏膜病病毒细胞毒 (病毒含量为 10^{3.0} TCID₅₀/mL) 接种牛 (5 头), 每头牛接种 10.0 mL (滴鼻腔左右各 2.0 mL, 滴口腔 2.0 mL, 颈部肌肉左右各注射 2.0 mL)。同时设定 2 头牛作为健康对照。两组牛隔离饲养, 攻毒后观察 14 d, 每日饲养、观察, 测定体温 (从攻毒前 2 d 开始测定体温) 并采集深层鼻腔拭子接种 MDBK 细胞进行病毒分离, 攻毒后 14 d 剖杀作病理解剖学观察。

表 1 序列分析用 BVDV 参考毒株

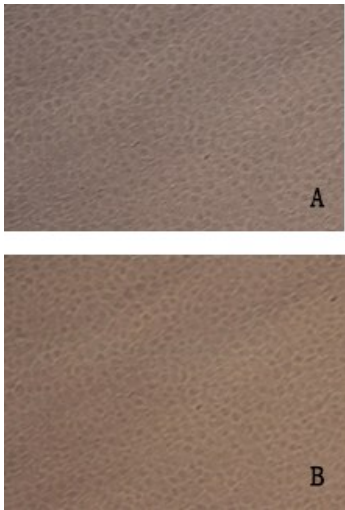
Tab 1 BVDV reference strains for sequence analysis

毒株名称	登录号/地区	年份	毒株名称	登录号/地区	年份
BVDV 1 Oregon	L32876.1/美国	1994	BVDV 1	JQ799141.1/四川	2012
BVDV 1 Singer	L32875.1/美国	1994	BVDV 1 isolate BJ1302	KF925520.1/北京	2013
BVDV 1 Draper	L32880.1	1994	BVDV 1 isolate BJ1305	KF925505.1/北京	2013
BVDV1 Osloss	M96687.1/美国	2003	BVDV 1 isolate S101	KJ690686.1/吉林	2014
BVDV 1 NADL	M31182.1/美国	2005	BVDV 1 isolate S13	KJ690680.1/吉林	2014
BVDV 1 ZM-95	AF526381.3/吉林	2006	BVDV1 SD-15	KR866116.1/山东	2015
BVDV 1 isolate NX0803	GU120254.1/宁夏	2008	BVDV1 RK13	KT355592.1/美国	2015
BVDV 1 isolate HZ0602	GU120245.1/惠州	2008	BVDV1 SC-16	KX280711.1/四川	2016
BVDV 1 strain BJ09-02	HN769723.1/北京	2009	BVDV1 No.20	Ab906694.1/日本	2016
BVDV 1 strain BJ09-09	HQ116541.1/北京	2009	BVDV1 Y2	KY964311.1/吉林	2017
BVDV 1 isolate ZD05	GU120243.1/肇东	2010	OS/14	KX853087.1/波兰	2017
BVDV 1 PLK HLJ	HM100077.1/黑龙江	2010	BVDV1 138CP	LT907991.1/意大利	2017
BVDV 1 BJ11-12	JX08005.1/北京	2011	BVDV 2 890	L32886.1/美国	1994
BVDV 1 isolate BJ1125	KF925519.1/北京	2011	BVDV 2 TR-2006-3	EU542423.1/土耳其	2009
BVDV 1 isolate BJ1202	KF925514.1/北京	2012	BVDV 2 HLJ-10	JF714967.1/黑龙江	2009

2 结果与分析

2.1 BVDV 的分离 将 IDEXX BVDV 抗原检测 ELISA 试剂盒检测结果为阳性的肠道样品接种 MDBK 细胞连传 15 代,均未出现 CPE(图 1)。将

F1~F15 代病毒培养物用 IDEXX 牛病毒性腹泻/黏膜病病毒抗原检测试剂盒检测均为阳性。将 F15 代细胞培养物进行 PCR,结果为阳性(图 2)。

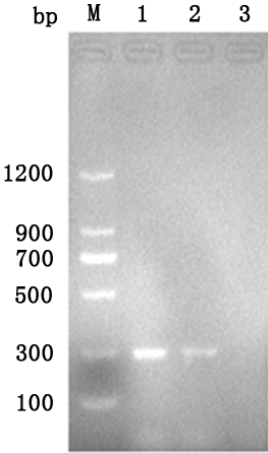


A;BVDV F15 代在 MDBK 上未产生 CPE B;MDBK 细胞对照

A: None CPE appeared on MDBK cell infected with the 15th generation BVDV; B: Normal MDBK control

图 1 BVDV 适应 MDBK 细胞病变 (200X)

Fig 1 The CPE of MDBK infected with BVDV (200X)



M:蛋白分子量标准;1: BVDV Oregon C24V 株的 PCR 产物;
2: BVDV F15 代培养物的 PCR 产物; 3: MDBK 细胞的 PCR 产物
M:Protein Marker;1: PCR result of BVDV strain Oregon C24V;
2: PCR result of the 15th generation BVDV;3: PCR result of MDVK cells

图 2 BVDV F15 代细胞培养物的 PCR 鉴定

Fig 2 The PCR result of the 15th generation BVDV

2.2 BVDV 病毒含量测定 BVDV 病毒分离物连传 15 代,仍未出现 CPE。将第 5 代病毒培养物收获、冻融并分装,经 IFA 病毒含量测定结果为 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml。

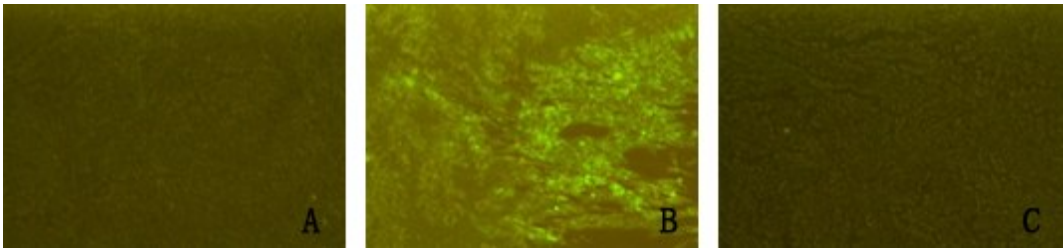
2.3 纯净性检测 按照 2015 年版《中国兽药典》三部附录方法进行无菌检验、支原体检验和外源病毒检验,结果为无菌生长、无支原体生长和无外源病毒污染,说明该分离毒株纯净性良好。

2.4 特异性检验

2.4.1 鉴别检验 将 BVDV 毒种稀释为 100 TCID₅₀/0.1 mL 后与等量 BVDV 标准阳性血清中和后接种 MDBK 细胞,经 IFA 染色未出现特异性荧光, BVDV 病毒对照出现特异性荧光,正常细胞对照未出现特异性荧光(图 3),说明分离的毒株为 BVDV。

表 2 F5 代 BVDV 毒种外源病毒检测结果
Tab 2 Test of exogenous virus on 5th generation BVDV

代次	纯净性		
	无菌检验	支原体	外源病毒检验
F5	无菌生长	无支原体生长	荧光抗体检查法: 接种 MDBK 细胞,未见 BVDV 荧光;接种 Vero 细胞,未见 BTV 荧光; 致细胞病变检查法: 接种 MDBK、Vero 细胞,未见 CPE; 红细胞吸附性外源病毒检测: 接种 MDBK、Vero 细胞未见红细胞吸附现象。



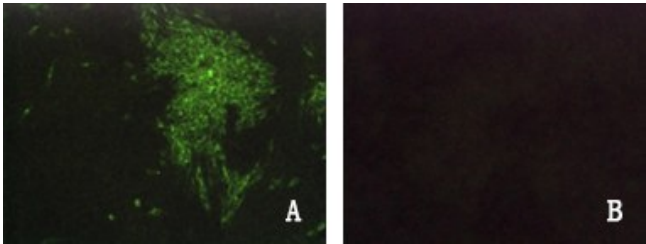
A: 中和样品;B:病毒对照;C:细胞对照
A: neutralized sample; B: Virus positive control; C: Normal cell control.

图 3 鉴别检验 IFA 结果(100X)

Fig 3 The specific identity test by indirect immunofluorescence assay on BVDV(100X)

2.4.2 荧光抗体检测 将分离的 BVDV 培养物在 MDBK 细胞上培养 72 h,然后采用 BVDV 间接荧光试剂盒进行染色,在感染细胞的胞浆可观察到典型

的绿色荧光(图 4 A),而细胞对照未出现绿色荧光(图 4 B)。



A:BVDV 感染 MDBK;B:MDBK 对照
A: Virus-infected MDBK cell;B: MDBK cell control.

图 4 IFA 染色结果(100X)

Fig 4 Detection by indirect immunofluorescence assay on BVDV(100X)

2.4.3 RT-PCR 检测 用设计的特异性引物,对分离培养物及 BVDV Oregon C24V 标准毒株进行 RT-PCR 扩增,发现分离培养物与 BVDV 国际标准毒株 Oregon C24V 株均能扩增出 288 bp 的片段(图 5),与预期目的片段一致,扩增结果清晰,无杂带,而培养用 MDBK 细胞无任何条带。

2.5 基因型序列测定 将所测的目的片段与 Genbank 中已发表的 30 株 BVDV 序列的 5'端非编码区序列进行同源性比较,同源性为 68.7%~89.2%。其中与我国分离的 BJ1202 株(登陆号:KF925514.1)和 Y2 株(登陆号:KY964311.1)同源关系最近,均为 89.2%。与 BVDV I 型经典毒株 Oregon 株、Singer 株、NADL 株的同源性为 83.8%~86.9%(图 6),与 BVDV 2 型经典毒株 890 株同源性仅为 73.4%;与 2014 年以来我国北京、吉林、四川、山东等地分离的 BVDV 毒株亲缘关系在 88%左右。基因序列系统进化树分析结果显示同样的结果(图 7)。

2.6 电镜形态观察 BVDV 分离株细胞培养液经离心浓缩,负染,电镜下观察发现,病毒离子略呈圆形,有囊膜,直径约 40~60 nm。

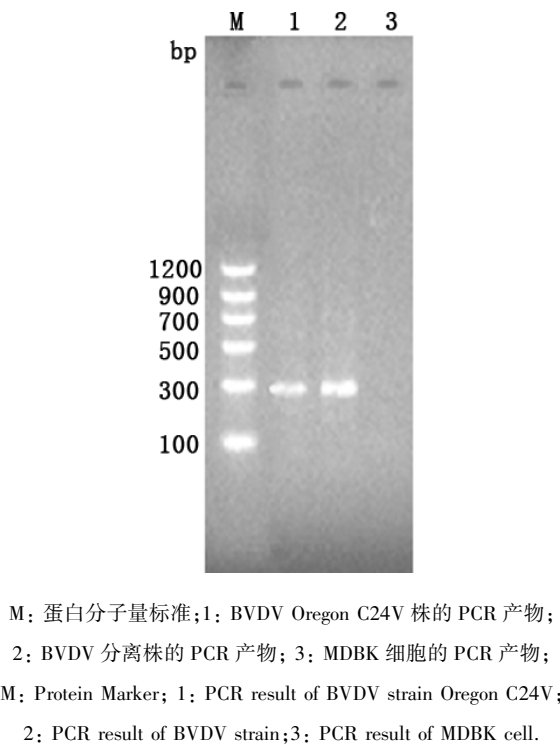


图 5 BVDV 的 PCR 鉴定
Fig 5 The PCR result of BVDV

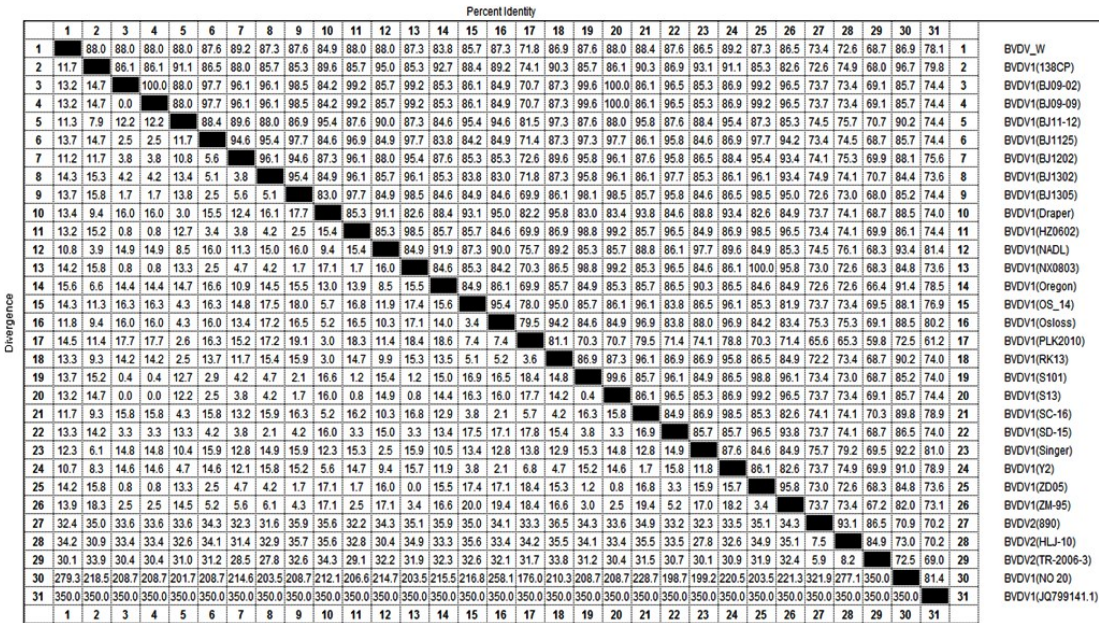


图 6 BVDV/W 株与 Genbank 中 BVDV 基因序列进行同源性比较

Fig 6 Homology analysis between BVDV/W and the sequences from GenBank

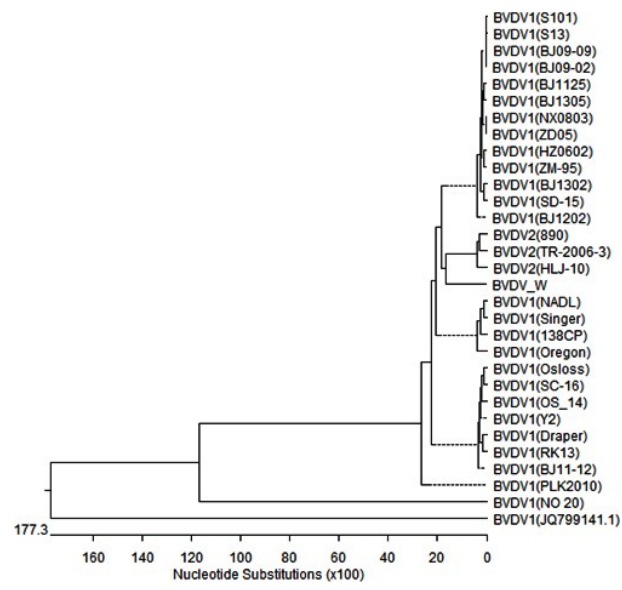


图 7 BVDV W 株与 Genbank 中 BVDV 基因序列系统进化树

Fig 7 Phylogenetic analysis of BVDV/W and sequences from GenBank

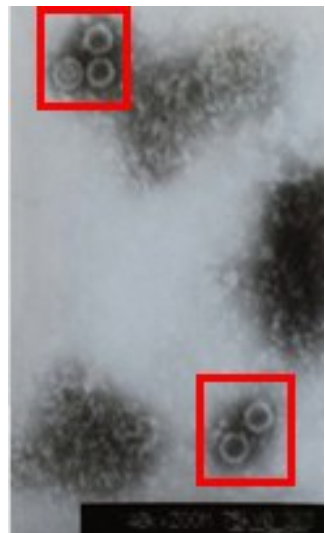


图 8 BVDV/W 株电镜照片

Fig 8 The electronic microscope photo of strain BVDV/W.

2.7 动物回归试验结果 将 BVDV 分离毒株接种阴性敏感牛,从临床观察症状看,攻毒后第 3 日开始有 3 头牛陆续出现典型的腹泻症状(稀便,严重时甚至呈水样),3 头牛的口腔、鼻腔、阴道、肛门或眼结膜等黏膜组织出现充血或溃疡等症状,2 头牛的鼻腔或眼睛还伴有黏液性或脓性分泌物,发病牛精神沉郁、食欲减退;出现腹泻的 3 头牛体温升高

到 40℃ 以上,最高可达到 41.6℃,其中 2 头均持续高温 2 日以上。另外的 2 头牛体温未见异常,但伴有浆液性或脓性眼鼻分泌物。1 头牛连续腹泻后第 10 日死亡。对照牛未见任何异常。从攻毒牛鼻拭子病毒分离情况看,攻毒后有 3 头牛从攻毒后第 5~8 日开始向外排毒,可持续至第 10~14 日(1 头持续至 14 日),2 头牛仅攻毒后 5~6 日和 5~7 日可检测到病毒。

3 讨论与结论

据可否使培养细胞产生细胞病变,可将 BVDV 分为两种生物型^[1-2]:一种为病毒在细胞中复制不引起细胞病变,称为非致细胞病变型(Noncytopathogenic, NCP),如 NY-1 株;另一种为引起细胞形成空泡、核固缩、溶解和死亡等病变,称为致细胞病变型(Cytopathogenic, CP),如 OregonC24V 株、NADL 株等。NCP 型能引起持续感染,CP 型 BVDV 在体内不能引起持续感染。从国内外已批准的 BVDV 弱毒疫苗和灭活疫苗(包括含 BVDV 成分的二联或多联疫苗)看,仅有 4 个疫苗为 NCP 生物型,其余均为 CP 型^[7]。研究利用 MDBK 细胞,成功从疑似感染 BVDV 牛肿大出血的肠系膜淋巴结和脾脏样品中分离出 1 株 BVDV,该毒株在 MDBK 细胞上连传 15 代,均不产生 CPE,证明该分离毒株为 NCP 型。从动物回归结果看,该分离毒株接种健康易感牛,可引起体温升高(超过 40℃)、腹泻、黏膜病、眼鼻黏性或脓性分泌物等典型 BVD 症状,从而进一步证明分离到的毒株为 BVDV。

BVDV 5'-UTR 在 BVDV 基因组中相对保守的,常用作合成引物来检测 BVDV 或作为 BVDV 分型鉴定引物^[8-9]。根据 5'-UTR 的序列可将 BVDV 分为 BVDV-1 和 BVDV-2 两种基因型,但这两种基因型均属于同一个血清型,存在一定的交叉保护^[10-11]。Fei Xue 等^[12](2010)研究表明:目前我国流行优势株以 BVDV-1 型为主。本研究根据国际标准毒株的 5'-UTR 序列设计出特异性引物,经 PCR 反应可扩增出 288bp 特异性条带,并经 5'-UTR 序列分析,与我国分离的 BJ1202 株(登陆号:KF925514.1)和 Y2 株(登陆号:KY964311.1)同源

关系最近,均为 89.2%,与 2014 年以来我国北京、吉林、四川、山东等地分离的 BVDV 毒株亲缘关系在 88%左右。系统进化树也显示分离的毒株与国内主要流行分支相同,均属于 BVDV-1 型。说明该毒株具有一定的代表性。

BVD 的根除方法是病畜的检验与捕杀,但成本较高。疫苗接种是目前多数国家控制和预防该病的主要方法,常规灭活疫苗和活疫苗是主要的疫苗类型^[13]。弱毒疫苗虽可刺激机体产生较高滴度的抗体,但其存在毒力不稳定,可诱发免疫抑制、持续感染以及可能在外源病原污染等安全隐患。相比较而言,灭活疫苗安全性方面的优势更为明显,并且其免疫原性相对较差的缺点可通过选用有效的佐剂加以改进。针对目前 BVD 较为严重的流行形势,采用流行优势毒株制备安全高效的灭活疫苗应为防控这 BVD 的首选。因此,研究所分离到的 BVDV/W 株具有开发灭活疫苗的潜力。

参考文献:

[1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学出版社,1997:988-1029.

Yin Zh, Liu J H. Animal virology [M].the second edition. Beijing: Science Press, 1997: 988-1029.

[2] Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections[J]. Vet Microbiol, 1999, 64(2-3): 89-107.

[3] 李佑民,刘振润,武根莲,等.牛病毒性腹泻-粘膜病病毒株(长春184)的分离和鉴定[J].中国人民解放军兽医大学学报,1983,3(2):113-121.

Li Y M, Liu Zh R, Wu G L, *et al.* Isolation and identification of bovine viral diarrhoea-mucous membrane virus strain (Changchun 184), [J]. Journal of Chinese people's Liberation Army Veterinary University, 1983,3 (2): 113-121.

[4] 王晓亮,王玉梅,张玉玲,等.宁夏部分地区牛病毒性腹泻的血清学检测[J]. 流行病学,2016, 33 (2): 17-19.

Wang X L, Wang Y M, Zhang Y L, *et al.* Serological detection

of bovine viral diarrhea in some region in Ningxia province [J]. epidemiology, 2016, 33 (2): 17-19.

[5] Cai D, Song Q, Wang J, *et al.* Genomic characterization of three bovine viral diarrhea virus isolates from cattle. Arch Virol, 2016, 161(12): 3589-3592.

[6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版[S].

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia volume 3 of 2015 edition [S].

[7] 武华,薛文志. 牛病毒性腹泻病毒及其控制[M].北京:中国农业出版社,2010.

Wu H, Xue W Zh. Bovine viral diarrhea virus and its control [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010.

[8] Cerutti F, Luzzago C, Lauzi S, *et al.* Phylogeography, phylodynamics and transmission chains of bovine viral diarrhea virus subtype 1f in Northern Italy[J]. Infect Genet Evol. 2016, 45:262-267.

[9] Zoccola R, Mazzei M, Carrozza M, *et al.* A newly developed BVDV-1 RT-qPCR Taqman assay based on Italian isolates: evaluation as a diagnostic tool [J]. Folia Microbiol (Praha). 2017, 62(4): 279-286.

[10] Wen Z X, Debra Mattick, Linda Smith, *et al.* Vaccination with a modified-live bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1a vaccine completely protected calves against challenge with BVDV type 1b strains[J]. Vaccine, 2011, 29: 70-76.

[11] Dean H, Leyh R. Cross-protective efficacy of a bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1 vaccine against BVDV type 2 challenge. Vaccine[J]. 1999 Mar 5;17(9-10):1117-1124.

[12] Xue F, Zhu Y M, Li J, *et al.* Genotyping of bovine viral diarrhea viruses from cattle in China between 2005 and 2008[J]. Veterinary Microbiology, 2010,143: 379-383.

[13] 王丹娜,吴明福,王君伟. 牛病毒性腹泻疫苗的研究进展.畜牧与兽医[J],2006,38(7): 51-53.

Wang D N, Wu M F, Wang J W. Research progress on bovine viral diarrhea vaccine. Animal Husbandry and Veterinary Medicine [J], 2006, 38 (7): 51-53.

(编辑:陈希)