

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.11.01

牛病毒性腹泻病毒 E2 蛋白的原核表达及 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

孙丹¹, 黄小洁², 薛麒², 秦义娴², 高月异², 孙淼², 刘丹^{2*}

(1. 北京市兽药饲料监测中心, 北京 102200; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2023-05-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 11-0001-07 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为建立检测牛病毒性腹泻病毒抗体的间接 ELISA 检测方法, 利用大肠杆菌表达系统成功表达 E2 蛋白并纯化, 利用纯化后的蛋白作为包被抗原, 用方阵法对影响 ELISA 试验的各个因素进行优化, 并进行特异性、敏感性和重复性试验。确定 E2 抗原最佳包被浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$, 最佳血清稀释度为 1:40, 最佳封闭液为 1% 明胶, 最佳血清作用方式为 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, 酶标抗体的最佳作用方式为 1:2000 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min; 最佳底物作用时间为室温 20 min, 阳性临界值为 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 0.255$ 。与血清中和试验和商品化试剂盒进行比较, 总符合率分别为 98% 和 96%, 批内和批间重复性试验的变异系数均小于 10%。该方法与其它常见牛病毒阳性血清均无交叉反应。本研究成功建立了间接 ELISA 方法, 为进一步用于大批量牛血清样本的抗体检测和流行病学研究奠定了基础。

[关键词] 牛病毒性腹泻病毒; E2 蛋白; 原核表达; 间接 ELISA 方法

E. coli Expression of Bovine Viral Diarrhea Virus E2 Protein and Establishment of Indirect ELISA Method for Antibody Detection

SUN Dan¹, HUANG Xiao-jie², XUE Qi², QIN Yi-xian², GAO Yue-yi², SUN Miao², LIU Dan^{2*}

(1. Beijing Veterinary Drug and Feed Monitoring Center, Beijing 102200, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: LIU Dan, E-mail: liudan813@163.com

Abstract: In order to establish an indirect ELISA method for the detection of bovine viral diarrhea virus antibodies, E2 protein was successfully expressed in *E. coli* expression system. The purified protein was used as the coating antigen, and the factors of ELISA test were optimized by square matrix method. Specificity, sensitivity and repeatability tests were performed. The optimal conditions of ELISA were as follows: 1 $\mu\text{g/mL}$ E2 antigen coated at 4 $^{\circ}\text{C}$ for overnight, 1% gelatin sealed at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, 1:40 dilution serum incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, 1:2000 diluted second antibody incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min and colored for 20 min, and the positive

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项“牛羊主要病原检测新技术与制品效力检验替代方法研究”(GY202103)

作者简介: 孙丹, 兽医师, 从事兽药检测和检测方法研究。

通讯作者: 刘丹。E-mail: liudan813@163.com

critical value was $OD_{450nm} \geq 0.255$. Compared with the serum neutralization test and IDEXX ELISA, the total coincidence rate was 98% and 96%, respectively. The intra-assay and inter-assay coefficient of variation was less than 10%. This method had no cross reaction with common bovine virus positive serum. Therefore, the established indirect ELISA method can be used for antibody detection of large quantities of samples and epidemiological studies.

Key words: bovine viral diarrhea virus; E2 protein; *E. coli* expression; indirect ELISA

牛病毒性腹泻病 (bovine viral diarrhea disease, BVD) 是由牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV) 引起的一种接触性传染病, 以发热、腹泻、消化道黏膜坏死、溃烂、持续性感染等为特征^[1-3]。BVD 在国内外地区均广泛流行, 其致病机制复杂且缺乏有效的治疗手段, 给养牛业造成了巨大的经济损失^[4-6]。BVDV 属于黄病毒科瘟病毒属, 是一种长度约 12.3 kb 的单股正链 RNA 病毒, 在遗传上分为 BVDV-1、BVDV-2 和 BVDV-3 型, 其基因型主要由 5'UTR 区、Npro 和 E2 蛋白编码区决定。E2 蛋白是 BVDV 主要的结构蛋白, 位于病毒粒子的表面, 是最早产生抗体的囊膜糖蛋白, 因此可用于 BVD 的快速诊断^[7-9]。

BVDV 基因型和基因亚型众多, 给该病的检测和预防带来了严重挑战, 特别是持续性感染, 加重了该病的传播, 因此对患病牛和带毒牛的检测和淘汰非常必要。BVD 的检测和鉴定方法主要有病原学检测和血清学检测。病原学检测包括病毒分离、电镜技术、分子生物学检测等; 血清学检测包括血清中和试验、琼脂扩散试验、免疫荧光技术和 ELISA 方法等。其中 ELISA 方法具有操作简单、特异性强等特点, 技术比较成熟, 能实现样本的快速和高通量检测, 最适于在基层推广使用^[10-11]。本研究对 BVDV-1 标准株 C24V 株的 E2 基因进行分析和密码子优化, 利用原核表达系统表达 E2 蛋白, 建立基于 E2 蛋白的 BVDV 抗体间接 ELISA 检测方法, 以期对 BVDV 大批量样本的抗体检测和流行病学研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 质粒、病毒和血清 pET22b 载体、*E. coli* BL21 (DE3) 购自北京擎科生物技术公司; 中和试验

用 BVDV NADL 株和 MDBK 细胞由中国兽医药品监察所保存; BVDV 阳性血清和阴性血清、160 份 BVDV 临床样本血清 (收集自内蒙古呼和浩特地区和河北张家口地区牛场)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV3) 阳性血清、牛传染性鼻气管炎 (IBRV) 阳性血清、牛呼吸道合胞体病毒 (BRSV) 阳性血清等由中国兽医药品监察所保存。

1.2 主要试剂 IPTG、氨苄青霉素购自 Amresco 公司; 明胶、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗牛 IgG 购自 Sigma 公司; 蛋白预染 Marker、TMB 单组份显色液、终止液、包被液均购自北京索莱宝生物科技有限公司; BVDV 抗体 ELISA 检测试剂盒购自 IDEXX 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 pET22b-E2 原核表达载体的构建 以 BVDV-1 C24V 株基因序列 (GenBank 登录号 L07496.1) 为基础, 密码子优化后进行基因合成目的片段, 通过同源重组将目的片段亚克隆至 pET22b 表达载体, 经测序鉴定正确后命名为 pET22b-E2。

1.4 E2 蛋白的表达、鉴定和纯化 pET22b-E2 转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 得到的菌液加入 IPTG 诱导后进行表达测试, 确认目的蛋白有表达后进行蛋白的纯化测试。

1.5 间接 ELISA 方法的优化 以纯化后的 E2 蛋白作为包被抗原, 采用间接 ELISA 方法作为基础, 分别对影响间接 ELISA 反应的各个因素进行方阵优化。

1.5.1 确定抗原包被浓度和阴阳性血清稀释度 使用包被液将纯化的 E2 蛋白稀释为 8、4、2、1、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 5 个稀释度。将阴阳性血清分别做 1:40、1:80、1:160 和 1:320 稀释, 封闭液选择 1% 明胶,

酶标二抗作 1:5000 稀释,按常规 ELISA 方法进行方阵滴定试验,用酶标仪测定 OD_{450nm} 值。以 P/N 最大且阳性血清 $OD_{450nm} \geq 1.0$ 、阴性血清 $OD_{450nm} \leq 0.2$ 作为判定最优的标准。

1.5.2 确定最佳封闭液 按照优化的包被浓度和血清稀释度,分别选择 5% 脱脂奶、1% 明胶、10% 山羊血清、10% 马血清、1% BSA、10% 兔血清作为封闭液,按照上述方法和判定标准进行试验,确定最佳封闭液。

1.5.3 确定血清最佳作用方式 将阴阳性血清分别于室温和 37 °C 孵育 30 min、60 min,测定 OD_{450nm} 值,确定血清最佳作用温度和时间。

1.5.4 确定酶标二抗工作浓度 将 HRP 标记的兔抗牛 IgG 分别作 1:2000、1:4000、1:6000 和 1:8000 稀释,选择已经优化好的条件、确定最佳二抗浓度。

1.5.5 确定酶标二抗最佳作用方式 将酶标二抗分别于室温和 37 °C 孵育 30 min、60 min,测定 OD_{450nm} 值,确定酶标二抗最佳作用温度和时间。

1.5.6 最佳底物作用时间的优化 按照已经优化的反应条件,将 TMB 底物分别避光置室温作用 10 min、20 min 和 30 min 加入终止液终止反应,确定底物最佳作用时间。

1.6 间接 ELISA 方法的阴阳性临界值确定 取 53 份经血清中和试验检测为 BVDV 抗体阴性的牛血清,用建立的间接 ELISA 方法检测,根据测定的 OD_{450nm} 值计算平均值 ($\bar{x}$) 及标准偏差 s ,根据判定规则 ($\bar{x} + 3s$) 确定间接 ELISA 方法的临界值。

1.7 ELISA 方法的特异性试验 将建立的 ELISA 方法对 BVDV 抗体阳性牛血清、IBRV 抗体阳性牛血清、BPIV3 抗体阳性牛血清、BRSV 抗体阳性牛血清以及 BVDV 抗体阴性牛血清进行同步检测,根据 OD_{450nm} 值判定有无交叉反应,以评价建立方法的特异性。

1.8 ELISA 方法的敏感性试验 将 BVDV 阳性血清稀释至 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400 倍,用建立的 ELISA 方法进行检测,以评估方法的敏感性。

1.9 重复性试验 批内重复性试验:使用同一批纯化的 E2 蛋白包被酶标板,检测 5 份不同抗体水平的 BVDV 阳性血清样品和 1 份 BVDV 阴性血清样品,计算变异系数。批间重复性试验:取 3 块不同时间包被在不同酶标板的试剂盒,检测 5 份不同抗体水平的 BVDV 阳性血清样品和 1 份 BVDV 阴性血清样品,每份血清做 3 个重复,计算并分析结果。

1.10 临床样本检测 选取 160 份临床牛血清样品,应用建立的间接 ELISA 方法进行 BVDV 抗体检测,并与微量血清中和试验、商品化试剂盒检测结果进行比较,计算符合率情况。

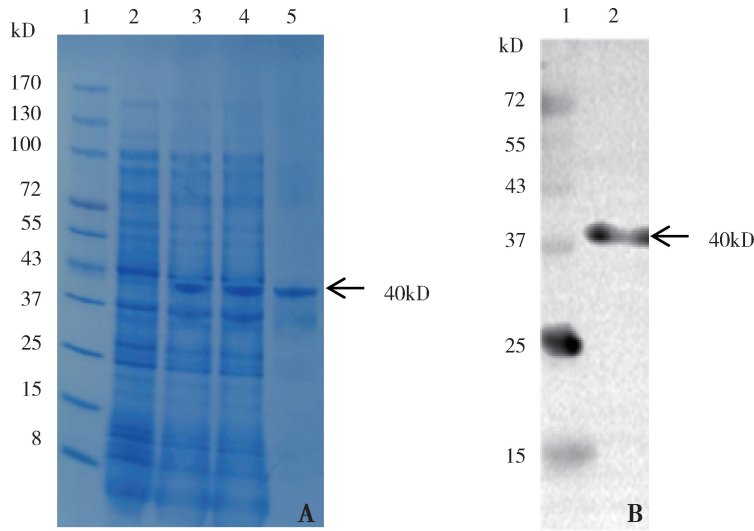
参常规方法进行微量血清中和试验:采用 96 孔细胞培养板培养 MDBK 细胞至长满单层;将 BVDV NADL 株病毒稀释至 200 TCID₅₀/0.1 mL;将待检血清做 5 倍稀释,取血清 200 μ L 加入 200 μ L 工作抗原,充分混合后置 37 °C 作用 2 h;取 MDBK 96 孔细胞板,弃去细胞培养液,每孔加入血清病毒中和液 100 μ L,每个稀释度重复 4 孔,至 37 °C 吸附 1 h 后,每孔补加 100 μ L 细胞维持液,继续培养,每日观察细胞病变,第 5 日进行判定;同时设标准阳性血清、阴性血清和病毒对照。待检血清在 1:5 稀释时有 2 个或 2 个以上孔的细胞未出现细胞病变判为血清阳性,否则判为血清阴性。

2 结果与分析

2.1 E2 蛋白的原核表达 重组质粒 pET22b-E2 转化 BL21 (DE3),得到的菌液进行诱导表达,SDS-PAGE 鉴定结果显示目的蛋白在 40 kD 左右出现明显条带,有可溶性表达和包涵体表达两种形式,可溶性表达蛋白经纯化后效果较好(图 1A)。Western-blot 检测结果表明,重组 E2 蛋白能与 BVDV 阳性血清发生特异性反应(图 1B)。

2.2 间接 ELISA 方法的方阵优化结果

2.2.1 最佳抗原包被浓度和最佳血清稀释度的确定 由表 1 可以看出,抗原包被浓度为 1 μ g/mL、血清稀释倍数为 1:40 时,P/N 值最大,阳性血清 $OD_{450nm} \geq 1.0$ 且阴性血清 $OD_{450nm} \leq 0.2$,所以确定抗原包被浓度为 1 μ g/mL,血清稀释倍数为 1:40。



A: pET22b - E2 诱导表达;1. Marker; 2. pET22b - E2 未诱导; 3. 诱导样品上清; 4. 诱导样品沉淀; 5. 可溶蛋白纯化样品
B: Western - blot 鉴定 E2 蛋白; 1. Marker; 2. E2 蛋白

图 1 E2 蛋白诱导表达和 Western - blot 鉴定

Fig 1 The induced expression of pET22b - E2 and identification of E2 protein by Western - blot

表 1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度选择

Tab 1 Determination for optimal concentration of antigen and dilution of serum

抗原包被浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1:40 稀释		1:80 稀释		1:160 稀释		1:320 稀释	
	+	—	+	—	+	—	+	—
8	2.581	0.381	2.167	0.391	1.715	0.395	1.158	0.433
4	2.948	0.211	1.888	0.153	1.617	0.177	1.141	0.249
2	1.272	0.132	1.146	0.110	0.887	0.133	0.575	0.125
1	1.103	0.082	0.777	0.084	0.548	0.083	0.392	0.064
0.5	0.681	0.065	0.570	0.073	0.437	0.066	0.290	0.086

2.2.2 最佳封闭液选择 选择封闭液为1%明胶于37℃封闭1h,P/N值最大且阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.0$ 、阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.2$ 。

2.2.3 血清最佳作用方式的确定 血清于37℃作用30min时,P/N值最大且阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.0$ 且阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.2$ (表2)。

表 2 血清最佳作用方式

Tab 2 Determination for optimal action mode of serum

血清作用方式	血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$		
	+	—	P/N
37℃ 30 min	1.067	0.076	14.0
37℃ 60 min	1.447	0.129	11.2
室温 30 min	1.032	0.077	13.4
室温 60 min	1.651	0.120	13.8

2.2.4 最佳酶标二抗工作浓度的确定 酶标二抗选择1:2000时,P/N值最大且阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.0$ 、阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.2$ 。

2.2.5 酶标二抗最佳作用方式的确定 酶标二抗于37℃作用30min时,P/N值最大且阳性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \geq 1.0$ 且阴性血清 $\text{OD}_{450\text{nm}} \leq 0.2$ (表3)。

表 3 酶标二抗最佳作用方式

Tab 3 Determination for optimal action mode of

酶标二抗作用方式	HRP labeled antibody		
	血清 $\text{OD}_{450\text{nm}}$		
	+	—	P/N
37℃ 30 min	1.393	0.110	12.7
37℃ 60 min	2.272	0.228	10.0
室温 30 min	1.538	0.137	11.2
室温 60 min	1.587	0.206	7.7

2.2.6 底物作用时间的确定 表 4 结果显示,底物作用时间为室温 20 min 时,P/N 值最大。

表 4 底物最佳作用时间

作用时间	血清 OD _{450nm}		P/N
	+	—	
室温 10 min	1.138	0.082	13.8
室温 20 min	1.487	0.097	15.3
室温 30 min	1.796	0.127	14.1

表 5 53 份 BVDV 抗体阴性牛血清 OD_{450nm} 值

Tab 5 The OD _{450nm} of 53 BVDV antibody negative bovine serums								
样品编号	OD _{450nm}		样品编号	OD _{450nm}		样品编号	OD _{450nm}	
	值 1	值 2		值 1	值 2		值 1	值 2
1	0.190	0.196	20	0.168	0.174	39	0.199	0.189
2	0.158	0.152	21	0.123	0.133	40	0.217	0.203
3	0.186	0.178	22	0.130	0.132	41	0.218	0.209
4	0.157	0.149	23	0.132	0.144	42	0.161	0.173
5	0.161	0.165	24	0.203	0.195	43	0.177	0.173
6	0.211	0.209	25	0.116	0.110	44	0.178	0.162
7	0.138	0.144	26	0.139	0.145	45	0.161	0.169
8	0.167	0.171	27	0.193	0.207	46	0.124	0.118
9	0.152	0.162	28	0.120	0.116	47	0.124	0.136
10	0.154	0.150	29	0.166	0.178	48	0.218	0.212
11	0.193	0.205	30	0.161	0.171	49	0.199	0.183
12	0.151	0.149	31	0.119	0.127	50	0.211	0.215
13	0.125	0.123	32	0.136	0.144	51	0.149	0.135
14	0.140	0.148	33	0.154	0.150	52	0.176	0.168
15	0.146	0.150	34	0.130	0.146	53	0.184	0.182
16	0.239	0.249	35	0.179	0.185	阳性血清	1.225	1.192
17	0.173	0.169	36	0.142	0.136	阴性血清	0.092	0.111
18	0.152	0.146	37	0.145	0.159			
19	0.200	0.192	38	0.168	0.156			

2.4 特异性试验结果 特异性试验结果显示,仅 BVDV 抗体阳性牛血清检测 OD_{450nm} > 0.255,其他均为阴性,说明建立的间接 ELISA 具有良好的特异性,与常见其它的牛血清无交叉反应。

2.5 敏感性试验结果 将 BVDV 阳性血清连续倍比稀释后,用建立的 ELISA 方法进行检测,结果

2.3 间接 ELISA 方法阴阳性临界值的确定 对 53 份经血清中和试验检测为 BVDV 抗体阴性的牛血清进行检测(表 5),测得 OD_{450nm} 平均值($\bar{x}$)为 0.165,标准偏差 s 为 0.030,根据阴阳性临界判定规则($\bar{x} + 3s$),确定 ELISA 方法的阴阳性临界值为 0.255,即样品 OD_{450nm} ≥ 0.255 时判定为阳性,样品 OD_{450nm} < 0.255 时判定为阴性。

显示,阳性血清稀释 1600 倍时,OD_{450nm} > 0.255 仍为阳性,表明建立的 ELISA 方法具有较高的敏感性。

2.6 重复性试验结果 表 6 和表 7 结果显示,批内重复性试验和批间重复性试验变异系数均小于 10%,表明建立的 ELISA 方法重复性良好。

表 6 批内重复性试验

Tab 6 The intro – batch repeatability test

样品		血清 OD _{450nm}					平均值	方差	变异系数
阳性 1	1.457	1.455	1.402	1.408	1.427	1.409	1.426	0.024	1.68%
阳性 2	0.984	0.977	0.959	0.987	1.004	0.986	0.983	0.015	1.53%
阳性 3	0.808	0.776	0.757	0.767	0.797	0.795	0.783	0.020	1.57%
阳性 4	0.796	0.761	0.777	0.768	0.746	0.737	0.764	0.021	2.75%
阳性 5	1.423	1.397	1.403	1.395	1.343	1.343	1.384	0.033	2.38%
阴性 1	0.174	0.166	0.169	0.150	0.151	0.149	0.160	0.011	6.90%

表 7 批间重复性试验

Tab 7 The intre – batch repeatability test

样品	第 1 批		第 2 批		第 3 批		第 4 批		平均值	方差	变异系数
阳性 1	1.401	1.455	1.466	1.440	1.429	1.387	1.426	1.460	1.433	0.026	1.81%
阳性 2	0.961	0.996	0.932	0.936	0.999	0.979	0.917	0.964	0.961	0.030	3.12%
阳性 3	0.819	0.833	0.715	0.684	0.879	0.813	0.760	0.762	0.783	0.065	8.30%
阳性 4	0.715	0.754	0.751	0.761	0.756	0.738	0.744	0.759	0.747	0.015	2.00%
阳性 5	1.452	1.492	1.265	1.336	1.426	1.410	1.390	1.381	1.394	0.070	5.02%
阴性 1	0.159	0.179	0.163	0.142	0.155	0.147	0.167	0.151	0.158	0.012	7.60%

2.7 临床样本检测 对 160 份牛血清样本,用商品化的 BVDV 总抗体检测试剂盒进行抗体检验,结果显示阳性 92 份,阴性 68 份。对 92 份阳性样本,用建立的间接 ELISA 方法检测到阳性血清 85 份,其中的 82 份用血清中和试验检测同为阳性;有 7 份样本两种方法检测均为阴性。对阴性血清 68 份,间接 LEISA 方法和血清中和试验检测结果均为阴性。间接 ELISA 方法与血清中和试验、商品化试剂盒的总体符合率分别为 98% 和 96%。详见表 8。

表 8 对 160 份血清样本 BVDV 抗体检测

Tab 8 Detection of BVDV antibody of 160 serum samples

商品化试剂盒	间接 ELISA		血清中和试验	
	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性(92)	85	7	82	10
阴性(68)	0	68	0	68
间接 ELISA 与血清中和试验总符合率	98%			
间接 ELISA 与商品化试剂盒总符合率	96%			

3 讨论与结论

BVDV 呈世界性流行,我国流行情况更加复杂,给养殖业造成了巨大的经济损失。BDV 目前尚

无特效药物,国内外主要采取疫苗免疫、病原和抗体检测、清除持续性感染牛、BVDV 净化等综合防控措施,因此 BVDV 抗体监测和疫苗效果评价尤为重要。BVDV 抗体检测的标准方法是血清中和试验,但其操作复杂,试验周期较长,敏感性不高,不利于高通量样本检测和基层推广使用。而血清抗体间接 ELISA 方法具有检测速度快、对试验环境和人员的要求低,且其敏感性高于血清中和试验,结果判定简单,在临床样本检测和疫苗免疫抗体监测等方面能发挥更大的作用。本研究利用大肠杆菌表达系统表达 BVDV E2 蛋白建立的检测血清抗体的间接 ELISA 方法,可准确检测血清中的 BVDV 抗体,特异性强敏感性高,对于大批量临床样本的抗体检测、基层样本筛查及 BVDV 净化等方面具有重要价值。

目前国内检测 BVDV 抗体使用的 ELISA 试剂盒大多为国外进口,存在价格昂贵,进口周期长等劣势。美国 IDEXX 公司商品化的 BVDV 总抗体试剂盒,其包被抗原为全病毒抗原,需要繁殖大量病毒并进行密度梯度离心,存在制备工艺复杂、成本高和散毒风险等缺点。本研究借助基因表达和蛋白纯化技术制备 BVDV E2 蛋白,E2 蛋白是 BVDV

结构蛋白中免疫原性最强的糖蛋白,在结构基因中具有良好的中和抗体能力。将纯化后的 E2 蛋白作为包被抗原,克服了全病毒包被的不足之处,建立的间接 ELISA 方法与商品化试剂盒的符合率高达 96%。

包被抗原的反应原性和纯度是影响间接 ELISA 方法敏感性和特异性的关键。目前已报道的 BVDV E^{ms} 蛋白表达产物大多以包涵体形式表达,存在目的蛋白损失严重、纯度不高等缺点,本研究通过线性抗原表位预测分析并进行密码子优化,利用大肠杆菌原核表达 E2 蛋白,E2 蛋白主要以可溶性形式在大肠杆菌中高效表达,这一蛋白表达特性获得了高纯化和浓度的包被抗原。本研究建立的间接 ELISA 方法与血清中和试验的符合率较高,更适于高通量检测,用于 BVDV 疫苗免疫效果评价和 BVDV 净化等,具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] Brodersen B W. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control [J]. Veterinary Pathology, 2014, 51 (2): 453 – 464.

[2] Olafson P, MacCallum A D, Fox F H. An apparently new transmissible disease of cattle [J]. The Cornell Veterinarian, 1946, 36: 205 – 213.

[3] Fulton R W, Whitley E M, Johnson B J, *et al.* Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in South Central United States [J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2009, 73(4): 283 – 291.

[4] Nishimori A, Hirose S, Ogino S, *et al.* Endemic infections of bovine viral diarrhea virus genotypes 1b and 2a isolated from

cattle in Japan between 2014 and 2020 [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2022, 84(2): 228 – 232.

[5] Chernick A, Van der Meer F. Evolution of Bovine viral diarrhea virus in Canada from 1997 to 2013 [J]. Virology, 2017, 509: 232 – 238.

[6] Nilnont T, Aiumlamai S, Kanistanont K, *et al.* Bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in northeast Thailand [J]. Tropical Animal Health and Production, 2016, 48 (6): 1201 – 1208.

[7] Bolin S R, Ridpath J F. Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease [J]. Archives of Virology, 1996, 141, 1463 – 1477.

[8] Hossain M M, Rowland R R. Replicon particle expressing the E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus immunization and evaluation of antibody response [J]. Viral Immunology, 2018, 31 (1): 55 – 61.

[9] Wang J, Yin J H, Wang S H, *et al.* Development and application of an indirect ELISA for the serological detection of bovine viral diarrhea virus infection based on the protein E2 antigen [J]. Molecular Biology Reports, 2023, 50 (5): 4707 – 4713.

[10] Gonda M G, Fang X, Perry G A, *et al.* Measuring bovine viral diarrhea virus vaccine response: using a commercially available ELISA as a surrogate for serum neutralization assays [J]. Vaccine, 2012, 30(46): 6559 – 6563.

[11] Yi W, Zhu H, Wu Y, *et al.* The recombinant Erns and truncated E2 – based indirect enzyme – linked immunosorbent assays to distinguishably test specific antibodies against classical swine fever virus and bovine viral diarrhea virus [J]. Virology Journal, 2022, 19(1): 121.

(编辑:李文平)