

猪 A 群轮状病毒的分离与鉴定

库旭钢^{1,2}, 张 坤^{1,2}, 刘羽茜^{1,2}, 何启盖^{1,2*}

(1. 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070; 2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070)

摘要: 目前国内对猪轮状病毒的研究较少, 作者旨在对猪 A 群轮状病毒进行分离与鉴定, 为后续猪轮状病毒致病机理和分子生物学特性研究奠定基础。用胰蛋白酶处理 RT-PCR 检测猪 A 群轮状病毒病原阳性的临床腹泻粪样, 然后接种长成单层的 MA-104 细胞, 进行病毒分离传代。再对分离毒株进行常规 RT-PCR 鉴定和电镜观察, 并对分离毒株的 VP6、VP7 和 VP8 基因进行测序及序列分析。结果成功分离猪 A 群轮状病毒 TM-a 株, 经序列同源性分析发现, 与 TM-a 株 VP6、VP7 和 VP8 基因同源性最高的毒株分别为中国北京人源 LL3354 株、印度人源 RMC321 株和日本野猪源 GUB-71 株, 其相似性为 96.0%、95.1% 和 97.0%。该 TM-a 株轮状病毒不同基因表现出与人源轮状病毒和猪源轮状病毒的高度同源性, 推测猪 A 群轮状病毒可能在人畜间传播, 发生基因重组现象。

关键词: 猪 A 群轮状病毒; 分离; 鉴定

中图分类号: S852.659.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)02-0275-07

Isolation and Identification of Group A Porcine Rotavirus

KU Xu-gang^{1,2}, ZHANG Kun^{1,2}, LIU Yu-xi^{1,2}, HE Qi-gai^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Agriculture Microbiology of Animal Virology, Wuhan 430070, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Porcine rotavirus can induce serious diarrhea in piglet, but most researches are on human. We successfully isolated and identified group A porcine rotavirus (GAR) virus, which make a contribution to pathogenesis, molecular biology study on porcine rotavirus. GAR were detected by RT-PCR test from different feces samples of diarrhea, those positive samples were treated by trypsin, then was inoculated to MA-104 cell line to isolate strain TM-a. After routine RT-PCR test and electron microscope observation, we sequenced and analyzed VP6, VP7 and VP8 genes of strain TM-a. Through homology analysis, we found VP6, VP7 and VP8 are, respectively, identical to Beijing human strain LL3354 from China (96.0%), Indian human strain RMC321 (95.1%), wild boar strain GUB-71 from Japan (97.0%). Strain TM-a have a high similarity to human and wild boar rotavirus, we infer that GAR may spread from human to animal, and there exist gene recombination.

Key words: group A porcine rotavirus; isolation; identification

轮状病毒引起婴儿腹泻致死现象在许多国家时有报道^[1-3], 引起人们的密切关注。有报道称同时感染轮状病毒的不同毒株时, 该病毒会发生基因片段交换而产生新的重配毒株^[4-7], 但在自然条件下这种

重配的现象还未被证实。在对猪病毒性腹泻的流行病学调查中发现轮状病毒是引起猪病毒性腹泻的主要病原之一, 目前国内对猪轮状病毒的各种研究较少, 作者对猪 A 群轮状病毒 (group A porcine rota-

收稿日期: 2011-05-26

基金项目: 国家生猪现代产业技术体系 (CARS-36); 广东省中国科学院全面战略合作项目 (2010B090301020)

作者简介: 库旭钢 (1984-), 男, 河南许昌人, 硕士, 主要从事动物传染病诊断与临床疫病防控研究, E-mail: kuxugang@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 何启盖, 教授, E-mail: heqigai@yahoo.com

virus, GAR)进行了分离和鉴定,为研究其在病毒性腹泻病中发挥的作用提供基础。

1 材料与方法

1.1 病料

本实验室检测并保存的湖北天门某猪场猪 A 群轮状病毒病原阳性粪样。

1.2 细胞、宿主菌与载体

MA-104 细胞^[8-9](恒河猴胎肾传代细胞系)购于武汉大学菌种保藏中心, pMD-18T 克隆载体购自宝生物工程(北京)有限公司, DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 主要试剂

胰蛋白酶购于 Sigma 公司、MEM 细胞培养基为 GIBCO BRL 公司产品、琼脂糖为上海生物工程公司产品、Trizol RNArose Reagent 为 GIBCO BRL 公司产品、TSA(胰蛋白大豆琼脂)和 TSB(胰蛋白大豆肉汤)为 BD 公司产品、EasyPure Quick Gel Extraction Kit 购于北京全式金生物技术有限公司、RNA PCR Kit(AMV)、DNA Marker 购于大连宝生物工程(北京)有限公司。

胰蛋白酶溶液浓度 0.25%; 细胞生长液含 10% 胎牛血清的 MEM(pH 7.2~7.6); 细胞维持液含 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰蛋白酶的无牛血清 MEM(pH 7.2~7.6)。

1.4 病料的处理及接种

粪便样品用 PBS (0.1 mol \cdot L⁻¹, pH 7.2) 稀释, 混匀制成 10%(V/V) 的悬液; 10 000 r \cdot min⁻¹

4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清用 0.22 μM 孔径的一次性滤器过滤除菌, -80 $^{\circ}\text{C}$ 存放备用。接种细胞前病料用终浓度 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰蛋白酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。取长成单层的 MA-104 细胞, 弃去生长液; 用无血清的 MEM 维持液洗 3 次, 加 1 mL 上述病料悬液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱吸附 1 h, 每 20 min 轻晃 1 次。同一病料接种 2 个细胞瓶(25 cm²), 一瓶在吸附后弃掉病料悬液, 另一瓶保留病料悬液, 同时加入 6 mL 维持液, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱培养, 试验中设置空白对照。连续传代, 逐日观察接毒后细胞的变化, 待细胞出现 CPE 达 70% 时, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻融 2 次, 分装存放 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.5 病毒的鉴定^[10-11]

在病毒盲传过程中, 观察细胞 CPE, 并利用本实验室已建立的检测 PGAR 的常规 RT-PCR 检测方法进行鉴定(引物见表 1)。

将接病毒后到达 70% 病变的细胞培养物收获后 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清立刻进行复染, 后在电镜下观察病毒粒子形态。

1.6 引物

根据 GenBank 收录的猪 A 群轮状病毒(PGAR)的 VP6(DQ204741)、VP7(DQ204743)和 VP8(FJ492835.1)基因序列及国内外已发表的相关文献材料^[12-15], 利用 Primer 5.0 软件进行引物设计, 预期扩增的目的片段分别为 1 194、840 和 756 bp, 引物由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列及扩增片段大小见表 1。

表 1 PGAR RT-PCR 检测及 VP6、VP7 和 VP8 基因扩增引物

Table 1 Primers used for RT-PCR amplification and sequencing of VP6, VP7 and VP8 genes

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence	酶切位点 Restriction site	扩增片段长度/bp Length
RVF	CCCCGGTATTGAATATACCACAGT		333
RVR	TTTCTGTTGCCACCCCTTAGT		
VP6F	CC <u>GGATCC</u> ATGGAGTTCTGTACTCATT	<i>Bam</i> H I	1 194
VP6R	CCCC <u>AAGCTT</u> TTACTTAATCAACATGCTTCT	<i>Hind</i> III	
VP7F	CC <u>GGATCC</u> ATGTATGGTATTGAATATACCACAG	<i>Bam</i> H I	840
VP7R	TT <u>AAGCTT</u> TTGTGGTGCAGTTGTTGGATCAGC	<i>Hind</i> III	
VP8F	CTC <u>GGATCC</u> ATGGCTTCGCTCATTATAGA	<i>Bam</i> H I	756
VP8R	CAT <u>GTCGAC</u> AGCTCTTGTGTGCACTATCT	<i>Sal</i> I	

1.7 VP6、VP7 和 VP8 基因的 RT-PCR 扩增

参考文献[16-17]进行 RNA 的提取及 cDNA 的合成。

PCR 反应总体系为 25 μL :5 \times PCR buffer 5.0 μL , TaKaRa HS 0.125 μL , 上游引物 (10 pmol \cdot μL^{-1})1.0 μL , 下游引物 (10 pmol \cdot μL^{-1})1.0 μL , cDNA 模板 5.0 μL , 双蒸水 12.875 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

按照 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 所提供的操作步骤来回收目的 DNA 片段。

1.8 克隆质粒的构建

将回收的 DNA 片段与 pMD18-T 载体于 16 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴连接 7~8 h;取 10 μL 连接产物加入到 30 μL 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,轻轻混匀,冰上静置 30 min;42 $^{\circ}\text{C}$ 温水中热击 45 s 后,迅速冰浴 2 min;再加入约 500 μL 不含抗生素的 TSB 培养基,180 r \cdot min $^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床培养约 1 h;5 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min,弃去 400 μL 上清,混匀后涂布至含氨苄抗性的 TSA 平板;37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养至出现单菌落。

1.9 构建质粒的鉴定

1.9.1 PCR 鉴定 挑取平板上的单个菌落于 5 mL TSB 培养液培养至浑浊,取 1.0 mL 菌液离心后弃上清加入 50 μL 三蒸水重悬,水浴中煮 10 min,迅速放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷却;12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 2 min,取上清 5 μL 作为 PCR 扩增的模板。PCR 扩增体系 (25 μL):10 \times PCR buffer (Mg $^{2+}$) 2.5 μL ,10 mmol \cdot L $^{-1}$ dNTP 1.0 μL ,Taq 酶 0.15 μL ,上游引物 (10 pmol \cdot μL^{-1})1.0 μL ,下游引物 (10 pmol \cdot μL^{-1})1.0 μL ,模板 5.0 μL ,ddH $_2$ O 14.35 μL 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物电泳观察。

1.9.2 酶切鉴定 按照 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 的说明提取质粒 DNA。取 30 μL 质粒 DNA 进行双酶切鉴定,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱反应 2~3 h,酶切产物进行电泳检测。

1.10 VP6、VP7 和 VP8 基因的测序和序列分析

将 PCR 和双酶切鉴定正确的重组菌送至南京金思特科技有限公司测序。

将分离株的 VP6、VP7 和 VP8 基因序列与已发表的部分 PGAR 基因序列进行了比较。所选的

10 株病毒中 VP6 基因人源有 4 株 (DQ873675:R479^[15]、EU330646:LL3354、AF531913:RMC321、AY601552:RMC/G60),猪源有 4 株 (AY538664:JL94、FJ617209:GD、DQ204741:RU172、D00326:Gottfried),牛源 (EU873012:KV0407) 和熊猫源 (GU188283:CH-1) 各 1 株;VP7 所选的人源有 6 株 (DQ873680:R479、EF159575:LL3354、AF501578:RMC321、FJ598039:VN-6、AY603150:RMC/G7、EF199734:CMH010/03),猪源有 3 株 (AY538665:JL94、AB176683:JP35-7、X06759:Gottfried),熊猫源 1 株 (GU188284:CH-1);VP8 所选的 13 株毒株中,人源有 2 株 (EF672556.1:RVA/Human-tc/IND/69M/1980/G8P4^[10]、M60600.1:69M),猪源有 10 株 (AB176684.1:Hokkaido-14、AB176687.1:JP16-3、AB621582.1:TJ1-1、AB621583.1:TJ2-2、AB621584.1:TJ4-3、AY174094.1:A34、AY768809.1、34461-4、FJ870286.1:06-52-1、FJ870287.1:06-285、HQ268847.1:CMF48/08),野猪源 1 株 (AB573648.1:GUB71)。

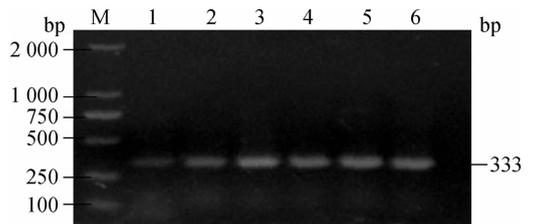
2 结果

2.1 病毒的分离

病料接种 MA-104 细胞,盲传至第 3 代开始出现明显细胞病变 (CPE),且前述 2 种病料接种方法没有明显的差异,随传代次数增加,最早在 24 h 可见 CPE,表现为细胞变圆堆积、细胞脱落拉网。

2.2 病毒的 RT-PCR 鉴定

病毒盲传至第 5 代产生稳定 CPE,利用本实验室已建立的常规 RT-PCR 检测第 3、5、10、15、20 和 25 代细胞毒结果均为 PGAR 阳性 (图 1),证实猪轮状病毒已在 MA-104 细胞上稳定增殖。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~6. 第 3、5、10、15、20 和 25 代细胞病毒扩增
M. DL2000 DNA marker; 1-6. pGAR virus gene amplified from 3rd, 5th, 10th, 15th, 20th and 25th passage cells, respectively

图 1 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 1 The results of RT-PCR

2.3 病毒的形态观察

对收获的细胞培养物进行电镜形态观察,镜下可见轮廓清晰的车轮状的双层衣壳结构(图 2),将从病料中分离的毒株命名为 TM-a 株。

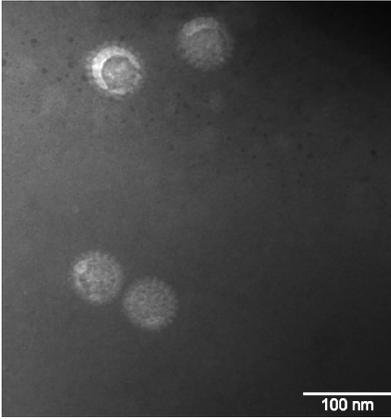
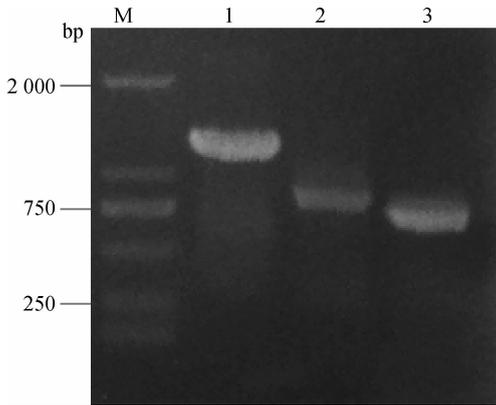


图 2 细胞培养物中的病毒颗粒

Fig. 2 Virus particles of cell culture

2.4 VP6、VP7 和 VP8 基因的 RT-PCR 扩增

用制备好的模板进行 RT-PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定结果(图 3)显示扩增片段大小与预期符合(1 194、840 和 756 bp)。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~3. VP6、VP7 和 VP8 基因扩增产物

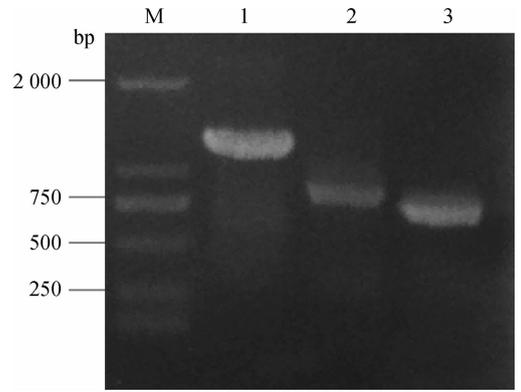
M. DL2000 DNA marker; 1-3. PCR products of VP6, VP7 and VP8

图 3 VP6、VP7 和 VP8 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 Products of VP6, VP7 and VP8 gene by RT-PCR

2.5 VP6、VP7 和 VP8 克隆质粒的构建与鉴定

将扩增回收的 DNA 片段连到克隆载体 pMD-18T 上,提取质粒进行 PCR 和双酶切鉴定(图 4、图 5),结果证明克隆成功。

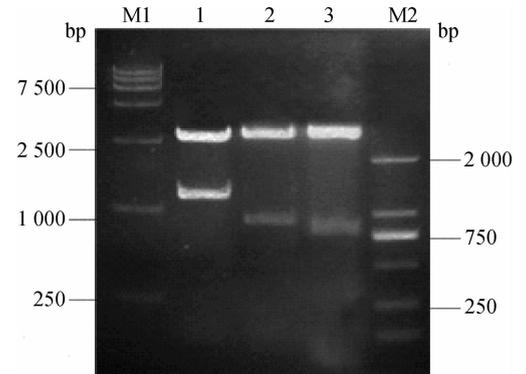


M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~3. VP6、VP7 和 VP8 重组质粒扩增产物

M. DL2000 DNA marker; 1-3. PCR products of recombinant plasmid of VP6, VP7 and VP8

图 4 重组质粒的 PCR 鉴定结果

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid by PCR



M1. DL15000 DNA 相对分子质量标准;M2. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. pMD18-T-VP6/BamH I + Hind III; 2. pMD18-T-VP7/BamH I + Hind III; 3. pMD18-T-VP8/BamH I + Sal I

M1. DL15000 DNA marker; M2. DL2000 DNA marker; 1. pMD18-T-VP6/BamH I + Hind III; 2. pMD18-T-VP7/BamH I + Hind III; 3. pMD18-T-VP8/BamH I + Sal I

图 5 重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid by restriction enzyme

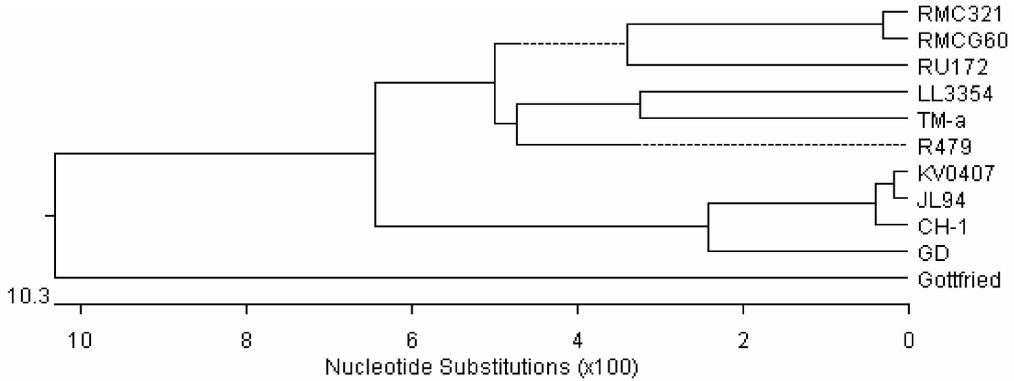
2.6 VP6、VP7 和 VP8 基因序列测序结果以及同源性分析

将经过 PCR 鉴定和双酶切鉴定正确的 TSB/Amp 培养的重组菌 TM-a 送往南京金思特科技有限公司测序,测序结果已上传到 NCBI GenBank 中(登录号为 JF970185、JF970186、JF970187)。

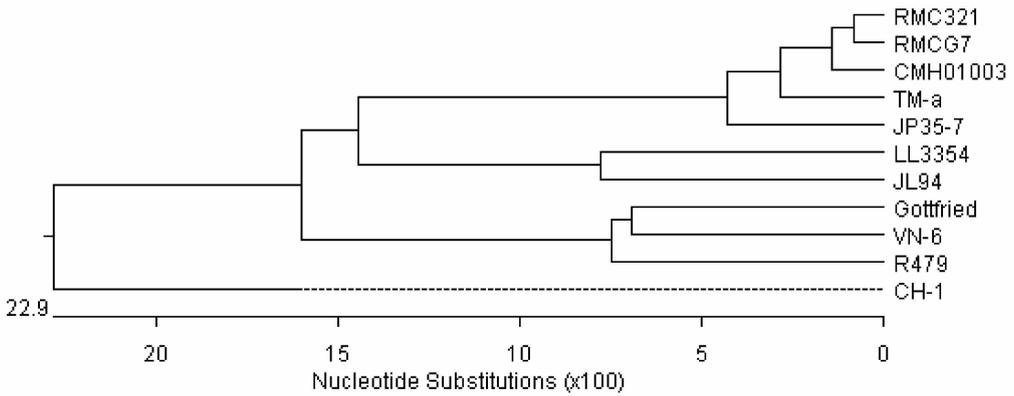
为进一步分析分离株 TM-a 与其它 PGAR 毒株间的亲缘关系,从 GenBank 中选取不同地方分离株的 VP6、VP7 和 VP8 基因序列和 TM-a 株的基

因一起输入 DNASTar 中的 MegAlign 软件,绘制出这 3 个基因系统发育进化树(图 6)。与 TM-a 株 VP6 基因同源性最高的是中国北京人源 LL3454 毒株,相似性为 96.0%;与其同源性最高的猪源毒株是印度的 RU172 毒株,相似性为 93.5%,该毒株与其它毒株的同源性因地域或宿主差异而存在差异。与 TM-a 株 VP7 基因同源性最高的是印度人源

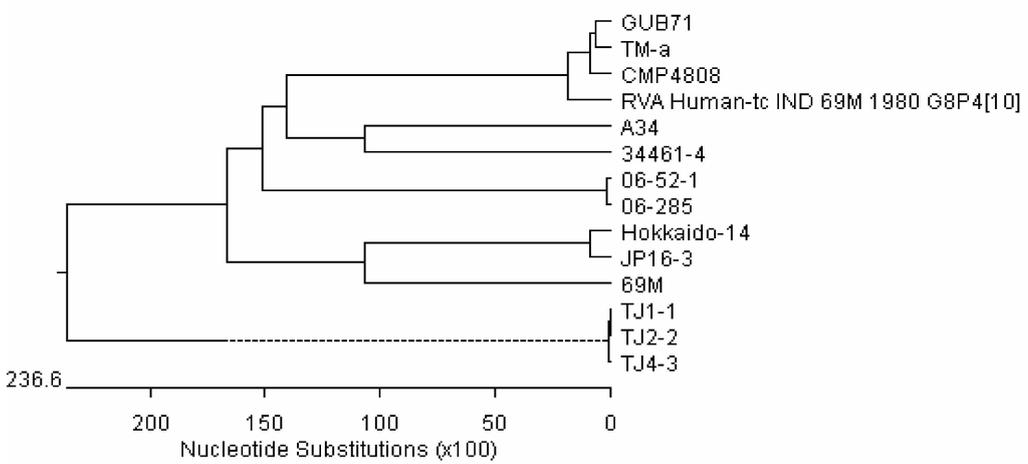
RMC321 毒株,相似性为 95.1%;与其同源性最高的猪源毒株是日本的 JP35-7 毒株,相似性为 92.3%。与 TM-a 株 VP8 基因同源性最高的是日本野猪源 GUB71 毒株,相似性为 97.0%;但印度人源 RVA/Human-tc/IND/69M/1980/G8P4^[10] 毒株与分离株 TM-a 的相似性为 95.0%,该毒株与其它毒株的同源性因地域或宿主差异而存在差异。



A



B



C

图 6 猪 A 群轮状病毒 VP6(A)、VP7(B)和 VP8(C)基因系统进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic trees constructed on the basis of VP6 (A), VP7 (B) and VP8 (C) from PGAR strains

3 讨论

轮状病毒在体外分离培养比较困难^[1,18],在接种 MA-104 细胞前用胰酶处理病料及在细胞维持液中加适量的胰酶是成功分离轮状病毒的关键。胰酶可能促进轮状病毒粒子外衣壳蛋白 VP4 裂解成 VP5 和 VP8,增强其吸附能力,从而在细胞上增殖。本试验中,作者在病毒接种前用终浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 胰蛋白酶 37°C 作用 30 min,细胞维持液中添加终浓度 $1\sim 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胰酶。

病毒盲传至第 3 代开始出现明显 CPE,随着传代次数增加,一般在接种后 24 h 开始出现轻微 CPE,表现为细胞变圆、脱落及拉网现象。该分离毒株从第 3 代至 25 代均产生稳定 CPE,利用实验室已建立的常规 RT-PCR^[16] 检测,结果为 PGAR 阳性(图 1),证实猪轮状病毒已在 MA-104 细胞上增殖。在传至第 21 代的过程中,每代在接种 18 h 左右都有明显的 CPE,说明病毒对 MA-104 细胞适应较强。

Mukherjee 等对人 A 群轮状病毒 G9P[6] 毒株基因序列进行了分析,VP6、VP1~3 和 NPS2~5 与人源 Wa-like 毒株和猪源 Gottfried-like 毒株的相似性在 80%~90%,而 NSP1 和 VP8 仅与猪源 Gottfried-like 和 YM-like 毒株相似^[13]。从感染的婴儿中分离的一株新轮状病毒毒株,VP4 基因与牛轮状病毒毒株 B223 有较近的亲缘关系,而 VP7 基因与人源轮状病毒关系较密切^[14]。本试验通过对 TM-a 毒株 VP6、VP7 和 VP8 基因的同源性分析发现,与 TM-a 株 VP6、VP7 和 VP8 基因相似性最高毒株的分别为中国北京人源 LL3354 株、印度人源 RMC321 株和日本野猪源 GUB-71 株,其同源性分别为 96.0%、95.1% 和 97.0%。可以利用 VP4 和 VP7 抗体对轮状病毒进行分型^[19]。这些研究结果均说明了轮状病毒的多样性和复杂性^[20],以及猪源轮状病毒和人源轮状病毒的高度相似性,推测它们之间可能发生基因重组,该病毒可能在人畜间交叉传播。对猪轮状病毒的分子生物学研究将会成为未来对猪病毒性腹泻病的防控提供重要依据,具有极其重要的临床意义。

参考文献:

[1] BROOR S, GHOSH D, MATHUR P. Molecular epidemiology of rotaviruses in India[J]. *Indian J Med*

Res, 2003, 118: 59-67.

- [2] HOSHINO Y, HONMA S, JONES R W, et al. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains[J]. *Virology*, 2005, 5332(1): 177-188.
- [3] MARTELLA V, COLOMBRITA D, LORUSSO E, et al. Detection of a porcine-like rotavirus in a child with enteritis in Italy[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(10): 3501-3507.
- [4] BANYAI K, ESONA M D, KERIN T K, et al. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain G11P[6] from Ecuador[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(11): 1823-1829.
- [5] MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, HEIMAN E, et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains[J]. *J Virol*, 2008, 82(7): 3204-3219.
- [6] SANTOS N, LIMA R C, NOZAWA C M, et al. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(8): 2734-2736.
- [7] WARD R L, NAKAGOMI O, KNOWLTON D R, et al. Evidence for natural reassortants of human rotaviruses belonging to different genogroups[J]. *J Virol*, 1990, 64(7): 3219-3225.
- [8] 田小艳,孙 华,邓雨修,等. 猪轮状病毒分离与鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(10): 85-87.
- [9] AGBALIKA F, HARTEMANN P, FOLIGUET J M. Trypsin-treated Ma-104: a sensitive cell line for isolating enteric viruses from environmental samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47(2): 378-380.
- [10] PRABHA S, VERGHESE S. Detection of porcine rotavirus from tissue and faecal specimens[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2009, 27(2): 149-152.
- [11] RODÁK L, SMÍTALOVÁ R, ŠMÍD B, et al. Comparing electron microscopy and a competitive blocking ELISA in the detection of rotaviruses in porcine faeces[J]. *Vet J*, 2009, 187(2): 279-281.
- [12] MARTELLA V, CIARLET M, BANYAI K, et al. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain[J]. *Virology*,

- 2006, 346(2): 301-311.
- [13] MUKHERJEE A, DUTTA D, GHOSH S, et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(5): 733-746.
- [14] NAKAGOMI O, NAKAGOMI T. Molecular evidence for naturally occurring single VP7 gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups [J]. *Arch Virol*, 1991, 119(1-2): 67-81.
- [15] WANG Y H, KOBAYASHI N, NAGASHIMA S, et al. Full genomic analysis of a porcine-bovine reassortant G4P[6] rotavirus strain R479 isolated from an infant in China [J]. *J Med Virol*, 2010, 82(6): 1094-1102.
- [16] 张 坤,何启盖. 猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪 A 群轮状病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及临床应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(8): 1001-1005.
- [17] SONG D S, KANG B K, OH J S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis, and porcine group A rotavirus[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2006, 18: 278-281.
- [18] WYATT R G, JAMES HD J R, PITTMAN A L, et al. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes[J]. *J Clin Microbiol*, 1983, 18(2): 310-317.
- [19] COULSON B S. VP4 and VP7 typing using monoclonal antibodies[J]. *Arch Virol Suppl*, 1996, 12: 113-118.
- [20] JAIN V, DAS B K, BHAN M K, et al. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(10): 3524-3529.

(编辑 白永平)