

福建省猪群感染牛病毒性腹泻病毒的病原学检测与分析

徐磊¹, 曾亮明^{2,3}, 王玉玲³, 陈先进³, 林伯全¹, 林拱阳³,
傅光华², 施少华², 程龙飞², 黄瑜^{2*}, 张渊魁^{3*}

(1. 福建农业职业技术学院动物科学系, 福州 350119; 2. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013;
3. 福州大北农生物技术有限公司, 福州 350014)

摘要: 旨在建立鉴别牛病毒性腹泻病毒(BVDV)与猪瘟疫病毒(CSFV)的 RT-PCR 检测方法, 用于福建省猪群感染 BVDV 的病原学检测, 并进行猪源 BVDV 协同感染的病原学调查。根据 BVDV 5'-UTR 保守序列建立猪源 BVDV 的特异性 RT-PCR, 进行敏感性、特异性、重复性试验, 然后对福建省 9 个地市 42 个猪场的 458 份临床样品进行 BVDV 检测及测序, 并参照已有的 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV 和 PCV-2 病原检测方法对 BVDV 阳性样品进行协同感染检测。结果显示该方法敏感度达 0.1 TCID₅₀, 检测 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV、PCV-2 和 PPV 均为阴性, 重复 5 次进行敏感性和特异性试验的结果一致; 样品 BVDV 病原阳性率 10.04% (46/458), 猪场阳性率 78.57% (33/42), 9 个地市阳性率 100% (9/9); 其中 46 份 BVDV 阳性样品 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV 和 PCV-2 感染的阳性率分别为 91.30% (42/46)、50.00% (23/46)、41.30% (19/46)、63.04% (29/46)、37.00% (17/46)。结果表明, 建立的 RT-PCR 方法敏感性高、特异性强、重复性好, 适合用于猪源 BVDV 的监测; 福建省猪群 BVDV 感染情况较普遍, 且与多种病毒协同, 其中 CSFV 协同感染率最高。

关键词: 福建省; 猪源牛病毒性腹泻病毒; RT-PCR; 病原学检测; 协同感染

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)12-2006-07

Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) from Swine in Fujian Province

XU Lei¹, ZENG Liang-ming^{2,3}, WANG Yu-ling³, CHEN Xian-jin³, LIN Bo-quan¹, LIN Gong-yang³,
FU Guang-hua², SHI Shao-hua², CHENG Long-fei², HUANG Yu^{2*}, ZHANG Yuan-kui^{3*}

(1. Department of Animal Science, Fujian Agricultural Vocational Technical College, Fuzhou 350119, China;
2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 3. Fuzhou Da Bei Nong Biotech Company Limited, Fuzhou 350014, China)

Abstract: The study was aimed at establishing a reverse transcriptase PCR (RT-PCR) to differentiate swine bovine viral diarrhea virus (BVDV) and classical swine fever virus (CSFV) for the investigation of BVDV from swine in Fujian province and combined infection of swine BVDV. According to the conserved gene sequence of BVDV 5'-UTR, a specific RT-PCR was established and then sensitivity, specificity, repeatability were tested for the detection of BVDV in 458 clinical samples from 42 swine farms in 9 regions of Fujian province. Then according to the reference CSFV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), highly pathogenic PRRSV (HP-PRRSV), pseudorabies virus (PRV) and porcine circovirus type 2 (PCV-2) were detected in BVDV positive samples. The results showed that sensitivity was determined as 0.1 TCID₅₀

收稿日期: 2014-03-18

基金项目: 福建省科技计划重大项目(2012N3004); 福州市区域科技重大项目(2011-Q-25); 福建农业职业技术学院科研专项项目(14-ZM-02)

作者简介: 徐磊(1984-), 男, 江西赣州人, 讲师, 主要从事畜禽传染病研究, E-mail: xulei0328@163.com

* 通信作者: 黄瑜, 研究员, E-mail: huangyu_815@163.com; 张渊魁, 研究员, E-mail: zhang.yuankui@qq.com

BVDV. In addition, all negative controls such as CSFV, PRRSV, HP-PRRSV, PRV, PCV-2 and porcine parvovirus virus (PPV) showed negative detection in the specificity assay. Both sensitivity and specificity were repeated five times with similar results. The BVDV positive rate of swine, swine farm and 9 regions was 10.04% (46/458), 78.57% (33/42) and 100% (9/9) in samples by sequence data, respectively, and the positive rate of 46 BVDV positive samples which infected with CSFV, PRRSV, HP-PRRSV, PRV and PCV-2 were 91.30% (42/46), 50.00% (23/46), 41.30% (19/46), 63.04% (29/46) and 37.00% (17/46). These findings indicated that the method with high sensitivity, specificity and reproducibility could provide an efficient tool for detection of swine BVDV. The BVDV infection in swine was common in Fujian province. And it was combined infection with other pathogens, especially CSFV.

Key words: Fujian province; swine BVDV; RT-PCR; aetiology detection; combined infection

牛病毒性腹泻病毒 1 型 (bovine viral diarrhea virus 1, BVDV 1)、牛病毒性腹泻病毒 2 型 (bovine viral diarrhea virus 2, BVDV 2)、猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV)、边界病毒 (border disease virus, BDV) 均属于黄病毒科瘟病毒属成员^[1]。BVDV 感染宿主广泛, 包括牛、猪、羊、骆驼、鹿等, 且其致病机制与临床类型较为复杂^[2]。在 1973 年, 猪源 BVDV 首次从自然感染发病猪体内分离并鉴定^[3], 之后世界各地均有 BVDV 自然感染猪的报道。中国于 1996 年首次从疑似猪瘟病料中分离出 BVDV^[4]。猪感染 BVDV 后可引起类似于猪瘟的临床症状和病理变化^[5], 对猪群危害很大^[6-7], 同时由于 BVDV 和 CSFV 在免疫学上存在着广泛的交叉性, 这些都给猪瘟的诊断和防治提出了新的课题^[8]。本研究旨在建立一种鉴别猪源 BVDV 与 CSFV 的 RT-PCR 检测方法, 用于福建省猪群感染 BVDV 的病原学检测, 并参照已有的 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV 和 PCV-2 检测方法进行猪源 BVDV 协同感染的病原学调查, 以期为深入开展猪源 BVDV 的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒

BVDV Oregon C24V 株 (TCID₅₀ 为 $10^{-5.7} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、高致病性 PRRSV (HP-PRRSV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV-2)、猪细小病毒 (PPV) 由福州大北农生物技术有限公司提供。

1.2 主要试剂及仪器

TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司; M-MLV

Reverse Transcriptase、Ribonuclease Inhibitor、dNTP Mixture、Ex-Taq 酶、Random primer 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 片段快速胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司; 质粒提取试剂盒、pGM-T 快连载体、T₄ DNA ligase、Top 10 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; PCR 扩增仪为 Eppendorf Mastercycler Gradient AG22331。

1.3 样品来源

458 份样品, 包括 160 份疑似猪瘟的病猪脏器(脾、扁桃体、肺、脑组织及淋巴结)和 298 份临床健康猪抗凝血样, 分别来自于福建省的福州、宁德、莆田、漳州、泉州、厦门、龙岩、三明、南平共 9 个地市的 42 个猪场。

1.4 引物设计合成

选择 GenBank 中 BVDV 与 CSFV 标准毒株及其登录号: NADL (M31182)、Oregon C24V (AF091605)、New York' 93 (AF502399)、ZM-95 (AF526381)、SD1 (M96751)、CSFV SWH (DQ127910)、HCLV (AF531433) 等, 分析其核苷酸序列, 选取 5'-UTR 高度保守且特异核苷酸区域, 应用 Primer Premier 6 设计 1 对猪源 BVDV 特异性引物, 由宝生物工程(大连)有限公司合成, 其序列如下, P1: 5'-TAGCCATGCCCTTAGTAGGACT-3', P2: 5'-ATTCCATGTGCCATGTACAGCAG-3', 扩增片段 289 bp。

1.5 病毒 RNA 提取与 cDNA 合成

1.5.1 病毒 RNA 提取 病毒悬液经 4 °C 3 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 取离心上清液 200 μL, 加入 1 000 μL Trizol, 轻混 1 min, 室温静止 10 min; 再加入 200 μL 氯仿, 轻混 1 min, 室温静止 10 min; 于 4

℃ 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取离心上层液, 加入 1 倍体积的异丙醇, 于 4 ℃ 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 000 μL 75% 乙醇, 于 4 ℃ 10 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 小心倾弃乙醇, 置于超净台中晾干, 用 RNase-Free water 溶解, 立即进行反转录或者 -75 ℃ 冻存待用。

1.5.2 cDNA 合成 按照以下程序进行反转录合成 cDNA: 病毒 RNA 1.0 μL, 5 × RT-Buffer 2.0 μL, dNTP (各 2.5 mmol · L⁻¹) 0.8 μL, Random primer (20 pmol · μL⁻¹) 0.5 μL, M-MLV Reverse Transcriptase (10 U · μL⁻¹) 0.5 μL, Ribonuclease Inhibitor (40 U · μL⁻¹) 0.5 μL, RNase-Free water 定容至 10.0 μL, 轻柔混匀, 室温放置 10 min, 移入 42 ℃ 水浴 60 min, 得到的 cDNA 置 -20 ℃ 保存备用。

1.6 PCR 扩增及鉴定

PCR 扩增反应体系: dNTP (各 2.5 mol · L⁻¹) 0.8 μL, 上、下游引物 (20 pmol · μL⁻¹) 各 0.5 μL, cDNA 1.0 μL, Ex-Taq 酶 0.1 μL, ddH₂O 定容至 10.0 μL; PCR 扩增反应程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 按照 DNA 片段快速回收试剂盒说明书进行 DNA 片段纯化。纯化的 PCR 产物克隆至 pGM-T 载体, 质粒提取试剂盒抽提质粒, 酶切鉴定为阳性的克隆送上海 Invitrogen 公司测序, 测序结果与已发表的 BVDV 的 5'-UTR 序列的相应区域作同源性比较。

1.7 RT-PCR 敏感性试验

将 BVDV Oregon C24V 病毒液 (TCID₅₀ 为 10^{-5.7} · 100 μL⁻¹) 进行 10⁻¹ ~ 10⁻⁹ 系列稀释成 9 个稀释度, 每个稀释度分别取 200 μL (即分别含 2 × 10^{4.7}、2 × 10^{3.7}、2 × 10^{2.7}、2 × 10^{1.7}、2 × 10^{0.7}、2 × 10^{-0.3}、2 × 10^{-1.3}、2 × 10^{-2.3} 和 2 × 10^{-3.3} TCID₅₀ 病毒量) 按 1.5 和 1.6 方法进行 RNA 提取及 RT-PCR 扩增, 将检测结果为阳性的最高稀释度换算成 TCID₅₀, 即为所建立的 RT-PCR 方法敏感度。

1.8 RT-PCR 特异性试验

按 1.5 方法对 BVDV Oregon C24V、CSFV、PRRSV、HP-PRRSV 抽提 RNA 并合成 cDNA 作为模板, 按王宪文等^[9] 的方法对 PRV、PCV-2、PPV 抽提 DNA 作为模板, 按 1.6 体系及程序进行 PCR 扩增, 验证特异性。

1.9 RT-PCR 重复性试验

将 1.7 和 1.8 试验分别重复进行 5 次, 观测重复情况。

1.10 福建省猪源 BVDV 感染的病原学检测

脏器样品经研磨冻存待检; 提取血液样品白细胞待检。应用建立的 RT-PCR 方法进行 BVDV 病原学检测并进行克隆、测序, 测序结果与已发表的 BVDV 的 5'-UTR 序列的相应区域作同源性比较。

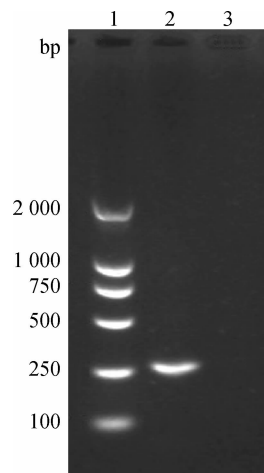
1.11 BVDV 阳性样品中其他病毒的检测

参照已有的病原检测方法^[9-12] 对 BVDV 阳性样品分别进行 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV 和 PCV-2 协同感染检测。

2 结果

2.1 BVDV RT-PCR 检测方法的建立

2.1.1 BVDV RT-PCR 扩增及鉴定 对 BVDV Oregon C24V 株进行 RT-PCR 扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得了约 289 bp 条带 (图 1), 与预期相符。回收条带、克隆、测序, 经 Blast, 与 GenBank 中的 BVDV 序列相似性在 98% 以上。



1. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 2. BVDV Oregon C24V 扩增产物; 3. 阴性对照

1. DL2000 DNA marker; 2. RT-PCR product of BVDV Oregon C24V; 3. Negative control

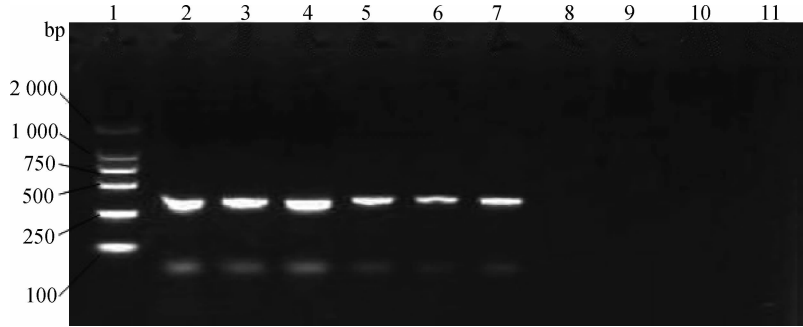
图 1 BVDV RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of RT-PCR amplification of BVDV

2.1.2 RT-PCR 敏感性试验 取 5 μL RT-PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示 2 × 10^{4.7}、2 × 10^{3.7}、2 × 10^{2.7}、2 × 10^{1.7}、2 × 10^{0.7} 和 2 × 10^{-0.3} TCID₅₀ BVDV 的 RT-PCR 结果都为阳性, 而 2 × 10^{-1.3}、2 × 10^{-2.3} 和 2 × 10^{-3.3} TCID₅₀ BVDV 的 RT-PCR 结果都为阴性。因 1.6 试验 PCR 扩增反

应体系中 cDNA 的体积为 1.5 试验反转录合成 cDNA 体积的 1/10, 所以本 RT-PCR 可检测到 $1/10 \times$

$2 \times 10^{-0.3} = 2 \times 10^{-1.3} \text{TCID}_{50}$ BVDV, 即本 RT-PCR 敏感度达 0.1TCID_{50} (图 2)。



1. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 2~10. 分别为 $2 \times 10^{4.7}$ 、 $2 \times 10^{3.7}$ 、 $2 \times 10^{2.7}$ 、 $2 \times 10^{1.7}$ 、 $2 \times 10^{0.7}$ 、 $2 \times 10^{-0.3}$ 、 $2 \times 10^{-1.3}$ 、 $2 \times 10^{-2.3}$ 和 $2 \times 10^{-3.3} \text{TCID}_{50}$ BVDV 的 RT-PCR 产物; 11. 阴性对照

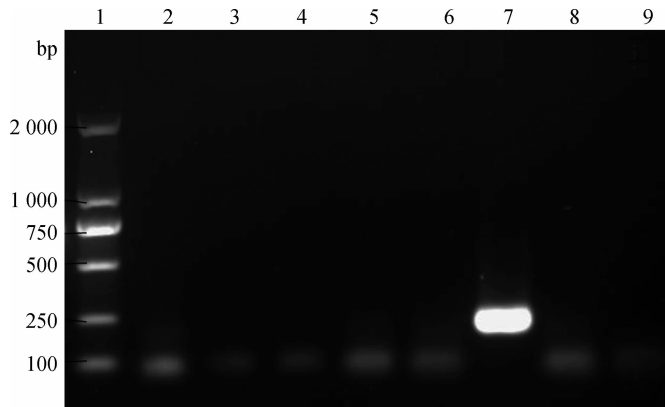
1. DL2000 DNA marker; 2-10. RT-PCR amplified fragments of $2 \times 10^{4.7}$ 、 $2 \times 10^{3.7}$ 、 $2 \times 10^{2.7}$ 、 $2 \times 10^{1.7}$ 、 $2 \times 10^{0.7}$ 、 $2 \times 10^{-0.3}$ 、 $2 \times 10^{-1.3}$ 、 $2 \times 10^{-2.3}$ and $2 \times 10^{-3.3} \text{TCID}_{50}$ BVDV, respectively; 11. Negative control

图 2 BVDV RT-PCR 敏感性试验

Fig. 2 Sensitivity of RT-PCR detection for BVDV RNA

2.1.3 RT-PCR 特异性试验 该引物从 BVDV 扩增出 1 条预期大小为 289 bp 的条带, 但不能从 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV、PCV-2 和 PPV 扩增出阳性条带(图 3)。

2.1.4 重复性试验 重复进行 1.7 和 1.8 试验 5 次, 观测重复情况。5 次敏感性试验都与 2.1.2 一致; 5 次特异性试验结果都与 2.1.3 一致。



1. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 2~8. 分别为 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV、PCV-2、BVDV 和 PPV 扩增产物; 9. 阴性对照

1. DL2000 DNA marker; 2-8. PCR amplified fragments of CSFV, PRRSV, HP-PRRSV, PRV, PCV-2, BVDV and PPV, respectively; 9. Negative control

图 3 BVDV PCR 特异性试验

Fig. 3 Specificity of PCR detection for BVDV DNA

2.2 福建省猪源 BVDV 感染的病原学检测

458 份样品经检测及克隆、测序, 其中 160 份脏器样品有 22 份呈 BVDV 阳性, 脏器样品阳性率 13.75%; 298 份血液样品有 24 份呈 BVDV 阳性, 血液样品阳性率 8.05%, 即: 样品平均阳性率为 10.04%。42 个猪场中, 有 33 个猪场的样品呈 BVDV 阳性, 猪场阳性率为 78.57%, 且阳性猪场在 9 个地市都有分布(表 1)。46 份阳性样品的扩增产

物测序, 均得到 289 bp 大小的 DNA 片段, 且 46 份样品中 BVDV 基因片段核苷酸序列相似性在 98.3%~99.7%, 与 GenBank 中发布的 BVDV Oregon C24V 株的核酸序列相似性在 91%~99%, 而与 BVDV NADL 株的核苷酸相似性为 88%~97%。可见, 本研究中测定的 46 份阳性样品的基因序列相似性较高。

表 1 BVDV 检测结果

Table 1 The detection results of BVDV

| 项目 Items | 脏器样品 Organ samples | 血液样品 Blood samples | 猪场 Swine farms | 地市 Regions |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---------------|
| 调查数(数量) Detection number | 160 | 298 | 42 | 9 |
| 阳性数(数量) Positive number | 22 | 24 | 33 | 9 |
| 阳性率/% Positive rate | 13.75 | 8.05 | 78.57 | 100 |

2.3 BVDV 阳性样品中其他病毒的检测

对 2.2 中 46 份 BVDV 阳性样品进行其他病毒的病原学检测,结果显示 46 份 BVDV 阳性样品中,CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV、PCV-2 的阳性

率分别为 91.30% (42/46)、50.00% (23/46)、41.30% (19/46)、63.04% (29/46)、37.00% (17/46),即 BVDV 与 CSFV 的协同感染率最高。详细检测情况见表 2。

表 2 BVDV 阳性样品中 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV 和 PCV-2 的检测结果

Table 2 The detection results of CSFV, PRRSV, HP-PRRSV, PRV and PCV-2 in BVDV positive samples

| 样品号 Sample No. | 检测结果 Detection results | | | | | 样品号 Sample No. | 检测结果 Detection results | | | | |
|-------------------|------------------------|-------|----------|-----|-------|-------------------|------------------------|-------|----------|-----|-------|
| | CSFV | PRRSV | HP-PRRSV | PRV | PCV-2 | | CSFV | PRRSV | HP-PRRSV | PRV | PCV-2 |
| 1 | + | - | + | + | - | 24 | + | - | - | + | - |
| 2 | + | + | - | + | - | 25 | + | - | - | + | - |
| 3 | + | - | + | + | - | 26 | - | - | - | + | + |
| 4 | - | - | + | + | + | 27 | + | + | - | - | - |
| 5 | + | - | + | - | + | 28 | + | + | + | + | - |
| 6 | + | - | - | - | - | 29 | + | - | + | - | + |
| 7 | + | - | - | - | - | 30 | + | - | + | + | + |
| 8 | + | + | - | + | - | 31 | + | + | - | - | + |
| 9 | - | + | - | + | + | 32 | + | + | - | + | - |
| 10 | + | + | + | + | + | 33 | + | - | + | + | - |
| 11 | + | + | - | - | - | 34 | + | - | + | + | + |
| 12 | + | - | + | + | - | 35 | + | + | - | - | + |
| 13 | + | - | + | + | - | 36 | + | + | - | - | - |
| 14 | + | - | - | + | - | 37 | + | + | - | - | - |
| 15 | + | + | + | - | + | 38 | + | - | - | + | - |
| 16 | + | - | + | - | + | 39 | + | - | - | + | - |
| 17 | + | - | - | + | + | 40 | + | + | - | + | - |
| 18 | + | - | - | + | + | 41 | + | + | + | + | - |
| 19 | + | + | - | + | - | 42 | + | + | + | + | - |
| 20 | + | - | + | - | - | 43 | + | + | - | + | - |
| 21 | + | + | + | - | + | 44 | + | - | - | + | + |
| 22 | - | + | - | + | + | 45 | + | + | - | - | - |
| 23 | + | + | + | - | - | 46 | + | + | - | - | - |

“+”表示抗原检测结果阳性,“-”表示抗原检测结果阴性

“+” means positive result of antigen detection,“-” means negative result of antigen detection

3 讨 论

由于 BVDV 与 CSFV 存在交叉抗原,临床上很难用血清学方法将其鉴别诊断,而 PCR 方法作为一种分子诊断技术,具有其他方法不可比拟的优点^[13]。本研究所建立的 RT-PCR 方法最低能检出 0.1 TCID₅₀ BVDV,检测 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV、PCV-2 和 PPV 均为阴性。重复性试验说明,此方法除了特异、敏感外,还具有很好的稳定性,适合用于猪源 BVDV 的监测。

用所建立的 RT-PCR 方法进行福建省猪群感染 BVDV 的病原学检测,结果显示,9 个地市阳性率为 100%(9/9),猪场阳性率为 78.57%(33/42),而猪群阳性率为 10.04%(46/458),与其他省份区域的报道^[14-16]类似,表明福建省猪群 BVDV 感染情况较普遍。对 46 份 BVDV 阳性样品的扩增产物测序结果分析表明,福建省猪源 BVDV 毒株的基因序列相似性较高。在 46 份 BVDV 阳性样品中,血液样品阳性率为 8.05%(24/298),表明临床健康的猪存在一定比例的 BVDV 隐性感染,这种可能适应猪体的 BVDV 感染后会在猪群引起较严重的后果^[17],应予以重视;而脏器样品阳性率 13.75%(22/160),表明病猪存在相对临床健康猪更高比例的 BVDV 感染。

福建省猪源 BVDV 协同感染的病原学检测结果显示,46 份 BVDV 阳性样品中,猪源 BVDV 与 CSFV、PRRSV、HP-PRRSV、PRV、PCV-2 共 5 种临床常见病原存在不同程度的协同感染,而猪源 BVDV 在混合感染中的角色有待进一步研究。46 份阳性样品中,没有发现 BVDV 单一感染的现象,其中与 CSFV 协同感染率最高,为 91.30%(42/46),戴益民等^[18]的研究也出现了猪源 BVDV 与 CSFV 协同感染的临床样本,这些都与 J. Dahle 等^[19]的试验结果不符(J. Dahle 等在攻毒试验中发现 BVDV 与 CSFV 在猪体内很难共存)。猪源 BVDV 与 CSFV 协同感染的出现,与临床上经常使用污染 BVDV 的猪瘟细胞苗^[13-14,20]是否有关仍需要做进一步研究。

4 结 论

所建立的鉴别猪源 BVDV 与 CSFV 的 RT-PCR 检测方法敏感性高、特异性强、重复性好,适合用于猪源 BVDV 的监测;应用其对福建省猪群感染

BVDV 及其协同感染的病原学检测进行研究,发现福建省猪群 BVDV 感染情况较普遍,且与多种病毒协同,其中与 CSFV 的协同感染率最高。

参考文献:

- [1] FAUQUET C. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses[M]. Academic Press, 2005.
- [2] 吴文辉. 猪群 BVDV 感染状况调查及成因初步分析[D]. 上海:上海交通大学, 2011.
- [3] FERNELIUS A L, AMTOWER W C, LAMBERT G, et al. Bovine Viral Diarrhea Virus in swine: characteristics of virus recovered from naturally and experimentally infected swine [J]. *Can J Comp Med*, 1973, 37(1):13-20.
- [4] 王新平, 涂长春, 李红卫, 等. 从疑似猪瘟病料中检出牛病毒性腹泻病毒[J]. *中国兽医学报*, 1996, 16(4): 341-345.
- [5] TERPSTRA C, WENSVOORT G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhea virus associated with signs resembling swine fever [J]. *Res Vet Sci*, 1988, 45(2):137-142.
- [6] 卫秀余, 沈 强, 余红梅, 等. 2009 年猪病诊断回顾[J]. *今日养猪业*, 2010(1):34-35.
- [7] 邓 宇, 孙春清, 张宏彪, 等. 1 株猪源牛病毒性腹泻病毒的分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(3): 416-423.
- [8] 周绪斌, 王新平, 宣 华, 等. 鉴别牛病毒性腹泻病毒和猪瘟病毒的复合 PCR 方法及其应用[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(6):557-560.
- [9] 王宪文, 刘兴友, 梁美兰, 等. 猪圆环病毒 II 型 PCR 检测方法的研究[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(9): 28-31.
- [10] 李 艳, 仇华吉, 王秀荣, 等. 鉴别猪瘟强毒和弱毒的反转录-复合套式聚合酶链式反应(RT-nPCR)检测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(9): 1907-1914.
- [11] 肖跃强, 管 宇, 唐 娜, 等. PRRSV 经典与高致病性毒株 RT-PCR 鉴别检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(7):873-877.
- [12] 蔺 芳, 尹双辉, 尚佑军, 等. 多重 PCR 方法快速鉴别猪伪狂犬疫苗毒和野毒[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(13):5889-5891.
- [13] 范学政, 宁宜宝, 王 琴, 等. 用 RT-PCR 方法检测猪瘟细胞苗中污染牛病毒性腹泻病毒[J]. *中国兽医杂志*, 2010, 46(1):8-10.

- [14] 邓宇,张荣,丛雁方,等.猪源牛病毒性腹泻病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立[J].畜牧兽医学报,2011,42(7):1046-1050.
- [15] 宋永峰,张志,张燕霞,等.猪源牛病毒性腹泻病毒的流行初探[J].中国动物检疫,2008,25(7):25-27.
- [16] 孟雨,吴发兴,朱紫祥,等.牛病毒性腹泻病毒 RT-PCR检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2010,40(1):51-54.
- [17] 王新平,周绪斌.瘟病毒间的差异及起源[J].动物医学进展,1997,18(2):1-4.
- [18] 戴益民,张文波,刘文峰,等.江西部分地区猪瘟疑似病例中牛病毒性腹泻病毒感染情况的初步调查[J].中国兽医杂志,2010,46(7):12-14.
- [19] DAHLE J,SCHAGEMANN G,MOENNIG V,et al. Clinical, virological and serological findings after intranasal inoculation of pigs with bovine viral diarrhoea virus and subsequent intranasal challenge with Hog Cholera Virus [J]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1993, 40(1):46-54.
- [20] 邓宇,蔺涛,张荣,等.猪源牛病毒性腹泻病毒套式PCR检测方法的建立[J].中国兽医学报,2012,32(5):654-657.

(编辑 白永平)