

牛呼吸疾病综合征主要病毒的检测、分离与鉴定

徐肖文^{1,2,3}, 项志杰^{3,4}, 王琛^{1,2,3}, 郭爱珍^{1,2,3,4,5}, 陈颖钰^{*1,2,3,4}

- 1 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070
- 2 华中农业大学动物科技学院动物医学院, 湖北 武汉 430070
- 3 华中农业大学生猪健康养殖协同创新中心, 湖北 武汉 430070
- 4 华中农业大学湖北省兽医流行病学国际科技合作基地, 湖北 武汉 430070
- 5 华中农业大学湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070

徐肖文, 项志杰, 王琛, 郭爱珍, 陈颖钰. 牛呼吸疾病综合征主要病毒的检测、分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 4978-4986

Xu Xiaowen, Xiang Zhijie, Wang Chen, Guo Aizhen, Chen Yingyu. Detection, isolation, and identification of the main viruses causing bovine respiratory disease complex[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 4978-4986

摘要:【背景】牛呼吸疾病综合征(bovine respiratory disease complex, BRDC)是由病原和环境共同作用所致的以支气管肺炎为主的多病因、多症状性疾病, 给国内外肉牛养殖业带来了巨大经济损失。引起BRDC的病毒主要包括牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)、牛呼吸道合胞体病毒(bovine respiratory syncytial virus, BRSV)、牛副流感病毒3型(bovine parainfluenza virus type 3, BPIV-3)等, 优势病原因地、因时、因畜种而异。【目的】清晰了解我国BRDC的流行现状及流行毒株, 是有效防控该病的基础。【方法】自2021年9月到2022年7月间, 运用反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术对来自湖北、湖南、安徽、河南、广东、广西和贵州等地21个牧场的179头具有呼吸道症状牛的196份样品(167份鼻拭子、13份肺脏组织、1份鼻黏液、5份气管拭子、1份唾液和9份血清)进行BRSV、IBRV、BPIV-3和BVDV这4种病毒的检测。【结果】BRSV、IBRV、BPIV-3、BVDV的样本阳性检出率分别为7.14% (95% CI: 3.96, 11.69)、0.51% (95% CI: 0.01, 2.81)、4.08% (95% CI: 1.78, 7.88)和6.63% (95% CI: 3.58, 11.07); 179头牛检测该4种病毒的阳性检出率分别为7.82% (14/179) (95% CI: 4.34, 12.77)、0.56% (1/179) (95% CI: 0.01, 3.07)、4.47% (8/179) (95% CI: 1.95, 8.62)和7.26% (13/179) (95% CI: 3.92, 12.10)。0.56% (1/179) (95% CI: 0.01, 3.07)的牛为BVDV及BRSV共感染。进一步对阳性样品进行了病毒

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划(2021BEF02028); 国家现代农业(肉牛/牦牛)产业技术体系(CARS-37)

Supported by: Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2021BEF02028); National Modern Agriculture (Beef Cattle/Yak) Industrial Technology System (CARS-37)

*Corresponding author: E-mail: chenyingyu@mail.hzau.edu.cn

Received: 2022-09-08; Accepted: 2022-09-26; Published online: 2022-10-28

分离, 共获得 1 株 BVDV 和 6 株 BPIV-3, 分型显示 BVDV 为 1d 型、BPIV-3 为 C 型。【结论】本研究确定了我国部分地区牛呼吸疾病综合征的优势病毒为 BRSV、BVDV 及 BPIV-3, BVDV 及 BPIV-3 的优势血清型为 BVDV-1d、BPIV-3C。研究结果为相关疫苗的研制提供了基础, 为牛呼吸疾病综合征的防控提供了参考依据。

关键词: 牛呼吸疾病综合征; 病毒; 检测; 分离

Detection, isolation, and identification of the main viruses causing bovine respiratory disease complex

XU Xiaowen^{1,2,3}, XIANG Zhijie^{3,4}, WANG Chen^{1,2,3}, GUO Aizhen^{1,2,3,4,5}, CHEN Yingyu^{*1,2,3,4}

1 State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

2 College of Veterinary Medicine, College of Animal Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

3 The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

4 Hubei International Science and Technology Cooperation Base of Veterinary Epidemiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

5 Hubei Hongshan Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: [Background] Bovine respiratory disease complex (BRDC) is a multi-causal and polysymptomatic disease caused by the joint action of pathogens and environments, which brings serious economic losses to the beef cattle industry. The viral pathogens of BRDC include bovine respiratory syncytial virus (BRSV), infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), bovine parainfluenza virus 3 (BPIV-3), and bovine viral diarrhea virus (BVDV). The pathogen spectrum of BRDC varies regarding different places, time, and breeds. [Objective] To evaluate the epidemic status and dominant pathogens for the prevention and control of BRDC. [Methods] We obtained and tested 196 samples (including 167 nasal swabs, 13 lung tissue samples, 1 nasal mucus sample, 5 tracheal swabs, 1 saliva sample, and 9 serum samples) of 179 cattle with respiratory symptoms from 21 farms in Hubei, Hunan, Anhui, Henan, Guangdong, Guangxi, and Guizhou from September 2021 to July 2022 for BRSV, IBRV, BPIV-3, and BVDV by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). [Results] The positive rates of BRSV, IBRV, BPIV-3, and BVDV in the samples were 7.14% (95% CI: 3.96, 11.69), 0.51% (95% CI: 0.01, 2.81), 4.08% (95% CI: 1.78, 7.88), and 6.63% (95% CI: 3.58, 11.07), respectively. The positive rates of the four viruses in the cattle were 7.82% (14/179) (95% CI: 4.34, 12.77), 0.56% (1/179) (95% CI: 0.01, 3.07), 4.47% (8/179) (95% CI: 1.95, 8.62), and 7.26% (13/179) (95% CI: 3.92, 12.10), respectively. The co-infection with BVDV and BRSV occurred in 0.56% (1/179) (95% CI: 0.01, 3.07) of the cattle. One strain of BVDV and 6 strains of BPIV-3 were then isolated from the positive samples. RT-PCR results showed that the BVDV strain was of type 1d and all the 6 BPIV-3 strains were of type C. [Conclusion] This study revealed that the dominant viruses of BRDC were BRSV, BVDV, and BPIV-3 in some regions in China. BVDV-1d and BPIV-3C were the dominant subtypes of BVDV and BPIV-3, respectively. This study provides a basis for the development of related vaccines and further the prevention and control of BRDC.

Keywords: bovine respiratory disease complex; viruses; detection; isolation

随着肉牛产业的不断发展,牛呼吸疾病综合征(bovine respiratory disease complex, BRDC)已成为肉牛产业兴起的重要阻碍因素,同时也是养牛业的常发病^[1]。BRDC是由环境应激和病原(细菌、支原体及病毒等)共同作用所致。其病毒性病原主要包括牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV)、牛病毒性腹泻病毒(bovine viral diarrhea virus, BVDV)、牛呼吸道合胞体病毒(bovine respiratory syncytial virus, BRSV)和牛副流感病毒3型(bovine parainfluenza virus type 3, BPIV-3)等^[2],这些病毒感染健康牛后常引起咳嗽、流鼻涕、食欲减退与呼吸困难等临床症状,严重影响生产性能。为了解我国BRDC的流行现状及优势病毒,本研究收集了来自湖北、湖南、安徽、河南、广东、广西和贵州等不同地区的病牛组织样本,利用反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术对IBRV、BVDV、BRSV和BPIV-3四种病毒进行检测,并对阳性样品进行病毒的分离与鉴定,以期为疫苗研发和BRDC的防控提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源

自2021年9月到2022年7月收集来自湖北、湖南、安徽、河南、广东、广西和贵州等地区21个牛场的179头具有呼吸道症状牛的196份样品,包括167份鼻拭子、13份肺脏组织、1份鼻黏液、5份气管拭子、1份唾液和9份血清。

1.1.2 细胞

牛胚胎肾(madin-darby bovine kidney, MDBK)细胞购自中国兽医药品监察所。

1.1.3 主要试剂和仪器

DMEM高糖(2×)培养液,吉林吉诺生物工程有限责任公司;低熔点琼脂糖粉,武汉普兰德生物技术有限公司;2×Taq Master Mix、DNA/RNA Extraction Kit、HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;1.1×S4 Fidelity PCR Mix,北京金沙生物科技有限公司。琼脂糖凝胶电泳仪,北京六一生物科技有限公司;全自动核酸提取仪,南京诺唯赞医疗科技有限公司;基因扩增仪,杭州博日科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测病毒

提取病料的DNA/RNA, DNA病毒用PCR扩增检测IBRV, RNA病毒逆转录为cDNA后进行PCR扩增,检测BVDV、BPIV-3、BRSV。本研究所用引物如表1所示,引物由北京擎科生物科技有限公司合成。PCR反应体系:2×Taq Master Mix 12.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL,模板2 μL, ddH₂O 8.5 μL。PCR反应条件:95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 退火(BVDV、IBRV、BPIV-3退火温度分别为59.5、60.5、57.6 °C, BRSV一轮和二轮退火温度分别为53、56 °C) 15 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,扩增出阳性条带的样本送公司测序,鉴定正确的样本进行病毒分离。

1.2.2 病毒分离

阳性样品(病牛的肺组织样品充分匀浆后, 8 000 r/min离心3 min取上清液)反复冻融后经0.22 μm滤器过滤,取适量滤液接种于长满单层的MDBK细胞,在37 °C、5% CO₂培养箱中感染2 h,弃去滤液,用PBS清洗后加入含有2%胎牛血清和1%青链霉素双抗的DMEM

表 1 本研究所用到的引物

Table 1 Primers used in this study

Viruses	Target genes	Sequence (5'→3')	Product size (bp)	References
BPIV-3	N	F1: GAGAAAGACCCAGGAAGACAGA	704	[3]
		R1: ACACCCATCGCATAACTCCAGA		
		F2: CATCCATAGTTCCTTATGCATG	153	Designed by our laboratory
		R2: TTGGGTCGCTCTGTTTCC		
		F3: ACAGTATGTAACAGGACGGTCC	126	
IBRV	TK	R3: GCCTCTTGTAATCCCCAA		
		F: CCGACCGCCTCCTACACCAGATGCT	868	Designed by our laboratory
BRSV	N	R: GGGTGTAGGCAAGCTCACCGCAACG		
		F1: CAAACTAAATGACACTTTCAACAAG	566	[4]
BVDV	5'UTR	R1: CATTCATTCCTTAGTACATTGTTG		
		F2: CGTAGTACAGGTGACAACATTG	422	
		R2: ACCAAAGCAGCAACACATAGCAC		
BVDV	5'UTR	F: TCAGCGAAGGCCGAAAAGAGG	310	[5]
		R: TCCATGTGCCATGTACAGCAGAG		

维持液, 每日观察细胞病变。接毒 3-5 d 或细胞出现 80%以上病变后收毒, 反复冻融 3 次, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清并经 0.22 μm 滤器过滤后置-80 °C 备用。

1.2.3 PCR 鉴定

参照表 1 引物序列, 对盲传的每一代病毒液进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系: 1.1×S4 Fidelity PCR Mix 21 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 2 μL。PCR 反应条件: 98 °C 2 min; 95 °C 10 s, 退火(BVDV、IBRV、BPIV-3 退火温度分别为 59.5、60.5、57.6 °C, BRSV 一轮和二轮退火温度分别为 53、56 °C) 15 s, 72 °C 15 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收阳性条带产物进行测序。

1.2.4 噬斑纯化

对 1.2.3 鉴定正确的病毒进行噬斑纯化, 将病毒液进行 10 倍比稀释。选择 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 这 5 个稀释度接种长满单层 MDBK 细胞的 6 孔板, 剩余 1 个孔为阴性对照, 在 37 °C、含 5% CO₂ 培养箱中感染作用 2 h, 弃去滤液, 加入 2 mL 提前准备好的含有 2%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗和 DMEM 培养液(2×)

的低熔点琼脂糖, 待彻底凝固后置 37 °C、含 5% CO₂ 培养箱中培养, 每日观察病变, 挑取单个噬斑进行扩大培养。

1.2.5 TCID₅₀ 测定

将 MDBK 细胞消化后以每孔 200 μL 接种于 96 孔板, 待细胞长满单层后弃去细胞培养液, 使用不含血清和双抗的 DMEM 培养液将病毒原液进行 10 倍比系列稀释, 最高稀释到 10⁻⁸, 每个梯度做 8 个重复, 每孔加入 100 μL 病毒液, 在 5% CO₂、37 °C 培养箱中吸附 2 h 后补加 100 μL 维持液, 放于培养箱中培养, 于 3-5 d 后按照 Reed-Muench 法(TCID₅₀≥50%病变的病毒最高稀释度的对数+距离比例, 距离比指>50%的百分数-50%与>50%的百分数-低于 50%的百分数之比)统计结果。

1.2.6 BPIV-3 生长特性测定

将已知病毒滴度的病毒以 0.1 MOI (multiplicity of infection, 原液感染复数)接种长满单层的 MDBK 细胞, 分别于接毒后 3、6、9、12、18、24、30、33、42、48、60、72 h 收毒, 反复冻融 3 次, 测定各时间点的病毒滴度, 绘制生长曲线。

2 结果与分析

2.1 BRSV、IBRV、BPIV-3、BVDV 的阳性检出率

利用 RT-PCR 对 196 份临床病料进行检测, 结果显示, 7.14% (95% CI: 3.96, 11.69) (14/196, 14 份鼻拭子样本) 的临床样品检测到 BRSV, 6.63% (95% CI: 3.58, 11.07) (13/196, 13 份鼻拭子样本) 的临床样品检测到 BVDV, 0.51% (95% CI: 0.01, 2.81) (1/196, 1 份鼻拭子样本) 检测到 IBRV, 4.08% (95% CI: 1.78, 7.88) (8/196, 6 份鼻拭子样本及 2 份肺组织样本) 检测到 BPIV-3 (图 1-4)。

在 179 头牛中, BRSV、IBRV、BPIV-3、BVDV 这 4 种病毒的阳性检出率分别为 7.82% (95% CI: 4.34, 12.77) (14/179)、0.56% (95% CI: 0.01, 3.07) (1/179)、4.47% (95% CI: 1.95, 8.62) (8/179)、7.26% (95% CI: 3.92, 12.10) (13/179);

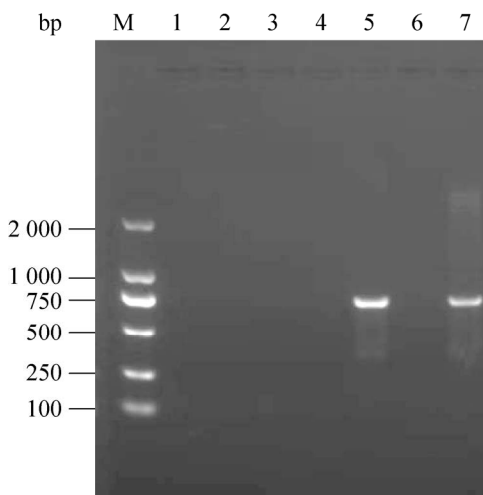


图 1 部分病料 BPIV-3 RT-PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1-5: 不同病料 BPIV-3 病毒检测结果; 6: 阴性对照; 7: 阳性对照

Figure 1 BPIV-3 RT-PCR amplification results of some disease materials. M: DL2000 DNA Marker; 1-5: BPIV-3 virus test results of different disease materials; 6: Negative control; 7: Positive control.

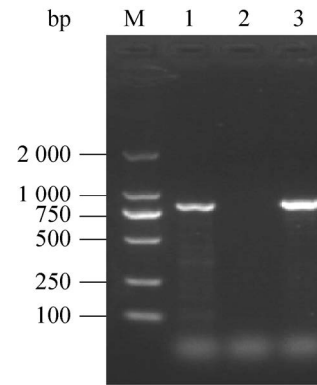


图 2 病料 IBRV RT-PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1: 病料 IBRV 病毒检测结果; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照

Figure 2 IBRV RT-PCR amplification result of the disease material. M: DL2000 DNA Marker; 1: IBRV virus test result of the disease material; 2: Negative control; 3: Positive control.

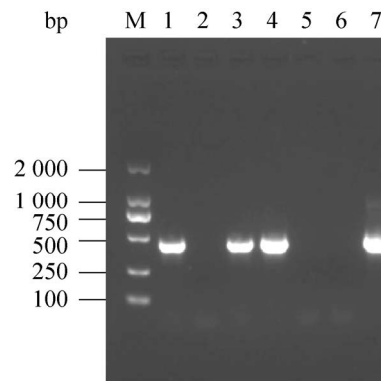


图 3 部分病料 BRSV RT-PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1-5: 不同病料 BRSV 病毒检测结果; 6: 阴性对照; 7: 阳性对照

Figure 3 BRSV RT-PCR amplification results of some disease materials. M: DL2000 DNA Marker; 1-5: BRSV virus test results of different disease materials; 6: Negative control; 7: Positive control.

其中 BVDV 与 BRSV 在病牛中共感染的比例为 0.56% (95% CI: 0.01, 3.07) (1/179)。

2.2 病毒的分离与鉴定

对上述阳性样品进行病毒分离, 接种细胞 3-5 代并经 PCR 鉴定后成功获得 1 株 BVDV (non-cytopathic) 与 6 株 BPIV-3 (图 5 和图 6)。光

学显微镜下显示 BPIV-3 早期细胞变圆肿大, 局部细胞脱落(图 7A); 中期细胞逐渐融合脱落成圆形, 部分细胞裂解为碎片(图 7B); 后期细胞大面积融合形成拉网状(图 7C), 最终细胞完全脱落。图 7D 为正常 MDBK 细胞。

使用分型引物(BPIV-3A 上游引物: 5'-CATCCATAGTTCCTTATGCATG-3', 下游引物: 5'-TTGGGTCGCTCTGTTTCC-3'; BPIV-3C 上游引物: 5'-ACAGTATGTAACAGGACGGTCC-3', 下游引物: 5'-GCCTCTTGTGTAATCCCCAA-3')进一步对所获得 BPIV-3 的病毒进行分型鉴定, 发现 6 株 BPIV-3 病毒均能扩增出 BPIV-3C 目的条带, 而且与预期大小一致(图 8), 同时将其 PCR 产物送去测序, 并将测序结果在 NCBI 上比对, 结果也显示 6 株 BPIV-3 病毒为 C 型, 而 BVDV 的 PCR 产物测序结果比对后结果显示为 1d 型。

2.3 噬斑纯化结果

对 6 株 BPIV-3C 分别进行至少 3 次噬斑纯

化, 每次纯化挑取多个噬斑(图 9), 并进行扩大培养, 待 80%以上病变后收毒, 利用 RT-PCR 进行外源病毒检测鉴定, 确定为纯净的 BPIV-3C 病毒。

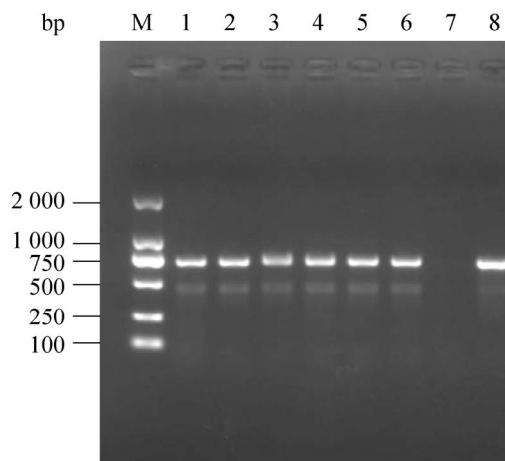


图 5 BPIV-3 PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1-6: 不同样本 BPIV-3 病毒检测结果; 7: 阴性对照; 8: 阳性对照

Figure 5 BPIV-3 PCR amplification results. M: DL2000 DNA Marker; 1-6: BPIV-3 virus test results of different disease samples; 7: Negative control; 8: Positive control.

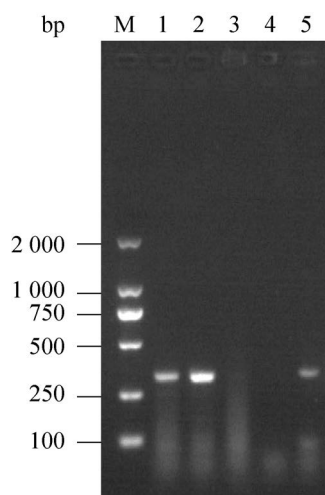


图 4 部分病料 BVDV RT-PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1-3: 不同病料 BVDV 病毒检测结果; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照

Figure 4 BVDV RT-PCR amplification results of some disease materials. M: DL2000 DNA Marker; 1-3: BVDV virus test results of different disease materials; 4: Negative control; 5: Positive control.

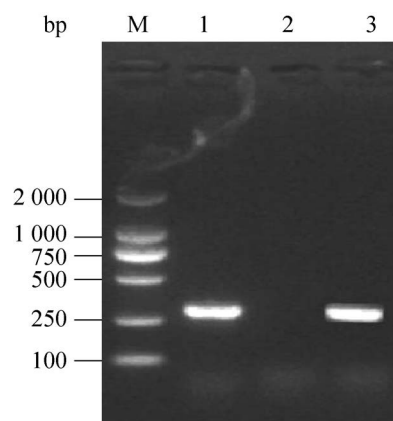


图 6 BVDV PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1: 样本 BVDV 病毒检测结果; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照

Figure 6 BVDV PCR amplification results. M: DL2000 DNA Marker; 1: BVDV virus test result of sample; 2: Negative control; 3: Positive control.

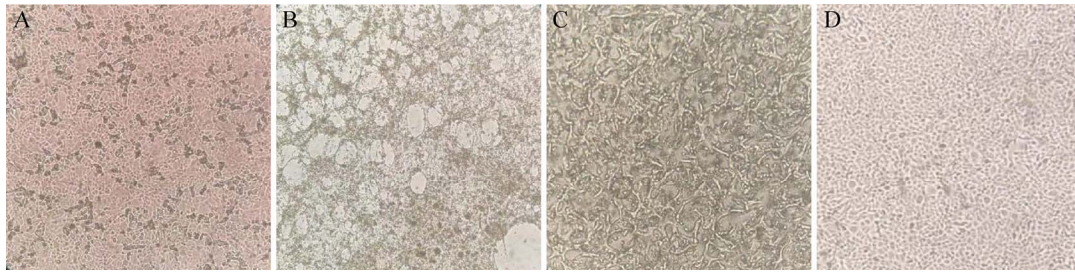


图7 BPIV-3 细胞病变 A: 接毒后 24 h (40×); B: 接毒后 48 h (40×); C: 接毒后 72 h (40×); D: 阴性对照(40×)

Figure 7 Cytopathy of BPIV-3. A: 24 h after receiving the poison (40×); B: 48 h after receiving the poison (40×); C: 72 h after receiving the poison (40×); D: Negative control (40×).

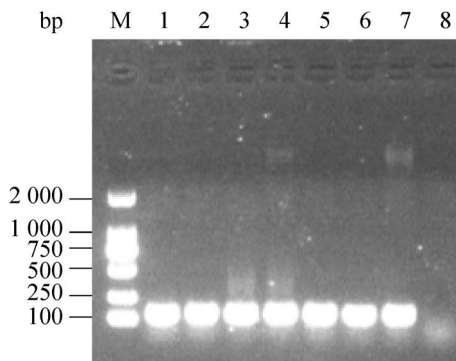


图8 BPIV-3C PCR 扩增结果 M: DL2000 DNA Marker; 1-6: 不同样本 BPIV-3C 病毒检测结果; 7: 阳性对照; 8: 阴性对照

Figure 8 BPIV-3C PCR amplification results. M: DL2000 DNA Marker; 1-6: BPIV-3C virus test results of different disease samples; 7: Positive control; 8: Negative control.

2.4 病毒毒价测定

接毒后 3-5 d, 按 Reed-Muench 算法, 得出 6 株 BPIV-3C 病毒滴度分别为 $10^{7.55}$ 、 $10^{8.1}$ 、 $10^{7.43}$ 、 $10^{7.2}$ 、 $10^{7.47}$ 、 $10^{7.8}$ TCID₅₀/mL。

2.5 病毒生长曲线

为了解病毒的生长特性, 选取毒价较高的毒株, 以 0.1 MOI 接毒测定生长曲线, 结果表明, 病毒在接毒后 24 h 时增殖达到峰值, 病毒滴度达到 $10^{8.52}$ TCID₅₀/mL, 24-30 h 病毒复制进入短暂平台期, 随后病毒滴度呈下降趋势 (图 10)。



图9 BPIV-3C 单个噬斑(100×)

Figure 9 Single plaque of BPIV-3C (100×).

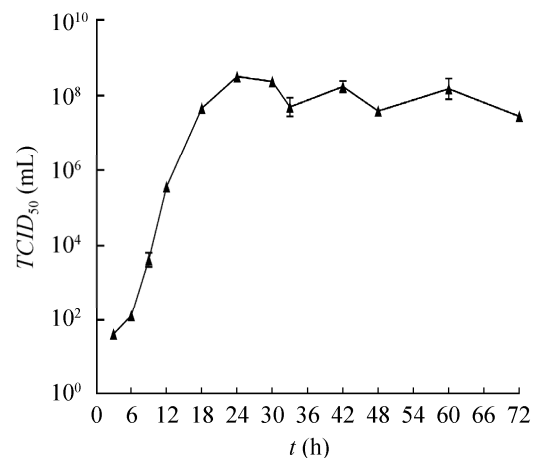


图10 BPIV-3C 生长曲线

Figure 10 Growth curve of BPIV-3C.

3 讨论与结论

BRDC 对肉牛业与奶牛业健康发展的威胁日趋严重, 由于 BRDC 的感染情况较为复杂, 了解我国 BRDC 的流行现状及流行毒株对该病的防控具有重要意义。近年来, 越来越多的研究人员对其主要病毒性病原进行了调查, 但多是基于抗原甚至抗体的检测, 难以反映疾病的真实情况。例如, 肉牛 BPIV-3 的血清学阳性率为 77.6%–91.08%^[6-7]; IBRV 抗体阳性率为 50.23%–52.77%, 群体阳性率在 70%以上^[8]。BVDV 抗原总阳性率为 0.49%, 抗体总阳性率为 75.94%–80.97%^[9-10]。部分奶牛群中 IBRV、BVDV、BPIV-3、BRSV 的个体阳性率则分别高达 76.2%、60.5%、63.2%、45.4%, 群体阳性率更是分别高达 82.2%、75.0%、85.7%、89.3%^[11]。本研究利用 RT-PCR 技术对该 4 种病原进行了病原学检测, 结果也显示了 IBRV、BVDV、BPIV-3、BRSV 这 4 种病毒在我国肉牛群中确实存在不同程度的流行。而且在患有呼吸道疾病综合征的病牛中, BRSV 和 BVDV 占有优势的地位, 阳性检出率分别为 7.82%和 7.26%。表明我国肉牛呼吸道疾病综合征的防控中, 应将 BRSV 和 BVDV 作为防控的要点。

此外, 本研究还发现了 BVDV 与 BRSV 共感染的病例, 这与许多学者的相关研究报道^[11-13]一致, 这 4 种病毒在临床上存在混合感染的情况, 主要是因为某种病原感染健康牛后会导致饲养牛的抵抗力下降, 甚至还会造成免疫抑制, 从而易发生继发感染与混合感染。

为了有针对性地开发牛呼吸道疾病综合征病毒的高效疫苗, 本研究对临床样本进行了病毒的分离, 并鉴定了具体的亚型。发现在所调查的场群中, BVDV 为 1d 型, BPIV-3 为 C 型。目前国内流行的 BVDV 主要为 1 型^[14], BPIV-3

主要为 A 型与 C 型, 鲜有 B 型报道^[15], 这也与本研究的结果一致。

综上所述, 本研究揭示了华中、华南、西南等地区部分养殖场 BRDC 主要病毒性病原的流行情况, 为 BRDC 的防控提供了参考依据, 而且分离获得的毒株是当下国内较为流行的病毒亚型, 能够作为相关疫苗研究的储备, 具有良好的临床应用价值。

REFERENCES

- [1] 郭爱珍. 牛呼吸疾病综合征及其防治[J]. 中国奶牛, 2011(24): 7-11
Guo AZ. The prevalence and control of bovine respiratory disease complex[J]. China Dairy Cattle, 2011(24): 7-11 (in Chinese)
- [2] Fulton RW. Bovine respiratory disease research (1983–2009)[J]. Animal Health Research Reviews, 2009, 10(2): 131-139
- [3] 刘鹏, 侯喜林, 周玉龙, 朴范泽. 牛副流感病毒 3 型的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1384-1389
Liu P, Hou XL, Zhou YL, Piao FZ. Isolation and identification of bovine parainfluenza virus type 3[J]. Microbiology, 2009, 36(9): 1384-1389 (in Chinese)
- [4] Klima CL, Zaheer R, Cook SR, Booker CW, Hendrick S, Alexander TW, McAllister TA. Pathogens of bovine respiratory disease in north American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(2): 438-448
- [5] Deng Y, Sun CQ, Cao SJ, Lin T, Yuan SS, Zhang HB, Zhai SL, Huang L, Shan TL, Zheng H, et al. High prevalence of bovine viral diarrhea virus 1 in Chinese swine herds[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(3/4): 490-493
- [6] 王海勇, 童钦, 王伟, 武华. 我国牛副流感病毒 3 型血清学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(2): 154-156
Wang HY, Tong Q, Wang W, Wu H. Serological survey of antibodies against bovine parainfluenza virus type 3 in 12 provinces[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36(2): 154-156 (in Chinese)
- [7] 霍志云, 童钦, 胡嘉欣, 王伟. 北方三省(区)牛副流感病毒 3 型的血清学调查[J]. 动物医学进展, 2012, 33(9): 124-126
Huo ZY, Tong Q, Hu JX, Wang W. Serological survey of antibodies against bovine parainfluenza virus type 3 in

- three regiond of north China[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(9): 124-126 (in Chinese)
- [8] 曲萍, 宋晓晖, 董浩, 胡冬梅, 赵柏林, 孙雨, 张倩, 王晓英, 杨林. 我国部分地区牛传染性鼻气管炎血清学调查与分析[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(3): 132-136
Qu P, Song XH, Dong H, Hu DM, Zhao BL, Sun Y, Zhang Q, Wang XY, Yang L. Serological investigation and analysis of infectious bovine rhinotracheitis in partial areas of China[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(3): 132-136 (in Chinese)
- [9] 张宇名, 王君娜, 迟丽丽, 李树凡, 陈志远, 王昆, 王广辉, 刘锡武, 孙翔翔, 樊晓旭, 徐守振. 2018-2019年山东部分地区规模化奶牛场牛病毒性腹泻病毒感染血清学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(5): 10-14
Zhang YM, Wang JN, Chi LL, Li SF, Chen ZY, Wang K, Wang GH, Liu XW, Sun XX, Fan XX, Xu SZ. Serological investigation of bovine viral diarrhea virus infection in large-scale dairy farm in some areas of Shandong from 2018 to 2019[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2021, 57(5): 10-14 (in Chinese)
- [10] 权璞宏, 张志丹, 赵丽霞, 谷玉, 王旭红, 韩硕, 周伟光, 关平原, 徐晓静. 我国部分地区肉牛 5 种病的血清流行病学调查[J]. *兽医导刊*, 2022(1): 24-29
Quan PH, Zhang ZD, Zhao LX, Gu Y, Wang XH, Han S, Zhou WG, Guan PY, Xu XJ. Serological investigation of five diaeases in beef cattle in some areas of China[J]. *Veterinary Orientation*, 2022(1): 24-29 (in Chinese)
- [11] 毕玉戔, 宋丽丽, 薛原, 李金波, 李春花, 贾爱琴, 宋晓飞, 张连秀, 王蕾. 我国北方 4 省部分规模奶牛场牛呼吸道疾病综合征主要病原血清抗体检测[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(12): 9-13
Bi YY, Song LL, Xue Y, Li JB, Li CH, Jia AQ, Song XF, Zhang LX, Wang L. Detection of serum antibodies against major pathogens leading to BRDC in large-scale dairy farms in four provinces, northern China[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(12): 9-13 (in Chinese)
- [12] 刘泽余, 刘占愷, 李智杰, 郭利, 张加力. 吉林省部分牛场 BVDV、IBRV、BRSV 的感染情况调查[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(12): 101-105
Liu ZY, Liu ZK, Li ZJ, Guo L, Zhang JL. Investigation of BVDV, IBRV and BRSV infection in some cattle farms of Jilin province[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 51(12): 101-105 (in Chinese)
- [13] 张信军. 江苏省牛常见呼吸道病毒病流行病学调查及表达 BVDV-2 E2 基因重组 BHV-1 疫苗的免疫效果评价[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2018
Zhang XJ. Epidemiological survey of bovine respiratory viruses in Jiangsu province and evaluation of the immune efficacy of a recombinant BHV-1 vaccine expressing E2 gene of BVDV-2[D]. Yangzhou: Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2018 (in Chinese)
- [14] 王勤, 何博, 欧云文, 刘俐君, 杨磊, 潘琴, 张杰. 牛病毒性腹泻病毒两种基因型双重 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *动物医学进展*, 2021, 42(9): 24-29
Wang Q, He B, Ou YW, Liu LJ, Yang L, Pan Q, Zhang J. Establishment and application of duplex RT-PCR for genotypes of bovine viral diarrhea virus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(9): 24-29 (in Chinese)
- [15] 楚会萌, 任亚初, 程凯慧, 解晓莉, 张亮, 孙阳阳, 杨宏军. 一株牛副流感病毒 3 型的分离鉴定及基因组序列分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(9): 1038-1041
Chu HM, Ren YC, Cheng KH, Xie XL, Zhang L, Sun YY, Yang HJ. Isolation, identification, and genome sequencing of a bovine parainfluenza virus type 3 strain[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2020, 15(9): 1038-1041 (in Chinese)