牛病毒性腹泻病毒陕西株的分离与 NS_{5b} 基因序列测定

马秋明,王学艳,王晶钰,何维明
(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】分离并鉴定陕西省牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus,BVDV)。【方法】采集腹泻犊牛的肠系膜淋巴结,处理后接种于 MDBK 细胞,盲传,逐日观察是否有细胞病变产生。采用病毒蚀斑技术对病毒克隆纯化后,提取其 RNA,进行 RT-PCR 鉴定。将扩增的 NS_{5b} 基因克隆入 pMD18-T 载体中,采用碱裂解法小量提取质粒,并对质粒进行 *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切、*Sal* Ⅰ 单酶切及 PCR 鉴定,对阳性克隆进行核苷酸序列测定及分析。采用病毒蚀斑试验测定分离毒株的半数组织培养感染量($TCID_{50}$)。【结果】盲传 4 代后细胞出现典型、规律的细胞病变。RT-PCR 扩增出预期长度(360 bp)的基因片段,核苷酸序列分析结果表明,所扩增的基因为牛病毒性腹泻黏膜病病毒 NS_{5b} 基因,其与 BVDV VEDEVAC 株 NS_{5b} 基因核苷酸序列有 99%同源性。BVDV 陕西株的半数组织培养感染量($TCID_{50}$)为 3.6。【结论】成功分离了牛病毒性腹泻病毒陕西株,为陕西省 BVDV 的防治提供了理论依据。

[关键词] 牛病毒性腹泻病毒;NS_{5b} 基因;RT-PCR;细胞病变;陕西省
[中图分类号] S852.65+3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2008)12-0001-06

Isolation and NS_{5b} gene sequencing of BVDV in Shaanxi Province

MA Qiu-ming, WANG Xue-yan, WANG Jing-yu, HE Wei-ming
(*College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: 【Objective】 The study was to isolate and identify BVDV in Shaanxi Province. 【Method】 The supernatant of the intestine absorbent gland was innoculated into MDBK cells and reproduced blindly. The virus was purified by the virus plaque formation, and the RNA was isolated and detected by RT-PCR. The fragments of NS_{5b} gene was successfully cloned into the pMD18-T vector, the recommbanant plasmid was identified by incision enzyme digestion and PCR, and the positive clone was sequenced. The $TCID_{50}$ of the BVDV in Shaanxi Province was tested by the virus plaque formation. 【Result】 The unknown virus isolated from mesenteric lymphadenitis showed obvious cytopathic effects (CPE) after blindly subculturing 4 times. The cloning virus was isolated by virus plaque technique. The nucleotides sequence of NS_{5b} gene of the cloning virus shared 99% homology with strain VEDEVAC, and its $TCID_{50}$ was 3.6. 【Conclusion】 The cloning virus was Bovine viral diarrhea virus (BVDV), and its nucleotides sequence of NS_{5b} gene shared 99% homology with strain VEDEVAC.

Key words: Bovine viral diarrhea-mucosal disease; NS_{5b} gene; RT-PCR; cytopathic effect; Shaanxi Province

---

* [收稿日期] 2007-10-28
[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2005K01-G20-2);国家"十一五"科技支撑计划奶业专项"西北农区生态型奶业生产技术和奶牛性控技术研究与开发"(2006BAD4A11)
[作者简介] 马秋明(1976-),男,陕西蓝田人,研究实习员,主要从事预防兽医学研究。
[通讯作者] 王晶钰(1964-),男,陕西乾县人,博士,副教授,硕士生导师,主要从事预防兽医学研究。
E-mail:Wjingyu2004@126.com

牛病毒性腹泻黏膜病(Bovine viral diarrhea-mucosal disease,BVD-MD)是由牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus,BVDV)引起的一种复杂的,以发热、腹泻、黏膜糜烂溃疡、白细胞减少、产奶量下降及怀孕母牛流产或产出畸形胎儿为主要特征的传染病[1]。该病可引起持续感染与免疫耐受、繁殖障碍、血小板减少与出血综合征。BVDV 主要感染牛、羊、鹿[2]、猪等,尤其是可引起幼畜腹泻死亡,给奶牛养殖业造成很大的经济损失,为奶牛养殖重点防制和检疫对象。张光辉等[3]对河南省 BVDV 流行株进行了分离鉴定。赵月兰等[4-5]对河北省 BVDV 流行株进行了分离鉴定,并对其生物学特性进行了研究。王新平等[6]对我国 BVDV 流行毒株长春 184、D、H、Yak、ZM-95、NCD 的基因型进行定位和同源性比较,结果发现,BVDV 可能存在着一定的地域性。1994 年,陈茂盛等[7]对陕西省 13 个县的肉牛、奶牛进行了 BVD-MD 血清学调查,结果发现阳性率为 12.7%,近年来该病在陕西牛群中的发生有扩大的趋势,但至今尚未见对 BVDV 进行分离鉴定的报道。BVDV 的 NS_{5b}蛋白具有依赖 RNA 的 RNA 酶活性,对 BVDV 的复制具有重要作用,NS_{5b} 基因在 BVDV 基因组中相对保守[8]。2006-09～2007-05,陕西某奶牛场犊牛群发生腹泻,经多种抗生素治疗无效,从临床症状和剖检病变分析初步怀疑为 BVDV 或轮状病毒(Rotavirus,RV)感染所致。为确诊其病原,本研究对该病病原进行了分离鉴定,并对分离病毒的 NS_{5b}基因片段进行了核苷酸序列分析,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 病 料 病料为疑似 BVDV 或 RV 感染的奶牛肠系膜淋巴结,采集于陕西杨凌及其周边地区的奶牛场,共 20 份。

1.1.2 细胞、宿主菌与载体 MDBK 细胞购自中国兽医药品监察所;DH5α 宿主菌,由西北农林科技大学预防兽医学实验室保存;pMD18-T 克隆载体试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.3 主要试剂 1640 培养基,购自 GIBCO 公司;胎牛血清,购于杭州四季青生物有限公司;Trizol 试剂盒和 RNasin,购自美国 Invitrogen 公司;胶回收(小量)试剂盒,购自上海华舜生物工程有限公司;RNA 酶抑制剂、Ex *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs,均购自大连宝生物工程有限公司;M-MLV 反转录试剂盒、*Eco*RⅠ和 *Sal*Ⅰ限制性内切酶,购自 Fermentas 公司;DNA Marker(DL2000),购自广东东盛公司;DEPC,购自 Amresco 公司;细胞生长液、维持液,购自 GIBCO 公司,使用时细胞生长液和维持液分别添加体积分数 8%和 3%的胎牛血清;其他试剂,均为国产分析纯级。

1.2 病料的处理

将采集的肠系膜淋巴结剪碎,按每克加 5 mL 的比例加入含青霉素(1 000 U/mL)、链霉素(1 000 μg/mL)的灭菌生理盐水,用组织研磨器研磨后于 −40 ℃/室温反复冻融 3 次,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

1.3 病毒的分离培养

培养 MDBK 传代细胞,待其长成单层后,弃去营养液,用 D-Hank′s 液洗 3 次,分别加入原营养液体积 1/10 的病料上清液,37 ℃ 吸附 1 h,其间摇匀 3 次,加入维持液,于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 环境中静置培养。逐日观察细胞病变情况,第 5 天收获细胞培养物,−40 ℃/室温反复冻融 3 次,4 000 r/min离心 10 min,取上清液盲传。同时设 MDBK 细胞空白对照,不加病料上清液,培养方法同上。

1.4 病毒的克隆纯化

培养 MDBK 细胞,待其长成单层后将生长液弃去,用 D-Hank′s 液洗 3 次,分别加 10,100,1 000 倍稀释的病毒细胞培养物上清液(体积为原生长液体积的 1/10),37 ℃吸附 1 h,其间摇匀 3 次,然后将 2×维持液与 30 g/L 琼脂糖(42～45 ℃)等体积混合,加入培养皿至 2～3 mm 高度。每稀释度作 3 次重复。待琼脂凝固后,将琼脂层向上,37 ℃、体积分数 5% CO_2 条件下静置培养。第 4 天向各培养皿中加入 37 ℃预热的质量分数 1%中性红琼脂培养液,再培养 1 d。观察蚀斑形成情况,挑取单个存在的蚀斑,加入到 50 μL 无血清生长液中,40 ℃/室温反复冻融 3 次后,接种于 96 孔培养板中将蚀斑纯化 3 次。最后将病毒细胞培养物于−70 ℃保存备用.

1.5 引物的设计与合成

参照 GenBank 已发表的 BVDV 的 Oregon C24V 株的 NS_{5b}基因保守序列(GenBank 登录号:AF091605),利用 Oligo 6.0 生物软件设计 1 对引物,P1:5′-TGG AGA TCT TTC ACA CAA TAG C-3′;P2:5′-GCT GTT TCA CCC AGT TAT ACA T-3′,该引物预期扩增产物约为 360 bp。参照轮状病毒(RV)的 *VP*1 基因保守序列(GenBank 登录号:M64666)设计 1 对引物,P3:5′-AGA ATT TCC

GTT TGG CTA-3′；P4：5′-CGG TCA CAT CAT ACA ACT CT-3′，该引物预期扩增产物约为 950 bp。引物均由上海生工合成。

1.6 病毒总 RNA 的提取

按 Invitrogen 公司的 TRIZOL LS Reagent 试剂盒操作说明书，提取病毒基因组 RNA。向病毒 RNA 中加入 30 μL DEPC 处理水和 1 μL RNA 酶抑制剂，室温溶解 10 min，置－20 ℃保存备用。

1.7 病毒 NS_{5b} 和 *VP*1 基因的 RT-PCR 鉴定

取 RNA 溶液 11 μL，加 1 μL 下游引物，65 ℃作用 10 min，冰浴 5 min，再加入 5×M-MLV Buffer 4 μL，M-MLV 1 μL，Ribonuclease inhibitor 1 μL，dNTP 2 μL，混匀，42 ℃作用 1 h，70 ℃ 反应 10 min，冷却即得反转录 cDNA。分别以病毒 NS_{5b} 和 *VP*1 基因反转录 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，PCR 反应体系为 25 μL：cDNA 模板 2.0 μL，Ex *Taq* 10×缓冲液 2.5 μL，dNTPs 2.0 μL，P1/ P2 或 P3/P4 均各 1.0 μL，Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL，补灭菌超纯水至 25 μL。扩增反应热循环参数为：95 ℃ 5 min；95 ℃ 50 s，54 ℃ 50 s，72 ℃ 30 s，34 个循环；72 ℃延伸 10 min。同时设空白对照试验，PCR 反应体系中不加 cDNA 模板，其他组分和扩增程序同上。扩增产物在含 EB 的 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳，利用凝胶成像系统进行观察。

1.8 病毒克隆株的鉴定

1.8.1 PCR 产物的纯化回收　将 PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳，切下目的条带，用凝胶回收纯化试剂盒回收目的片段，－20 ℃保存备用。

1.8.2 重组质粒 NS_{5b}-pMD18-T 的构建与鉴定　分别取回收的 PCR 产物 4.5 μL、pMD18-T 载体 0.5 μL、Ligation Solution Ⅰ 5 μL，于 PCR 管中混匀，16 ℃反应过夜。取连接产物 10 μL 转化 DH5α 感受态，挑选白色阳性菌落，在含有氨苄（100 μg/mL）的 LB 培养基中培养，采用碱裂解法小量提取质粒，进行 *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切、*Sal* Ⅰ 单酶切及 PCR 鉴定。

1.8.3 核苷酸序列的测定　将筛选的阳性克隆菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司和上海捷瑞生物工程有限公司分别进行测序，并将核苷酸序列提交到 NCBI BLAST 进行检索鉴定。

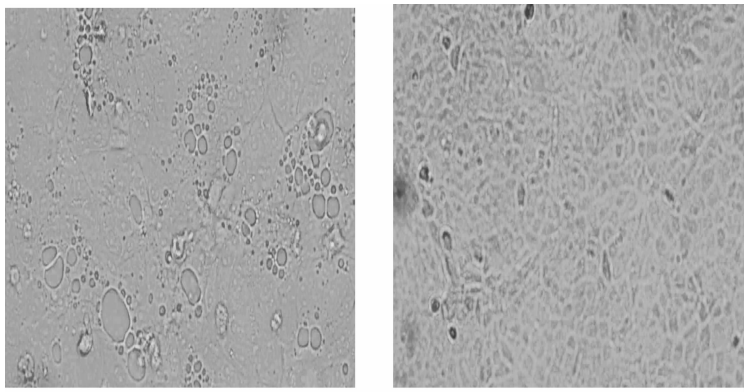
1.9 病毒克隆株半数组织培养感染量（$TCID_{50}$）的测定

取病毒克隆株的细胞培养物上清液，作 10 倍系列稀释后，分别接种于 96 孔 MDBK 细胞培养板，每稀释度接种 10 孔，接种剂量 100 μL/孔，同时设 2 孔对照（加等量的细胞培养液）。37 ℃ 吸附 1 h，再加入 100 μL 维持液，37 ℃、体积分数 5% CO_2 条件下静置培养，逐日观察各孔细胞病变，连续观察 5 d，参考文献[1]，采用 Reed-Muench 法计算病毒的 $TCID_{50}$。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离培养

病料接种长成单层的 MDBK 细胞，盲传 4 代后开始出现典型且规律的细胞病变（CPE），CPE 表现为细胞变圆，胞浆出现空泡，继而细胞脱落死亡，而加入维持液的空白对照细胞形态正常（图 1）。表明分离到的病毒为 CPE 型。



A　　B

图 1　BVDV 陕西株的分离培养（×100）

A. 病变细胞；B. 空白对照细胞

Fig. 1　Isolated culture of BVDV in Shaanxi Province（×100）

A. Cytopathic effect on MDBK cell；B. Normal MDBK cell

2.2 病毒的克隆纯化

将病毒细胞培养物接种长成单层的 MDBK 细胞，4 d 后在 10^{-2} 稀释度产生单个的可数空斑，空斑大小不一，直径一般为 1～3 mm，空斑数在各重复之间差异较大。

2.3 病毒 NS_{5b} 和 $VP1$ 基因的 RT-PCR 鉴定

RT-PCR 鉴定结果（图 2）显示，扩增出一条清晰的约 360 bp 的目的条带，与预期结果相符，而 RV 鉴定呈阴性，空白对照也无扩增产物。

2.4 重组质粒 NS_{5b}-pMD18-T 的酶切鉴定

重组质粒 NS_{5b}-pMD18-T 用 *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切，切出 360 bp 的条带；*Sal* Ⅰ 单酶切切出约 3 000 bp 的条带（图 3），与预期结果相符。表明，重组质粒中包含了 NS_{5b} 目的基因片段。

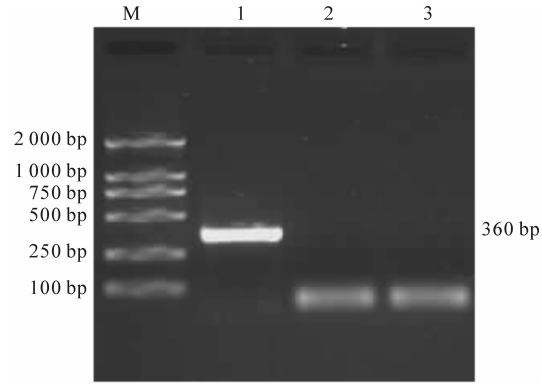


图 2 分离病毒 NS_{5b} 或 $VP1$ 基因的 RT-PCR

M. DNA Marke DL2000；1. NS_{5b} 基因扩增结果；2. $VP1$ 基因扩增结果；3. 空白对照

Fig. 2 Electropherogram of NS_{5b} or $VP1$ gene RT-PCR

M. DNA Marke DL2000；1. BVDV amplification product；2. RV amplification product；3. Negative

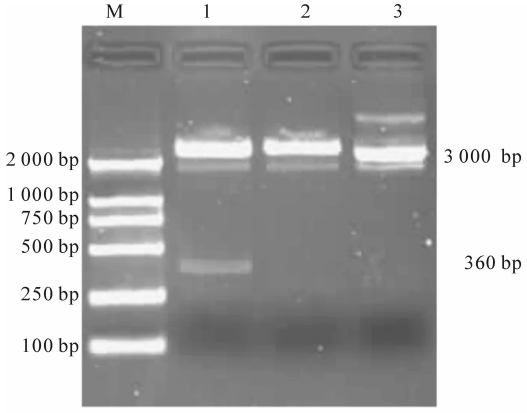


图 3 重组质粒 NS_{5b}-pMD18-T 的酶切鉴定结果

M. DNA Marke DL2000；1. *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切鉴定结果；2. *Sal* Ⅰ 单酶切鉴定结果；3. 质粒对照

Fig. 3 Restriction endonuclease map of NS_{5b}-pMD18-T plasmid

M. DNA Marke DL2000；1. *Eco*R Ⅰ and *Sal* Ⅰ map of plasmid；2. *Sal* Ⅰ map of plasmid；3. Plasmid control

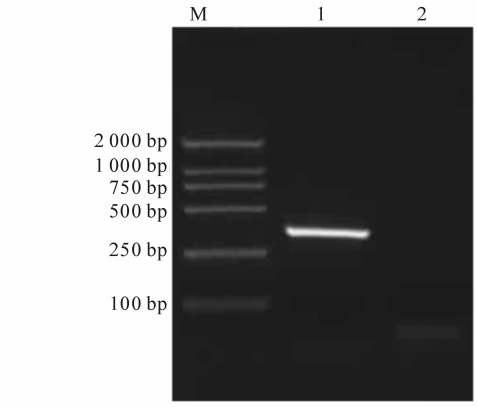


图 4 重组质粒 NS_{5b}-pMD18-T 的 PCR 鉴定结果

M. DNA Marke DL2000；1. 重组质粒；2. 空白对照

Fig. 4 Identification of NS_{5b}-pMD18-T plasmid by PCR

M. DNA Marke DL2000；1. Plasmid by PCR；2. Negtive control

2.5 重组质粒 NS_{5b}-pMD18-T 的 PCR 鉴定

重组质粒 NS_{5b}-pMD18-T 的 PCR 鉴定结果显示，扩增出约 360 bp 的目的条带（图 4），空白对照无扩增产物，表明重组质粒包含了目的基因 NS_{5b} 片段。

2.6 BVDV 陕西株 NS_{5b} 基因核苷酸序列的测定

将 1.8.3 中两公司的核苷酸测序结果校对后，利用 DNAStar、Clustal X 等分析软件对分离毒株的 NS_{5b} 基因序列进行整理拼接，即得 BVDV 陕西株 NS_{5b} 基因核苷酸序列（图 5）。

TGGAGATCTTTCACACAATAGCCCAACCCAGCCTAAAGCACACCTACGGCGAAGTGACATGGG
AACAACTTGAGGCAGGGATTAACAGAAAAGGAGCTGCAGGCTTTCTAGAAAAGAAGAATGTTGGA
GAAGTACTGGACTCAGAGAAGCACCTGGTGGAACAACTAATCAGAGATTTGAAAACAGGAAGGAA
GATAAGATATTATGAGACAGCAATACCCAAAAACGAGAAGAGAGATGTCAGTGATGATTGGCAAGCA
GGGGACATAGTGGATGAAAAGAAACCAAGAGTGATTCAATACCCTGAAGCTAAGACAAGACTGGCC
ATCACTAAAGTTATGTATAACTGGGTGAAACAGC

图 5 BVDV 陕西株 NS_{5b} 基因的核苷酸序列

下划线部分为引物序列

Fig. 5 Sequence of NS_{5b} gene of BVDV in Shaanxi Province

The sequence underlined is primer

将处理后的核苷酸序列提交到 NCBI BLAST 检索鉴定，各序列用 Fast Minimum Evolution 软件模块比对，结果（图 6）显示，分离毒株为 BVDV，且与匈牙利 VEDEVAC 株的 NS_{5b} 基因核苷酸同源性最高，为 99%。

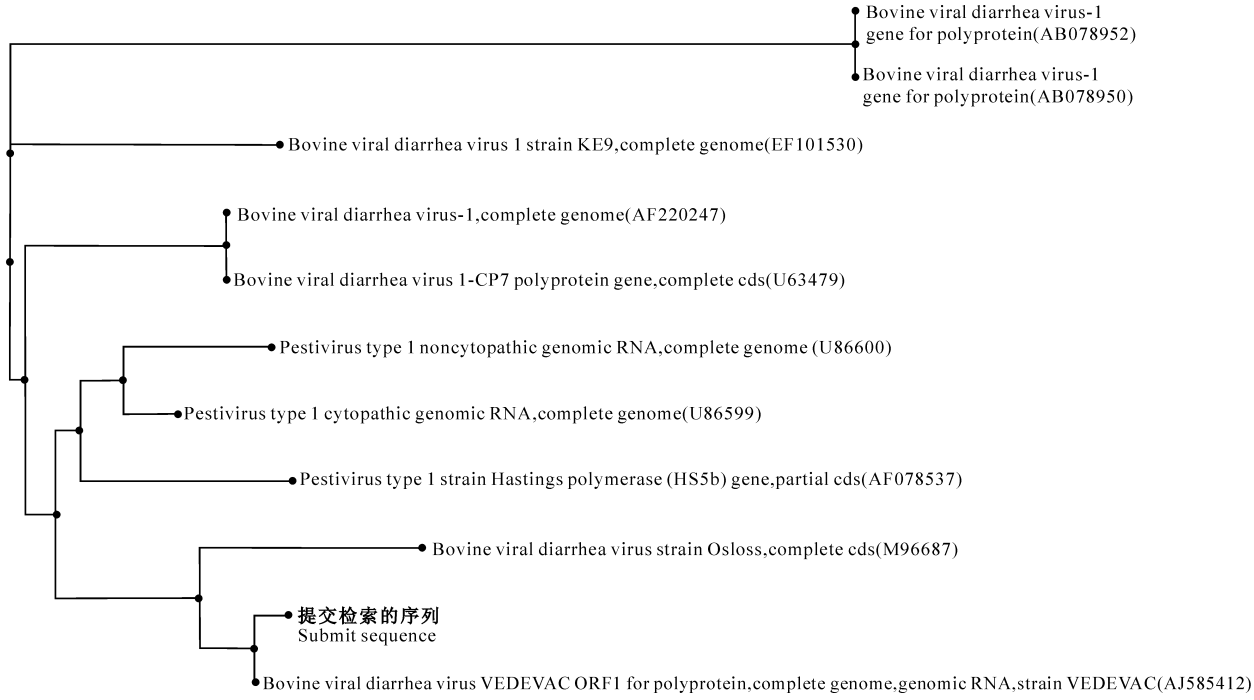


图 6　BVDV 陕西株 NS_{5b} 基因的 NCBI BLAST 比对结果

括号内字符为 GenBank 登录号

Fig. 6　NS_{5b} gene alignments by NCBI BLAST of BVDV in Shaanxi Province

Characters in the bracket is GenBank number

2.7　病毒克隆株 $TCID_{50}$ 的测定

逐日观察并记录各孔细胞病变，结果见表 1，采用 Reed-Muench 法计算病毒的 $TCID_{50}$，结果显示病毒克隆株的 $TCID_{50}$ 为 3.6。

表 1　BVDV 陕西株 $TCID_{50}$ 的测定

Table 1　$TCID_{50}$ of BVDV in Shaanxi Province

病毒稀释度 Solution of virus	接种孔数 Well number	孔数 Well number		5 d 累计孔数 Total number		CPE^+ 百分比/% Percentage
		CPE^+	CPE^-	CPE^+	CPE^-	
10^{-1}	10	10	0	31	0	100.0(31/31)
10^{-2}	10	8	2	21	2	91.3(21/23)
10^{-3}	10	6	4	13	6	68.4(13/19)
10^{-4}	10	5	5	7	11	38.9(7/18)
10^{-5}	10	2	8	2	19	9.5(2/21)
10^{-6}	10	0	10	0	29	0(0/29)
10^{-7}	10	0	10	0	39	0(0/39)
10^{-8}	10	0	10	0	49	0(0/49)

3　讨　论

牛病毒性腹泻黏膜病的临床症状复杂多样，从临床症状很难确诊，需进行实验室诊断。该病的实验室诊断方法有血清学检测方法、免疫学检测技术和分子生物学方法，其中 RT-PCR 是一种特异、敏感、快速、操作简单的分子生物学方法[9]。牛病毒性腹泻黏膜病在陕西牛群中有感染[7]，但目前还未见有 BVDV 陕西分离株的报道。本研究采用 MDBK 细胞成功地从患腹泻的犊牛病料中分离到 1 株牛病毒性腹泻病毒，并对分离到的病毒 NS_{5b} 基因片段进行了核苷酸序列测定，发现其与 BVDV VEDEVAC 株的 NS_{5b} 基因核苷酸序列同源性达 99%，结果为陕西省牛病毒性腹泻黏膜病病原的研究提供了宝贵的

试验材料，也为陕西省牛病毒性腹泻黏膜病的诊断、防治积累了实践经验。

BVDV 属黄病毒科，瘟病毒属，与猪瘟病毒(CSFV)及羊边界病病毒(BDV)之间在血清学检测中存在高度交叉反应，因此常规的血清学方法，如免疫扩散试验、中和试验、补体结合反应及免疫荧光试验等均不能有效地将其区分，而 RT-PCR 等分子生物学诊断方法则能将其区分开[10]。因此，建立一种特异、敏感、快速的 RT-PCR 诊断方法，对于该病的诊断及牛群的净化具有重要意义[11]。BVDV 在传播过程中其基因组变异较大[12]，其 NS_{5b}蛋白具有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶活性，NS_{5b}基因在基因组中相对保守[8]，本研究选取 NS_{5b}基因设计引物，有利于提高 RT-PCR 检测方法的特异性和敏感性。

BVDV 往往引起免疫抑制和持续感染，给奶牛业造成的隐性损失难以估量，应引起人们的重视[13-14]。目前，在该病的防治方面主要是通过检疫逐步净化牛群，而不是免疫防制，这已在奥地利取得巨大成效[11]。本研究建立的 RT-PCR 方法，为陕西省牛群 BVDV 的检测奠定了基础。

[参考文献]

[1] 殷　震，刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京：北京农业出版社，1997.
Yin Z，Liu J H. Animal Viruology [M]. 2nd Edition. Beijing：Beijing Agriculture Press，1997. (in Chinese)

[2] 郜玉钢. 鹿源 BVDV 分离鉴定、*E*0 基因的克隆与表达及免疫原性研究 [D]. 吉林：吉林农业大学，2005：37-45.
Hao Y G. Isolation and identification of BVDV from and *E*0 gene cloning and immunity [D]. Jilin：Jilin Agriculture University，2005：37-45. (in Chinese)

[3] 张光辉，李祥瑞，李建丽，等. 牛病毒性腹泻病毒地方株的分离与鉴定 [J]. 河南农业科学，2005(3)：71-73.
Zhang G H，Li X R，Li J L，et al. Isolation and identification of BVDV regional strains in He′nan Province [J]. Henan Agriculture Science，2005(3)：71-73. (in Chinese)

[4] 赵月兰，杨汉春，左玉柱，等. 河北省奶牛牛病毒性腹泻/粘膜病病毒的分离鉴定 [J]. 中国动物检疫，2006，23(11)：29-32.
Zhao Y L，Yang H C，ZuoY Z，et al. Isolation and identification of bovine viral diarrhea-mucosal disease in dairy cows in Hebei Province [J]. China Animal Quarantine，2006，23(11)：29-32. (in Chinese)

[5] 赵月兰，左玉柱，范京惠，等. 牛病毒性腹泻/粘膜病病毒河北分离株的生物学特性 [J]. 中国农学通报，2006，22(12)：1-4.
Zhao Y L，Zuo Y Z，Fan J H，et al. Biological characteristics of bovine viral diarrhea-mucosal disease virus HB strain [J]. Chinese Agricultureal Science Bulletin，2006，22(12)：1-4. (in Chinese)

[6] 王新平，涂长春，李红卫，等. 牛病毒性腹泻病毒 P125 基因重要区的比较与分析 [J]. 中国兽医学报，1996，16(6)：546-553.
Wang X P，Tu C C，Li H W，et al. Analysis and comparision of BVDV P125 gene [J]. Chinese Journal of Veterinary Science，1996，16(6)：546-553. (in Chinese)

[7] 陈茂盛，寇改霞，蒋宏伟，等. 陕西省牛病毒性腹泻\黏膜病血清学调查 [J]. 畜牧兽医杂志，1994(2)：23-24.
Chen M S，Kou G X，Jiang H W，et al. Investation of BVDV of Shaanxi [J]. J of Animal Science and Husbandry，1994(2)：23-24. (in Chinese)

[8] Zhong W，Gutshall L L，del Vecchio A M. Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity withinthe nonst ructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus [J]. J Virol，1998，72(11)：9365-9369.

[9] Karaoglu T，Burgu I，Ozkul A. Biotypic characterisation of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in clinical samples [J]. Acta Vet Hung，2003，51(3)：425-431.

[10] Laamanen U I，Neuvonen E P，Yliviuhkola E M，et al. Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell cultures for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in field samples [J]. Res Vet Sci，1997，63(3)：199-203.

[11] Obritzhauser W，Fuchs K，Kofer J. BVDV infection risk in the course of thevoluntary BVDV eradication program in Styria/Austria [J]. Preventive Veterinary Medicine，2005，72：127-132.

[12] Uttenth H A，Stadejek T，Nylin B，et al. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in Denmark during a 10-year eradication period [J]. APMIS，2005，113(7-8)：536-541.

[13] Kalaycioglu A T. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) diversity and vaccination [J]. Vet Q，2007，29(2)：60-67.

[14] Ernst P，Thomas W J，Matthias S. BVDV and innate immunity [J]. Biologicals，2003，31：107-111.