

孙心如, 孙敏, 周洪婷, 等. 牛轮状病毒多克隆抗体制备及特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 72-77.

SUN X R, SUN M, ZHOU H T, et al. Preparation and characterization of polyclonal antibody against bovine rotavirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 72-77.

牛轮状病毒多克隆抗体制备及特性分析

孙心如^{1,2}, 孙敏², 周洪婷^{1,2}, 李素芬², 张雪寒², 周金柱²,
贡嘎¹, 索朗斯珠^{1*}, 李彬^{2*}

(1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏 林芝 860000 ;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 旨在优化 G6P [1] 型牛轮状病毒 (bovine rotavirus, BRV) 在 MARC-145 细胞中的培养条件, 制备其免源多克隆抗体, 并对制备的多抗进行效价检测及鉴定。对 G6P [1] 型 BRV 毒株 NCDV 进行不同病毒接种量及收毒时间优化, 确定病毒在 MARC-145 细胞中的最佳培养条件; 以 1×10^7 TCID₅₀ NCDV 活毒作为免疫原免疫成年兔, 制备免源多克隆抗体; 通过间接 ELISA 检测多抗效价, 并通过间接免疫荧光试验 (IFA) 及中和试验鉴定其特异性。结果: NCDV 毒株以感染比 0.1、感染时间 24 h 为最佳培养条件, 病毒滴度可至 4.9×10^6 TCID₅₀/mL; 间接 ELISA 结果显示, 多克隆抗体的效价为 1 : 51 200, 表明 NCDV 具有良好的免疫原性; IFA 及中和试验结果表明, NCDV 多克隆抗体与 G6P [1] 型、G9P [1] 型和 G10P [11] 型 BRV 毒株均能发生特异性反应, 存在良好的交叉中和效应, 表明制备的多抗具有良好的反应性。综上, 本试验成功优化了 NCDV 毒株在 MARC-145 细胞中的增殖条件, 并制备了高效价的免源多克隆抗体, 为后续 BRV 感染的血清学诊断及疫苗研发奠定了理论基础。

关键词: 牛轮状病毒; NCDV 毒株; MARC-145 细胞; 多克隆抗体

中图分类号: S852.65+3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)07-0072-06

Preparation and characterization of polyclonal antibody against bovine rotavirus

SUN Xinru^{1,2}, SUN Min², ZHOU Hongting^{1,2}, LI Sufen², ZHANG Xuehan², ZHOU Jinzhu²,
GONG Ga¹, SUOLANG Sizhu^{1*}, LI Bin^{2*}

(1. College of Animal Science, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Nyingchi 860000, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: The aim of this study was to optimize the culture conditions of G6P [1] type bovine rotavirus (BRV) in MARC-145 cells, to prepare BRV rabbit polyclonal antibody, and to evaluate the titer of the prepared polyclonal antibody. The optimal culture conditions of NCDV in MARC-145 cells were determined by optimizing the multiplicity of infection and the infection time. Then, rabbit polyclonal antibody was prepared by immunizing adult rabbits with 1×10^7 TCID₅₀ NCDV. Next, the titer of the antibody was detected by ELISA, and its specificity was determined by IFA and neutralization test. The results of cytopathic viral titer and the expression of the viral protein showed that the multiplicity of infection of 0.1 and infection time of 24 h were the best culture conditions for NCDV, and the virus titer could reach 4.9×10^6 TCID₅₀/mL. The ELISA results showed that the titer of the polyclonal antibody was 1 : 51 200, which indicated that NCDV live virus possessed good immunogenicity. The results of IFA and neutralization tests showed that polyclonal antibodies of NCDV could react specifically with G6P [1], G9P [1] and G10P [11] BRV strains, and produced a good cross neutralization effect. This experiment successfully optimized the culture conditions for NCDV in MARC-145 cells, and prepared highly effective rabbit polyclonal antibodies, which laid a theoretical foundation for serological diagnosis and vaccine development of BRV.

Keywords: bovine rotavirus; NCDV strain; MARC-145 cells; polyclonal antibody

收稿日期: 2023-10-04; 修回日期: 2024-05-17

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (23) 1029]; 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-37)

第一作者: 孙心如, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 索朗斯珠, 博士, 教授, 研究方向为高原动物传染病, E-mail: xzslsz@163.com; 李彬, 博士, 研究员, 研究方向为动物腹泻病防控技术, E-mail: libinana@126.com.

轮状病毒 (rotavirus, RV) 属于呼肠孤病毒科轮状病毒属, 是引起世界范围内儿童和幼畜急性腹泻的主要病原之一。已报道 RV 可感染多种动物, 比如牛^[1]、猪^[2]、兔^[3]、犬和猫^[4]、驴^[5]、小熊猫^[6]、大熊猫^[7]等, 造成了重大经济损失。牛轮状病毒 (bovine rotavirus, BRV) 主要感染 1 月龄内的犊牛, 引发腹泻、食欲不振、脱水和精神沉郁等一系列症状, 腹泻严重时粪便中带有血丝及脱落的肠黏膜。

有学者从数据库中筛选了 1984—2021 年国内 BRV 调查的文献, 发现共计有 25 个省市检出 BRV, 总流行率为 46% (6 635/10 677)^[8]。另据报道, 在国内 6 个省共 23 个养殖场采集了 269 例犊牛腹泻样本, 阳性率高达 71%^[9]。崔鑫等^[10]从新疆 12 个奶牛场采集 325 份犊牛粪便样品, 用 RT-PCR 检测牛冠状病毒和 BRV, 感染率分别为 9.54% 和 15.38%, BRV 检出率相对较高。由此可见, 牛轮状病毒在我国流行范围广, 流行时间长, 是引起犊牛腹泻最重要的病原之一。

根据 GenBank 中不同 BRV 毒株的 11 个基因片段核苷酸序列的同源性, 能确定该毒株的基因型, 其中 P 型和 G 型分别由 VP4 和 VP7 基因决定^[11]。目前已分离鉴定的 RV 有 42 个 G 型、58 个 P 型^[12]。国外 BRV 毒株的 G 型以 G6 为主导, 其次是 G10; P 型主要是 P [5], 其次是 P [11]^[13-16], 而最常见的病毒型组合是 G6P [5]、G6P [11] 和 G10P [11] 基因型^[15-18]。我国主要存在的是 G6、G10 和 P [1]、P [5]、P [11] 基因型, G6P [1] 组合最为常见^[9, 19-21]。RV 的基因型众多, 遗传进化机制复杂多变, 不同型 BRV 毒株间交叉保护效率低^[22]。本研究拟制备 G6P [1] 型牛轮状病毒的兔多克隆抗体, 并鉴定其交叉中和效应, 为后续的疫苗研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒培养

MARC-145 细胞购自美国模式菌种收集中心 (ATCC), 由本实验室传代保存, 其培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM (上海源培生物科技股份有限公司) 营养液中, 消化液为 0.25% 胰酶 (含 0.02% EDTA, 南京生航生物技术有限公司)。BRV NCDV 标准株 (G6P [1] 型)、SDLY 株 (G9P [1] 型) 及 N3 株 (G10P [11] 型) 为本实验室保存。BRV 毒株先在胰酶作用下 37 °C 体外激活 1 h, 再将其接种至长满单层的 MARC-145 细胞, 37 °C 孵育 1 h 后弃除病毒液, 向细胞中添加细胞维持液 (含有胰酶的 DMEM 营养液), 待培养至特定时间收集细胞上清液, 测定半数组织细胞感染量 (TCID₅₀), 或收集细胞沉淀, 测定

病毒蛋白表达水平。

1.2 病毒滴度的测定

病毒液需先加入 0.5 μg/mL 胰酶, 放入 37 °C 培养箱激活 1 h, 用 DMEM 将激活的病毒液按照 10 倍梯度稀释成 11 个稀释度, 用 PBS 将长满单层的 96 孔细胞板内的 MARC-145 细胞洗涤 3 次, 将稀释好的病毒液按照稀释梯度依次加入 96 孔板内 (每孔 100 μL)。最后一排设置正常细胞阴性对照组, 每孔加 100 μL 细胞维持液。将细胞板放入细胞培养箱中培养, 逐日观察并记录病变情况, 并用 Reed-Muench 计算 TCID₅₀。

1.3 病毒培养条件的优化

将 NCDV 毒株按照不同感染复数 (MOI) 感染 MARC-145 细胞, 于感染后 18 h 观察细胞病变 (CPE), 收集细胞上清液测定病毒滴度, 并利用 Western blot 检测病毒蛋白 VP6 表达水平, 比较相同时间不同接毒量下 MARC-145 细胞中病毒的增殖情况。同时, 按照上述 MOI 感染细胞, 于感染后不同时间观察细胞病变, 收集细胞上清液及细胞蛋白, 比较不同收毒时间下病毒在 MARC-145 细胞中的增殖情况, 绘制 NCDV 的一步生长曲线。

1.4 Western blot 分析

利用 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (上海雅酶生物医药科技有限公司) 制备 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。将 NCDV 不同感染条件下收集的细胞蛋白与 2× 蛋白上样缓冲液 (江苏碧云天高新技术有限公司) 1:1 混合后, 煮沸 10 min 使蛋白变性, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液加入 SDS 变性胶, 150 V 电泳约 50 min。取蛋白胶湿转至 PVDF 膜上 (300 mA, 1 h), 用含 5% 脱脂奶的 TBST (实验室自备) 进行封闭 (37 °C, 2 h)。封闭后加入 RV VP6 蛋白特异性单克隆抗体 (本实验室自制) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 再加 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (武汉博士德生物工程有限公司) 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后, 利用 ECL 化学发光检测试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 曝光显色后, 全自动化学发光成像分析系统 (上海天能科技有限公司) 采集和分析印迹膜图像。

1.5 多克隆抗体的制备

成年兔免疫前采集耳缘静脉血, 分离阴性血清备用。将 NCDV 培养上清液超速离心去除细胞碎片后, 采用背部皮下多点注射免疫成年兔, 免疫程序如图 1 所示。每次免疫前耳缘静脉采血, 37 °C 温箱静置 1 h, 5 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 分离血清, 分装于 EP 管中, 放置于 -80 °C 冻存备用。

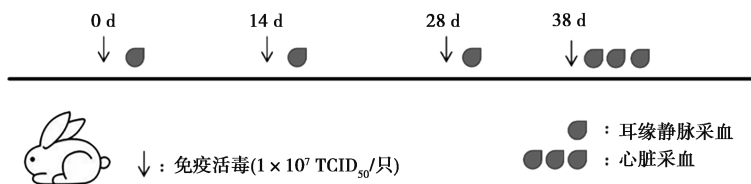


图1 牛轮状病毒多克隆抗体免疫程序

1.6 间接 ELISA 检测

用包被液稀释轮状病毒的 VP6 蛋白, 并将其包被至酶标板 (50 ng/孔), 4 ℃ 包被过夜, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。用含 5% 脱脂乳的 PBST 于 37 ℃ 封闭 2 h 后, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。用 NCDV 毒株免疫后血清作为一抗, 并进行倍比稀释后加入酶标板, 37 ℃ 孵育 1 h 后, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 再用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (武汉博士德生物工程有限公司) 作为二抗, 37 ℃ 孵育 50 min, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 最后加入 TMB 显色液 (武汉爱博泰克生物科技有限公司), 显色 10 min 后加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色, 放入酶标仪检测 OD₄₅₀ 值。

1.7 间接免疫荧光试验 (IFA)

MARC-145 细胞长满单层后以 MOI=0.1 分别接种 NCDV、SDLY 及 N3 毒株, 以未接毒细胞作为阴性对照。病毒培养 24 h 后弃掉上清液, PBST 洗涤细胞 3 次; 固定液 (上海碧云天生物技术股份有限公司) 常温固定 30 min 后, PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min; 封闭液 (上海碧云天生物技术股份有限公司) 37 ℃ 封闭 2 h 后, PBST 洗涤 3 次; 加入 1% BSA 稀释的兔多克隆抗体 (1:1 000) 37 ℃ 孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min; 细胞中添加 1% BSA 稀释的 FITC 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) (1:500, 武汉博士德生物工程有限公司), 37 ℃ 避光孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 最后向细胞中添加 DAPI (武汉博士德生物工程有限公司) 细胞核染色, 37 ℃ 孵育 5 min, PBST 洗涤 3 次, 吸干上清液后置于倒置荧光显微镜下观察拍照。

1.8 中和效价测定

将免疫后兔血清置于 56 ℃ 水浴锅灭活 30 min, 用 DMEM 按照 2 倍倍比连续稀释至 2⁻¹²。将已测定病毒滴度的 BRV 病毒液激活后稀释至 200 TCID₅₀/0.1 mL, 与稀释后的血清 1:1 混匀后放于 37 ℃ 细胞培养箱中反应 1 h。将长满单层 MARC-145 细胞的 96 孔板洗涤 3 次, 按照稀释度每孔加入 100 μL 病毒血清混合液。同时设置 200 TCID₅₀/0.1 mL 和 DMEM

1:1 混合阴性对照组以及只加 DMEM 的空白对照组。37 ℃ 孵育 1 h 后, 换液, 逐日观察细胞病变情况, 根据记录结果用 Reed-Muench 法计算出 50% 血清中和效价。

1.9 数据统计与分析

整理不同处理组中病毒的 TCID₅₀ 结果及间接 ELISA 中 OD₄₅₀ 值, 利用 GraphPad Prism 5 软件统计数据的显著性并作图。

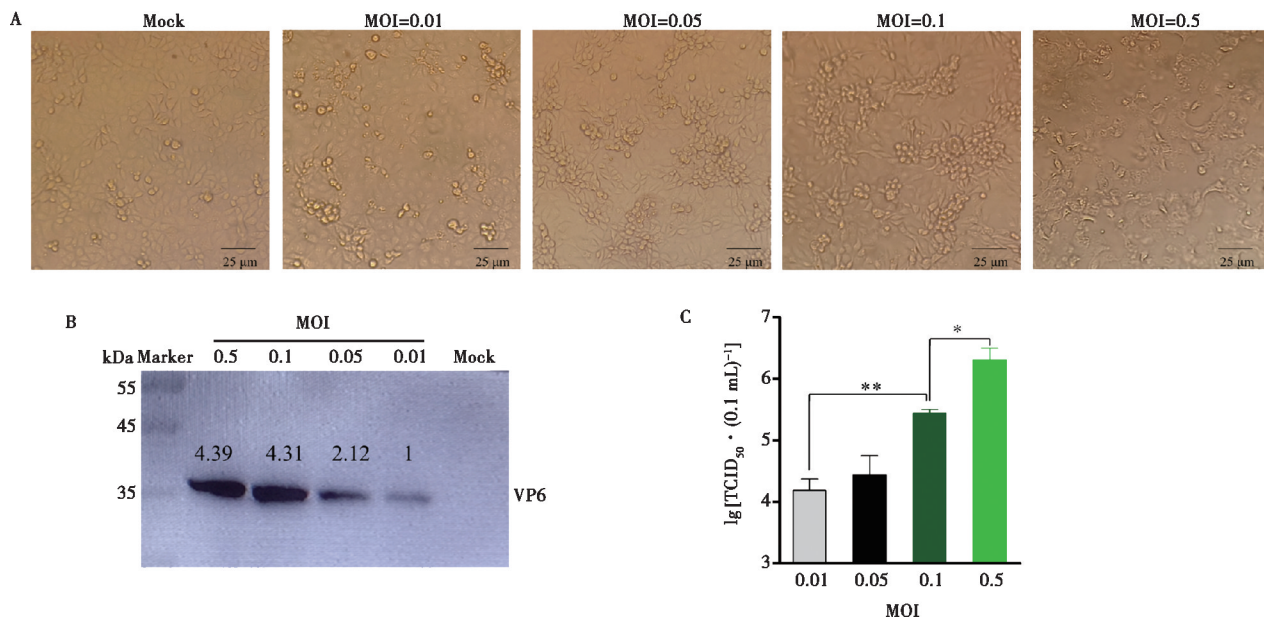
2 结果

2.1 NCDV 最优 MOI 值确定

将 NCDV 毒株按照 MOI 为 0.01、0.05、0.1 及 0.5 分别接种 MARC-145 细胞, 同时设置阴性对照组 (Mock), 病毒感染后 18 h (18 hpi) 观察 CPE、测定 VP6 蛋白表达及病毒滴度水平。结果显示, MOI 为 0.01 或 0.05 时, 细胞病变不完全, 蛋白表达水平及病毒滴度较低; MOI 为 0.5 时, 细胞上清液内病毒滴度最高, 但细胞病变过快, 18 hpi 时细胞几乎完全脱落, 不利于病毒传代增殖及感染特性测定; 而 MOI 为 0.1 时, 细胞病变完全且细胞脱落较少 (图 2A), VP6 蛋白表达水平高 (图 2B), 18 hpi 时病毒滴度可至 2.8×10⁵ TCID₅₀/0.1 mL (图 2C), 因此后续选取 MOI 为 0.1 感染 MARC-145 细胞。

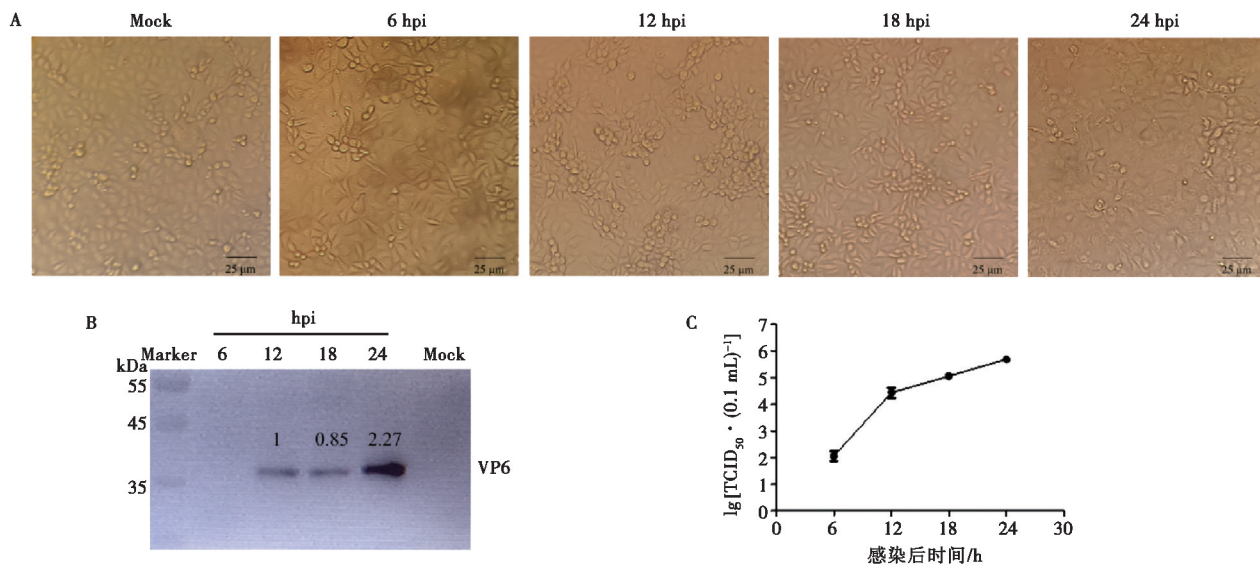
2.2 NCDV 生长曲线的绘制

将 NCDV 毒株按照 MOI=0.1 接种 MARC-145 细胞, 同时设置阴性对照组 (Mock), 分别在接种后 6、12、18 和 24 h 时观察 CPE, 测定病毒滴度及 VP6 蛋白表达情况。结果显示, 随着感染时间延长, 细胞逐渐开始出现病变, 细胞皱缩聚集, 界限不清晰, 表面崩解导致间隙变大 (图 3A); 感染后 6 h 未检测出 VP6 蛋白表达, 感染后 12 h 开始检测到并逐步增多, 感染后 24 h 时 VP6 蛋白表达量最高 (图 3B); 生长曲线测定结果显示, NCDV 病毒滴度随感染时间延长滴度逐步升高, 感染后 6 h 病毒滴度为 1.2×10² TCID₅₀/0.1 mL, 感染后 24 h 病毒滴度约为 4.9×10⁵ TCID₅₀/0.1 mL (图 3C)。



A. NCDV 以不同 MOI 值感染细胞后细胞病变特征; B. Western blot 鉴定 NCDV 以不同 MOI 值感染细胞后病毒蛋白 VP6 表达水平, 泳道上方数值为灰度值, 是以 0.01 MOI 的 VP6 条带灰度值作为基数的倍数; C. NCDV 以不同 MOI 值感染细胞后病毒滴度的对数, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

图 2 NCDV 最佳感染 MOI 值确定



A. NCDV 感染不同时间后细胞病变特征; B. Western blot 鉴定 NCDV 感染不同时间后病毒蛋白 VP6 表达水平, 泳道上方数值为灰度值, 是以 12 hpi 的 VP6 条带灰度值作为基数的倍数; C. NCDV 生长曲线。

图 3 NCDV 生长曲线绘制

2.3 多克隆抗体效价测定

NCDV 毒株免疫成年兔达到三免后, 采集免疫后的兔血清作为一抗, 以免疫前的兔血清为阴性对照, 利用间接 ELISA 测定血清抗体效价。图 4 结果显示,

抗体稀释度为 1 : 51 200 时, 阳性血清 OD_{450} 值 > 2.1 倍阴性血清 OD_{450} 值, 说明 NCDV 免疫原性良好, 抗体效价可达到 1 : 51 200。

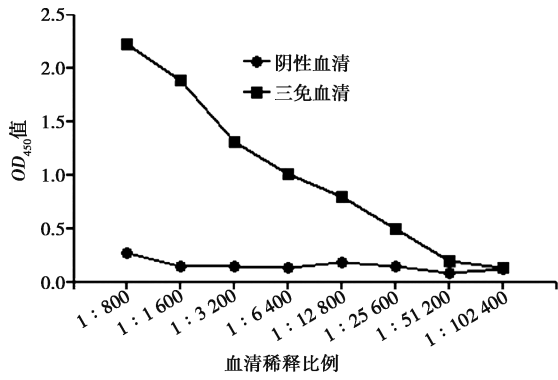


图 4 兔多克隆抗体 ELISA 效价测定

2.4 多克隆抗体的 IFA 鉴定

MARC-145 细胞长满单层后以 MOI=0.1 分别接种 NCDV、SDLY 及 N3 毒株，以未接毒细胞作为阴性对照 (Mock)。结果显示，兔多抗可与 NCDV 感染细胞发生特异性结合，且绿色荧光可分布于整个细胞中；同时，NCDV 免疫制备的兔多抗可与 G9P [1] 型 SDLY 毒株及 G10P [11] 型 N3 毒株感染细胞特异性结合产生荧光，而未接毒的阴性对照没有特异性荧光 (图 5)，说明 G6P [1] 型 NCDV 毒株的兔多抗可与不同型 BRV 毒株发生特异性结合。

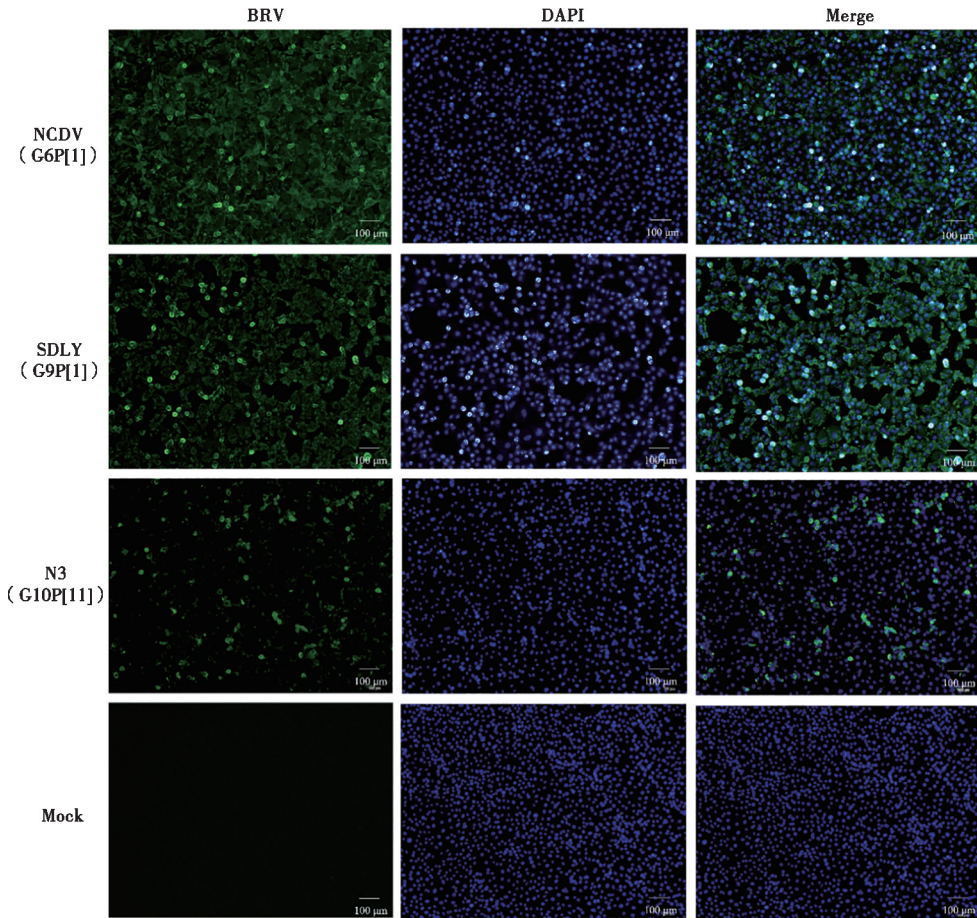


图 5 多克隆抗体的 IFA 鉴定

2.5 多克隆抗体中和效价的测定

用 Reed-Muench 法计算得出多抗对 NCDV 的中和效价是 1:512，对 SDLY (G9P [1] 型) 和 N3 (G10P [11] 型) 毒株的交叉中和效价均为 1:256，说明 G6P [1] 型全病毒免疫兔所产生的兔多克隆抗体对同源毒株具有良好的中和活性，对异源毒株具有部分交叉中和活性。

3 讨论

目前预防 BRV 感染最有效的手段是疫苗接种，

即通过诱导机体产生特异性抗体而预防 BRV 的流行与传播。近年来，BRV 疫苗研制主要集中于灭活疫苗及亚单位疫苗等。本研究利用 BRV 活病毒免疫成年兔，其三免后 ELISA 效价最终可达到 1:51200，中和效价为 1:512，表明 BRV 活疫苗也具有较好的免疫原性。

VP6 是 RV 中表达最丰富且在毒株间高度保守的病毒蛋白，具有良好的免疫原性。陆亚冬^[23]用原核表达的重组 VP6 蛋白包被酶标板，建立了检测 BRV 抗体的间接 ELISA 方法，确定了 VP6 蛋白可以用来

作为检测 BRV 抗体的抗原,同时,利用 VP6 蛋白进行 ELISA 检测的抗体效价与 BRV 中和抗体效价间存在相关性。本研究中以 VP6 蛋白作为抗原检测免疫血清的 ELISA 效价,确定 VP6 蛋白表达水平随着 BRV 感染复数、感染时间等条件发生变化,与病毒滴度呈正相关,可作为评价 BRV 复制效率的靶蛋白。

益准^[24]研制的 BRV VP6+LTB 亚单位疫苗对奶牛轮状病毒 (G6P [1]) 和牦牛轮状病毒 (G8P [1]) 的中和效价分别为 1:820 和 1:512,而王冬^[22]利用 G6P [1] 型 BRV 毒株 SDA2 灭活疫苗的免疫血清,对 G6P [1] 型和 G8P [1] 型毒株的中和效价分别是 1:2143 和 1:47,说明不同类型疫苗对 BRV 毒株的交叉保护效率不同。本研究发现,G6P [1] 型 BRV 毒株活疫苗诱导抗体的中和效价可达 1:512,对 G9P [1] 型和 G10P [11] 型毒株的交叉中和效价均为 1:256,说明 G6P [1] 型 BRV 活疫苗具有较好的交叉保护潜力,为后续 BRV 的疫苗研发提供了理论基础。

综上,本试验成功优化了 BRV NCDV 毒株在 MARC-145 细胞中的增殖条件,制备了高效价的兔源多克隆抗体,并确定该抗体可用于不同分型 BRV 毒株的 IFA 检测,且具有广谱的中和活性,为后续 BRV 血清学诊断及疫苗研发奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] CHEN S, ZHANG W, ZHAI J, et al. Prevalence of bovine rotavirus among cattle in mainland China: a meta-analysis [J]. *Microb Pathog*, 2022, 170: 105727.
- [2] LUO S, CHEN X, YAN G, et al. Emergence of human-porcine reassortment G9P [19] porcine rotavirus A strain in Guangdong Province, China [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 9: 1111919.
- [3] ZHAO Q, LIU L, HUANG T, et al. Complete genomic analysis of rabbit rotavirus G3P [22] in China [J]. *Arch Virol*, 2023, 168 (4): 129.
- [4] AZEVEDO L S, COSTA F F, GHANI M B A, et al. Full genotype characterization of Brazilian canine G3P [3] strains during a 10-year survey (2012–2021) of rotavirus infection in domestic dogs and cats [J]. *Arch Virol*, 2023, 168 (7): 176.
- [5] DONG J, LIU G, GAO N, et al. Reassortant G3P [12] rotavirus A strain associated with severe enteritis in donkeys (*Equus asinus*) [J]. *Equine Vet J*, 2022, 54 (1): 114–120.
- [6] LIU S, LI Y, ZHANG D, et al. Mortality analysis of captive red panda cubs within Chengdu, China [J]. *BMC Vet Res*, 2022, 18 (1): 68.
- [7] GUO L, YAN Q, YANG S, et al. Full genome sequence of giant panda rotavirus strain CH-1 [J]. *GenomeAnnounc*, 2013, 1 (1): e00241–12.
- [8] QIN Y F, GONG Q L, ZHANG M, et al. Prevalence of bovine rotavirus among *Bovidae* in China during 1984–2021: a systematic review and meta-analysis [J]. *Microb Pathog*, 2022, 169: 105661.
- [9] LIU X, YAN N, YUE H, et al. Detection and molecular characteristics of bovine rotavirus A in dairy calves in China [J]. *J Vet Sci*, 2021, 22 (5): e69.
- [10] 崔鑫, 孟凡艳, 鱼海玮, 等. 新疆南疆部分规模牛场犊牛轮状病毒、冠状病毒感染情况调查与基因鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56 (12): 40–44.
- [11] MATTHIJNSSENS J, CIARLET M, MCDONALD S M, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG) [J]. *Arch Virol*, 2011, 156 (8): 1397–1413.
- [12] GHONAIM A H, HOPO M G, GHONAIM N H, et al. The Epidemiology of circulating rotavirus associated with diarrhea in Egyptian kids and calves: a review [J]. *Zoonoses*, 2023, 3 (1). DOI: 10.15212/ZOONOSES-2023-0004.
- [13] MOHAMED F F, MANSOUR S M G, EL-ARABY I E, et al. Molecular detection of enteric viruses from diarrheic calves in Egypt [J]. *Arch Virol*, 2017, 162 (1): 129–137.
- [14] MADADGAR O, NAZAKTABAR A, KEIVANFAR H, et al. Genotyping and determining the distribution of prevalent G and P types of group A bovine rotaviruses between 2010 and 2012 in Iran [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179 (3/4): 190–196.
- [15] POURASGARI F, KAPLON J, KARIMI-NAGHLANI S, et al. The molecular epidemiology of bovine rotaviruses circulating in Iran: a two-year study [J]. *ArchVirol*, 2016, 161 (12): 3483–3494.
- [16] COLLINS P J, MULHERIN E, CASHMAN O, et al. Detection and characterisation of bovine rotavirus in Ireland from 2006–2008 [J]. *Ir Vet J*, 2014, 67 (1): 13.
- [17] BADARACCO A, GARAI COECHEA L, RODRÍGUEZ D, et al. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010 [J]. *VetMicrobiol*, 2012, 158 (3/4): 394–399.
- [18] SWIATEK D L, PALOMBO E A, LEE A, et al. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005 [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 140 (1/2): 56–62.
- [19] YAN N, LI R, WANG Y, et al. High prevalence and genomic characteristics of G6P [1] bovine rotavirus A in yak in China [J]. *J Gen Virol*, 2020, 101 (7): 701–711.
- [20] CHENG X, WU W, TENG F, et al. Isolation and characterization of bovine RVA from Northeast China, 2017–2020 [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11 (12): 1389.
- [21] 贾伟强, 胡林杰, 孟野, 等. 黑龙江省大庆市部分地区牛轮状病毒腹泻的分子流行病学调查 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2019, 40 (5): 107–108.
- [22] 王冬. 牛 A 群轮状病毒 SDA2 毒株免疫原性的初步研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2022.
- [23] 陆亚冬. 犊牛冠状病毒和轮状病毒间接 ELISA 诊断方法的建立与初步应用 [D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
- [24] 益准. A 群牛轮状病毒 VP6 亚单位疫苗的初步研究 [D]. 成都: 西南民族大学, 2022.