

刘颖, 黄宗梅, 王轩昂, 等. 中原地区牛肠道病毒分离鉴定及其遗传变异分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 88-92.

LIU Y, HUANG Z M, WANG X A, et al. Isolation, identification and genetic evolution analysis of bovine enterovirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 88-92.

中原地区牛肠道病毒分离鉴定及其遗传变异分析

刘颖[#], 黄宗梅[#], 王轩昂, 郑兰兰, 马世杰^{*}, 陈红英^{*}

(河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 旨在探究中原地区牛肠道病毒 (BEV) 的生物学特性及其 5'-UTR 序列遗传特征。采用 RT-PCR 方法对 2023—2024 年从四川、河南和河北地区收集的 77 份腹泻牛粪便样品进行 BEV 检测, 对阳性样本的 BEV 5'-UTR 序列进行克隆及遗传变异分析, 通过接种 Madin-Darby 牛肾细胞 (MDBK) 进行病毒分离与鉴定。结果: 77 份牛粪便样品中有 20 份 (25.97%) 检测为 BEV 阳性, 获得 20 株 BEV 5'-UTR 核苷酸序列; 20 株 BEV 与 13 株 BEV 参考毒株 5'-UTR 序列同源性为 77.2%~94.1%; 遗传变异分析显示, 获得的 20 株 BEV 序列中 17 株属于 BEV-F 种, 余下 3 株属于 BEV-E 种; 分离到 2 株 BEV, 命名为 HB002、HN004-8, 均为 BEV-F 种, 病毒滴度均在 48 h 时达到高峰, 分别为 $10^{5.49}$ TCID₅₀/μL 和 $10^{5.67}$ TCID₅₀/μL; 电子显微镜观察病毒粒子呈球形, 直径 20~30 nm。本研究为 BEV 感染的防控提供了参考。

关键词: 牛肠道病毒; 分离与鉴定; 5'-UTR; 遗传变异

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)05-0088-05

Isolation, identification and genetic evolution analysis of bovine enterovirus

LIU Ying[#], HUANG Zongmei[#], WANG Xuanang, ZHENG Lanlan, MA Shijie^{*}, CHEN Hongying^{*}

(College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: To understand the biological properties and genetic characteristics of bovine enterovirus (BEV) in central China, a total of 77 fecal samples were collected from cattle with diarrhoea in the area in 2023-2024 to detect BEV by RT-PCR. The BEV-positive samples were subjected to the cloning of 5'-UTR sequences and the genetic variation analysis, and was inoculated into Madin-Darby bovine kidney cells (MDBK) for isolation and characterization of BEV. The results showed that 20 of the 77 (25.97%) bovine diarrhea samples tested positive for BEV, and the 5'-UTR nucleotide sequences of 20 BEV strains were obtained. The 5'-UTR nucleotide sequence identity of the 20 BEV strains obtained in this study and the 13 BEV reference strains ranged from 77.2% to 94.1%. The phylogenetic analysis showed that 17 of the 20 BEV strains obtained in this study belonged to the BEV-F type, while the other 3 strains belonged to the BEV-E type. Two BEV strains (HB002 and HN004-8) were isolated, both of which were BEV-F type, with viral titers of $10^{5.49}$ TCID₅₀/μL and $10^{5.67}$ TCID₅₀/μL, respectively, and reached the peak of viral titer at 48 h. The results of electron microscopy showed that the viral particles were round and 20-30 nm in diameter. This study provided a reference for comprehensive prevention and control of BEV infection.

Keywords: bovine enterovirus; isolation and identification; 5'-UTR; genetic variation

牛肠道病毒感染是由牛肠道病毒 (bovine enterovirus, BEV) 引起牛的一种临床上以严重消化道和呼吸道症状为特征的新发传染病^[1]。BEV 宿主广泛, 已从牛、羊、黑斑羚和鼠等多种动物中分离出来^[2-5], 且该病毒常与其他病原混合感染, 造成感染

动物临床症状加重甚至死亡, 严重影响了畜牧业的可持续发展。

肠道病毒为微 RNA 病毒科、肠道病毒属成员。肠道病毒属包含 12 个肠道病毒种 (A~L) 和 3 个鼻病毒种 (A~C)^[6], 其中牛肠道病毒包括 E 和 F 两个种。BEV 病毒粒子呈球形, 二十面体, 无囊膜, 病毒粒子直径约为 20~30 nm。病毒基因组为不分节段的单股正链 RNA, 基因组全长约 7.5 kb, 基因组依次由 5'非编码区 (5'-UTR)、开放阅读框 (ORF) 和 3'非编码区 (3'-UTR) 组成。ORF 翻译 1 个多聚蛋白, 经过裂解产生 4 种结构蛋白 (VP1、VP2、VP3 和 VP4) 和 7 种非结构蛋白 (2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D)^[7]。

收稿日期: 2024-05-21; 修回日期: 2025-03-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1601606); 河南省高校科技创新人才支持计划项目 (21HASTIT039)

第一作者: 刘颖, 女, 硕士研究生; 黄宗梅, 女, 助理研究员。

[#]共同第一作者

^{*}通信作者: 马世杰, 教授, 主要从事分子病原与分子免疫学研究, E-mail: participate2006@126.com; 陈红英, 教授, 主要从事分子病原与分子免疫学研究, E-mail: chhy927@163.com。

1959年, Moll等^[8]首次发现并报道从牛中分离出BEV。2011年, 我国首次从内蒙古地区犏牛粪便样品中分离的一株BEV(命名为BHM26)^[9], 属于BEV-F种。2012年, 邢泽黎等^[10]从吉林地区首次分离出一株BEV(HY12), 属于BEV-E种, 确定我国牛群中存在BEV E和F两个种。近年来, 国内有关BEV的报道陆续增多, 然而BEV流行情况、遗传变异及生物学特性等数据仍缺乏。因此, 本研究采用RT-PCR方法对牛群中BEV进行检测, 对检测为阳性的BEV样品进行5'-UTR序列的克隆和遗传变异分析, 同时进行病毒分离与鉴定, 为BEV感染的防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 细胞及样品采集

Madin-Darby牛肾细胞(MDBK)由郑州猪重大疫病防控重点实验室保存。2023—2024年采集自四川省(15份)、河南省(53份)和河北省(9份)规模化肉牛场患腹泻牛的77份粪便样品, 按15的体积加入PBS振荡混匀, 反复冻融3次, 12 000 r/min离心10 min, 收集上清液置于-80℃保存备用。

1.2 主要试剂

2×Rapid Taq Master Mix、TRIzol Reagent购自南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA Marker I购自北京博迈德基因技术有限公司; DNA凝胶回收试剂购自广州飞扬生物工程有限公司; pMD18-T Vector购自宝生物工程(大连)有限公司; 胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)购自北京索莱宝科技有限公司; DMEM培养基购自美国GIBCO公司。

1.3 引物设计

根据已发表的BEV毒株5'-UTR序列, 参照文献^[11]合成1对针对BEV 5'-UTR保守区域的特异性鉴定引物(BEV-5'-UTR-F: 5'-TTTAAAACAGC-CTGGGGCTTGTAC-3'; BEV-5'-UTR-R: 5'-CG-GAGTACCGAAAGTAGTCTGTTTC-3'), 预期扩增片段大小为667 bp, 由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.4 5'-UTR扩增、克隆及测序

取400 μL粪便上清液, 采用TRIzol法提取RNA, 参照RNA反转录试剂盒说明书反转录为cDNA。以cDNA为模板, 进行PCR扩增。扩增产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

将回收目的片段引入到pMD18-T载体, 经PCR证实为阳性的重组质粒, 送北京擎科生物科技有限公司进行序列的测定。用DNASTar软件的Seqman程序对所测的序列进行拼接、组装, 并利用Megalign程序

进行序列同源性分析。采用MEGA 7.0软件使用邻近法(Neighbor-Joining)法进行遗传变异分析。

1.5 病毒分离

将检测为BEV阳性的粪便上清液经0.45 μm过滤除菌。将已除菌的样品接种单层MDBK细胞, 加入2 mL含2%胎牛血清的DMEM维持液继续培养至72 h, 收取培养物, 反复冻融3次, 离心取上清液, 进行下一代培养。培养过程中同时设立不接毒的细胞培养物作为阴性对照。将盲传3代的细胞培养液提取RNA, 反转录为cDNA, 利用BEV检测引物检测细胞培养液中的BEV。

1.6 病毒纯化

将病毒液按 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 进行10倍系列稀释后, 接种6孔板内的单层MDBK细胞, 同时设置阴性对照, 加入含2.5%低熔点琼脂糖的DMEM培养基, 置于培养箱中培养72 h。挑取单个蚀斑, 进行RT-PCR检测, 鉴定为BEV后进行下一轮的蚀斑纯化, 以此连续操作3次后得到纯化的病毒。

参照文献^[12]方法测定病毒半数组织培养感染量(TCID₅₀), 按照Reed-Muench法计算病毒的TCID₅₀。

1.7 病毒一步生长曲线

将纯化后的BEV病毒液以感染比(MOI)为1接种至单层MDBK细胞的6孔板中, 分别在6、12、18、24、30、36、42、48、60、72、78和96 h收取培养物, 反复冻融3次, 离心、收集上清液, 测定不同时间病毒的TCID₅₀。利用GraphPad Prism 8.0绘制病毒的一步生长曲线。

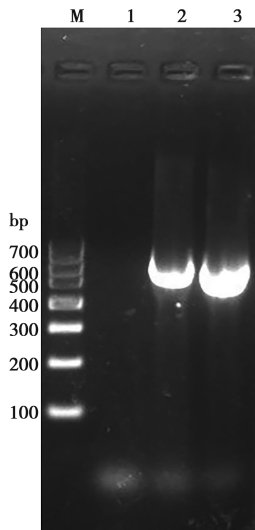
1.8 BEV HN004-8株形态学观察

取200 mL BEV HN004-8株第10代细胞培养物, 反复冻融3次后收取病毒液, 4℃, 8 000 r/min除去沉淀, 取上清液, 4℃, 30 000 r/min离心3 h, 弃上清液, 用100 μL PBS重悬沉淀, 进行磷钨酸负染, 用Hitachi HT-7800透射电镜观察病毒粒子大小及形态。

2 结果与分析

2.1 BEV的RT-PCR检测

77份粪便样品的RT-PCR扩增产物经2.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 共有20份样品可扩增出1条约667 bp的特异性条带(图1), 与BEV目的片段大小一致。20份阳性样品中, 河南省、河北省、四川省分别占14份、1份和5份, BEV总阳性率为25.97%。



M. DNA Marker I; 1. 阴性对照; 2. 待检样品; 3. 阳性对照。

图1 5'-UTR RT-PCR 扩增的部分结果

2.2 BEV 5'-UTR 核苷酸同源性和遗传变异分析

将检测为 BEV 的样品进行 5'-UTR 序列的克隆及测序, 获得了 20 株 BEV 的 5'-UTR 核苷酸序列, 并将序列上传至 GenBank 中 (登录号: PP706387 ~ PP706406)。

将 20 株 BEV 的 5'-UTR 序列与 GenBank 中已发布的 13 株 BEV 参考毒株 5'-UTR 序列进行同源性分析。结果显示, 获得的 20 株 BEV 之间 5'-UTR 核苷酸序列同源性为 79.1% ~ 99.5%, 20 株 BEV 与 6 株 BEV-F 种参考毒株同源性为 78.2% ~ 92.3%, 与 7 株 BEV-E 种参考毒株同源性为 77.2% ~ 94.1%。获得的毒株 HB002 和 HN004-8 与参考毒株 BEV-261 (BEV-F 种) 同源性最高, 分别为 92% 和 91.8%; 而 HB002 与 HY12 和 SL305 参考毒株 (BEV-E 种) 同源性最低, 为 81.2%; HN004-8 仅与 HY12 参考毒株 (BEV-E 种) 同源性最低, 为 80.5%。

基于 5'-UTR 序列构建的遗传进化树显示, BEV 毒株分为两个分支 (BEV-E 和 BEV-F) (图 2)。克隆的 20 株 BEV 中有 17 株与 PS87、Ho12 和 W1 等 6 株 BEV 参考毒株处于一个分支, 属于 BEV-F 种, 而余下的 3 株与 PA12-24791、HY12 等 7 株 BEV 参考毒株处于另一分支, 属于 BEV-E 种。来自河北省的毒株 HB002 和河南省的毒株 HN004-8 均与 BEV-F 种参考毒株处于同一分支中, 亲缘关系较近; 而与

BEV-E 种参考毒株亲缘关系较远, 在进化树上明显处于不同分支。此外, 河南省、四川省牛场中存在同一牛场内同时发生 BEV-E 种和 BEV-F 种感染。

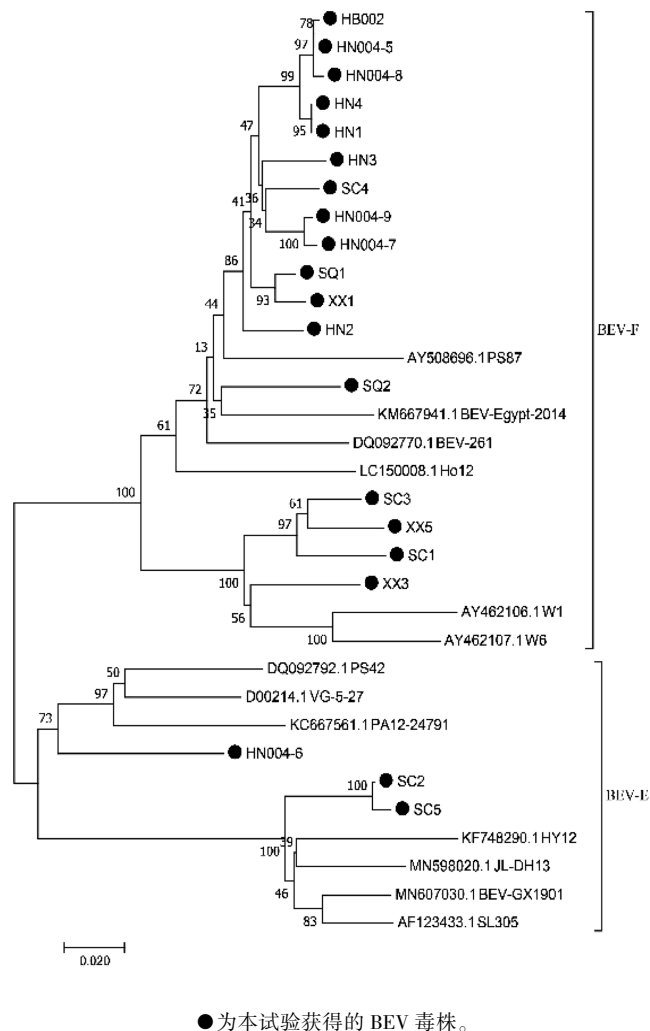


图2 BEV 5'-UTR 遗传进化树

2.3 病毒的分离与 RT-PCR 鉴定

将样品 HB002、HN004-8 经处理后, 接种单层 MDBK 细胞, 并进行传代培养。第 3 代 30 h 时, MDBK 细胞出现皱缩、变圆、聚集和脱落等现象 (图 3), 分离获得 2 株病毒。利用 BEV 5'-UTR 特异引物进行 RT-PCR 鉴定, 病毒细胞液在约 667 bp 处出现 1 条特异性目的条带, 与预期大小相符, 而以正常 MDBK 细胞核酸为模板进行 BEV 检测, 结果为阴性。初步表明, 分离病毒为 BEV。

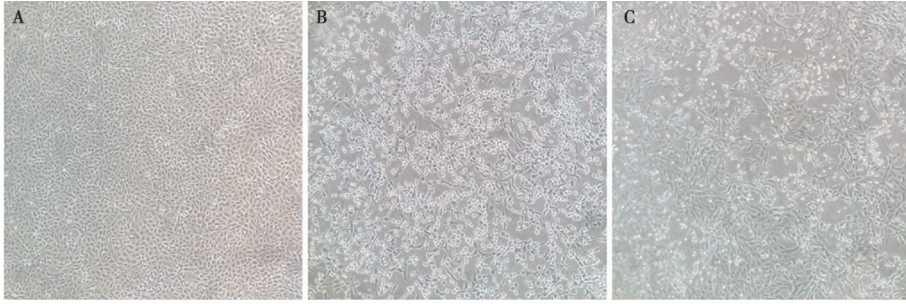


图3 病料接种MDBK细胞的病变观察(100×)

2.4 病毒蚀斑纯化

经连续3轮的蚀斑纯化, RT-PCR结果显示, 均能扩增出目的片段, 表明HN004-8、HB002毒株已纯化。根据Reed-Muench法, 测定出HB002 P14代病毒滴度为 $10^{4.29}$ TCID₅₀/μL, HN004-8 P8代病毒滴度为 $10^{6.5}$ TCID₅₀/μL。

2.5 BEV的一步生长曲线

将分离株HB002和HN004-8接种MDBK细胞, 每隔12 h观察细胞病变并记录, 根据Reed-Muench法计算病毒滴度, 绘制BEV的生长曲线。如图4所示, BEV感染MDBK细胞后0~48 h, 病毒滴度呈指数上升趋势, 2株毒株均在48 h达到最高, 分别为 $10^{5.49}$ TCID₅₀/μL、 $10^{5.67}$ TCID₅₀/μL, 随后逐渐下降, 在96 h仍保持较高滴度。

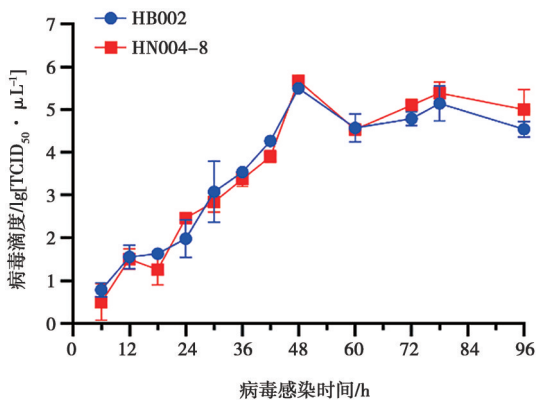


图4 BEV的一步生长曲线

2.6 病毒形态学观察

将HN004-8分离株感染MDBK细胞48 h后收取病毒液, 经反复冻融裂解细胞, 然后去除细胞碎片, 超速离心, PBS液悬浮沉淀。经磷钨酸负染后, 在透射电镜下观察, 可见无囊膜、直径20~30 nm的病毒粒子(图5), 与BEV粒子的形态及大小相符合。

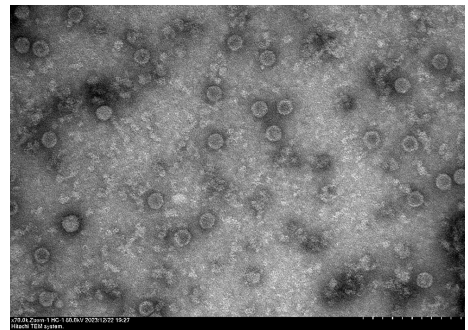


图5 HN004-8分离株电镜形态(标尺=200 nm)

3 讨论

BEV是我国一种新发动物传染病病原, 引起牛消化道、呼吸道和生殖道疾病, 制约养牛业的健康发展。临床上BEV也能从无症状的健康牛中检测到, 受感染的无症状牛可以将病毒排泄到体外, 造成疫病传播。因此, 加强对牛场BEV感染的流行病学调查, 并尽快从流行毒株中筛选出疫苗候选株, 可为BEV感染的防控提供技术奠定基础。

本研究对2023—2024年收集自河南省、河北省和四川省的共77份牛腹泻粪便样品进行检测, 发现20份检测为BEV阳性, 阳性率为25.97%。林倩等^[12]在2019年对宁夏地区疑似BEV感染牛群采集的438份粪便样品进行检测, 发现BEV总感染率为22.4%。钱明珠等^[13]对2016—2020年河南省17个地市采集的1970份牛粪便样品进行BEV检测, 结果显示平均感染率达23.35%。古丽巴哈尔·图尔荪等^[14]在2022年对新疆地区疑似BEV感染牛群采集的740份粪便样品进行了流行病学调查, 阳性率达15.54%。Luo等^[15]对2021—2022年广西97个牛场采集的1168份粪便样品进行检测, 结果显示BEV阳性率为10.7%, 表明BEV在我国很多地区持续流行。本研究对BEV阳性样品进行5'-UTR的克隆和测序,

获得了 20 株 BEV 5'-UTR 序列。遗传变异分析显示, 本研究获得的 20 株 BEV 中 17 株为 BEV-F 种 (85%), 其余 3 株为 BEV-E 种 (15%)。Chang 等^[16]报道 2012—2018 年从河南、吉林和宁夏分离的 27 株 BEV 中 24 株是 BEV-E 种 (88.89%), 3 株是 BEV-F 种 (11.11%), 而在 2021—2022 年广西的 125 株 BEV 毒株中 BEV-E 种和 BEV-F 种分别为 54.4% 和 45.6%^[15], 表明 BEV-F 种已经在我国普遍流行, 应引起高度重视。

BEV 常在患有严重呼吸道和肠道疾病的养牛场中被检测和分离到, 有时与其他腹泻病毒引起混合感染^[17]。相关研究报道, BEV 可引起 Vero、MDBK 和 BHK-21 细胞病变^[18]。本研究将 BEV 阳性样品接种 MDBK 细胞, 成功分离并纯化到 2 株 BEV 毒株 (HB002 和 HN004-8), 均为 BEV-F 种。BEV 分离株感染 MDBK 细胞后, 细胞出现变圆、碎裂、脱落等现象, 且在 MDBK 上均产生形状规则、边缘明显的蚀斑; BEV 分离株感染 MDBK 细胞后 0~48 h, 病毒滴度呈指数上升趋势, 表明 2 株 BEV 分离株能在 MDBK 细胞上稳定传代且保持较高病毒滴度; 对病毒粒子进行观察, 显示病毒粒子直径在 20~30 nm。病毒株的分离为后续 BEV 疫苗的研发提供了候选毒株。

综上所述, 本研究调查了四川、河南和河北地区 BEV 的流行与遗传变异特征, 并成功分离到 2 株 BEV 毒株, 为我国 BEV 感染的防控及其致病机制研究提供了有力的支持。

参考文献:

- [1] 刘亚静, 李欣, 张群, 等. 吉林省不同地区牛肠道病毒遗传变异分析 [J]. 中国兽医学报, 2018, 38 (1): 59-68.
- [2] ZHENG T. Characterisation of two enteroviruses isolated from Australian brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand [J]. Arch Virol, 2007, 152 (1): 191-198.
- [3] OMATSU T, TSUCHIYAKA S, HIRATA T, et al. Detection of enterovirus genome sequence from diarrheal feces of goat [J]. Virus Genes, 2014, 48 (3): 550-552.
- [4] CHANG X, LIN Q, HU J, et al. Discovery of a virus of the species enterovirus F in goats [J]. Arch Virol, 2019, 164 (10): 2551-2558.
- [5] 何欢, 张斌. 牛肠道病毒的研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2017, 51 (1): 63-68.
- [6] ADAMS M J, LEFKOWITZ E J, KING A M Q, et al. Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses (2017) [J]. Arch Virol, 2017, 162 (8): 2505-2538.
- [7] MCCARTHY F M, SMITH G A, MATTICK J S. Molecular characterisation of Australian bovine enteroviruses [J]. Vet Microbiol, 1999, 68 (1/2): 71-81.
- [8] MOLL T, DAVIS A D. Isolation and characterization of cytopathogenic enteroviruses from cattle with respiratory disease [J]. Am J Vet Res, 1959, 20: 27-32.
- [9] 李英利, 常继涛, 于力. 牛肠道病毒的分离鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33 (5): 388-390.
- [10] 邢泽黎, 朱利塞, 王新平, 等. 从吉林省肉牛场新发疫病分离出 E 种肠道病毒 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34 (3): 390-394.
- [11] 张姗, 李晓轩, 侯绍华, 等. 牛肠道病毒北京株的分离鉴定及全基因组分析 [J]. 中国兽医科学, 2018, 48 (7): 844-850.
- [12] 林倩, 胡俊英, 李卓宸, 等. 宁夏地区牛场 E 种肠道病毒的分离与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2019, 51 (11): 123-127.
- [13] 钱明珠, 胡俊英, 林倩, 等. 河南省牛肠道病毒感染的流行病学调查与分析 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41 (10): 1937-1941.
- [14] 古丽巴哈尔·图尔荪, 张福慧, 张群, 等. 新疆地区牛肠道病毒的病毒分离鉴定及毒株差异 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (5): 873-878.
- [15] LUO Y, LIU H, ZOU Y, et al. Molecular epidemiology of bovine enteroviruses and genome characterization of two novel bovine enterovirus strains in Guangxi, China [J]. Microbiol Spectr, 2023, 11 (2): e0378522.
- [16] CHANG X, ZHANG Z, CUI X, et al. Genetic diversity and recombination of bovine enterovirus strains in China [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12 (3): e0280023.
- [17] 董坤, 胡俊英, 张芷源, 等. 吉林省牛病毒性腹泻病毒与牛肠道病毒混合感染的流行病学调查 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (6): 1143-1148.
- [18] JI C, ZHANG Y, SUN R, et al. Isolation and identification of two clinical strains of the novel genotype enterovirus E5 in China [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (3): e0266221.