

李海琴, 康昭风, 谭美芳, 等. 江西省猪伪狂犬病原流行病学调查及其 *gB*、*gE* 及 *TK* 基因遗传变异分析[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(2): 332-339.



江西省猪伪狂犬病原流行病学调查及其 *gB*、*gE* 及 *TK* 基因遗传变异分析

李海琴, 康昭风, 谭美芳, 曾艳兵, 季华员*

(江西省农业科学院 畜牧兽医研究所, 江西 南昌 330200)

摘要: 为了解江西省猪伪狂犬病原流行情况及遗传变异情况, 对 2017—2018 年收集的疑似伪狂犬样品, 以 1 对针对猪伪狂犬病毒 *gE* 基因的检测引物进行病原检测, 并随机挑选 15 株 PRV 阳性样品, 对 PRV 病毒复制必需的糖蛋白 *gB* 基因和主要毒力基因 *gE* 与 *TK* 基因克隆测序及遗传进化分析, 用以探究其遗传变异关系。临床结果显示: 猪伪狂犬病毒检出率由 2017 年的 4.76% 提高到了 2018 年的 7.54%, 检出率较低, 无明显季节性。15 株 PRV *gB/gE/TK* 全基因序列遗传进化分析结果表明: 调查的 15 株伪狂犬病毒毒株与中国株处于同一分支, 与美国株 Bartha 差异较大。核苷酸同源性分析结果表明: 15 株 PRV *gB* 基因相互间同源性为 98.9%~100%; 与参考毒株的 *gB* 基因的同源性 96.7%~100%; *gE* 基因相互间同源性为 99.1%~100%; 与参考毒株的 *gE* 基因的同源性 98.1%~100%; *TK* 基因变异相对较小, 相互间同源性为 100%, 与参考 PRV 毒株的 *gE* 基因的同源性 99.1%~100%。研究结果表明, *gB* 基因和 *gE* 基因存在较多的变异, 可能是当前流行毒株抗原变异及毒力增强从而使现有疫苗免疫保护力不佳的主要原因。

关键词: 猪伪狂犬病毒; *gB* 基因; *gE* 基因; *TK* 基因; 遗传进化

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2019)02-0332-08

Epidemiological Survey of Pseudorabies in Jiangxi Province and Analysis of Genetic Variation of *gB*, *gE* and *TK* Genes

LI Hai-qin, KANG Zhao-feng, TAN Mei-fang,
ZENG Yan-bing, JI Hua-yuan*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China)

Abstract: To study the epidemic and genetic variation of pseudorabies virus (PRV) in Jiangxi Province, PRV in clinical samples collected during 2017—2018 were detected by PCR based on *gE* gene, and fragments of 15 sequences were analyzed to explore the variation of *gB/gE/TK* gene. The results showed that the PRV clinical detection rate increased from 3.7% in 2017 to 7.54% in 2018, the detection rate was low across Jiangxi Province and there was no obvious seasonal change. Sequencing analysis showed that the *gB/gE* gene of detected 15

收稿日期: 2018-09-12 修回日期: 2018-11-30

基金项目: 江西省现代农业生猪产业技术体系(JXARS-01)和江西省农业科学院创新基金资助项目(2016CQN006)

Project supported by Jiangxi Modern Agriculture Pig-industry Technology Research System(JXARS-01) and Innovation Project Supported by Jiangxi Academy of Agricultural Sciences(2016CQN006)

作者简介: 李海琴(1986—), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物疫病防控研究, 278030049@qq.com; *通信作者: 季华员, 副研究员, 博士, 47856041@qq.com。

PRV strains had a low identity with PRV strains in US. The result of phylogenetic tree analysis of *gB/gE* gene showed that the 15 isolates and PRV strain of China belonged to the same cluster and with the US strain separated into two main groups; indicating that the current epidemic strain probably made the mutation of *gB/gE* gene, which would influence the immunogenicity and immune evasion of virus, and might be the reason for low immune protection of the currently applied vaccine strain.

Keywords: pseudorabies virus; *gB* gene; *gE* gene; *TK* gene; genetic variation

猪伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由猪伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起以神经症状、繁殖障碍、生长停滞等为特征的急性、热性的传染病^[1]。该病可致妊娠母猪流产,种公猪不育,新生仔猪出现神经症状和腹泻,育肥猪生长停滞等。自1984年刘永纯^[2]首次报道此病后,该病原已在全国30多个省市流行,是危害我国养猪业的重大传染病之一。在我国,随着PRV基因缺失苗的使用和部分规模化猪场实施猪伪狂犬病毒的净化工作,PR得到有效的控制。但是自2011年10月以来,我国大部分地区的PRV *gE* 抗体水平显著升高,许多免疫过PRV基因缺失苗的猪场也有发病报道,给我国的养殖业带来了巨大的经济损失^[3]。

PRV的基因组为线性双链DNA分子,分子量约140 kb, G+C含量超过72%。PRV基因组是由独特长序列区(unique long region, UL), 内部重复序列区(internal repeat sequences, IRs), 独特短序列区(unique short region, US)和末端重复序列(terminal repeat sequences, TRs)4个部分构成^[4]。囊膜蛋白功能主要与病毒进入,出壳,参与调节免疫反应,促进合胞体形成;其中gB蛋白是病毒主要的免疫原,刺激产生的抗体对病毒有较强的中和能力,若有补体参与,将产生更强的中和能力^[5];gE蛋白是病毒增殖的非必需糖蛋白,主要与病毒的毒力有关,缺失*gE*基因的PRV毒株对小鼠和仔猪大幅降低^[6-7]。*TK*基因编码胸苷激酶,是PRV在神经复制中所必须的酶,缺失*TK*基因的PRV毒株在神经元的复制能力极弱,对小鼠、兔和仔猪致病力大幅降低^[8]。

为了深入了解江西省猪伪狂犬病的流行及伪狂犬病毒遗传变异情况,本研究拟对2017—2018年疑似PRV感染的病猪,采集其脑、肺脏等组织匀浆后提取病毒DNA,并挑选15份阳性样品对其*gB*、*gE*和*TK*基因进行克隆测序,为进一步探究近年来猪伪狂犬病毒爆发的原因提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 病料样品

2017—2018年从江西省宜春、九江、南昌、吉安、新余、抚州、上饶、鹰潭等地的猪场中采集疑似猪伪狂犬病的发病猪的脑、肺、淋巴结等组织样品472份,于-20℃保存备用。

1.2 主要试剂

Phanta Max Super-Fidelity DNA聚合酶购自南京诺唯赞生物科技有限公司、DL 5 000 DNA marker、病毒核酸纯化试剂盒、胶回收试剂盒及DH5α感受态细胞等均购置宝日医生物技术(北京)有限公司, pEASY-Blunt Zero克隆试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 引物设计与合成

参照文献[9]合成*gE*基因的检测引物^[9]。参照GenBank登录的PRV HNX(KM189912)序列,用Primer3.0在线软件分别设计扩增*gB*、*gE*和*TK*基因的全长的引物(表1),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 病毒DNA的提取和PCR扩增

组织样品加入适量的PBS匀浆,后反复冻融3次,8 000 r/min离心5 min。后续按照病毒DNA的提取试剂盒操作。以提取的DNA为模板,用引物分别进行PCR扩增。PCR体系:5 μL DNA模板,1 μL dNTP Mixture(10 mmol/L each),25 μL 2×Phanta Max Buffer,2 μL上游引物(10 μmol/L),2 μL下游引物(10 μmol/L),1 μL Max Super-Fidelity DNA Polymerase(1U/μL),5 μL DMSO,加DEPC处理的灭菌ddH₂O至50 μL。反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸3 min,35个循环;最后,

72 ℃延伸5 min。扩增产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测并观察结果。PCR产物经胶回收后克隆至pEASY-Blunt Zero载体,转入DH5 α 感受态细胞,菌液PCR鉴定后挑选阳性克隆送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

表1 本试验所涉及的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primers	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')	位置 Position	产物大小/bp Products size
gB-F	GCGAGACGTGCGATCAACGGCATC	16252-16275	2 827
gB-R	GACGGGCTGTACCTGACCTACGAG	19055-19078	
gE-F	CGCACACACCGGGGTTGAGACC	122745-122766	1 795
gE-R	CGGAATGCGGGCGGACCGGTTTC	124516-124537	
TK-F	CGTAGAAGCGGTTGTGGCAGCGGATC	59322-59347	1 065
TK-R	CGTTGCCTCCGTCGCGGTCTCCATC	60362-60386	

1.5 基因序列分析

应用DNASar Lasergene7.1软件包中的MegAlign程序分别比较本试验获得的gB、gE和TK全基因序列与25株其他国家或地区PRV毒株的gB、gE和TK基因序列的核苷酸同源性;同时,用MEGA6.0软件构建本试验获得的代表性gB、gE和TK基因序列与其他国家或地区的PRV基因序列的分子进化树,分析本试验获得序列与其他国家或地区的PRV毒株的进化关系及江西省PRV各毒株的流行情况。

2 结果分析

2.1 猪伪狂犬野毒检测结果

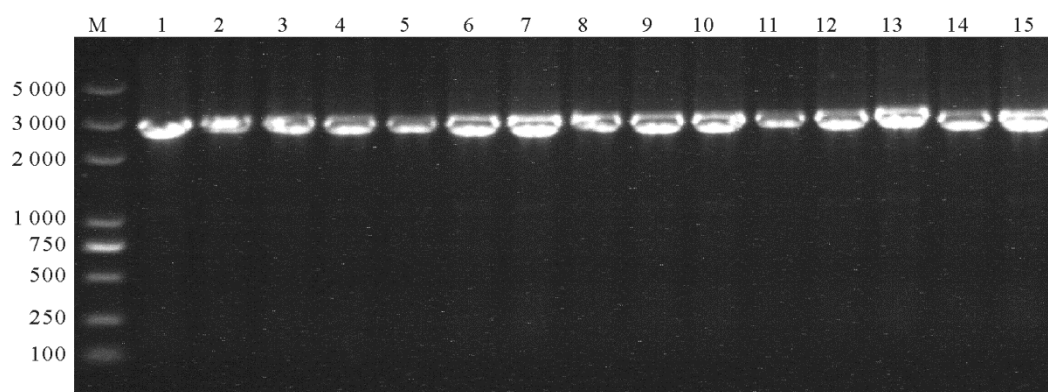
2017—2018年共检测了472份样品,有28份样品为PRV野毒,阳性率为5.93%。按年度统计结果表明,伪狂犬野毒阳性率2017年的4.76%提高到了2018年的7.54%,按月份统计结果显示,伪狂犬野毒检出阳性率与季节无明显关系(表2)。

表2 2017—2018年江西省规模猪场PRV野毒感染情况
Tab.2 The results of PRV in pigs in Jiangxi from 2017 to 2018

月份 Months	样品数 Sample number	2017年		2018年		
		阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	样品数 Sample numbe	阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate
1	0	0	0.00	0	0	0.00
2	0	0	0.00	0	0	0.00
3	46	2	4.35	52	5	9.62
4	53	4	7.55	35	2	5.71
5	32	1	3.13	43	3	6.98
6	24	1	4.17	21	1	4.76
7	13	0	0.00	37	3	8.11
8	19	1	5.26	11	1	9.09
9	37	2	5.41	0	0	0.00
10	21	1	4.76	0	0	0.00
11	11	1	9.09	0	0	0.00
12	17	0	0.00	0	0	0.00
总计 Total	273	13	4.76	199	15	7.54

2.2 *gB*、*gE*和*TK*基因的扩增

以提取DNA为模板,应用*gB*、*gE*及*TK*基因的引物分别进行PCR扩增,*gB*基因的扩增产物长度约为2 800 bp(图1);*gE*基因的扩增产物长度约为1 800 bp(图2),*TK*基因的扩增产物长度约为1 000 bp(图3),与目的片段大小一致,产物经胶回收、克隆后测序。

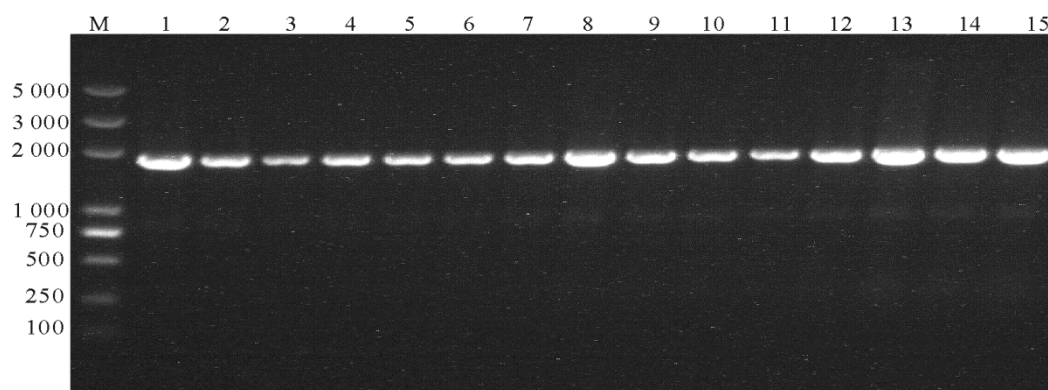


M:DL5 000 DNA Marker;泳道1~15:15株PRV代表株

M:DL5 000 DNA Marker;Lane 1~15:15representative PRV sample

图1 PRV *gB*基因的PCR扩增结果

Fig.1 PCR amplication of PRV *gB* gene

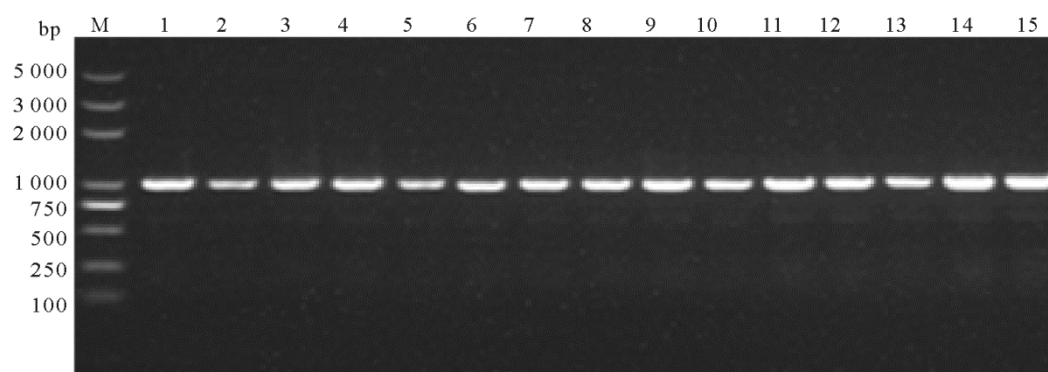


M:DL5 000 DNA Marker;泳道1~15:15株PRV代表株

M:DL5 000 DNA Marker;Lane 1~15:15representative PRV sample

图2 PRV *gE*基因的PCR扩增结果

Fig.2 PCR amplication of PRV *gE* gene



M:DL5 000 DNA Marker;泳道1~15:15株PRV代表株

M:DL5 000 DNA Marker;Lane 1~15:15representative PRV sample

图3 PRV *TK*基因的PCR扩增结果

Fig.3 PCR amplication of PRV *TK* gene

2.3 PRV 基因的核苷酸同源性及进化树分析

随机挑选从临床上检测的15个PRV阳性样品(JXYC/CH/2017、JXYC/CH/2018、JXJJ/CH/2017、JXJJ/

CH/2018、JXNC/CH/2017、JXNC/CH/2018、JXJA/CH/2017、JXJA/CH/2018、JXXY/CH/2017、JXFZ/CH/2017、JXFZ/CH/2018、JXSR/CH/2017、JXSR/CH/2018、JXYT/CH/2017、JXYT/CH/2018)进行 *gB*、*gE*、*TK* 基因的克隆测序,并与国内外参考毒株进行核苷酸同源性比对及进化树分析。

2.3.1 *gB* 基因核苷酸同源性及进化树分析 *gB* 基因序列及同源性进化树比对结果表明,15个扩增片段大小均为 2 827 bp,相互间同源性为 98.9%~100%;与其他 PRV 参考毒株的 *gB* 基因同源性为 96.7%~100%;其中与美国 Kaplan 毒株(登录号:JF797218)关系最远,同源性为 96.7%;与 JS-2 012 株(登录号:KP257591)、HN1201 株(登录号:KP722022)相对较近,同源性约为 100%。核苷酸与 Bartha 疫苗株(登录号:JF797217)相比,在 2 474~2 476 位点均出现的插入(CCG),在第 2 523~2 531 均出现 9 个碱基的缺失(GGCGGGGC);氨基酸与 Bartha 疫苗株(登录号:JF797217)相比,JXJA/CH/2017、JXXY/CH/2017、JXFZ/CH/2017、JXFZ/CH/2018、JXYT/CH/2018 毒株均在第 718 位氨基酸 R→C 的突变。在将本试验获得的 PRV *gB* 全基因序列与 14 株其他国家或地区来源的 PRV 毒株的 *gB* 基因序列进行进化分析,结果显示本研究的 15 个毒株与 JS-2012(登录号:KP257591)、HN1201(登录号:KP722022)、Ea(登录号:KU315430)等其它大部分中国分离株都在同一个进化分支;而 Bartha(登录号:JF797217)、Kaplan(登录号:JF797218)等国外分离株在不同的进化分支(图4)。

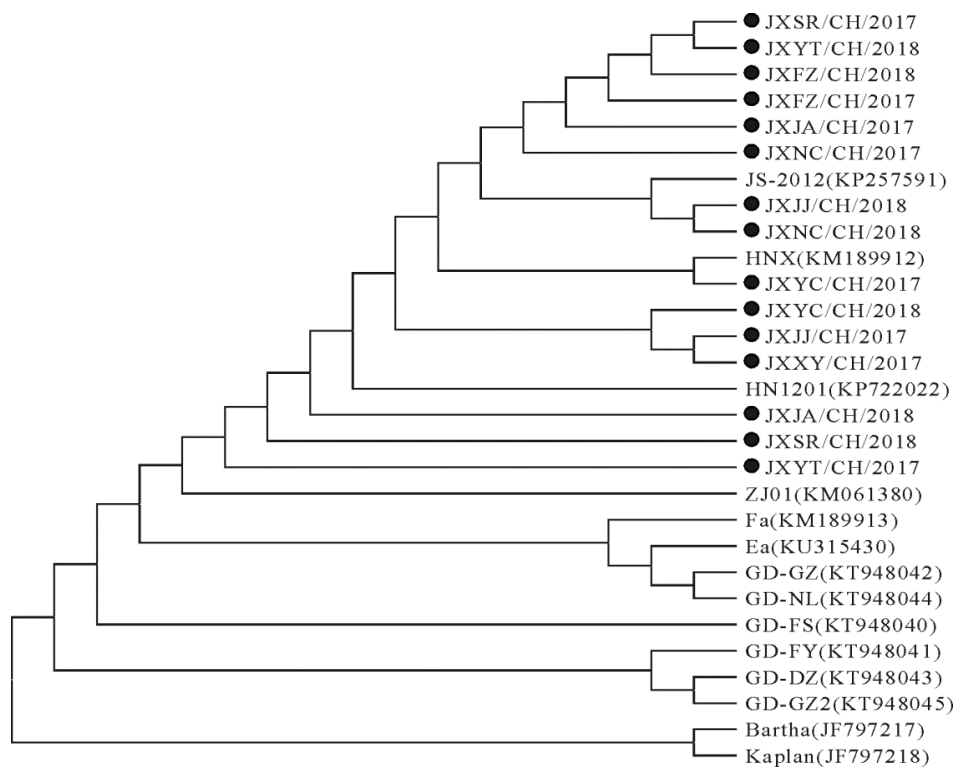


图4 不同国家/地区 PRV *gB* 基因序列进化树

Fig.4 Phylogenetic tree based on the complete *gB* gene nucleotide sequences of PRV strains from different countries/areas

2.3.2 *gE* 基因核苷酸同源性及进化树分析 *gE* 基因序列及同源性进化树比对结果表明,15个扩增片段大小均为 1 065 bp,相互间同源性为 99.1%~100%;与其他 PRV 参考毒株的 *gE* 基因的同源性 98.1%~100%;其中与美国 Bartha 毒株(登录号:JF797217)关系最远,同源性为 98.1%;与 JS-2012(登录号:KP257591)、HNX(登录号:KM189912)等相对较近,同源性约为 99.1%~100%。核苷酸与中国新分离株 HNX(登录号:KM189912)相比,JXJA/CH/2017、JXJA/CH/2018、JXNC/CH/2017、JXNC/CH/2018 毒株均在第 1477~1479 位点均出现的缺失(GAC),与疫苗株 Bartha(登录号:JF797217)缺失位点一致;而仅 JXSR/CH/2018 在第 841~843 均出现 3 个碱基的缺失(TAC)。将本试验获得的 PRV *gE* 全基因序列与 14 株其他国家或地区来源的 PRV 毒株的 *gE* 基因序列进行进化分析,结果显示本研究的 15 个毒株相互之间差异较大,分散于进化树的不同细分支,但与中国分离株都在同一个进化分支;而 Bartha(登录号:JF797217)、Kaplan(登录号:JF797218)等国外分离株在不同的进化分支(图5)。

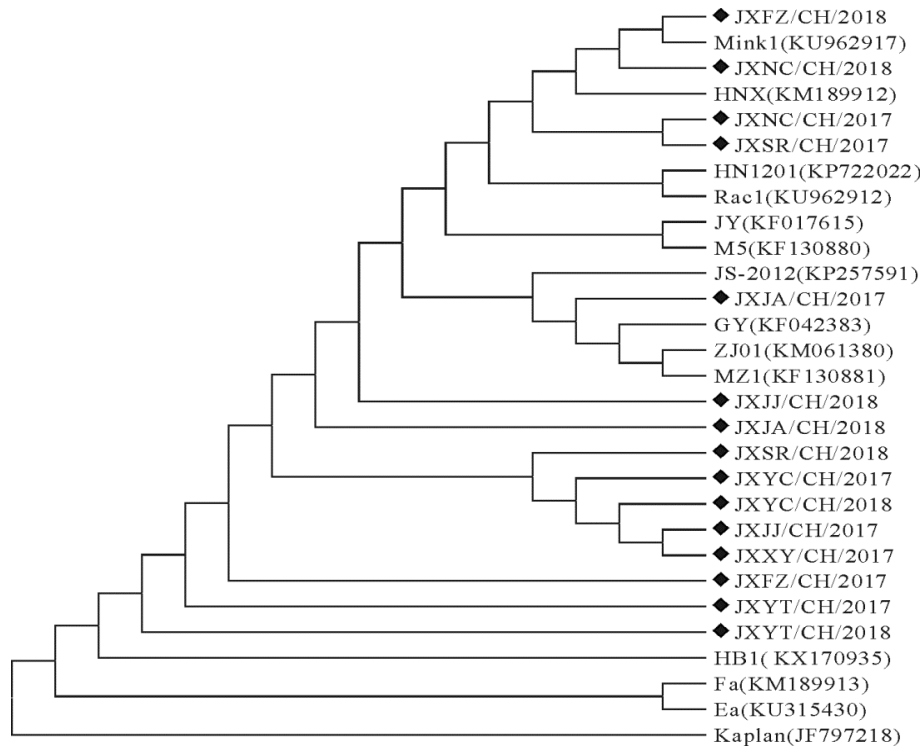
图5 不同国家/地区 PRV *gE* 基因序列进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on the complete *gE* gene nucleotide sequences of PRV strains from different countries/areas

2.3.3 *TK* 基因核苷酸同源性及进化树分析 *TK* 全基因序列及同源性进化树比对结果表明, 15 个扩增片段大小均为 1 795 bp, 相互间同源性为 100%; 与其他 PRV 毒株的 *gE* 基因的同源性 99.1%~100%; 其中与中国 GD-YJ 毒株(登录号: KF042383)关系最远, 同源性为 99.1%。将本试验获得的 PRV *TK* 全基因序列与 14 株其他国家或地区来源的 PRV 毒株的 *TK* 基因序列进行进化分析, 结果显示本研究的 15 个毒株差相互之间差异较大, 与 *gE* 基因一致; 但并没有 *gB*、*gE* 基因有明显的分支差别(图 6)。

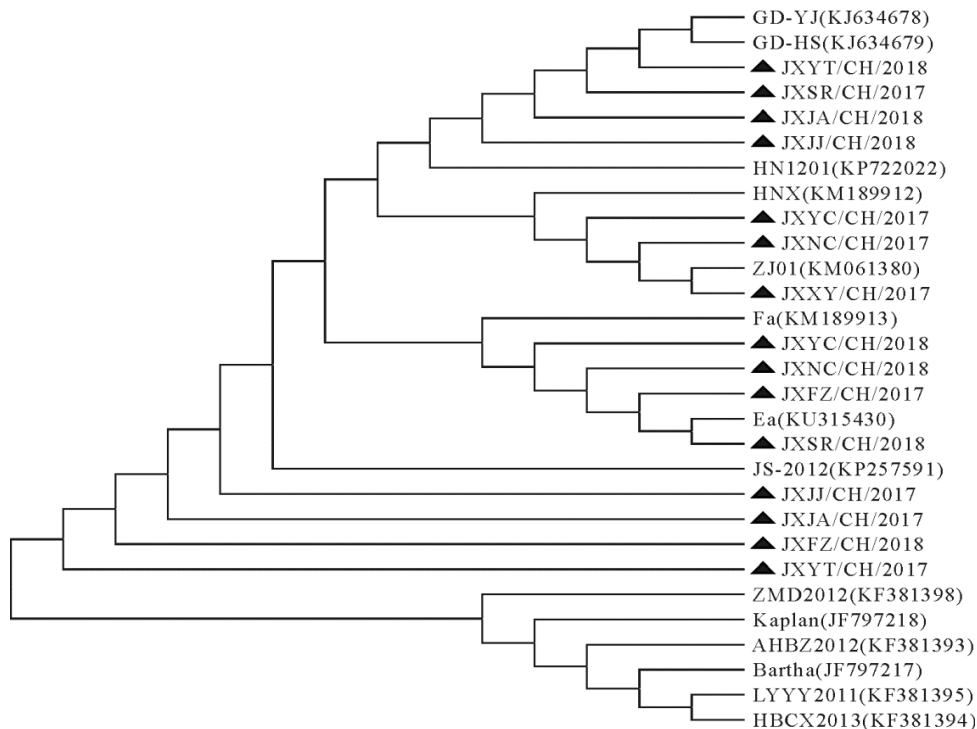
图6 不同国家/地区 PRV *TK* 基因序列进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on the complete *TK* gene nucleotide sequences of PRV strains from different countries/areas

3 结论与讨论

近年来,利用PRV基因缺失活疫苗或灭活疫苗,部分规模化猪场实施PR净化工作,使我国大部分规模化猪场PR得到有效的控制,发病率降低显著。但自2011年底以来,我国多省市爆发PRV疫情,江西省部分地区规模化猪场PRV野毒感染压力大^[10],使原本已控制的PR带来严峻的挑战^[2]。根据病原检测结果表明,2017—2018年,伪狂犬病毒野毒阳性率显著上升,结果表明江西省野毒感染在不断扩散。为了进一步探究伪狂野毒抗体与病原阳性之间的关系,本课题组还对江西2017—2018年的1662份规模化猪场的血清进行gE抗体检测,检测结果表明,伪狂gE抗体阳性率由2017年的37.4%上升到2018年的39.4%,这与邹敏等^[3]的研究结果一致。伪狂野毒抗体水平和抗原检出阳性率都呈上升趋势,但与野毒抗体阳性率高与病原阳性率低相悖。其中一个原因是由于伪狂犬病毒的组织嗜性,易在三叉神经节和扁桃体富集繁殖,引起灶性坏死,往往在高密度的免疫和高水平的中和抗体的双重夹击下,被封锁在三叉神经节内无法排毒散毒,因此不容易被检测出来;另一个原因可能是感染伪狂野毒的猪只大部分病原含量较低,不易检出^[11]。并且伪狂犬野毒通过改变抗原性,逃避机体免疫系统,使伪狂野毒毒株可以在猪只拥有高的抗体水平也可以被感染^[12]。疫苗免疫虽可有效减轻野毒感染猪的发病程度,甚至不表现临床症状和临床损害,但是猪只并未能清除体内的伪狂病毒。

多个试验证明,与传统的伪狂犬病毒如Ea株(登录号:KU315430)、Fa株(登录号:KM189913)相比,多个伪狂犬病新分离毒株如HNX株(登录号:KM189912)、ZJ01株(登录号:KM061380)、HeN1(登录号:KP098534)等发生了致病性增强和抗原变异,当猪群内有大量病原循环传播时,可突破传统疫苗的临床保护,使猪群发生感染,野毒抗体转阳甚至出现严重的临床问题^[13]。疫苗免疫失败可能与伪狂病毒抗原变异和毒力增强的关键基因gB、gE和TK有关。本研究挑选15株PRV阳性样品,分别对15株PRV的gB、gE和TK全基因序列进行测序分析。结果显示,gB、gE与现有疫苗毒株的核苷酸序列同源性不高,发生变异的可能性较大。PRV gB蛋白的优势抗原表位区分别位于第59~126位氨基酸,第214~289位氨基酸和第507~734位氨基酸3个区域,其中还有2个不连续的抗原表位区位于第540~646位氨基酸内。在本研究中,PRV JXYT/CH/2018株与Kaplan株(登录号:JF797218)比对,gB蛋白第536~718位氨基酸之间存在氨基酸的改变,结果表明,gB蛋白存在的变异,可能导致这些蛋白结构发生改变,进而引起病毒的中和能力和入侵能力发生改变^[14-15]。

以本研究的15株PRV的与HNX(登录号:KM189912)、Fa(登录号:KM189913)、Bartha(登录号:JF797217)、Kaplan(登录号:JF797218)、Becker(登录号:JF797219)、JS-2012株(登录号:KP257591)等gB/gE/TK基因序列进行比对分析,结果显示江西PRV毒株与分离毒株Fa(登录号:KM189913)和HNX株(登录号:KM189912)在同一个进化分支,而国外分离株Bartha(登录号:JF797217)、Kaplan株(登录号:JF797218)在另外一个分支,且中国分支中存在多个亚分支。Henderson等^[16]使用PRV强毒株和无免疫标记的疫苗毒株接种入羊体内,后在子代病毒检测到有毒力标记的疫苗毒株,表明了2株病毒的基因组出现了重组,进一步的试验结果表明重组病毒对羊的毒力增加。Dangler等^[17]将2种PRV分别经3种方式(滴鼻感染、肌肉注射、滴鼻感染+肌肉注射)接种猪只,都能够得到重组病毒,说明PRV在体内可能会出现自然重组现象。中国猪伪狂犬病毒毒株抗原基因和毒力基因的多样性及伪狂病毒的自然重组现象,为防控伪狂犬病毒带来了巨大的压力。

参考文献:

- [1] Yu X, Zhou Z, Hu D, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China[J]. Emerg Infect, 2014, 20(1): 102-104.
- [2] Gu J, Hu D, Peng T, et al. Epidemiological investigation of pseudorabies in Shandong Province from 2013 to 2016[J]. Trans-bound Emerg, 2018, 65(3): 890-898.
- [3] 邹敏, 杨旭兵, 郑辉, 等. 2012—2013年我国部分地区猪伪狂犬病流行病学调查[J]. 中国动物检疫, 2015(4): 1-5.
Zou M, Yang X B, Zheng H, et al. Epidemiological survey of pseudorabies in some areas in China from 2012 to 2013[J]. China Animal Health Inspection, 2015(4): 1-5.
- [4] Nauwynck H, Glorieux S, Favoreel H, et al. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in

- cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract[J]. *Vet Res*, 2007, 38(2): 229-241.
- [5] Li X, Yang F, Hu X, et al. Two classes of protective antibodies against pseudorabies virus variant glycoprotein B: Implications for vaccine design[J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(12): e1006777.
- [6] Hu R M, Zhou Q, Song W B, et al. Novel pseudorabies virus variant with defects in TK, gE and gI protects growing pigs against lethal challenge[J]. *Vaccine*, 2015, 33(43): 5733-5740.
- [7] 潘慧, 李艳华, 向柯宇, 等. 猪伪狂犬病病毒流行毒株 gE/gI 缺失突变株的构建及生物学特性研究[J]. 华南农业大学学报, 2018(2): 9-15.
- Pan H, Li Y H, Xiang K Y, et al. Construction and biological characteristics of a gE/gI deletion mutant of porcine pseudorabies virus epidemic strain[J]. *Journal of South China Agriculture University*, 2018(2): 9-15.
- [8] Lei J L, Xia S L, Wang Y, et al. Safety and immunogenicity of a gE/gI/TK gene-deleted pseudorabies virus variant expressing the E2 protein of classical swine fever virus in pigs[J]. *Immunol Lett*, 2016, 174: 63-71.
- [9] 吴发兴, 郑辉, 亓传德, 等. 猪伪狂犬病病毒 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 动物医学进展, 2009(5): 5-9.
- Wu F X, Zheng H, Qi C D, et al. Establishment and application of PCR assay for detection of pseudorabies virus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2009(5): 5-9.
- [10] 李海琴, 康昭凤, 谭美芳, 等. 2016—2017年江西省部分地区规模化猪场猪伪狂犬病血清流行病学调查[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(5): 1037-1041.
- Li H Q, Kang Z F, Tan M F, et al. A seroepidemiological survey of porcine pseudorabies virus in some large scale pig farms from 2016—2017 in Jiangxi Province[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2018, 40(5): 1037-1041.
- [11] Yang Q Y, Sun Z, Tan F F, et al. Pathogenicity of a currently circulating Chinese variant pseudorabies virus in pigs[J]. *World J Virol*, 2016, 5(1): 23-30.
- [12] Liu Y, Rui P, Ma R, et al. Innate immune evasion mechanisms of pseudorabies virus[J]. *Bingdu Xuebao*, 2015, 31(6): 698-703.
- [13] 余腾. 猪伪狂犬病病毒(HNX株)的生物学特性与比较基因组学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Yu T. Biological characteristics and comparative genomics analysis of pseudorabies virus (HNX Strain) [D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2016.
- [14] Wang Y, Qiao S, Li X, et al. Molecular epidemiology of outbreak-associated pseudorabies virus (PRV) strains in central China[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(3): 401-409.
- [15] Tong W, Liu F, Zheng H, et al. Emergence of a pseudorabies virus variant with increased virulence to piglets[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 181(3/4): 236-240.
- [16] Katz J B, Henderson L M, Erickson G A. Recombination in vivo of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains[J]. *Vaccine*, 1990, 8(3): 286-288.
- [17] Dangler C A, Deaver R E, Kolodziej C M. Genetic recombination between two strains of Aujeszky's disease virus at reduced multiplicity of infection[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(2): 295-299.