

新生水貂肠炎病毒母源抗体消长规律及其亚单位疫苗免疫效果研究

吴洪超^{1§}, 王凌霄^{1§}, 霍宁宁¹, 丁航天¹, 陈亚磊¹, 刁向锋¹,
刘友财², 刘玉秀^{1*}, 田克恭^{1*}

(1. 国家兽用药品工程技术研究中心, 洛阳 471003; 2. 威海市文登区泽库畜牧兽医工作站, 威海 264400)

摘要: 本研究旨在探索水貂肠炎病毒(mink enteritis virus, MEV)的母源抗体消长规律及其亚单位疫苗免疫效果。以免疫母貂所生仔貂为研究对象, 采集 21、30、45、60 日龄仔貂血清, 测定水貂病毒性肠炎母源抗体 HI 效价(MEV HI); 选取 25 只 47~52 日龄健康水貂接种制备 MEV 基因工程亚单位疫苗, 免疫前后 14 d 采血测定 MEV HI 效价; 免疫后 14 d 进行水貂肠炎病毒攻毒临床症状观察, 并测定粪便 HA 效价; 攻毒后 14 d 对濒死和存活水貂安乐死, 采集十二指肠、空肠和回肠进行病理组织学观察和免疫组化检测。结果显示, 免疫母貂所产仔貂的 MEV HI 效价随着日龄的增加逐渐降低, 在 21 日龄时较高, 45 日龄时少部分仔貂 MEV HI 效价 $<1:32$, 60 日龄时大部分仔貂 HI 效价 $\leq 1:4$; 使用制备合格疫苗免疫后 14 d 对照组水貂的 MEV HI 效价均不高于 $1:4$, 免疫组 MEV HI 效价升高至 $1:64 \sim 1:512$; 攻毒保护试验表明, 免疫组水貂 100% 抵抗水貂肠炎病毒强毒的攻击, 水貂的精神、饮食、粪便等均未见异常, 且攻毒后粪便 HA 效价为 $1:8 \sim 1:16$; 病理组织学和免疫组化检测结果表明, MEV 基因工程亚单位疫苗能够很好地阻止病毒在肠黏膜上皮细胞的复制和对肠黏膜上皮细胞的损伤。因此, 免疫母貂所生仔貂 21 日龄时体内抗体效价最高, 制备的疫苗免疫 50 日龄左右的水貂时能够突破母源抗体干扰并产生高水平的抗体, 能够抵抗水貂肠炎病毒强毒株的攻击。

关键词: 水貂病毒性肠炎; 母源抗体消长规律; 疫苗; 免疫效力; 攻毒试验

中图分类号: S858.92

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2020.11.034

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



The Dynamic of Maternal Antibody Against Enteritis Virus in Newborn Minks and Immune Efficacy of the Subunit Vaccine

WU Hongchao^{1§}, WANG Lingxiao^{1§}, HUO Ningning¹, DING Hangtian¹, CHEN Yalei¹,
XI Xiangfeng¹, LIU Youcai², LIU Yuxiu^{1*}, TIAN Kegong^{1*}

(1. National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang 471003, China;

2. Zeku Animal Husbandry and Veterinarian Station,

Wendeng District, Weihai 264400, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the dynamic of mink enteritis virus (MEV) maternal antibody and the immune effects of subunit vaccines. The offspring of immunized female mink were studied, serum of 21, 30, 45 and 60 days old mink were collected to determine the HI titer of maternal antibody of MEV. 25 healthy minks aged 47~52 days were selected to be

收稿日期: 2020-04-20

基金项目: 河洛英才计划项目“新型兽用生物制品研发及产业化”

作者简介: 吴洪超(1988-), 男, 河南郑州人, 硕士, 研究方向: 宠物及毛皮经济动物疫苗, E-mail: wu2008213@126.com

王凌霄(1991-), 女, 河南濮阳人, 本科, 研究方向: 宠物及毛皮经济动物疫苗, E-mail: 18336774557@163.com

吴洪超与王凌霄对本文具有同等贡献, 并列第一作者

* 通信作者: 刘玉秀(1985-), 女, 山西兴县人, 博士, 副研究员, 研究方向: 宠物及毛皮经济动物疫苗, E-mail: qingqingyuxiu1@163.com

田克恭(1964-), 男, 山西万荣县人, 研究员, 研究方向: 动物疫病诊断及防控技术, E-mail: vetvac@126.com

inoculated with MEV genetic engineering subunit vaccine, and then blood samples were collected 14 d before and after immunization to determine MEV HI titer. The clinical symptoms and the titer of feces HA of mink enteritis virus were observed 14 d after immunization. Dying and surviving minks were euthanized 14 d after challenge, the duodenum, jejunum and ileum were collected for histopathological observation and immunohistochemical detection. The results showed that the MEV HI of the offspring of immunized female mink decreased gradually with the increase of day age, it was higher at 21 d of age, the MEV HI titer of some minks at 45 d was $<1:32$ and $\leq 1:4$ at 60 d. The MEV HI titer of the control mink was not higher than $1:4$ on 14 d after the preparation of qualified vaccine, while it was increased to $1:64 \sim 1:512$ in immune group. Challenge protection tests showed that the immunized minks were 100% resistant to the attack of mink enteritis virus, and there was no abnormality in the mink's mental state, diet and feces, the HA titer of feces matter after challenge was $1:8 \sim 1:16$. Histopathological and immunohistochemical tests showed that MEV genetic engineering subunit vaccine could well prevent the replication of virus in intestinal mucosal epithelial cells and the damage to intestinal epithelial cells. Therefore, the antibody titer was highest at 21 day-old after immunizing female mink, and the prepared vaccine could break through maternal antibody interference and produce high levels of antibodies when it immunized minks at about 50 d of age, and could resist the attack of mink enteritis virus virulent strain.

Key words: mink viral enteritis; dynamic of maternal antibody; vaccine; immune efficacy; challenge test

水貂病毒性肠炎(mink viral enteritis, MVE)是由水貂肠炎病毒(mink enteritis virus, MEV)感染引起的高度接触性传染病,发病水貂主要表现为剧烈腹泻、呕吐等^[1-2],该病具有较高的发病率和死亡率^[3]。随着毛皮动物养殖业的迅速发展,该病也经常出现^[4-6],给中国水貂养殖业造成了巨大经济损失^[7]。

虽然在 20 世纪 90 年代水貂病毒性肠炎灭活疫苗已经问世,并有效控制了 MEV 的流行^[3],但是临床上仍有许多免疫后的水貂感染 MEV 的病例报道^[5-6,8-9]。导致免疫失败的因素很多,其中母源抗体的干扰是不容忽视的原因之一^[10-11]。母源抗体对灭活疫苗干扰的机制是母源抗体与疫苗中抗原形成免疫复合物,诱导 B 细胞受体和 Fc γ R II B 结合形成负调节的抑制信号,或形成免疫复合物,经抗原递呈细胞处理后,Fc R 介导免疫复合物的吞噬和清除,从而抑制新生动物机体产生针对野毒和疫苗抗原的抗体^[12]。为此,本试验研究了养殖场新生水貂的病病毒性肠炎母源抗体的消长规律,同时用 50 日龄左右水貂评价了水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)的免疫效果,为该疫苗临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 Sf9 细胞、表达水貂肠炎病毒 VP2 蛋白的重组杆状病毒 MEV-VP2 株、攻毒用水貂肠炎病毒 JL 株均由普莱柯生物工程股份有限公司保存。

1.1.2 试验动物 21、30、45、60 日龄健康水貂,用于研究水貂病毒性肠炎母源抗体的消长规律;47~52 日龄健康水貂,用于疫苗评价,均购自洛阳市周边水貂养殖场。经 RT-PCR/PCR 检测,犬瘟热病毒(canine distemper virus, CDV)和水貂肠炎病毒(MEV)核酸均为阴性。

1.1.3 主要试剂 昆虫细胞无血清培养基购自壹生科(深圳)有限公司;氢氧化铝胶佐剂购自 SPI 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 KPL 公司;AEC 显色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;水貂肠炎病毒血凝抑制试验抗原、水貂肠炎病毒阳性血清、磷酸盐缓冲液(0.015 mol/L, pH 6.5)、阿氏液、MEV 单克隆抗体均购自普莱柯生物工程股份有限公司。猪红细胞采集自健康猪前腔静脉血,保存于 10 倍体积以上的阿氏液中。

1.2 方法

1.2.1 水貂病毒性肠炎母源抗体消长规律测定

母貂配种前单剂量肌肉注射水貂病毒性肠炎灭活疫苗,1 mL/只,母貂配种后在其所产仔貂中,分别在 21、30、45、60 日龄时,随机挑选 20 只仔貂进行采血,分离血清,经 56 °C 灭活 30 min 后,测定水貂肠炎病毒血凝抑制(HI)抗体效价。

1.2.2 水貂肠炎病毒血凝抑制(HI)效价测定

操作步骤参照文献^[13]进行,并做适当改进。在微量血凝反应板每行的 2~12 孔各加入 PBS(0.015 mol/L, pH 6.5)25 μ L,然后吸取被检血清或阳性血清 25 μ L 分别加入第 1 孔和第 2 孔,第 2 孔混匀后吸取 25 μ L 加入第 3 孔,依次 2 倍稀释至第 10 孔,从第 10 孔吸取 25 μ L 弃去;在第 1 孔至第 11 孔每孔均加入 8 单位抗原 25 μ L,第 12 孔加入 PBS(0.015 mol/L, pH 6.5)25 μ L 作红细胞对照;混匀后,37 °C 作用 30 min;每孔加入 1% 猪红细胞悬液 25 μ L,混匀,2~8 °C 作用 90 min,观察结果。以出现完全抑制红细胞凝集的血清最高稀释度为被检血清的 HI 效价。

1.2.3 水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)的制备与无菌检验 当 Sf9 细胞密度达到 $2.0 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 个/mL 时,按 0.2%~2% 的体积比接种重组杆状病毒 MEV-VP2 株,27 °C 培养 96~120 h 收获细胞培养物,5 000 r/min 离心 30 min,弃上清,细胞沉淀中加入等体积的 25 mmol/L NaHCO_3 重悬后,于 2~8 °C 条件下裂解 30 min。5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。灭活后取 9 份 VP2 蛋白液和 1 份氢氧化铝胶混合,同时按总量的 0.01% 加入硫柳汞,充分搅拌混匀,2~8 °C 保存。取样接种硫乙醇酸盐液体培养基(TG)小瓶,置 37 °C 培养 3 d,吸取培养物,接种于 2 支 TG 小管,每支 0.2 mL,1 支置 37 °C 培养,1 支置 25 °C 培养,另取 0.2 mL 接种 1 支胰酪大豆胨液体培养基(TSB)小管,置 25 °C 培养,均观察 7 d,进行疫苗的无菌检验。

1.2.4 水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)的免疫效力评价 为了评价上述制备的水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)在临床条件下对水貂的免疫效果,选取 25 只 47~52 日龄健康水貂,其中 20 只分别单剂量接种上述制备的水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源),1 mL/只,另 5 只不免疫作为对照组。免疫前和免疫后 14 d 采血测定 MEV HI 抗体效价。免疫后 14 d,从免疫水貂中选取免疫前 HI 效价不同的 5

只水貂,连同 5 只对照水貂每只灌胃感染水貂肠炎病毒 JL 株病毒液 15 mL。攻毒后连续观察 14 d,并记录水貂的临床表现,包括精神状态、食欲、粪便等。同时在攻毒前和攻毒后 3~7 d 采集粪便,测定粪便中水貂肠炎病毒的血凝(HA)效价。攻毒后对濒死水貂和攻毒后 14 d 水貂进行剖解,采集十二指肠、空肠、回肠,经 10% 福尔马林固定,按常规方法制备切片,HE 染色后显微镜下观察组织病理变化。另取制备的切片进行免疫组化检测,简要步骤为切片经马血清封闭后,滴加 MEV 单克隆抗体,37 °C 孵育 30 min, PBS 洗涤后滴加 HRP 标记羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤后滴加 AEC 显色液显色,用苏木精复染后封片,普通光学显微镜下观察。

2 结 果

2.1 水貂病毒性肠炎母源抗体消长规律

采集 21、30、45、60 日龄仔貂全血,分离血清,测定水貂肠炎病毒 HI 效价。由图 1 可知,水貂病毒性肠炎母源抗体水平随着日龄的增加逐渐降低,21 日龄时 HI 效价为 1:64~1:1 024(几何平均值为 1:388.0);30 日龄时 HI 效价下降至 1:32~1:512(几何平均值为 1:194.0);45 日龄时 HI 效价继续降至 1:8~1:256(几何平均值为 1:46.9);60 日龄时 HI 效价进一步降至 1:4~1:64(几何平均值为 1:9.8),其中 45%(9/20)仔貂的 HI 效价不高于 1:4。

2.2 水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)无菌检验结果

取制备的疫苗接种于 TG 小瓶,培养 3 d 内无细菌生长,吸取培养物接种于 TG 小管和 TSB 小管,培养 7 d 内均无细菌生长,表明制备的疫苗无菌检验合格,可用于后续的免疫效力评价。

2.3 水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)的免疫效力评价

2.3.1 血清 MEV HI 抗体产生水平 免疫前和免疫后 14 d 采血测定 MEV HI 效价。由图 2 可知,免疫前 21/25 水貂的 MEV HI 效价为 1:8~1:32,免疫后 14 d,对照组水貂的 MEV HI 效价均不高于 1:4,免疫组水貂 MEV HI 效价升高至 1:64~1:512,表明水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)能够突破母源抗体,并诱导 50 日龄左右水貂产生较高的 HI 抗体。

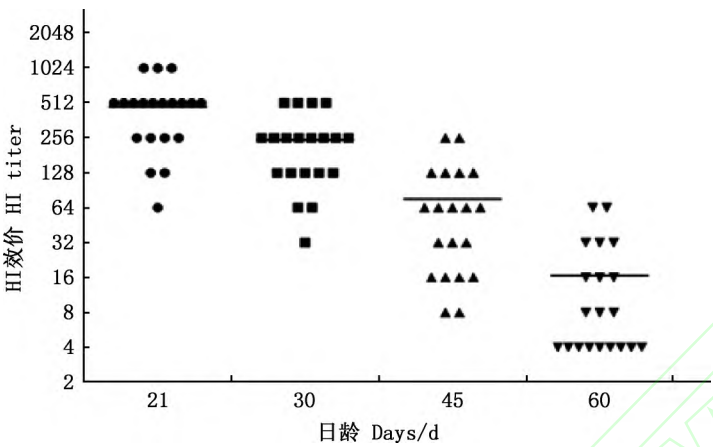


图 1 不同日龄仔貂血清 MEV HI 效价

Fig. 1 MEV HI titer of different day-old minks

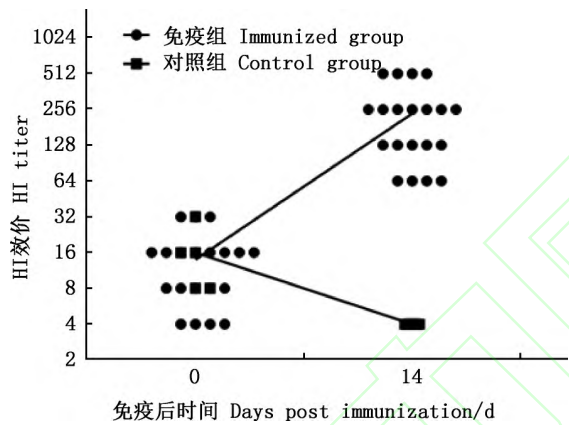


图 2 血清 MEV HI 效价测定结果

Fig. 2 The results of MEV HI titer of serum

2.3.2 水貂肠炎病毒攻毒保护试验 免疫后 14 d进行水貂肠炎病毒攻毒,由表 1 和表 2 可知,攻毒对照组 100%水貂发病,表现出水貂病毒性肠炎的典型症状,如排稀便、黏便,精神不振或沉郁,食欲减退或废绝,攻毒后 7~9 d 分别死亡 1 只水貂,攻毒后 3~5 d 粪便 HA 效价达到 1 : 128~1 : 1 024。免疫组水貂 100%抵抗水貂肠炎病毒强毒的攻击,水貂的精神、饮食、粪便等均未见异常,且攻毒后粪便 HA 效价为 1 : 8~1 : 16,表明水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)的免疫效果良好。

表 1 水貂肠炎病毒攻毒后临床观察结果

Table 1 The results of clinical observation after challenge with MEV

组别 Groups	动物编号 Number	腹泻 Diarrhea	精神不振 Depression	食欲减退 Anorexia	死亡 Died
免疫组 Immunized group	1 #	—	—	—	—
	2 #	—	—	—	—
	3 #	—	—	—	—
	4 #	—	—	—	—
	5 #	—	—	—	—
对照组 Control group	6 #	+	+	—	+
	7 #	—	+	+	—
	8 #	—	+	—	—
	9 #	+	+	—	+
	10 #	+	+	—	+

+,表示出现相应症状;—,表示未出现相应症状

+, Indicates the presence of symptoms;—, No symptoms

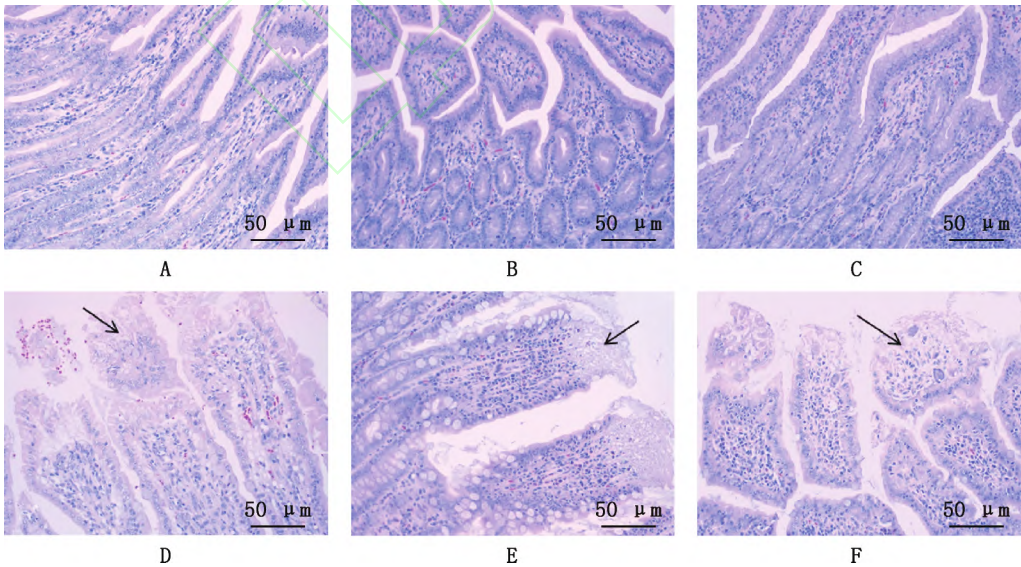
表 2 水貂肠炎病毒攻毒后粪便 HA 效价测定结果

Table 2 The fecal HA titer of minks after challenge with MEV

组别 Groups	动物编号 Number	时间/d					
		0	3	4	5	6	7
免疫组 Immunized group	1#	<1:8	1:8	1:16	1:8	1:8	<1:8
	2#	<1:8	<1:8	1:8	<1:8	<1:8	<1:8
	3#	<1:8	1:16	1:8	<1:8	<1:8	<1:8
	4#	<1:8	1:8	1:8	<1:8	<1:8	<1:8
	5#	<1:8	1:8	1:8	1:8	<1:8	<1:8
对照组 Control group	6#	<1:8	1:512	1:1 024	1:1 024	1:512	1:128
	7#	<1:8	1:32	1:128	1:128	1:16	<1:8
	8#	<1:8	1:16	1:128	1:32	1:8	<1:8
	9#	<1:8	1:64	1:1 024	1:1 024	1:256	1:256
	10#	<1:8	1:64	1:512	1:512	1:512	1:256

2.3.3 病理组织学和免疫组化检测结果 攻毒后对濒死和攻毒后 14 d 存活水貂安乐死,采集十二指肠、空肠、回肠,经福尔马林固定后进行病理组织学观察和免疫组化检测。由图 3、4 可知,免疫组水貂十二指肠、空肠、回肠均未见明显病理变化(图 3A、3B、3C),免疫组化检测十二指肠、空肠、回肠均为 MEV 阴性(图 4A、4B、4C);攻毒对照组水貂十二指肠可见黏膜上皮细胞少量脱落(图 3D),空肠可

见肠绒毛上段黏膜上皮及固有层细胞脱落坏死(图 3E),回肠可见黏膜上皮细胞少量脱落轻微坏死(图 3F),免疫组化检测十二指肠、空肠、回肠均为 MEV 阳性(图 4D、4E、4F)。表明水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)免疫后能够很好地阻止病毒在肠黏膜上皮细胞的复制和对肠黏膜上皮细胞的损伤。



A~C,免疫组水貂十二指肠、空肠、回肠;D~F,攻毒对照组水貂十二指肠、空肠、回肠。下同

A~C,Duodenum,jejunum and ileum of minks in immunized group;D~F,Duodenum,jejunum and ileum of minks in control group. The same as below

图 3 水貂肠道病理组织学观察结果(200×)

Fig. 3 Histopathological observation of mink intestine challenged with MEV (200×)

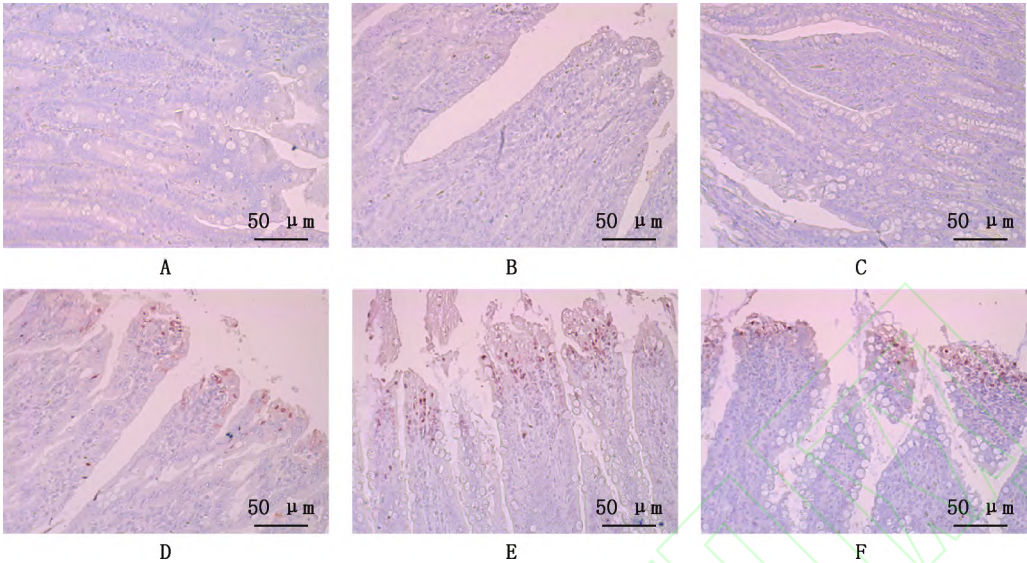


图 4 水貂肠道免疫组化检测结果(200×)

Fig. 4 Immunohistochemical detection of MEV in mink intestine (200×)

3 讨 论

水貂病毒性肠炎是影响水貂养殖业的重要疾病之一,目前主要采用接种疫苗来防控该病,但是接种疫苗的时间过早,仔貂母源抗体会影响到疫苗的免疫效果,接种疫苗时间过晚,仔貂母源抗体水平偏低,仔貂在免疫空窗期,容易感染水貂肠炎病毒^[8-9]。因此,在尽可能缩短免疫空窗期的情况下,降低母源抗体对免疫接种的影响,提高疫苗的免疫效果是避免病毒感染导致仔貂伤亡的关键。

母源抗体可使幼龄动物在其出生后一段时间在环境微生物侵袭时获得保护^[14],但是母貂配种前血清中的抗体水平、窝产仔数量、仔貂通过初乳对母源抗体的吸收情况等因素,都会影响仔貂血清中母源抗体水平和母源抗体的持续时间。

考虑到国内水貂场的免疫程序相近,即种貂配种前 1 个月接种疫苗,本研究以洛阳水貂场的仔貂为研究对象,研究了水貂病毒性肠炎的母源抗体消长规律,发现 45 日龄时,100%(20/20)仔貂的水貂病毒性肠炎母源抗体 HI 效价不低于 1:8,60 日龄时,水貂病毒性肠炎母源抗体效价进一步降低,其中 55%(11/20)仔貂的水貂病毒性肠炎母源抗体 HI 效价为 1:8~1:64,45%(9/20)仔貂的水貂病毒性肠炎母源抗体 HI 效价不高于 1:4。因此,45~60 日龄是仔貂免疫水貂病毒性肠炎疫苗的合适时机。钱毓斌等^[10]研究也显示 50~60 日龄的仔貂母源抗体水平已经处于较低水平,中和疫苗抗原的能力较弱,不至于导致免疫效果降低或免疫失败。虽然国

内水貂场的免疫程序相近,但是不同水貂场的饲养管理水平、窝产仔数、仔貂成活率仍然存在差异,会导致仔貂的母源抗体水平参差不齐,因此建议各场根据实际情况制定适宜的免疫程序。

王洋等^[15]通过比较原核表达的 MEV NS1 蛋白和 VP2 蛋白的免疫原性,证实 VP2 蛋白更适合亚单位疫苗的制备。Dalsgaard 等^[16]在重组豇豆花叶病毒表达 MEV VP2 抗原表位表明,免疫水貂后能够抵抗强毒的攻击。Langeveld 等^[17]也研制了具有良好免疫效果的合成肽疫苗和表位疫苗。由于利用杆状病毒表达系统制备的病毒样颗粒(VLPs)不含病毒基因组,杆状病毒也不会感染哺乳动物,接种动物后更加安全,同时 VLPs 具有与全病毒相似的免疫原性,因此使用 VLPs 制备疫苗受到人们的青睐,并展开了广泛研究,其中人乳头瘤病毒疫苗已经研制成功^[18]。Christensen 等^[19]于 1994 年使用杆状病毒表达系统制备了 MEV VLPs,但是可能由于早期的技术条件不成熟而没有推广应用。倪佳等^[20-21]使用杆状病毒表达系统制备了 MEV VLPs,通过免疫日本大耳白兔,证实其具有良好的免疫原性。本研究结合水貂场仔貂通常在 45~50 日龄断奶分窝的生产实际,用 50 日龄左右水貂研究了制备的水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)的免疫效力。结果免疫后 14 d 水貂血清 MEV HI 效价升高至 1:64~1:512,表明水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)能够突破母源抗体诱导 50 日龄左右水貂产生较高的 HI 抗体。

攻毒后对照组水貂表现出与国内外学者研究结果相同的水貂病毒性肠炎典型症状,如排稀便、黏便,精神不振甚至沉郁,食欲减退甚至废绝等^[2,22-24],组织病理学检测观察到肠上皮细胞坏死、脱落等病理变化,与 MEV 组织毒感染水貂后的病理变化相同^[25],而免疫组水貂能够有效抵抗强毒株的攻击。免疫攻毒试验结果表明水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)对 50 日龄左右水貂具有良好的免疫效力,因此在 50 日龄左右接种该疫苗,既可以缩短仔貂的免疫空窗期,又可以减少母源抗体对免疫接种的干扰。

4 结 论

本研究通过研究水貂病毒性肠炎的母源抗体消长规律和水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)对 50 日龄左右水貂的免疫效力,证实 45~60 日龄是仔貂免疫水貂病毒性肠炎疫苗的合适时机。为临床上科学制定水貂免疫程序提供了参考依据,同时也为水貂病毒性肠炎基因工程亚单位疫苗(杆状病毒源)的临床应用奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] ZHANG Q M, WANG Y P, JI Q, et al. Selection of antiviral peptides against mink enteritis virus using a phage display peptide library[J]. *Current Microbiology*, 2013, 66(4): 379-384.
- [2] REYNOLDS H A. Some clinical and hematological features of virus enteritis of mink[J]. *Canadian Journal of Comparative Medicine Revue Canadienne De Medecine Comparee*, 1969, 33(2): 155.
- [3] HUNDT B, BEST C, SCHLAWIN N, et al. Establishment of a mink enteritis vaccine production process in stirred-tank reactor and wave bioreactor microcarrier culture in 1-10 L scale[J]. *Vaccine*, 2007, 25(20): 3987-3995.
- [4] WANG J K, CHENG S P, YI L, et al. Detection of mink enteritis virus by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 187(2): 401-405.
- [5] 郭万里. 水貂肠炎细小病毒二联灭活疫苗的研制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- GUO W L. Development of divalent inactivated vaccine for mink enteritis parvovirus[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [6] 朱翔宇, 鲁荣光, 王 洋, 等. 水貂细小病毒 MEV-LT18 株的分离鉴定及遗传进化分析[J]. *中国兽医学*

报, 2020, 40(2): 278-284.

ZHU X Y, LU R G, WANG Y, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of mink enteritis virus MEV-LT18 [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40(2): 278-284. (in Chinese)

- [7] 王 洋. 水貂肠炎细小病毒在体内分布规律及相关细胞因子的变化[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.

WANG Y. Cytokines changes and viral distribution *in vivo* of mink infection with mink enteritis virus[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016. (in Chinese)

- [8] 左 静. 水貂肠炎细小病毒抗原性分析及其特异性马源抗体的制备[D]. 长春: 吉林大学, 2011.

ZUO J. Antigen analysis of mink enteritis parvovirus and preparation of specific horse antibodies against mink enteritis parvovirus[D]. Changchun: Jilin University, 2011. (in Chinese)

- [9] 刁非非. 水貂肠炎细小病毒分离株的分子生物学特性及其致病性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.

DIAO F F. Molecular characterization of mink enteritis virus isolated from mink and its pathogenesis in mink[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2017. (in Chinese)

- [10] 孟晓琴, 曹世祯, 卓春花, 等. 母源抗体对猪瘟疫苗免疫效果的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(1): 40-41.

MENG X Q, CAO S Z, ZHUO C H, et al. The effect of maternal antibody on the immune efficacy of classical swine fever vaccine[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 49(1): 40-41. (in Chinese)

- [11] 程世鹏, 吴 威, 闫喜军. 毛皮动物主要传染病免疫失败原因分析及防控措施[J]. *特产研究*, 2004, 4: 46-49.

CHENG S P, WU W, YAN X J. The analysis of immunological defeat reason and measurement of prevention and control on the major infectious diseases of fur animal[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2004, 4: 46-49. (in Chinese)

- [12] 夏业才, 陈光华, 丁家波. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.

XIA Y C, CHEN G H, DING J B. Science of Veterinary Biologicals[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018. (in Chinese)

- [13] JIN H L, XIA X Z, LIU B, et al. High-yield production of canine parvovirus virus-like particles in a baculovirus expression system[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(3): 705-710.

- [14] 张评洪, 任 涛, 唐应华, 等. 免疫程序与母源抗体对 H5 禽流感疫苗免疫鸭和鹅 H1 抗体水平的影响[J].

中国兽医科技,2005,8:57-61.

ZHANG P H,REN T,TANG Y H,et al. Influence of immunization programs and maternal antibody upon HI antibody levels of ducks and geese immunized with H5 AIV vaccines[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*,2005,8:57-61. (in Chinese)

[15] 王 洋,牛登云,刘 昊,等. 水貂细小病毒 NS1 与 VP2 蛋白的原核表达及免疫原性分析[J]. *中国畜牧兽医*,2016,43(6):1630-1634.

WANG Y,NIU D Y,LIU H,et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of mink parvovirus NS1 and VP2 protein[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*,2016,43(6):1630-1634. (in Chinese)

[16] DALSGAARD K,UTTENTHAL S,JONES T D,et al. Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease[J]. *Nature Biotechnology*,1997,15(3):248-252.

[17] LANGEVELD J P M,KAMSTRUP S,UTTENTHAL A,et al. Full protection in mink against mink enteritis virus with new generation canine parvovirus vaccines based on synthetic peptide or recombinant protein[J]. *Vaccine*,1995,13(11):1033-1037.

[18] KOST T A,KEMP C W. Fundamentals of baculovirus expression and applications[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*,2016,896:187-197.

[19] CHRISTENSEN J,ALEXANDERSEN S,BLOCH B,et al. Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system; A recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink[J]. *Journal of General Virology*,1994,75(1):149-155.

[20] 倪 佳. 表达水貂肠炎病毒 VP2 蛋白的重组杆状病毒的构建及其免疫原性分析[D]. 北京:中国农业科学院,2011.

NI J. Generation of recombinant baculovirus expressing VP2 protein of mink enteritis virus and analysis of its immunogenicity in a rabbit model[D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences,2011. (in Chinese)

[21] 倪 佳,张 蕾,柴秀丽,等. 水貂肠炎病毒 VP2 基因在昆虫杆状病毒表达系统中的表达[J]. *中国畜牧兽医*,2011,38(9):97-100.

NI J,ZHANG L,CHAI X L,et al. Expression of VP2 gene of mink enteritis virus in baculovirus expression system[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*,2011,38(9):97-100. (in Chinese)

[22] 谭婷婷. 水貂细小病毒的分离鉴定及卵黄抗体的制备[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2010.

TAN T T. Isolation, identification of mink enteritis virus and preparation of immunoglobulin[D]. Harbin:Northeast Forestry University,2010. (in Chinese)

[23] MAO Y,WANG J,HOU Q,et al. Comparison of biological and genomic characteristics between a newly isolated mink enteritis parvovirus MEV-LHV and an attenuated strain MEV-L[J]. *Virus Genes*,2016,52(3):388-396.

[24] 谭 斌,陈微晶,武 华. 致病性水貂肠炎病毒 MEV-ZJ1 株的分离与鉴定[J]. *中国畜牧兽医*,2011,38(2):149-151.

TAN B,CHEN W J,WU H. Isolation and identification of pathogenic mink enteritis virus MEV-ZJ1 strain[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*,2011,38(2):149-151. (in Chinese)

[25] REYNOLDS H A. Pathological changes in virus enteritis of mink[J]. *Canadian Journal of Comparative Medicine Revue Canadienne De Medecine Comparee*,1970,34(2):155-163.

(责任编辑 田秀芝)