

不同猪源脑心肌炎病毒的分离、鉴定 和全基因组序列分析

常洪涛¹,刘慧敏²,陈 陆¹,杨 霞¹,赵 军¹,王新卫¹,姚惠霞¹,王川庆^{1*}

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 为研究脑心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)对不同猪种的感染情况,本研究应用改进的“细胞接种与 RT-PCR 方法相结合”技术,成功分离到中国国内首株地方土猪源 EMCV、首株家养野猪源 EMCV 和 3 株良种猪源 EMCV,并进行了全基因组序列测定和分析。结果显示,5 株 EMCV 分离毒株的基因组全长 7 724~7 735 bp,彼此间核苷酸相似性为 99.3%~99.8%,与其他不同动物源 EMCV 参考毒株的相似性为 79.9%~99.9%,与国内猪源、鼠源毒株的相似性均在 99.4%以上;各基因片段中,以 VP1 和 2A 变异幅度最大,VP2 和 3D 最为保守;基于 EMCV 全基因组、ORF 和 VP1 基因序列绘制的系统发育进化树显示,EMCV 可分为 G1、G2 和 G3 3 个群,猪源 EMCV 主要分布在 G1 群和 G2 群,鼠源 EMCV 在 G1 群和 G3 群中均有分布;5 株 EMCV 分离毒株与其他国内参考毒株同属于 G1 群。研究结果证实,地方土猪和家养野猪可感染 EMCV 并引起发病,提醒在进行地方品种养殖和野生动物家养时要充分考虑人兽共患疫病传播的生态学;鼠在不同猪种间交叉感染 EMCV 时,可能起到重要媒介作用;EMCV 流行毒株存在较大的地域差异,其传播具有一定的区域限制性;EMCV 在感染不同猪种时可能会发生某些氨基酸突变,以适应新的宿主。

关键词: 脑心肌炎病毒;不同猪种;RT-PCR;全基因组;分子特征分析

中图分类号:S852.659.6

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2014)06-0967-07

Isolation, Identification and Full Length Genome Sequence Analysis of EMCV from Different Pig Source

CHANG Hong-tao¹, LIU Hui-min², CHEN Lu¹, YANG Xia¹, ZHAO Jun¹,
WANG Xin-wei¹, YAO Hui-xia¹, WANG Chuan-qing^{1*}

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The current study was undertaken to study the infection status of EMCV from different pig breed. Modified “cell inoculation and RT-PCR” technology was used, and the 5 EMCV strains were isolated from local pig, domestic boar and improved breed pig. The full length genome of the EMCV strains were acquired and sequenced, and their molecular characteristic were analyzed. The results showed that the full-genome sequence of 5 EMCV isolates were 7724-7735 bp in length, and shared 99.3%-99.8% nucleotide identity each other, 79.9%-99.9% identity with reference EMCV strains from different animal sources, and 99.4% with Chinese strains from pig and mice. Among all gene fragments, VP1 and 2A are easy to mutation, VP2 and 3D are most conserved. The phylogenetic tree based on the full length genome, ORF and VP1 gene sequences showed that

收稿日期:2013-12-19

基金项目:国家自然科学基金(31272567)

作者简介:常洪涛(1978-),男,河南商丘人,博士生,讲师,主要从事动物传染病免疫防治研究, E-mail:ndcht@163.com。常洪涛和刘慧敏并列第一作者

* 通信作者:王川庆,博士,教授, E-mail:wchuanq@163.com

the EMCV were divided into G1, G2 and G3 groups. The isolates from pig belong to G1 and G2 groups, the ones from mice distribute in G1 and G3 group, 5 isolates strains in this study belong to G1 group with other Chinese reference strains. The results identified that the EMCV infection could cause severe clinical symptoms in local pig and domestic boar, which remind us of taking fully consideration of the zoonosis ecology in the course of Wild animal breeding activities. Mice may play an important medium role in incross infection of EMCV at the different pig breed. A big regional difference exists in EMCV and the transmission is limited in a range of area, moreover, some mutation may occur in EMCV infection to adapt new hosts.

Key words: encephalomyocarditis virus; different pig breed; RT-PCR; full length genome; molecular characterization analysis

脑心肌炎病毒 (encephalomyocarditis virus, EMCV) 是一种具有自然疫源性的人畜共患疫病病原^[1], 可以感染家畜、啮齿动物、野生动物、灵长类动物和人^[2-3], 其中以猪感染后危害最为严重。1958年, EMCV 作为仔猪致死性心肌炎病原首次被报道, 随后进一步确定该病也可致使母猪发生繁殖障碍^[4-5]。中国于 2005 年从疑似病死猪体内分离到首株 EMCV^[6], 近年来已证实猪群中感染较为普遍, 血清抗体平均阳性率高达 72%^[7-8], 并陆续分离到多株良种猪源 EMCV^[6-7]。EMCV 是单股正链 RNA 病毒, 分类上属小 RNA 病毒科、心病病毒属, 基因组全长约 7.8 kb, 含有 1 个大的开放阅读框 (ORF), 衣壳蛋白由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 等 4 种结构蛋白组成, 其中以结构蛋白 VP1 的抗原性最强, 可刺激机体产生中和抗体^[9-10], 并与致病性有关^[11]。本研究分离不同猪源的 EMCV 河南株, 并进行鉴定和全基因组测序解析, 以期了解不同猪种对该病毒的感染情况, 丰富 EMCV 基因序列数据库, 并为研究其分子生态学 and 有效防控该病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与细胞

RPMI-1640、新生牛血清等购自美国 Hyclone 公司, RNA 提取用 TRIzol LS Reagent 购自 Invitrogen 公司, M-MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、pMD18-T 载体、5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Core Set Vet. 2.0 Kit 等均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, BHK-21 传代细胞系由本实验室保存。

1.2 病毒分离鉴定

从河南省发病猪场采集良种猪、家养野猪和淮

南猪的心、淋巴结和脾等疑似病料, -20 °C 冻存待用。毒株的分离和电镜观察、间接荧光抗体法等初步鉴定工作均参考盖新娜等^[6]的方法进行。

1.3 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 软件, 参考已发表的猪 EMCV BJC3 株基因序列 (GenBank 登录号 DQ464062), 设计并合成可覆盖其完整 ORF 的特异性引物 (表 1), 进行分段扩增、克隆。

1.4 病毒总 RNA 提取

取各分离毒的细胞培养液, 按照 TRIzol 使用说明书, 提取病毒总 RNA。

1.5 RT-PCR 及测序

应用各片段特异性引物, 以各分离毒的总 RNA 为模板反转录成相应片段的 cDNA, 并以各 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 同时优化 PCR 的最佳反应条件。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 45 s, 57~60 °C 60 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。基因组 5'端和 3'端扩增方法按 5'-Full RACE 和 3'-Full RACE Core Set Vet. 2.0 试剂盒说明书操作进行。各扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定、胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 α , 筛选阳性克隆, 经 PCR 鉴定后送上海生物工程公司测序。并应用 DNASTar 软件和测序峰图软件 Chromas2.33 对各片段测序结果进行拼接, 获得各分离毒的全基因组序列。

1.6 同源性比较与系统进化分析

运用 MegAlign 程序将各分离毒全基因序列与 17 株从 NCBI GenBank 搜集下载的 EMCV 参考毒株 (表 2) 的基因序列及其推导的氨基酸序列进行同源性分析, 并应用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树。

表 1 用于 EMCV 全基因组 RT-PCR 扩增的引物参数

Table 1 Oligonucleotide primer parameters of EMCV for RT-PCR amplification

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	扩增片段位置 Position for amplified fragments	长度/bp Length(bp)
ER-1F	ATTGTATGGGATCTGATCTGGGG	603-625	1 513
ER-1R	GTGTTGGATGCCTCAATGTAGGG	2 093-2 115	
ER-2F	GTATTCTACTCTGCCAGACAGCAC	1 948-1 971	1 575
ER-2R	CTAAACAATCTAACCTCCAAACCTC	3 498-3 522	
ER-3F	CTGATTTTCGGCACTCTGTTCTTT	3 258-3 280	2 097
ER-3R	CATCTGTCGCTTCTGTCTTGTT	5 332-5 354	
ER-4F	TGGCTAGGATTGAAAGGAAGAAG	5 226-5 248	1 050
ER-4R	TTTTACGTGGTACGTGAATACGG	6 253-6 275	
ER-5F	GTAGTGAATGCCTTTGAGCCACA	6 200-6 222	1 314
ER-5R	TTCCTGCTTACCAGAAATGAACGG	7 491-7 513	
5'GSP1	GAGGAGGAGTTATTCTTGTCTGAGG	942-966	5'-UTR
5'GSP2	GGGCCTAGACGTTTTTTAACCTC	659-682	
5'-RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA		
5'-RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATCAGTCGATG		
3'-GSP1	ATGTTGTCATACTATCGTCCAGG	7 430-7 452	3'-UTR
3'-RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT		

UTR, Untranslated region

Based on the sequence of EMCV strain BJC3 (GenBank accession number DQ464062)

表 2 用于序列比较和分析的 EMCV 参考毒株

Table 2 The EMCV reference strains for comparison and analysis of the sequence

GenBank 序列号 Accession number	分离地 Origin	宿主 Host	毒株命名 Isolate name	核苷酸/bp Nucleotid(bp)
FJ897755	中国 China	猪 Pig	GXLC	7 725
FJ604852	中国 China	猪 Pig	GX0601	7 729
PDQ464062	中国 China	猪 Pig	BJC3	7 746
DQ464063	中国 China	猪 Pig	HB1	7 735
HM641897	中国 China	猪 Pig	NJ08	7 724
DQ517424	韩国 Korea	猪 Pig	CBNU	7 713
EU780148	韩国 Korea	猪 Pig	K3	7 731
EU780149	韩国 Korea	猪 Pig	K11	7 744
X74312	德国 Germany	猪 Pig	PV21	7 861
M22458	加拿大 Canada	猪 Pig	EMC-D	7 829
M37588	巴拿马 Panama	猪 Pig	D variant	7 842
AY296731	美国 USA	猪 Pig	EMCV-30	7 678
FJ604853	中国 China	鼠 Mouse	GX0602	7 725
DQ288856	美国 USA	鼠 Mouse	PEC9	7 722
DQ294633	美国 USA	鼠 Mouse	Rz-pMwt	7 765
M81861	美国 USA	黑猩猩 Chimpanzee	EMCV-R	7 835
L22089	乌干达 Uganda	猴 Monkey	Mengo-M	7 761

2 结果

2.1 EMCV 的分离与鉴定

2.1.1 EMCV 的分离 从送检的疑似病料组织中成功分离到 5 株 EMCV, 分别命名为 JZ1201、JZ1202、YM13、YY13 和 HNXX13(表 3), 初代培养

48 h 时均出现细胞病变(CPE), 连传 3 代后, 接种 24 h 即出现典型 CPE。

2.1.2 不同代次 TCID₅₀ 测定 经测定, 5 株分离毒株 1~4 代细胞培养物的 TCID₅₀ (表 4) 除 JZ1202 株和 HNXX13 株的病毒滴度在第 2 代时略有下降外, 其他分离毒各代次基本稳定。

表 3 5 株 EMCV 毒株的分离情况

Table 3 Informations related with 5 isolates of EMCV

毒株 Isolate name	分离时间、地点 Date, origin	分离宿主 Host	分离组织 Tissue origin for isolation
JZ1201	2012, 焦作 Jiaozuo	猪 Pig	脾 Spleen
JZ1202	2012, 焦作 Jiaozuo	家养野猪 Domestic boar	心+淋巴结 Heart+lymphonodus
YM13	2013, 义马 Yima	猪 Pig	心+脾 Heart+spleen
YY13	2013, 原阳 Yuanyang	猪 Pig	心+脾 Heart+spleen
HNXX13	2013, 信阳 Xinyang	淮南猪 Local pig	心 Heart

JZ1201 株和 JZ1202 株分离自同一猪场

JZ1201 and JZ1202 were isolated from the same farm

表 4 5 株 EMCV 毒株不同代次细胞毒的 TCID₅₀ 测定 (0.1 mL)

Table 4 TCID₅₀ (0.1 mL) of 5 isolates of EMCV at different passages

代次 Passage	JZ1201	JZ1202	YM13	YY13	HNXX13
1	6.12	6.32	5.98	6.25	6.21
2	6.44	5.90	6.22	6.39	5.86
3	7.39	7.42	6.73	7.01	7.39
4	7.50	7.63	6.96	7.58	7.60

2.1.3 病毒形态 在透射电镜下对 5 株分离毒株的病毒粒子进行形态学观察, 均可清晰观察到数个形状规则, 直径为 25~29 nm 的圆形病毒粒子(图 1)。



图 1 分离毒株感染 BHK-21 的超微形态
Fig. 1 Ultrastructural morphologic features of isolated strains-infected BHK-21 cells (Collections of picornavirus particles)

2.1.4 间接荧光抗体鉴定 5 株分离毒株所感染的 BHK-21 细胞的细胞质内均可见到特异的绿色荧光(图 2)。

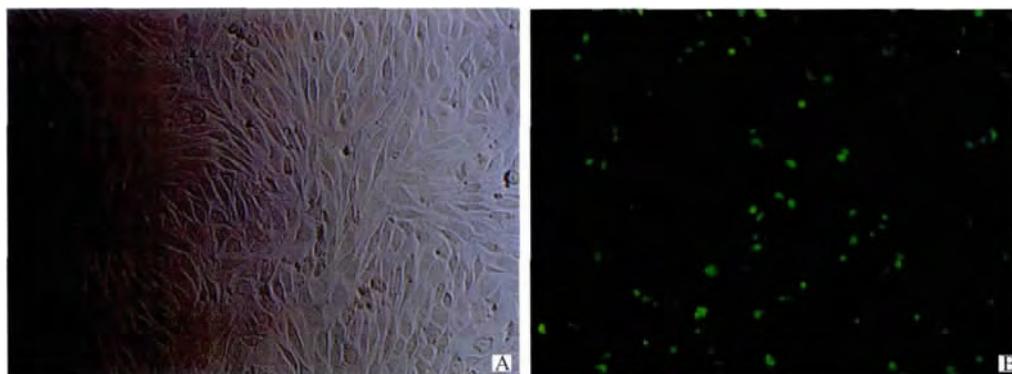
2.2 病毒基因组序列及结构分析

通过序列拼接, 5 株分离毒株的基因组全长为 7 724~7 735 bp, 基因序列已提交 GenBank(表 5), ORF 均为 6 879 bp, 编码由 2 292 个氨基酸组成的多聚蛋白, 可切割成 1 个病毒自身编码的前导蛋白

(L) 和 11 个蛋白终产物(1A~1D、2A~2C 和 3A~3D), 差异只是在于 5'-UTR(709~724 bp) 和 3'-UTR(131~137 bp) 的长度略有不同。

2.3 病毒全基因组及各基因片段的相似性比较

全基因组核苷酸序列分析结果表明, 5 株分离毒株之间的相似性为 99.3%~99.8%, 与国内外参考毒株的相似性为 79.9%~99.9%, 其中与国内猪源毒株的相似性高达 99.4% 以上, 与韩国毒株和欧美毒株的相似性分别为 99.4%~99.8% 和 82.3%~99.7%, 与国内、外鼠源毒株的相似性分别为



A. 正常 BHK-21 细胞;B. EMCV 分离毒株感染细胞
A. Normal BHK-21 cell;B. EMCV isolates infected BHK-21 cell

图 2 5 株 EMCV 毒株的免疫荧光鉴定 (200×)

Fig. 2 Identification of 5 isolates of EMCV by IFA (200×)

表 5 5 株 EMCV 毒株的全基因组信息

Table 5 The full length genome information of the 5 EMCV isolates

毒株命名 Isolate name	GenBank 序列号 Accession number	基因组全长/bp Full length genome	5'-UTR/bp	ORF/bp	3'-UTR/bp
JZ1201	KF836386	7 735	724	6 879	132
JZ1202	KF836387	7 735	724	6 879	132
YM13	KF836389	7 729	713	6 879	137
YY13	KF836390	7 724	714	6 879	131
HNXX13	KF771002	7 725	709	6 879	137

99.4%~99.7%和 79.9%~99.6%。3 株良种猪源分离毒株之间的相似性为 99.3%~99.5%，与国内、外其他猪源参考毒株的相似性分别为 99.4%~99.9%和 83.5%~99.6%。JZ1201 株和 JZ1202 株分离自同一猪场，相似性高达 99.8%。JZ1202 株与国内猪源参考毒株的相似性为 99.5%~99.9%。HNXX13 株与国内猪源毒株的相似性高达 99.6%以上，与韩国毒株和欧美毒株的相似性分别为 99.2%~99.7%和 83.5%~99.2%，与国内、外鼠源毒株的相似性分别为 99.6%和 80.8%~99.5%。进而与参考毒株 ORF 和各基因片段的核苷酸、氨基酸序列比对分析，发现 5 株分离毒株的非结构蛋白编码区均比结构蛋白编码区保守。在结构蛋白中，以 VP1 变异幅度最大，VP2 最为保守；非结构蛋白中，以 2A 变异幅度最大，3D 最为保守。VP1 片段的氨基酸变异多发生在 7~63 位，JZ1201 株和 JZ1202 株的 7 位由 K→R，YM13 株的 13 位由 T→A，63 位变数最大，HNXX13 株为 Q，JZ1201 株为 R，JZ1202 株和 YY13 株为 G，YM13 株为 E。

2.4 病毒系统进化分析

基于全基因组和 ORF 序列绘制的系统发育进化树(图 3)显示，EMCV 分为 G1、G2 和 G3 3 个群。猪源 EMCV 主要分布在 G1、G2 群，鼠源 EMCV 在 G1 群和 G3 群中均有分布。5 株分离毒株与其他国内参考毒株均属于 G1 群，但分布并不完全集中，3 株良种猪源 EMCV 也相距较远。家养野猪源 EMCV 与同场分离的良种猪源 EMCV 亲缘关系最近，二者与 HB1 株高度同源。淮南猪源 EMCV 则与 GXLC 株亲缘关系最近。基于 VP1 基因序列绘制的系统发育进化树(图 3)，可见 5 株分离毒株聚集在一起，与 GXLC 株最为接近，并同处于进化树主干上。猪源 EMCV-30 株尽管属于 G1 群，却位于一个独立分支，明显不同于其他 EMCV 毒株。

3 讨论

猪脑心肌炎是近年来新发现的人兽共患传染病，加强地方流行毒株的分离、鉴定工作，逐步积累

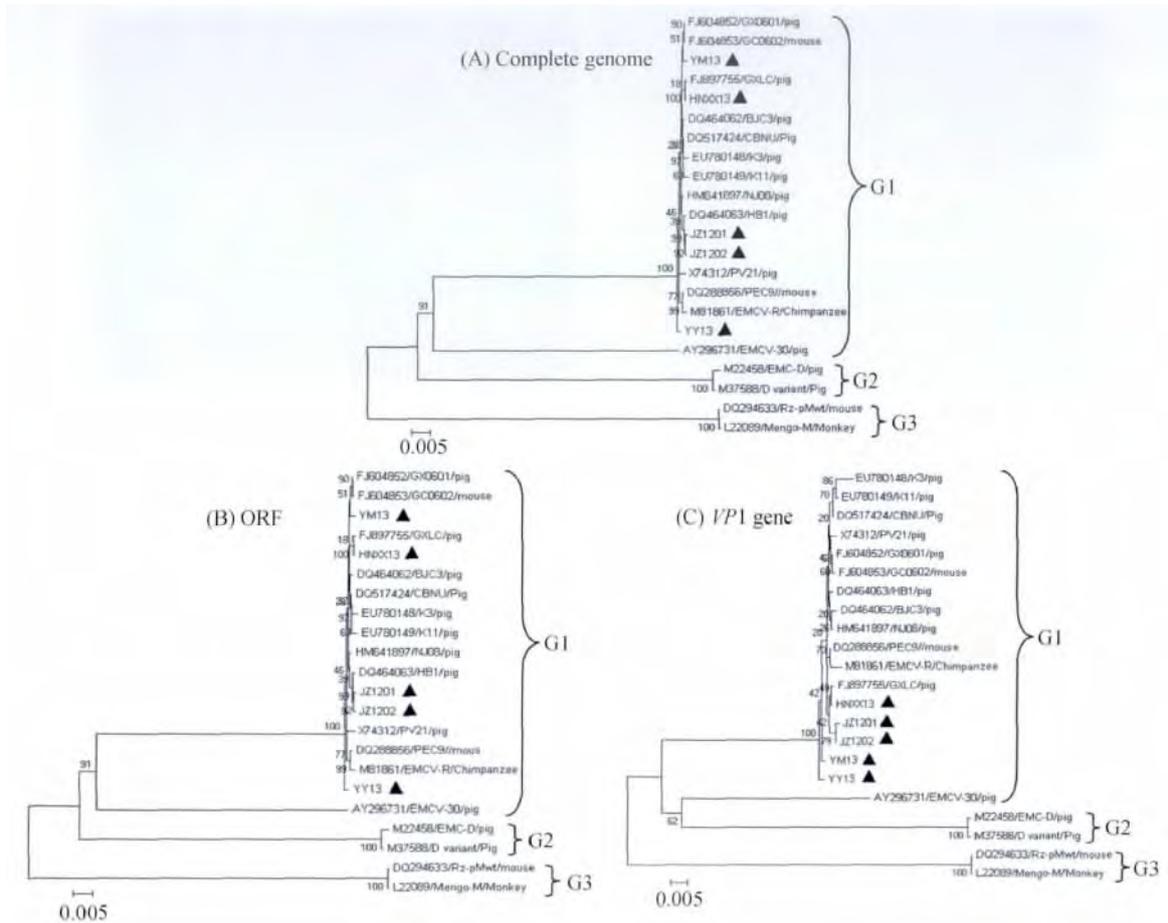


图 3 基于 EMCV 全基因组 (A)、ORF (B) 和 VP1 基因 (C) 核苷酸序列的系统进化树
 Fig. 3 Phylogenetic trees based on EMCV complete genome (A), ORF (B) and VP1 gene (C) nucleotide sequences

分子流行病学和生物信息学研究资料,是有效防控该病的当务之急。由于 EMCV 在疑似病料中的含量极低,养猪生产中也多表现为亚临床感染,因此病毒的直接分离、鉴定等工作难以开展。本研究中,笔者曾多次尝试应用各种分子生物学技术从病料中检测 EMCV,但均未获得成功。由于 EMCV 接种 BHK-21 细胞后很快能出现明显 CPE,而猪瘟病毒 (SCFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRS)、猪圆环病毒 (PCV)、猪伪狂犬病毒 (PRV) 和猪细小病毒 (PPV) 等多种猪病毒性病原接种后不会增殖。因此,笔者先将疑似病料处理后接种于 BHK-21 细胞,一旦出现 CPE 后再用 RT-PCR 方法进行检测,最终成功分离到国内首株地方土猪源 EMCV、首株家养野猪源 EMCV 和 3 株良种猪源 EMCV。这种改进的“细胞接种与 RT-PCR 方法相结合”技术,一方面大幅提高了疑似病料组织中 EMCV 的检出率和分离率,同时可利用细胞接种技术进行初步鉴定。通常情况下,家养野猪和地方土猪多在艰苦条

件下长期培育而成,抗病力极强。家养野猪源、淮南猪源 EMCV 的成功分离,证实该病毒可感染这些猪种并导致发病。遗传进化分析表明,5 株分离毒株彼此高度同源,与国内猪源、鼠源参考毒株处于同一分支,因此应具有共同感染来源或存在交叉感染,提醒在进行地方品种养殖和野生动物驯化中要充分考虑人兽共患疫病传播的生态学。另外, JZ1201 株和 JZ1202 株分离自同一发病猪场,该场依山而建,家养野猪采用山上自由放牧与舍饲相结合的饲养模式,良种猪为山下集约化饲养,2 个猪舍之间相距约 3 km,饲料、饲养人员以及各种工具均为独立配置。此次疫情中,家养野猪群首先表现出临床症状,其分离毒株与随后分离到的同场良种猪源 EMCV 相似性高达 99.8%,推断应是同一株病毒感染不同猪种所致。

EMCV 在猪之间的传播能力有限,鼠在猪群 EMCV 的传播过程中则具有重要作用。JZ1202 株和 HNXX13 株与国内鼠源毒株的相似性均高达

99.6%,亲缘关系极近,从而提示 EMCV 在家养野猪、地方土猪和鼠之间可能存在着交叉感染与传播,因此做好猪场内及周边的灭鼠工作,无疑会对有效防控该病至关重要。除 YY13 株外,其余 4 株分离毒株与国内猪源、鼠源 EMCV 亲缘关系最近,与韩国毒株的亲缘关系较近,与多数欧美毒株的亲缘关系较远,说明 EMCV 尽管存在较大的地域差异,但传播应有一定范围内的区域限制性,而与德国毒株 PV21 的亲缘关系高达 99.1% 以上,则提示日益发达的国际交通和贸易也有可能加速 EMCV 的长距离扩散。

在 EMCV 基因组所编码的 4 种结构蛋白中,VP1 基因是最重要的中性和抗原表位所在区域,变异幅度最大,其氨基酸序列与致病性密切相关^[12-13],因此对其开展相关研究最具价值。通过序列比对发现,尽管 5 株分离毒株的 VP1 基因具有很高的核苷酸相似性,但 VP1 蛋白已出现细微变异,提示 EMCV 在感染良种猪、野猪和地方土猪时可能会发生某些氨基酸的突变,以适应新的猪种。分离自同一猪场的良种猪源、家养野猪源 EMCV VP1 蛋白的第 7 位氨基酸均由 K→R,63 位氨基酸则分别为 R、G,再次证实 JZ1201 株和 JZ1202 株确为同一株病毒,但在家养野猪体内发生了个别氨基酸的变异。

参考文献:

- [1] ZIMMERMAN J J, D'ALLAIRE S, TAYLOR D J. Disease of swine[M]. 9th Edition. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional, 2006: 331-336.
- [2] DEUTZ A, FUCHS K, NOWOTNY N, et al. Sero-epidemiological studies of zoonotic infections in hunters-comparative analysis with veterinarians, farmers, and abattoir workers[J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2003, 115(3): 61-67.
- [3] OBERSTE M S, GOTUZZO E, BLAIR P, et al. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(4): 640-646.
- [4] GELMETTI D, MERONI A, BROCCHI E, et al. Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis [J]. *Vet Res*, 2006, 37(1): 15-23.
- [5] 白 娟, 蒋康富, 李玉峰, 等. 猪脑心肌炎病毒 NJ08 株基因组序列测定与分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(5): 402-404.
- [6] 盖新娜, 杨汉春, 郭 鑫, 等. 猪脑心肌炎病毒的分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(1): 59-65.
- [7] ZHANG G Q, GE X N, GUO X, et al. Genomic analysis of two porcine encephalomyocarditis virus strains isolated in China [J]. *Arch Virol*, 2007, 152(6): 1209-1213.
- [8] 张家龙, 盖新娜, 马 良, 等. 规模化猪场脑心肌炎病毒感染血清学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(1): 7-9.
- [9] RACANIELLO V R. Picornaviridae: The viruses and their replication//Fields Virology[M]. KNIPE D M, HOWLEY P M, GRIFFIN D E, et al. 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001: 685-715.
- [10] SUH Y S, HA S J, LEE C H, et al. Enhancement of VP1-specific immune response and protection against EMCV-K challenge by co-delivery of IL-12 DNA with VP1 DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2001, 19(15-16): 1891-1898.
- [11] KOENEN F, VANDERHALLEN H, CASTRYCK F, et al. Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent encephalomyocarditis outbreaks in Belgium[J]. *Zentralbl Vet Med B*, 1999, 46(4): 217-231.
- [12] BAE Y S, EUN H M, YOON J W. Genomic differences between the diabetogenic and non-diabetogenic variants of encephalomyocarditis virus[J]. *Virology*, 1989, 170(1): 282-287.
- [13] NELSEN-SALZ B, ZIMMERMANN A, WICKERT S, et al. Analysis of sequence and pathogenic properties of two variants of encephalomyocarditis virus differing in a single amino acid in VP1 [J]. *Virus Res*, 1996, 41(2): 109-122.

(编辑 白永平)