

猪流行性腹泻弱毒疫苗研究进展

胡鸿惠¹, 南文金¹, 龚中贵², 彭国良¹ (1. 韶关学院, 广东韶关 512005; 2. 韶关市动物卫生监督所, 广东韶关 512000)

摘要 分析了我国猪流行性腹泻疫苗的使用现状, 从疫苗毒株的选择、野毒株的分离和培养、毒株的致弱、疫苗安全性和免疫效力等方面综述了猪流行性腹泻弱毒疫苗的研究进展, 以期为新形势下进一步开展猪流行性腹泻疫苗的研发提供借鉴与参考。

关键词 猪流行性腹泻; 猪流行性腹泻病毒; 弱毒疫苗; 毒株

中图分类号 S852.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)26-0069-04

Research Progress of Pocine Epidemic Diarrhea Attenuated Virus Vaccine

HU Hong-hui¹, NAN Wen-jin¹, GONG Zhong-gui² et al (1. Shaoguan University, Shaoguan, Guangdong 512005; 2. Shaoguan Animal Health Supervision Institute, Shaoguan, Guangdong 512000)

Abstract In this paper, the current usage situation of pocine epidemic diarrhea vaccine (PEDV) in China was described, and the research progress of pocine epidemic diarrhea (PED) attenuated virus vaccine was summarized from the aspects of the selection of vaccine strains, the separation and culture of wild strains, the attenuation of strains, the safety and immune efficiency of vaccine, and so on. It provides references for the research and development of pocine epidemic diarrhea vaccine in the new epidemic situation.

Key words PED; PEDV; Attenuated virus vaccine; Strain

1971 年英国首先发现猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED), 随后比利时、荷兰、德国、瑞士、法国等均有该病的报道, 我国于 1976 年首次报道该病的发生^[1]。自 2010 年以来, 我国大部分地区的猪场出现新一轮仔猪腹泻疫情, 甚至出现在一些广泛使用 PED 灭活苗和弱毒苗的猪场, 与此同时韩国、日本、越南、泰国等亚洲国家也发生腹泻疫情^[2-3]。自 2013 年 4 月以来, 美国、加拿大、墨西哥等美洲国家, 甚至欧洲国家均有猪腹泻疫情的报道^[4-5]。2014 年, 日本大面积暴发仔猪腹泻病^[6]。目前, 猪流行性腹泻已成为危害世界养猪业的重要传染病之一, 给养猪业带来巨大的经济损失, 因此该病的防疫与控制至关重要。疫苗免疫是预防动物传染病的有效方式, 也是亚洲国家 PED 防疫控制的主要方式之一。一直以来, 猪流行性腹泻疫苗的研制与应用备受国内外学者的重视。近年来, 不少猪流行性腹泻相关疫苗陆续上市, 2014 年 3 月美国宣布猪病毒性腹泻 RNA 核酸疫苗上市, 2015 年 3 月我国宣布猪传染性胃肠炎-猪流行性腹泻-猪轮状病三联活疫苗上市等^[7]。猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 主要寄生在猪的小肠, 以细胞免疫为主, 而弱毒疫苗是一种病原致病力减弱但仍然具有活力的完整病原疫苗, 可以在免疫动物体内繁殖, 具有使用剂量小、免疫原性好、不需佐剂、成本低、使用方便、可诱导较强的细胞免疫反应, 一次免疫即可获得长久免疫力等优点^[8-9]。笔者从疫苗毒株的选择、野毒株的分离和培养、毒株的致弱、疫苗安全性和免疫效力等方面综述猪流行性腹泻弱毒疫苗的研究进展。

1 我国猪流行性腹泻疫苗的使用现状

已研制的猪流行性腹泻疫苗有组织灭活苗、细胞灭活

苗、细胞弱毒苗和转基因植物疫苗、联苗等, 亚洲地区在很长一段时间内通过疫苗免疫接种很好地控制了猪流行性腹泻。国内市售的猪流行性腹泻相关疫苗以灭活苗为主, 以弱毒苗为辅, 其中大部分是联苗, 包括猪流行性腹泻-猪传染性胃肠炎 (TGE) 二联苗和猪流行性腹泻-猪传染性胃肠炎-猪轮状病 (PoR) 三联疫苗等, 国内生产厂家主要有哈维科、吉林正业、上海海利、成都天邦、普莱柯和诺倍威。灭活疫苗因其安全、稳定而一直备受青睐, 其中二联灭活疫苗的市场份额相对较大。活疫苗可以诱导猪体产生分泌性 IgA (sIgA), 提供对病毒强毒攻击的免疫保护, 已成为目前企业研发推出产品的热点。陈静等^[10]研究表明, 与灭活疫苗相比, 接种活疫苗后动物攻毒保护性更好。尽管在一定程度上弱毒活疫苗存在毒力返强的危险, 科研人员和企业仍在不断完善和加强弱毒疫苗的研发, 并在近年先后推出 PED-TGE 二联活疫苗、PED-TGE-PoR 三联活疫苗投入市场。同时, 新型疫苗 (如亚单位疫苗、DNA 疫苗、转基因植物疫苗、重组活载体疫苗等基因工程疫苗) 均在研发, 但少有商品化。与传统疫苗相比, 新型疫苗在研发和投入使用的过程中人们更为关注疫苗的免疫原性和安全性, 在我国等亚洲国家暂时没有得到推广和应用^[11-14]。

2 弱毒疫苗毒株的选择

已经实现商品化的弱毒疫苗所使用的猪流行性腹泻病毒毒株主要有 CV777 株、P-5V 株、KPED-9 株和 DR13 株^[15]。其中, CV777 毒株最早由比利时 Pensaert 等分离得到, 我国童有恩等^[16]首次开展了 CV777 强毒株的致弱培育, 随后又开展了 PED 和 TGE 二联弱毒苗的研制, 并在 2003 年获得 TGE-PED 二联活疫苗新兽药证书。目前, 国内很多企业仍然使用该毒株作为疫苗毒株进行生产。在日本, 广泛用于活疫苗生产的毒株为 P-5V。在韩国, Kweon 等^[17]成功从新生小猪小肠内容物分离到的野毒株 KPEDV-9, 通过传代适应 Vero 细胞连续传代致弱, 并后续用于疫苗生产。Song 等^[18]也从新生仔猪小肠内容物中分离到 DR13 毒株, 经过连

基金项目 广东省现代农业产业体系建设专项; 广东省协同创新发展中心平台项目 (YJK-2014-52-16); 韶关市科技计划项目 (2013CX/N06, 韶科[2015]72 号); 2016 年韶关学院校级科研项目; 广东省科技计划项目 (2016A040402038)。

作者简介 胡鸿惠 (1982-), 女, 湖南郴州人, 助理研究员, 硕士, 从事动物生产与疾病研究。

收稿日期 2016-08-05

续传代并成功研制成口服疫苗,该疫苗口服效果强于肌注,并于 2011 年在菲律宾注册商标。此外,也有很多未能实现商品化的疫苗研发和正在研发中的腹泻疫苗,童昆周等^[19]开展了 PEDV-G1 的致弱培育工作。Sato 等^[20]开展了 83P-5 毒株的致弱培育。陶晓珊等^[21]开展了 SD10A1 毒株的致弱研究。张许科等^[22]开展 HN1301 强毒株的致弱研究。

近年来,随着猪流行性腹泻疫情的暴发,研究人员发现以 CV777 毒株为代表的经典毒株生产的疫苗对猪的保护力不足,造成免疫失败的现象屡屡发生^[23]。通过对流行毒株的分子流行病学调查,发现我国 2010 年以来的流行毒株与 CV777 相比,毒力基因发生了较大的改变,而 2013~2014 年美国、韩国、日本的流行毒株与过去 10 年的流行毒株相比,也发生了变异。Chen 等^[24]在我国分离的 LC 毒株与 CV777 毒株相比有 897 个核苷酸不同,大部分差异主要存在 ORF1 和 S 基因上,同样的基因缺失和插入存在 2010~2012 年的中国分离株 BJ-2011-1、CH/FJND-3/2011 和 GD-B 中。Suzuki T 等^[25]于 2013~2014 年在日本分离的 2 个毒株(TTR-2/JPN/2014 和 MYG-1/JPN/2014)的 S 基因和 ORF3 基因上发现大范围的缺失,这 2 个毒株与 2013~2014 年美国和韩国的广泛流行的分离株有较近的亲源关系,与经典毒株相比在已知的中和表位中存在氨基酸的突变。

总之,毒株的选择及其免疫原性、毒价是弱毒疫苗研发和投入生产并能实现市场化的关键因素之一。在新的养殖新形势下,由于经典疫苗对猪流行性腹泻病毒感染的保护力不足和该病毒基因的变异,又一次启发了新一轮的猪流行性腹泻疫苗的研发之路,研究者们正从这些变异毒株中筛选代表性强、免疫原性好的毒株研发新的疫苗。

3 弱毒疫苗的分离培养与致弱

3.1 毒株的分离和培养 猪流行性腹泻病毒野毒株的分离培养较为困难,有研究人员应用猪胎肾、猪甲状腺细胞进行 PEDV 的分离未能成功。宣华等^[26]应用猪胎小肠组织原代单层细胞培养获得成功,病毒滴度可达 $2 \times 10^{6.5} \sim 2 \times 10^{9.0}$ TCID₅₀/mL。Hofmann 等首次在 Vero 细胞中成功传代和培养 PEDV。此后,陆续有成功应用 Vero 细胞进行 PEDV 的分离的报道^[27-28]。此外,也有应用 PK15 细胞和 Marc-145 细胞中成功分离或传代 PEDV 的报道^[29-30]。总体而言,PEDV 分离率非常低,有的培养后基本检测不到组织细胞感染量(TCID₅₀),给病毒的扩大生产及病毒量的确定造成困难。

为了提高 PEDV 的临床分离效率、在疫苗生产中提高病毒的低度,研究人员不断探索研究。有些 PEDV 的分离会在第 1 代出现细胞病变,有的则需要盲传多代后才出现病变^[31]。冯晓声等^[32]通过使用细胞亲和剂来改变病毒与细胞之间的关系,增加病毒和细胞之间的亲和度,使得病毒更容易感染细胞。佟有恩等^[33]采用加胰酶的办法将二联活疫苗的 PEDV 的毒价提高 2 个滴度。周靛靛等^[34]试验发现 Vero 细胞采用 0.02% EDTA + 0.25% 胰酶为分散液与用 PBS + 0.25% 胰酶为分散液,其使单层细胞的消化时间缩短,进而缩短了病毒繁殖时间,且毒价能达到要求。王琳等^[35]探索

并优化 CV777 疫苗株的培养条件,发现当胰酶浓度为 5.0~7.5 μg/mL 时,病毒增殖速度随胰酶浓度的增加有所上升,且不同代次 Vero 细胞对病毒增殖的敏感性不同。为降低生产成本,有企业驯化疫苗毒株,以适应低血清培养,采用分代次递进式减少营养液中的血清浓度^[36]。除病毒本身的特性以外,提高 PEDV 病毒培养的滴度不仅可以从培养基着手,也可以考虑培养条件、细胞系等。同时,需要建立一个敏感性高的检测方法辅助病毒分离与鉴定,如荧光定量 RT-PCR 方法相比普通方法更具定量、敏感的优越性。

3.2 毒株的致弱 常用的病毒致弱方法有 4 种:①从自然界中筛选弱毒株;②通过异种动物或细胞传代致弱;③采用物理和化学方法致弱;④利用基因工程技术对病原进行重组。目前,应用于猪流行性腹泻病毒的致弱方法主要是通过细胞传代致弱和利用基因工程技术对病原进行重组致弱。

选择合适的毒株进行致弱是弱毒疫苗研发的关键环节之一,而不同的毒株由于其毒力的强弱不同,因此通过传代致弱的代次会有一定的差距。童昆周等^[19]通过使用 Vero 细胞的传代,并在一定代次用 PK15 和 ST 细胞进行交替传代将 PEDV-G1 强毒株致弱,后续试验结果表明 PEDV-G1 第 83 代毒具有较高的免疫原性并具备作为弱毒疫苗株的条件。佟有恩等^[16]将 CV777 强毒株的在 Vero 细胞上连续传代进行致弱,83 代以后适应了仔猪肾原代细胞(PK),并自 90 代起做空斑培养,进行病毒克隆纯化,克隆后 25 代弱毒株稳定性试验表明经 6 代返祖传代毒力未见返强,符合弱毒株标准。Kweon 等^[17]成功分离到野毒株 KPEDV-9,通过传代适应 Vero 细胞,并连续传代至 93 代。Song 等^[18,37]将 DR13 毒株经过在 Vero 细胞上连续传代 100 代致弱。日本 Sato 等^[20]开展 83P-5 毒株的传代致弱,该毒株在传代 22 代时开始适应细胞,并连续传代至 100 代。陶晓珊等^[21]对分离的 SD10A1 毒株进行传代致弱,第 16 代出现稳定的细胞病变,病毒含量高于 $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL,在 Vero 细胞上传代至 121 代时对未吃初乳仔猪安全,并命名为 SD10。张许科等^[22]将 HN1301 分离株经 Vero 细胞传代致第 46 代时成功致弱,并命名为 HN1302 株。P-5V 毒株虽已经应用于疫苗生产,但无相关的致弱研究报道。已有的研究表明,PEDV 在细胞传代培养的过程中,随着代次的增加,其毒力逐渐减弱,但也存在散失病毒复制能力的风险。目前使用的不同弱毒疫苗毒株致弱的代次各不相同。笔者认为 PED 疫苗毒株的致弱方面仍然存在很多不足之处,比如可以考虑改良培养基缩短病毒复制周期、改变病毒培养温度致弱病毒、研发培育新的适应性细胞系等。此外,在病毒的致弱研究中可以关注毒株的致弱标志,有助于疫苗投入使用后的鉴别诊断。

4 冻干保护剂

动物疫苗保护剂可以减少疫苗在高温和长时间保存中可能发生的物理和化学变化。常用的冻干保护剂有糖类、蛋白类、聚乙二醇等。国内动物疫苗最常使用的冻干保护剂主要有脱脂牛奶、蔗糖、明胶,其中一般蔗糖脱脂牛奶的比例为 5%,明胶的比例为 1.5%~3.0%,这些保护剂具有溶解性

好、外型稳定、保存方便和成本低廉等优点,但具有热稳定性差和保护功能较弱的缺点,一般 2~8℃ 下保存期为 4~6 个月。国外对耐热冻干保护剂的研究起步较早,已有商品化的产品,2~8℃ 下保存期可达 2 年以上。近年来,国内有研究人员探索以二糖类海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮、白蛋白等为组分的耐热性冻干保护剂的研究工作^[38-39]。关于 PEDV 的冻干保护剂的研发鲜有报道。陶晓珊等^[21]选择蔗糖和明胶为保护剂,其在疫苗中的质量百分比终浓度分别为 5% 和 1%,在保护剂中添加 0.5% 的酪蛋白酸钠。冻干保护剂的选择和质量会影响疫苗的质量、效价和稳定性。总体来看,国内对耐热冻干保护剂的研究报道较少,仅有少量禽病疫苗的研发过程中对耐热冻干保护剂进行了研究,猪病疫苗普遍采用的是普通冻干保护剂。对 PED 疫苗在内的猪病疫苗的冻干保护剂的研发具有一定的市场潜力。

5 疫苗的安全性和免疫效力

疫苗的安全性试验主要包括垂直传播和水平传播能力、不同日龄猪和妊娠母猪的免疫安全性、阳性猪群的免疫安全性、超剂量免疫的安全性以及毒力返强试验等。免疫效力试验则包括最小免疫剂量、免疫产生期与免疫持续期、不同的免疫途径等。

童昆周等^[19]将 PEDV-G1 第 83 代致弱毒株进行免疫效力试验,结果表明弱毒疫苗总免疫效力达 94.6%。其中,口服或肌注免疫 1~4 个发病量强毒攻击的免疫猪均获得 100% 保护;6 个发病量攻击的免疫猪,则口服免疫获得 50% 保护,肌注免疫获得 100% 保护。1998 年,佟有恩等^[16]将适应 Vero 细胞系的不同代次的 CV777 毒株进行感染性及免疫效力试验,结果表明致弱毒株毒价可达 $3.33 \times 10^{7.0} \sim 3.33 \times 10^{7.5} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$,第 83-7-斑 5 的克隆传代毒的主动免疫试验保护率为 95.92%,被动免疫试验保护率为 96.2%,且该毒株经 6 代次返祖传代毒力未返强。佟有恩等^[32]又研制了 TGE-PED 二联活疫苗,免疫效力试验结果表明弱毒株的毒力稳定,免疫后主动保护率为 97.7%,被动保护率为 98%,比二联灭活疫苗约高 10 个百分点,而免疫剂量减少 50%,免疫期可达 7 个月,仔猪的被动免疫期可至断奶后 1 周,免疫后 14 d 可产生较强的保护力,6 个猪场的田间试验保护率为 95%~98%,紧急预防接种效果明显。1999 年,Kweon 等^[17]用 KPEDV-9 弱毒株免疫妊娠母猪,结果发现母猪的免疫力明显提高。初乳前仔猪的致病性试验发现母猪所产生的抗体对抵抗 PEDV 野毒能力较强。怀孕母猪安全性试验表明接种 KPEDV-9 的母猪平均每窝产活仔数与对照组相同,无任何临床症状。2000 年,李树根等^[40]将 PEDV 弱毒株 G1-P83 和 TGE 弱毒株 AG1 制成弱毒二联疫苗,发现该疫苗可以使初生仔猪、断奶仔猪和肥育猪对 TGEV 和 PEDV 强毒的攻击有一定的抵抗能力,其中初生仔猪在 8~10 日龄用弱毒二联疫苗口服免疫,在断奶时能够较好地保护仔猪,免受 TGEV 和 PEDV 强毒的感染。2007 年,Song 等^[18]将 13 株 DR 弱毒株通过口服及肌肉注射免疫妊娠母猪,其中口服免疫组发病率为 13%,而肌肉免疫组为 60%,

口服组仔猪的 IgA 含量高于肌肉注射组,在强毒株攻毒情况下,新生仔猪口服组比肌肉注射组获得了更好的免疫保护,病毒株在猪体内连续 3 次传代毒力不返强。2014 年,陶晓珊等^[21]开展以 SD10 为毒株的弱毒疫苗研发,单剂量和超剂量试验均表明该毒株对小猪安全,主动免疫妊娠母猪后其产仔猪攻毒保护率为 100%,而仔猪的主动免疫保护率也达 100%,对照组发生典型的发病症状。2015 年,张许科等^[22]研究弱毒株 HN1302 的免疫保护效力,试验结果表明攻毒后第 14 天血清中和抗体水平逐渐升高,多数达到 1:32 的水平,此后随着攻毒时间的增加,中和抗体水平增高,在攻毒后第 28 天达到最高,与 CV777 相比,弱毒株 HN1302 产生免疫效力较快,且能维持在一个较高的水平,能够充分保护猪流行性腹泻的攻击。疫苗的免疫效力决定了动物能否有效抵抗病毒的感染,弱毒疫苗接种后可以快速、持续地产生抵抗力,国内 PED 弱毒疫苗推出市场后其占有的市场份额逐渐提升。同时,在研发过程中需要关注的一个问题是 PED 疫苗的免疫持续期,弱毒疫苗的免疫持续期越长可以减少疫苗的免疫次数,减低生产成本、减少应激,尤其是当前养殖状况复杂,猪场接种疫苗种类较多、相互干扰已成为影响疫苗免疫效果的因素之一。

6 展望

近年来,国内外腹泻疫情屡屡发生,猪流行性腹泻的给全球养猪业造成巨大的经济损失。该病流行的相关问题主要集中在病毒发生较多的变异,与其他肠病毒共感染的比例逐年上升,疫苗的质量问题等^[41]。很多因素使得猪流行性腹泻的防治成为今后一段时间内集约化养猪面临的亟待解决的问题之一。面对近年来的腹泻疫情,在临床生产实践中一些经典的腹泻疫苗不能很好地抵抗疾病,有的发病猪场通过返饲、自家苗的制备和使用,在一定程度上很好地控制了腹泻疫情,但返饲、自家苗的使用缺乏规范的方法,且病毒的滴度难以控制,又存在其他疫病感染的风险,不能长期使用。因此,饲养者们通过选择合适的疫苗进行免疫防疫才是科学有效的防控手段。

几十年来,学者们对 PED 疫苗的研发工作一直没有停滞。筛选和培育出具有良好免疫原性、高毒价的毒株是疫苗研制成功的关键。动物机体抗感染免疫的过程中,体液免疫和细胞免疫都非常重要。由于 PEDV 的肠道亲嗜性,局部肠黏膜免疫也发挥了重要作用,而活疫苗毒力减弱但保持完整的具有活力的病原,可以诱导良好粘膜免疫,是一个可持续发展 and 不断完善的研究方向。但是,与灭活疫苗相比,弱毒疫苗的安全更为受到关注。弱毒疫苗的研发主要分为弱毒疫苗株的培育、疫苗的安全性检验和疫苗的效力检验等 3 个阶段。

目前,基于腹泻疫情发生形势的变化,结合现有腹泻疫苗研究概况,笔者认为今后对猪流行性腹泻疫苗的研发可以从以下方面加以重视:①猪流行性腹泻具有一定的地方流行性特征,研究人员可以长期监测腹泻疫情的发生,筛选地方流行毒株作为疫苗的候选毒株,追踪变异的 PEDV 毒株,加强

企业-高校-研究院的合作,将工厂化的疫苗生产工艺与高校、研究院的资源优势相结合。以临床分离培养的变异毒株作为候选,优化和改进现有的商品化疫苗,加快科技转化为生产力的进度,加快实验室研发转化为生产的速度,也使养猪业受惠。②有针对性地考虑加强联苗的研发。持续追踪调查,检测和分离临床上与 PEDV 共感染的其他肠病毒,作为多联疫苗毒株的候选。③考虑基因工程活疫苗的研发与应用,保持活疫苗的免疫原性,但又减少活疫苗毒力返强的风险。

参考文献

- [1] HOFMANN M, WYLER R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture [J]. J Clin Micro, 1988, 26(11): 2235-2239.
- [2] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in sucking piglets, China [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(1): 161-163.
- [3] 蔡汝健, 张乐宜, 宋长绪. 2010-2013 年华南地区猪流行性腹泻病流行情况调查及防控效果[J]. 广东农业科学, 2013(11): 104-105.
- [4] WANG L, BYRUM B, ZHANG Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2014(20): 917-919.
- [5] CHUNG H C, NGUYEN V G, MOON H J, et al. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus during outbreaks in South Korea, 2013-2014 [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(12): 2238-2240.
- [6] HORIE M, KABEMURA M, MASATANI T, et al. Isolation and molecular characterization of porcine epidemic diarrhea viruses collected in Japan in 2014 [J]. Arch Virol, 2016, 161: 2189.
- [7] 张晓鹏. 10 年磨一剑: 哈兽研维科生物首创的猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻、猪轮状病毒三联活疫苗隆重上市[J]. 畜牧兽医科技信息, 2015(8): 83.
- [8] 赵德明, 张仲秋, 周向梅, 等. 猪病学[M]. 10 版. 北京: 中国农业出版社, 2014.
- [9] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [10] 陈静, 刘德清, 张宁, 等. 7 种常用猪流行性腹泻疫苗临床免疫效果观察和评估[J]. 养猪, 2013(4): 106-108.
- [11] 孟凡丹. 猪传染性胃肠炎和流行性腹泻二联核疫苗免疫效力研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [12] 陈建飞. 猪流行性腹泻病毒全基因组序列分析及感染性 cDNA 克隆的构建[D]. 哈尔滨: 哈尔滨兽医研究所研究生院, 2012.
- [13] KANG T J, JANG Y S, YANG M S. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants [J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(2): 378-383.
- [14] ZHANG Y, ZHANG X, LIAO X, et al. Construction of a bivalent DNA vaccine co-expressing S genes of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* [J]. Virus genes, 2016, 52(3): 354-364.
- [15] SONG D, MOON H, KANG B. Porcine epidemic diarrhea: A review of current epidemiology and available vaccines [J]. Clin Exp Vaccine Res, 2015, 4(2): 166-176.
- [16] 佟有恩, 冯力, 李伟杰, 等. 猪流行性腹泻弱毒株的培育[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(6): 329-332.
- [17] KWEON C H, KWON B J, LEE J G, et al. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate [J]. Vaccine, 1999, 17: 2533-2546.
- [18] SONG D S, OH J S, KANG B K, et al. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain [J]. Res Vet Sci, 2007, 82(1): 134-140.
- [19] 童昆周, 李力复, 林志雄, 等. 猪流行性腹泻弱毒疫苗的研究[J]. 中国兽医科技, 1996, 26(1): 3-4.
- [20] SATO T, TAKEYAMA N, KATSUMATA A, et al. Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo [J]. Virus Genes, 2011, 43(1): 72-78.
- [21] 陶晓珊, 刘蕾, 申洪银, 等. 一种猪流行性腹泻活疫苗: 中国, CN103933561A [P]. 2014.
- [22] 张许科, 孙进忠, 田克恭. 一种猪流行性腹泻病毒株, 及其致弱毒疫苗株及应用: 中国, CN 104513827A [P]. 2015.
- [23] LIN C M, SAIF L J, MARTHALER D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains [J]. Virus Res, 2016, 16: 30225-30232.
- [24] CHEN F, ZHU Y, WU M, et al. Comparative genomic analysis of classical and variant virulent parental/attenuated strains of porcine epidemic diarrhea virus [J]. Viruses, 2015, 7(10): 5525-5538.
- [25] SUZUKI T, MURAKAMI S, TAKAHASHI O, et al. Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014 [J]. Infect Genet Evol, 2015, 36(12): 363-368.
- [26] 宣华, 邢德坤, 王殿瀛, 等. 应用猪胎肠单层细胞培养流行性腹泻病毒的研究[J]. 中国人民解放军兽医大学学报, 1984, 4(3): 202-208.
- [27] 王康, 王鑫, 杨德, 等. 猪流行性腹泻病毒 HeB10/2014 株的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(4): 284-288.
- [28] KADOI K, SUGIOKA H, SATOH T, et al. The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines [J]. New Micro, 2002, 25(3): 285-290.
- [29] JUNG K, SAIF L J. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis [J]. Vet J, 2015, 204(2): 134-143.
- [30] LAWRENCE P K, BUMGARDNER E, BEY R F, et al. Genome sequences of porcine epidemic diarrhea virus: In vivo and in vitro phenotypes [J]. Gen Annou, 2014, 2(3): 503-514.
- [31] 付梦瑾, 朱玲, 吴云飞, 等. 猪流行性腹泻病毒的分离鉴定及增殖规律[J]. 中国兽医学报, 2013, 43(11): 1133-1139.
- [32] 冯晓声, 贾爱卿, 王贵平. 一种猪流行性腹泻病毒的培养方法: 中国, CN 104611297A [P]. 2015.
- [33] 佟有恩, 冯力, 李伟杰, 等. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联弱毒疫苗的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(6): 406-410.
- [34] 周靓靓, 孙心, 吴蕾. 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻疫苗病毒培养条件的优化 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2014, 39(6): 33-35.
- [35] 王琳, 邢育钢, 李继昌. 猪流行性腹泻疫苗株在 Vero 细胞中繁殖条件的优化 [J]. 当代畜牧养殖业, 2014(11): 3-4.
- [36] 徐宏军, 胡来根, 牟和平, 等. 低血清培养 Vero 细胞生产猪流行性腹泻 CV777 株病毒的方法: 中国, CN104630158A [P]. 2015.
- [37] SONG D S, YANG J S, OH J S. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3 [J]. Vaccine, 2003, 21(17/18): 1833-1842.
- [38] 王佳佳. 鸡新城疫耐热糖玻璃活疫苗制备技术研究[D]. 南京: 南京农业大, 2013.
- [39] 陈果亮, 杜元钊, 管清江, 等. 常规动物用活疫苗冻干保护剂的改良初探[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(10): 28-29.
- [40] 李树根, 周仲芳, 李力复, 等. 猪流行性腹泻和猪传染性胃肠炎弱毒二联疫苗研究[J]. 中国兽医杂志, 2000, 26(8): 5-8.
- [41] SUN D B, WANG X Y, WEI S, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review [J]. J Vet Med Sci, 2016, 78(3): 355-363.