

表达猪瘟病毒石门株 *E0* 和/或 *E2* 基因重组非复制型腺病毒疫苗的免疫保护试验*

孙永科,杨玉艾,王养会,李普华,张彦明

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100,中国)

[摘要] 用已构建好的表达猪瘟病毒石门株 *E0* 基因的重组腺病毒 pAd-*E0*、表达猪瘟病毒石门株 *E2* 基因的重组腺病毒 pAd-*E2* 以及联合表达猪瘟病毒石门株 *E0-E2* 基因的重组腺病毒 pAd-*E0-E2* ,肌肉和皮下接种免疫商品猪 2 次(间隔 20 d) ,同时设非重组腺病毒 PAD-CMV、常规猪瘟疫苗和空白对照组。二免 21 d 后进行 CSFV 石门株强毒超致死量(1 000 倍 TCID₅₀) 攻击,研究表达猪瘟保护性抗原基因重组腺病毒疫苗的免疫效果。结果表明,pAd-*E0*、pAd-*E2* 和 pAd-*E0-E2* 免疫组猪的死亡率分别为 50 %、25 %和 25 % ,而常规猪瘟免化弱毒疫苗免疫组的死亡率为 40 % ,pAd-CMV 免疫组和空白对照组猪全部死亡;在攻毒前,重组腺病毒免疫组抗体水平普遍较低,商品化疫苗免疫组能 100 %检测到抗体,而非重组腺病毒和空白对照没有检测到抗体;攻毒后 pAd-*E0*、pAd-*E2* 和 pAd-*E0-E2* 试验组中分别有 75 %、50 %和 50 %猪体温超过 40 ℃ ,常规苗试验组 80 %体温超过 40 ℃ ,而 PAD-CMV 组和空白对照组所有试验猪体温均超过 40 ℃ ,表明重组腺病毒疫苗具有一定的保护效果。表明,仅含有 *E0* 基因的重组腺病毒 pAd-*E0* 的免疫保护效果和常规疫苗还有距离;含有 *E2* 基因和 *E0-E2* 基因的重组腺病毒的免疫保护效果不亚于常规疫苗。

[关键词] 猪瘟病毒;重组腺病毒;*E0* 基因;*E2* 基因;保护效果

[中图分类号] S852.65⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0029-05

Immunological characterization of the replication-defective recombinant adenovirus expressing *E0* and/or *E2* antigen of classical swine fever virus Shimen strain

SUN Yong-ke , YANG Yu-ai , WANG Yang-hui , LI Pu-hua , ZHANG Yan-ming

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract : The commercially available pig 's susceptibility to CSFV was determined 21 days after twice immunizations through subcutaneous and intramuscular routes by three recombinant adenoviruses which contained the Classical Swine Fever Virus (CSFV) *E0* and/or *E2* gene ,and set pigs inoculated non-recombinant adenovirus and DMEM as negative control. The mortality rate of pigs vaccinated with pAd-*E0* ,pAd-*E2* and pAd-*E0-E2* were 50 percent ,25 percent and 25 percent ,respectively ,while 40 percent of animals vaccinated with commercial vaccine were dead ,and all animals vaccinated with the non-recombinant human adenovirus and blanks were dead. Before challenge ,low antibodies to CSFV were detected in all pigs vaccinated with recombinant adenoviruses. High antibodies were detected in all animals vaccinated with commercial vaccine ,but none in blanks. The number of pigs which had a temperature above 40 ℃ (indicative of fever)

* [收稿日期] 2006-09-18

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2003 K02- G11-01) ;国家自然科学基金项目(30471290)

[作者简介] 孙永科(1977 -) ,男,江苏盐城人,在读博士,主要从事分子病原学及基因工程疫苗研究。

[通讯作者] 张彦明(1956 -) ,男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。Email :ylzhangym @sohu.com

were tested every day after challenge. Results showed 75 percent of animals (3/4) vaccinated with pAd-E0, 50 percent of animals (2/4) vaccinated with pAd-E2, and 50 percent of animals (4/8) vaccinated with pAd-E0-E2 developed temperatures above 40 °C; 80 percent of pigs (4/5) vaccinated with commercial vaccine developed temperatures above 40 °C, while all blanks developed temperatures above 40 °C. The analysis of clinical symptom showed that the recombinant adenoviruses could offer protection to CSFV. The above results showed that the recombinant adenovirus contained CSFV E0 gene could offer less protection for pigs than commercial vaccine, but recombinant adenoviruses contained CSFV E2 could offer more protection than commercial vaccine.

Key words: classical swine fever virus; recombinant-defective adenovirus; E0 gene; E2 gene; protection effect

猪瘟是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的猪的一种高度接触性传染病,死亡率极高^[1],给世界养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。猪瘟被世界动物卫生组织(OIE)列为A类动物疾病,我国也将其列为一类动物疫病。我国对猪瘟病的防控研究以猪瘟兔化弱毒疫苗的问世,而处于世界先进水平。从20世纪60年代以来,中国C株猪瘟兔化弱毒疫苗在世界范围内为控制猪瘟的流行,起到了关键性的作用。长期以来,猪瘟兔化弱毒疫苗高强度的免疫,已使CSFV野毒株及兔化弱毒抗原发生了变异,出现了慢性、隐性等非典型感染的流行形式^[3],导致疫情难于控制,造成免疫失败。为此,迫切需要对猪瘟病毒病进行更深入的理论和实践研究。目前,进一步研制更安全、更高效的新型疫苗,是国内外许多学者努力的方向。

以活病毒为载体的疫苗,可诱导机体产生针对目的抗原的免疫应答,是一种极具开发前景的新型疫苗。重组复制缺陷型腺病毒具有较高的基因转移效率和诱导保护性免疫的作用,用作疫苗载体具有明显的优势^[4],可模仿病毒天然的感染方式,并直接在体内表达天然的、具有生物活性的抗原蛋白,能诱导有效的特异性体液免疫和细胞免疫应答,目前已应用于新型减毒活疫苗和基因治疗的研究中^[5]。但是将腺病毒应用于猪瘟病毒载体的研究,在国内还未见报道。本试验在前期利用改进的人源AdEasy-1系统成功构建表达猪瘟病毒石门株E0和/或E2基因的重组腺病毒PAD-E0、PAD-E2和PAD-E0-E2的基础上,进一步对其免疫效果进行了研究,以期对猪瘟病毒主要保护基因重组腺病毒疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪瘟重组非复制型腺病毒疫苗和常规疫苗

表达猪瘟病毒石门株E0基因的重组腺病毒疫苗pAd-E0、表达猪瘟病毒石门株E2基因的重组腺病毒疫苗pAd-E2及联合表达猪瘟病毒石门株E0-E2基因的重组腺病毒疫苗pAd-E0-E2由西北农林科技大学动科学院预防兽医实验室构建;商品化猪瘟兔化弱毒疫苗购自中牧实业股份有限公司成都药械厂,编号0605091-1,有效期1年。

1.1.2 主要试剂 工具酶 RNA提取试剂盒为Gibco公司产品;逆转录酶和Ex Taq酶为大连宝生物工程有限公司产品。

1.1.3 试验动物 6~7周龄商品化非免疫长白猪购自西北农林科技大学畜牧站,共27头,经检查猪瘟抗体为阴性。

1.2 试验设计

将27头猪随机分为4组,第1组4头,用pAd-E0免疫;第2组4头,用pAd-E2免疫;第3组8头,用pAd-E0-E2免疫;第4组4头,为非重组腺病毒对照组;第5组5头,为常规苗(猪瘟兔化弱毒疫苗)对照组;第6组2头,为空白对照组。重组腺病毒组(第1,2,3组)和非重组腺病毒组(第4组)的免疫剂量均为 2.4×10^9 IU/头,于颈部肌肉和腹部皮下多点注射,20 d后以相同途径和剂量再次免疫;猪瘟兔化弱毒疫苗对照组的免疫方法和剂量按照疫苗使用说明进行;空白对照用培养重组腺病毒的DMEM培养液免疫,2 mL/头。所有试验猪在第1次免疫后20 d时进行二免,二免后21 d时用1 000倍TCID₅₀的猪瘟强毒石门株肌肉注射、点眼、滴鼻和口服攻毒。

1.3 猪体温检测

从攻毒时开始每天测量体温,观察临床症状。

1.4 猪血清抗体的检测

从第1次免疫前开始采血,免疫后每星期采血1次,直到全群扑杀为止。分离血清,参考中国兽药监察所提供的猪瘟抗体ELISA使用说明书,对所有

血清中的猪瘟抗体水平进行检测。

1.5 猪血液中 CSFV 的检测

1.5.1 引物设计 根据猪瘟病毒石门株 E2 基因的序列,使用美国 National Bioscience Inc 研制的分子生物学软件 Oligo 5.0 自行设计扩增 CSFV E2 基因的上、下游引物。

上游引物为:5'-CTATCTAGAA TGGCGC-CCA TCACGGCCTA-3';

下游引物为:5'-CCCAA GCTTTA GTGACGAC-CTCCA-3'。

引物由上海博雅生物工程有限公司合成。

1.5.2 CSFV 的 RT-PCR 检测 在攻毒后的 2,4,6,8,10,12 和 14 d 采集猪全血,用 RT-PCR 方法检测血液中的猪瘟病毒。用 Gibco 公司的 Trizol Reagent 试剂提取其总 RNA,进行反转录:上游引物 2 μ L, RNA 提取液 5 μ L,去离子水 4 μ L,置于 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,然后冰浴 2~5 min,瞬时离心后加入 5 \times RT Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor 1 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, AMV 反转录酶 2 μ L,混合均匀后置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,然后煮沸 5 min,作为模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系为:反转录 cDNA 液 5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 5 μ L,上、下游引物各 2 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶 1 μ L,灭菌去离子水 30 μ L,反应总体积为 50 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,54 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。取 PCR 产物少许,进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 攻毒后猪病理变化观察

在攻毒后的 14 d,当所有存活猪的临床症状消失后,将其全部处死并进行剖检,观察下颌淋巴结、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、肾脏、脾脏、膀胱以及心脏是否有病理变化。

2 结果与分析

2.1 猪攻毒后的临床症状

1 组(pAd-E0 免疫组)在攻毒后第 4 天,4 头免疫猪中 3 头猪食欲下降,体温达 40 $^{\circ}$ C 以上,持续 48 h 左右。其中 1 头在 72 h 后体温和食欲恢复正常;另 2 头体温仍持续达 40 $^{\circ}$ C 以上,精神萎靡,先便秘后拉稀,在第 9~10 天死亡。另 1 头猪攻毒后没有任何临床症状。

2 组(pAd-E2 免疫组)在攻毒后第 4 天,4 头免疫猪中 2 头猪食欲稍微下降,体温达 40 $^{\circ}$ C 以上,持

续 48 h 左右,其中 1 头在 72 h 后体温和食欲恢复正常;另 1 头体温仍持续达 40 $^{\circ}$ C 以上,先便秘后拉稀,在第 10 天死亡。其余 3 头猪全部存活。

3 组(pAd-E0-E2 免疫组)在攻毒后第 4 天,8 头免疫猪中 3 头猪体温达 40 $^{\circ}$ C 以上;第 5 天有 4 头猪体温达 40 $^{\circ}$ C 以上,食欲下降,其中 2 头发烧猪在攻毒后的第 7 天体温和食欲恢复正常,但另 2 头体温仍持续达 40 $^{\circ}$ C 以上,精神萎靡,先便秘后拉稀,先后在第 9 天和第 10 天死亡。另外 4 头猪攻毒后没有临床症状。

5 组(猪瘟兔化弱毒疫苗免疫组)在攻毒后的第 4 天,5 头免疫猪中 4 头猪体温达 40 $^{\circ}$ C 以上,持续 48 h 左右,食欲稍微下降,其中 2 头在 72 h 后体温和食欲恢复正常;另外 2 头体温持续达 40 $^{\circ}$ C 以上,先便秘后拉稀,在第 9~10 天死亡。其余的 3 头猪全部存活。

4 组(pAd-CMV 免疫组)和 6 组(空白对照组)的所有试验猪在攻毒后第 2 天体温升至 40 $^{\circ}$ C 以上,病猪便秘;第 3 天食欲减退,精神沉郁,有些病猪发生呕吐;第 4 天很少采食,仅少量饮水,精神高度沉郁,四肢软弱无力,行动缓慢,摇摆不稳,普遍拉稀,两眼无神,有多量黏液脓性分泌物,腹下、耳和四肢内侧有出血点;第 5 天病猪俯卧不起,全身震颤,四肢呈游泳状划动,体温一直稽留在 41 $^{\circ}$ C 左右。第 6 天开始陆续死亡,死前体温下降。

2.2 攻毒前后猪 CSFV 抗体水平的变化

pAd-E0 免疫组攻毒前 3 头免疫猪抗体水平缓慢上升,但一直偏低,另 1 头一直到攻毒前抗体水平 < 0.1;攻毒后猪抗体水平明显上升,攻毒后第 1 周和第 2 周抗体最高水平分别达到 0.279 和 0.414。pAd-E2 和 pAd-E0-E2 免疫组猪的抗体水平的变化与 pAd-E0 免疫组相似,但水平偏低,其中 pAd-E2 免疫组同样有 1 头在攻毒前几乎检测不到抗体;攻毒后猪抗体水平明显上升,攻毒后第 1 和第 2 周最高抗体水平分别达到 0.276 和 0.396。pAd-E0-E2 免疫组中也有 1 头在攻毒前抗体水平 < 0.1;攻毒后猪抗体水平显著上升,攻毒后第 1 周和第 2 周最高抗体水平分别达到 0.312 和 0.489。常规苗对照组猪在攻毒前所有个体的抗体水平显著上升,最高达到 0.402,攻毒后抗体最高可达 0.587。pAd-CMV 和空白对照组在攻毒前一直没有检测到猪瘟病毒抗体,但是在攻毒后可以检测到较高水平的抗体。

2.3 攻毒后猪血液中 CSFV 的检测

RT-PCR 结果显示,重组腺病毒 pAd-E0, pAd-

E2 和 pAd-E0-E2 免疫组 CSFV 的检出率分别为 100%、50% 和 50%，常规疫苗组的检测率为 80%，而 pAd-CMV 和空白对照的检出率为 100%。

2.4 攻毒后猪组织脏器的病理变化

剖检结果表明,尽管临床症状已经消失,但是某些脏器还存在一些病理变化。pAd-E0 免疫组 2 头存活猪中,1 头下颌淋巴结、肠系膜淋巴结以及膀胱肿胀出血,1 头肠系膜淋巴结和肾脏出血。pAd-E2 免疫组 3 头存活猪中,有 1 头下颌淋巴结、肠系膜淋巴结以及膀胱肿胀出血,1 头肾脏有出血,1 头没有病变。pAd-E0-E2 免疫组 6 头存活猪中,2 头下颌淋巴结、肠系膜淋巴结以及膀胱肿胀出血,1 头肠系膜淋巴结和肾脏出血,1 头腹股沟淋巴结、扁桃体出血,另外 2 头没有病变。常规疫苗免疫组 3 头存活猪中,1 头下颌淋巴结、腹股沟淋巴结和膀胱有出血,1 头肾脏和膀胱有出血,1 头没有病变。pAd-CMV 和空白对照组猪下颌淋巴结、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、肾脏、脾脏、膀胱以及心脏均有明显的出血现象。

3 讨论

分子生物学方法的出现,为研制新型的猪瘟疫疫苗提供了有效的手段。目前,用于构建猪瘟疫病毒基因工程活载体疫苗的系统主要有痘苗病毒^[6-7]、伪狂犬病毒^[8-9]和腺病毒^[10]等,用这些系统构建的基因工程疫苗的免疫效果虽令人鼓舞,但还有待于进一步提高。到目前为止,所用的用于构建猪瘟疫基因工程疫苗的腺病毒载体均是猪源的,是一种复制型的重组病毒,用其构建的猪瘟疫疫苗接种动物后会导致载体病毒本身的扩散,接种仔猪还会受到针对载体病毒的母源抗体的影响^[11]。本研究中的 pAd-E0、pAd-E2 和 pAd-E0-E2 是利用最新一代的人源非复制型腺病毒 AdEasy-1 系统表达猪瘟疫病毒,主要保护性抗原 E0 和/或 E2 基因,该系统缺失了腺病毒基因组的 E1 和 E3 区,从而使机体对外源抗原的免疫反应增强,可更好地刺激机体产生免疫保护作用^[12],而且比复制型腺病毒更安全。有研究已经证实,利用人源非复制型 Adeasy-1 系统构建的猪瘟疫重组腺病毒疫苗在小鼠上可以加强免疫,不受腺病毒载体自身抗体的影响^[13-14]。但是,本试验结果显示用重组腺病毒 pAd-E0、pAd-E2 和 pAd-E0-E2 加强免疫猪后,并没有出现其在小鼠上加强免疫后抗体水平迅速上升的情况,并且第一次免疫接种后抗 CSFV 抗体水平很低,而常规疫苗免疫接种后抗体

水平明显上升,其原因有待于进一步研究。

本试验结果显示,用 1 000 倍 TCID₅₀ 攻击时,pAd-E0、pAd-E2 和 pAd-E0-E2 试验组分别有 2、1 和 2 头猪死亡,死亡率分别为 50% (2/4 头)、25% (1/4 头) 和 25% (2/8 头);商品化猪瘟疫化弱毒疫苗免疫组 5 头猪中有 2 头死亡,死亡率为 40%;非重组腺病毒免疫组和空白对照组猪全部死亡。可见,抗 CSFV 抗体水平的高低不是评价机体能否抵抗强毒攻击的惟一指标^[15],这有可能是因为接种重组腺病毒激发了机体其他的免疫机制(例如细胞免疫),而抵抗了猪瘟疫病毒的攻击^[16]。本试验前期研究结果表明,100 倍 TCID₅₀ 就可以导致所有非免疫猪死亡,而本研究采用 1 000 倍 TCID₅₀ 的病毒量攻击,目的是检测在超致死量病毒攻击的情况下,本研究构建的基因工程疫苗的保护效果究竟如何。从攻毒后表现的临床症状来看,pAd-E0 免疫组有 75% 表现有临床症状,并且体温超过 40℃;而 pAd-E2 免疫组和 pAd-E0-E2 免疫组只有 50% 表现有临床症状,体温超过 40℃,表明单纯含有 E0 基因的重组腺病毒的保护效果与含有 E2 基因的重组腺病毒还有一定的距离,这与 Edwards 等^[17]的研究结果一致。常规疫苗组有 80% (4/5 头) 表现有临床症状,保护效果较含有 E2 基因的重组腺病毒免疫组差,其原因可能是攻毒时使用的是猪瘟疫病毒石门株强毒,而常规疫苗是 C 株兔化弱毒疫苗,虽说常规疫苗能够有效的预防猪瘟疫,但是近年来猪瘟疫病毒不断产生变异致使常规疫苗免疫效果并不理想。这也提示,面对现在不断变异的 CSFV,应该及时地发现并研制出针对变异毒株的疫苗,以求最大限度的降低经济损失。

本试验结果表明,在临床症状消失后,pAd-E0、pAd-E2、pAd-E0-E2 和常规疫苗免疫组存活猪中分别有 2、2、4 和 2 头主要脏器有病理变化。表明含有 CSFV E2 基因的重组腺病毒对存活猪的脏器保护效果和常规疫苗没有区别,而含有 CSFV E0 基因的重组腺病毒的保护效果较差。

从以上结果可以看出,pAd-E2 和 pAd-E0-E2 能保护超致死量的猪瘟疫强毒石门株对猪的攻击,其保护效果要优于猪瘟疫兔化弱毒疫苗,而 pAd-E0 的保护率稍低于常规疫苗。

[参考文献]

- [1] Dahle J, Liess B. A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology[J]. Comp Im-

- munol Microbiol Infect Dis ,1992 ,15 :203-211.
- [2] Uttenthal A ,Storgaard T ,Oleksiewicz M B ,et al. Experimental infection with the paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs :determination of viral replication kinetic by quantitative RT-PCR ,virus isolation and antigen ELISA [J]. Vet Microbiol ,2003 ,92 :197-212.
- [3] 谢庆阁 ,翟中和. 畜禽重大疫苗研究进展 [M]. 北京 :中国农业科技出版社 ,1996.
- [4] Encke J ,Putlitz Z J ,Geissler M ,et al. Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural protein of the hepatitis C virus in murine model [J]. J Immunol ,1998 ,161 :4917-4923.
- [5] Torres J M ,Alonso C ,Ortega A ,et al. Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus [J]. J Virol ,1996 ,70 :3770-3780.
- [6] Rumenapf E T ,Stark R ,Meryers G ,et al. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus further characterization and induction of protective immunity [J]. J Virol ,1991 ,65 :589-597.
- [7] König M ,Lengsfeld T ,Pauly T ,et al. Classical swine fever virus : independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins [J]. J Virol ,1995 ,69 :6479-6486.
- [8] Van Z M ,Wensvoort G ,De kluiver E ,et al. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelop glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera [J]. J Virol ,1991 ,65 (5) :2761-2765.
- [9] Peeters B ,Bienkowskaszewczyk K ,Hus M ,et al. Biologically safe , nontransmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both aujeszky's disease and classical swine fever [J]. J Gen Virol ,1997 ,12 (78) :3311-3315.
- [10] Hammond J M ,Jansen E S ,Morrissy C J ,et al. Oral and subcutaneous vaccination of commercial pigs with a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 gene [J]. Arch Virol ,2001 ,146 :1787-1793.
- [11] Hammond J M ,Mccoy R J ,Jansen E S ,et al. Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever [J]. Vaccine ,2000 ,18 (11/12) :1040-1050.
- [12] Gnsberg H S ,Lundholm B U ,Horswood R L ,et al. Role of early region3 (E3) in pathogenesis of adenovirus disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA ,1989 ,86 (10) :3823-3827.
- [13] Papp Z ,Babiuk L A ,Baca estrada M E. The effect of preexisting adenovirus specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1 [J]. Vaccine ,1999 ,17 :933-943.
- [14] 赵小东 ,韩峰 ,应革 ,等. 表达流行性感冒病毒 HA 基因非复制型重组腺病毒的构建及免疫效果的研究 [J]. 病毒学报 ,2005 ,21 (1) :6-10.
- [15] Van B J G. Serological aspects of the vaccination against hog cholera with crystal violet vaccine [J]. Tijdschr Diergeneeskd ,1966 ,91 :149-170.
- [16] Kimman T G ,Bianchi A T ,Wensvoort G ,et al. Cellular immune response to hog cholera virus (HCV) : T cells of immune pigs proliferate in vitro upon stimulation with live HCV ,but the E1 envelope glycoprotein is not a major T - cell antigen [J]. J Virol ,1993 ,67 :2922-2927.
- [17] Edwards S. Survival and inactivation of classical swine fever virus [J]. Vet Microbiol ,2000 ,73 :175-181.