

新疆伊犁地区不同品种犬博尔纳病病毒自然感染调查

展群岭 张英英 徐鸣明 胡永波 吴秀玲 余建平 陈晓 朱丹 杨德雨 谢鹏

【摘要】 目的 调查新疆伊犁地区不同品种犬博尔纳病病毒(BDV)流行现状和分析其可能的种系来源。**方法** 采用改进的巢式反转录 PCR(nRT-PCR)方法,检测犬外周血单核细胞(PBMCs)BDV 磷蛋白(p24)RNA 基因片段。用 BDV 核蛋白(p40)RNA 片段和质粒 PMD19 标准品验证 p24 阳性产物,排除可能的假阳性。验证后的阳性产物进行基因测序、同源比对、氨基酸序列和系统发生学分析。**结果** 8 个品种 150 只犬中,仅哈萨克牧羊犬检出 BDV p24 片段,阳性率为 11.0%(10/91)。基因序列与德国马 He/80 和德国绵羊 S6 病毒株同源相似度分别为 99.2%和 95.7%,氨基酸相似度为 100%和 89.3%,亲缘关系与 He/80 最近,其次为 S6。**结论** 新疆伊犁地区哈萨克牧羊犬可能存在 BDV 自然感染,其流行株与该地区伊犁马感染的 He/80 和引进德国美利奴绵羊的 S6 病毒株有关。

【关键词】 博尔纳病病毒; 磷蛋白 RNA; 巢式反转录-聚合酶链反应; TaqMan 探针; 犬

Epidemiological investigation on natural infection of different canine breeds with Borna disease virus in Ili, China ZHAN Qun-ling*, ZHANG Ying-ying, XU Ming-ming, HU Yong-bo, WU Xiu-ling, YU Jian-ping, CHEN Xiao, ZHU Dan, YANG De-yu, XIE Peng. *Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
Corresponding author: XIE Peng, Email: peng.xie58@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the epidemiological pattern of Borna disease virus (BDV) among different canine breeds in Ili, China, and to analyze its potential phylogeny. **Methods** BDV p24 RNA fragments were detected from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of canine by modified nested RT-PCR (nRT-PCR). Possible false positives were excluded by determination of both BDV p40 RNA fragments and PMD19 plasmid standards. Analysis were performed on genetic sequence, homologous comparison, amino acid sequence and phylogeny after p24 positive products were validated. **Results** BDV p24 RNA fragments were found only in *Kazakh Tobet* (a shepherd dog) in 8 breeds of 150 cases and their overall positive rate was 11.0% (10/91). Compared with the strain of He/80 from horse and that of S6 from sheep in Germany, the homologous similarities of *Kazakh Tobet* was 99.2% and 95.7%, and that of amino acid as 100% and 89.3%, respectively. The kinship of *Kazakh Tobet* was close to He/80 and next to S6. **Conclusion** There was potential natural BDV infection in *Kazakh Tobet* in Ili, and its endemic strain was concerned with He/80 infecting Ili horse and S6 of *German Merino* sheep introduced into the region from Germany.

【Key words】 Borna disease virus; p24 RNA; Nested reverse transcription-polymerase chain reaction; TaqMan probe; Canine

博尔纳病病毒(Borna disease virus, BDV)属有包膜、非分节段的单股负链 RNA 病毒,在自然和实验宿主中具有高度的嗜神经性。基因组 8.9 kb, 6 个开放读码框,分别编码核蛋白(p40)、磷蛋白(p24)、

基质蛋白(p16)、非糖基化蛋白(p10)、糖蛋白(p56)和 L-多聚酶^[1]。其中, p24 和 p40 在宿主细胞中含量相对较高,常用于 BDV 血清学和分子生物学检测^[2]。BDV 自然感染广泛波及哺乳动物和人类^[3,4],引起病毒性脑炎^[5]、抑郁症^[6]、精神分裂症和神经行为异常^[7],其传播途径不明。犬与绵羊和人类接触最为密切,自然感染仅国外个案报道^[8,9],国内尚未进行大规模流行病学调查。本课题组采用改进的巢式反转录 PCR(nRT-PCR)方法,检测新疆伊犁地区不同品种犬外周血单核细胞(PBMCs)BDV p24 基因片段,了解该地区犬 BDV 自然感染现状和可能的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.010.002

基金项目:“十一五”国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA02Z196)

作者单位:400016 重庆医科大学附属第一医院神经内科(展群岭、张英英、徐鸣明、胡永波、余建平、陈晓、朱丹、杨德雨);新疆石河子大学医学院第二附属医院麻醉科(吴秀玲);重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆医科大学神经科学研究中心(谢鹏)

通信作者:谢鹏, Email: peng.xie58@gmail.com

种系来源。

材料与方法

1. 实验对象:参照德国绵羊 BDV p24 片段调查数据(阳性检测率 11.5%^[10])估计调查犬样本量,其结果为 133 只($p_1=0.10, p_2=0.03, power=0.90$),考虑样本失检因素,实际采样 160 只。采用分层、多阶段和整群抽样方法对新疆伊犁地区 1 市 8 县进行调查。每份样本均采集犬外周血 10 ml,置 EDTA 抗凝管中待分离单核细胞。样本采集时间为 2007 年 8 月 15 日至 12 月 14 日。

2. BDV p24 片段引物和探针:根据 GenBank BDV 基因组保守区编码 p24 第二开放阅读框(ORF II)核苷酸序列,设计 2 对引物和 1 条探针。外引物 P1: 5'-TGA CCC AAC CAG TAG ACC A-3', P2: 5'-GTC CCA TTC ATC CGT TGT C-3'; 内引物 P3: 5'-CCC TCC AAG TGG AAA CCA T-3', P4: 5'-CAG TAT CTT GAT GTT CTC GCC A-3'; 荧光探针序列 5'-FAM- TCA GCG GTG CGA CCA CTC CGA TAG C-TAM RA-3'。引物由上海英骏生物有限公司合成,探针由中山医科大学达晖基因诊断中心合成。

3. BDV p40 片段引物:根据 BDV p40 核苷酸序列设计 1 对引物。上游引物: 5'-CGA CAG GTA GGA TTC ACG AGG C-3', 下游引物: 5'-AGA CAT CAG GCA GAA CGC AGT G-3', 由赛百盛公司合成。

4. 质粒 PMD19 标准品引物:设计一对引物,引物位置分别位于 PMD19 骨架和连接 BDV p24 基因片段。上游引物: 5'-CTG ATG CTG TCG GAG TGG-3', 下游引物: 5'-CGG TGA TGA CGG TGA AAA-3'。由赛百盛公司合成。

5. RNA 提取:用 Ficoll-conray 液密度梯度离心法分离外周血 PBMCs, Trizol 一步法提取 RNA。伪随机数字选取 10 例 RNA 样本,紫外分光光度计测定 A260 nm 和 A280 nm 值,计算比值分析 RNA 样品纯度,琼脂糖凝胶电泳分析其完整性。

6. BDV p24 片段检测:用改进的 nRT-PCR 方法,即在 nRT-PCR 方法基础上,第二轮 PCR 过程中加入 TaqMan 荧光探针。在检测中均设置阴性对照(非模板)和阳性对照(PMD19 质粒标准品)以排除假阳性和假阴性。

(1)反转录反应:反应体系 10 μ l: RNA 样本 5 μ l, 5 \times 反转录缓冲液 2 μ l, 外上下游引物各 0.2 μ l,

10 mmol/L dNTP 0.1 μ l, 20 U/ μ l 反转录酶 0.5 μ l, DEPC H₂O 2 μ l。反应条件:37 $^{\circ}$ C 60 min, 95 $^{\circ}$ C 3 min。

(2)第一轮 PCR:反应体系 25 μ l: 5 \times 定性 PCR 缓冲液 5 μ l, 外上下游引物各 0.3 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.3 μ l, 3 U/ μ l Taq 聚合酶 1 μ l, 反转录产物 5 μ l, ddH₂O 13.1 μ l。反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 25 个循环。

(3)荧光定量 PCR:反应体系 50 μ l: 5 \times 定量 PCR 缓冲液(含 25 mmol/L MgCl₂) 10 μ l, 内上下游引物各 0.5 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ l, 3 U/ μ l Taq 聚合酶 1 μ l, 荧光探针 0.5 μ l, PCR 产物 5 μ l, ddH₂O 32 μ l。反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 93 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环。运用 Rotor-gene 6000 荧光定量 PCR 仪实时定量检测。PCR 产物长度为 86 bp。

7. BDV p40 基因片段检测:采用 RT-PCR 方法。反转录反应过程同(1)。PCR 反应体系共 20 μ l, 包括 PCR Mix 10 μ l, ddH₂O 7 μ l, 上下游引物各 1 μ l 及反转录产物 1 μ l。反应条件:采用降落 PCR 扩增, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, (66~58 $^{\circ}$ C, 每两个循环降 2 $^{\circ}$ C) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物长度为 154 bp。

8. 质粒 PMD19 标准品检测:采用 RT-PCR 方法。反转录反应过程同(1)。PCR 反应体系共 20 μ l, 包括 PCR Mix 10 μ l, ddH₂O 7 μ l, 上下游引物各 1 μ l 及反转录产物 1 μ l。反应条件:采用降落 PCR 扩增, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, (64~56 $^{\circ}$ C, 每两个循环降 2 $^{\circ}$ C) 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 扩增长度为 480 bp。

9. PCR 产物测序和系统发生学分析:阳性 BDV p24 产物,经 BDV p40 和质粒 PMD19 标准品验证后进行纯化和克隆,由上海生工生物工程技术有限公司测序。以 GenBank 提供的德国马 He/80 (Access Number: L27077) 和德国绵羊 S6 病毒株 (Access Number: U94885) 作为参照,对测序结果进行基因同源性和氨基酸序列比对分析,重构系统发生树评价 BDV 种系发生。

10. 统计学和生物信息学分析:用 Minitab 15 统计软件估计样本量; SPSS 16.0 软件产生伪随机数字进行随机抽样; 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$),

均数比较 ANOVA; 计数资料用 Fisher 精确 χ^2 检验。应用 EMBL、DNAMAN 5.2 和 DnaSP 4.0 软件分析基因同源性和氨基酸序列; MEGA4.0 软件重构 NJ (Neighbor-Joining, bootstrap 1000) 基因系统发生树。

结 果

1. 犬品种构成及性别、年龄比较: 采集的 160 只犬失检 10 只, 实际检测 150 只。其中, 哈萨克牧羊犬 (*Kazakh Tobet*, KT; 91 只, 60.7%)、德国牧羊犬 (*Schaferhund*, 24 只, 16.0%)、卡罗来纳犬 (*Carolina Dog*, 12 只, 8.0%)、西伯利亚雪橇犬 (*Siberian Husky*, 8 只, 5.3%)、猎犬 (*Hound*, 6 只, 4.0%)、小猎犬 (*Beagle*, 4 只, 2.7%)、德国杜宾犬 (*Doberman*, 3 只, 2.0%) 和梗犬 (*Terrier*, 2 只, 1.3%) 8 个品种。前 5 种犬性别 ($\chi^2 = 1.464, P = 0.859$) 与年龄 ($F = 1.427, P = 0.198$) 比较无差异。后 3 种因样本量较小, 未进行统计推断。

2. RNA 提取质量的评价: 随机选择 10 只犬的 RNA 样本, 紫外分光光度计测定 A260 nm/A280 nm 值, 比值分别为 1.93、1.82、1.81、1.84、1.94、1.87、1.82、1.91、1.89 和 1.92; 3% 琼脂糖凝胶电泳可见明显的 28S、18S 和 5S 三条带, 其中 28S 与 18S 的亮度约为 2:1, 表明所提取的 RNA 样品纯度较高, 完整性良好。

3. 样本 BDV p24 的检测: 用改进的 nRT-PCR 检测 150 只犬样本 BDV p24 基因片段。结果显示仅在 91 只 KT 中检出 10 只犬的 BDV p24 基因片段, 阳性率为 11.0% (10/91), 其他犬均为阴性 (图 1)。

4. 检测 BDV p40 验证 p24: RT-PCR 检测 150 只犬样本的 BDV p40 基因片段, 结果显示 10 只犬的 BDV p40 片段阳性, 与 BDV p24 阳性检测结果一致, 均在 3% 琼脂糖凝胶电泳 154 bp 出现一清晰的条带,

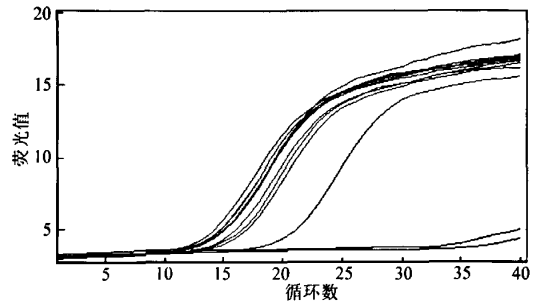
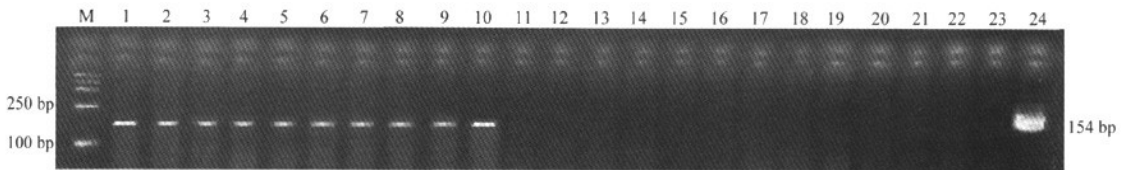


图1 KT BPMCs BDV p24 片段荧光扩增曲线

其余样本均为阴性 (图 2)。

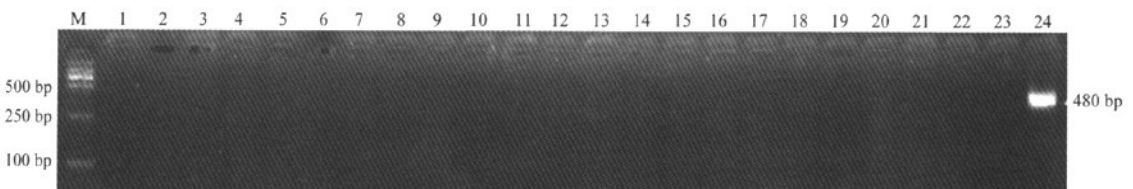
5. 检测质粒 PMD19 标准品验证 BDV p24: RT-PCR 检测 150 只犬样本质粒标准品。结果显示在 10 只犬的 BDV p24 和 p40 均为阳性的样本中, 未检出质粒标准品, 在 3% 琼脂糖凝胶电泳 480 bp 处未见条带 (图 3)。

6. BDV p24 基因片段序列同源性和氨基酸序列分析: 登录 GenBank 检索与 KT BDV p24 相关序列片段。10 只 KT 的 p24 序列与 He/80 和 S6 同源相似度分别为 99.2% 和 95.7%, 核苷酸差异度 $\pi = 0.008 \pm 0.004$ 和 $\pi = 0.043 \pm 0.021$, 碱基转换/颠换偏倚 R 值 (临界值为 2.0) 为 1.4 和 13.3, 氨基酸序列相似度分别为 100.0% (一致度 98.8%) 和 89.3%。He/80 序列 1673 位点碱基 T 被 KT078 颠换为 A, 氨基酸序列亮氨酸 (L) → 甲硫氨酸 (M); S6 序列 1659、1668 和 1674 位点碱基 C、G、C 被犬 KT012 ~ KT077 置换为 T、A、T, 氨基酸序列苏氨酸 (T) → 异亮氨酸 (I)、甘氨酸 (G) → 谷氨酸 (E)、丝氨酸 (S) → 亮氨酸 (L); S6 序列 1659、1668、1673 和 1674 位点碱基 C、G、T、C 被 KT078 置换为 T、A、A、T, 氨基酸序列苏氨酸 (T) → 异亮氨酸 (I)、甘氨酸 (G) → 谷氨酸 (E)、丝氨酸



注: 1~10: p40 阳性样本; 11~20: 随机阴性样本; 21~23: 阴性对照; 24: 阳性对照

图2 BDV p40 片段琼脂糖凝胶电泳



注: 1~10: BDV p24 和 p40 均阳性样本; 11~20: 随机阴性样本; 21~23: 阴性对照; 24: 阳性对照

图3 质粒 PMD19 标准品琼脂糖凝胶电泳

(S)→甲硫氨酸(M), S6 序列 1659、1668、1673 和 1674 位点碱基 C、G、T、C 被 KT079 置换为 T、A、C、T, 氨基酸序列苏氨酸(T)→异亮氨酸(I)、甘氨酸(G)→谷氨酸(E)、丝氨酸(S)→亮氨酸(L), 见表 1。

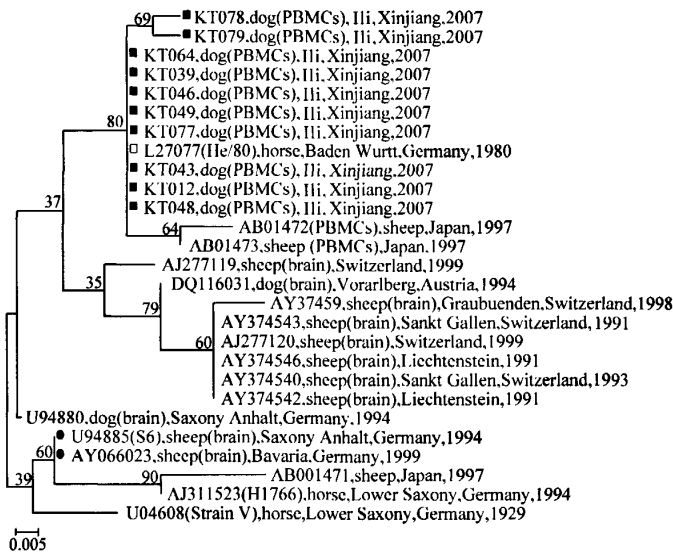
7. BDV p24 阳性片段序列系统发生树分析:KT 所测序列与 GenBank 检索获得犬、绵羊和马相关序列共同重构 BDV p24 基因 NJ 系统发生树。结果发现 KT078 和 KT079 汇聚形成一独立支系,再与其他 KT 和 He/80 聚合,最后同德国绵羊聚合。以 He/80 为外群(outgroup),KT 流行株与 S6 株相对进化速率 r 无差异($\chi^2=1.00 \sim 3.00, P=0.08 \sim 0.32$), 见图 4。

讨 论

目前 BDV 自然感染分布范围包括欧洲、北美洲以及中国和日本在内的亚洲^[11];自然宿主主要为马

和绵羊,其次为美洲驼、猫和牛等。中国于 2002 年 4 月首次报道重庆地区 50 例精神分裂症、情感障碍和病毒性脑炎患者 PBMCs 中检出 BDV p24 片段,其阳性率分别为 11.8%、7.7%和 5.0%^[12],提示上述疾病发病可能与 BDV 感染有关。此后对不同地区贮存宿主相继进行了检测,其阳性率不同。2003 年 11 个省市 61 例慢性疲劳综合征患者的脑脊液阳性率为 11.48%^[13];2004 年黑龙江地区 76 例正常人和 34 匹马 PBMCs 分别为 9.2%和 23.5%^[14];同年重庆地区 15 例格林-巴利综合征患者 PBMCs 为 6.67%^[15];2006 年宁夏及其周边地区患者 52 例病毒性脑炎脑脊液以及 53 例抑郁症和 360 只绵羊 PBMCs 分别为 11.54%、11.32%和 7.78%^[16];同年重庆地区 60 只山羊 PBMCs 和脑组织分别为 8.3%和 10.0%^[17];2008 年新疆伊犁地区 120 匹伊犁马 PBMCs 和脑组织均为 2.5%^[18];2009 年贵州省遵义地区 300 只山羊 PBMCs 为 0.67%^[19]。迄今为止,国内可能 BDV 感染主要分布于重庆、黑龙江、宁夏、新疆和贵州等地区,其流行株包括 He/80、H1766、strain V、H544、澳大利亚 S88、C6BV、BDV/MDCK 等。随着流行病学调查的不断深入,其分布范围逐渐扩大,宿主和病毒株种类也随之增多。

改进的 nRT-PCR 方法具有省力、省时、定量、实时以及敏感性和特异性高等特点,已应用于 BDV 检测^[20]。本研究对该方法检测的阳性结果进行 BDV p40 和质粒标准品的进一步验证,确保结果准确。伊犁地区与犬相关的牧羊群主要为 1963 年引自德国 Saxony 的美利奴绵羊(German merino sheep)及其杂交后代(中国美利奴-新疆型羊)^[21,22],其感染率可能



注:系统树分支处数字为各分支 1000 次 bootstrap 重抽样的置信值

图 4 重构 KT BDV p24 阳性片段序列基因系统发生树

表 1 BDV p24 扩增片段与 He/80 和 S6 病毒株核苷酸序列比对

| 样本编号 | 1610 | 1620 | 1630 | 1640 | 1650 | 1660 | 1670 | 1680 | 1690-5 |
|-------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------|
| He/80 | CCCTCAAGT | GGAAACATC | CAGACAGCTC | AGCGTGGCGA | CCACTCCGAT | AGCATCAGAA | TCCTTGCGGA | GAACATCAAG | ATACTG |
| S6 | | | | |C..... |G..... |C..... | | |
| KT012 | | | | | | | | | |
| KT039 | | | | | | | | | |
| KT043 | | | | | | | | | |
| KT046 | | | | | | | | | |
| KT048 | | | | | | | | | |
| KT049 | | | | | | | | | |
| KT064 | | | | | | | | | |
| KT077 | | | | | | | | | |
| KT078 | | | | | | |A..... | | |
| KT079 | | | | | | |C..... | | |

相近,故参照德国绵羊估计KT样本量。

1929年和1994年分别在德国Lower Saxony的马匹中分离出Strain V(Access Number:U04608)和H1766(Access Number:AJ311523);1994年又在德国Saxony Anhalt牧羊犬(Access Number:U94880)和绵羊(Access Number:U94885)的脑组织中分离出BDV^[11]。随着优良品种美利奴绵羊的引进,BDV可能随之输入伊犁地区。本研究关注该地区不同品种犬可能的自然感染状况和种系来源,对8个品种150只犬外周血进行检测。结果提示:①KT感染可能来源于已感染的伊犁马。KT BDV p24基因片段与德国马He/80存在高度同源相似度(99.2%),与He/80亲缘关系最近,伊犁马感染的病毒株亦为He/80^[18]。②KT感染可能来源于该地区引进的美利奴绵羊。8个品种犬中仅KT检出BDV p24片段,感染率(11.0%)与德国绵羊相近(11.5%),同源性与德国绵羊S6株存在高度相似度(95.7%),亲缘关系与S6较近。其可能的原因:KT与该地区美利奴绵羊接触频繁,增大了感染的机会,其余品种犬包括德国牧羊犬在内为宠物犬,与其他动物包括伊犁马和该地区绵羊等接触相对较少。该牧羊犬疫病病原可能来自伊犁马He/80的交叉感染和引进德国Saxony美利奴绵羊S6病毒株的输入感染。由于本研究BDV p24扩增序列的有限,上述结论有待于进一步证实。

BDV是一种人畜共患病病毒,血清学筛查结果显示,牧区健康人群中BDV阳性率显著高于城市居民,显示BDV可能通过动物水平传播给人类^[23]。伊犁地区为我国三大牧区之一,其牲畜种类繁多,与人类关系密切,易出现类似1885年德国Saxony Borna镇所发生马和绵羊博尔纳病的爆发性流行^[24],加之KT基因突变所引起蛋白质多肽链氨基酸序列的变化,改变了BDV生物学行为,可能将给人类和动物造成不可预知的风险,应引起高度重视。

参 考 文 献

[1] de la Torre JC. Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol*, 1994, 68 (12):7669-7675.

[2] Kamhieh S, Flower RL. Borna disease virus (BDV) infection in cats. A concise review based on current knowledge. *Vet Q*, 2006, 28(2):66-73.

[3] Caplazi P, Waldvogel A, Stitz L, et al. Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol*, 1994, 111(1):65-72.

[4] Flower RLP, Kamhieh S, McLean L, et al. Human Borna disease virus infection in Australia: serological markers of infection in

multi-transfused patients. *Apmis*, 2008, 116:89-93.

[5] Xie P, Li Q, Zeng ZL, et al. Borna disease virus infection in patients with viral encephalitis. *Neurology*, 2008, 70 (11): A101.

[6] Bode L, Dietrich DE, Stoyloff R, et al. Amantadine and human Borna disease virus in vitro and in vivo in an infected patient with bipolar depression. *Lancet*, 1997, 349(9046):178-179.

[7] Tomonaga K. Virus-induced neurobehavioral disorders: mechanisms and implications. *Trends Mol Med*, 2004, 10(2):71-77.

[8] Okamoto M, Kagawa Y, Kamitani W, et al. Borna disease in a dog in Japan. *J Comparat Pathol*, 2002, 126(4):312-317.

[9] Weissenbock H, Nowotny N, Caplazi P, et al. Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol*, 1998, 36 (7):2127-2130.

[10] Vahlenkamp TW, Konrath A, Weber M, et al. Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol*, 2002, 76 (19):9735-9743.

[11] Kolodziejek J, Durrwald R, Herzog S, et al. Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J General Virol*, 2005, 86:385-398.

[12] 邹德智. 神经精神病人外周血博尔纳病病毒p24基因检测. 重庆医科大学, 2002.

[13] 李永杰, 王得新, 张凤民, 等. 中国慢性疲劳综合征患者血浆中BDV-p24抗体的检测. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, (4): 330-333.

[14] 马培林, 张凤民, 李桂梅, 等. 博尔纳病病毒自然感染状况及其核苷酸序列. *中国公共卫生*, 2004, (4):408-410.

[15] 徐平, 谢鹏, 邹德智. 博尔纳病病毒与慢性格林-巴利综合征. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 2(6):425.

[16] 王振海, 谢鹏, 韩玉霞, 等. 宁夏及其周边地区博尔纳病病毒感染的分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(6): 479-482.

[17] 赵立波, 谢鹏, 牟君, 等. 重庆市山羊博尔纳病病毒p24基因的检测. *中国兽医科学*, 2006, (6):460-463.

[18] 朱丹, 曾志磊, 彭丹, 等. 新疆伊犁地区马群中博尔纳病病毒自然感染调查. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(11):1106-1109.

[19] 王长明, 徐平, 葛均江, 等. 贵州遵义地区山羊Borna病毒p24基因片段的检测. *中国人兽共患病学报*, 2009, 25(2):149-151.

[20] Wensman JJ, Thoren P, Hakhverdyan M, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus. *J Virol Methods*, 2007, 143(1):1-10.

[21] 陈周田. 伊犁六十二团德国美利奴羊品质现状调查. *新疆农业科学*, 1985, (5):35-36.

[22] 杨菊清, 杨开伦, 王子荣, 等. 德国美利奴山羊对伊犁河谷气候适应能力的观察. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(6):135-137.

[23] Takahashi H, Nakaya T, Nakamura Y, et al. Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms. *J Med Virol*, 1997, 52(3):330-335.

[24] Richt JA, Pfeuffer I, Christ M, et al. Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis*, 1997, 3(3):343-352.

(收稿日期:2009-04-23)

(本文编辑:张林东)