doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.12.03

首例兽用活疫苗中污染副流感病毒 5 型的检测

吴华伟[1],秦义娴[1],陈晓春[1],曹明慧[1],林梓栋[2],邓 永[1],刘 丹[1]

(1.中国兽医药品监察所,北京 100081;2.广东永顺生物制药股份有限公司,广州 010030)

[收稿日期] 2018-09-17 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2018) 12-0016-08 [中图分类号]S852.65

[摘 要] 从某企业送检的猪伪狂犬活疫苗中检出疑似血凝性外源病毒污染,经病原学和分子生物学鉴定,证实该疫苗污染了 PIV5,并对我国主要猪用活疫苗中污染 PIV5 情况进行了摸底检测。将样品经伪狂犬病毒特异性阳性血清中和后,接种 Vero 细胞连传 5 代,可出现细胞圆缩、聚集、颗粒增多等细胞病变。纯净性检测显示该分离株无细菌污染、支原体污染和外源病毒污染。将该分离毒株 F10 代培养物进行病毒含量和 HA 效价测定,分别为 $10^{7.0}$ $TCID_{50}$/mL 和 1∶256。以 PIV5 单克隆抗体作为一抗进行 IFA 染色,可在感染细胞的胞浆中观察到典型的绿色荧光;采用针对 PIV5 的 L 基因设计特异性引物,经 RT-PCR 可扩增出 277 bp 特异性片段,经测序后与 GenBank 中已发表的 8 株 PIV5 序列进行同源性比较,同源性为 93.1%~97.4%,其中与我国分离的来自小熊猫的 PIV5 ZJQ-221株(登陆号:KF100034.1)同源关系最近,为 97.4%;其次与犬源、猴源、牛源的 PIV5 同源性均在 95.5%以上,与猪源的 PIV5 同源性为 93.3%~95.9%,同源性均较高。基因序列系统进化树分析显示同样的结果。以上试验证明疫苗中污染的病毒为 PIV5,并命名为 PIV5/01 株。针对国内猪用活疫苗中污染 PIV5 情况的初步摸底检测显示,PIV5 污染率约为 16.7%,提示应加强疫苗中污染 PIV5 的预防和控制。

[关键词] 疫苗;污染;副流感病毒 5 型

The First Case of Contamination with Parainfluenza Virus 5 in Veterinary Live Vaccine

WU Hua-wei[1], QIN Yi-xian[1], CHEN Xiao-chun[1], CAO Ming-hui[1],
LIN Zi-dong[2], DENG Yong[1], LIU Dan[1]

(1.*China Institute of Veterinary Drug Control*, *Beijing* 100081, *China*;
2.*Guangdong Win-Sun Biopharmaceutical Incorporated Company*, *Guangzhou* 010030, *China*)

Abstract: Suspected hemagglutinating exogenous virus contamination was detected in a live procine Pseudorabies vaccine. It was confirmed by etiology and molecular biology that the vaccine was indeed contaminated by PIV5, and further detections were performed in major domestic live pig vaccine. The contaminated sample was first neutralized by Pseudorabies virus-specific positive serum, and subsequently inoculated with Vero cells for 5

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0208603)

作者简介: 吴华伟,副研究员,从事兽用生物制品检验和研究工作。E-mail:wuhuawei@ ivdc.org.cn

generations. Cytopathic effects such as cell circle shrinkage, aggregation and granulation increase were observed. Purity test indicated that the isolate was free from bacterial contamination, mycoplasma contamination and exogenous virus. Virus content and HA titer of the F10 generation culture of the isolate were measured, the results were $10^{7.0}$ $TCID_{50}$/mL and 1 ∶ 256 respectively. Typical green fluorescence was observed in the cytoplasm of infected cells by IFA staining with monoclonal antibody against PIV5. Meanwhile, the 277 bp specific sequence fragment could be amplified by primers specially designed for the L gene of PIV5. The fragment was sequenced and compared with publised PIV5 sequences of strain 8 in Genbank, the nucleotide homology is within 93.1%~97.4%, and the most closely related strain is PIV5 ZJQ-221 isolated from lesser panda in China, which share up to 97.4% homology with the isolate. With respect to PIV5 from dog, monkey and bovine origin, the homology is above 95.5%. This isolate in particular shares quite high homolgy with pig-derived PIV5 which range from 93.3 to 95.9%. The results of the phylogenetic tree analysis of gene sequence system draw the same conclusion. The tests above proved that the virus contaminated in the vaccine was PIV5, and named as strain PIV5/01. In addition, the preliminary tests for PIV5 contramination among domestic swine live vaccines showed that the contamination rate of PIV5 was about 16.7%, therefore here we remind that prevention and control of PIV5 contamintion in vaccine should be strengthen.

Key words: contamination; vaccine; parainfluenza virus 5

副流感病毒 5 型(Parainfluenza virus 5,PIV5)为单股负链不分节段 RNA 病毒,属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)。1954 年首先在原代猴肾细胞中发现猴病毒 5 型(Simian virus 5,SV5)[1]。不同宿主可分离到该病毒,如人类、猪、牛、犬、猫、虎和小熊猫等[1-3]。我国近几年陆续报道在牛群和猪体中也检测出 PIV5[4-5]。近期,在对某企业送检的猪伪狂犬活疫苗进行外源病毒检验时发现疑似血凝性外源病毒污染,经病原学和分子生物学验证,证实该批产品污染了 PIV5,这也是国内外首次报道生物制品中污染了 PIV5。此外,还对我国现有主要的猪用病毒类活疫苗中污染 PIV5 的情况进行了摸底检测,以期为加强兽用疫苗中 PIV5 污染的预防和控制提供数据参考。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　疫苗、细胞与血清　猪伪狂犬病活疫苗,某公司产品;Vero 细胞和猪伪狂犬病特异性阳性血清,均由中国微生物菌种保藏管理委员会兽医微生物中心提供;PIV5 特异性阳性血清,由中国兽医药品监察所病毒室制备。

1.1.2　主要试剂　DMEM 营养液 ,Gibco 公司产品;胎牛血清,PAN 公司产品;Ex-Taq 酶,宝生物工程(大连)有限公司产品;Trizol,Invitrogen 公司产品;IPTG、X-gal,购自北京索莱宝科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;T 载体和感受态细胞,购自 Tansgen 公司;PIV5 单克隆抗体,购自 USbiological 公司;羊抗小鼠 IgG FITC,购自 Sigma 公司。

1.1.3　主要仪器　PCR 仪、电泳仪、紫外成像仪、倒置荧光显微镜(莱卡)等。

1.2　方法

1.2.1　样品的处理与接种　按《中国兽药典》三部附录 3305 进行[6]。随机取疫苗 3 瓶,同批疫苗混匀后,2000~3000 g 离心 10 min,取上清液加入等体积猪伪狂犬病阳性血清,37 ℃中和作用 1 h,接种已长成良好单层的 Vero 细胞(75 cm2),3 mL/瓶,37 ℃孵育 1 h,补加含 2%胎牛血清的 DMEM 维持液至 10 mL。置 37 ℃ 5%二氧化碳的培养箱培养 5 d,每天观察 CPE。

1.2.2　F3 代培养物 HA 效价测定　按 1.2.1 进行培养,继代 3 次后,3000 r/min 离心 15 min 后,取上

清液用 PBS(0.1 mol/L,pH 7.0~7.2)作 2 倍系列稀释,加入 0.5%鸡红细胞悬液,混合均匀后,置 37 ℃孵育 20~40 min,进行 HA 效价判定,同时设立红细胞对照。当细胞对照孔的红细胞呈显著纽扣状时判定结果,以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点。

1.2.3 病毒分离 按 1.2.1 进行培养,如此盲传 5 代,如出现 CPE,且经 RT-PCR 检测结果为阳性,则视为病毒分离阳性;如无 CPE,且经 RT-PCR 检测结果为阴性,则视为病毒分离阴性。如无 CPE,且经 RT-PCR 检测结果为阳性,则继续盲传继代。

1.2.4 病毒含量测定 将 1.2.3 病毒分离株 F10 代细胞培养物,3000 r/min 离心 15 min,取上清液用不含血清的 DMEM 营养液进行 10 倍系列稀释,取 10^{-1}~10^{-8} 8 个稀释度,每个稀释度接种 8 孔已长成 vero 细胞单层的 96 孔细胞板,每孔 0.1 mL,37 ℃吸附 1 h,补加 2%胎牛血清的 DMEM 营养液培养5 d,同时设正常细胞对照,以 PIV5 单克隆抗体作为一抗(工作浓度 1∶200),以羊抗小鼠 IgG FITC 作为二抗(工作浓度 1∶100)进行间接荧光染色,判定是否感染,按 Reed-Muench 法计算 $TCID_{50}$。

1.2.5 分离株 F10 代细胞培养物 HA 效价测定 将 1.2.3 病毒分离株 F10 代细胞培养物,按 1.2.2 方法进行 HA 效价测定。

1.2.6 纯净性检测 将 1.2.3 病毒分离株 F10 代细胞培养物,按照《中国兽药典》2015 年版三部附录方法[6]分别进行无菌检验、支原体检验和外源病毒检验。

1.2.7 特异性检测

1.2.7.1 间接荧光抗体检测 将毒种用 DMEM 营养液稀释为 100 $TCID_{50}$/0.1 mL,接种 96 孔板单层 Vero 细胞各 8 孔,每孔 100 μL,同时设立正常细胞对照 8 孔。接种后在 37 ℃下吸附 1 h,再补加含 2%新生牛血清的 DMEM 维持液 100 μL,置 37 ℃二氧化碳培养箱培养 96 h,采用间接荧光抗体法判定结果。

1.2.7.2 RT-PCR 检测 根据 GenBank 上 PIV5 相关序列,设计针对 L 蛋白的一对引物:上游引物:5′-C GCCAGCAACAATTACTACC-3′;下游引物:5′-ACAACCCTAATGGGCGTAAC-3′。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,预期片段为 277 bp。

按病毒基因组 RNA 提取试剂盒说明,从分离毒株的细胞培养液中提取 RNA。按一步法 RT-PCR试剂盒说明书进行检测,反应体系为:模板 5 μl,上游引物和下游引物(25 μmol/L)各 1 μL,PrimeScript 1 step Enzyme Mix 1 μL,2×1 Step buffer 12.5 μL,RNase Free dH_2O 4.5 μL,混匀后瞬离。反应条件为:50 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,50 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 5 min;最后 4 ℃保温。用 1.5%琼脂糖平板(溴化乙锭终浓度 0.5 μg/mL)凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.2.7.3 基因序列测定 将 1.2.6.2 的 PCR 产物目的片段的凝胶块切下后,按商品化 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行 DNA 回收,克隆到 pMD18-T 载体上,送北京六合华大基因科技股份有限公司进行序列测定,然后与 GenBank 中已发表的 8 株 PIV5 序列进行同源性比较。采用的 PIV5 毒株信息见表 1。

表 1 序列分析用 PIV5 参考毒株

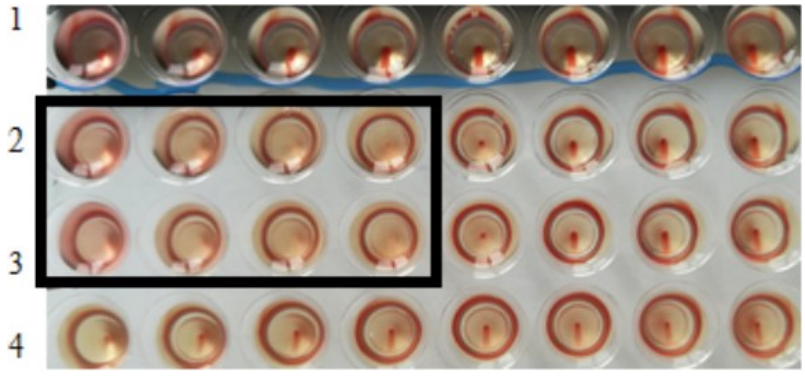
Tab 1 PIV5 reference strains for sequence analysis

毒株名称	登录号/地区	毒株来源	年份
PIV5 78524 株	JQ743319.1/英国	犬	2012
PIV5 CC14 株	KP89389.1/中国	犬	2013
PIV5 W3A 株	M81721.1/英国	猴	2014
PIV5 BC14 株	KM067467.1/中国	牛	2014
PIV5 ZJQ-221	KX100034.1	小熊猫	2016
PIV5 SER 株	JQ743328.1/英国	猪	2012
PIV5 Carina 株	MF170888.1/韩国	猪	2017
PIV5 Rigel 株	MF170889.1/韩国	猪	2017

1.2.8 猪用活疫苗中污染 PIV5 情况摸底检测 随机选取 30 批猪用活疫苗(其中猪繁殖与呼吸综合征活疫苗 20 批,猪瘟活疫苗 10 批),按照 1.2.6.2 方法进行 RT-PCR 检测,分析现有猪用活疫苗中污染 PIV5 情况。

2　结果与分析

2.1　样品 F3 代 HA 效价测定　经测定,以使 0.5% 红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点,PIV5 F3 代培养物 HA 效价为 1∶16(图 1),而正常 Vero 细胞上清液和鸡红细胞对照均沉淀。



1:Vero 细胞培养物上清液; 2、3: PIV5 F3 代培养物;4:0.5%红细胞对照

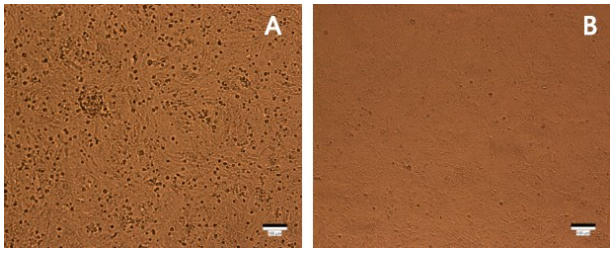
1:The supernatant of normal Vero control;2 and3:The fifth generation PIV5;

4:0.5% chicken red cell suspension control

图 1　PIV5 F3 代细胞培养物 HA 效价测定

Fig 1　The HA titer result of the third generation PIV5

2.2　病毒分离及 RT-PCR 结果　将样品在 Vero 细胞上连续传 5 代后,可发现细胞出现颗粒增多、圆缩、聚集等 CPE(图 2),而细胞对照正常。用设计的特异性引物,对分离培养物 F5 代进行 RT-PCR,可扩增出 277 bp 的目的片段(图 3),扩增结果清晰、无杂带,而 Vero 细胞对照和阴性对照均无任何条带。



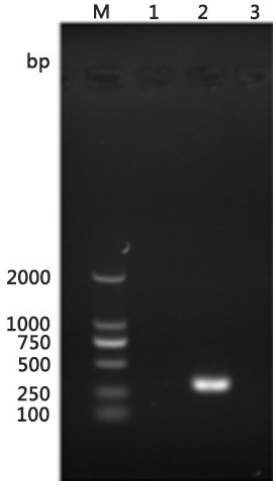
A: PIV5 F5 在 Vero 细胞上产生 CPE;B: Vero 细胞对照

A: CPE appeared on Vero cell infected with the fifth generation PIV5;

B:Normal Vero control

图 2　PIV5 适应 Vero 细胞病变(10×)

Fig 2　The CPE of Vero infected with PIV5(10×)



M:蛋白分子量标准;1: Vero 细胞的 PCR 产物;

2: PIV5 F5 代培养物的 PCR 产物; 3: 阴性对照

M:Protein Marker;1: PCR result of Normal Vero control;

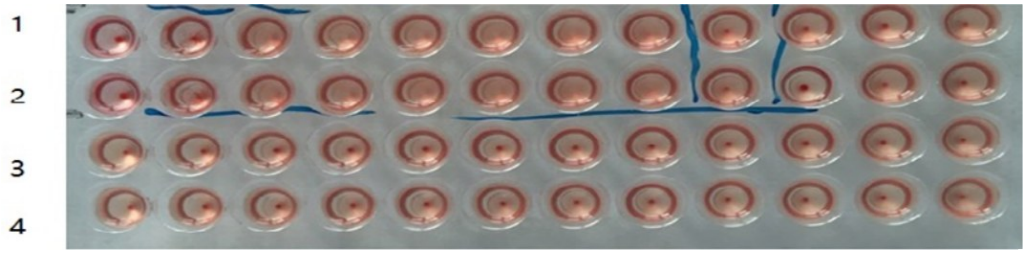
2: PCR result of the fifth generation PIV-5;

3: PCR result of negative control

图 3　PIV5 F5 代细胞培养物 PCR 鉴定

Fig 3　The PCR result of the fifth generation PIV5

2.2　病毒含量及 HA 效价测定结果　经测定,PIV5 F10 代培养物病毒含量为 $10^{7.0}$ $TCID_{50}$/mL;以使 0.5%红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点,BPIV-5 F10 代培养物 HA 效价为 1∶256(图 4),而 Vero 细胞对照上清液和鸡红细胞对照均沉淀。



1、2:PIV-5 F10 代培养物;3:Vero 细胞培养物上清液;4:0.5%红细胞对照

1 and 2:The fifth generation PIV5;3:The supernatant of normal Vero control;

4:0.5% chicken red cell suspension

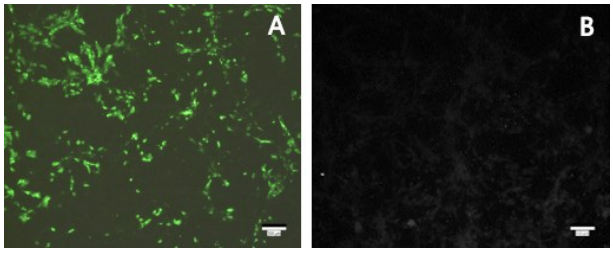
图 4　PIV5 F10 代细胞培养物 HA 效价测定

Fig 4　The HA titer result of the 10th generation PIV5

2.3　纯净性检测　按照 2015 年版《中国兽药典》三部附录方法进行无菌检验、支原体检验和外源病毒检验,结果为无菌生长、无支原体生长和无外源病毒污染,说明该分离毒株纯净性良好。

2.4　特异性检验

2.4.1　IFA 检测　将分离的 PIV5 培养物在 Vero 细胞上培养 96 h,然后以 PIV5 单抗为一抗(工作浓度1∶200),以羊抗鼠 IgG FITC 二抗(工作浓度 1∶100)进行染色,在感染细胞的胞浆可观察到典型的绿色荧光(图 5 A),而细胞对照未出现绿色荧光(图 5B)。



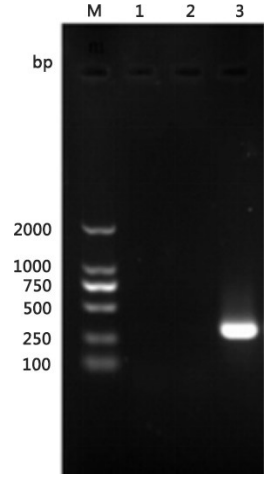
A:PIV5 感染 Vero ;B:Vero 对照

A: Virus infected Vero cell;B: Vero cell control

图 5　IFA 染色结果(10×)

Fig 5　The result of IFA(10×)

2.4.2　RT-PCR 结果　用设计的特异性引物,对分离培养物 F10 代进行 RT-PCR,可扩增出 277 bp 的目的片段(图 6),扩增结果清晰、无杂带,而 Vero 细胞对照和阴性对照均无任何条带。



M:蛋白分子量标准;1: 阴性对照;2:Vero 细胞的 PCR 产物;

3: PIV5 F10 代培养物的 PCR 产物

M:Protein Marker;1: PCR result of negative control

2: PCR result of normal Vero control

3: PCR result of the tenth generation PIV5

图 6　PIV5 F10 代细胞培养物的 PCR 鉴定

Fig 6　The PCR result of the tenth generation PIV5

2.4.3　基因序列测定　将所测的目的片段与 GenBank 中已发表的 8 株 PIV5 的 L 基因序列进行同源性比较,同源性为 93.1%~97.4%(图 7)。其中与我国分离的来自小熊猫的 PIV5 ZJQ-221 株(登陆号:KF100034.1)同源关系最近,为 97.4%;其次与犬源、猴源、牛源的 PIV5 同源性均在 95.5%以上,与猪源的 PIV5 同源性为 93.3%~95.9%,同源性均较高。基因序列系统进化树分析结果显示同样的结果(图 8)。

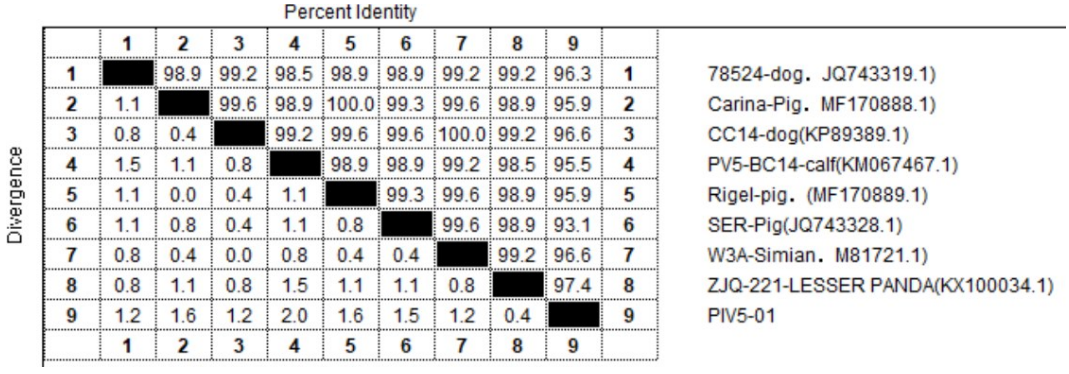


图 7　PIV5/01 株与 GenBank 中 L 基因序列同源性比较结果

Fig 7　Homology analysis between PIV5 and the sequences from GenBank

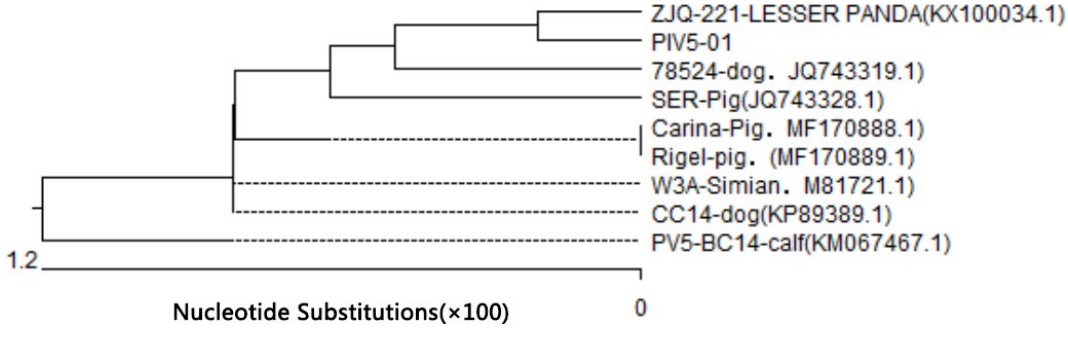


图 8　PIV5/01 株与 GenBank 中 PIV5 基因序列系统进化树

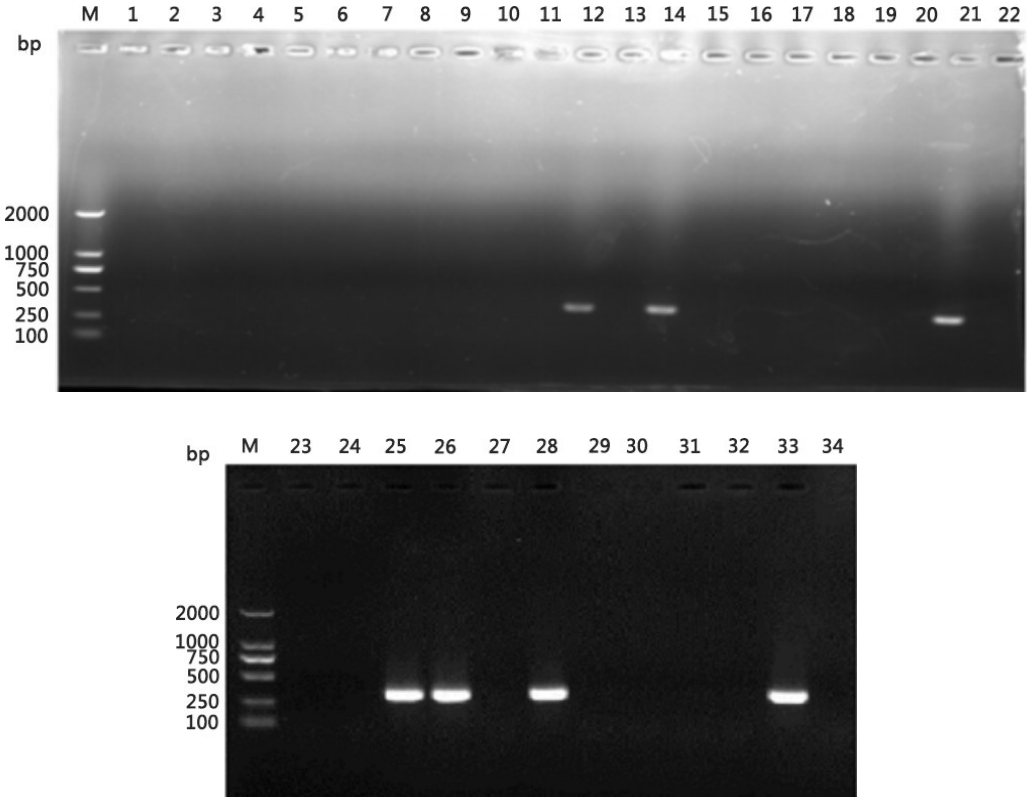
Fig 8　Phylogenetic analysis of PI-5 and sequences from GenBank

3　猪用活疫苗中污染 PIV5 情况检测结果

经对 30 批猪用病毒类活疫苗进行 PIV5 污染情况调查,共检出 5 批阳性样品(图 9),阳性率为 16.7%(5/30),其中猪繁殖与呼吸综合征活疫苗检出 3 批,阳性率为 10%(2/20);猪瘟活疫苗检出 3 批,阳性率为 30%(3/10),显示现有猪用活疫苗 PIV5 污染风险较高。

4　讨论与结论

据报道,PIV5 可以感染包括人类细胞在内的多种细胞,且在大多数细胞中均可获得高滴度的病毒,其中对 Vero 细胞最为敏感,培养滴度可高于 10^{10} PFU/mL[7]。此外,PIV5 感染的细胞也具有较好的红细胞吸附作用和红细胞凝集作用,可凝集豚鼠、鸡、猴等的红细胞,尤其以 4 ℃对鸡红细胞的血凝效价最高[8]。采用 Vero 细胞进行猪伪狂犬活疫苗中污染 PIV5 的分离,并采用鸡红细胞进行 HA 效价测定。结果显示,样品经特异性猪伪狂犬阳性血清中和后,连续继代 5 代,即可出现颗粒增多、圆缩、聚集等 CPE,且其 F10 代培养物的病毒含量和 HA 效价测定分别达到 $10^{7.0}$ $TCID_{50}$/mL 和1∶256,显示出良好的细胞适应性。特异性检测结果显示:采用 PIV5 单克隆抗体作为一抗进行 IFA 检测,



M:蛋白分子量标准;1-20:20 批次 PRRSV 活疫苗样品;23-32:10 批次 CSFV 活疫苗样品;21、33:PIV5/01 株阳性对照;22、34: 阴性对照

M:Protein Marker;1-20:20 batches of PRRSV live vaccines;21-32:10 batches of CSFV live vaccines;

21、33:PCR result of positive control;22、34:PCR result of negative control

图 9　PRRSV 和 CSFV 活疫苗中 PIV5 污染情况检测

Fig 9　The PCR result of PRRSV and CSFV live vaccines

可在 PIV5 感染的 Vero 细胞的胞浆中观察到典型的绿色荧光,这与文献[9]报道的 PIV5 生命周期中不存在 DNA 阶段,只在感染细胞的胞浆中增殖相吻合。RT-PCR 可扩增出预期大小的目的片段;序列比对结果显示与 GenBank 中已发表的 8 株 PIV5 的 L 蛋白序列同源性为 93.1%~97.4%,其中与我国分离的来自小熊猫的 PIV5 ZJQ-221 株(登陆号:KF100034.1)同源关系最近,为 97.4%;与犬源、猴源、牛源的 PIV5 同源性均在 95.5%以上,与猪源的 PIV5 同源性为 93.3%~95.9%,均呈现较高的同源性,系统进化树分析也显示同样的结果。以上病原学和分子生物学结果均证实,从某企业送检的猪伪狂犬活疫苗中检出疑似血凝性外源病毒为 PIV5。

PIV5 可感染不同的宿主,我国近几年也陆续有犬、猴、小熊猫、牛群和猪群中分离到 PIV5 的报道[2-5]。目前,除犬副流感病毒 5 型可引起犬呼吸系统或感染性支气管炎外,陆续也有 PIV5 疑似可引起其他动物发病的报告。Heinen E 等[10]2008 在德国一例 PRRSV 共感染的样品中分离出一株 PIV5(SER 株),2011 年 Yu Na Lee 等[11]从韩国出现呼吸症状猪的肺脏样品中分离出 KNU-11 株 PIV5 2015 年 Liu 等[4]曾报道,在吉林省白城牛场死于呼吸困难和间质性肺炎的犊牛肺组织中分离到一株与猪源 KUN-11 和 SER 株高度同源的 PIV5(PIV5-BC14 株),由于在健康牛中未检测到 PIV5,他们据此推测犊牛的疾病很有可能是由 PIV5-BC14 株引起的。2018 年 Ning Jiang 等[5]从中国 4 个省(市)腹泻相关猪群的肠道组织中分离到5 株与中国分离的小熊猫源 ZJQ-221 株和韩国分离的犬源 1168-1 株高度同源的 PIV5,但未揭示分离株

是否是引起腹泻的病原。尽管尚未看到除犬之外 PIV5 能引起其他物种(如人、猪、牛等)致病的明确报道,但 PIV5 感染的潜在威胁需引起充分重视。从对国内主要猪用活疫苗(以猪繁殖与呼吸综合征活疫苗和猪瘟活疫苗为代表)PIV5 污染状况的初步检测结果看,PIV5 污染的阳性率约为16.7%,提醒我们必须高度重视兽用疫苗中 PIV5 污染的风险,并尽快采取必要措施加以预防和控制。对于兽用疫苗中污染 PIV5,推测其主要原因可能有两个:一是由于目前我国猪群、牛群等动物中存在 PIV5 污染,因此来源于感染或隐性感染动物或组织制备的细胞或分离的毒种存在较大的 PIV5 污染风险,使用它们进行疫苗生产有可能造成终产品 PIV5 污染;二是鉴于目前我国兽用生物制品使用的牛血清、胰酶、培养基、原代细胞(或传代细胞)等生产用原辅材料的质量控制标准不够全面或部分缺失(如缺少胰酶、DMEM 等动物细胞用培养基的质量标准),造成生产用原辅材料质量控制严重缺位,从而可以通过生产环节进入疫苗成品。从兽用生物制品生产过程看,种毒(特别是新分离的野毒株)、细胞、胰酶(猪源或牛源)、牛血清等基础物质和材料是目前我国兽用生物制品外源病毒污染的主要风险点[12],任何一种材料或几种材料污染,都有可能造成终产品疫苗中污染 PIV5。至于本次兽用疫苗中 PIV5 污染的主要原因,尚需进一步进行试验验证。

参考文献:

[1] Hsiung G D. Parainfluenza-5 virus. Infection of man and animal [J]. Prog Med Virol, 1972, 14: 241-274.

[2] 孙 明, 刘巧荣, 秦亚嫚, 等. 犬副流感病毒的分离鉴定及部分基因序列分析[J].中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 77-82.
Sun M, Liu Q R, Qin Y M, *et al*. Isolation andidentification of partial gene sequence analysis of canine influenza virus [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2016, 26(2): 77-82.

[3] 翟俊琼, 周 霞, 邹舒展, 等. 虎源、熊猫源副流感病毒 5 型的鉴定及 F 基因遗传进化分析[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(4): 700-704.
Di J Q, Zhou X, Zou S Z, *et al*. Identification of type 5 influenza virus and genetic evolution analysis of F gene in Huyuan and Xiongmaoyuan [J]. China Veterinary Medical Journal, 2018, 38(4): 700-704.

[4] Liu Y, Li N, Zhang S, *et al*. Parainfluenza virus 5 as possible cause of severe respiratory disease in calves, China[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(12): 2242.

[5] Ning Jiang, Enyu Wang, Donghua Guo, *et al*. Isolation and molecular characterization of Parainfluenza virus 5 in diarrhea-affected piglets in China[J]. J Vet Med Sci, 2018, 18: 80(4): 590-593.

[6] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 [S]. 2015 年版. 北京:中国农业出版社.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. Three Volumes of the Veterinary Pharmacopoeia of the People´s Republic of China[S]. 2015 Edition. Beijing: China Agricultura Press.

[7] Capraro G A, Johnson J B, Kock N D, *et al*. Virus growth and antibody responses following respiratory tract infection of ferrets and mice with WT and P/V mutants of the Paramyxovirus Simian virus 5[J]. Virology, 2008, 376(2): 416-428.

[8] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997:997.
Yin Z, Liu J H. Animal virology[M]. Beijing: Science Press, 1997: 997.

[9] Tompkins S M, Lin Y, Leser G P, *et al*. Recombinant parainfluenza virus 5 (PIV5) expressing the influenza A virus hemagglutinin provides immunity in mice to influenza A virus challenge [J]. Virology, 2007, 362(1): 139-150.

[10] Heinen E, Herbst W, Schmeer N. Isolation of a cytopathogenic virus from a case of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its characterization as Parainfluenza virus 2[J]. Arch Virol, 1998, 143:2233-2239.

[11] Yu Na Lee, Changhee Lee. Complete genome sequence of a novel porcine parainfluenza virus 5 isolate in Korea[J]. Arch Virol, 2013, 158:1765-1772.

[12] 吴华伟,郎洪武,陈晓春,等.《中华人民共和国兽药典》2010 年版三部非禽源细胞及其制品外源病毒检验解读[J].中国兽药杂志,2013,47(1):48-52.
Wu H W, Lang H W, Chen X C, *et al*. Interpretation of detection of extraneous agents in non-avian cells and the products propagated in them in Veterinary Pharmacopoeia of the People´s Republic of China (2010 Edition, Volume Ⅲ) [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013,47(1):48-52.

(编 辑:李文平)