

杨振兴,李占鸿,宋子昂,等. 流行性出血病病毒血清分型 RT-PCR 方法的建立及应用[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 85-92.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.012

流行性出血病病毒血清分型 RT-PCR 方法的建立及应用

杨振兴¹,李占鸿¹,宋子昂²,李卓然¹,朱建波¹,廖德芳¹,杨恒¹

1. 云南省畜牧兽医科学院/云南省热带亚热带动物病毒重点实验室,昆明 650224;

2. 云南农业大学动物科学技术学院,昆明 650201

摘要 以决定流行性出血病病毒(EHDV)血清型的第二基因片段(*Seg-2*)为检测靶基因,设计 7 对特异性引物,建立用于鉴定 EHDV 血清型的 RT-PCR 检测方法,并通过扩增产物的测序,进一步了解病毒 *Seg-2* 的遗传特性。特异性试验结果显示,该检测方法可准确鉴定不同血清型的 EHDV 毒株,与蓝舌病病毒、中山病病毒、阿卡斑病毒均无交叉反应;灵敏度试验结果显示,对不同血清型 EHDV 核酸的检测下限均可达 10^2 拷贝;对我国不同时间与不同地域分离的 EHDV 毒株进行血清型 RT-PCR 鉴定,结果显示分离的 31 株 EHDV 分属 EHDV-1、-5、-6、-7 与 -10 型等 5 种血清型,与血清中和试验的鉴定结果完全吻合。以上结果表明,该方法具有良好的特异性和较高的灵敏度,可快速准确地鉴定 EHDV 毒株的血清型。

关键词 流行性出血病病毒(EHDV); 血清型; *Seg-2*; RT-PCR; 检测方法; 分子诊断

中图分类号 S 852.65⁺9.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)04-0085-08

流行性出血病病毒(epizootic haemorrhagic disease virus, EHDV)主要通过雌性库蚊(*Culiscoides*)吸血叮咬反刍动物进行传播,并感染引起流行性出血病(epizootic haemorrhagic disease, EHD)^[1]。EHD 作为一种严重侵害反刍动物的非接触传染病,广泛流行于热带、亚热带等媒介昆虫活跃的地区,可感染牛^[2]、鹿^[3]、羊驼和部分山羊^[4]等反刍动物,对鹿和牛的危害最为严重^[2-4]。疫病的暴发给肉牛养殖业造成了严重的经济损失,扰乱了畜产品的正常国际贸易,2008 年世界动物卫生组织(OIE)已将该病列为法定报告的跨境动物疫病^[5]。

EHDV 为呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)环状病毒属(*Orbivirus*)成员,基因组由 *Seg-1* 至 *Seg-10* 的 10 个双链 RNA 片段构成,*Seg-2* 编码的病毒外层衣壳蛋白 VP2,是诱导寄主体产生特异性中和抗体的主要蛋白,决定着 EHDV 的血清型^[6-7]。EHDV 的 *Seg-2*/VP2 具有高度变异的特性,不同血清型 EHDV 毒株之间 *Seg-2* 核酸序列的相似度在 43.8%~70.1%,VP2 氨基酸序列相似度在 29.4%~72.2%^[8]。值得注意的是,同一种血清型

的不同地域毒株间 *Seg-2* 核酸序列的差异度可达 29.5%,据此可将同一种血清型 EHDV 毒株进一步分为 2 种地域型,Eastern 型与 Western 型^[9]。澳大利亚、日本和中国的 EHDV 分离株均属 Eastern 型,而分离自美洲、非洲、中东的 EHDV 毒株为 Western 型^[10]。

目前世界范围已发现 9 种血清型的 EHDV (EHDV-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9 和 -10)。EHDV 的不同血清型毒株在世界各地的流行存在较大差异:北美洲和南美洲主要流行有 EHDV-1、-2、-6 型^[10];非洲主要流行有 EHDV-1、-4、-6、-9 型^[4];澳大利亚流行有 EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8 型^[11];地中海地区流行有 EHDV-6 与 -7 型^[12],日本流行有 EHDV-1、-2、-7 与 -10 等 4 种血清型^[13]。我国也同样存在多种血清型 EHDV 的流行,广西流行有 EHDV-5、-6、-7、-8 血清型^[14],广东流行有 EHDV-1 与 -5 型^[15],内蒙古存在 EHDV-6 型^[16],云南省流行有 EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-10 型^[17]。随着近年来全球一体化进程的深入及全球气候变暖,EHD 作为一种虫媒跨境传播疫病,在世界范围

收稿日期:2019-09-04

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0500908;2017YFC1200505);云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目(2017HB055)

杨振兴,助理研究员. 研究方向:牛羊虫媒病毒. E-mail: s300yn@163.com

通信作者:杨恒,博士,研究员. 研究方向:动物虫媒病毒. E-mail: yangheng2008.cool@163.com

的活动范围正日趋扩大,导致的经济损失也在逐步增多。

由于不同血清型 EHDV 毒株间缺乏交叉免疫保护,在自然界中甚至存在一头动物被多种血清型 EHDV 感染的现象,给病毒的血清型鉴定和防控工作带来了极大的阻力^[18],因此,快速准确鉴定本地区流行的 EHDV 毒株血清型具有重要意义。目前,国内尚无 EHDV 血清型特异性 RT-PCR 检测方法的报道,因此,根据我国流行的 EHDV 序列特征,建立快速准确的 EHDV 血清型诊断方法不仅是控制疫情的必要前提,也是制定动物免疫计划的基础。本研究报道了 7 种血清型 EHDV(EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8、-10)特异性 RT-PCR 检测方法的建立以及在中国分离 EHDV 毒株血清型鉴定上的应用,旨在

为我国开展 EHDV 的病原学诊断与流行病学调查提供有力保障。

1 材料与方法

1.1 毒株和质粒

研究中使用的 31 株分离自中国的 EHDV 毒株见表 1,蓝舌病病毒(bluetongue virus,BTV),阿卡斑病病毒(akabane virus,AKAV)和中山病病毒(chuzan virus,CHUV)由笔者所在实验室保存。EHDV-2 型毒株(AUS1979/01)与 EHDV-8 型毒株(AUS1982/06)源自澳大利亚麦克阿瑟-伊丽莎白(EMAI)研究所。EHDV Seg-5(基因节段 5,编码 NS1 蛋白)全长克隆质粒 PLB-EHDV-Seg5 由笔者所在实验室构建保存。

表 1 在中国分离的 EHDV 信息

Table 1 EHDV information isolated from China

病毒编号 Number	血清型 Serotype	分离日期 Date	分离地点 Region	经度 Longitude	纬度 Latitude	动物 Animal
V128	EHDV-1	2013/9/17				
V258	EHDV-6	2016/8/23				
V260	EHDV-6	2016/8/23				
V261	EHDV-6	2016/8/23	广东汕头 Shantou,Guangdong	E116°40'	N23°21'	奶牛 Cow
V259	EHDV-6	2016/8/31				
V262	EHDV-6	2016/8/31				
V263*	EHDV-6	2016/8/31				
V194*	EHDV-1	2016/6/11	广西合浦 Hepu,Guangxi	E108°55'	N21°29'	黄牛 Cattle
V195	EHDV-1	2016/6/11				
V125	EHDV-5	2013/6/27	广西马山 Mashan,Guangxi	E108°09'	N23°42'	水牛 Buffalo
V126	EHDV-5	2013/6/27				
V129	EHDV-5	2013/7/4				
V127*	EHDV-5	2015/7/4	广西融水 Rongshui,Guangxi	E109°15'	N25°8'	水牛 Buffalo
V023*★	EHDV-5	2013/9/16				
V024	EHDV-5	2013/9/16	云南德宏 Dehong,Yunnan	E98°31'	N24°23'	黄牛 Cattle
V132*	EHDV-1	2014/7/29				
V271*	EHDV-5	2014/6/18				
V274*	EHDV-6	2014/7/24	云南普洱 Puer,Yunnan	E101°51'	N22°35'	黄牛 Cattle
V270*	EHDV-5	2014/8/13				
V278*	EHDV-7	2015/8/19				
V003*★	EHDV-6	2012/7/18				
V277*	EHDV-10	2013/6/12				
V269*★	EHDV-7	2013/8/13				
V083*★	EHDV-1	2014/8/12				
V273*	EHDV-6	2015/7/14	云南师宗 Shizong,Yunnan	E104°17'	N24°36'	黄牛 Cattle
V276*	EHDV-6	2015/8/25				
V281	EHDV-1	2016/6/8				
V283	EHDV-6	2016/6/15				
V282	EHDV-10	2016/7/11				
V275	EHDV-5	2016/10/18				
V280*★	EHDV-10	2017/7/11				

注: * 表示该毒株已经完成全基因组测序,★表示选择作为不同血清型 EHDV 的代表毒株进行 RT-PCR 特异性实验。Note: * represents that the whole genome of the strain has been sequenced,★represents that the strain was selected as a representative strain of different serotypes of EHDV for specific test.

1.2 主要试剂

MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit 购自 Ambion 公司; Premix Ex Taq (Probe qPCR) Kit、One Step RT-PCR Kit、PrimeScript II 逆转录酶、RNase Inhibiter、dNTP (10 mmol/L)、Radom 6 mers 随机引物 (50 μmol/L)、EX Taq DNA 聚合酶、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、pMD19-T 载体、*E. coli* DH5α 感受态细胞和 DL5000 Marker 购自 TaKaRa 公司。

1.3 引物设计

从 GenBank 中下载不同血清型 EHDV 毒株 Seg-2 序列,使用 MEGA 7.0 软件与我们前期获取

的 15 株中国分离 EHDV-1、-5、-6、-7、-10 型代表毒株(表 1)的 Seg-2 全长序列进行序列比对。根据序列比对结果,选择不同血清型 EHDV Seg-2 的保守区域使用 Primer Premier 6 软件进行 EHDV 血清型特异性 RT-PCR 引物的设计(表 2)。引物由武汉金开瑞生物有限公司合成,纯度为 HAP 级,用 DEPC 水溶解、稀释至终浓度为 10 μmol/L。

1.4 病毒核酸提取及 cDNA 合成

使用病毒核酸提取试剂盒,按说明书操作提取 EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8、-10 代表毒株(表 1)、BTV、AKAV、CHUV 的病毒核酸。取 5 μL 提取的核酸为模板进行变性处理,使用 PrimeScript II 逆

表 2 EHDV 血清型 RT-PCR 扩增引物

Table 2 Different EHDV serotype-specific primer of RT-PCR

引物编号 Primer number	血清型 Serotype	地域型 Topotype	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	引物位置 Position	产物大小/bp Amplicon length
P1	EHDV-1	Western	EHDV1-S2-F	AACGGACAATCGTGGTGAGAG	1 230~1 251	1 194
			EHDV1-S2-R	GCATACAGCATAGCAACGGTAG	2 378~2 402	
P2	EHDV-2	Eastern	EHDV2-S2-F	GGAGATACTATTTATAAATGGGA	1 311~1 334	1 052
			EHDV2-S2-R	GCCCTATTCACATTCTCATAG	2 321~2 342	
P5	EHDV-5	Eastern	EHDV5-S2-F	AAGGAGACAACCTCGGAAGAGG	1 369~1 390	996
			EHDV5-S2-R	CCAGCGGAATCAAGTCTTCTAC	2 342~2 363	
P6	EHDV-6	Eastern	EHDV6-S2-F	AGTTGCCCAAGAGTATGTGA	1 229~1 249	913
			EHDV6-S2-R	CATCATTCTGTAAAGATAGGTCG	2 116~2 139	
P7	EHDV-7	Eastern	EHDV7-S2-F	AAGTGC GGAACATAAGAGATA	1 051~1 036	1 211
			EHDV7-S2-R	AAGAGTTTGTAGTACCTCATTCC	2 180~2 203	
P8	EHDV-8	Eastern	EHDV8-S2-F	ATATACGAGGAGTGAGTGGTGAG	1 035~1 057	1 061
			EHDV8-S2-R	TGCCATCAGGATCATTGAGACA	2 074~2 095	
P10	EHDV-10	Eastern	EHDV10-S2-F	GGAGATACTATTTATAAATGGGA	1 311~1 334	1 052
			EHDV10-S2-R	GCCCTATTCACATTCTCATAG	2 321~2 342	

转录酶以 20 μL 反应体系进行 cDNA 的合成:5× PrimeScript II Buffer 4 μL, dNTP (10 mmol/L) 1 μL, RNase Inhibitor (40 U/μL) 0.5 μL, Radom 6 mers (50 μmol/L) 1 μL, PrimeScript II RTase (200 U/μL) 1 μL, 变性 RNA 5 μL, 补水至 20 μL。反应条件为:30 °C 10 min, 45 °C 40 min, 72 °C 10 min。

1.5 PCR 反应体系的建立

使用表 2 中的 EHDV 血清型 RT-PCR 引物与对应的不同血清型 EHDV 代表毒株的 cDNA 进行 PCR 扩增,不同血清型反应体系均同时设立阴性对照。PCR 反应体系为:cDNA 模版 1 μL, Ex Taq (5 U/μL) 0.125 μL, 10× Ex Taq Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 加水补充至 25 μL。反应条

件为:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环;72 °C 5 min。取 PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,将符合扩增片段大小的 PCR 产物进行胶回收后,与 T 载体进行连接转化,筛选阳性菌落进行测序。

1.6 特异性试验

取合成的 7 种血清型 EHDV (EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8、-10)、BTV、AKAV 和 CHUV 的 cDNA 1 μL 为模板,使用表 2 中不同血清型引物,按建立的 PCR 反应体系进行 PCR 检测,不同血清型 EHDV 反应体系均同时设立阴性对照,取 PCR 产物进行电泳检测,分析 EHDV 血清型 RT-PCR 引物的特异性。

1.7 敏感性试验

以 10 倍梯度稀释的 PLB-EHDV-Seg5 质粒为

标准品(拷贝数为: $1.5 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^8$ 拷贝/ μL)建立标准曲线,取 $1 \mu\text{L}$ 不同血清型 EHDV 代表毒株 cDNA 为模板,采用绝对定量 qPCR 方法计算出不同血清型 EHDV 的 cDNA 拷贝数后将其进行 10 倍梯度稀释。取 $1 \mu\text{L}$ 稀释后不同梯度的 cDNA 为模板,使用对应的血清型特异性引物进行 PCR 反应,不同血清型反应体系均设立阴性对照,确定该方法可检出的最低模板拷贝浓度,分析 EHDV 血清型 RT-PCR 引物的检测灵敏度。

1.8 中国分离 EHDV 毒株血清型的 RT-PCR 定型

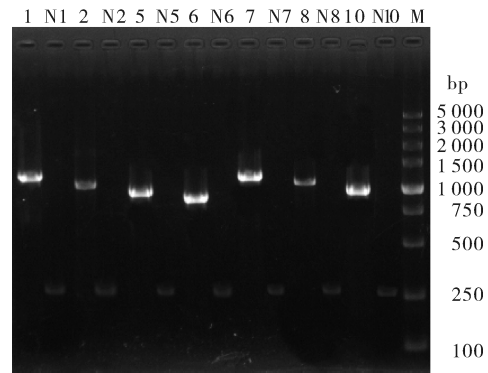
取分离自我国云南省、广西壮族自治区与广东省的 31 株 EHDV 毒株病毒液各 $50 \mu\text{L}$ (表 1)提取病毒核酸。取 $5 \mu\text{L}$ 变性后的核酸为模板,使用 EHDV 群特异性引物和血清型特异性引物进行一步法 RT-PCR 反应,鉴定各毒株的血清型并同前期血清中和试验结果进行对比。将不同血清型阳性 PCR 产物送上海捷瑞公司进行测序,测序引物为 EHDV 各血清型 RT-PCR 引物。

使用 DNASTAR 软件对测序结果进行拼接, Mafft-win^[19] 软件进行序列的比对,MEGA 7.0^[20] 进行系统发生树的构建,建树选择的模型为:Neighbor-joining(邻近法),P-distance(遗传距离模式),Bootstrap(自举检验)取值 1 000。系统发生树中其他国家分离的 EHDV 毒株序列以“GenBank 序列号_病毒血清型_分离地点_分离时间”表示。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应体系的建议及产物鉴定

取不同血清型 EHDV 代表毒株(EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8 和-10 血清型毒株)cDNA 为模板,用对应的血清型特异性引物进行 PCR 扩增,同时每种血清型均设立阴性对照。结果显示 7 种血清型 EHDV *Seg-2* 的扩增产物大小在 $800 \sim 1\,200$ bp,每种血清型阴性对照(N1~N10)均未出现非特异性扩增(图 1)。对 PCR 产物进行 T-A 克隆的测序结果显示,所获得的片段均为 EHDV 的 *Seg-2* 基因片段;EHDV-1 型代表毒株与分离自美国的 Western 毒株相似度最高($>85\%$),EHDV-2、-5、-6、-7 与-10 型代表毒株与分离自澳大利亚和日本的 Eastern 毒株相似度最高($>95\%$),表明设计的不同血清型 RT-PCR 引物可有效完成对应血清型毒株 *Seg-2* 片段的扩增。



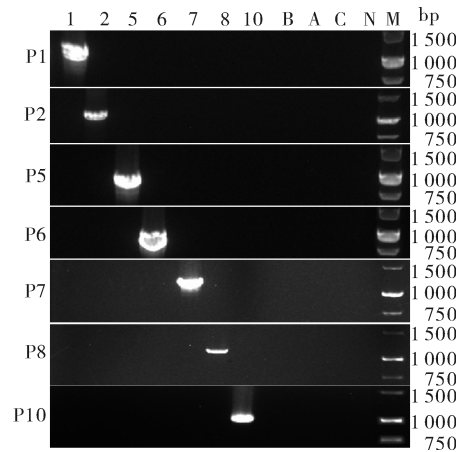
1: EHDV-1 (YNSZ/V083/2014), 2: EHDV-2 (AUS1979/01), 5: EHDV-5 (YNMS/V023/2013), 6: EHDV-6 (YNSZ/V003/2012), 7: EHDV-7 (YNSZ/V269/2013), 8: EHDV-8 (AUS1982/06), 10: EHDV-10 (YNSZ/V277/2013); N: 阴性对照 Negative control; M: DL5000 DNA marker.

图 1 不同血清型 EHDV PCR 检测结果

Fig.1 Detection of different serotypes of EHDV by PCR

2.2 特异性试验结果

以 BTV、AKAV、CHUV 和 7 种血清型 EHDV (EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8 和-10) 的 cDNA 为模板,分别使用表 2 中不同血清型 EHDV 鉴定引物(P1~P10)进行 PCR 扩增,均设立阴性对照,分析引物的特异性。结果显示:EHDV 血清型 RT-PCR 引物仅与对应血清型 EHDV 毒株的 cDNA 模板间有特异性的扩增条带产生,条带大小在 $800 \sim 1\,000$ bp,与其他血清型 EHDV 毒株,及相关病毒 BTV、AKAV 和 CHUV 之间及阴性对照无非特异性扩增产物出现(图 2),表明 EHDV 血清型 RT-PCR 引物具有良好的特异性。



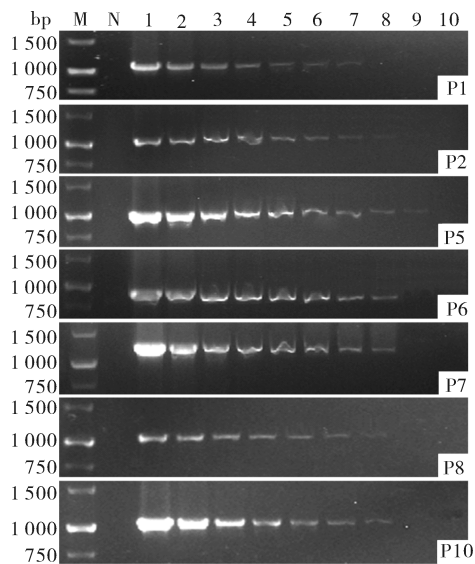
1、2、5、6、7、8、10: 同图 1 The same as Fig.1; B: 蓝舌病病毒 BTV; A: 阿卡斑病病毒 AKAV; C: 中山病病毒 CHUV; N: 阴性对照 Negative control; M: DNA 分子质量标准 DL5000 DNA marker.

图 2 EHDV 血清型引物特异性检测

Fig.2 The specificity assay of EHDV serotype primers

2.3 灵敏度试验结果

通过绝对定量 qPCR 计算出 EHDV-1、EHDV-2、EHDV-5、EHDV-6、EHDV-7、EHDV-8 和 EHDV-10 不同血清型 EHDV 代表毒株的 cDNA 拷贝数分别为 1.1×10^9 、 1.4×10^{10} 、 1.2×10^{11} 、 3.6×10^{10} 、 2.4×10^{10} 、 8.7×10^8 和 $2.1 \times 10^9/\mu\text{L}$ 。将上述 cDNA 进行 10 倍梯度连续稀释后,以对应的血清型特异性引物(P1~P10)进行 PCR 反应,分析 EHDV 血清型 RT-PCR 引物的灵敏度。结果显示 EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8、-10 血清型特异性 RT-PCR 引物对不同血清型 EHDV 核酸检测的最低拷贝数可达到为 10^2 拷贝(图 3),表明 EHDV 血清型 RT-PCR 引物具有良好的灵敏性。



1~10:病毒 cDNA $10^1 \sim 10^{10}$ 倍稀释 The viral nucleic acid dilution was $10^1 \sim 10^{10}$; N:阴性对照 Negative control; M:DNA 分子质量标准 DL5000 marker.

图 3 EHDV 血清型引物灵敏度检测

Fig.3 Sensitive detection of EHDV serotype primers

2.4 中国分离 EHDV 毒株的血清型 RT-PCR 鉴定结果

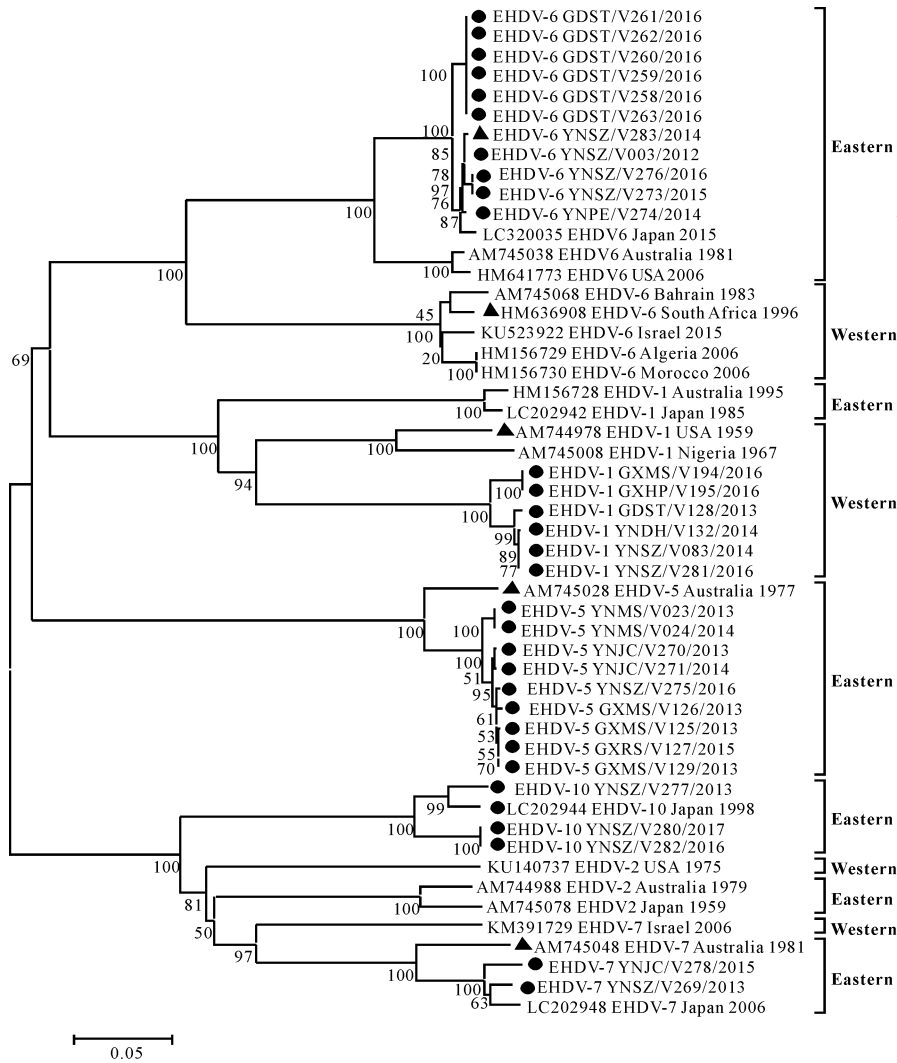
对分离自我国云南省、广西壮族自治区与广东省的 31 株 EHDV 毒株进行群特异性和血清型特异性一步法 RT-PCR 扩增,结果显示:31 株 EHDV 分属 EHDV-1、-5、-6、-7、-10 等 5 种血清型,与前期中和试验鉴定的血清型结果吻合。将扩增的中国 EHDV 毒株 *Seg-2* 进行测序,构建的系统发育树(图 4)显示,我国云南省、广东省与广西壮族自治区分离的 31 株 EHDV 分属 EHDV-1、-5、-6、-7 与 -10 等 5 种血清型,并以对应的血清型参考毒株聚为一

簇,进一步表明血清型 RT-PCR 扩增的正确性。我国流行的 EHDV-1 型毒株的 *Seg-2* 属 Western 型,与分离自美国、尼日利亚的 EHDV-1 型毒株具有共同的起源,而我国流行的 EHDV-5、-6、-7、-10 型等毒株的 *Seg-2* 与分离自日本、澳大利亚的对应血清型毒株聚为一簇,均属 Eastern 型,有着最近的亲缘关系。

3 讨论

EHDV 的血清型主要由 *Seg-2* 编码的 VP2 决定,因此,*Seg-2* 是 EHDV 血清型鉴定的首选靶基因。英国 Pirbright 实验室根据分离自非洲与中东地区的 EHDV 毒株 *Seg-2* 序列,初步建立了 EHDV 血清型特异性 RT-PCR 检测方法^[21-22]。但是研究中我们发现 Pirbright 实验室开发的 EHDV 血清型 RT-PCR 引物对部分中国 EHDV 毒株无法扩增,或者扩增产物十分微弱,测序无信号产生。通过 EHDV 代表毒株的全基因组测序分析我们发现, Pirbright 实验室公布的 EHDV 血清型 RT-PCR 引物与北美洲和中东的 EHDV 毒株的 *Seg-2* 序列具有较高的匹配度,但与中国不同血清型 EHDV 的 *Seg-2* 序列的匹配度较低,存在较多的碱基错配,这是导致引物对中国 EHDV 毒株无法扩增或者扩增效果较差的主要原因;此外,在日本和我国均发现 EHDV-10 型^[23],目前尚无该血清型特异性 RT-PCR 鉴定方法的报道。因此,针对我国流行的 EHDV 血清型毒株 *Seg-2* 序列特征,设计引物和建立我国流行的 EHDV 毒株血清型鉴定 RT-PCR 方法十分必要。

目前血清中和试验是国际上血清检测的金标准,但该方法有操作要求高、检测时间长和必须获得血清型完整的标准毒株或血清等缺点,不利于 EHDV 血清型的快速鉴定。而病毒核酸的分子检测具有操作简便、检测样本量多、准确和快速等优点,已被广泛应用于各类疾病的快速诊断及血清型鉴定等方面。本研究以我国流行的 5 种血清型 EHDV (EHDV-1、-5、-6、-7 和 -10) 和澳大利亚的 EHDV-2、EHDV-8 型毒株的 *Seg-2* 序列为靶基因,设计血清型特异性 RT-PCR 检测引物用于 EHDV 的血清型检测。EHDV-4 和 EHDV-9 型主要流行于非洲,目前世界范围仅报道过 1 株 EHDV-4 型毒株(NIG1968/01)在尼日利亚的分离^[8],而 EHDV-9 毒株序列尚未在 GenBank 上公布任何序列信息,由



不同血清型 EHDV 参考毒株以▲表示,本研究中获取的序列以●表示。Reference strains of different serotypes of EHDV are expressed in triangles; virus sequences obtained in this study are represented by dots.

图 4 基于 NJ 法的 EHDV 参考毒株和中国毒株 Seg-2 序列的系统发育分析

Fig.4 Neighbor-joining tree, showing relationships in Seg-2 between reference and field strains of EHDV from China

于缺乏参考毒株,我们暂无法建立 EHDV-4 与 EHDV-9 型血清型 RT-PCR 的检测方法。

本研究建立的 EHDV 血清型 RT-PCR 方法具有较好的特异性,在不同血清型 EHDV 间无交叉反应,与同样感染反刍动物的 BTV、AKAV 和 CHUV 等病毒之间也无交叉反应,可准确鉴定出 EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8、-10 等 7 种不同血清型的 EHDV 毒株。由于不同 EHDV 毒株在细胞上的增殖复制能力不同,导致分离 EHDV 毒株的病毒滴度及增殖特性差异明显,因此要求 EHDV 血清型 RT-PCR 方法应具备良好的灵敏度。灵敏度试验结果显示,本研究建立的方法对不同血清型 EHDV 核酸分子检测的最低下限均为 10^2 拷贝,表明该血清型 RT-

PCR 方法有较高的灵敏度。我国分离的 31 株 EHDV 毒株的血清型 RT-PCR 鉴定结果显示,这 31 株 EHDV 毒株分属 EHDV-1、-5、-6、-7 血清型,与前期病毒血清型鉴定的血清中和试验结果吻合,表明该方法可成功应用于我国流行的 EHDV 血清型鉴定。

建立 EHDV 血清型 RT-PCR 的另一个优势在于可以通过对扩增产物测序,进一步了解病毒 Seg-2 的遗传特性,从而分析病毒可能的来源以及病毒的活动规律,这将有助于更好地了解病毒的分布与流动情况。本研究中我们通过对中国 EHDV 毒株的测序发现:流行于我国云南、广东与广西 EHDV-1 的 Seg-2 均属于 Western 型,与美国毒株的亲缘

关系最近, EHDV-5、-6、-7 与-10 型属于 Eastern 型,在遗传进化上与澳大利亚和日本毒株最接近,表明了我国 EHDV 起源上的多样性,因此,该 EHDV RT-PCR 方法具有较好的推广使用价值。下一步我们准备在 EHDV 血清型 RT-PCR 的基础上开发 EHDV 血清型荧光定量 RT-PCR 方法,进一步提高检测灵敏度和缩短鉴定时间,实现对临床血液样本中 EHDV 血清型的快速鉴定。

参考文献 References

- [1] SAVINI G, AFONSO A, MELLOR P, et al. Epizootic haemorrhagic disease[J]. *Research in veterinary science*, 2011, 91(1): 1-17.
- [2] YADIN H, BRENNER J, BUMBROV V, et al. Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel[J]. *Veterinary record*, 2008, 162(2): 53-56.
- [3] MUTLU T E, KADIR Y, CARRIE B, et al. Epizootic hemorrhagic disease in cattle, western turkey[J]. *Emerging infectious diseases*, 2009, 15(2): 317-319.
- [4] MACLACHLAN N J, ZIENTARA S, SAVINI G, et al. Epizootic haemorrhagic disease[J]. *Revue scientifique et technique-office international des epizooties*, 2015, 34(2): 341-349.
- [5] CORBEL M J, MACMILLAN A P. Office international des epizooties OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines[M]. Paris: Office International Des Epizooties OIE, 2014: 422-432.
- [6] MERTENS P P C, MAAN S, SAMUEL A, et al. Virus taxonomy eighth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. London: Elsevier/Academic Press, 2005: 466-483.
- [7] ANBALAGAN S, COOPER E, KLUMPER P, et al. Whole genome analysis of epizootic hemorrhagic disease virus identified limited genome constellations and preferential reassortment[J]. *Journal of general virology*, 2014, 95(2): 434-441.
- [8] ANTHONY S J, MAAN S, MAAN N, et al. Genetic and phylogenetic analysis of the outer-coat proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV): comparison of genetic and serological data to characterise the ehdv serogroup[J]. *Virus research*, 2009, 145(2): 200-210.
- [9] ANTHONY S J, MAAN N, MAAN S, et al. Genetic and phylogenetic analysis of the core proteins VP1, VP3, VP4, VP6 and VP7 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV)[J]. *Virus research*, 2009, 145(2): 187-199.
- [10] VIAROUGE C, LANCELOT R, RIVES G, et al. Identification of bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus serotypes in French Guiana in 2011 and 2012[J]. *Veterinary microbiology*, 2014, 174(1/2): 78-85.
- [11] OHASHI S, YOSHIDA K, YANASE T, et al. Analysis of intratypic variation evident in an Ibaraki virus strain and its epizootic hemorrhagic disease virus serogroup[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2002, 40(10): 3684-3688.
- [12] WILSON W C, RUDER M G, KLEMENT E, et al. Genetic characterization of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated from cattle in Israel[J]. *Journal of general virology*, 2015, 96(6): 1400-1410.
- [13] OHASHI S. Identification and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a variant of the Ibaraki virus from naturally infected cattle and aborted fetuses in Japan[J]. *Journal of clinical microbiology*, 1999, 37(12): 3800-3803.
- [14] 曹颖颖, 吴健敏, 林俊, 等. 广西首例牛源鹿流行性出血热病毒的分离鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(10): 746-750. CAO Y Y, WU J M, LIN J, et al. Isolation and identification of the first case of epizootic hemorrhagic disease virus from cattle in Guangxi[J]. *Chinese journal of preventive veterinary medicine*, 2015, 37(10): 746-750 (in Chinese with English abstract).
- [15] 吕敏娜, 朱建波, 李娟, 等. 广东一株牛源流行性出血病病毒的分离鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(1): 67-70. LYU M N, ZHU J B, LI J, et al. Isolation and identification of the epizootic hemorrhagic disease virus from cattle in Guangdong [J]. *Chinese journal of preventive veterinary medicine*, 2017, 39(1): 67-70 (in Chinese with English abstract).
- [16] 李占鸿, 肖雷, 杨振兴, 等. 牛源流行性出血病病毒(EHDV)血清 10 型毒株在我国的分离鉴定[J]. *中国病毒学报*, 2019, 35(1): 112-120. LI Z H, XIAO L, YANG Z X, et al. Isolation and identification of the epidemic hemorrhagic fever virus serotype 10 strain from cattle in China[J]. *Chinese journal of virology*, 2019, 35(1): 118-126 (in Chinese with English abstract).
- [17] 杨振兴, 孟锦昕, 肖雷, 等. 流行性出血病病毒(EHDV)血清 7 型毒株在中国的首次分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(3): 602-610. YANG Z X, MENG J X, XIAO L, et al. Isolation of epizootic haemorrhagic disease virus serotype 7 strain in China for the first time[J]. *Chinese journal of animal and veterinary*, 2019, 50(3): 602-610 (in Chinese with English abstract).
- [18] VIAROUGE C, BREARD E, ZIENTARA S, et al. Duplex real-time RT-PCR assays for the detection and typing of epizootic haemorrhagic disease virus[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): 1-11.
- [19] KATO H, ASIMENOS G, TOH H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT[J]. *Methods in molecular biology*, 2009, 537(8): 39-64.
- [20] KOICHIRO T, GLEN S, DANIEL P, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular biology and evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [21] MAAN N S, SUSHILA M, KYRIAKI N, et al. RT-PCR Assays for seven serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus & their use to type strains from the mediterranean region and North America[J/OL]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012782>.
- [22] SUN F, COCHRAN M, BECKHAM T, et al. Molecular typing

of epizootic hemorrhagic disease virus serotypes by one-step multiplex RT-PCR[J]. *Journal of wildlife diseases*, 2014, 50(3):639-644.
 [23] SHIRAFUJI H, KATO T, YAMAKAWA M, et al. Character-

ization of genome segments 2, 3 and 6 of epizootic hemorrhagic disease virus strains isolated in Japan in 1985–2013; identification of their serotypes and geographical genetic types[J]. *Infection, genetics and evolution*, 2017, 53(12):38-46.

Development and utilization of RT-PCR assay for determining serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus

YANG Zhenxing¹, LI Zhanhong¹, SONG Ziang², LI Zhuoran¹,
 ZHU Jianbo¹, LIAO Defang¹, YANG Heng¹

1. *Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Yunnan Veterinary and Animal Science Institute, Kunming 650224, China;*

2. *College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China*

Abstract Epidemic haemorrhagic disease virus (EHDV) is an arbovirus that seriously endangers ruminants. Currently, nine serotypes of EHDV have been discovered worldwide, and five of them are prevalent in China. Neutralization test is the gold standard for serotype identification of EHDV, which has the shortcomings of time-consuming, laborious and long experimental period. Therefore, establishing an accurate and rapid serotyping method for EHDV is of great significance for the prevention and control of this disease. In this study, the second gene segment (*Seg-2*), which determines the serotype of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV), was used as the target gene to establish a one-step RT-PCR method for serotype-specific detection of EHDV. The results of specificity test showed that the method could accurately identify different serotypes of EHDV, and had no cross-reaction with bluetongue virus, chuzan Virus and akabane virus. The results of sensitivity test showed that the detection limit of the EHDV nucleic acid for different serotypes could reach 10^2 copies. EHDV strains isolated from different times and different regions in China were identified by this one-step RT-PCR and the results showed that the 31 EHDV isolates belonged to five serotypes, including EHDV-1, -5, -6, -7 and -10. The results of the RT-PCR were completely consistent with the results of the serum neutralization test. The above results showed that the method established in this study had good specificity and high sensitivity, and could quickly and accurately identify the serotype of EHDV strains.

Keywords epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV); serotypes; *Seg-2*; RT-PCR; detection method; molecular diagnostics

(责任编辑:边书京)