

魏后军, 胡波, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型的分离鉴定与序列分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 404-409.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.021

兔出血症病毒 2 型的分离鉴定与序列分析

魏后军, 胡波, 范志宇, 宋艳华, 仇汝龙, 陈萌萌, 薛家宾, 王芳

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起的一种具有高度传染性、急性致死性兔病。兔出血症病毒 2 型(RHDV2)引起的 RHD 主要在欧洲流行,病兔的死亡率高达 90%,而用经典 RHDV 毒株制备的疫苗几乎不能预防家兔感染 RHDV2,从而给世界养兔业造成了巨大的经济损失。2020 年 4 月,中国四川省某兔场首次发生由疑似 RHDV2 引起的 RHD,笔者所在实验室通过红细胞凝集试验(Hemagglutination, HA)、逆转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增、*vp60* 基因序列分析和病毒复制试验,对采集的病死家兔肝脏样本进行病原鉴定。HA 结果显示,部分病死家兔的肝脏样本不能引起血凝现象;RT-PCR 结果显示,样品中出现了 RHDV2 的特异性条带。对新发现毒株 cDNA 的 RT-PCR 产物进一步分析发现,所扩增 *vp60* 基因核苷酸序列与经典 RHDV *vp60* 基因核苷酸序列的一致性为 77.5%~80.1%,与 RHDV2 *vp60* 基因核苷酸序列的一致性为 93.6%~96.1%,并且与 RHDV2 处于同一个进化分支。病毒复制试验结果显示,用病死家兔肝脏组织与磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)按 1 g: 10 ml 混合后制成的悬液分别人工感染 5 只非免疫 25 日龄未断奶仔兔和 5 只 2 月龄兔,在 24~48 h 全部死亡。基于以上试验结果,确定本研究新发现的 RHDV 毒株为 RHDV2,并将其命名为 SC2020,这是在中国首次发现 RHDV2 毒株,应引起高度重视。

关键词: 兔出血症; 兔出血症病毒 2 型(RHDV2); *vp60* 基因; 鉴定; 序列分析

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)02-0404-06

Isolation, identification and sequence analysis of rabbit hemorrhagic disease virus type 2

WEI Hou-jun, HU Bo, FAN Zhi-yu, SONG Yan-hua, QIU Ru-long, CHEN Meng-meng, XUE Jia-bin, WANG Fang

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Veterinary Bio-Product Engineering, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: Rabbit hemorrhagic disease (RHD) is a highly contagious and acute fatal disease caused by rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV). RHD caused by rabbit hemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2) is mainly prevalent in Europe, and the mortality rate is as high as 90%. Rabbits can hardly be protected from infecting RHDV2 by classical

收稿日期:2020-04-27

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-43-C-1);国家重点研发计划项目(2018YFD0502203)

作者简介:魏后军(1986-),男,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究。(E-mail) whj280941235@126.com。胡波、范志宇和宋艳华为共同第一作者。

通讯作者:王芳,(E-mail) rwangfang@126.com

RHDV vaccine, resulting in huge economic loss to world rabbit-raising industry. In April 2020, suspected RHDV2-induced RHD cases were found in a rabbitry of Sichuan province, China. Hemagglutination (HA) test, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), *vp60* gene sequence analysis and virus replication experiment were conducted to identify the pathogen in the collected livers of dead rabbits in our lab. The results of HA showed

that the liver samples of some dead rabbits could not induce hemagglutination. In addition, specific bands of RHDV2 were detected by RT-PCR in the samples. Further analysis on RT-PCR product of newly discovered strain indicated that the nucleotide sequence of amplified *vp60* gene shared 77.5%–80.1% and 93.6%–96.1% nucleotide sequence consistency with classic RHDV *vp60* gene and RHDV2 *vp60* gene, respectively. The amplified segment and RHDV2 were on the same branch of the evolutionary tree. The results of virus replication showed that five unweaned rabbits (25-day-old) and five rabbits (two-month-old) died in 24 h to 48 h after being infected with suspension of 10 ml phosphate buffer saline (PBS) versus 1 g liver tissues from dead rabbits. These results indicated that the newly discovered RHDV strain was RHDV2, and it was named as SC2020. This is the first RHDV2 strain detected in China, and it should be carefully monitored.

Key words: rabbit hemorrhagic disease; rabbit hemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2); *vp60* gene; identification; sequence analysis

兔出血症 (Rabbit hemorrhagic disease, RHD) 是由兔出血症病毒 (Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV) 引起的一种急性、高传染性、高致死性疾病。经典的 RHDV 只感染家兔,且易感染 2 月龄以上的家兔,染病后家兔的病死亡率达 90%,常于感染后 48~72 h 死亡,死亡家兔具有呼吸系统和肝、脾、肾、心等实质脏器瘀血、肿大和出血等特征^[1];未断奶仔兔不易感。该病于 1984 年首先在中国被报道,随后迅速在全球大部分地区流行,同时 RHDV 也发生了遗传变异。从系统发育关系上看,RHDV 可以分为 G1~G6 这 6 个基因型 (GI.1),中国的流行毒株主要为 G2、G6 型^[2-3]。2010 年,在法国首次发现了 RHDV 的新毒株,研究者将其命名为 RHDV2^[4]。目前的研究发现,RHDV2 对不同日龄的家兔均易感,家兔感染后的病死率可达 90%。RHDV2 与经典 RHDV 毒株 G1~G6 型感染家兔致死的典型症状相似,但在遗传特性及抗原性上有很大差异,并且用经典毒株制备的疫苗不能有效避免家兔感染 RHDV2^[5]。目前,RHDV2 已在欧洲扩散,在亚速尔群岛和澳大利亚也有相关报道^[6-7]。中国肉兔配套系 100% 依赖进口,主要进口国为法国,中国同时是世界上最大的兔肉出口国,与欧洲之间在兔行业上的贸易往来密切。因此可见,RHDV2 对中国养兔业的潜在威胁极大。

2020 年 4 月 1 日,四川某兔场出现患病家兔的急性死亡病例,死亡家兔的临床症状和病理变化与兔出血症十分相似。2020 年 4 月 2 日至 4 月 5 日,患病家兔的死亡数量明显增多,且各日龄阶段的家兔包括未断奶的仔兔都有死亡发生。据了解,该兔场共有约 300 只母兔、1 500 只商品兔,发病前已对家兔注射兔病毒性出血症、多杀性巴氏杆菌病二联

灭活疫苗,发病后第 5 d 紧急注射上述二联灭活疫苗,但效果不明显,兔死亡率约为 73.3%,且病死家兔均出现 RHD 的典型临床症状。根据 RHDV2 可引起低龄幼兔死亡,且经典 RHDV 组织灭活疫苗不能有效抵抗 RHDV2 感染的特征,初步推测该兔病的病原为 RHDV2。经红细胞凝集 (Hemagglutination, HA) 试验、逆转录-聚合酶链式反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析、序列测定及病毒复制试验,确定该病原为 RHDV2,这是在中国首次发现的 RHDV2 毒株。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

病料样品来源为四川省某兔场的 3 只病死家兔 (编号为样品 1、样品 2、样品 3);RHDV 皖阜株、RHDV2 *vp60* 基因构建的重组质粒 pMD19-T-*vp60*-2 由笔者所在实验室保存;阴性无特定病原体 (Specific pathogen free, SPF) 兔肝脏由邛州市东方养殖有限公司提供。

1.2 红细胞凝集试验

参照中华人民共和国农业行业标准 (NY/T 572—2016《兔病毒性出血病血凝和血凝抑制试验方法》),分别取 3 只病死家兔的少许肝脏组织,置于载玻片上剪碎后滴加用磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 配制的体积分数为 1% 的“O”型红细胞,同时设 SPF 兔肝脏组织为阴性对照,设 RHDV 皖阜株肝脏组织为阳性对照,于 4 ℃ 放置 5 min。若肝脏组织中有兔出血症病毒,肉眼可观察到血凝现象。

1.3 病毒 RNA 的提取及反转录

将家兔肝脏组织样品与焦碳酸二乙酯 (Diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水溶液按 1:10 (质量体积比)

混合后研磨成悬液,10 000 r/min离心 15 min,取上清液按照 TRIzol 法提取 RNA;利用反转录试剂盒获得病毒 cDNA,于-20 ℃保存备用。

1.4 病毒 cDNA 的 PCR 鉴定

参照笔者所在实验室建立的检测经典 RHDV^[8]和鉴别经典 RHDV 与 RHDV2 的 RT-PCR 方法,以及世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 推荐的用于检测 RHDV2^[9]的 RT-PCR 方法中的引物(由南京擎科生物科技有限公司合成),以 cDNA 为模板,采用高保真的 Golden Star T6 Super PCR MIX 进行家兔出血症病毒 *vp60* 基因片段的扩增。用笔者所在实验室建立的方法进行检测时,经典 RHDV 的扩增产物大小为 591 bp;用鉴别经典 RHDV 与 RHDV2 RT-PCR 方法时,经典 RHDV 的扩增产物大小为 193 bp, RHDV2 扩增产物大小为 829 bp;用 OIE 推荐的方法检测时, RHDV2 扩增产物大小为 481 bp。

1.5 病毒基因序列的同源性分析

将 PCR 扩增产物送至南京擎科生物科技有限公司测序。用 DNASTar 中的 MegAlign 软件对新分离毒株 *vp60* 基因序列的测序结果进行同源性分析,并将基因序列上传至 GenBank 数据库。

1.6 病毒的遗传进化分析

vp60 基因是 RHDV 结构蛋白基因, OIE 以 *vp60* 基因作为 RHDV 分型的依据。从 GenBank 数据库中获得国内外经典 RHDV 毒株(登录号: AF231353、AF402614、DQ205345、FJ794180、JN165235、KU207100)、RHDV2 毒株(登录号: FR819781、HE819400、JX133161、KP129397、

KM115712)和兔杯状病毒(Rabbit calicivirus, RCV)(登录号: X96868)的 *vp60* 基因序列,对这些序列构建进化树并进行分析。

1.7 病毒的复制分析

在严格的生物安全防控条件下,将疑似感染 RHDV2 的病兔家兔肝脏组织样品与磷酸缓冲盐溶液按 1 g : 10 ml 混合后研磨成悬液,分别颈部皮下注射 5 只非免疫的 25 日龄未断奶仔兔和 5 只 2 月龄兔,注射量均为每只 1 ml,随后观察家兔的发病、死亡情况。取死亡家兔的肝脏组织进行血凝试验和用于鉴定经典 RHDV 与 RHDV2 的 RT-PCR 试验,将扩增产物送至南京擎科生物科技有限公司测序。

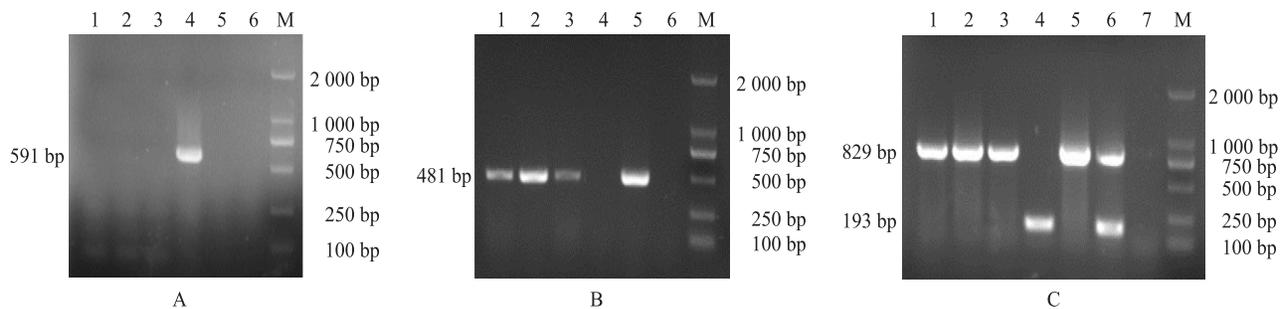
2 结果与分析

2.1 红细胞凝集试验

红细胞凝集试验结果表明,3 只病死家兔的肝脏样本中,样品 2 的肝脏出现血凝现象,样品 1、样品 3 均未出现肉眼可见的血凝现象。

2.2 病毒的 PCR 鉴定

以病毒 cDNA 为模板,用经典 RHDV 鉴定引物进行 PCR 扩增,图 1A 显示,3 个样品在 591 bp 位置均未出现特异性条带;使用 OIE 推荐的 RHDV2 鉴定引物进行 PCR 扩增,图 1B 显示,3 个样品在 481 bp 位置均出现特异性条带,其中样品 2 的扩增条带亮度较强;用经典 RHDV 与 RHDV2 鉴别引物进行 PCR 扩增,图 1C 显示,3 个样品在 829 bp 位置均出现 RHDV2 的特异性条带,在 193 bp 位置未出现经典的 RHDV 特异性条带。



A:经典 RHDV 鉴定引物扩增结果;B:OIE 推荐的 RHDV2 鉴定引物扩增结果;C:经典 RHDV 与 RHDV2 鉴别引物扩增结果。图 A、图 B 中,1:样品 1;2:样品 2;3:样品 3;4:RHDV 皖阜株;5:pMD19-T-*vp60*-2;6:SPF 兔肝脏组织;M:DL2000 DNA marker。图 C 中,1:样品 1;2:样品 2;3:样品 3;4:RHDV 皖阜株;5:pMD19-T-*vp60*-2;6:RHDV 皖阜株+pMD19-T-*vp60*-2;7:SPF 兔肝脏组织;M:DL2000 DNA marker。

图 1 兔出血症病毒 2 型 (RHDV2) 的 PCR 鉴定结果

Fig.1 PCR identification results of rabbit hemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2)

2.3 *vp60* 基因的序列分析

测定 RHDV2 扩增产物(大小为 829 bp)的 *vp60* 基因序列并将其上传至 GenBank 数据库中(登录号:MT383748),将其命名为 SC2020。表 1 的分析结果显示,本研究所扩增序列与 GenBank 上报道的经典 RHDV(基因型为 GI.1)的 *vp60* 基因(登录号:

AF231353、AF402614、DQ205345、FJ794180、JN165235、KU207100)的核苷酸序列一致性为 77.5%~80.1%,与 RHDV2(基因型为 GI.2) *vp60* 基因(登录号:FR819781、HE819400、JX133161、KP129397、KM115712)的核苷酸序列一致性为 93.6%~96.1%。

表 1 经典 RHDV、RHDV2 *vp60* 基因核苷酸序列的同源性分析结果

Table 1 Homology analysis results of nucleotide sequences of rabbit hemorrhagic disease virus(RHDV) and RHDV2 *vp60* genes

毒株	同源性(%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		98.1	92.8	92.1	91.1	97.2	86.3	82.5	82.1	79.9	82.5	81.4	79.5
2			93.6	93.0	91.7	98.2	86.4	83.2	82.8	80.4	82.9	82.0	80.1
3				97.3	96.3	93.3	86.0	82.6	82.3	79.8	82.5	81.8	79.4
4					95.2	92.4	85.5	82.9	82.6	79.6	82.7	82.1	79.8
5						91.4	85.8	81.7	81.3	78.5	81.8	81.0	77.5
6							86.1	82.2	81.8	78.9	82.1	81.1	78.8
7								82.6	82.1	79.0	82.8	82.0	78.6
8									98.4	97.7	97.6	96.9	94.2
9										97.3	97.5	96.8	93.6
10											97.6	98.4	96.1
11												97.3	93.8
12													95.9
13													

1~6 表示 RHDV, 登录号分别为 AF231353、AF402614、DQ205345、FJ794180、JN165235、KU207100, 7 表示 RCV, 登录号为 X96868, 8~12 表示 RHDV2, 登录号分别为 FR819781、HE819400、JX133161、KP129397、KM115712, 13 表示新分离的兔出血症病毒毒株 SC2020。

2.4 *vp60* 基因的遗传进化分析

用 MEGA 5.2 对病毒的 *vp60* 基因核苷酸序列进行遗传进化分析,由图 2 可以看出,新分离的病毒毒株与 RHDV2(基因型为 GI.2)的亲缘关系较近,并位于同一个大的分支,与 RHDV(基因型为 GI.1)的亲缘关系较远。

2.5 病毒的复制情况

分别用样品 2 的肝脏悬液注射 5 只 25 日龄非免疫的未断奶仔兔和 5 只 2 月龄兔,结果发现,10 只家兔均在注射后 24~48 h 死亡。取死亡家兔的肝脏组织进行红细胞凝集试验,结果显示,2 月龄兔中,有 1 只出现明显的血凝现象,有 2 只出现较弱的血凝现象,有 2 只未出现血凝现象;未断奶仔兔中,有 2 只出现明显的血凝现象,有 3 只出现较弱的血凝现象。对死亡家兔的肝脏组织进行经典 RHDV 与 RHDV2 鉴别 RT-PCR 试验,发现均出现

了单一的 RHDV2 特异性条带。进一步对该条带进行测序,结果表明,PCR 扩增产物的测序结果与攻毒毒株的序列一致。

3 讨论

RHDV2 自 2010 年首次在法国被报道以来,已逐步取代经典 RHDV 而在欧洲蔓延,并开始在世界范围内流行。中国在 2017 年以前的 RHDV 流行株主要是经典 RHDV 中的 G2 和 G6 型,并且存在 G2/G6 的重组毒株^[2-3]。通过对 RHDV 新分离毒株 SC2020 的序列分析,其毒株与 RHDV2 毒株的核苷酸序列一致性达 93%以上,与经典 RHDV 毒株的核苷酸序列一致性约为 80%。通过遗传进化分析可知,新分离毒株 SC2020 与 RHDV2 毒株位于同一个分支,表明本研究所分离的 RHDV 新毒株为 RHDV2,这是在中国首次发现 RHDV2 毒株。

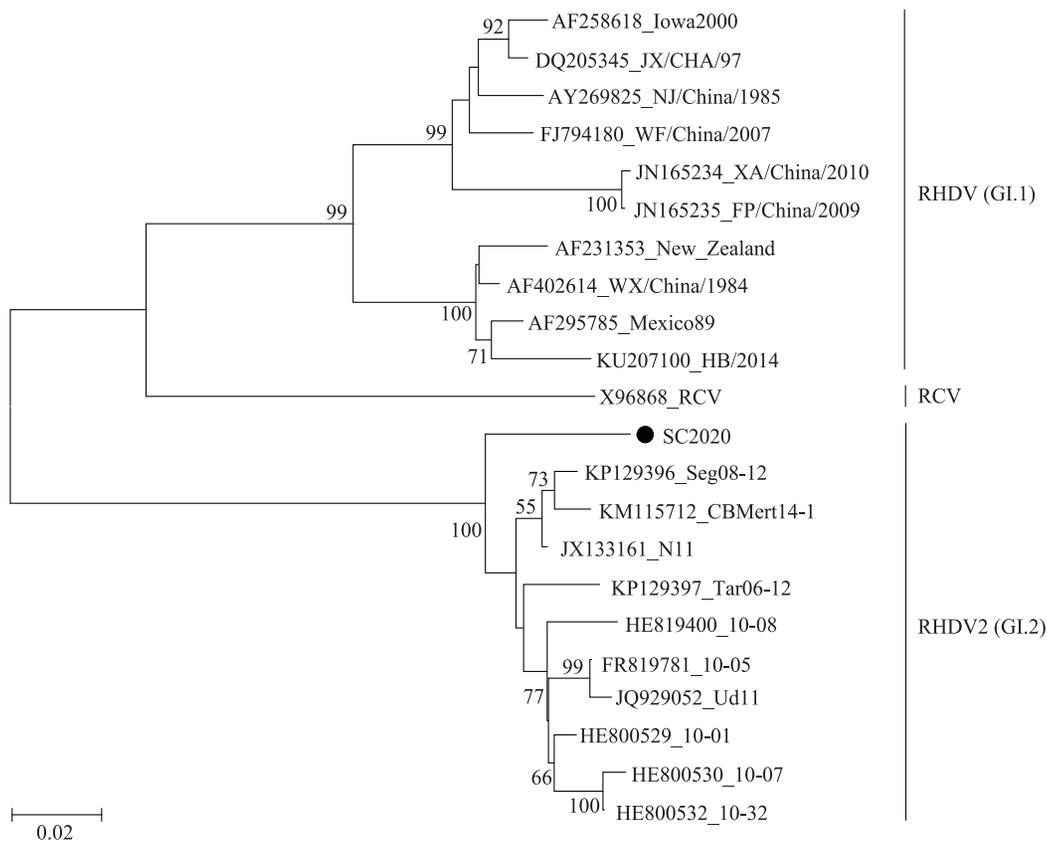


图2 *vp60* 基因的邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 进化树

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic tree of *vp60* genes

中国 RHDV 的临床样本检测主要使用行业标准推荐的人“O”型红细胞凝集试验方法,该方法易于操作,但存在假阴性和假阳性的可能。国内外均报道过低血凝和无血凝 RHDV 毒株的存在。由于在基层临床检测中较少使用 RT-PCR 方法和酶联免疫吸附法 (Enzyme linked immune sorbent assay, ELISA) 测定,因此,检验人员通过血凝试验进行检测时可能由于血凝试验呈阴性而判定为非 RHD,导致漏诊、误诊。在本研究中,最初 3 只病死家兔中有 2 只的肝脏组织没有出现血凝现象,在后续病毒复制试验中,有 2 只死亡家兔的肝脏组织也没有出现肉眼可见的血凝现象,而病死家兔均出现 RHD 的典型症状,且其肝脏样品经 RT-PCR 方法检测和测序,其毒株均鉴定为 RHDV2。中国已有的检测经典 RHDV 的实验室诊断方法可能并不适用于 RHDV2 的特异性检测,例如检测 RHDV 的 RT-PCR 方法^[8]和检测 RHDV 的胶体金免疫层析试纸条法等^[10]。国外已经建立了检测 RHDV2 的实时荧光定量 PCR 方法^[11-12]和夹心 ELISA 方法^[13],但是否能用于中国

新发现毒株的检测还有待进一步确认。笔者所在实验室建立的鉴别经典 RHDV 与 RHDV2 的 RT-PCR 方法,可以有效鉴别经典 RHDV 和 RHDV2,这为应对中国出现的 RHDV2 感染或经典 RHDV/RHDV2 混合感染病例的鉴定提供了有效方法,可用于中国 RHDV 毒株的检测及鉴别诊断。

本研究的 3 只死亡家兔此前已免疫接种由经典 RHDV 毒株制备的组织灭活疫苗,但是不能有效抵抗 RHDV2 的感染,这与国外相关报道^[5]相符。因此可以推测,RHDV2 一旦在中国流行,将对养兔业产生严重的危害甚至造成毁灭性的打击。鉴于中国可能出现由 RHDV2 引起的 RHD 暴发和流行,RHDV2 的疫苗研制已刻不容缓。在加强 RHD 流行病学调查的基础上,应加快 RHDV2 组织灭活疫苗或基因工程疫苗的研制,从而保障中国养兔业的健康发展。

参考文献:

- [1] ABRANTES J, VAN DER LOO W, LE PENDU J, et al. Rabbit

- haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 12.
- [2] HU B, WANG F, FAN Z, et al. Recombination between G2 and G6 strains of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) in China [J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(1): 269-272.
- [3] HU B, FAN Z, WANG F, et al. A new variant of rabbit hemorrhagic disease virus G2-like strain isolated in China[J]. *Veterinary Research*, 2016, 215: 20-24.
- [4] LE GALL-RECULE G, ZWINGELSTEIN F, BOUCHER S, et al. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France[J]. *Veterinary Research*, 2011, 168(5): 137-138.
- [5] LE GALL-RECULE G, LAVAZZA A, MARCHANDEAU S, et al. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44: 81.
- [6] STRIVE T, PIPER M, HUANG N, et al. Retrospective serological analysis reveals presence of the emerging lagovirus RHDV2 in Australia in wild rabbits at least five months prior to its first detection [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(2): 822-833.
- [7] ROUCO C, ABRANTES J, SERRONHA A, et al. Epidemiology of RHDV2 (*Lagovirus europaeus*/GI.2) in free-living wild European rabbits in Portugal[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(2): e373-e382.
- [8] 胡波,魏后军,王芳,等.兔出血症病毒 RT-PCR 检测方法的建立及其临床应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(11): 1442-1446.
- [9] VELARDE R, CAVADINI P, NEIMANIS A, et al. Spillover events of infection of brown hares (*Lepus europaeus*) with rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) caused sporadic cases of an European brown hare syndrome-like disease in Italy and Spain[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(6): 1750-1761.
- [10] 蔡少平,王芳,贾华敏,等.兔出血症病毒胶体金免疫层析试纸条诊断方法的建立及初步应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(11): 1795-1801.
- [11] DUARTE M D, CARVALHO C L, BARROS S C, et al. A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) [J]. *Journal of Virological Methods*, 2015, 219: 90-95.
- [12] NEIMANIS A S, AHOLA H, ZOHARI S, et al. Arrival of rabbit haemorrhagic disease virus 2 to northern Europe: emergence and outbreaks in wild and domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Sweden [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(1): 213-220.
- [13] DALTON K P, PODADERA A, GRANDA V, et al. ELISA for detection of variant rabbit haemorrhagic disease virus RHDV2 antigen in liver extracts [J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 251: 38-42.

(责任编辑:徐艳)