

陈萌萌,王冠萱,仇汝龙,等.兔出血症病毒 RHDV1 和 RHDV2 一步法双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的建立和应用 [J].江苏农业学报,2025,41(5):937-942.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.05.012

兔出血症病毒 RHDV1 和 RHDV2 一步法双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的建立和应用

陈萌萌^{1,2,3}, 王冠萱^{1,2}, 仇汝龙^{2,3}, 范志宇^{2,3}, 胡波^{2,3}, 宋艳华^{1,2,3}, 魏后军^{2,3}, 徐为中^{2,3}, 葛雷^{2,3}, 李一鸣^{2,3}, 王芳^{1,2,3}

(1.南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095; 2.江苏省农业科学院兽医研究所,江苏南京 210014; 3.兽用生物制品<泰州>国泰技术创新中心,江苏泰州 225300)

摘要:兔出血症病毒(RHDV)引起的兔出血症是一种急性、高度致死性传染病,对养兔业造成严重危害。本研究基于 RHDV 衣壳蛋白(VP60)基因序列设计引物和 TaqMan 探针,建立可同时检测 RHDV1 和 RHDV2 两种毒株的双重 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测体系。反应体系:2× One Step RT-PCR Buffer III 10.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL,ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL,两种荧光探针(10 μmol/L)各 0.8 μL,待测样本 2.0 μL, ddH₂O 4.8 μL。反应程序:42 °C 5 min,95 °C 10 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环。试验结果表明,该体系特异性强,与轮状病毒、兔多杀性巴氏杆菌、兔支气管败血波氏菌、绿脓杆菌、沙门氏菌无交叉反应;灵敏度高,最低检测限为 1 μL 100 拷贝。通过组内重复和组间重复进行重复性分析,Ct 值变异系数为 0.2%~2.9%,表明该体系稳定性较好。使用该体系对 112 份临床样本(60 份肝脏组织、52 份鼻肛拭子)进行检测,RHDV 总检出率为 69%,而常规 RT-PCR 体系的检出率仅为 51%。本研究建立的双重荧光定量 RT-PCR 方法具有高灵敏度、强特异性和良好的重复性,可为 RHDV 的临床快速诊断及定量分析提供可靠技术支持。

关键词:兔出血症病毒; 荧光定量 RT-PCR; TaqMan 探针

中图分类号: S855.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)05-0937-06

Establishment and application of one-step dual TaqMan probe quantitative RT-PCR system for rabbit hemorrhagic disease viruses RHDV1 and RHDV2

CHEN Mengmeng^{1,2,3}, WANG Guanxuan^{1,2}, QIU Rulong^{2,3}, FAN Zhiyu^{2,3}, HU Bo^{2,3}, SONG Yanhua^{1,2,3}, WEI Houjun^{2,3}, XU Weizhong^{2,3}, GE Lei^{2,3}, LI Yiming^{2,3}, WANG Fang^{1,2,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Guotai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China)

Abstract: Rabbit hemorrhagic disease (RHD) caused by rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) is an acute and highly lethal infectious disease that poses a serious threat to the rabbit breeding industry. In this study, primers and

收稿日期:2023-12-28

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(CARS-43-C-1)

作者简介:陈萌萌(1987-),女,连云港人,博士,副研究员,主要从事兔疾病防治与兽医生物技术研究。(E-mail) moonchen2010@yeah.net

通讯作者:王芳,(E-mail) rwangfang@126.com

TaqMan probes were designed based on the capsid protein (VP60) gene sequences of RHDV to establish a dual TaqMan quantitative RT-PCR detection system capable of simultaneously detecting both RHDV1 and RHDV2 strains. The reaction system included 10.0 μL of 2×One Step RT-PCR Buffer III, 0.6 μL of forward primer (10 μmol/L),

0.6 μL of reverse primer (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL of ROX Reference Dye II (50 \times), 0.8 μL of each fluorescent probe (10 $\mu\text{mol/L}$), 2.0 μL of test sample, and 4.8 μL ddH₂O. The reaction program was as follows: 42 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ for 10 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ for 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s, and 40 cycles. Results showed that the system had strong specificity and no cross-reactions with rotavirus, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Salmonella* spp., and high sensitivity with a minimum detection limit of 100 copies per microliter. Repeatability analysis through intra-group and inter-group repetitions showed that the coefficient of variation of Ct values was between 0.2% and 2.9%, indicating good stability of the system. When testing 112 clinical samples (60 liver tissues and 52 nasal and anal swabs) using this system, the overall detection rate of RHDV reached 69%, while the detection rate of the conventional RT-PCR system was only 51%. The dual quantitative RT-PCR method established in this study has high sensitivity, strong specificity, and good repeatability, providing a reliable technical support for the rapid clinical diagnosis and quantitative analysis of RHDV.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus; fluorescence quantitative RT-PCR; TaqMan probe

兔病毒性出血症 (Rabbit hemorrhagic disease, RHD), 又称兔出血症或兔瘟, 是由兔出血症病毒 (Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV) 引起的一种急性、高度接触传染性、致死性疾病, 主要感染家兔和野兔^[1]。RHDV 属于杯状病毒科兔病毒属成员, 目前有 GI.1 和 GI.2 两种基因型。该病毒基因组为 7.4 kb 的正链 RNA, 包含 2 个开放阅读框 (ORF)。ORF1 编码 1 个多蛋白, 该多蛋白可被切割成衣壳蛋白 (VP60) 和 7 个非结构蛋白, ORF2 编码次要结构蛋白 (VP10)^[2-3]。RHDV 于 1984 年在中国首次被报道^[4], 随后迅速传播至全球。截至 2010 年, 中国主要流行的 RHDV1 毒株为 GI.1 基因型, GI.1 基因型可分为 GI.1a 亚型和 GI.1c 亚型。2010 年, 在欧洲首次发现 RHDV2, 该毒株属于 GI.2 基因型, 在系统发育和抗原性方面与 GI.1 基因型存在差异^[5-7]。2020 年之前, 中国仅流行 RHDV1 毒株, 2020 年首次发现 RHDV2 毒株^[8]。由于 RHDV1 疫苗对 RHDV2 的交叉保护作用有限, 导致 RHDV2 在全国范围内迅速传播。目前, RHDV1 和 RHDV2 均在中国流行^[9-14]。

RHD 潜伏期为 1~3 d, 临床主要表现为神经症状、呼吸道症状、精神沉郁和食欲减退, 病兔常在体温升高后 12~36 h 死亡。RHDV1 仅感染家兔, 4~6 周龄仔兔多呈亚临床症状, 2 月龄以上的家兔易出现明显的临床症状。RHDV2 不仅可感染家兔, 还能跨物种感染野兔以及地中海田鼠等啮齿类动物。感染 RHDV2 的 10~15 日龄幼龄家兔也会出现明显的临床症状。2 种基因型 RHDV 引起的特征性病理变化均为坏死性肝炎^[15]。值得注意的是, 研究发现 RHDV2 在野外环境中已逐渐取代 RHDV1^[16], 这为 RHDV 防治带来了新的挑战。

目前针对 RHDV1 已建立多种诊断方法, 如抗原捕获夹心 ELISA、逆转录 PCR (RT-PCR)、实时定量 RT-PCR (RT-qPCR) 和免疫电镜等^[17-18]。随着 RHD2 暴发流行, 亟需建立能区分 2 种基因型的诊断方法。虽然 RT-qPCR 具有高敏感性和特异性, 但现有方法步骤较多且无法同时检测 2 种基因型毒株。为此, 本研究拟通过分析 RHDV1 和 RHDV2 的 VP60 基因序列, 设计特异性引物和探针, 建立一步法双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系, 旨在为兔出血症病毒的防治和流行病学研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 病毒样本

轮状病毒、兔多杀性巴氏杆菌、兔支气管败血波氏菌、绿脓杆菌、沙门氏菌、兔出血症病毒 1 型、兔出血症病毒 2 型 cDNA 均由本实验室 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。临床样本为 2022 年采集自山东、河南、四川、安徽和江苏等地兔场的疑似感染 RHDV 的家兔肝脏组织, 以及本实验室保存的鼻腔拭子样本。重组质粒 pMD18-T-VP60-1、pMD18-T-VP60-2 由本实验室构建, 分别含有 RHDV1 VP60 基因和 RHDV2 VP60 基因。

1.2 试剂与仪器

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、一步法 RT-PCR 试剂盒 One Step PrimeScriptTM RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 购自 TaKaRa 公司。PCR 仪为杭州博日科技有限公司产品。紫外凝胶成像系统为伯乐生命医学产品有限公司产品。QuantStudio 1 荧光定量 PCR 仪为美国 Applied Bio-systems 公司产品。

1.3 引物设计

采用 NanoDrop 测定重组质粒浓度并计算拷贝

数,用 ddH₂O 将重组质粒 pMD18-T-VP60-1 (61.8 ng/ μ L) 和 pMD18-T-VP60-2 (75.5 ng/ μ L) 分别稀释至 1 μ L 1×10^{10} 拷贝。通过 BLAST 比对分析,选取保守区域设计引物和探针,所有引物和探针均由生物工程(上海)股份有限公司合成。引物和探针序列如表 1 所示。

表 1 荧光定量 RT-PCR 引物与 TaqMan 探针序列

Table 1 Sequences of primers and TaqMan probes for fluorescence quantitative RT-PCR

名称	序列(5'→3')
RHDV-F	CGGTTTGCCGMCATTG
RHDV-R	CCAAARCTSAAGCACGTTKG
RHDV1-O-Probe	VIC-AGTGCAAGTTATTCTGCSAACAACCTC-BHQ1
RHDV2-C-Probe	FAM-AACGCAAGTTTCCTGGAAGCAGTTC-BHQ1

VIC 和 FAM 均为荧光染料,BHQ1 为荧光淬灭基团。

1.4 反应体系优化

按照 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书,采用 20 μ L 体系以及表 1 中的引物和探针扩增质粒标准品。通过优化引物浓度(0.1 μ mol/L、0.2 μ mol/L、0.3 μ mol/L、0.4 μ mol/L、0.6 μ mol/L、0.8 μ mol/L 和 1.0 μ mol/L)、探针浓度(0.1 μ mol/L、0.2 μ mol/L、0.3 μ mol/L、0.4 μ mol/L、0.6 μ mol/L、0.8 μ mol/L 和 1.0 μ mol/L)、退火温度(55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 和 65 $^{\circ}$ C)等参数,建立最佳双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系。

1.5 标准曲线的建立

将 pMD18-T-VP60-1 质粒(1 μ L 1×10^{10} 拷贝)和 pMD18-T-VP60-2 质粒(1 μ L 1×10^{10} 拷贝)等体积混合。将混合质粒 10 倍梯度稀释为 1 μ L $1\times 10^8 \sim 1\times 10^4$ 拷贝,分别使用双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系进行扩增,使用 Quant Studio™ Design & Analysis Software 生成标准曲线。

1.6 特异性试验

分别使用双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系扩增兔支气管败血波氏菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、兔多杀性巴氏杆菌、轮状病毒的 cDNA 以及 pMD18-T-VP60-1(1 μ L 1×10^8) 和 pMD18-T-VP60-2 (1 μ L 1×10^8) 等体积混合质粒,以 ddH₂O 为对照,进行特异性检测。

1.7 敏感性试验

将 pMD18-T-VP60-1 质粒(1 μ L 1×10^{10} 拷贝)和

pMD18-T-VP60-2 质粒(1 μ L 1×10^{10} 拷贝)等体积混合。将混合质粒 10 倍梯度稀释为 1 μ L $1\times 10^8 \sim 1\times 10^1$ 拷贝,分别使用双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系进行扩增,以 ddH₂O 为对照,进行敏感性检测。同时按照《兔出血症诊断技术》(NY/T 572-2023)中常规 RT-PCR 体系扩增质粒。

1.8 重复性试验

将 pMD18-T-VP60-1 质粒(1 μ L 1×10^{10} 拷贝)和 pMD18-T-VP60-2 质粒(1 μ L 1×10^{10} 拷贝)等体积混合。将混合质粒 10 倍梯度稀释为 1 μ L 1×10^6 拷贝、 1×10^5 拷贝和 1×10^4 拷贝,分别使用双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系进行扩增,并进行组内重复检测和组间重复检测(各 3 次重复)。以 Ct 值的变异系数评估该方法的重复性。

1.9 临床样本的检测

使用双重 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 体系和常规 RT-PCR 体系分别对 112 份临床样本(60 份肝脏组织和 52 份鼻肛拭子)进行检测。

2 结果与分析

2.1 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系

本研究对引物浓度、探针浓度、退火温度等参数进行优化,最终建立 20 μ L 双重 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 体系:2 \times One Step RT-PCR Buffer III 10.0 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.6 μ L,ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L,两种荧光探针(10 μ mol/L)各 0.8 μ L,待测样本 2.0 μ L,ddH₂O 4.8 μ L。反应程序设定为:42 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。

2.2 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系标准曲线

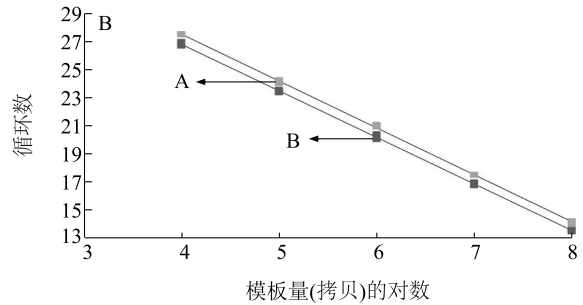
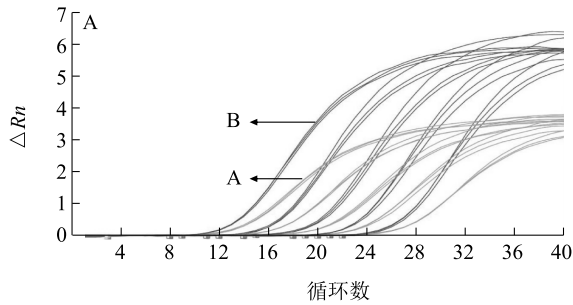
如图 1 所示,RHDV1 荧光强度与质粒拷贝数的标准曲线方程为 $Y = -3.323 \lg x + 14.168$,相关系数(r)=0.999,扩增效率为 99.94%;RHDV2 荧光强度与质粒拷贝数的标准曲线方程为 $Y = -3.301 \lg x + 13.536$,相关系数(r)=0.999,扩增效率为 100.88%。荧光强度与质粒拷贝数之间呈现出良好的线性关系,表明本研究建立的双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系可靠,能够满足定量分析的要求。

2.3 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的特异性检验

利用本研究建立的双重 TaqMan 探针荧光定量

RT-PCR 体系分别对兔支气管败血波氏菌、兔多杀性巴氏杆菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、轮状病毒的 cDNA 以及 pMD18-T-VP60-1 和 pMD18-T-VP60-2 混合

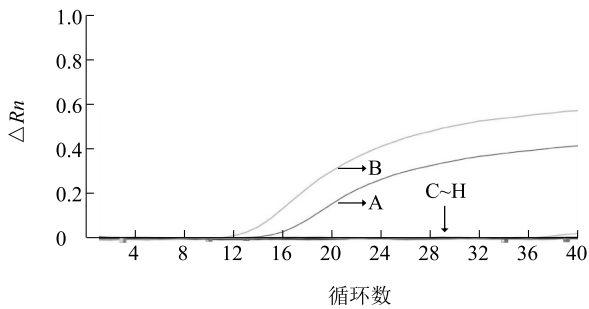
质粒进行检测。如图 2 所示,仅 pMD18-T-VP60-1 和 pMD18-T-VP60-2 扩增产生特异性扩增曲线,表明本研究构建的方法特异性较好。



A: pMD18-T-VP60-1; B: pMD18-T-VP60-2。Rn: 均一化报告基因。

图 1 pMD18-T-VP60-1、pMD18-T-VP60-2 质粒的扩增曲线 (A) 和标准曲线 (B)

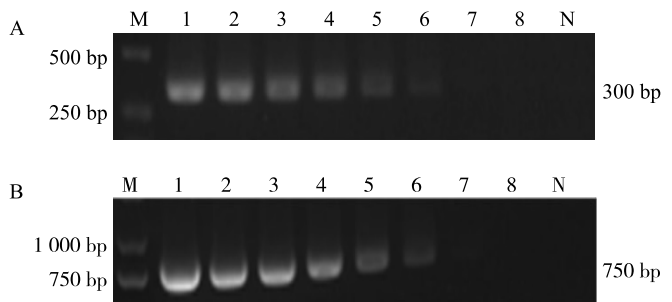
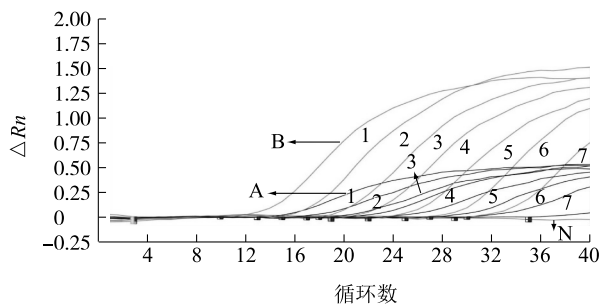
Fig.1 Amplification curves (A) and standard curves (B) of pMD18-T-VP60-1 and pMD18-T-VP60-2 plasmids



A: pMD18-T-VP60-1; B: pMD18-T-VP60-2; C: 兔多杀性巴氏杆菌; D: 兔支气管败血波氏菌; E: 沙门氏菌; F: 绿脓杆菌; G: 轮状病毒; H: ddH₂O 对照。Rn: 均一化报告基因。

图 2 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的扩增曲线

Fig.2 Amplification curves of the dual TaqMan probe quantitative RT-PCR system



A: pMD18-T-VP60-1; B: pMD18-T-VP60-2; M: DNA 分子量标准; 1~8: 1 μL 1 × 10⁸ 拷贝 ~ 1 × 10¹ 拷贝; N: ddH₂O 对照。Rn: 均一化报告基因。

图 3 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系 (A) 与常规 RT-PCR 体系 (B) 的敏感性检验

Fig.3 Sensitivity comparison between the dual TaqMan probe quantitative RT-PCR system (A) and the conventional RT-PCR system (B)

2.4 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的敏感性检验

如图 3 所示,本研究建立的双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系最低检测限为 1 μL 1 × 10² 拷贝。常规 RT-PCR 体系对质粒 pMD18-T-VP60-1 的最低检测限为 1 μL 1 × 10⁴ 拷贝,对质粒 pMD18-T-VP60-2 的最低检测限为 1 μL 1 × 10³ 拷贝。双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的灵敏度为常规 RT-PCR 体系的 10~100 倍。

2.5 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的重复性分析

根据双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系得到的 Ct 值,计算其变异系数。如表 2 所示,组内重复和组间重复的变异系数均小于 3%,表明建立的双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系稳定性较好。

表 2 双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系的重复性分析

Table 2 Reproducibility analysis of the dual TaqMan probe quantitative RT-PCR system

质粒	质粒含量 (拷贝, 1 μ L)	组内重复		组间重复	
		<i>Ct</i> 值	变异系数(%)	<i>Ct</i> 值	变异系数(%)
pMD18-T-VP60-1	1×10^6	26.69 \pm 0.157	0.60	26.66 \pm 0.445	1.70
	1×10^5	28.86 \pm 0.107	0.40	28.68 \pm 0.373	1.30
	1×10^4	32.32 \pm 0.308	1.00	32.28 \pm 0.181	0.60
pMD18-T-VP60-2	1×10^6	25.37 \pm 0.062	0.20	24.83 \pm 0.714	2.90
	1×10^5	27.72 \pm 0.190	0.70	27.26 \pm 0.108	0.40
	1×10^4	31.68 \pm 0.335	1.10	31.98 \pm 0.381	1.20

Ct 值:循环数。

2.6 临床样本检测

利用已建立的双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系和常规 RT-PCR 体系分别对 60 份肝脏组织和 52 份鼻肛拭子进行检测。如表 3 所示,利用本研究建立的双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系检出 16 份感染 RHDV1 的肝脏组织、27 份感染 RHDV2 的肝脏组织、2 份 RHDV1、RHDV2 混合感染的肝脏组织、3 份携带 RHDV1 的鼻肛拭子、29 份携带 RHDV2 的鼻肛拭子,检出率为 69%;用常规 RT-PCR 体系检出 14 份感染 RHDV1 的肝脏组织、23 份感染 RHDV2 的肝脏组织、20 份携带 RHDV2 的鼻肛拭子,检出率为 51%。表明本研究建立的双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系优于常规 RT-PCR 体系。

表 3 临床样本检测结果

Table 3 Test results of clinical samples

感染类型	双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 体系		常规 RT-PCR 体系	
	肝脏组织	鼻肛拭子	肝脏组织	鼻肛拭子
RHDV1 感染	16	3	14	0
RHDV2 感染	27	29	23	20
混合感染	2	0	0	0

RHDV1:兔出血症病毒毒株 1;RHDV2:兔出血症病毒毒株 2。

3 讨论与结论

兔出血症病毒(RHDV)引起的兔出血症是家兔的重要传染病。RHDV2 在法国被首次发现,并迅速在欧洲蔓延,目前已传播至澳大利亚、非洲、北美和亚洲^[19-21]。RHDV2 具有与 RHDV1 相似的高致病性,其快速传播能力和高致死率引起了广泛关注^[22]。

目前,传统组织灭活疫苗对 RHDV2 感染的保护效果有限,缺乏有效的交叉保护。RHDV2 在中国兔场广泛流行,给养兔业造成严重损失。目前已经建立了多种诊断 RHD1 和 RHD2 的方法,如病毒分离、RT-PCR^[23]、实时 RT-PCR^[24-26]、ELISA 等方法。SYBR Green 或 TaqMan 能够产生特异性荧光信号,且其灵敏度较高,已被广泛用于病毒检测^[22,27]。本研究基于 RHDV VP60 设计引物和探针,通过优化反应条件和体系,建立双重 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 检测体系:2 \times One Step RT-PCR Buffer III 10.0 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.6 μ L,ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μ L,两种荧光探针(10 μ mol/L)各 0.8 μ L,待测样本 2.0 μ L, ddH₂O 4.8 μ L。反应程序设定为:42 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。该体系对 RHDV1 和 RHDV2 具有高度特异性,检测灵敏度达到 1 μ L 100 拷贝,是常规 RT-PCR 体系灵敏度的 10~100 倍。重复性试验结果表明,*Ct* 值变异系数为 0.2%~2.9%,表明该方法稳定性较好。

与现有检测技术相比,本研究采用一步法直接检测样本 RNA,并通过两种探针实现 RHDV1 和 RHDV2 的同步检测,显著缩短检测时间,简化操作流程,更适用于临床样本的高通量筛查。该方法兼具高特异性和高灵敏度的优势,可大幅提升临床检测效率,为 RHD 的快速诊断与防治提供技术支持,并为后续开发商业化诊断试剂盒研制奠定基础。

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] MEYERS G, WIRBLICH C, THIEL H J, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus: genome organization and polyprotein processing of a calicivirus studied after transient expression of cDNA constructs[J]. *Virology*, 2000, 276(2): 349-363.
- [3] MEYERS G, WIRBLICH C, THIEL H J. Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome[J]. *Virology*, 1991, 184(2): 664-676.
- [4] 刘胜江, 薛华平, 浦伯清, 等. 兔的一种新病毒病——兔病毒性出血症[J]. *畜牧与兽医*, 1984, 6: 253-255.
- [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(1): 81.
- [6] PUGGIONI G, CAVADINI P, MAESTRALE C, et al. The new French 2010 rabbit hemorrhagic disease virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*) [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 96.
- [7] LE PENDU J, ABRANTES J, BERTAGNOLI S, et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses [J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(7): 1658-1666.
- [8] 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.
- [9] ZHOU J, MA Y, WANG M, et al. Establishment of a duplex TaqMan RT-PCR for the differential detection of RHDV GI.1 and GI.2 [J]. *Journal of Virological Methods*, 2022, 304: 114526.
- [10] HU B, WEI H, FAN Z, et al. Emergence of rabbit haemorrhagic disease virus 2 in China in 2020[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2021, 7(1): 236-239.
- [11] 吴忆春. 一株兔出血症病毒变异毒株的分离与鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022(4): 78-81.
- [12] 常赵阳, 刘玉梅, 刘潍萁, 等. 1 例兔出血症病毒 2 型感染疫情的诊断[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(6): 1886-1894.
- [13] 庞雪晴. RHDV *RdRp* 基因的克隆分析及其蛋白功能初步研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2023.
- [14] 吴忠斌. 山东省临沂地区兔病毒性出血症的分子流行病学调查[D]. 泰安: 山东农业大学, 2023.
- [15] MARCATO P S, BENAZZI C, VECCHI G, et al. Clinical and pathological features of viral haemorrhagic disease of rabbits and the European brown hare syndrome [J]. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 1991, 10(2): 371-392.
- [16] LOPES A M, DALTON K P, MAGALHAES M J, et al. Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(6): 1309-1319.
- [17] 董浩, 张乐颖, 左琴, 等. 兔出血症 2 型研究进展[J]. *动物医学进展*, 2023, 44(9): 97-101.
- [18] ABRANTES J, LOPES A M. A review on the methods used for the detection and diagnosis of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5): 972.
- [19] MAHAR J E, HALL R N, PEACOCK D, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2; GI.2) is replacing endemic strains of RHDV in the Australian landscape within 18 months of its arrival[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(2). DOI: 10.1128/JVI.01374-17.
- [20] ABRANTES J, LOPES A M, DALTON K P, et al. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012 - 2013 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(11): 1900-1902.
- [21] LOPES A M, ROUCO C, ESTEVES P J, et al. GI.1b/GI.1b/GI.2 recombinant rabbit hemorrhagic disease virus 2 (*Lagovirus europaeus*/GI.2) in Morocco, Africa[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(1): 279-283.
- [22] 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.
- [23] 宋艳华, 魏后军, 范志宇, 等. 兔出血症病毒经典毒株和变异毒株的 RT-PCR 鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(5): 1117-1121.
- [24] 王冠萱, 陈萌萌, 仇汝龙, 等. 兔出血症病毒 1、2 型双重 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测方法的建立和应用[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(18): 40-44.
- [25] 陈萌萌, 仇汝龙, 范志宇, 等. 兔出血症病毒 2 型 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(6): 1476-1480.
- [26] 谭永贵, 刘腾, 朱杰, 等. SYBR Green II 荧光定量 PCR 结合熔解曲线鉴别不同亚型兔病毒性出血症病毒方法的建立[J]. *中国动物传染病学报*, 2017, 25(1): 7-11.
- [27] GALL A, HOFFMANN B, TEIFKE J P, et al. Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR [J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 120(1/2): 17-32.

(责任编辑: 成纾寒)