



生物实验室

中国蓝舌病病毒流行株血清型实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用

宋子昂^{Δ1} 李占鸿^{Δ2} 杨振兴² 李卓然² 刘威³ 李华春² 廖德芳^{*2} 杨恒^{*2}

1 云南农业大学动物医学院 云南 昆明 650201

2 云南省畜牧兽医科学院云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室 云南 昆明 650224

3 内蒙古自治区农牧业科学院 内蒙古 呼和浩特 010031

摘要:【背景】蓝舌病病毒(Bluetongue virus, BTV)是一种严重危害反刍动物的虫媒病毒,我国存在 12 种血清型 BTV (BTV-1、-2、-3、-4、-5、-7、-9、-12、-15、-16、-21 和-24)的流行。【目的】建立 12 种血清型 BTV 的 RT-qPCR 定型方法,为 BTV 的诊断与流行病学研究提供技术保障。【方法】根据我国流行 BTV 基因节段 2 (Seg-2)序列设计引物和 TaqMan 探针,对引物的特异性与敏感性进行评估;以 12 种血清型 BTV 毒株和核酸阳性血液样本验证建立的血清型 RT-qPCR 检测方法;将其应用于库蠓与动物血液样本中 BTV 的定型。【结果】建立的 BTV 血清型 RT-qPCR 检测方法具有良好的特异性与灵敏性,反应的扩增效率(E)值 $>90.3\%$,相关系数(R^2)值在 0.991–0.999 之间,对 12 种血清型 BTV 核酸的检测下限在 25–48 拷贝之间。对 165 株 BTV 的 RT-qPCR 定型结果与病毒的 Seg-2 测序鉴定结果一致;对 194 份采集于哨兵动物的 BTV 核酸阳性血液样本的 RT-qPCR 定型结果与感染动物上分离 BTV 的血清型一致。采用建立的方法,从 2019 年云南省师宗县与景洪市采集的库蠓与牛血液样本中鉴定出 6 种血清型的 BTV (BTV-1、-2、-4、-5、-16 和-24)。【结论】研究建立的 12 种 BTV 血清型 RT-qPCR 定型方法具有特异、敏感和省时的优点,可用于媒介与动物感染 BTV 的血清型定型,具有良好的应用与推广价值。

关键词: 蓝舌病病毒, 血清型, 实时荧光定量 RT-PCR, 应用

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1200505); National Natural Science Foundation of China (31760744); National Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (201303035); Young and Middle-Aged Academic and Technology Leader Reserve Talents Training Project of Yunnan Province (2017HB055)

^ΔThese authors equally contributed to these work

***Corresponding authors:** E-mail: LIAO Defang: wenjie3@hotmail.com; YANG Heng: yangheng2008.cool@163.com

Received: 04-10-2020; **Accepted:** 01-03-2021; **Published online:** 26-04-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200505); 国家自然科学基金(31760744); 国家公益性行业(农业)专项(201303035); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目(2017HB055)

^Δ对本文贡献相同

***通信作者:** E-mail: 廖德芳: wenjie3@hotmail.com; 杨恒: yangheng2008.cool@163.com

收稿日期: 2020-10-04; **接受日期:** 2021-03-01; **网络首发日期:** 2021-04-26

Development and application of a real-time RT-PCR for serotyping of bluetongue virus strains epidemic in China

SONG Ziang^{Δ1} LI Zhanhong^{Δ2} YANG Zhenxing² LI Zhuoran² LIU Wei³
LI Huachun² LIAO Defang^{*2} YANG Heng^{*2}

1 College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

2 Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virology Laboratory, Yunnan Animal Science and Veterinary Institute, Kunming, Yunnan 650224, China

3 Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Hohhot, Inner Mongolia 010031, China

Abstract: [Background] Bluetongue virus (BTV), one kind of arbovirus, causes seriously harms in ruminants and twelve serotypes of BTV (BTV-1, -2, -3, -4, -5, -7, -9, -12, -15, -16, -21 and -24) are widely prevalent in China. [Objective] To provide technical support for the diagnosis and epidemiology research of BTV, we aimed to develop serotyping RT-qPCR method for 12 BTV serotypes which were epidemic in China. [Methods] Primers and TaqMan probes based on the Seg-2 sequences of Chinese BTVs were designed and their specificity and sensitivity were evaluated. The reliability of the established RT-qPCR method was assessed with BTV strains and BTV-positive blood samples then further applied to identify the serotypes of BTV in *Culicoides* and blood samples. [Results] The established BTV serotype RT-qPCR method showed highly specificity and sensitivity with the amplification efficiency (*E*) values larger than 90.3%, the correlation coefficient values (R^2) ranging from 0.991 to 0.999 and the minimum copy number of detectable BTV nucleic acid ranging from 25 to 48 copies. Serotype identification of 165 isolated BTV strains by RT-qPCR and Seg-2 sequencing showed consistent results. Furthermore, serotype RT-qPCR identification results of 194 BTV-positive blood samples from infected sentinel animals were consistent with serotyping results of the isolated BTVs. Using the established RT-qPCR method, six serotypes of BTV (BTV-1, -2, -4, -5, -16 and -24) were identified from the *Culicoides* and cattle blood samples collected from Shizong county and Jinghong district of Yunnan province. [Conclusion] The BTV serotype RT-qPCR established here could be used for diagnosis the serotypes of BTV in vectors and animals with advantage of time saving, high specificity and sensitivity.

Keywords: Bluetongue virus, serotype, RT-qPCR, application

蓝舌病毒(Bluetongue Virus, BTV)感染引起的动物蓝舌病(Bluetongue, BT)是一种严重侵害反刍动物的烈性传染病,世界动物卫生组织将 BT 列为法定报告的动物疫病,我国也将其列为一类动物疫病^[1]。BT 的流行和暴发给牛羊养殖业造成巨大的经济损失,严重影响畜产品正常国际贸易。2006–2008 年,非洲来源的 BTV-8 型毒株在欧洲大部分国家蔓延,导致欧洲有记录以来最为严重的 BT 暴发,直接经济损失高达 30 亿美元^[2-3]。尽管防控及时,但欧洲仍不断有 BTV-8 型引起疫情的报道^[4-5],BT 成为国际上继口蹄疫与禽流感后备受关注的动物疫病。

BTV 隶属呼肠孤病毒科(Reoviridae)环状病毒属(Orbivirus),病毒基因组大小约 20 kb,由 10 个节段(Seg-1–Seg-10)的双链 RNA (Double Stranded RNA, dsRNA)组成^[2-3]。BTV 血清型众多,目前世界范围内已发现 27 种血清型的 BTV (BTV-1–BTV-27)^[6-7],病毒基因节段 2 (Segment 2, Seg-2)编码的 VP2 蛋白决定着病毒的血清型,是诱导产生病毒特异性中和抗体的主要蛋白^[8]。Seg-2/VP2 序列高度变异,不同血清型 BTV 的 Seg-2 核酸序列相似度在 41.4%–71.2%之间,VP2 氨基酸序列相似度在 27.0%–77.6%之间。根据 Seg-2 的变异,可将 27 种血清型 BTV 划分为 A–L 等 12 种基因型;而同一血清型 BTV 毒株可划分为 Western 地域型(北美洲、

南美洲与部分欧洲毒株)与 Eastern 地域型(亚洲与澳大利亚毒株)^[9-10]。

1979 年,本实验室在我国云南省师宗县的绵羊中首次发现 BT 的暴发;1996–1997 年,从云南省的哨兵牛上分离到 7 种血清型的 BTV (BTV-1、-2、-3、-4、-12、-15 和-16)^[11];2013–2017 年,从云南省、广东省、江苏省与广西壮族自治区设立的哨兵动物(牛与山羊)中相继分离出 12 种血清型的 BTV (BTV-1、-2、-3、-4、-5、-7、-9、-12、-15、-16、-21 和-24)共 300 余株^[12-15]。我国流行 BTV 的血清型复杂多样,同一区域存在多种血清型 BTV 的流行,不同血清型 BTV 毒株的致病性存在较大差异,给我国 BT 的防控带来了严峻的挑战。建立准确快速的 BTV 血清型鉴定方法,不仅是 BTV 流行病学研究的重要内容,也是科学制定 BT 防控策略的重要保障。

血清中和试验(Serum Neutralization Test, SNT)与病毒中和试验(Viral Neutralization Test, VNT)是 BTV 血清型鉴定的经典技术^[16],但存在耗时长、成本高的缺陷,RT-PCR 与实时荧光定量 RT-PCR (RT-qPCR)已成为 BTV 血清型鉴定的主流技术^[17-18]。RT-qPCR 具有通量高、灵敏性与特异性强的优势,是鉴定临床样本或媒介中 BTV 血清型的主要方法,英国 Pirbright 研究所(欧洲 BTV 参考实验室)保存了大量欧洲 BTV 分离毒株与采集自感染动物的血液样本,为开发 BTV 血清型 RT-qPCR 定型技术提供了可能^[18]。

与国外比较,我国在 BTV 诊断检测技术方面的研究相对滞后,根据我国流行 BTV 的遗传特征,建立特异的 BTV 血清型 RT-qPCR 检测方法十分必要。通过前期在全国范围开展的 BTV 流行病学研究,本实验室已建立了我国比较完备的 BTV 病毒库、阳性血液库与血清库^[11-15]。本研究根据我国流行 BTV 的 Seg-2 序列特征,拟建立我国流行 12 种血清型 BTV 的 RT-qPCR 定型方法,以期 BTV 的流行病学调查与 BT 防控策略的制定提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 病毒、血液样品与核酸样品

24 种 BTV 血清型(BTV-1–BTV-24)国际标准参考毒源自 OIE 南非参考实验室(Onderstepoort Veterinary Institute)。2012–2014 年,中国分离 12 种血清型 BTV (BTV-1、-2、-3、-4、-5、-7、-9、-12、-15、-16、-21 与-24)流行毒株(表 1),1979–2020 年我国云南、江苏、广西、广东等地分离的 165 株 BTV 由本实验室保存(表 2),上述毒株已通过 Seg-2 测序确认病毒的血清型^[19]。流行性出血病病毒(Epizootic Hemorrhagic Disease Virus, EHDV)^[20]、中山山病毒(Chuzan Virus, CHUV)^[21]与阿卡斑病毒(Akabane Virus, AKAV)^[22]由本实验室从哨兵动物上分离保存。

BTV 感染动物的 EDTA 抗凝血样本共计 194 份,于 2013–2020 年采集自云南、广西、广东设立的哨兵动物(表 2),对动物感染 BTV 血清型的确认包括:(1) 动物的血液中检测到 BTV 群特异性抗体与病毒核酸^[23-24];(2) 从动物血液中分离出 BTV,并通过 Seg-2 测序明确分离病毒的血清型^[19];(3) 动物血清中检测到针对分离 BTV 毒株的中和抗体。

BTV 基因节段 10 (Seg-10)全长序列克隆质粒 pLB-BTV-NS3-T7^[24]与口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)阳性核酸由本实验室保存;牛流行热病毒(Bovine Ephemeral Fever Virus, BEFV)阳性核酸由中国农业科学院兰州兽医研究所惠赠。

1.2 主要试剂和仪器

病毒 RNA 抽提试剂盒 MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit, Thermo-Fisher 公司;总 RNA 提取试剂 RNAiso-Plus、实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒 One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Real Time)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 Premix Ex Taq Kit (Probe qPCR)、实时荧光定量 qPCR 试剂盒(SYBR Green)、RNase Inhibitor、逆转录酶 PrimeScript II Reverse Transcriptase, TaKaRa 公司。KingFisher™ Flex 核酸自动提取仪与实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystem 公司。

表 1 中国 12 种 BTV 血清型流行毒株的分离信息与核酸拷贝数定量结果

Table 1 Source information and nucleic acid copy numbers of Chinese BTV strains belonging to 12 serotypes

毒株号 Strain No.	血清型 Serotype	分离动物 Isolation animals	分离时间(年份) Isolation time (Year)	分离地点 Isolation place	核酸拷贝数 Copy numbers of nucleic acid (copies/ μ L)
YNSZ/V147	BTV-1	山羊 Goat	2012	云南 Yunnan	9.62×10^8
YNPE/V146	BTV-2	牛 Cattle	2013	云南 Yunnan	1.28×10^9
YNDH/V025	BTV-3	牛 Cattle	2013	云南 Yunnan	3.46×10^9
YNPE/V030	BTV-4	牛 Cattle	2013	云南 Yunnan	4.54×10^8
YNSZ/V084	BTV-5	山羊 Goat	2012	云南 Yunnan	7.85×10^8
GDST/V089	BTV-7	牛 Cattle	2014	广东 Guangdong	2.66×10^8
YNDH/V008	BTV-9	牛 Cattle	2013	云南 Yunnan	8.45×10^8
GXNN/V007	BTV-12	牛 Cattle	2012	广西 Guangxi	6.82×10^9
YNPE/V061	BTV-15	牛 Cattle	2014	云南 Yunnan	1.43×10^9
YNSZ/V109	BTV-16	山羊 Goat	2012	云南 Yunnan	2.54×10^8
JSXY/V057	BTV-21	牛 Cattle	2013	江苏 Jiangsu	7.14×10^8
YNDH/V015	BTV-24	牛 Cattle	2013	云南 Yunnan	8.45×10^8

注: 以上毒株已获取全基因组序列

Note: Complete genome sequences of these strains have been acquired

表 2 中国分属 12 种血清型 165 株 BTV 的分离信息与血清型 RT-qPCR 验证结果

Table 2 Source information and RT-qPCR serotyping results of 165 Chinese BTV strains belonging to 12 serotypes

血清型 Serotype	分离地 Isolation place	分离动物 Isolation animals	分离时间(年份) Isolation time (Year)	毒株数 Numbers of virus strains	RT-qPCR C_t 值* C_t values of RT-qPCR*
BTV-1	云南、广西 Yunnan, Guangxi	牛、山羊 Cattle, goat	1979, 1996, 1997, 2012, 2013, 2015, 2016, 2020	15	17.6 \pm 4.1
BTV-2	云南、广东 Yunnan, Guangdong	牛、山羊 Cattle, goat	1996, 1997, 2013, 2014	15	19.3 \pm 4.6
BTV-3	云南 Yunnan	牛 Cattle	1996, 1997, 2012, 2013, 2014	18	17.8 \pm 3.9
BTV-4	云南、广西、广东 Yunnan, Guangxi, Guangdong	牛、山羊 Cattle, goat	1996, 2012, 2013, 2015, 2016, 2017, 2020	31	18.4 \pm 3.9
BTV-5	云南、广东 Yunnan, Guangdong	牛 Cattle	2012, 2013, 2015, 2016	8	17.8 \pm 4.7
BTV-7	广东 Guangdong	牛、山羊 Cattle, goat	2014, 2020	3	20.2 \pm 5.0
BTV-9	云南 Yunnan	牛 Cattle	2012, 2015	9	18.3 \pm 4.9
BTV-12	云南、广西、广东、江苏 Yunnan, Guangxi, Guangdong, Jiangsu	牛、山羊 Cattle, goat	1996, 1997, 2012, 2014	13	18.5 \pm 4.9
BTV-15	云南、江苏 Yunnan, Jiangsu	牛 Cattle	1996, 1997, 2014	5	19.4 \pm 3.8
BTV-16	云南、广西、广东 Yunnan, Guangxi, Guangdong	牛、山羊 Cattle, goat	1996, 1997, 2012, 2013, 2014, 2015, 2017	26	18.9 \pm 3.9
BTV-21	云南、广西、广东 Yunnan, Guangxi, Guangdong	牛、山羊 Cattle, goat	1996, 2013, 2014, 2015	17	17.4 \pm 4.5
BTV-24	云南 Yunnan	牛 Cattle	2012, 2013, 2015	5	16.7 \pm 3.1

注: *: C_t 值以每种 BTV 血清型毒株 RT-qPCR 反应 C_t 值的平均数 \pm 标准差表示Note: *: The C_t value of RT-qPCR detection for each BTV serotype was showed by the means of the C_t values \pm standard deviation

1.3 引物和探针的设计及合成

从 GenBank 中下载 BTV 的 Seg-2 序列,使用 MAFFT 软件^[25]与本实验室获取的我国 12 种血清型 BTV 毒株 Seg-2 全长序列(共计 72 条)进行序列比对。选择在同一血清型内高度保守区域,使用 Beacon Designer 8.0 软件进行特异性扩增引物与

TaqMan 探针的设计(表 3)。探针的 5'端标记 FAM (6'羧基荧光基团)报告基团,3'端标记 BHQ1 (黑洞淬灭基团)。引物由上海捷瑞生物工程公司合成,探针的纯度为 HPLC 级(液相色谱纯化),合成的引物与探针以无 RNA 酶水稀释为 10 μmol/L 备用。

表 3 12 种 BTV 血清型 RT-qPCR 引物及探针信息
Table 3 Information of RT-qPCR primers and probes for 12 BTV serotypes

血清型 Serotypes	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	引物位置 Primer position	产物大小 Product size (bp)	参考毒株数* Numbers of reference strains*
BTV-1	BTV-1_F	GGTTATGATGGGAARCGAGC	261-281	197	China (9), India (8) Australia (47)
	BTV-1_R	GTATCCGCTTTCTTTGARTCAATT	415-435		
	BTV-1_Probe	TCTTTCATCATCCAYTGTAACCATCGCTC	320-349		
BTV-2	BTV-2_F	TAATACATTGGGAGTACCAGTTG	1 288-1 311	156	China (5), Taiwan China (1), India (5) Australia (2)
	BTV-2_R	CATYTATTATCTCCCCRACCAT	1 400-1 422		
	BTV-2_Probe	CTATCACGTCCTCATCGCTRTCTG	1 364-1 389		
BTV-3	BTV-3_F	ATTTACCGATTACRCACCCCGT	2 597-2 619	97	China (6), Japan (1) India (1), Australia (1)
	BTV-3_R	CTYCGTTTAAGCCTATCTATGCG	2 648-2 671		
	BTV-3_Probe	CGCGTCTGAAACCTCRAAAGCAACCAAC	2 623-2 651		
BTV-4	BTV-4_F	GTGCCGAGATTATTGGATATAAC	236-259	134	China (15), India (11)
	BTV-4_R	GGTTGTATATCCATYCGATCGTC	324-347		
	BTV-4_Probe	TCGCCCACCTTCATCCACTTCGCATTA	299-325		
BTV-5	BTV-5_F	ACTAGTGAGCCGTTCCAGCC	626-646	94	China (5), South Africa (3), France (1), Nigeria (1)
	BTV-5_R	TTGAAGTAAYCCTGCGCGGAA	716-737		
	BTV-5_Probe	ATACCCAGGATCAGCCATGTCAACCCT	683-710		
BTV-7	BTV-7_F	AATATGTTTCCGTGCTTACGAG	1 093-1 115	157	China (2), Australia (1), South Africa (2)
	BTV-7_R	GTGCGTACACGTARTTCTCATT	1 206-1 238		
	BTV-7_Probe	TGCGAGCGAAACTCAATTCGGCGAT	1 124-1 149		
BTV-9	BTV-9_F	GTACTCACGTCGYATATGGAG	1 064-1 084	130	China (3), India (8), Australia (1)
	BTV-9_R	CGMATGGCGTACACTCCAATTA	1 172-1 193		
	BTV-9_Probe	TCCGCGCAATCAACGTGCCCCG	1 107-1 129		
BTV-12	BTV-12_F	GTTGGCGYATATGGTGGAGTAA	1 067-1 088	75	China (7), Japan (1), India (1)
	BTV-12_R	CRTCCCTAGYTCCATCTCA	1 123-1 144		
	BTV-12_Probe	CGTAYCCCTGCTTACGAGGAACGAT	1 091-1 115		
BTV-15	BTV-15_F	TTTAGTTCCRACAGAGAGAGG	2 272-2 293	81	China (5), Australia (2)
	BTV-15_R	CAATCTCCCARACTCCCATCA	2 332-2 332		
	BTV-15_Probe	AGCTCCCTCCCAACCATCGCTGG	2 306-2 328		
BTV-16	BTV-16_F	GAGGGAACCTCGAGCGAACA	821-840	259	China (9), Japan (8), India (5), Indonesia (3), Australia (1)
	BTV-16_R	CCGTTATTTGTGTCCGACGC	1 060-1 079		
	BTV-16_Probe	CAACAACCGATCCGGAAAGAAACG	970-994		
BTV-21	BTV-21_F	ATATTACRTCRAAAGGCCAAAG	981-1003	169	China (5), Japan (2), India (3), Indonesia (6), Australia (14)
	BTV-21_R	ATGTCCARTACACRTCTCCAAG	1 128-1 149		
	BTV-21_Probe	TTGGTGGACGAATCCGTACCCATGT	1 070-1 094		
BTV-24	BTV-24_F	TACCGCTTCTTTTYCTTATCCA	2 228-2 249	120	China (3), South Africa (2), Israel (6), France (3), America (1)
	BTV-24_R	TCGCATAAGCTCCAACCTTCAAC	2 326-2 347		
	BTV-24_Probe	TGGTCTGTCCAGTGATACTWTATGGC	2 278-2 304		

注: *: 括号中的数值表示引物设计时参考的 BTV 毒株数
Note: *: Numbers in the parentheses indicate the number of the BTV strains used for primers design

1.4 病毒核酸的提取

采用2种方式提取病毒核酸:(1) 使用RNAiso-Plus 提取中国12种血清型BTV流行毒株(表1)、24种血清BTV国际参考毒株、EHDV、CHUV、AKAV与库蠓样本的核酸;(2) 165株中国BTV毒株与BTV感染动物的EHDA抗凝血液样本,使用磁珠法病毒核酸提取试剂盒,于核酸自动提取仪上按操作说明提取核酸。将提取的核酸转入EP管中,于94℃变性3 min,立即冰浴,冻存于-80℃备用。

1.5 cDNA的合成与定量

以提取的病毒核酸为模板,使用随机引物和PrimeScript II逆转录酶进行cDNA的合成。以10倍梯度稀释的pLB-BTV-NS3-T7质粒为标准品(核酸拷贝数为 1.3×10^2 – 1.3×10^8 拷贝/μL)建立标准曲线,取1 μL合成的12种血清型BTV流行毒株cDNA为模板,通过BTV群特异性RT-qPCR检测方法^[24]进行绝对定量qPCR反应,通过标准曲线计算出cDNA的拷贝数。

1.6 BTV血清型RT-qPCR引物与探针的筛选

针对每一待检血清型BTV,分别设计3套候选扩增引物,通过以下3方面进行筛选:(1) 以24种血清型BTV、EHDV、CHUV、AKAV、FMDV与BEFV的cDNA为模板,进行qPCR反应(SYBR Green染料法),通过扩增产物的熔解曲线(Melting Curve)与电泳检测,对引物的特异性进行筛选;(2) 以 10^2 拷贝/μL的12种血清型BTV毒株cDNA为模板进行qPCR反应(SYBR Green染料法),重复3次,通过比较荧光信号循环阈值(Cycle Threshold, C_t)与熔解曲线,筛选扩增效率最高的引物;(3) 在确认扩增引物的基础上,合成TaqMan探针,以24种血清型BTV的cDNA为模板进行“探针+引物”的qPCR反应,确认引物与探针组合的反应性与特异性。

1.7 标准曲线的绘制和敏感性试验

以拷贝数确定的12种血清型BTV的cDNA为标准品,10倍梯度稀释至拷贝数为 10^0 – 10^8 拷贝/μL这9个梯度,每个梯度重复2次qPCR反应(探针法)。

以病毒核酸拷贝数的对数值为横坐标,以 C_t 值的平均值为纵坐标建立标准曲线,计算相关系数(R^2)和扩增效率(E 值),分析不同血清型BTV核酸的最低检测拷贝数。qPCR反应体系: Premix *Ex Taq* 10 μL, ROX Dye II (50×) 0.2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各0.4 μL, TaqMan探针(10 μmol/L) 0.8 μL, ddH₂O 7.2 μL, 核酸模板1 μL。qPCR反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40个循环。

1.8 重复性试验

取低浓度(10^2 拷贝/μL)与高浓度(10^7 拷贝/μL)的12种血清型BTV毒株cDNA 1 μL为模板,进行3次批内和批间平行qPCR试验,计算所得 C_t 值的标准差(Standard Deviation, STD)与变异系数(Coefficient of Variation, CV),分析检测方法的重复性。

1.9 以中国分离BTV毒株验证RT-qPCR检测效果

取1979–2020年我国12种血清型165株BTV(表2)核酸各1 μL为模板进行病毒血清型的RT-qPCR检测。反应体系: 2×One Step RT-PCR Buffer III 10.0 μL; *Ex Taq* HS 0.4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μL, 上、下游引物(10 μmol/L) 各0.4 μL, TaqMan探针(10 μmol/L) 0.8 μL, ROX Reference Dye II (50×) 0.4 μL, 加入RNase-Free H₂O补足20 μL。反应条件: 42℃ 5 min; 95℃ 10 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40个循环。

1.10 以BTV核酸阳性血液样本验证RT-qPCR检测效果

以12种不同血清型BTV感染哨兵动物上采集的血液样本各20份,取5 μL提取的核酸为模板,进行BTV的群特异性RT-qPCR反应^[24],剔除 C_t 值>37.0的核酸样本后,将血液核酸样本分为“强阳性样本”(C_t 值在29.0–34.0之间)和“弱阳性样本”(C_t 值在34.0–37.0之间),进行BTV血清型RT-qPCR的回复验证,以RT-qPCR反应产生扩增曲线,而且 C_t 值<38.0判定为阳性结果。

1.11 BTV血清型RT-qPCR检测方法的应用

2019年在云南省师宗县五龙乡(经纬度为

E104°29'65"和 N24°60'98", 海拔 1 000 m)不同牛羊圈舍设置捕蚊灯, 采集媒介昆虫样本, 在显微镜下筛选出库蠓, 加入适量的 PBS 进行研磨, 使用 RNAiso-Plus 提取核酸, 取 20 μ L 提取的核酸反转录合成 cDNA, 以 2 μ L cDNA 为模板分别进行 12 种血清型 BTV 的 qPCR 检测。

取 2019 年云南省景洪市牛、羊养殖场采集的血液样品 40 份提取核酸, 通过 BTV 群特异性 RT-qPCR 筛选出 BTV 阳性核酸样本(C_t 值 <38.0)。取 BTV 阳性核酸样本各 10 μ L 进行混合, 使用异丙醇进行沉淀, 以适量无 RNA 酶水进行溶解, 反转录合成 cDNA, 进行 BTV 血清型 qPCR 检测。根据 BTV 血清型检测结果, 取每一份 BTV 阳性核酸 5 μ L 为模板, 进行对应血清型 BTV 的 RT-qPCR 鉴定, 确认每份 BTV 阳性核酸样本的血清型。

2 结果与分析

2.1 BTV cDNA 拷贝数的定量

为分析 BTV 血清型特异性 RT-qPCR 方法的灵敏度, 反转录合成我国 12 种血清型 BTV (BTV-1、-2、-3、-4、-5、-7、-9、-12、-15、-16、-21 和-24) 流行毒株的 cDNA, 绝对定量 qPCR 分析结果显示其拷贝数在 2.54×10^8 拷贝/ μ L (BTV-16)– 6.82×10^9 拷贝/ μ L (BTV-12)之间(表 1)。

2.2 BTV 血清型 RT-qPCR 引物的筛选

针对每一待检 BTV 血清型合成 3 对 PCR 扩增引物, 采用 qPCR (SYBR Green 染料法)进行扩增引物的特异性验证。结果显示, 设计的大部分 PCR 扩增引物具有良好的特异性, 仅与对应血清型 BTV

的 cDNA 模板之间产生单一溶解曲线峰, 扩增产物电泳仅见单一的 DNA 条带; BTV-3、BTV-9、BTV-12、BTV-21 和 BTV-24 型各有一对引物的特异性较差, 产生 2–3 个溶解曲线峰, 淘汰以上引物对。

经过第 1 轮筛选, 以 10^2 拷贝的 12 种 BTV 血清型代表毒株 cDNA 为模板, 通过 qPCR (SYBR Green 染料法)分析引物的扩增效率, 对剩余引物对进行第 2 轮筛选。通过剔除扩增效率较低(平均 C_t 值最高)的引物, 最终获得了 12 对特异性强扩增效率高的扩增引物, 其扩增产物大小在 75–259 bp 之间(图 1、表 3)。根据筛选确定的 PCR 扩增引物合成 TaqMan 探针, 以 24 种血清型 BTV 的 cDNA 为模板进行“探针+引物”的 qPCR 反应, 结果显示设计的引物与探针具有高度的特异性, 仅对相应血清型 BTV 毒株的 cDNA 产生扩增曲线, 与其他血清型 BTV、EHDV、CHUV、AKAV、BEFV 和 FDMV 核酸模板之间无扩增曲线产生。

2.3 RT-qPCR 的标准曲线和敏感性

将 12 种血清型 BTV 代表毒株的 cDNA 稀释为 10^0 – 10^8 拷贝/ μ L 这 9 个梯度, 每个梯度设置 2 个重复进行 qPCR 反应。结果显示, 不同血清型 BTV 的 qPCR 反应扩增效率(E 值)在 90.3% (BTV-1 型)–107.0% (BTV-4 型)之间, 不同浓度核酸模板产生的扩增曲线具有良好的线性关系, 相关系数(R^2)值在 0.991 (BTV-3 型)–0.999 (BTV-5 型)之间; 不同血清型 BTV 核酸最低检出量在 25 拷贝(BTV-16 型)–48 拷贝(BTV-1 型)之间(表 4), 表明建立的 BTV 血清型 RT-qPCR 方法具有良好的敏感性。

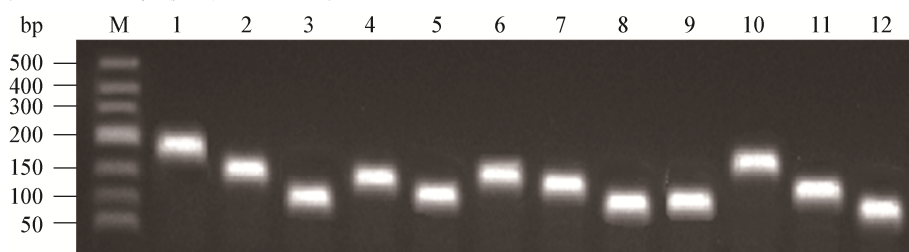


图 1 12 种 BTV 血清型 qPCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis analysis of the qPCR amplification products of twelve BTV serotypes

注: M: DL500 DNA Marker; 1–12: BTV-1、-2、-3、-4、-5、-7、-9、-12、-15、-16、-21 和-24 的 qPCR 扩增产物

Note: M: DL500 DNA Marker; 1–12: qPCR products of BTV-1, -2, -3, -4, -5, -7, -9, -12, -15, -16, -21 and -24

表 4 BTV 血清型特异性 RT-qPCR 检测方法的标准曲线和敏感度分析
Table 4 Standard curves and sensitivity assay results of BTV serotype RT-qPCR

血清型 Serotype	斜率 Slope	截距 Intercept	回归方程 Regression equation	扩增效率 E (%)	相关系数* R ² *	敏感度** Sensitivity (copies/μL)**
BTV-1	-3.578	43.10	y=-3.578x+43.10	90.3	0.998	48
BTV-2	-3.403	39.50	y=-3.403x+39.50	96.7	0.997	32
BTV-3	-3.265	41.57	y=-3.265x+41.57	102.4	0.991	34
BTV-4	-3.165	39.90	y=-3.165x+39.90	107.0	0.992	45
BTV-5	-3.391	42.30	y=-3.021x+42.30	97.2	0.999	39
BTV-7	-3.301	42.37	y=-3.301x+42.37	100.9	0.995	44
BTV-9	-3.239	41.23	y=-3.239x+41.23	103.6	0.996	42
BTV-12	-3.327	40.13	y=-3.327x+40.13	99.8	0.997	34
BTV-15	-3.475	42.56	y=-3.475x+42.56	94.0	0.992	47
BTV-16	-3.523	40.36	y=-3.523x+40.36	92.2	0.996	25
BTV-21	-3.305	38.75	y=-3.305x+38.75	100.7	0.997	35
BTV-24	-3.168	39.53	y=-3.168x+39.53	106.9	0.998	42

注：*：R²表示相关系数；**：敏感度以可检测到的最低病毒核酸拷贝数表示
Note: *: R² was the correlation coefficient; **: Sensitivity was denoted as the minimum copy numbers of viral nucleic acid could be detected

2.4 RT-qPCR 的重复性
重复性试验结果显示，批内重复性试验的标准差在 0.08-0.35 之间，变异系数在 0.41%-0.99% 之间；批间重复性试验的标准差在 0.09-0.53 之间，变异系数在 0.48%-1.00% 之间(表 5)。批内和批间重复性试验变异系数均≤1%，表明本研究建立的 RT-qPCR 检测方法具有良好的重复性。

表 5 BTV 血清型特异性 RT-qPCR 的重复性
Table 5 Repeatability of the BTV serotyping RT-qPCR

血清型/模板浓度 Serotype/Concentration of template (copies/μL)		批内重复性		批间重复性	
		Intra-assay reproducibility		Inter-assay reproducibility	
		C _t 值	变异系数	C _t 值	变异系数
		C _t value (X±SD)	CV (%)	C _t value (X±SD)	CV (%)
BTV-1	10 ²	18.07±0.15	0.83	17.94±0.09	0.48
	10 ⁷	36.02±0.18	0.50	35.62±0.29	0.81
BTV-2	10 ²	15.72±0.11	0.70	15.75±0.15	0.94
	10 ⁷	32.63±0.15	0.46	31.55±0.21	0.67
BTV-3	10 ²	18.84±0.08	0.41	18.69±0.13	0.67
	10 ⁷	34.99±0.35	0.99	34.83±0.25	0.72
BTV-4	10 ²	15.72±0.11	0.70	15.74±0.12	0.77
	10 ⁷	32.63±0.15	0.46	32.70±0.23	0.70
BTV-5	10 ²	18.61±0.12	0.65	18.28±0.18	1.00
	10 ⁷	35.56±0.26	0.73	35.53±0.53	0.98
BTV-7	10 ²	19.08±0.14	0.74	19.24±0.13	0.65
	10 ⁷	36.02±0.33	0.92	35.87±0.29	0.82
BTV-9	10 ²	18.62±0.14	0.77	18.61±0.18	0.95
	10 ⁷	34.65±0.33	0.94	35.35±0.25	0.71
BTV-12	10 ²	16.97±0.13	0.76	17.79±0.17	0.93
	10 ⁷	33.96±0.33	0.98	34.07±0.34	0.98
BTV-15	10 ²	18.06±0.16	0.86	18.77±0.14	0.73
	10 ⁷	35.57±0.35	0.98	35.96±0.20	0.54
BTV-16	10 ²	15.42±0.14	0.88	15.43±0.11	0.70
	10 ⁷	33.33±0.23	0.70	33.93±0.30	0.89
BTV-21	10 ²	15.60±0.13	0.83	15.04±0.10	0.66
	10 ⁷	32.10±0.31	0.95	32.87±0.28	0.84
BTV-24	10 ²	17.57±0.14	0.82	17.81±0.14	0.79
	10 ⁷	33.48±0.26	0.79	33.32±0.30	0.90

2.5 中国 BTV 流行毒株血清型 RT-qPCR 检测结果

为了验证建立的 RT-qPCR 检测方法能否准确鉴定我国流行 BTV 毒株的血清型,选择 1979–2020 年云南、广西、广东、江苏等地分离的 12 种血清型 BTV 共计 165 株,进行 BTV 血清型的 RT-qPCR 回复验证。结果显示,每种 BTV 血清型 RT-qPCR 均可检测对应血清型的 BTV 毒株,获取的 C_t 值在 11.2–25.8 之间变化(图 2、表 2),表明建立的 BTV 血清型 RT-qPCR 可准确对我国不同时间与不同地域流行的 BTV 毒株进行血清型鉴定。

2.6 BTV 阳性血液样品的检测结果

取 2013–2020 年不同血清型 BTV 感染哨兵动物上采集的血液样本各 20 份,提取核酸进行 BTV 群特异性 RT-qPCR 检测,以阳性核酸(数量在 13–19 份之间)为模板进行 BTV 血清型的 RT-qPCR 检测。对于 BTV 核酸含量较高的“强阳性样本”,BTV 血清型 RT-qPCR 检测的 C_t 值在 27.8–34.1 之间,与 BTV 群特异性 RT-qPCR 获取的 C_t 值范围(27.5–34.0)基本一致;对于 BTV 核酸含量较低的“弱

阳性样本”BTV 血清型 RT-qPCR 检测的 C_t 值在 34.1–37.3 之间,也与 BTV 群特异性 RT-qPCR 获取的 C_t 值范围(34.1–37.0)基本一致(表 6)。

2.7 BTV 血清型 RT-qPCR 的应用

2019 年在云南省师宗县五龙乡采集的库蠓样本提取核酸进行 BTV 血清型 RT-qPCR 检测的结果表明,该地区的库蠓携带 BTV-1 (C_t 值:33.5)、BTV-4 (C_t 值:32.7)、BTV-5 (C_t 值:30.8)、BTV-16 (C_t 值:31.3)和 BTV-24 (C_t 值:34.2)这 5 种血清型 BTV。景洪市采集 40 份牛羊血液样品中的 12 份为 BTV 核酸阳性, C_t 值在 31.4–35.7 之间。将 12 份 BTV 核酸阳性汇集为一份“样品池”,合成 cDNA 进行 12 种 BTV 血清型 qPCR 反应,结果显示 BTV-1、-2 与 -4 型检测结果为阳性(C_t 值分别为 32.6、30.5 与 34.2)。分别对 12 份阳性核酸进行 BTV-1、-2 与 -4 型的 RT-qPCR 检测,结果显示 5 份核酸为 BTV-1 型、3 份核酸为 BTV-2 型、4 份核酸为 BTV-4 型。在 2 份 BTV-1 核酸阳性样品中同时检测到 BTV-4 型核酸,表明 2 头动物同时感染了 BTV-1 与 BTV-4 型。

3 讨论

虽然英国的 Pirbright 研究所报道了 BTV 血清型 RT-qPCR 定型技术,但引物设计所参考的序列主要以欧洲和美洲流行的 BTV 毒株为主^[18]。通过序列比对分析,我们发现欧洲流行大部分血清型 BTV 毒株的 Seg-2 属 Western 地域型,而我国流行的 BTV-1、-2、-3、-4、-9、-12、-15、-16、-21 这 9 种血清型 BTV 毒株的 Seg-2 属 Eastern 型,与同血清型 Western 毒株的 Seg-2 序列差异高达 31.6%^[11–15]。Pirbright 研究所报道的 PCR 扩增引物和探针与我国 BTV 毒株的 Seg-2 序列之间存在 3–6 个碱基差异,因此,本研究根据中国流行 12 种血清型 BTV 的 Seg-2 序列,选定保守区域进行 RT-qPCR 扩增引物与探针的设计,从而建立适合我国流行 BTV 血清型鉴定的 RT-qPCR 检测方法。

同一基因型不同血清型 BTV 的 Seg-2 核酸序列相似度在 70.3%–78.5%之间^[9,26],因此确保 BTV 血

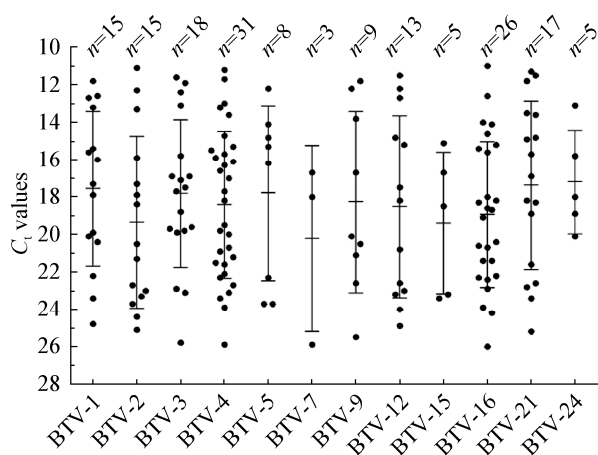


图 2 中国 165 株 BTV 血清型 RT-qPCR 检测结果

Figure 2 Serotyping results of 165 Chinese BTV strains by RT-qPCR

注:图中 Y 轴表示 C_t 值;X 轴表示 BTV 血清型;黑点对应一份核酸样品的 C_t 值;“n”代表每种血清型 BTV 的数量

Note: The Y-axis represents the C_t values and the X-axis represents the BTV serotype. Black dot represents C_t value of each sample; “n” represents the numbers of tested BTV strains for each serotype

表 6 BTV 感染动物血液样品 BTV 群特异性与血清型特异性 RT-qPCR 检测结果
Table 6 BTV group and serotype RT-qPCR detection results of the blood samples collected from animals infected with BTVs

血清型 Serotype	样品类型* Sample type*	样品数 Numbers of samples	BTV 群特异性 RT-qPCR BTV group RT-qPCR		BTV 血清型 RT-qPCR BTV serotype RT-qPCR	
			C _t 值范围 Range of C _t values	C _t 平均值±标准差 Mean of C _t values±standard deviation	C _t 值范围 Range of C _t values	C _t 平均值±标准差 Mean of C _t values±standard deviation
BTV-1	Strong positive	6	29.4–33.1	30.5±2.2	30.6–33.5	31.3±1.6
	Weak positive	11	34.1–37.0	35.9±0.7	34.9–36.4	35.8±0.5
BTV-2	Strong positive	7	29.7–33.4	32.3±1.7	29.1–34.0	31.3±1.9
	Weak positive	9	35.0–36.7	36.3±1.0	34.4–36.8	35.6±0.9
BTV-3	Strong positive	8	29.2–33.8	31.5±2.3	29.7–33.2	30.6±1.7
	Weak positive	11	35.2–36.7	35.9±0.8	35.4–37.0	36.1±0.8
BTV-4	Strong positive	10	29.1–33.7	31.5±1.3	29.7–33.3	31.4±2.3
	Weak positive	7	34.3–36.9	35.6±0.8	34.9–36.8	35.2±1.0
BTV-5	Strong positive	9	29.6–33.8	31.5±1.6	29.1–32.8	30.1±1.7
	Weak positive	7	34.3–36.7	35.6±0.5	34.9–37.2	36.1±1.0
BTV-7	Strong positive	5	29.1–33.3	30.6±2.8	29.4–33.9	31.7±2.5
	Weak positive	8	34.8–36.9	35.6±0.8	34.2–36.5	35.3±0.9
BTV-9	Strong positive	10	29.1–34.0	31.8±2.0	29.3–33.5	31.9±2.4
	Weak positive	7	34.9–36.8	35.5±0.6	34.7–36.9	35.9±0.8
BTV-12	Strong positive	6	29.5–34.0	31.7±0.5	29.2–33.2	32.3±2.1
	Weak positive	8	34.2–37.0	35.5±1.2	34.1–36.4	35.9±0.9
BTV-15	Strong positive	11	27.5–33.7	31.0±2.5	27.8–33.5	31.4±2.1
	Weak positive	6	35.0–36.7	36.0±0.7	34.8–36.4	35.5±0.6
BTV-16	Strong positive	10	29.6–33.9	32.0±1.3	29.3–34.1	31.7±1.8
	Weak positive	7	34.6–36.6	35.5±0.9	34.2–37.1	35.1±0.9
BTV-21	Strong positive	7	28.6–33.8	30.8±1.9	29.5–33.4	30.6±2.1
	Weak positive	8	34.3–36.7	35.6±1.0	34.5–37.3	35.8±0.6
BTV-24	Strong positive	9	29.9–33.8	32.1±2.1	29.1–34.1	31.1±2.0
	Weak positive	7	34.1–36.2	35.4±0.9	35.2–37.2	36.5±1.2

注：*：C_t 值在 29.0–34.0 之间定义为强阳性；C_t 值在 34.0–37.0 之间定义为弱阳性
Note: *: The samples with the C_t values between 29.0 and 34.0 were defined as strongly positive, while C_t values between 34.0 and 37.0 were defined as weakly positive

清型 RT-qPCR 的特异性十分关键。考虑到合成 TaqMan 探针的成本较高，而合成扩增引物的成本却较经济，因此，针对每种血清型 BTV，我们合成 3 对候选 PCR 扩增引物，以 24 种血清型 BTV 的 cDNA 为模板，通过 qPCR (SYBR Green 染料法)对引物的特异性进行筛选。剔除与其他血清型 BTV 核酸之间存在交叉扩增的引物，从而确保引物的特异性。

研究进一步通过 qPCR (SYBR Green 染料法)

分析扩增引物对低拷贝数(10² 拷贝/μL) BTV cDNA 模板的扩增效果，筛选扩增效率最高的引物。通过对比，最终筛选出 12 对 BTV 血清型 RT-qPCR 扩增引物(表 3)。在确认了 PCR 扩增引物对的特异性和灵敏度后，我们合成 TaqMan 探针，进行“引物+探针”特异性与敏感性测试。特异性试验结果显示，设计的 BTV 血清型 RT-qPCR 引物与探针具有良好的特异性，仅与对应血清型 BTV 毒株的核酸模板之间产生扩增曲线；敏感性试验结果显示，产生的

扩增曲线具有良好的线性关系, 相关系数(R^2)值在 0.991–0.999 之间。对不同血清型 BTV 核酸模板的最低检出量在 25–48 拷贝之间(表 5), 表明建立的 BTV 血清型 RT-qPCR 方法具有良好的特异性与灵敏性。

建立的 BTV 血清型 RT-qPCR 方法能否对我国不同时间与不同地域流行 BTV 毒株的血清型进行鉴定, 是衡量方法可靠性的重要指标。我们选择了 1979–2020 年我国云南、广东、广西、江苏等地分离的 12 种 BTV 血清型共计 165 毒株进行血清型的 RT-qPCR 回复验证, 结果显示, RT-qPCR 鉴定的 BTV 血清型结果与通过 Seg-2 测序的鉴定结果一致(表 2、图 2)。表明本研究建立的 BTV 血清型 RT-qPCR 具有良好的覆盖度, 可有效鉴定我国不同时间、不同地域流行 BTV 毒株的血清型。

实验室保存了不同血清型 BTV 感染哨兵动物间隔一周采集的血液样本与 BTV 抗体检测数据。根据 BTV 的感染规律, 我们选择了 BTV 抗体转阳前 1 周(病毒感染早期)、BTV 抗体转阳后 2 周(病毒血症高峰期)以及 BTV 抗体转阳后 3 个月(病毒感染后期)的血液样本进行 BTV 群特异性 RT-qPCR 检测, 将其分为病毒核酸含量较高的强阳性样本(对应病毒血症高峰期)与弱阳性样本(对应病毒感染早期与后期), 用于验证 BTV 血清型 RT-qPCR 鉴定方法的准确性。结果显示, 建立的 BTV 血清型 RT-qPCR 可对不同感染时期动物血液中的病毒进行血清型鉴定, 表明建立的检测方法具有良好的敏感度, 可用于不同感染时期动物血液中 BTV 的血清型鉴定。

我们应用建立的方法对采集的库蠓与牛羊血液样本进行 BTV 血清型的鉴定。对于库蠓样本, 我们关注的是群体携带 BTV 血清型的情况, 因此直接将采集的库蠓合并提取核酸, 进行 12 种血清型的 RT-qPCR 反应, 结果显示, 采集的库蠓携带 5 种血清型 BTV (BTV-1、-4、-5、-16 和-24), 这也与我们前期从该地区哨兵动物上分离的 BTV 毒株的血清型一致。对于采集自景洪地区牛羊的血液样

本, 我们首先进行 BTV 群特性 RT-qPCR, 发现 12 份血液样本为 BTV 核酸阳性, 阳性率为 30% (12/40)。若对 12 份 BTV 阳性核酸逐一进行 12 种 BTV 血清型的检测, 工作量比较大, 因此, 我们将 12 份 BTV 阳性核酸合并为一份样本池, 反转录合成 cDNA, 通过 qPCR 反应首先判断存在哪些血清型 BTV, 从而缩小 BTV 血清型的检测范围, 避免对每份核酸阳性样本进行 12 种 BTV 血清型的逐一检测, 提高了工作效率。

4 结论

本研究建立了针对中国流行 BTV 毒株的 RT-qPCR 血清型鉴定方法, 该方法具有特异性强、灵敏度高和耗时少的优点, 可用于媒介与动物感染 BTV 血清型的快速与准确诊断, 为我国开展 BTV 的病原学诊断与流行病学调查研究提供了强有力的技术保障。

REFERENCES

- [1] Liu SL, Huang GS, Zhao ZL, Hua QY. Animal Vector-Borne Diseases and Inspection and Quarantine Technology[M]. Beijing: Science Press, 2011: 217-225 (in Chinese)
刘胜利, 黄冠胜, 赵增连, 花群义. 动物虫媒病与检验检疫技术[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 217-225
- [2] Maan S, Maan NS, Ross-smith N, Batten CA, Shaw AE, Anthony SJ, Samuel AR, Darpel KE, Veronesi E, Oura CAL, et al. Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains[J]. Virology, 2008, 377(2): 308-318
- [3] Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS. Bluetongue epidemiology in the European Union[J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(4): 539-544
- [4] Bessell PR, Searle KR, Auty HK, Handel IG, Purse BV, De C Bronsvort BM. Assessing the potential for bluetongue virus 8 to spread and vaccination strategies in Scotland[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 38940
- [5] Courtejoie N, Durand B, Bournez L, Gorlier A, Bréard E, Sailleau C, Vitour D, Zientara S, Baurier F, Gourmelen C, et al. Circulation of bluetongue virus 8 in French cattle, before and after the re-emergence in 2015[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(1): 281-284
- [6] Maan S, Maan NS, Nomikou K, Batten C, Antony F, Belaganahalli MN, Samy AM, Reda AA, Al-Rashid SA, El Batel M, et al. Novel bluetongue virus serotype from

- Kuwait[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(5): 886-889
- [7] Zientara S, Sailleau C, Viarouge C, Höper D, Beer M, Jenckel M, Hoffmann B, Romey A, Bakkali-Kassimi L, Fablet A, et al. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(12): 2123-2125
- [8] Hassan SS, Roy P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(12): 9832-9842
- [9] Maan S, Maan NS, Samuel AR, Rao S, Attoui H, Mertens PPC. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88(Pt 2): 621-630
- [10] Attoui H, Maan S, Anthony SJ, Mertens PPC. Bluetongue virus, other orbiviruses and other reoviruses: their relationships and taxonomy[A]//Mellor PS, Baylis M, Mertens PPC. *Bluetongue*[M]. London: Academic Press, 2009: 23-46
- [11] Kirkland PD, Zhang N, Hawkes RA, Li Z, Zhang F, Davis RJ, Sanders DA, Li H, Zhang K, Ben J, et al. Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China[J]. *Epidemiology & Infection*, 2002, 128(2): 257-263
- [12] Li ZH, Wang JP, Yang H, Liao DF, Song JL, Gao L, He YW, Li HC. Isolation of bluetongue virus serotype 9 strain in China for the first time[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(2): 354-363 (in Chinese)
李占鸿, 王金萍, 杨恒, 廖德芳, 宋建领, 高林, 何于雯, 李华春. 蓝舌病病毒血清 9 型毒株在我国的首次分离[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(2): 354-363
- [13] Li ZH, Xiao L, Meng JX, Kou ML, Song JL, Liao DF, Gao L, Yang H, Li HC. Isolation and identification of bluetongue virus serotype 5 strain in China[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(1): 36-43 (in Chinese)
李占鸿, 肖雷, 孟锦昕, 寇美玲, 宋建领, 廖德芳, 高林, 杨恒, 李华春. 中国蓝舌病病毒血清 5 型毒株的分离与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(1): 36-43
- [14] Yang H, Wang JP, Li L, Xiao L, Meng JX, Kou ML, Diao DF, He YW, Gao L, Li ZH, et al. Genetic characteristics of bluetongue virus serotype 24 strains isolated in China[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39(1): 31-37 (in Chinese)
杨恒, 王金萍, 李乐, 肖雷, 孟锦昕, 寇美玲, 廖德芳, 何于雯, 高林, 李占鸿, 等. 我国蓝舌病病毒血清 24 型毒株的分离与遗传特征分析[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(1): 31-37
- [15] Yang H, Lv MN, Sun MF, Lin LQ, Kou ML, Gao L, Liao DF, Xiong HL, He YW, Li HC. Complete genome sequence of the first bluetongue virus serotype 7 isolate from China: evidence for entry of African-lineage strains and reassortment between the introduced and native strains[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(1): 223-227
- [16] OIE Terrestrial Animal Health Code[M]. 13th ed. Paris, France: World Organisation for Animal Health (OIE), 2004
- [17] Maan NS, Maan S, Belaganahalli MN, Ostlund EN, Johnson DJ, Nomikou K, Mertens PPC. Identification and differentiation of the twenty six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32601
- [18] Maan S, Maan NS, Belaganahalli MN, Potgieter AC, Kumar V, Batra K, Wright IM, Kirkland PD, Mertens PPC. Development and evaluation of real time RT-PCR assays for detection and typing of bluetongue virus[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163014
- [19] Li ZH, Song ZA, Yang ZX, Li ZR, Liao DF, Li HC, Yang H. Establishment and application of one-step RT-PCR method to identify the serotype of bluetongue virus epidemic in China[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2020, 50(12): 1486-1493 (in Chinese)
李占鸿, 宋子昂, 杨振兴, 李卓然, 廖德芳, 李华春, 杨恒. 中国流行的十二种血清型蓝舌病病毒一步法 RT-PCR 定型方法的建立与应用[J]. *中国兽医科学*, 2020, 50(12): 1486-1493
- [20] Yang ZX, Li ZH, Wu JM, Wang JP, Xiao L, Kou ML, Zhu JB, Liao DF, Li HC, Yang H. Characterization of strains of epizootic haemorrhagic disease virus serotype 5 isolated in China from 2013 to 2016[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2020, 36(3): 475-483 (in Chinese)
杨振兴, 李占鸿, 吴健敏, 王金萍, 肖雷, 寇美玲, 朱建波, 廖德芳, 李华春, 杨恒. 2013-2016 年中国流行性出血病病毒血清型 5 型的分离与遗传特征分析[J]. *病毒学报*, 2020, 36(3): 475-483
- [21] Yang H, Xiao L, Meng JX, Xiong HL, Gao L, Liao DF, Li HC. Complete genome sequence of a Chuzan virus strain isolated for the first time in mainland China[J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(4): 1073-1077
- [22] Meng JX, Li N, He YW, Kou ML, Wang JL, Ding H, Chuang XH, Li HC. Akabane virus isolated from Yunnan sentinel goat in 2015[J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2020, 34(4): 411-414 (in Chinese)
孟锦昕, 李楠, 何于雯, 寇美玲, 王静林, 丁宏, 创向辉, 李华春. 2015 年从云南哨兵山羊中分离到阿卡斑病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2020, 34(4): 411-414

- [23] Miao HS, Li L, Liao DF, Yang YQ, Li HC. Research on establishment and comparison of bluetongue-virus multi-clone antibody C-ELISA[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2014, 29(1): 58-62 (in Chinese)
苗海生, 李乐, 廖德芳, 杨永钦, 李华春. 蓝舌病多克隆抗体 C-ELISA 检测方法的建立和比较研究[J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(1): 58-62
- [24] Yang ZX, Zhu JB, Li ZH, Li ZR, He YW, Xie JR, Li HC, Liao DF, Yang H. Establishment and application of a duplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of bluetongue virus and epidemic haemorrhagic disease virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(9): 1104-1111 (in Chinese)
杨振兴, 朱建波, 李占鸿, 李卓然, 何于雯, 谢佳芮, 李华春, 廖德芳, 杨恒. 蓝舌病病毒和流行性出血病病毒双重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(9): 1104-1111
- [25] Katoh K, Asimenos G, Toh H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT[A]//Posada D. Bioinformatics for DNA Sequence Analysis[M]. New York: Humana Press, 2009: 39-64
- [26] Maan S, Maan NS, Nomikou K, Veronesi E, Bachanek-Bankowska K, Belaganahalli MN, Attoui H, Mertens PPC. Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26147