



研究报告

## 一株兔出血症病毒 2 型毒株的分离鉴定

涂藤<sup>Δ1</sup> 周明忠<sup>Δ2</sup> 张鹏飞<sup>1</sup> 姜睿姣<sup>1</sup> 曾红梅<sup>1</sup> 陈婉婷<sup>1</sup> 杨泽晓<sup>1,3</sup> 罗燕<sup>1,3</sup>  
姚学萍<sup>1,3</sup> 王印<sup>\*1,3</sup>

1 四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130

2 四川省动物疫病预防控制中心 四川 成都 610041

3 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130

**摘要:**【背景】我国于 2020 年 4 月突发兔出血症病毒 2 型(Rabbit Hemorrhagic Disease Virus 2, RHDV2)疫情,严重威胁兔养殖业和生态平衡,而且目前国内对 RHDV2 的病原学以及遗传特征等基础研究匮乏。【目的】分离鉴定 RHDV2 毒株,对分离株进行全基因测序与遗传进化分析。【方法】对成都某兔场疑似 RHDV2 感染致死的家兔进行病理剖检,通过 RT-qPCR 检测和动物回归试验,分离鉴定得到 RHDV2 毒株,进一步进行全基因测序及遗传进化分析。【结果】病死兔剖检表现为各实质器官出血肿大,以心、肺、肝脏尤为明显,经 RT-qPCR 确诊为 RHDV2,而且不存在其他病原混合感染,试验感染家兔可致相似病变。将分离株命名为 SCCN03,其基因序列全长为 7 464 bp,与参考毒株(GenBank 登录号为 MN901451.1)一致性为 99.21%。对比参考株氨基酸序列,分离株的非结构蛋白和结构蛋白氨基酸序列发生了多处错义突变,其中非结构蛋白 p16 和结构蛋白的几处错义突变可能与毒株变异有关。进化树显示毒株 SCCN03 属于 GI.2 基因型。【结论】分离鉴定出一株 RHDV2 毒株,获得其基因序列,丰富了 RHDV2 的全基因数据资料,为后续 RHDV 毒力相关研究和相关疫苗研发奠定了基础。

**关键词:** 兔出血症病毒 2 型, 分离鉴定, 全基因测序, 遗传进化分析

**Foundation item:** Science and Technology Project of Sichuan Province

<sup>Δ</sup>These authors equally contributed to this work

**\*Corresponding author:** E-mail: yaanwangyin@tom.com

**Received:** 30-07-2020; **Accepted:** 29-09-2020; **Published online:** 11-12-2020

基金项目: 四川省科技计划

<sup>Δ</sup>对本文贡献相同

**\*通信作者:** E-mail: yaanwangyin@tom.com

收稿日期: 2020-07-30; 接受日期: 2020-09-29; 网络首发日期: 2020-12-11

## Isolation and identification of a rabbit hemorrhagic virus type 2 strain

TU Teng<sup>Δ1</sup> ZHOU Mingzhong<sup>Δ2</sup> ZHANG Pengfei<sup>1</sup> JIANG Ruijiao<sup>1</sup>  
ZENG Hongmei<sup>1</sup> CHEN Wanting<sup>1</sup> YANG Zexiao<sup>1,3</sup> LUO Yan<sup>1,3</sup>  
YAO Xueping<sup>1,3</sup> WANG Yin<sup>\*1,3</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

2 Center for Disease Control and Prevention of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610041, China

3 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 611130, China

**Abstract: [Background]** Rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2) was found in April 2020 in China, which seriously threatened the rabbit breeding industry and ecological balance. Besides, basic researches on the etiology and genetic characteristics of RHDV2 are still lacking in China. **[Objective]** To isolate and identify RHDV2 strain, and to conduct whole gene sequencing and genetic evolution analysis of the isolated strain. **[Methods]** We planned to conduct pathological dissection, RT-qPCR detection, and animal regression test to isolate and identify the RHDV2 strain in a rabbit farm suspected to have died from RHDV2 infection. **[Results]** Further whole gene sequencing and genetic evolution analysis were performed. The necropsies of dead rabbits showed hemorrhage and enlargement of all parenchymal organs, especially the heart, lung and liver. RHDV2 was confirmed by RT-qPCR, and there was no mixed infection with other pathogens. We found the infected rabbits could cause similar lesions. The isolates were named SCCN03, and the gene sequences is 7 464 bp in length, which was about 99.21% consistent with the reference strain (GenBank accession number: MN901451.1). By comparing the amino acid sequence of the reference strain, many missense mutations occurred in the amino acid sequence of the non-structural proteins and structural proteins in the isolated strain, among which several missense mutations of the non-structural proteins P16 and structural proteins may be related to the variation of the virus strain. The evolutionary tree showed that SCCN03 belonged to GI.2 genotype. **[Conclusion]** One strain of RHDV2 was isolated and identified, and its gene sequence was obtained, which enriched the whole genetic data of RHDV2 and laid a foundation for subsequent studies on virulence of RHDV and related vaccine development.

**Keywords:** rabbit hemorrhagic disease virus 2, isolation and identification, whole gene sequencing, genetic evolution analysis

兔出血症(Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD) 又称兔瘟、兔出血性肺炎, 是由嵌杯病毒科(Caliciviridae)兔病毒属(Lagovirus)兔出血症病毒(Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, RHDV)引起兔的一种急性、败血性、高度致死性传染病, 该病毒于 1984 年首次在我国江苏无锡等地暴发<sup>[1-3]</sup>。3 月龄以上的亚成年兔或成年兔对经典 RHDV 易感, 发病率达 100%, 病死率达 90%, 病死兔以肝、脾、肾等器官出血、肿大, 鼻腔、气管淤血等为特征; 但 2 月龄以下的吮乳兔或幼兔对经典 RHDV 有较强的抵抗力, 发病率较低或不发病<sup>[4]</sup>。

兔出血症病毒 2 型(RHDV2)是经典 RHDV 的变异株, Dalton 等的分子流行病学研究表明, RHDV2 已取代经典 RHDV 成为法国、西班牙和葡萄牙目前的流行毒株<sup>[5]</sup>。与经典 RHDV 不同, 在自然条件下, RHDV2 既能感染野兔, 也可感染家兔, 而且家兔更为易感, 尤其是幼兔与亚成年兔; RHDV2 可通过受污染的水和食物经呼吸道和消化道结合上皮细胞 HBGA 受体进入宿主体内, 引起肝坏死以及弥散性血管内凝血导致实质性器官出血<sup>[6]</sup>。鉴于幼兔、亚成年兔对 RHDV2 的高度易感性以及他国 RHDV2 的暴发流行, 我国应采取

相应的防治措施控制其蔓延。目前可通过发病兔群日龄、病死率与临床表现做出初步判断,经实验室检测确诊后应立即处理发病兔群,阻止感染面积的扩大<sup>[7]</sup>。

RHDV2 无囊膜结构,病毒结构呈球形,病毒颗粒直径为 32–44 nm,呈正二十面体对称结构。该病毒是单股正链 RNA 病毒,其基因组全长为 7 442 bp,与经典 RHDV 和 RHDVa 基因序列差异明显<sup>[8–10]</sup>。RHDV2 与 RHDV 基因组结构完全相同,核苷酸一致性达 82.4%<sup>[11]</sup>,RHDV2 基因组有 2 个开放阅读框 ORF1 和 ORF2,其中 ORF1 编码一个多聚蛋白,该多聚蛋白由病毒编码的蛋白酶酶解成多个非结构蛋白 p16、p23、p29、2C 样蛋白、3C 样蛋白、VPg、RNA 依赖 RNA 聚合酶(RdRp)和结构蛋白 VP60<sup>[12]</sup>,ORF2 编码衣壳蛋白 VP10。2020 年 4 月突发的 RHDV2 疫情是其第一次在我国暴发,解析我国 RHDV2 毒株全基因序列对明确其进化地位、变异特征、优化检测方法等具有重要意义。

本研究从四川省暴发兔出血症的某规模化兔场获得分离株并命名为 SCCN03,设计引物扩增分离株全基因序列,与已登录的经典 RHDV、RHDV2、ESBHV 等序列进行比对分析,明确分离株的进化地位,丰富 RHDV2 基因序列材料,以期 RHDV2 诊断、RHDV2 疫苗研发和治病机理研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料及试验动物

成都某规模化兔场送检疑似感染 RHDV2 病兔,所有病料均由四川农业大学动物医学院动物检疫实验室保存。

动物:健康未免疫家兔 8 只(幼兔和成年兔各 4 只),购自成都达硕实验动物有限公司。

### 1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒、病毒 RNA 提取相关试剂盒、反转录试剂盒、2×*Taq* PCR Master Mix、DNA 分子

量标准、pMD19-T 载体、2×SYBR Green *Pro Taq* HS Premix 等,宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;其他国产分析纯试剂,万科化学试剂公司。

荧光定量 PCR 仪、PCR 仪、核酸电泳仪(NanoDrop ND-2000)和 Quantity One 凝胶成像仪,Bio-Rad 公司。

### 1.3 引物设计及合成

RT-qPCR 引物参考本实验室已建立的 RHDV2 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法<sup>[13]</sup>。根据 RHDV2-Bremerhaven-17 毒株(GenBank 登录号为 MN901451.1)的基因编码序列,设计 11 对引物,引物信息如表 1 所示,送至杭州有康生物科技有限公司合成并测序。

### 1.4 病理解剖及病变观察

在严格生物安全条件下,对兔场送来的病死兔进行解剖,观察并记录病变。

### 1.5 DNA/RNA 提取及反转录

按照 DNA/RNA 提取试剂盒提取 DNA/RNA,并将 RNA 反转录成 cDNA,–80 °C 保存备用。

### 1.6 RT-qPCR 检测

以提取的病死兔组织的 DNA、cDNA 为模板,使用本实验室建立的 RHDV2-RT-qPCR 方法<sup>[13]</sup>进行检测,同时对其他兔源病毒和细菌(经典 RHDV、兔巴氏杆菌、兔出血症病毒、欧洲野兔综合征病毒热 EBHSV)进行检测。

### 1.7 RHDV2 全基因片段扩增

以病死兔肝脏组织 cDNA 为模板,以表 1 中的引物 A–K 进行分段扩增。PCR 反应体系(20 μL):cDNA 模板 2 μL,2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL,ddH<sub>2</sub>O 6 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL。PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2 min,34 个循环;72 °C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,用胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物。

表 1 用于 RT-qPCR/RT-PCR 的引物信息

Table 1 Primers for RT-qPCR/RT-PCR

引物名称 Primers name	基因片段 Gene segment	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物长度 The length of the product (bp)
VP60 F/R	VP60	GGGTGTCATATCCACCCCAA CCCAGTTGAACACGAG	101
A-F/R	1-750	ATGGCGGCTATGTCGCG TGTGATGTTGCCGAGCTTAGTGT	750
B-F/R	650-1 450	CAGCACGGGACAGGAAGGAC GGTTGTATGATGGCAGGGTGC	800
C-F/R	1 350-2 150	ATGAGGCAGCAACGTTGGAC GAGGCCACATCGGGGTG	800
D-F/R	2 050-2 850	CGTTGGGGAGAACTGGTGAAG TTGGGGTCAGTGAACACGTCAACA	800
E-F/R	2 750-3 550	TGCGGTGGGTGCTTGTG TGTGATGGGTGACTTTTTCCAGTCAC	800
F-F/R	3 450-4 250	CACCACTGACCTGTGTCTTGT GAGGGCCTTGCCTGAGTTG	800
G-F/R	4 150-4 950	GGGGAAGAAGATTGACCACGTGAAA TGCTGAGCGGGCAAACATCTA	800
H-F/R	4 850-5 650	GTGAGCCTCCTGCCTGCC CATGCCACCGGCCAG	800
I-F/R	5 550-6 350	ACGCCCCGGGCAAC TAGGGATGGTGGTACCGCTGAAG	800
J-F/R	6 250-7 050	GCTAGTGCCGGGTCTGC GTCCAACAAATTCAGACATAAGAAAAACCATTGG	800
K-F/R	6 950-7 442	GTTGACATCCGCCCTGTGG ATAGCTTACTCTAAACTATAAAGCC	492

1.8 PCR 回收产物克隆及测序

将 PCR 纯化产物与 pMD19-T 载体连接，转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，均匀涂布于含氨苄青霉素(100 μg/mL)的 LB 平板上，在 37 °C 恒温培养箱中培养 10-16 h，挑阳性克隆子送擎科梓熙生物科技有限公司进行测序。

1.9 全基因序列同源性分析

使用 DNASTar 中的 MegAlign 软件对测序结果进行拼接，将拼接所得毒株命名为 SCCN03，并登录 GenBank 下载 RHDV 经典毒株、RHDV2 毒株和欧洲野兔热毒株共 22 株，使用 MegAlign 软件对包括本研究分离株 SCCN03 在内的 23 株兔属病毒株的全基因序列进行同源性分析并构建进化树。

1.10 动物回归试验

1.10.1 RHDV2 感染家兔

取-70 °C 保存的肝脏组织，反复冻融研磨 3 次，加入生理盐水制备成匀浆液，4 000 r/min 离心 10 min，把 6 只家兔分为 2 个试验组(幼兔组和成年兔组)，

分别取上清液对 2 组家兔进行腹腔注射，另外 2 只不做任何处理即为对照组。

1.10.2 试验兔解剖观察

若试验兔注射研磨液后病死，对照组正常，立刻解剖观察组织病变，并与兔场送检的病死兔进行病理特征对比。

1.10.3 RT-qPCR

参照 1.5、1.6 方法，分别提取试验兔病变组织 RNA，并反转录为 cDNA，使用本实验室建立的 RT-qPCR 方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 病理解剖及病变观察

成都某兔场送来的病死兔(图 1A、1B)，其肺脏可见出血点或出血斑(图 1C)，心外膜出血(图 1D)，肝脏肿大出血、质脆(图 1E)，胆囊肿大(图 1F)，肾肿大、出血(图 1G)，脾肿大(图 1H)，个别兔口鼻出血(图 1I)。根据流行病学调查兔场发病死亡的兔大多数都是 20 日龄以下的幼兔，病死率接近 80%。

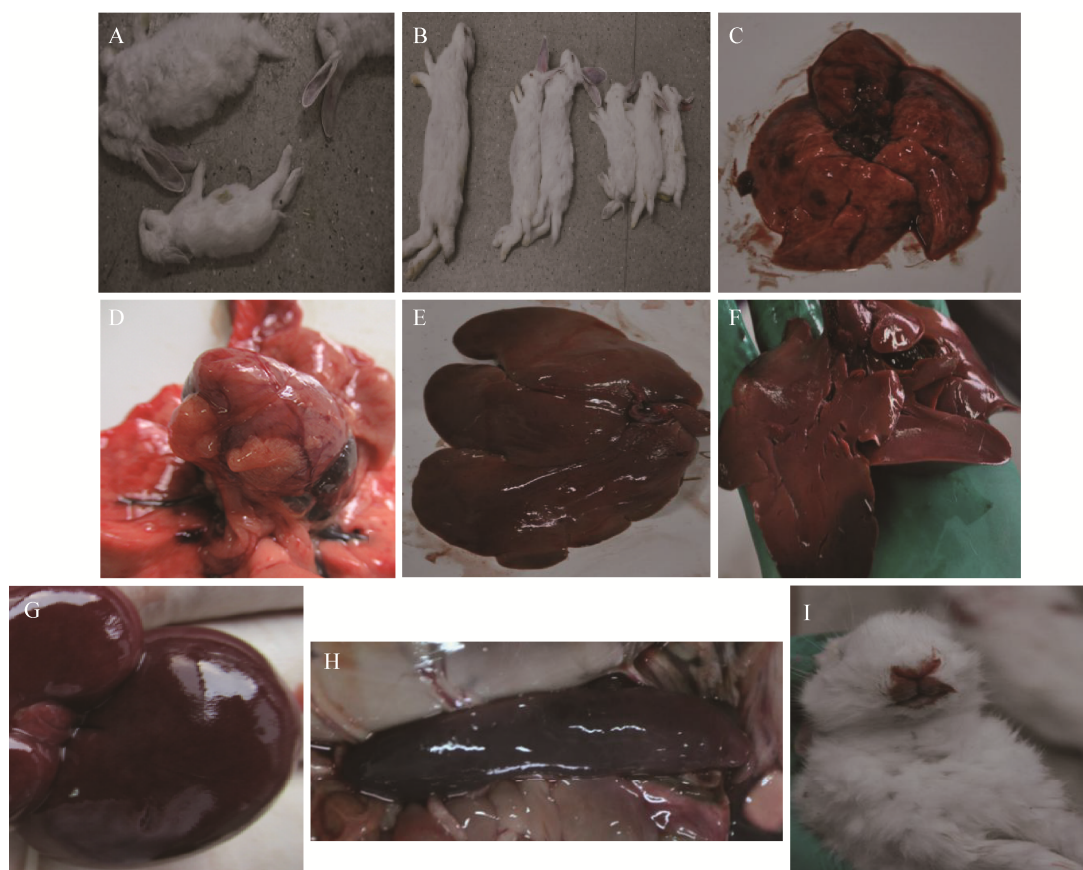


图 1 病死兔剖检病变图和临床症状图

Figure 1 Pathologic pictures and clinical symptom pictures of dead rabbit necropsy

注: A、B: 成都某兔场送来的病死兔; C: 肺脏有出血点和出血斑; D: 心外膜出血; E: 肝脏肿大出血; F: 胆囊肿大; G: 肾肿大出血; H: 脾肿大; I: 兔口鼻出血

Notes: A and B: The dead rabbits sent from a rabbit farm in Chengdu; C: The lungs had bleeding spots and blood spots; D: Epicardial hemorrhage; E: The liver was enlarged and bleeding; F: Gallbladder enlargement; G: The kidney was enlarged and bleeding; H: Enlarged spleen; I: Bleeding from the mouth and nose

## 2.2 RT-qPCR 检测

组织病料提取 RNA 进行 RT-qPCR 检测, 结果表明 RHDV2 为阳性(图 2), 兔巴氏杆菌、兔出血症病毒、欧洲野兔综合征病毒 EBHSV 均为核酸阴性<sup>[14]</sup>。

## 2.3 全基因片段扩增

按照 1.7 的操作步骤进行 RT-PCR 后, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果 SCCN03 毒株扩增出的分段基因片段与各基因预期片段大小一致, 见图 3。将 SCCN03 株各基因扩增片段分别克隆到 pMD19-T 载体中进行测序, 采用 DNASTar 的 MegAlign 程序对基因组分段测序结果进行分别拼接, 得到基因组全长 7 464 bp 序列, 将基因

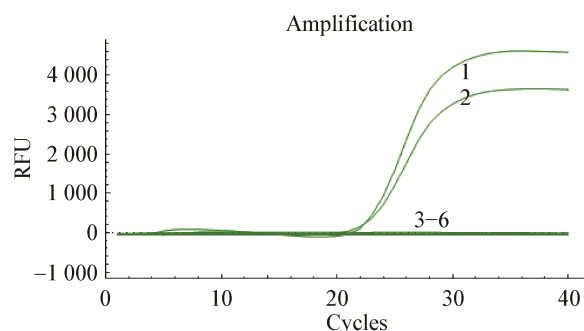


图 2 RHDV2 扩增曲线

Figure 2 RHDV2 amplification curve

注: 1: pMD19T-RHDV2-VP60; 2: 送检组织; 3-6: 分别为阴性对照、经典 RHDV(RHDV-Sch01)、pGM-T-EBHSV、兔巴氏杆菌

Note: 1: pMD19T-RHDV2-VP60; 2: Diseased tissue material; 3-6: Negative control, RHDV-Sch01, pGM-T-EBHSV, *Pasteurella multocida*

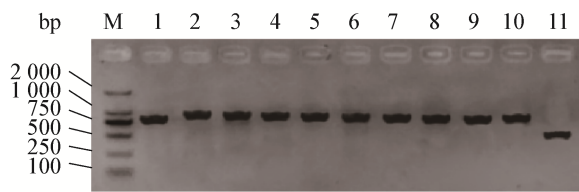


图 3 毒株 SCCN03 全基因 PCR 扩增结果  
Figure 3 PCR amplification results of whole gene of strain SCCN03

注: M: DL2000 DNA Marker; 1-11: SCCN03 A-K 基因片段扩增目的条带  
Note: M: DL2000 DNA Marker; 1-11: SCCN03 A-K gene fragment amplification target band

组注释序列, 提交 NCBI, 获取 GenBank 登录号为 MW178245。

2.4 全基因序列对比分析

使用 MegAlign 软件进行了 23 株 RHDV 毒株的序列分析, 结果显示分离株 SCCN03 与兔属病毒不同基因型的 22 株参考毒株(参考毒株信息见表 2)

表 2 参考毒株信息

Table 2 Reference strains

毒株 Strains	登录号 Accession No.	国家 Country	基因型 Genotype	年份 Year
RHDV2-NL2016	MN061492.1	荷兰 Netherlands	GI.2	2016
RHDV2-Bremerhaven-17	MN901451.1	德国 Germany	GI.2	2017
RHDV-N11	KM878681.1	西班牙 Spain	GI.2	2011
CBVal16	KM979445.1	葡萄牙 Portugal	GI.2	2012
16PLM1	MF407653.1	西班牙 Spain	GI.1	2016
QC/Canada/WIN-AH-2016-OTH-0018	KY235675.1	加拿大 Canada	GI.2	2016
RED2016	MG602006.1	波兰 Poland	GI.2	2016
AUS/VIC/HAM-2/2016	MF421623.1	澳大利亚 Australia	GI.2	2016
AUS/SA/ONK-1/2016	MF421664.1	澳大利亚 Australia	GI.2	2016
AUS/VIC/HAM-1/2016	MF421622.1	澳大利亚 Australia	GI.2	2016
AUS/VIC/HAM-4/2016	MF421578.1	澳大利亚 Australia	GI.2	2016
CBAIgarve14-4	KM115716.2	葡萄牙 Portugal	GI.2	2014
AUS/NSW/FC-1/2015	MF421651.1	澳大利亚 Australia	GI.2	2015
AUS/NSW/BEGA-1/2015	MF421649.1	澳大利亚 Australia	GI.2	2015
O4021-9_1982	KC832839.1	瑞典 Sweden	GII.2	1982
O4022-10_1982	KC832838.1	瑞典 Sweden	GII.2	1982
Bs12_1	KR230102.2	意大利 Italy	GII.2	2012
NZ/Southland/Gore-425B/2013	KY426993.1	新西兰 New Zealand	GI.4	2013
NZ/Southland/Gore-425A/2013	KX357707.1	新西兰 New Zealand	GI.4	2013
AUS/SA/GLE-1/2016	MF421672.1	澳大利亚 Australia	GI.2	2016
Zar11-11	KP129398.1	葡萄牙 Portugal	GI.2	2014
VMS	MG602007.1	波兰 Poland	GI.2	2017

的核酸一致性在 87.91%–99.21%。SCCN03 与参考毒株 RHDV2-Bremerhaven-17 的一致性为 99.21%。

SCCN03 与参考毒株 RHDV2-Bremerhaven-17 的核苷酸序列相比, SCCN03 核苷酸序列发生了多处碱基变化, 结合氨基酸密码子对照表, 其中有多处突变属于错义突变: 编码 p16 蛋白的区域(1–143 位氨基酸残基之间)有 2 处突变, 即 Arg<sup>136</sup>→Ser<sup>136</sup> 和 Pro<sup>140</sup>→Ser<sup>140</sup>; 编码 p23 蛋白的区域(144–367 位氨基酸残基之间)有 1 处突变, 即 Thr<sup>241</sup>→Ala<sup>241</sup>; 编码 2C 样蛋白的区域(368–718 位氨基酸残基之间)有 1 处突变, 即 His<sup>666</sup>→Ser<sup>666</sup>; 编码 VPg 蛋白的区域(995–1 108 位氨基酸残基之间)也有 1 处突变, 即 Asn<sup>1105</sup>→Lys<sup>1105</sup>; 编码 3C 样蛋白的区域(1 109–1 251 位氨基酸残基之间)有 1 处突变, 即 Pro<sup>1215</sup>→Ser<sup>1215</sup>; 编码 RNA 依赖 RNA 聚合酶(RdRp)的区域(1 279–1 750 位氨基酸残基之间)有 2 处突变, 即

Ser<sup>1617</sup>→Arg<sup>1617</sup> 和 Ala<sup>1731</sup>→Glu<sup>1731</sup>; 在编码结构蛋白 VP60 的区域有 1 处突变, 即 Gly<sup>2124</sup>→Ala<sup>2124</sup>; 在编码结构蛋白 VP10 的区域有 2 处突变, 即 Glu<sup>2397</sup>→Lys<sup>2397</sup> 和 Lys<sup>2433</sup>→His<sup>2433</sup>。同时毒株 SCCN03 基因序列末端非编码区(7 370–7 464 nt) 出现 1 处碱基突变的现象, 推断该突变可能和该非编码区处于病毒基因组的末端, 因此与碱基之间的稳定性较差有关。

全基因组进化树分析结果如图 4 所示, 结合表 2 信息, 全基因组序列构建的进化树有 2 个大分支。一个分支由 1982 年在瑞典分离的 O4021-9\_1982、O4022-10\_1982 毒株和 2012 年在意大利分离的 BS12\_1 毒株组成, 它们都属于 GII.2 型兔属病毒。另一个大分支包括 2 个分支, 其中一个分支包括了 2013 年在新西兰分离的兔杯状病毒毒株 NZ/Southland/Gore-425B/2013 和 NZ/Southland/Gore-425A/2013, 它们

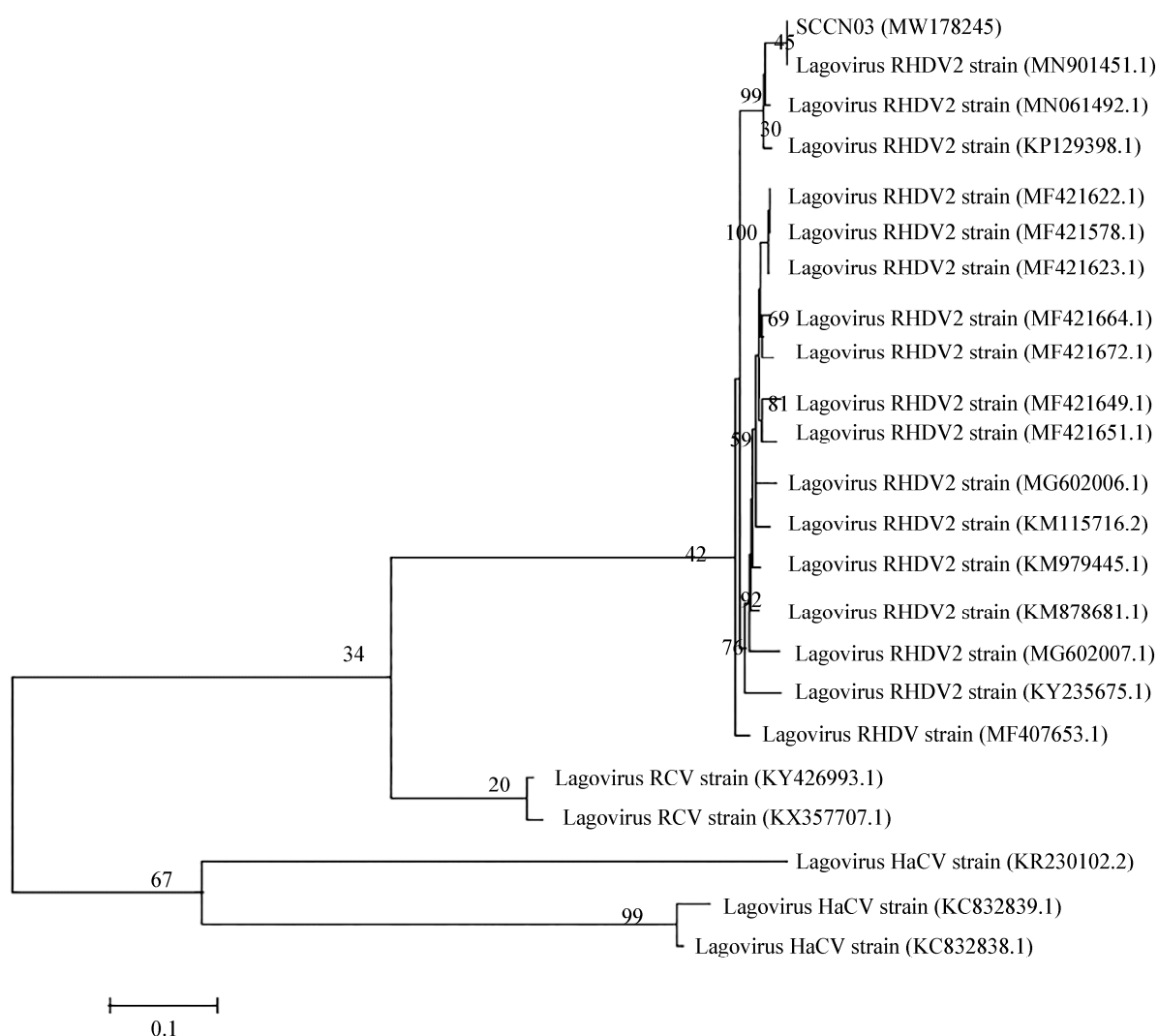


图 4 RHDV2 全基因组分子进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of all full-sequenced RHDV2 strains

注: 分支点上的数字代表可信度; 标尺: 遗传距离

Note: The number on the branch point represents the credibility; Scale: The genetic distance



属于 GI.4 型兔瘟病毒;另一分支包括 3 个小的分支,分别为本研究的毒株及 2016–2017 年分离到的 GI.2 型毒株、2011–2016 年发现的 GI.2 型兔瘟病毒、2016 年在西班牙分离到的 GI.1 型兔瘟毒株 16PLM1。2011–2016 年发现的 GI.2 型兔瘟病毒包括 2011 年在西班牙分离的毒株 RHDV-N11 在内的 13 株毒株。本研究分离到的 SCCN03 与毒株 RHDV2-Bremerhaven-17 (2017 年,德国)在同一个分支且一致性最高,为 99.21%。

## 2.5 感染家兔试验

### 2.5.1 病理解剖及病变观察

试验组在注射病毒液后,家兔出现采食量下降、精神萎靡、体温明显升高、不愿活动等症状,试验组家兔均在 48 h 内死亡,对照组未出现异常情况。死亡家兔口出血,鼻腔周围有血状泡沫,病理变化与兔场送检病兔解剖基本一致。

### 2.5.2 RT-qPCR

提取 6 只试验兔病变组织 RNA 并反转录为 cDNA,以动检实验室保存的 pMD19T-RHDV2-VP60 作为阳性对照,使用本实验室建立的 RT-qPCR 方法进行检测,结果见图 5,表明 RHDV2 核酸阳性。

## 3 讨论与结论

RHDV2 早期分离株致病力弱于经典 RHDV<sup>[15]</sup>,临床主要表现为亚急性和慢性感染。但近期研究<sup>[16]</sup>发现,RHDV2 感染多表现为急性致死,

而且感染的多是幼兔和亚成年兔。经典 RHDV 易感染 3 个月以上的成年兔,RHDV2 与经典 RHDV 在宿主选择上有很大差异。本研究观察到家兔感染 RHDV2 的病理变化有肺脏可见出血点或出血斑、心外膜出血、肝脏肿大出血且质脆,这一结果与国外研究发现感染 RHDV2 的病兔病变集中在肝脏有所不同<sup>[17-18]</sup>,推测可能与毒株毒力不同有关。

本研究检测 RHDV2 病原所用的 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法是本实验室建立的快速高效的检测方法。该检测方法与常规兔瘟检测方法血凝(Hemagglutination, HA)和血凝抑制(Hemagglutination Inhibition, HI)试验、琼脂扩散试验(Agar Gel Precipitation, AGP)、酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)、RT-PCR 方法等相比不仅能定量检测,而且更简便、快捷、准确。

本研究采取不同分段扩增测序方法进行 RHDV2 基因组扩增,与常规测得全基因序列的方法<sup>[19]</sup>进行了比较,发现本试验的方法可以更加方便地获取 RHDV2 的全基因,测序的片段小,使获得测序的结果更加方便快捷,可以达到 RHDV 全基因序列测定目的。本研究通过对四川省成都市疑似暴发 RHDV2 兔场送来的病死兔进行剖检病变观察,初步诊断符合 RHDV2 临床病理变化,经 RT-qPCR 检测诊断为 RHDV2 阳性。通过使用 RHDV2 阳性病料感染试验用家兔,从家兔体内分离到一株 RHDV2 毒株 SCCN03,对其全基因序列进行分段扩增并测序,经拼接成功获得一段全基因长度为 7 464 bp 的序列,通过同源比对和进化树分析,由 RHDV2 全基因进化树可以看出,时间和地理位置都对 RHDV 的变异有影响,但时间对 RHDV 的变异影响程度显著高于地理区域的影响。

本试验研究的分离株 SCCN03 相比于参考株,全基因序列一共发生了 60 处碱基突变,其中有 11 处突变属于错义突变,发生于编码蛋白 p16、p23、2C 样、3C 样、VPg、RdRp 的区域以及编码结构蛋

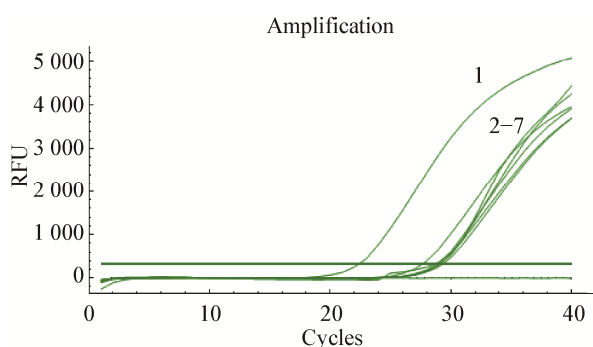


图 5 家兔 RHDV2 扩增曲线

Figure 5 RHDV2 amplification curve of test rabbit

注: 1: pMD19T-RHDV2-VP60; 2–7: 试验兔病变组织

Note: 1: pMD19T-RHDV2-VP60; 2–7: Tissue of test rabbits



白 VP60 和 VP10 的区域。与参考毒株相比,在非结构蛋白中, p16 氨基酸发生的错义突变最多,尽管 p16 的作用尚不清楚,但国外已有研究提出该蛋白质突变与毒力之间的联系<sup>[20]</sup>。在结构蛋白中, VP10 氨基酸发生的错义突变多于 VP60,可能与 VP60 基因核苷酸序列是保守的基因片段有关, VP10 是由 ORF2 中 3'末端的 gRNA 和 sgRNA 编码的次要结构蛋白,有研究指出 VP10 可以增加病毒复制水平并促进细胞凋亡<sup>[21]</sup>。此外,还有研究证实了 VP10 有下调 VP60 表达的能力<sup>[22]</sup>。总之,结果表明 VP10 发生的突变可能会影响宿主细胞的病毒复制和病毒体释放,同时 SCCN03 毒株中各个蛋白氨基酸发生的突变可能与毒株的毒力变异有关。本试验研究不仅丰富了 RHDV2 的分子流行病学数据资料,而且为后续 RHDV2 毒力、疫苗以及致病机理研究奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, Qian NH, Xu WY, Du NX. A new viral disease of rabbit: viral hemorrhage in rabbit[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 1984, 16(6): 253-255 (in Chinese)  
刘胜江, 薛华平, 浦伯清, 钱年华, 徐为燕, 杜念兴. 兔的一种新病毒病: 兔病毒性出血症[J]. *畜牧与兽医*, 1984, 16(6): 253-255
- [2] Du NX, Xu WY, Liu SJ, Xu FN, Yu YR, Li RJ. Studies on rabbit haemorrhagic disease[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1991, 24(1): 1-10,97 (in Chinese)  
杜念兴, 徐为燕, 刘胜江, 徐福南, 虞蕴如, 李汝俭. 兔出血症研究[J]. *中国农业科学*, 1991, 24(1): 1-10,97
- [3] Abrantes J, Van Der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review[J]. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 12
- [4] McIntosh MT, Behan SC, Mohamed FM, Lu ZQ, Moran KE, Burrage TG, Neilan JG, Ward GB, Botti G, Capucci L, et al. A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas[J]. *Virology Journal*, 2007, 4: 96
- [5] Dalton KP, Nicieza I, Abrantes J, Esteves PJ, Parra F. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 169(1/2): 67-73
- [6] Duarte MD, Carvalho CL, Barros SC, Henriques AM, Ramos F, Fagulha T, Luis T, Duarte EL, Fevereiro M. 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
- [7] Tan YG, Zhu J, Guo HM, Wu QM, Chen ZY, Li CF, Liu GQ. Prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibodies of VP60 protein from new rabbit hemorrhagic disease virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2016, 46(3): 332-337 (in Chinese)  
谭永贵, 朱杰, 郭慧敏, 吴巧梅, 陈宗艳, 李传峰, 刘光清. 新型兔出血症病毒(RHDV2)VP60 蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(3): 332-337
- [8] Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease virus: molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome[J]. *Virology*, 1991, 184(2): 664-676
- [9] Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits[J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(8): 4013-4015
- [10] Lopes AM, Dalton KP, Magalhães MJ, Parra F, Esteves PJ, Holmes EC, Abrantes J. Full genomic analysis of new variant rabbit hemorrhagic disease virus revealed multiple recombination events[J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(6): 1309-1319
- [11] Zhao XL. Primary study on the RT-PCR detection methods of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and rabbit hemorrhagic disease virus type2 (RHDV2)[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese)  
赵希仑. 兔出血症病毒(RHDV)与兔出血症病毒 2 型(RHDV2)的 RT-PCR 检测方法研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2016
- [12] Tan YG, Zhu J, Guo HM, Meng CC, Li CF, Chen ZY, Liu GQ. Research progress of novel rabbit hemorrhagic virus (RHDV2)[A]//The 16th Symposium of animal infectious diseases branch of Chinese animal husbandry and Veterinary Association. Proceedings of the 16th Symposium of animal infectious diseases branch of Chinese animal husbandry and Veterinary Association[C]. Jinan: Animal Infectious Diseases Branch of Chinese animal husbandry and Veterinary Association, Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, PLA, 2015 (in Chinese)  
谭永贵, 朱杰, 郭慧敏, 孟春春, 李传峰, 陈宗艳, 刘光清. 新型兔出血症病毒(RHDV2)研究进展[A]//中国畜牧兽医学动物传染病学分会第十六次学术研讨会. 中国畜牧兽医学动物传染病学分会第十六次学术研讨会论文集[C]. 济南: 中国畜牧兽医学, 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 2015
- [13] Wang B. Preliminary research on the detection of RHDV

- and RHDV2 by SYBR Green I real-time fluorescence quantitative RT-PCR method[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 王波. 用 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 RHDV、RHDV2 的初步研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2016
- [14] Yang ZX, Zhao XL, Li Y, Yao XP, Wang Y, Liu YD, Meng ZQ, Geng Y, Bai Y. Development of a complex RT-PCR for the detection and differentiation of rabbit hemorrhagic disease virus and rabbit hemorrhagic disease virus 2[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(6): 710-716 (in Chinese)
- 杨泽晓, 赵希仑, 李岩, 姚学萍, 王印, 刘亚东, 蒙正群, 耿毅, 白瑜. 兔出血症病毒与兔出血症病毒 2 型复合 RT-PCR 检测方法的初步研究[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(6): 710-716
- [15] Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Marchandeau S, Bertagnoli S, Zwingelstein F, Cavadini P, Martinelli N, Lombardi G, Guérin JL, Lemaitre E, et al. Emergence of a new *Lagovirus* related to Rabbit Haemorrhagic Disease Virus[J]. Veterinary Research, 2013, 44(1): 81
- [16] Capucci L, Cavadini P, Schiavitto M, Lombardi G, Lavazza A. Increased pathogenicity in rabbit haemorrhagic disease virus type 2 (RHDV2)[J]. The Veterinary Record, 2017, 180(17): 426
- [17] Westcott DG, Frossard JP, Everest D, Dastjerdi A, Duff JP, Steinbach F, Choudhury B. Incursion of RHDV2-like variant in great Britain[J]. The Veterinary Record, 2014, 174(13): 333
- [18] Hall RN, Peacock DE, Kovaliski J, Mahar JE, Mourant R, Piper M, Strive T. Detection of RHDV2 in European brown hares (*Lepus europaeus*) in Australia[J]. The Veterinary Record, 2017, 180(5): 121
- [19] Li JW, Wang HN, Tian L, Huang Y, Zhang XL. Isolation, identification and genome sequenceing of a Rabbit hemorrhagic disease virus strain WHNRH[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 720-725 (in Chinese)
- 李建文, 王红宁, 田浪, 黄勇, 张夏兰. 兔出血症病毒 (RHDV) WHNRH 株的分离鉴定及基因组全序列的测定与分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 720-725
- [20] Silvério D, Lopes AM, Melo-Ferreira J, Magalhães MJ, Monterroso P, Serronha A, Maio E, Alves PC, Esteves PJ, Abrantes J. Insights into the evolution of the new variant rabbit haemorrhagic disease virus (GI.2) and the identification of novel recombinant strains[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(4): 983-992
- [21] Liu GQ, Ni Z, Yun T, Yu B, Chen L, Zhao W, Hua JG, Chen JP. A DNA-launched reverse genetics system for rabbit hemorrhagic disease virus reveals that the VP<sub>2</sub> protein is not essential for virus infectivity[J]. Journal of General Virology, 2008, 89(12): 3080-3085
- [22] Chen L, Liu GQ, Ni Z, Yu B, Yun T, Song Y, Hua JG, Li SM, Chen JP. Minor structural protein VP2 in rabbit hemorrhagic disease virus downregulates the expression of the viral capsid protein VP60[J]. Journal of General Virology, 2009, 90(12): 2952-2955