

李占鸿, 杨振兴, 林栩慧, 等. 云南和广东省流行性出血病病毒血清 6 型毒株 (EHDV-6) 的分离与遗传特性 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(4): 8-15.
LI Zhanhong, YANG Zhenxing, LIN Xuhui, et al. Isolation and genetic characteristics of epidemic hemorrhagic disease virus serotype 6 (EHDV-6) strains from Yunnan and Guangdong Provinces[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(4): 8-15.

云南和广东省流行性出血病病毒血清 6 型毒株 (EHDV-6) 的分离与遗传特性

李占鸿^{1†}, 杨振兴^{1†}, 林栩慧², 吕敏娜², 肖 雷¹, 寇美玲¹,
廖德芳¹, 朱建波¹, 杨 恒¹, 李华春¹

(1 云南省畜牧兽医科学院/云南热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224;
2 广东省农业科学院 动物卫生研究所/广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】分离流行于我国南方地区的流行性出血病病毒血清 6 型毒株 (EHDV-6), 掌握分离毒株的遗传特征。【方法】对设立于我国云南和广东省的哨兵动物定期采血, 进行 EHDV 感染情况监测与病毒分离培养。通过血清中和试验确定分离 EHDV 的血清型, 采用一步法 RT-PCR 对分离的 EHDV-6 毒株基因节段 2、3、6 (Seg-2、-3、-6) 进行扩增与序列分析。【结果】2012—2016 年, 从云南省和广东省的哨兵动物中分离出 25 株 EHDV 毒株, 其中, 11 株为 EHDV-6 型。中国 EHDV-6 型毒株的 Seg-2、-3 与 -6 均属 Eastern 型, 核酸序列相似性分别为 99.1%、98.9% 和 98.8%, 在系统发生树上分别聚为 1 个独立的支系。在日本引起疫病暴发的 EHDV-6 型毒株与中国 EHDV-6 型毒株具有最近的亲缘关系。日本 EHDV-6 型毒株在系统发生树上处于中国支系内部, Seg-2、Seg-3 与中国毒株的核酸序列相似性分别为 98.5% 和 93.9%。【结论】云南和广东省流行的 EHDV-6 型毒株核酸与氨基酸序列高度相似; 日本和中国的 EHDV-6 型毒株具有最近的亲缘关系, 提示中日之间可能存在 EHDV 的流动。研究结果为进一步开展我国 EHDV-6 型毒株流行病学分析、致病性、病原学诊断与疫苗制备等研究提供了基础。

关键词: 流行性出血病病毒; 血清 6 型; 分离鉴定; 序列分析
中图分类号: S511; S502 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)04-0008-08

Isolation and genetic characteristics of epidemic hemorrhagic disease virus serotype 6 (EHDV-6) strains from Yunnan and Guangdong Provinces

LI Zhanhong^{1†}, YANG Zhenxing^{1†}, LIN Xuhui², LÜ Minna², XIAO Lei¹, KOU Meiling¹,
LIAO Defang¹, ZHU Jianbo¹, YANG Heng¹, LI Huachun¹
(1 Yunnan Animal Science and Veterinary Institute/Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory, Kunming 650224, China; 2 Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Objective】To isolate epidemic hemorrhagic disease virus serotype 6 (EHDV-6) strains prevalent in southern China, and investigate the genetic characteristics of the isolated strains. 【Method】Blood samples

收稿日期: 2019-08-30 网络首发时间: 2020-06-17 14:43:34
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200617.1116.004.html>
作者简介: 李占鸿 (1989—), 男, 助理研究员, 硕士, E-mail: dy0811zh@163.com; 杨振兴 (1986—), 男, 助理研究员, 硕士, E-mail: s300yn@163.com; †对本文贡献相同; 通信作者: 杨 恒 (1978—), 男, 研究员, 博士, E-mail: yangheng2008.cool@163.com; 李华春 (1958—), 男, 研究员, 博士, E-mail: li_huachun@hotmail.com
基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1200505, 2016YFD0500908); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303035); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养项目 (2017HB055)

were collected from sentinel animals in Yunnan and Guangdong Provinces in China. EHDV infection was monitored and the virus was isolated. The serum types of isolated strains were determined by serum neutralization test, and segments 2, 3 and 6 (Seg-2, -3 and -6) of EHDV-6 isolated strains were amplified by one-step RT-PCR and subsequently sequenced. 【Result】 From 2012 to 2016, 25 EHDV strains were isolated from sentinel animals in Yunnan and Guangdong Provinces and 11 strains of them were EHDV-6. Seg-2, -3 and -6 of Chinese EHDV-6 strains were of Eastern topotype, and the nucleic acid sequence similarities were 99.1%, 98.9% and 98.8% respectively, which were clustered into an independent Chinese branch on the phylogenetic tree. Chinese EHDV-6 strains had the closest relationship with the EHDV-6 strains which caused epidemic outbreaks in Japan. The Japanese EHDV-6 strain was within the Chinese branch on the phylogenetic tree. The similarities of nucleic acid sequences of Seg-2 and Seg-3 between the Japanese and Chinese strains were 98.5% and 93.9% respectively. 【Conclusion】 The sequences of EHDV-6 strains prevalent from Yunnan and Guangdong Provinces are highly similar. The closest genetic relationship between Japanese and Chinese EHDV-6 strains suggests that there may be flow of EHDV between China and Japan. The results provide a basis for further research on epidemiological analysis, pathogenicity, etiological diagnosis and vaccine preparation of EHDV-6 strains in China.

Key words: epizootic haemorrhagic disease virus; serotype 6; isolation and identification; sequence analysis

动物流行性出血病 (Epizootic haemorrhagic disease, EHD) 是由流行性出血病病毒 (Epizootic haemorrhagic disease virus, EHDV) 通过吸血库蠓 *Culicoides* spp. 进行传播的一种动物虫媒病毒病^[1]。EHDV 可感染多种野生与家养反刍动物, 南美洲、北美洲、欧洲、亚洲、非洲、大洋洲均有 EHD 疫情报道^[1-3]。白尾鹿 (White tail deer) 与不同品种的牛对 EHDV 均具有很高的易感性。牛感染 EHDV 后可表现发热, 鼻孔和嘴唇发红、结痂, 鼻腔和眼睛有分泌物, 口腔炎, 流涎, 跛行, 口腔、鼻腔糜烂, 呼吸困难^[2-3]。妊娠期母牛出现早产与流产, 奶牛产奶量急剧减少。近年来 EHD 多次在中东地区的牛群中暴发, 引起了国际上的高度重视^[4]。

EHDV 属呼肠孤病毒科 Reoviridae 环状病毒属 *Orbivirus*, 病毒基因组由 10 个大小不同的双链 RNA 节段 (Seg-1~Seg-10) 组成^[5]。EHDV 的外层衣壳由 VP2 (Seg-2 编码) 与 VP5 (Seg-6 编码) 蛋白构成, VP2 是诱导 EHDV 血清型特异性中和抗体的主要蛋白, 决定病毒的血清型; VP5 可影响 VP2 蛋白的构象, 进而影响中和抗体的产生^[6-7]。Seg-2/VP2 与 Seg-6/VP5 序列在不同血清型 EHDV 之间高度变异, 不同血清型毒株之间核酸序列差异可达 55%, 氨基酸序列差异可达 70%^[6]。根据 Seg-2 与 Seg-6 的序列变异, 可将其分为 A~D 4 种基因群 (Group)^[8]。Seg-3 编码 EHDV 的内层衣壳蛋白 VP3, 具有高度保守性, 由于三联密码子第 3 位的沉默突变, Seg-3 核酸序列在不同地域的分离毒株间存在一定差异。系统发生树分析显示, 世界范围

的 EHDV 分 Eastern 与 Western 2 种地域型 (Topotype)^[8], 分离自中国、日本和澳大利亚的毒株属 Eastern 型, 分离自北美洲、南美洲和欧洲的毒株属 Western 型^[8]。

目前世界范围内报道了 9 种血清型的 EHDV (EHDV-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9 和 -10)^[1, 9-10]。近年来 EHDV-6 型在中东地区土耳其、非洲阿尔及利亚与摩洛哥的牛群中多次引起疫病暴发和流行^[3], 特别是 2015 年 EHDV-6 型在日本的牛群中再次引起疫病暴发^[11], 提示我国很可能也将面临 EHDV-6 型引起的疫病的威胁。2012 年, 我们在全国范围内开展了 EHDV 的血清学调查, 在内蒙古、广东、广西和云南的牛群中均监测到 EHDV-6 型特异性中和抗体^[12-14], 表明该血清型病毒在我国南方与北方均呈广泛流行趋势。分离我国流行的 EHDV-6 型毒株并掌握病毒的遗传背景, 对我国 EHD 的防控具有重要意义。2012—2016 年, 本研究在云南省和广东省设立的哨兵动物上分离到多株 EHDV-6 型毒株, 为开展我国流行 EHDV-6 型毒株的病原学及流行病学特征分析、掌握国内外 EHDV-6 型毒株之间的关系提供了宝贵的材料。本文对 2012—2016 年我国云南省和广东省 EHDV-6 型毒株的分离及病毒的序列特征进行了报道, 研究结果为我国开展 EHDV-6 病原学诊断、流行病学和致病性研究等提供了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

MagMAX-96 病毒 RNA 分离试剂盒购自

Thermo 公司, 胎牛血清与 MEM 细胞培养基购自 Gibco 公司, 一步法 RT-PCR 扩增试剂盒与一步法 qRT-PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物公司, 病毒 RNA/DNA 提取试剂盒与 DNA 胶回收试剂盒购自天根生物科技有限公司。

1.2 细胞、毒株与标准阳性血清

BHK-21 细胞与 C6/36 细胞均由云南省畜牧兽医科学院热带亚热带动物病毒病重点实验室保存。6 种 EHDV 血清型 (EHDV-1、-2、-5、-6、-7、-8) 参考毒株由澳大利亚麦克阿瑟-伊丽莎白农业研究所馈

赠^[15]。使用经纯化灭活处理的 EHDV 参考毒株免疫日本大耳兔, 制备不同血清型 EHDV 的标准阳性血清, 血清中和抗体效价分别为 EHDV-1: 1:453、EHDV-2: 1:320、EHDV-5: 1:226、EHDV-6: 1:453、EHDV-7: 1:320、EHDV-8: 1:640^[15]。

1.3 引物设计与合成

下载 GenBank 公布的 EHDV-6 型毒株序列, 使用 Oligo 7.0 分别设计扩增该毒株 Seg-2、Seg-3 与 Seg-6 节段的 3 对引物, 扩增产物大小分别为 913、1 095 与 1 149 bp(表 1), 引物由上海捷瑞公司合成。

表 1 中国 EHDV-6 型分离毒株 Seg-2、Seg-3 与 Seg-6 节段扩增引物
Table 1 Primers for amplifying Seg-2, Seg-3 and Seg-6 of EHDV-6 isolates in China

引物名称 Prime name	引物序列(5'→3') Primer sequence	引物位置 Primer location	产物大小/bp Product size
EHDV-6-S2-F	AGTTGCCCAAGAGTATGTGA	Seg-2 (1 247~1 266 bp)	913
EHDV-6-S2-R	CATCATTCTGTAAAGATAGGTCG	Seg-2 (2 139~2 161 bp)	
EHDV-6-S3-F	CAAAARATAATYGATGGRGTGAAAG	Seg-3 (204~228 bp)	1 095
EHDV-6-S3-R	GGYGCTGGTTCTCTATTTTCAA	Seg-3 (1 276~1 299 bp)	
EHDV-6-S6-F	CRGGTGAATCYTACGGTGAA	Seg-6 (210~230 bp)	1 149
EHDV-6-S6-R	CGCCYTCTTGTTGAAYCGCTAT	Seg-6 (1 315~1 337 bp)	

1.4 血样采集

在广东省汕头市、云南省师宗县与江城县设立牛羊虫媒病毒监控点, 筛选蓝舌病病毒和 EHDV 抗体检测均为阴性的 10 头黄牛与 5 只山羊作为哨兵动物, 每年 5—12 月, 每隔 1 周从哨兵动物上采集常规血、肝素钠抗凝血与 EDTA 抗凝血, 采用云南省畜牧兽医科学院热带亚热带动物病毒病重点实验室建立的牛羊虫媒病毒高通量核酸检测方法进行检测, 对阳性样品进行病毒分离。

1.5 病毒分离与鉴定

取采集的血液样本分别进行血清分离与红细胞离心收集。采用朱建波等^[16]建立的 EHDV 群特异性抗体 C-ELISA 检测方法与杨振兴等^[17]报道的基于 EHDV 群特异性保守基因 *Seg5* 建立的 EHDV 群特异性高通量 qRT-PCR 方法分析哨兵动物中 EHDV 的感染情况。取 EHDV 核酸阳性且抗体未转阳的动物血液, 参照李占鸿等^[10]报道的 EHDV 分离程序, 用 PBS 缓冲液将红细胞洗涤 1 次后加入灭菌水进行裂解, 取 500 μ L 红细胞裂解液接种 BHK-21 细胞连续盲传培养, 逐日观察细胞病变。待出现明显细胞病变后, 取 200 μ L 细胞培养液提取核酸, 通过 EHDV 群特异性 qRT-PCR 对分离的病毒进行鉴定^[17]。

1.6 血清中和试验

将待鉴定病毒进行 10 倍梯度稀释后接种 96 孔板培养的 BHK-21 细胞, 通过 Karber 法测定病毒的 TCID₅₀。参照 Batten 等^[18]报道的方法进行血清中和试验: 将不同血清型 EHDV 的标准阳性血清进行 1:16 至 1:1 024 倍比稀释, 在 96 孔板中加入 50 μ L 稀释的血清与 100 个 TCID₅₀ 的待检病毒, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下作用 1 h, 然后转至 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 第 2 天每孔分别加入 50 μ L 密度为 2×10^5 /mL 的 BHK-21 细胞; 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 4~6 d 后, 观察细胞病变, 计算血清对病毒的中和指数。

1.7 EHDV 毒株 Seg-2、Seg-3 与 Seg-6 节段 RT-PCR 扩增与测序

提取分离 EHDV 毒株的核酸, 于 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后立即冰浴。分别取 5 μ L 变性后的核酸为模板, 使用表 1 的引物对, 通过一步法 RT-PCR 进行 EHDV 毒株 Seg-2、Seg-3 与 Seg-6 的扩增。反应体系: 2 $\times$ 1 Step Buffer 25 μ L, PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 2 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 2 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 2 μ L, 核酸模板 5 μ L, 加入无 RNA 酶水补齐至 50 μ L。反应条件: 50 $^{\circ}$ C 逆转录 30 min; 94 $^{\circ}$ C 灭活逆转录酶 2 min; 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环。对 PCR 产物

进行电泳胶回收, 以 PCR 扩增的上下游引物作为测序引物, 对纯化后的 DNA 进行双向测序。

1.8 序列分析与系统发生树构建

使用 DNASTAR 软件 (Ver 6.0) 进行序列拼接, 并通过 BioEdit 软件进行核酸与氨基酸序列的比对分析, 核酸与氨基酸序列相似度以平均值±标准差表示。利用 MEGA 7.0 构建系统发生树, 建树方法为邻近法 (Neighbor-joining method), 选择遗传距离模式 (P-distance), 自举检验 (Bootstrap) 取值 500^[19]。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离与鉴定

2012—2016 年, 在我国云南省和广东省相继分离出 25 株 EHDV 毒株, 对分离毒株进行 EHDV 群

特异性 qRT-PCR 检测, 样品核酸 Ct 值为 18~25。经过血清中和试验鉴定出分离的 EHDV 血清型包括 EHDV-1、-5、-6、-7 与 -10 型 5 种。EHDV-6 型血清共计分离出 11 株毒株: 云南省师宗县 5 株、云南省江城县 1 株、广东省汕头市 5 株 (表 2)。

师宗县 2014 年未分离到 EHDV-6 型毒株, 2012、2013、2015 与 2016 年均分离出 EHDV-6 型, 表明 EHDV-6 型在师宗县处于长期流行趋势。除 EHDV-6 型外, 师宗县还分离出 EHDV-1、-5、-7 与 -10 型 4 种血清型毒株, 江城县分离出 EHDV-1、-5 与 -7 型 3 种血清型毒株, 表明了云南省流行的 EHDV 血清型的多样性。广东省汕头市 2013 年分离出 EHDV-1 型毒株, 2016 年连续分离出 5 株 EHDV-6 型毒株, 未分离到 EHDV-1 型毒株, 表明 EHDV-6 型可能替代 EHDV-1 型成为该地区的主要流行血清型。

表 2 中国 EHDV-6 型毒株分离信息表
Table 2 Information of EHDV-6 strains isolated in China

毒株 Strain	来源动物 Animal source	分离年份 Isolation year	分离地点 Isolation place	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude
YNSZ/V003/2012	黄牛 Cattle	2012	云南师宗 Shizong, Yunnan	E104°17'	N24°36'	940
YNSZ/V003/2012	黄牛 Cattle	2012	云南师宗 Shizong, Yunnan	E104°17'	N24°36'	940
YNSZ/V283/2013	黄牛 Cattle	2013	云南师宗 Shizong, Yunnan	E104°17'	N24°36'	940
YNJC/V274/2014	黄牛 Cattle	2014	云南江城 Jiangcheng, Yunnan	E101°51'	N22°35'	1 129
YNSZ/V273/2015	黄牛 Cattle	2015	云南师宗 Shizong, Yunnan	E104°17'	N24°36'	940
GDST/V263/2016	奶牛 Dairy cattle	2016	广东汕头 Shantou, Guangdong	E116°40'	N23°21'	5
GDST/V258/2016	奶牛 Dairy cattle	2016	广东汕头 Shantou, Guangdong	E116°40'	N23°21'	5
GDST/V259/2016	奶牛 Dairy cattle	2016	广东汕头 Shantou, Guangdong	E116°40'	N23°21'	5
GDST/V260/2016	奶牛 Dairy cattle	2016	广东汕头 Shantou, Guangdong	E116°40'	N23°21'	5
GDST/V261/2016	奶牛 Dairy cattle	2016	广东汕头 Shantou, Guangdong	E116°40'	N23°21'	5
YNSZ/V276/2016	黄牛 Cattle	2016	云南师宗 Shizong, Yunnan	E104°17'	N24°36'	940

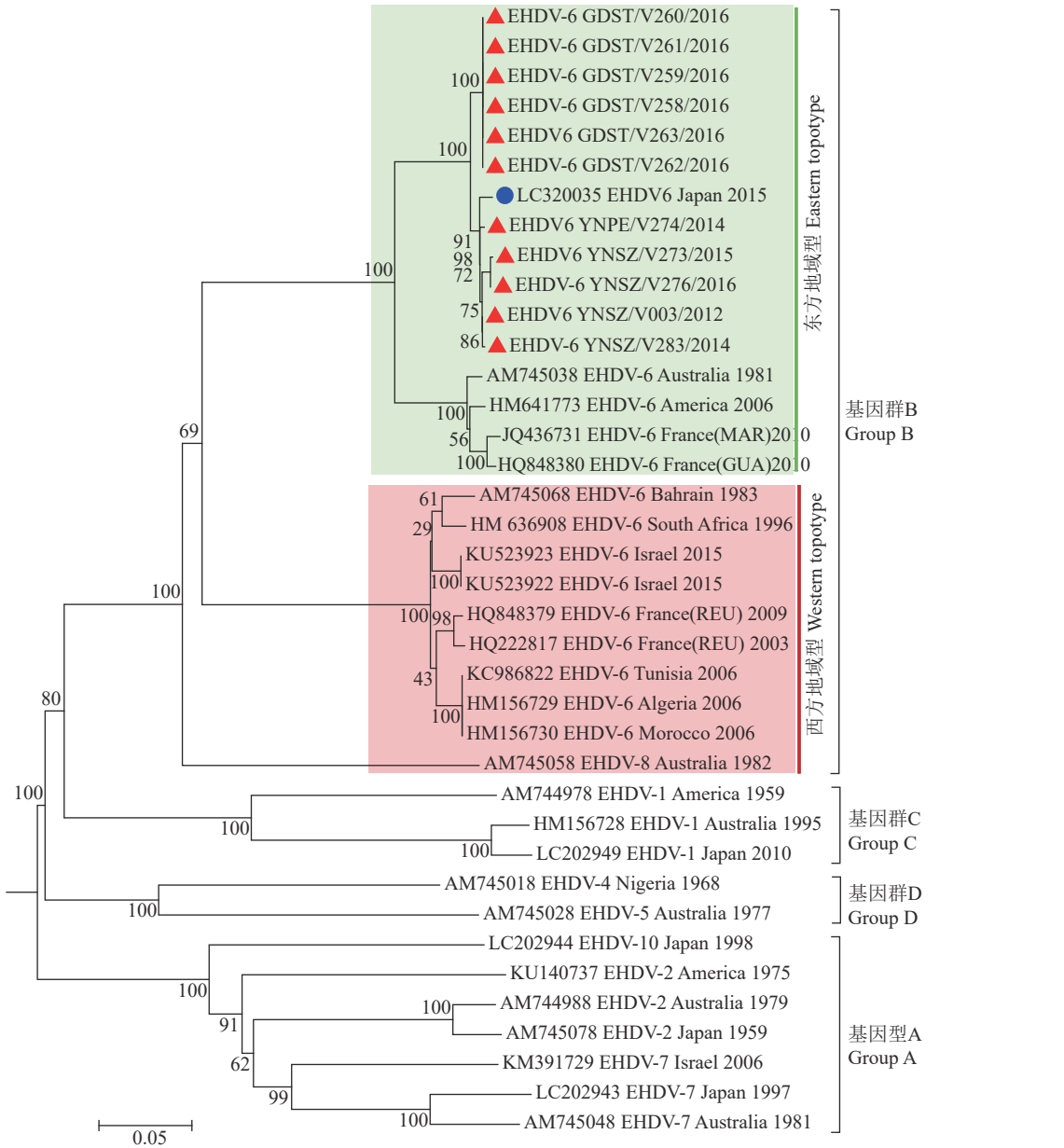
2.2 EHDV-6 型毒株 Seg-2、Seg-3 与 Seg-6 的 RT-PCR 扩增

将 Seg-2、Seg-3 与 Seg-6 测序结果进行 BLAST 比对分析, 显示中国 EHDV-6 型毒株 Seg-2、-6 序列与世界范围 EHDV-6 型毒株核酸序列相似性最高 (>85%), 表明我们成功完成了中国 11 株 EHDV-6 型毒株 Seg-2、Seg-3 与 Seg-6 的测序。

2.3 EHDV-6 型毒株 Seg-2 的序列分析

中国不同时间、地域分离的 EHDV-6 型毒株的 Seg-2/VP2 序列具有高度保守性, 核酸与氨基酸序列相似性均为 99.1%。EHDV 毒株 Seg-2 序列的系统发生树显示不同血清型 EHDV 的 Seg-2 分为

A~D 4 种基因群, 世界范围分离的 EHDV-6、-8 型毒株属 B 群^[8, 20]。随着中国 EHDV-6 型毒株序列加入, 世界范围 EHDV-6 的 Seg-2 明显分为 Eastern 与 Western 2 种地域型 (图 1): 分离自中国、日本、澳大利亚、美国与法国的海外行政区 (瓜德罗普岛与马提尼克岛) 的 EHDV-6 型毒株均属 Eastern 型, 来自中东地区与非洲的 EHDV-6 型共同构成 Western 型。中国与日本分离的 EHDV-6 型毒株具有最近的亲缘关系, Seg-2/VP2 序列核酸与氨基酸序列相似性高达 98.5% 和 98.9%; 与澳大利亚和美国 EHDV-6 型毒株亲缘关系较远; 与非洲和中东地区毒株亲缘关系最远 (图 1、表 3)。



“▲”表示本研究获取的中国 EHDV-6 型毒株序列，“●”表示与中国 EHDV-6 型毒株具有最近亲缘关系的日本毒株序列

“▲” indicated sequence of Chinese EHDV-6 strain isolated in this study, “●” indicated sequence of Japanese strain that had the closest relationship with Chinese EHDV-6 strain

图 1 邻近法构建的 EHDV-6 型毒株 Seg-2 系统发生树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Seg-2 of EHDV-6 strain constructed by Neighbor-joining method

表 3 世界范围内 EHDV-6 型毒株 Seg-2/VP2、Seg-3/VP3 和 Seg-6/VP5 核酸与氨基酸序列相似性¹⁾

Table 3 Nucleic acid and amino acid sequence similarities among Seg-2/VP2, Seg-3/VP3 and Seg-6/VP5 of EHDV-6 strains around the world					%	
国家/地域 Country/Region	Seg-2	VP2	Seg-6	VP5	Seg-3	VP3
中国 China	99.1±0.7	99.1±0.7	98.8±0.9	99.9±0.2	98.9±0.7	99.9±0.1
日本 Japan	98.5±0.4	98.9±0.4	—	—	93.9±2.9	99.6±0.3
澳大利亚 Australia	90.5±0.3	93.9±0.2	90.5±0.2	98.1±0.2	92.5±1.4	99.8±0.3
美国 America	90.0±0.4	93.3±0.3	90.1±0.1	98.5±0.1	80.2±0.3	96.9±0.3
非洲 Africa	71.0±0.2	73.6±0.5	79.8±0.1	96.3±0.2	80.0±0.3	97.2±0.2
中东 Middle East	71.0±0.1	73.1±0.1	79.7±0.1	96.3±0.2	79.4±0.4	97.0±0.2

1) “—”表示缺乏相应的毒株序列信息

1) “—” indicated no corresponding sequence information of strain

2.4 EHDV-6 型毒株 Seg-6 的序列分析

与 EHDV 的 Seg-2 系统发生树中观察到的情况相似, 不同血清型 EHDV 的 Seg-6 也分为 A~D 4 种基因群, 世界范围分离的 EHDV-6、-8 型毒株同属 B 群^[8, 20]; EHDV-6 型毒株的 Seg-6 分为 Eastern 与 Western 2 种地域型: 中国、澳大利亚、美国分离的 EHDV-6 型毒株均属 Eastern 型, 中东与非洲分离的 EHDV-6 型毒株属 Western 型 (图 2)。

中国不同时间、地域分离的 EHDV-6 型毒株的 Seg-6/VP5 核酸与氨基酸序列相似性分别为 98.8% 和 99.9%(表 3)。由于 GenBank 中缺少日本 EHDV-6 型毒株 Seg-6 序列信息, 中国毒株的 Seg-6 在 Eastern 地域型中形成 1 个独立的支系, 与澳大利亚和美国分离的毒株具有最近的亲缘关系, 与非洲和中东地区的 EHDV-6 型毒株亲缘关系最远 (图 2、表 3)。

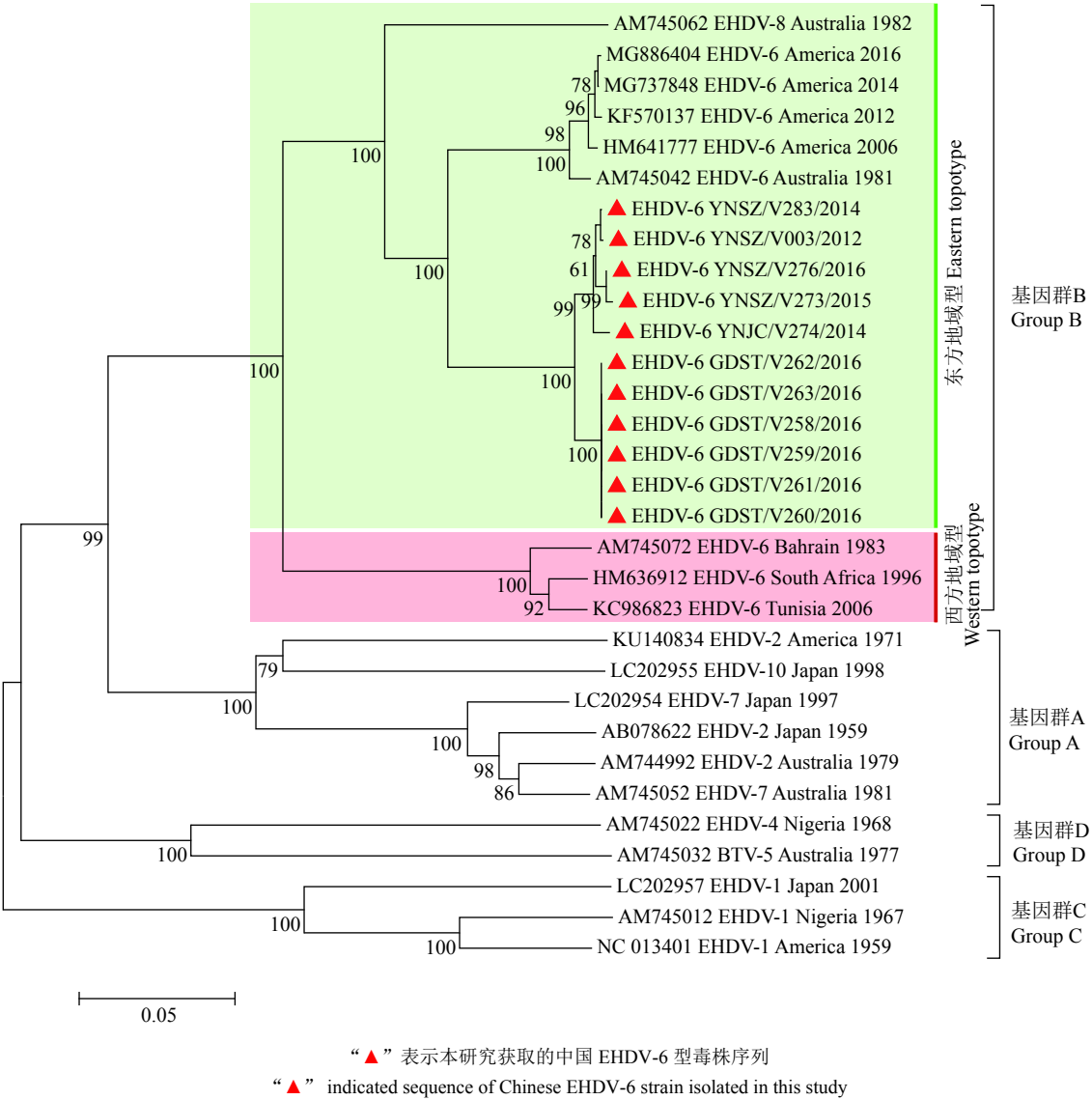


图 2 邻近法构建的 EHDV-6 型毒株 Seg-6 系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Seg-6 of EHDV-6 strain constructed by Neighbor-joining method

2.5 EHDV-6 型毒株 Seg-3 的序列分析

此次分离的 EHDV-6 型毒株的 Seg-3/VP3 序列高度保守, 核酸与氨基酸序列相似性分别为 98.9% 和 99.9%。系统发生树显示, 世界范围分离的 EHDV 的 Seg-3 序列可分为 Western 与 Eastern 型。中国与澳大利亚、日本分离的 EHDV-6 型毒株毒株均属于 Eastern 型, 美国、中东地区和非洲分离

的 EHDV 毒株构成 Western 型 (图 3)。中国和日本分离的 EHDV-6 型毒株具有最近的亲缘关系, 核酸与氨基酸序列相似性分别高达 93.9% 和 99.6%; 中国与其他 Eastern 毒株 Seg-3/VP3 核酸与氨基酸序列相似性分别为 92.5%、99.8%; 与 Western 型毒株的亲缘关系最远 (图 3、表 3)。

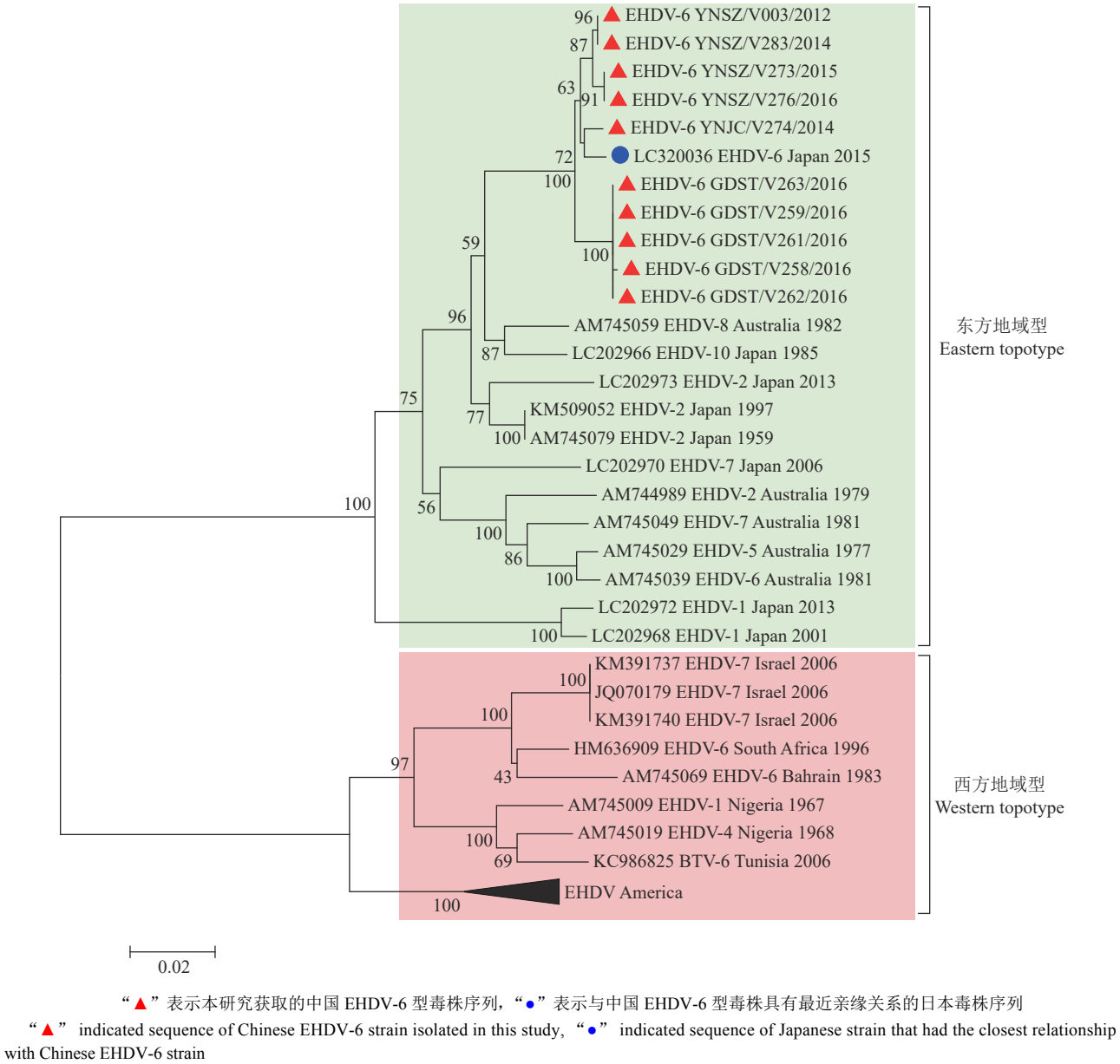


图 3 邻近法构建的 EHDV-6 型毒株 Seg-3 系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Seg-3 of EHDV-6 strain constructed by Neighbor-joining method

3 讨论与结论

EHDV 血清型众多,不同血清型毒株对牛的致病性存在较大差异。前期研究认为仅 EHDV-2 型的其中 1 个毒株——茨城病病毒 (Ibaraki virus, IBAV) 对牛有较强致病性^[21]。近年来 EHDV-6 多次在世界多个国家地区的牛群与野生鹿群中引发疫病,如非洲阿尔及利亚 (2006 年) 与突尼斯 (2015 年)、南美洲留尼汪岛 (2003 年) 与法属圭那亚 (2012 年)、美国 (2016 年)、土耳其 (2007 年) 以及日本 (2015 年)^[22-24],引起世界动物卫生组织 (OIE) 的高度重视。我国是世界上牛羊养殖业大国,2017 年肉牛存栏量达 7 441 万头,奶牛存栏量达 1 340 万头。面对近年来 EHDV-6 型在世界范围引起的疫

情,掌握 EHDV-6 型毒株遗传背景及在我国的流行情况,积极开展相应的预防工作,防患于未然,对保障我国肉牛与奶牛行业的安全生产具有十分重要的意义。

从前期血清学调查结果来看,我国北方地区 (内蒙古) 与南方地区 (云南、广东、广西) 均有 EHDV-6 的活动^[12-14]。2012—2016 年,本研究在云南和广东分离出 11 株 EHDV-6 型毒株,一方面为 EHDV-6 型在我国的流行提供了直接证据,更为深入开展我国 EHDV-6 型病原学与流行病学研究提供了基础。我国云南与广东流行的 EHDV-6 型毒株 Seg-2/VP2、Seg-3/VP3 和 Seg-6/VP5 核酸与氨基酸序列高度相似,在系统发生树上聚为 1 个相对独立的进化分支,表明我国云南与广东流行的 EHDV-

6 型毒株来源于同一个祖先病毒, 在我国特有的生态环境中演化形成了具有地域特征的 EHDV-6 型中国支系。日本 2015 年分离的 EHV-6 型毒株^[11]与中国毒株 Seg-2/VP2 序列相似性高达 98.5% 与 98.9%, Seg-3/VP3 序列相似性高达 98.9% 与 99.9%, 在系统发生树上处于中国 EHDV-6 支系的内部, 表明中国与日本的 EHDV-6 型毒株具有最近的亲缘关系。在我国南方地区分离的 EHDV-10 型^[10]、蓝舌病^[22-23]、阿卡斑病^[25]、牛流行热病^[26] 等牛羊虫媒病毒毒株序列与日本分离的毒株存在高度相似性, 在进化上具有最近亲缘关系。中国南方地区与日本相隔甚远, 两国的虫媒病毒序列高度相似和亲缘关系高度相近的机制值得进一步研究。

本研究首次报道了 2012—2016 年 11 株 EHDV-6 型毒株在我国云南和广东省的分离与遗传特征, 研究结果为开展我国 EHDV-6 遗传特性、致病性、病原学诊断与疫苗制备等研究提供了基础。后续将对我国 EHDV-6 型代表毒株进行全基因组测序, 建立 EHDV-6 型的血清型特异性病原与抗体的检测技术, 在我国北方地区开展 EHDV-6 型的流行病学调查与病毒分离, 为阻断 EHDV-6 型在我国引起动物疫病暴发提供技术支撑。

参考文献:

[1] SAVINI G, AFONSO A, MELLOR P, et al. Epizootic haemorrhagic disease[J]. *Res Vet Sci*, 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]. *Vet Rec*, 2008, 162(2): 53-56.

[3] TEMIZEL E M, YESILBAG K, BATTEN C, et al. Epizootic hemorrhagic disease in cattle, western Turkey[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2): 317-319.

[4] 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 O.I.E, 2008: 1092-1106.

[5] MERTENS P P C, MAAN S, SAMUEL A, et al. Orbiviruses, Reoviridae[M]. FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Virus taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. London: Elsevier academic press, 2005: 466-483.

[6] 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 Res*, 2009, 145(2): 200-210.

[7] HUISMANS H, BREMER C W, BARBER T L. The nucleic acid and proteins of epizootic haemorrhagic disease virus[J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 1979, 46(2): 95-104.

[8] 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 Res*, 2009, 145(2): 187-199.

[9] SHIRAFUJI H, KATO T, YAMAKAWA M, et al. Char-

acterization 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]. *Infect Genet Evol*, 2017, 53: 38-46.

[10] 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]. *病毒学报*, 2019, 35(1): 112-120.

[11] YUKA K, MASAHIRO K, YASUYUKIO, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 infection in cattle, Japan, 2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24(5): 902-905.

[12] 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.

[13] 张怡轩, 林俊, 曹颖颖, 等. 广西鹿流行性出血热病毒血清型调查及分布影响分析[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2016(4): 19-21.

[14] 张胜男, 李华春, 朱建波, 等. 2015 年内蒙古地区蓝舌病及流行性出血热流行病学调查及血清型鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(12): 939-943.

[15] 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): 150-158.

[16] 朱建波, 杨振兴, 肖雷, 等. 流行性出血病多克隆抗体 C-ELISA 检测方法的建立[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(7): 1440-1450.

[17] 杨振兴, 朱建波, 李占鸿, 等. 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.

[18] BATTEN C A, HENSTOCK M R, BIN-TARIF A, et al. Bluetongue virus serotype 26: Infection kinetics and pathogenesis in Dorset Poll sheep[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 157(1/2): 119-124.

[19] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.

[20] MAAN N S, MAAN S, NOMIKOU K, 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]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12782.

[21] ALLISON A B, GOEKJIAN V H, POTGIETER A C, et al. Detection of a novel reassortant epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) in the USA containing RNA segments derived from both exotic (EHDV-6) and endemic (EHDV-2) serotypes[J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(2): 430-439.

[22] LEE F, TING L J, LEE M S, et al. Genetic analysis of two taiwanese bluetongue viruses[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 148(2/3/4): 140-149.

[23] YANG H, ZHU J, LI H, et al. Full genome sequence of bluetongue virus serotype 4 from China[J]. *J Virol*, 2012, 86(23): 13122-13123.

[24] BREARD E, BELBIS G, VIAROUGE C, et al. Epizootic hemorrhagic disease virus serotype 6 experimentation on adult cattle[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 95(2): 794-798.

[25] 冯云, 章域震, 杨卫红, 等. 阿卡斑病毒云南分离株全基因组序列特征研究[J]. *病毒学报*, 2016, 32(2): 161-169.

[26] LIAO Y K, INABA Y, LI N J, et al. Epidemiology of bovine ephemeral fever virus infection in Taiwan[J]. *Microbiol Res*, 1998, 153(3): 289-295.