

# 2012—2016年中国南方地区帕利亚姆血清群病毒的分离与序列特征分析

杨恒<sup>1</sup>,肖雷<sup>1</sup>,李占鸿<sup>1</sup>,孟锦昕<sup>1</sup>,杨振兴<sup>1</sup>,  
吕敏娜<sup>2</sup>,林栩慧<sup>2</sup>,廖德芳<sup>1</sup>,牛保生<sup>3</sup>,李华春<sup>1\*</sup>

(1. 云南省畜牧兽医科学院 热带亚热带动物病毒重点实验室,昆明 650224;

2. 广东省农业科学院动物卫生研究所,广州 510640;3. 云南省师宗县动物疫病预防控制中心,师宗 655799)

**摘要:**旨在从牛、羊监控动物群中,对流行于我国的帕利亚姆血清群病毒(PALV)进行分离、鉴定与序列特征分析,明确我国流行毒株与国外毒株之间的关系。自监控动物采集的 PALV 阳性血液接种 BHK-21 细胞进行病毒分离;对所分离 PALV 毒株的 *Seg-7* 与 *Seg-2* 基因片段进行扩增、测序与序列分析;通过高分辨率琼脂糖凝胶电泳分析不同血清型 PALV 代表毒株基因组的“电泳带型”特征;通过免疫荧光与中和试验分析不同血清型 PALV 的阳性血清之间的交叉反应特性与中和活性。试验结果如下:2012—2016 年,在云南、广西、广东共计分离出 19 株 PALV; *Seg-2* 与 *Seg-7* 测序与系统发育分析显示,分离毒株分属 Chuzan virus(CHUV)、D'Aguilar virus(DAV)与 Bunyip Creek virus(BCV)三种血清型,不同血清型毒株均与日本毒株具有最近的亲缘关系,而与澳洲、非洲毒株亲缘关系较远。病毒基因组电泳结果显示 PALV 基因组呈现“3-3-4”的电泳带型特征。免疫荧光结果显示针对 CHUV 的多克隆抗体可使感染 CHUV、DAV 与 BCV 的 BHK-21 细胞呈现特异性荧光。血清学中和试验显示,CHUV、DAV 与 BCV 三种病毒的阳性血清之间无交叉中和保护作用。本研究报道了 2012—2016 年中国 PALV 的分离与 *Seg-2*、*Seg-7* 序列特征,并首次报道了 PALV 的 DAV 与 BCV 两种血清型病毒在我国的分离,研究结果将有助于掌握我国 PALV 的分布与遗传特征,为诊断试剂的开发、流行病学调查与致病性研究提供科学依据。

**关键词:**帕利亚姆血清群病毒;病毒分离;病毒鉴定;血清型;序列分析;交叉中和和保护

中图分类号:S852.659.4

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2018)04-0761-10

## Sequence Analysis of Palyam Serogroup Virus Isolated in South China from 2012 to 2016

YANG Heng<sup>1</sup>, XIAO Lei<sup>1</sup>, LI Zhan-hong<sup>1</sup>, MENG Jin-xin<sup>1</sup>, YANG Zhen-xing<sup>1</sup>,  
LÜ Min-na<sup>2</sup>, LIN Xu-hui<sup>2</sup>, LIAO De-fang<sup>1</sup>, NIU Bao-sheng<sup>3</sup>, LI Hua-chun<sup>1\*</sup>

(1. *Yunnan Tropical and Subtropical Animal Virus Diseases Laboratory, Yunnan Animal Science and Veterinary Institute, Kunming 650224, China*; 2. *Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangzhou 510640*; 3. *Animal Disease Control Center of Shizong County, Shizong 655799, China*)

**Abstract:** The aim of this study was to isolate and identify the Palyam serogroup virus (PALV) prevalent in China from the sentinel herds and to clarify the relationship between the native strains and the foreign strains. For virus isolation, PALV-positive blood samples were collected from sentinel herds and blind passed on BHK-21 cells. Specific primers targeting *Seg-2* and *Seg-7* of PALV were designed for identification and sequence analysis of the isolated virus by RT-PCR

收稿日期:2017-09-12

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0500908);公益性行业(农业)科研专项(201303035);国家自然科学基金(31360621;31760744)

作者简介:杨恒(1978-),博士,副研究员,主要从事动物虫媒病毒研究,E-mail: yangheng2008\_cool@163.com;肖雷(1971-),男,硕士,副研究员,主要从事牛羊虫媒病毒研究。二人并列第一作者

\*通信作者:李华春,博士,研究员,主要从事蓝舌病病毒研究;E-mail: Li\_huachun@hotmail.com

amplification. Genomic RNA of the isolated virus was extracted from the infected cells and determined by high resolution agarose gel electrophoresis. Cross-reactivity and cross-neutralizing activity of positive sera from different serotypes of PALV were analyzed by immunofluorescence and serum neutralization test. The results were as follows: During 2012 to 2016, a total of 19 strains of PALV were isolated from Yunnan, Guangxi and Guangdong provinces. *Seg-2* and *Seg-7* sequencing and phylogenetic analysis showed that the Chinese strains of PALV belonged to Chuzan virus (CHUV), D'Aguilar virus (DAV) and Bunyip Creek virus (BCV) and showed closest genetic relationship with the Japanese strains, but showed relative far relationship with the Australian and African strains. High resolution agarose gel electrophoresis showed that the genomic dsRNA of different serotypes of representative PALV strains presenting "3-3-4" banding characteristics. Immunofluorescence results showed that BHK-21 cells infected with CHUV, DAV or BCV presented specific fluorescence when using polyclonal antibody against CHUV as detection antibodies. Serological neutralization tests showed that there was no cross-neutralization protection between the positive sera of CHUV, DAV and BCV viruses. This study reported the molecular characteristics of PALV isolated in China from 2012 to 2016. It's the first time, we reported the DAV and BCV isolated in China. These results will be helpful to better understand the distribution and genetic characteristics of Chinese PALV and provide basis for development of diagnosis reagent and carried out epidemiological and pathogenic research on PALV.

**Key words:** Palyam serogroup virus; virus isolation; virus identification; serotype; sequence analysis; cross-neutralization protection

帕利亚姆血清群病毒(Palyam serogroup virus, PALV)为呼肠孤病毒科环状病毒属(*Orbivirus*)基因组分节段双链 RNA(dsRNA)虫媒病毒,广泛分布于热带、亚热带与温带地区,可感染多种反刍动物,其中以牛最为易感。病毒主要通过吸血昆虫库蠓(*Culicoides*)对动物的吸血性叮咬传播<sup>[1-2]</sup>。PALV 具有多种不同的血清型,由于历史原因,不同血清型的 PALV 往往以病毒首次分离地的地名进行命名,因此容易让人误认为它们是不同的病毒,但实际为同一种病毒的不同血清型。目前报道的 PALV 血清型有 Chuzan virus(CHUV)、D'Aguilar virus(DAV)、Bunyip Creek virus(BCV)、CSIRO Village virus、Petevo virus、Gweru virus、Marondera virus、Marrakai virus、Abadina virus 以及 Vellore virus<sup>[3]</sup>。

CHUV 于 1985 年首次从日本中山县库蠓 *C. oxystoma* 和牛血液中分离获得,因而命名为中山病毒<sup>[4]</sup>。CHUV 为导致 1985—1986 年日本暴发的新生牛积水性无脑小脑发育不全综合征(hydranencephaly cerebellar hypoplasia syndrome, HCH)的病原<sup>[5]</sup>,目前日本已经研发了针对 CHUV 的灭活疫苗,用于控制本病的流行<sup>[6-7]</sup>。2007 年韩国的一项家畜虫媒病毒血清学调查研究显示,发生流产牛的

CHUV 抗体阳性率为 22.8%,认为 CHUV 可能与牛的流产有一定的关系<sup>[8]</sup>。DAV 与 BCV 最早分别于 1970 与 1975 年从澳大利亚的库蠓 *C. oxystoma* 与 *C. peregrinus* 中分离。2016 年,日本从监控牛群与库蠓上分离出多株 DAV 与 BCV,证实了两种病毒在日本的流行<sup>[9]</sup>。目前关于 BCV 与 DAV 致病性报道较少,推测两种病毒可能与发生在牛上的流产有一定关系,但仍需进一步通过动物试验证明<sup>[10]</sup>。

与环状病毒属的蓝舌病病毒(BTV)和鹿流行性出血热病毒(EHDV)类似<sup>[11]</sup>,PALV 的基因组大小约 21 kb,由 *Seg-1*(3.9 kb)至 *Seg-10*(0.7 kb)等 10 个基因节段构成,可编码 7 种结构蛋白(VP1~VP7)与三种非结构蛋白(NS1~NS3)<sup>[12-14]</sup>。*Seg-2* 编码的 VP2 蛋白决定着 PALV 的血清型,诱导产生病毒的血清型特异性中和抗体,其核酸与氨基酸序列在不同血清型毒株之间高度变异。*Seg-7* 编码的 VP7 蛋白为 PALV 的群特异性抗原,可诱导产生病毒的群特异性抗体,其氨基酸序列在不同血清型之间高度保守,*Seg-7* 核酸序列在不同地域分离的毒株之间存在着一定差异,体现出病毒的地域特征<sup>[15-16]</sup>。

2012 年,我们从云南省师宗县的监控牛上首次分离出 CHUV(SZ/187 毒株),并完成其全基因组

序列测定<sup>[17]</sup>,随后王芳(F. Wang)等<sup>[18]</sup>在项目设立于广西壮族自治区马山市的监控牛中也分离出 CHUV (GX871 毒株)。通过对两株中国 CHUV 毒株基因组序列的比较显示,两个毒株 *Seg-1* 至 *Seg-10* 基因节段的核酸序列相似度均大于 99%,表明在我国云南与广西流行的 CHUV 有着非常近的亲缘关系。

为掌握 PALV 在我国大陆地区的分布、血清型与病毒的遗传背景,2012—2016 年我们在云南、广东与广西设立的监控动物牛上开展了 PALV 的分离工作,相继分离出 19 株 PALV。本文对我国 PALV 的分离、鉴定、*Seg-2* 与 *Seg-7* 的序列特征进行了报道,研究结果将有助于掌握我国 PALV 的分布、遗传背景以及与世界范围 PALV 毒株之间的关系,为 PALV 诊断试剂的开发、流行病学调查与致病性研究提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

磁珠法病毒 RNA 抽提试剂盒 MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit、MEM 培养基、胎牛血清购自 Thermo 公司;RNA 提取试剂 RNAiso-Plus、病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒、高分辨率琼脂糖、PrimeScript 逆转录酶、Ex Taq DNA 聚合酶、胶回收试剂盒、荧光定量 qRT-PCR 试剂盒,购自大连宝生物公司;氯化锂(LiCl)购自 Sigma 公司。

### 1.2 细胞株、毒株、抗体

BHK-21 细胞、BTV-1 型毒株(Y863)、EHDV-1 型毒株(V128/2014)与 CHUV 毒株(SZ/187)由本实验室分离保存;兔抗 CHUV 多克隆抗体由本实验室制备保存;FITC 标记羊抗兔 IgG 荧光二抗,购自武汉博士德公司。

### 1.3 监控点与监控动物的设立

通过对云南、广西、广东牛、羊虫媒病毒的血清学调查并结合当地的气候、地理环境的分析,作者在我国的云南省师宗县、广西壮族自治区马山市以及广东省汕头市郊区分别设定了三个牛、羊虫媒病毒监控点。在监控点设置 BTV 血清学阴性的牛和羊作为虫媒病毒监控动物,每年 3 至 10 月定期从监控动物上采血进行虫媒病毒的检测与分离工作。

### 1.4 血液样品的采集与病毒分离

从监控动物上采集的肝素钠抗凝血、EDTA 抗凝血与常规血液三种血液样品于 4 °C 保存,并送至实验室进行虫媒病毒的检测与病毒分离工作。取 200  $\mu$ L EDTA 抗凝血 3 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 10 min 收集红细胞(RBCs),以 PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL 灭菌水作用 10 min 裂解 RBCs。取 50  $\mu$ L RBCs 裂解液以 MagMax Express 核酸自动提取仪提取核酸,采用本实验室建立的牛羊虫媒病毒高通量 Real Time qRT-PCR 技术进行血液样本中 BTV、EHDV、PALV、阿卡斑病毒与牛流行热病毒的核酸检测。对 qRT-PCR 检测为 PALV 阳性的血液样本(*Ct* 值>38),取 200  $\mu$ L RBCs 裂解液接种长为单层的 BHK 细胞并连续盲传 5 代,当细胞出现明显的细胞病变(CPE)时,收获细胞上清,冻存于-80 °C 备用。

### 1.5 引物设计与合成

依据我们前期获取的中国 CHUV 毒株(SZ/187 与 GX871)序列<sup>[17-18]</sup>以及 GenBank 公布的 PALV 毒株的序列,以 PALV 的群保守性 *Seg-7* 基因节段和血清型特异性 *Seg-2* 基因节段为靶序列,设计 4 对扩增引物分别用于 PALV *Seg-7* 以及 BCV、CHUV 和 DAV 三种血清型 *Seg-2* 的特异性 RT-PCR 扩增。引物由上海捷瑞公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PALV 的 *Seg-7* 与 BCV、CHUV 和 DAV 的 *Seg-2* RT-PCR 扩增引物

Table 1 RT-PCR amplification primers targeting *Seg-7* of PALV and *Seg-2* of BCV, CHUV and DAV

引物名 Primers name	引物序列(5'-3') Primers sequence	位置 Primers location	产物大小/bp Products size
PALV-S7-F	GCCAACACTACACAACAAGAAAG	<i>Seg-7</i> :171-191	791
PALV-S7-R	CCGAATATAACAGTAAAGCCA	<i>Seg-7</i> :941-961	
BCV-S2-F	GRGCTRTCATAGATTTCGGAAGC	<i>Seg-2</i> :987-1008	1 251
BCV-S2-R	TACAAACYTTTACYAGAGCCAT	<i>Seg-2</i> :2215-2237	
CHUV-S2-F	GGATTACGCYATTACTCGGA	<i>Seg-2</i> :1175-1195	1 004
CHUV-S2-R	ATGGATTCTTGTGGGATTAT	<i>Seg-2</i> :2157-2178	
DAV-S2-F	ATTTTTCAACGAAGAGACGTG	<i>Seg-2</i> :929-949	1 223
DAV-S2-R	ATAGGAACACCTTTACCYAGG	<i>Seg-2</i> :2131-2151	

## 1.6 核酸提取、RT-PCR 扩增与测序

采用病毒 RNA/DNA 抽提试剂盒提取病毒核酸, 94 °C 变性 3 min 后立即冰浴, 进行病毒 dsRNA 的解链。以变性后的核酸为模板, 使用 Radoms 6 mers 引物和 PrimeScrip 逆转录酶进行 cDNA 的合成。取 2  $\mu$ L 合成的 cDNA 为模板, 以 Ex Taq DNA 聚合酶进行 PALV 的 *Seg-7* 与 *Seg-2* 的 PCR 扩增。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 扩增产物进行电泳, 对扩增大小符合预期条带进行电泳回收与测序, 使用 Gontig Express 软件对测序结果进行拼接。将获取的序列进行 BLAST 比对, 对病毒的种属与血清型进行判定。

## 1.7 高分辨率琼脂糖凝胶电泳分析

将我国分离的 BTV-1 (Y863 毒株), EHDV-1 (V128/2014 毒株)、CHUV (SZ/187 毒株)、DAV (V106/YN/2014 毒株) 与 BCV (V104/YN/2014 毒株) 分别接种单层 BHK-21 细胞, 待细胞出现完全 CPE 后, 离心收集细胞, 使用 RNAiso-Plus 按说明书提取细胞总 RNA。按文献[19]的方法进行基因组 dsRNA 的纯化。以高分辨率琼脂糖配制 2% 浓度的凝胶, 取 10  $\mu$ L 纯化后的病毒基因组 dsRNA 于 4 °C 以 90 V 电压电泳 4~5 h, 比较分析 BTV、EHDV、CHUV、DAV 和 BCV 五种病毒基因组 dsRNA 的电泳带型。

## 1.8 系统发育树的构建

从 GenBank 中下载分离自中国、日本、印度、澳大利亚与津巴布韦 PALV 毒株的 *Seg-2* 与 *Seg-7* 序列。使用 Mega 6.0 软件<sup>[20]</sup> 与本研究获取的序列进行比对, 将比对结果以软件中的邻近法 (Neighbor-joining, NJ) 进行系统发育树构建, 选择模型参数为: P-distanc, 自举检验 (Bootstrap) 取值 1 000。

## 1.9 免疫荧光试验

将 CHUV (SZ/187 毒株)、DAV (V106/YN/2014 毒株)、BCV (V104/YN/2014 毒株) 分别接种 12 孔板 BHK-21 细胞, 并设定未接毒空白细胞作为阴性对照, 培养 72 h。待细胞开始出现 CPE 时, 弃去培养液, 以预冷的甲醇/丙酮混合液 (1:1) 室温固定 20 min, PBST 洗涤细胞一次; 以 5% 的脱脂奶于 37 °C 封闭 1 h; 弃去封闭液, 加入 200  $\mu$ L 兔抗 CHUV 多克隆抗体 (1:200 稀释) 37 °C 孵育 1 h, 以 PBST 洗涤细胞三次; 加入 FITC 标记羊抗兔 IgG

荧光二抗 200  $\mu$ L (1:400 稀释) 37 °C 孵育 1 h, 以 PBST 洗涤细胞三次, 于倒置荧光显微镜下观察细胞的荧光。

## 1.10 病毒中和试验

选择云南省分离的 SZ/187 毒株、V106/YN/2014 毒株与 V104/YN/2014 毒株分别作为中国分离 PALV 的 CHUV、DAV 与 BCV 血清型参考毒株, 进行病毒的噬斑纯化。将纯化后的三个参考毒分别进行  $10^{-1}$  至  $10^{-7}$  连续 10 倍稀释, 每个稀释度按 50  $\mu$ L · 孔<sup>-1</sup> 的量, 接种 96 孔板培养的 BHK-21 细胞, 培养 6 d 观察 CPE, 采用 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID<sub>50</sub>。将自然感染 SZ/187、V106/YN/2014 与 V104/YN/2014 三个毒株动物的血清以 56 °C 灭活 30 min, 并以 1:20~1:640 连续倍比稀释备用。取 50  $\mu$ L 100 TCID<sub>50</sub> 的参考毒病毒液, 采用“固病毒-稀释血清”的方法测定感染动物血清的中和抗体效价; 采用交叉保护中和试验分析 CHUV、DAV 与 BCV 阳性血清之间是否存在交叉保护。

## 2 结果

### 2.1 中国 PALV 毒株的分离

2012 至 2016 年作者在我国云南省师宗县、广西壮族自治区马山市以及广东省汕头市送检的牛、羊血液样品中, 通过 PALV 的特异性 Real Time qRT-PCR 共计检测出 47 份阳性血液样品。取 PALV 核酸阳性血液以 BHK-21 细胞进行病毒的连续盲传分离, 在盲传的第 3~5 代, 细胞出现明显的细胞病变 (CPE), 表现为大量的贴壁细胞变圆与脱落 (图 1)。本研究共计分离出 19 株 PALV, 病毒分离信息见表 2。

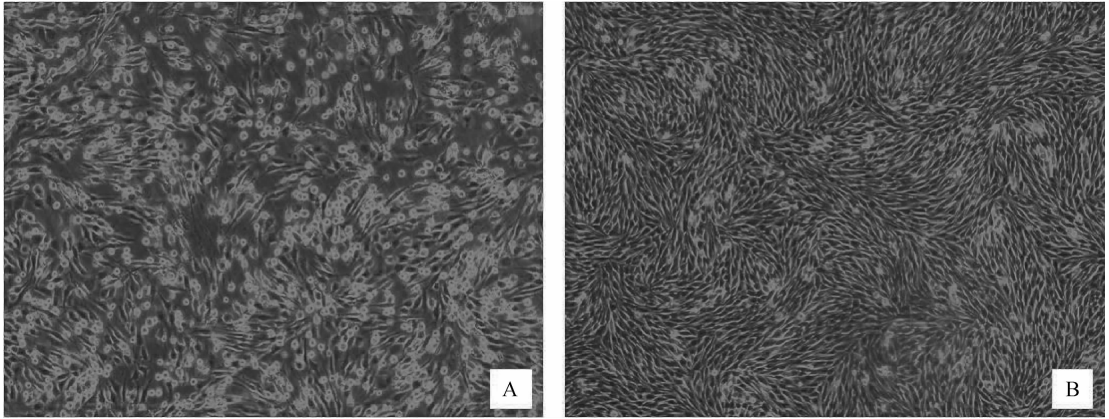
### 2.2 中国分离 PALV *Seg-7* 与 *Seg-2* 的扩增与序列分析

对 PALV 的 *Seg7* 序列比对显示, 中国分离的 19 株 PALV 的 *Seg-7* 核酸序列相似性在 97.9%~100%, 与中国台湾分离毒株相似性在 98.1%~99.1%, 与日本分离毒株相似度在 96%~97.4%, 与印度分离毒株的相似度在 93.9%~94.9%, 与澳大利亚和津巴布韦分离毒株的相似性最低, 在 83.8%~90.5%。

对 PALV 的 *Seg2* 序列比对结果显示, 本研究分离的 PALV 分属 CHUV、DAV 与 BCV 三种血清型 (表 2)。云南与广西分离的 13 株 CHUV 的 *Seg-*

2 核酸序列相似性在 99%~100%, 与日本分离 CHUV 毒株序列相似性在 96.2%~98.3%。云南分离的 3 株 DAV 的 *Seg-2* 核酸序列相似性大于 99.5%, 与日本分离 DAV 毒株相似性在 94.7%~

98.4%, 与澳大利亚和津巴布韦 DAV 毒株的相似性为 91%。云南与广东分离的 4 株 BCV 的 *Seg-2* 与日本分离 BCV 毒株核酸序列相似性均大于 99%, 与澳大利亚分离 BCV 毒株的相似性在 91%~92.2%。



A. 感染细胞; B. 对照细胞

A. Infected cells; B. Control cells

图 1 PALV 感染 BHK-21 细胞引起的 CPE

Fig. 1 CPE of BHK-21 cells caused by the infection of PALV

表 2 2012 至 2016 年我国分离 PALV 的分离信息

Table 2 Isolation information of Chinese PALV form 2012 to 2016

毒株号	病毒/血清型	分离动物	分离时间	分离地点
Strain No.	Virus/serotype	Isolated animal	Isolated time	Isolated site
SZ/187	PALV/CHUV	13 号牛	2012 年 8 月	云南省师宗县
V144/YN/2012	PALV/CHUV	14 号牛	2012 年 9 月	云南省师宗县
GX871	PALV/CHUV	水牛	2013 年 8 月	广西壮族自治区马山市
V104/YN/2014	PALV/BCV	10 号牛	2014 年 10 月	云南省师宗县
V145/YN/2014 <sup>B</sup>	PALV/BCV/CHUV	4 号牛	2014 年 9 月	云南省师宗县
V103/YN/2014	PALV/CHUV	5 号牛	2014 年 8 月	云南省师宗县
V101/YN/2014	PALV/CHUV	20 号牛	2014 年 8 月	云南省师宗县
V100/YN/2014	PALV/CHUV	4 号羊	2014 年 8 月	云南省师宗县
V099/YN/2014	PALV/CHUV	4 号羊	2014 年 8 月	云南省师宗县
V078/YN/2014	PALV/CHUV	20 号牛	2014 年 8 月	云南省师宗县
V098/YN/2014	PALV/CHUV	17 号牛	2014 年 9 月	云南省师宗县
V142/YN/2014	PALV/CHUV	19 号牛	2014 年 9 月	云南省师宗县
V106/YN/2014	PALV/DAV	4 号牛	2014 年 9 月	云南省师宗县
V141/YN/2014	PALV/CHUV	4 号牛	2014 年 9 月	云南省师宗县
V156/YN/2015 <sup>A</sup>	PALV/CHUV	水牛	2015 年 8 月	云南省红河州
V157/YN/2015 <sup>A</sup>	PALV/DAV	水牛	2015 年 8 月	云南省红河州
V256/GD/V2015	PALV/BCV	奶牛	2015 年 11 月	广东省汕头市
V203/YN/2016	PALV/DAV	牛	2016 年 8 月	云南省师宗县
V252/GD/V2016	PALV/BCV	奶牛	2016 年 1 月	广东省汕头市

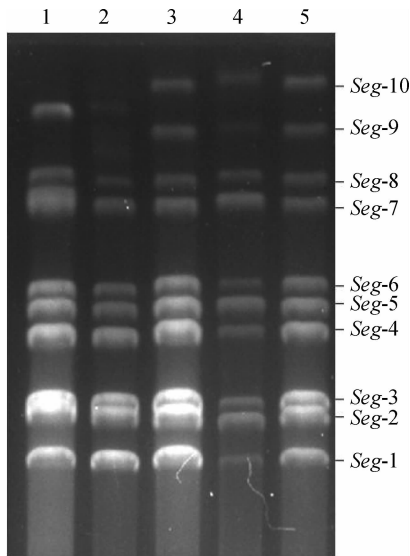
<sup>A</sup>. V156/YN/2015 与 V157/YN/2015 毒株分离自红河州送检血液样品, 而非监控动物; <sup>B</sup>. V145/YN/2014 同时含有 BCV 与 CHUV 两种血清型病毒

<sup>A</sup>. The V156/YN/2015 and V157/YN/2015 strains were isolated from blood samples of Red River State, not monitoring animals;

<sup>B</sup>. V145/YN/2014 contains two serotype viruses of BCV and CHUV

### 2.3 中国分离 PALV 的 dsRNA 电泳分析

基因组核酸电泳可用于初步判断基因组分节段 dsRNA 病毒的种类<sup>[20]</sup>。我们提取并纯化了 BTV、EHDV、CHUV、BCV、DAV 五种病毒的基因组 dsRNA,以 2% 的高分辨率琼脂糖进行电泳。结果如图 2 显示, PALV 的 CHUV、DAV、BCV 三种血清病毒 dsRNA 型电泳带型完全一致,呈现“3-3-4”的电泳带型特征,而 BTV 和 EHDV 呈现出“3-3-3”的电泳带型,与 PALV 基因组电泳带型有着明显的差异,这提示 PALV 的基因组节段大小与 BTV 和 EHDV 存在明显差异,可通过核酸电泳“带型”的差异对这三种病毒进行快速区分。



1. BTV; 2. EHDV; 3. BCV; 4. CHUV; 5. DAV

图 2 BTV、EHDV、BCV、CHUV、DAV 基因组 dsRNA 高分辨率琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 The high-resolution agarose gel electrophoresis result of genomic dsRNA of BTV, EHDV, BCV, CHUV and DAV

### 2.4 中国分离 PALV Seg-2 与 Seg-7 的系统发生树分析

不同血清型 PALV 的 Seg-7 显示出明显的地域特征(图 3),可分为四簇:来自中国、日本与印度的不同血清型 PALV 共同形成一个大簇,我们将其命名为“Asia Group”,来自澳大利亚的 PALV 可形成两个独立的簇,分别命名为“Australia Group 1”与“Australia Group 2”,而来自非洲津巴布韦的 PALV 形成另一独立的簇,命名为“Zimbabwe Group”。

不同血清型 PALV 分离毒株 Seg-2 的分子系统发育分析显示(图 4),中国 CHUV、DAV、BCV 三

种血清毒株与日本、澳大利亚分离对应血清型毒株聚为一簇。值得注意的是,在同一血清型毒株中, Seg-2 的序列也体现出了一定的地域性,日本与中国分离毒株聚为紧密的一簇,而来自澳大利亚的毒株形成一个独立于中国与日本毒株的分支。

### 2.5 中国分离 BCV、CHUV 与 DAV 毒株的免疫荧光分析

以实验室制备的兔抗 CHUV 阳性血清为一抗,对感染了 CHUV、BCV 与 DAV 的 BHK-21 细胞进行免疫荧光染色分析。结果如图 5 显示,制备的 CHUV 阳性血清可与病毒感染后细胞中产生的病毒蛋白发生特异性结合,使 BHK 细胞显现出特异性绿色荧光,而未感染病毒的对照细胞无荧光。

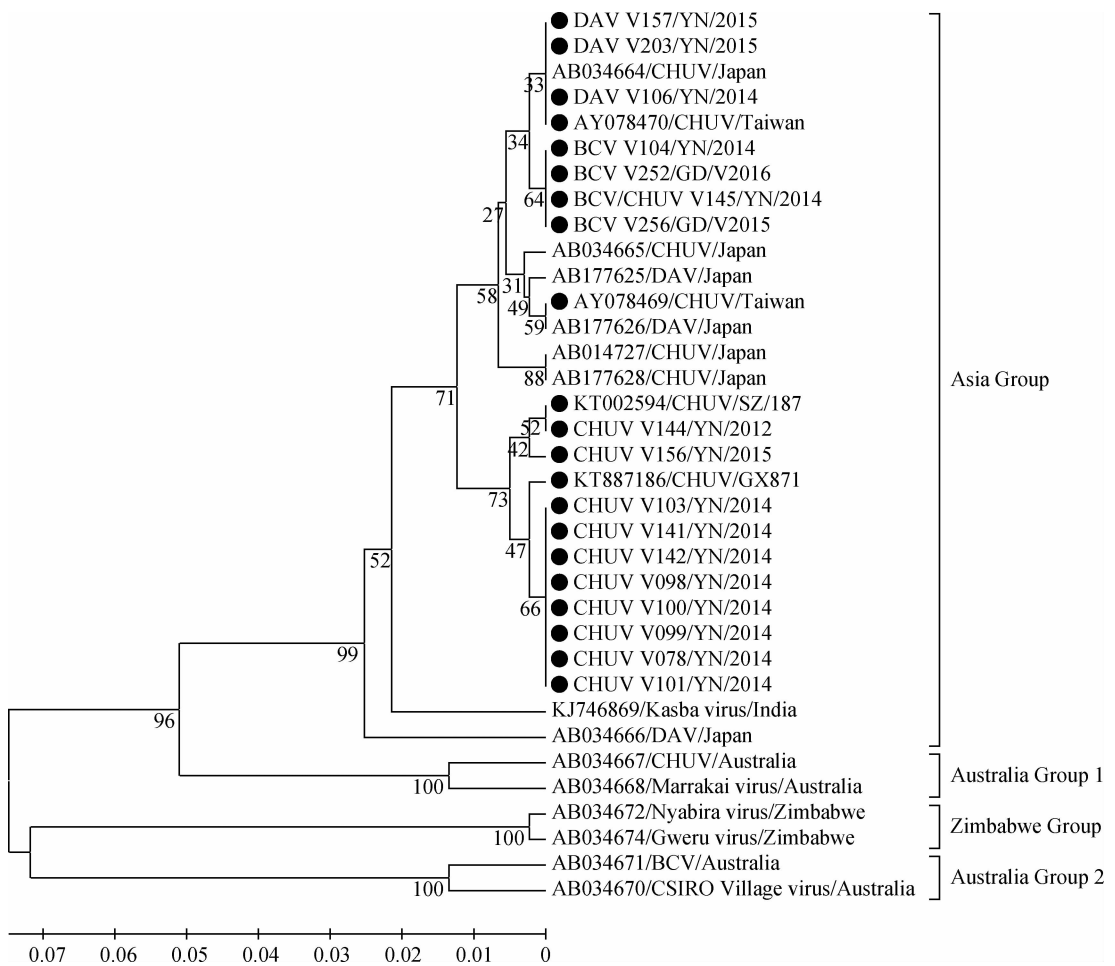
### 2.6 中国分离 BCV、CHUV 与 DAV 毒株的血清中和试验

自然感染 SZ/187、V106/YN/2014 与 V104/YN/2014 三个毒株的牛血清对 100 个 TCID<sub>50</sub> 的 CHUV、DAV 与 BCV 病毒液的中和抗体效价均在 1:160 以上,而 1:20 稀释的对照阴性血清对病毒液未产生中和作用,表明动物发生了对应血清型病毒的感染。交叉中和试验结果显示,CHUV、DAV 与 BCV 三个血清型的中和抗体之间无交叉中和保护作用。

## 3 讨论

PALV 广泛分布于热带与亚热带地区,非洲的几内亚、尼日尼亚、津巴布韦,大洋洲的澳大利亚,亚洲的中国台湾地区、印度、日本、韩国均有该病毒的分报道<sup>[1, 3-4, 8-9]</sup>。长久以来, PALV 在我国大陆地区的分布情况、与国外毒株之间的关系以及对动物的危害等问题一直不清楚。近 10 年来,由于全球气温升高等因素,新发和复发虫媒病毒病不断出现,对畜牧业生产和人类健康构成严重威胁<sup>[21]</sup>。为掌握我国牛、羊虫媒病毒的分布与流行特征,作者在我国云南、广西、广东、湖北、江苏、山西、新疆、内蒙古等 8 个省建立了牛、羊虫媒病毒鉴定点并设定了监控动物。自 2012 年首次从云南省的监控牛上分离出 CHUV 以来<sup>[17]</sup>,我们连续 5 年在云南、广西与广东省的监控动物上分离出 PALV,表明该病毒很可能广泛流行于我国南方地区。

我们从监控动物与送检血液样品中检出 47 份 PALV 核酸阳性血液样品,然而将这些阳性血液样品在 BHK-21 细胞上连续盲传却只分离出 19 株 PALV,仍有部分阳性血液未能分离出病毒。我们



图中●表示本研究中分离的 PALV 毒株及其他中国分离株

● represents the isolated PALV strains in this study and other Chinese isolates

图 3 邻近法构建的 PALV *Seg-7* 序列系统发育分析

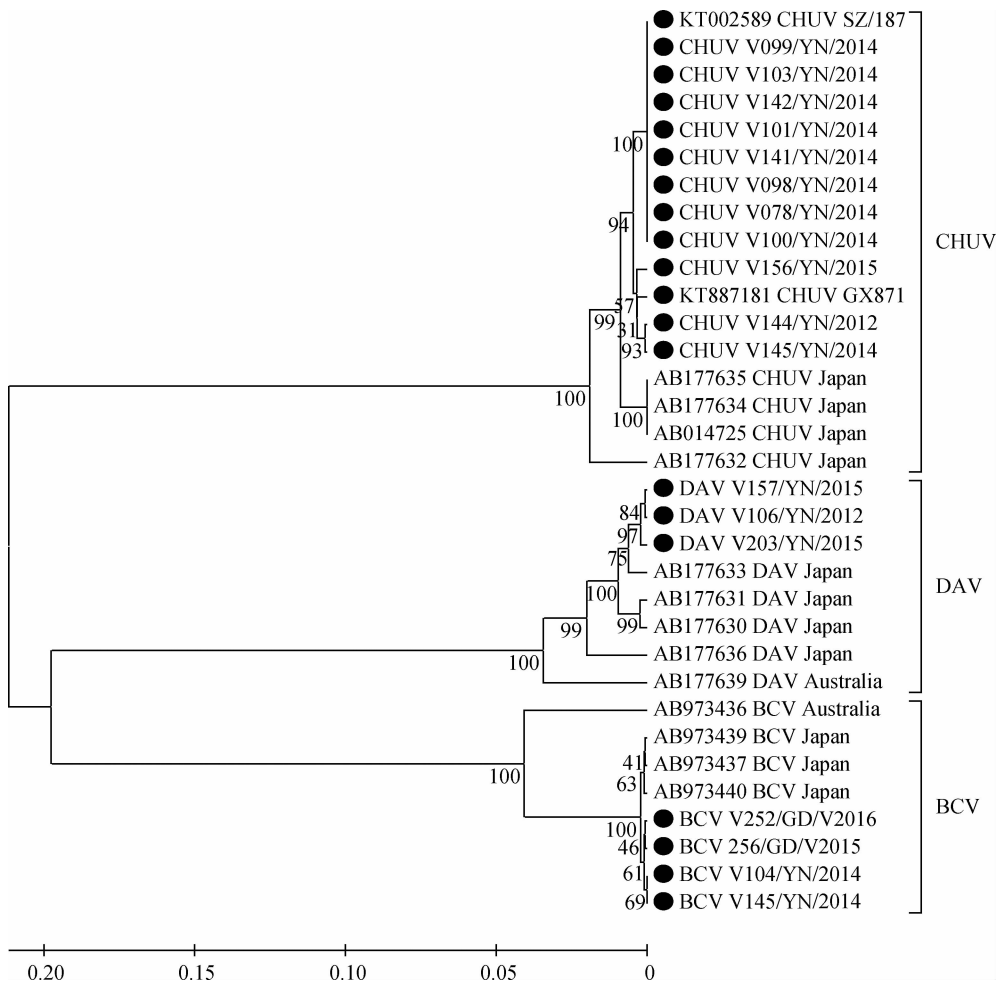
Fig 3 Phylogenetic analyses available *Seg-7* of PALV with Neighbor-joining method

认为可能有两方面的原因:(1)PALV 阳性血液在 BHK 细胞上盲传可能不是 PALV 最佳的分离方式。我们分离的第一株 PALV(SZ/187),通过将血液样本在 BHK-21 细胞连续盲传获得成功分离,因此后继大部分 PALV 的分离工作采用该方式进行。王芳(F. Wang)等<sup>[18]</sup>采用 C6/36 盲传 1 代而后继续在 BHK 细胞连续盲传的方式也从牛血液样品中分离到了 PALV 毒株,提示 PALV 可以采用不同的方式进行病毒分离,至于哪种分离方式对病毒分离效率最高,我们可以参考 BTV 的分离方式<sup>[22]</sup>进行比较与摸索,从而提高 PALV 的分离效率。(2)当感染动物产生了感染病毒的中和抗体以后,血液中抗体与病毒的结合将导致病毒对接种细胞的感染能力大幅下降<sup>[22]</sup>。这可能是我们虽然检测到 PALV 核酸阳性,但病毒分离失败的一个原因。通过 PALV

的动物感染试验,分析在不同的时间点感染动物血液中病毒核酸的水平、病毒中和抗体水平以及病毒成功进行分离之间的关系,可帮助选择最佳的时间点对监控动物进行采血,有效开展 PALV 的分离工作。

通过对 PALV 保守的 *Seg-7* 节段的测序与系统发育分析显示该基因节段体现出了明显的地域性。分离至中国、日本、印度三个国家的 PALV 聚为一个独立的“Asia Group”,而分离自澳大利亚与非洲的 PALV 则形成了各自单独的进化簇。这一方面表明 PALV *Seg-7* 节段的核酸序列可作为不同血清型 PALV 地域性(Topotype)判定的一个标准<sup>[15]</sup>,另一方面也提示中国、日本、印度三个国家的 PALV 有着最近的共有祖先。

对 BTV *Seg-2* 的系统发育分析表明<sup>[23-25]</sup>:不同血清型的 BTV 毒株可聚在一起形成一个基因型,



图中●表示本研究中分离的 PALV 毒株  
● represents the isolated PALV strains in this study

图 4 邻近法构建的 PALV *Seg-2* 系统发生树图

Fig 4 Phylogenetic analyses available *Seg-2* of PALV with Neighbor-joining method

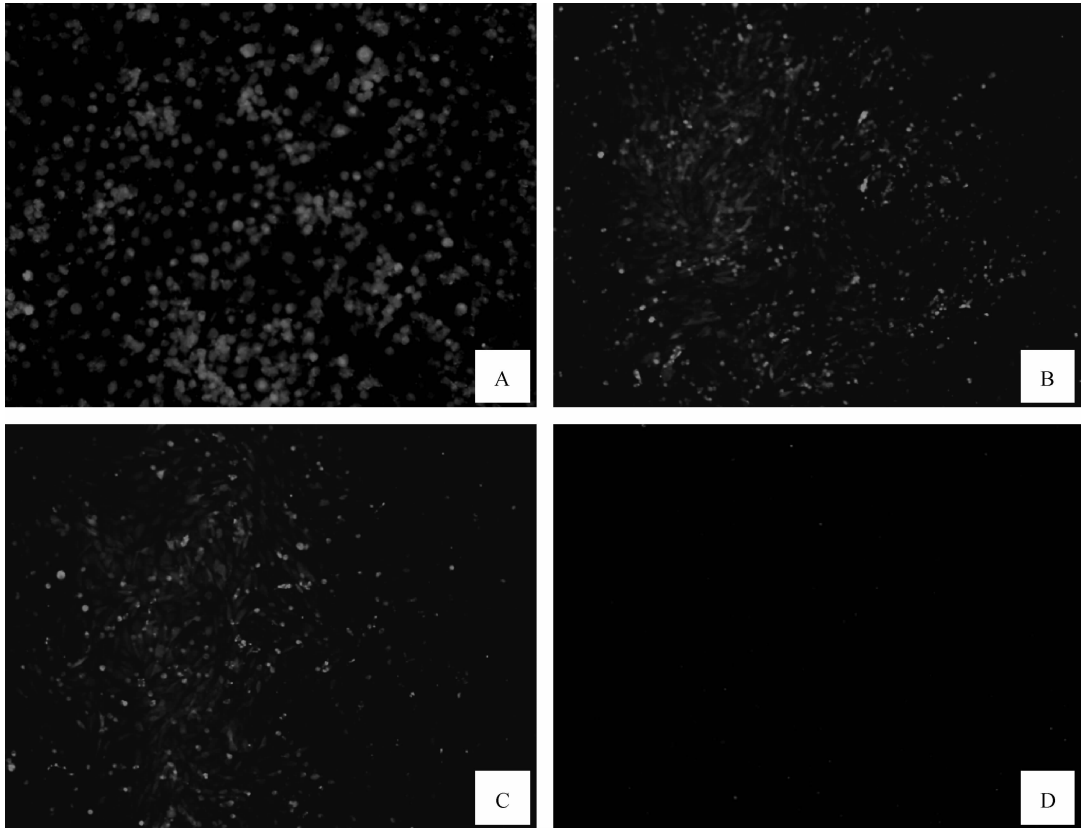
并据此将 BTV 27 个血清型分为 A~L 等十二个基因型;在同一个 BTV 血清型中,还可根据毒株分离地域的不同进一步分为“东方型”和“西方型”以及多个地域亚型。从本研究的结果来看,我们初步认为同一血清型 PALV 的 *Seg-2* 在一定程度上也体现了地域型的差异,但由于世界范围 PLAV 序列的缺乏,目前还难以确定 PALV 的 *Seg-2* 是否体现和 BTV 类似的进化特征。随着更多分离至亚洲、非洲与澳大利亚的不同血清型 PALV 毒株 *Seg-2* 的测序,将有助于我们从整体上进一步认知该病毒 *Seg-2* 与血清型之间的关系以及进化特征。

PALV *Seg-2* 与 *Seg-6* 编码的 VP2 与 VP5 蛋白共同决定着病毒的血清型,激发感染动物产生血清型特异性抗体,*Seg-7* 编码的 VP7 蛋白为 PALV 的群特异性抗原,诱导机体产生血清群特异性抗

体<sup>[3,11-13]</sup>。我们以制备的 CHUV 多克隆抗体对感染 CHUV、BCV 与 DAV 的细胞进行免疫荧光染色,虽然感染细胞都可产生特异性荧光,但 CHUV 的荧光强度明显强于 BCV 与 DAV。我们分析 CHUV 的阳性血清中既含有针对 VP7 的群特异性抗体,也含有针对 CHUV VP2 与 VP5 的特异性抗体,因此免疫荧光试验结果显示 CHUV 感染细胞的免疫荧光信号强,而对 BCV 与 DAV 感染细胞的荧光信号相对较弱。血清中和试验显示 CHUV、DAV 与 BCV 阳性血清之间无交叉中和活性进一步证实了这一点。试验结果提示获取 PALV VP7 蛋白的单克隆抗体是研究 PALV 群特异性血清/抗原诊断检测方法的首选<sup>[26]</sup>。

本研究报道了 2012—2016 年中国 PALV 的分离与 *Seg-2*、*Seg-7* 序列特征,并首次报道了 PALV





A. CHUV 感染细胞; B. BCV 感染细胞; C. DAV 感染细胞; D. 未感染 BHK 对照细胞

A. CHUV infected cells; B. BCV infected cells; C. DAV infected cells; D. Uninfected BHK cells

图 5 BHK-21 细胞感染 BCV、CHUV 和 DAV 72 h 后的免疫荧光观察结果

Fig 5 Immunofluorescence result of BHK-21 cells after infected respectively with BCV, CHUV and DAV for 72 h

的 DAV 与 BCV 两种血清型病毒在我国的分离。研究结果为我们进一步开展中国 PALV 的遗传学特征、感染与致病性、诊断方法的研究提供了材料。在下一步的研究中,我们将进行三方面的工作:(1)对中国分离的 PALV 代表毒株进行全基因组测序,获取中国分离 CHUV、BCV 与 DAV 代表毒株的遗传背景,分析病毒的变异特点以及毒株之间的基因重配<sup>[16]</sup>。(2)纯化出 PALV 病毒,建立 PALV 的血清学诊断方法,开展血清学调查。(3)开展不同血清型 PALV 毒株对牛羊等动物的感染特性与致病性分析,特别是研究动物发生多种血清型 PALV 感染或者与 BTV 混合感染时病毒的感染特性与致病性特点。

#### 4 讨 论

2012—2016 年在云南、广西、广东监控动物牛、羊血液中共计分离出 19 株 PALV,表明 PALV 流行于我国南方地区。对分离株的 *Seg-2* 序列分析与 BHK-21 细胞上的交叉中和试验结果显示,分离毒

株分属 Chuzan virus (CHUV)、D'Aguilar virus (DAV) 与 Bunyip Creek virus (BCV) 三种血清型,分别分离到 13、3 和 4 株, PALV 三种不同血清型的抗体之间无交叉保护作用。对 *Seg-7* 序列分析显示,该基因节段在不同血清型毒株间高度保守,基因序列的变异体出现明显的地域特征。首次报道了 DAV 与 BCV 两种血清型病毒在中国的分离。

#### 参考文献 (References):

- [1] WHISTLER T, SWANEPOEL R, ERASMUS B J. Characterization of Palyam serogroup orbiviruses isolated in South Africa and serologic evidence for their widespread distribution in the country[J]. *Epidemiol Infect*, 1989, 102(2): 317-324.
- [2] 刘胜利, 黄冠胜, 赵增连, 等. 动物虫媒病与检验检疫技术[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- LIU S L, HUANG G S, ZHAO Z L, et al. Animal vector-borne diseases and inspection & quarantine technology[M]. Beijing: Sciences Press, 2011. (in Chinese)

- [3] WHISTLER T, SWANEPOEL R. Characterization of potentially foetotropic Palyam serogroup orbiviruses isolated in Zimbabwe[J]. *J Gen Virol*, 1988, 69 (Pt 9): 2221-2227.
- [4] MIURA Y, GOTO Y, KUBO M, et al. Isolation of Chuzan virus, a new member of the Palyam subgroup of the genus *Orbivirus*, from cattle and *Culicoides oxystoma* in Japan[J]. *Am J Vet Res*, 1988, 49(12): 2022-2025.
- [5] TATEYAMA S, YAMAGUCHI R, UCHIDA K, et al. An outbreak of congenital hydranencephaly and cerebellar hypoplasia among calves in South Kyushu, Japan: a pathological study[J]. *Res Vet Sci*, 1990, 49(2): 127-131.
- [6] KIM Y H, KWEON C H, TARK D S, et al. Development of inactivated trivalent vaccine for the teratogenic Aino, Akabane and Chuzan viruses[J]. *Biologicals*, 2011, 39(3): 152-157.
- [7] HECHINGER S, WERNIKE K, BEER M. Evaluating the protective efficacy of a trivalent vaccine containing Akabane virus, Aino virus and Chuzan virus against Schmallenberg virus infection[J]. *Vet Res*, 2013, 44: 114.
- [8] LIM S I, KWEON C H, TARK D S, et al. Sero-survey on Aino, Akabane, Chuzan, bovine ephemeral fever and Japanese encephalitis virus of cattle and swine in Korea[J]. *J Vet Sci*, 2007, 8(1): 45-49.
- [9] KATO T, SHIRAFUJI H, TANAKA S, et al. Bovine arboviruses in *Culicoides* biting midges and sentinel cattle in southern Japan from 2003 to 2013[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(6): e160-e172.
- [10] OHASHI S, YOSHIDA K, YANASE T, et al. Analysis of intratypic variation evident in an Ibaraki virus strain and its epizootic hemorrhagic disease virus serogroup[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(10): 3684-3688.
- [11] STUART D I, GRIMES J M. Structural studies on orbivirus proteins and particles[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 309: 221-244.
- [12] YAMAKAWA M, FURUUCHI S, MINOBE Y. Molecular characterization of double-stranded RNA segments encoding the major capsid proteins of a Palyam serogroup orbivirus that caused an epizootic of congenital abnormalities in cattle[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(Pt 1): 205-208.
- [13] YAMAKAWA M, KUBO M, FURUUCHI S. Molecular analysis of the genome of Chuzan virus, a member of the Palyam serogroup viruses, and its phylogenetic relationships to other orbiviruses[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(Pt 4): 937-941.
- [14] WHISTLER T, SWANEPOEL R. Proteins of Palyam serogroup viruses[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71(Pt 6): 1333-1338.
- [15] YAMAKAWA M, OHASHI S, KANNO T, et al. Genetic diversity of RNA segments 5, 7 and 9 of the Palyam serogroup orbiviruses from Japan, Australia and Zimbabwe [J]. *Virus Res*, 2000, 68(2): 145-153.
- [16] OHASHI S, MATSUMORI Y, YANASE T, et al. Evidence of an antigenic shift among Palyam serogroup orbiviruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(10): 4610-4614.
- [17] YANG H, XIAO L, MENG J X, et al. Complete genome sequence of a Chuzan virus strain isolated for the first time in mainland China [J]. *Arch Virol*, 2016, 161(4): 1073-1077.
- [18] WANG F, LIN J, CHANG J T, et al. Isolation, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of the first Chuzan virus in China [J]. *Virus Genes*, 2016, 52(1): 138-141.
- [19] MAAN S, RAO S J, MAAN N S, et al. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses [J]. *J Virol Methods*, 2007, 143(2): 132-139.
- [20] 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.
- [21] SAEGERMAN C, BERKVENNS D, MELLOR P S. Bluetongue epidemiology in the European Union[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(4): 539-544.
- [22] CLAVIJO A, HECKERT R A, DULAC G C, et al. Isolation and identification of bluetongue virus[J]. *J Virol Methods*, 2000, 87(1-2): 13-23.
- [23] MAAN N S, MAAN S, BELAGANAHALLI M N, et al. 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.
- [24] MAAN S, MAAN N S, SAMUEL A R, et al. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88: 621-630.
- [25] MACLACHLAN N J. Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis[J]. *Prev Vet Med*, 2011, 102(2): 107-111.
- [26] YAMAKAWA M, FURUUCHI S. Expression and antigenic characterization of the major core protein VP7 of Chuzan virus, a member of the Palyam serogroup orbiviruses[J]. *Vet Microbiol*, 2001, 83(4): 333-341.