

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.6.01

中国山羊痘弱毒疫苗 AV41 株基因组 分子标记的比较分析

陆 游^{1,2}, 南文龙², 巩明霞², 李 林², 邹艳丽², 吴晓东², 彭大新^{1*}, 陈义平^{2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

[收稿日期]2021-01-27 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2021)06-0001-07 [中图分类号]S855.3

[摘 要] 为鉴别我国山羊痘病毒(GTPV)弱毒疫苗 AV41 株与牛结节性皮肤病病毒(LSDV)野毒株,运用生物信息学方法将 AV41 株基因组全序列与 GenBank 中已发表的 LSDV、GTPV 和绵羊痘病毒(SPPV)基因组进行比较,筛选 AV41 株基因组分子标记。采用我国不同厂家来源的 AV41 株疫苗测序验证分子标记相关序列,并与我国 LSDV 野毒株相应位置序列比较。结果显示,通过基因组比较分析共筛选获得分子标记 19 个,经测序确认其中 7 个为 AV41 株基因组独特分子标记,包括 DNA ligase 基因 2433A2434、Kelch-like protein 基因 1831A1832、GTPV_gp020 基因 G203A、GTPV_gp021 基因 C681T、DNA-binding virion core protein 基因 C47T、RNA polymerase subunit 基因 T64C 和 Myristylated protein 基因 C746A,而我国 LSDV 野毒株相应位置序列未见上述变化。本研究揭示了 AV41 株基因组独特分子标记分布情况,可用于我国牛结节性皮肤病疫情防控中与 LSDV 野毒株的分子鉴别。

[关键词] 山羊痘弱毒疫苗;牛结节性皮肤病;分子标记

Genomic Molecular Markers Comparative Analysis of Attenuated Goat Poxvirus Vaccine AV41 in China

LU You^{1,2}, NAN Wen-long², GONG Ming-xia², LI Lin², ZOU Yan-li²,
WU Xiao-dong², PENG Da-xin^{1*}; CHEN Yi-ping^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China)

Corresponding authors: PENG Da-xin, E-mail: pengdx@yzu.edu.cn; CHEN Yi-ping, E-mail: cyp777@163.com

Abstract: To distinguish Goatpox virus (GTPV) attenuated vaccine AV41 from wild-type Lumpy skin disease virus (WT-LSDV) in China, genomic molecular markers of AV41 were primitively analyzed using bioinformatics method from complete genomic comparative analysis of LSDV、GTPV and Sheeppox virus(SPPV) strains published

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0208602)

作者简介: 陆 游, 硕士研究生, 从事牛结节性皮肤病诊断与防控技术研究; 南文龙, 副研究员, 从事外来动物疫病诊断与防控技术研究。二人为共同第一作者。

通讯作者: 彭大新, E-mail: pengdx@yzu.edu.cn; 陈义平, E-mail: cyp777@163.com

in GenBank. Thereafter, sequences with relevant molecular markers were verified by sequencing AV41 from different manufacturers and comparing with corresponding positions of WT - LSDV genome. Nineteen molecular markers were successfully screened from genome of AV41. Seven of these markers were specific to AV41 after being further confirmed, including DNA ligase gene 2433A2434、Kelch - like protein gene 1831A1832、GTPV_gp020 gene G203A、GTPV_gp021 gene C681T、DNA - binding viron core protein gene C47T、RNA polymerase subunit gene T64C and Myristylated protein gene C746A, which were not observed in WT - LSDV. Systematically, this study implied the distribution of AV41 specific genomic molecular markers, which can be utilized for distinguishing AV41 from WT - LSDV during the epidemic prevention and monitor of Lumpy skin disease in China.

Key words: goatpox virus attenuated vaccine; Lumpy skin disease; molecular markers

牛结节性皮肤病(Lumpy skin disease, LSD)是一种由羊痘病毒属牛结节性皮肤病病毒(Lumpy skin disease virus, LSDV)引发的急性、亚急性传染病^[1]。该病临床表现为皮肤水肿及局部坚硬的结节、结痂或溃疡,怀孕牛流产,奶牛产奶量减少,公牛暂时或永久不育,商品牛的肉质或皮张利用率明显下降^[2-3]。2019 年 8 月, LSD 疫情首次发生于我国新疆伊犁州, 2020 年 6 月以来, 我国福建长汀、江西赣州、广东潮州、安徽黄山、浙江金华等地又确诊发生该疫情^[4]。世界动物卫生组织(OIE)将其列为法定报告的动物疫病, 农业农村部暂时将其作为二类动物疫病管理。

根据《牛结节性皮肤病防治技术规范》, 我国采用山羊痘弱毒疫苗 AV41 株, 按山羊的五倍剂量免疫牛来预防 LSD^[5]。但弱毒疫苗的使用可对 LSDV 野毒的诊断和监测产生干扰^[6-7]。当前尚无 AV41 株的特异性鉴别检测方法, 本研究拟筛选、验证 AV41 株基因组独特性分子标记, 为该疫苗株与我国 LSDV 野毒株的鉴别提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 毒株 山羊痘弱毒疫苗 AV41 株购自哈药集团生物疫苗有限公司、山东绿都生物科技有限公司, 山羊痘病毒 + 小反刍兽疫病毒二联弱毒疫苗(AV41 株 + Clone 9 株)购自华派生物工程集团有限公司。中国 LSDV 野毒株 LSDV/China/XJ2019 - 1 由中国动物卫生与流行病学中心分离鉴定。

1.2 试剂与仪器 磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司, PCR 扩增试剂 2 × Taq

Plus Master Mix(Dye Plus) 购自 Vazyme 公司, 毛细管电泳仪及 DNA Marker 购自 QIAGEN 公司, 引物由睿博兴科(青岛)有限公司合成。

1.3 病毒核酸提取 采用磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒, 提取中国 LSDV 野毒株和不同厂家来源的山羊痘弱毒疫苗 AV41 株的基因组 DNA, 厂家代号为 A、B、C。

1.4 基因组分子标记筛选 从 GenBank 中下载已有的全部 27 株 LSDV 基因组全序列(GenBank 登录号: MN995838.1、MT130502.1、MN642592.1、MN072619.1、KX894508.1、MH893760.2、KY829023.3、KY702007.1、KX683219.1、MT134042.1、MT643825.1、AF325528.1、AF409137.1、MH646674.1、MT992618.1、MN636843.1、MN636841.1、MN636840.1、MN636839.1、MN636838.1、MK4418381、MG972412.1、KX764645.1、KX764644.1、KX764643.1、AF409138.1、MT134042.1), 除 AV41 株以外全部 11 株 GTPV 基因组全序列(GenBank 登录号: MN072621.1、KC951854.1、MN072625.1、MN072624.1、MN072623.1、MN072620.1、KX576657.1、MW020570.1、AY077836.1、AY077835.1) 和全部的 12 株绵羊痘病毒(Sheep poxvirus, SPPV) 基因组全序列(GenBank 登录号: MN072631.1、MN072630.1、MN072629.1、MN072628.1、MN072627.1、MN072626.1、MW020571.1、AY077834.1、AY077833.1、AY077832.1、KT438551.1、KT438550.1)。利用生物信息学软件 BLAST 和 DNASTAR, 将 AV41 株基因组全序列(GenBank 登录号: MH381810.1) 逐段与上述 LSDV、GTPV、SPPV 基因组全序列进行比较, 分析筛选 AV41

株基因组分子标记。

1.5 测序验证 于 1.4 筛选的 AV41 株分子标记所在的基因两侧序列设计引物,采用 1.3 方法制备的 DNA 模板进行 PCR 扩增,对扩增产物测序,验证不同来源的 AV41 株相关分子标记位置的基因组序列,并与我国 LSDV 野毒株基因相比较,确认 AV41 株基因组独特分子标记存在及分布情况。

反应体系 25 μL : 2 $\times$ Vazyme Taq Plus Master Mix(Dye Plus) 12.5 μL , 上下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 核酸模板 2 μL , 无核酸酶水 8.5 μL 。

反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 6 min。PCR 反应结束, 利用毛细管电泳仪分析结果, PCR 产物送睿博兴科(青岛)有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 基因组分子标记筛选 将 AV41 株基因组全序列与 GenBank 数据库下载中的 27 株 LSDV、11 株 GTPV、12 株 SPPV 基因组全序列进行比较, 共筛选获得 19 个 AV41 株分子标记, 包含 4 个插入标记, 4 个缺失标记和 11 个单核苷酸多态性(SNP)标记(表 1), 而其余 LSDV、GTPV、SPPV 毒株基因组全序列对比结果中, 尚未发现上述 19 个标记。根据分子标记所在基因两侧序列设计引物(表 2), 其中, EEV maturation protein 基因采用两组引物扩增, 一组用于 G2261T 位点测序, 另一组用于 2285C2286 与 $\Delta\text{C2293} - 2294$ 两个位点测序。IL-1R 基因的 C582A 和 T571G 位点采用同一组引物进行扩增测序。

2.2 测序验证 以中国 LSDV 野毒株和不同厂家生产的 AV41 株的基因组 DNA 为模板, 对 2.1 中 19 个分子标记所在位置相应基因进行 PCR 扩增, 毛细管电泳显示, 扩增基因目的条带均与预期大小相符(图 1)。经测序验证, 并与 LSDV 野毒株基因组相关位置序列相比, 其中 7 个为 AV41 基因组独有的分子标记, 包括 2 个插入标记(DNA ligase 基因 2433A2434、Kelch-like protein 基因 1831A1832) 和 5 个 SNP 位点标记(GTPV_gp020 基因 G203A、GTPV_gp021 基因

C681T、DNA-binding viron core protein 基因 C47T、RNA polymerase subunit 基因 T64C 和 Myristylated protein 基因 C746A), 具体见表 1 与图 2。

3 讨论与结论

牛结节性皮肤病病毒与山羊痘病毒、绵羊痘病毒同为羊痘病毒属成员, 相互间基因组全序列同源性高达 95%^[8], 编码主要抗原的基因序列相近。因此, 采用同属同源或异源弱毒疫苗株进行免疫, 都可预防牛结节性皮肤病。国际上用于 LSD 免疫的同源疫苗株有 Neethling 株与 0240/KS-1 株, 异源疫苗株有 SPPV RM65 株与 Romanian 株, GTPV_Mysore 株与 Gorgan 株等。非洲、中东、巴尔干等 LSD 流行地区的防控经验显示, 采用弱毒疫苗免疫有效控制了该病的传播扩散^[9-10]。

分子生物学方法是鉴别野毒株与疫苗株的主要手段, 如荧光探针法和高分辨率熔解峰分析法(High-resolution melting, HRM) 等。Eirini 等根据 Neethling 株在 G 蛋白偶联趋化因子受体基因处插入的 12 bp 碱基, 设计了双重探针的荧光定量 PCR 方法, 可以区分 Neethling_vaccine_LW 疫苗株和 LSDV_Turkey_2014 等 9 种 LSDV 野毒株^[11]。Tesfaye 等基于 SPPV 疫苗株在 B22R 同源基因存在的 21 bp 与 27 bp 碱基缺失, 建立了 HRM 分析法, 可用于 SPPV Romanian 疫苗株等 4 种 SPPV 疫苗株与 LSDV_Evros/GR/15 等 4 种 LSDV 野毒株的鉴别^[12-13]。当前, 我国尚未开发或从国外引进 LSDV 同源疫苗株。山羊痘弱毒疫苗 AV41 株可用于免疫山羊和绵羊预防 GTPV 与 SPPV, 已有近 35 年使用经历, 证实其安全有效^[14-15]。该疫苗株也可作为我国预防 LSD 的异源弱毒疫苗使用。鉴别诊断方面, 聂福平等基于 LSDV 野毒株 ORF126 区域插入的 26 bp 碱基, 建立了检测 LSDV 野毒株的 TaqMan-MGB 荧光定量 PCR 方法, 仅特异性扩增 LSDV 野毒株相关基因, 而对异源疫苗 AV41 株无扩增信号^[16]。

目前, 国内尚无直接鉴别检测 AV41 株的方法。本研究将 AV41 株基因组全序列与 GenBank 中的 LSDV、GTPV 和 SPPV 毒株序列比较, 对中国 LSDV 野毒株和不同厂家生产的 AV41 株相关基因测序, 证实其中 7 个分子标记为 AV41 株独特性, 包

表 1 AV41 株基因组分子标记的筛选、比对与测序
Tab 1 Screening, alignment and sequencing of genomic molecular markers of AV41 strain

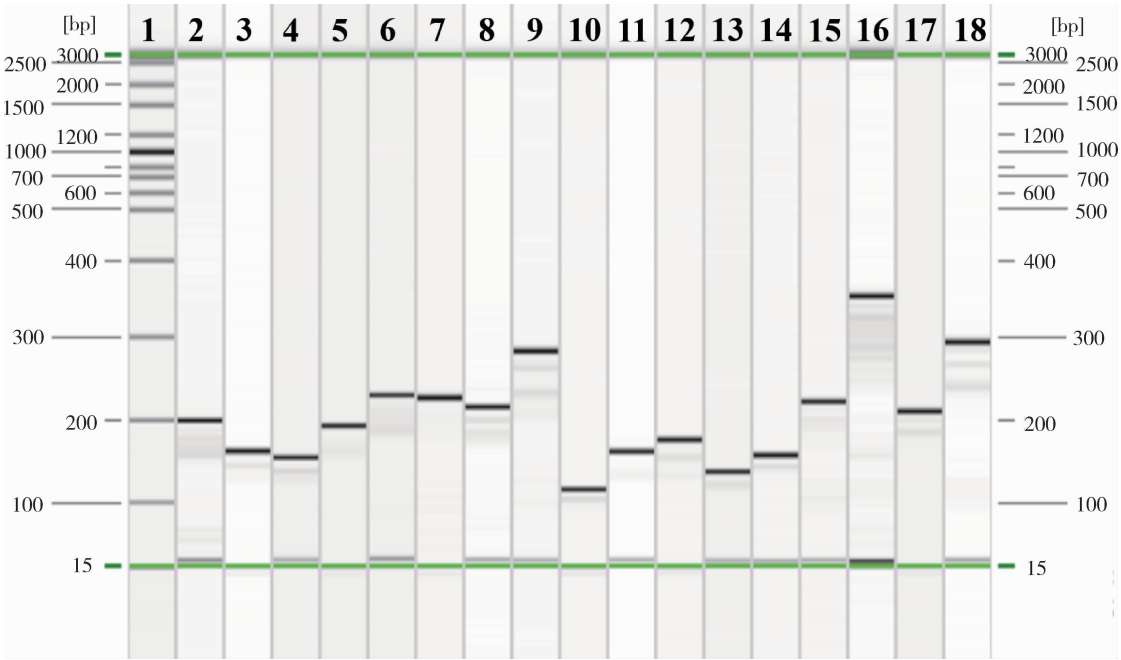
变化类型	基因名称	变化情况	基因组位置 (GenBank 序列号:MH381810.1)	是否为 编码区	基因组全序列对比结果						测序验证结果			
					GTPV AV41	27 株 LSDV	11 株 GTPV	12 株 SPPV	A 厂 AV41	B 厂 AV41	C 厂 AV41	WT - LSDV		
插入	GTPV_gp001	1366T1367	1530 位	否	T	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	EEV maturation protein	2285C2286	18284 位	否	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	DNA ligase	2433A2434	122371 位	否	A	—	—	—	A	A	A	—	—	—
	Kelch - like protein	1831A1832	136930 位	否	A	—	—	—	A	A	A	—	—	—
缺失	EEV maturation protein	ΔC2293 - 2294	18276 ~ 18277 位之间	否	—	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	Thymidine kinase(TK)	ΔTAT590 - 591	57094 ~ 57095 位之间	否	—	TAT	TAT	TAT	TAT	TAT	TAT	TAT	TAT	TAT
	Virion core protein	ΔGT2443 - 2444	40245 ~ 40246 位之间	否	—	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT	GT
	RING finger host range protein	ΔGI356 - 1357	133475 ~ 133476 位之间	否	—	G	G	G	G	G	G	G	G	G
SNP 位点	IL - 1R	C582A	2968 位	是	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	IL - 1R	T571G	2979 位	是	G	C/T	T	T	T	T	T	T	T	T
	GTPV_gp020	G203A	15453 位	是	A	G	G	G	A	A	A	A	A	A
	GTPV_gp021	C681T	15704 位	否	T	C	C	C	T	T	T	T	T	T
	EEV maturation protein	G2261T	18309 位	否	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	DNA - binding viron core protein	C47T	38809 位	是	T	C	C	C	T	T	T	T	T	T
	RNA polymerase subunit	T64C	49223 位	是	C	T	T	T	C	C	C	C	C	C
	Myristylated protein	C746A	52595 位	是	A	C	C	C	A	A	A	A	A	A
	GTPV_gp058	C354A	54528 位	是	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	GTPV_gp066	G272T	59371 位	是	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	Ankyrin - like protein	G147T	147767 位	否	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G

“—”：该分子标记处碱基缺失；WT - LSDV：中国 LSDV 野毒株；加粗：经测序验证为 AV41 独特性分子标记

表 2 AV41 分子标记测序验证用 PCR 引物

Tab 2 PCR primers for molecular marker sequencing verification of AV41

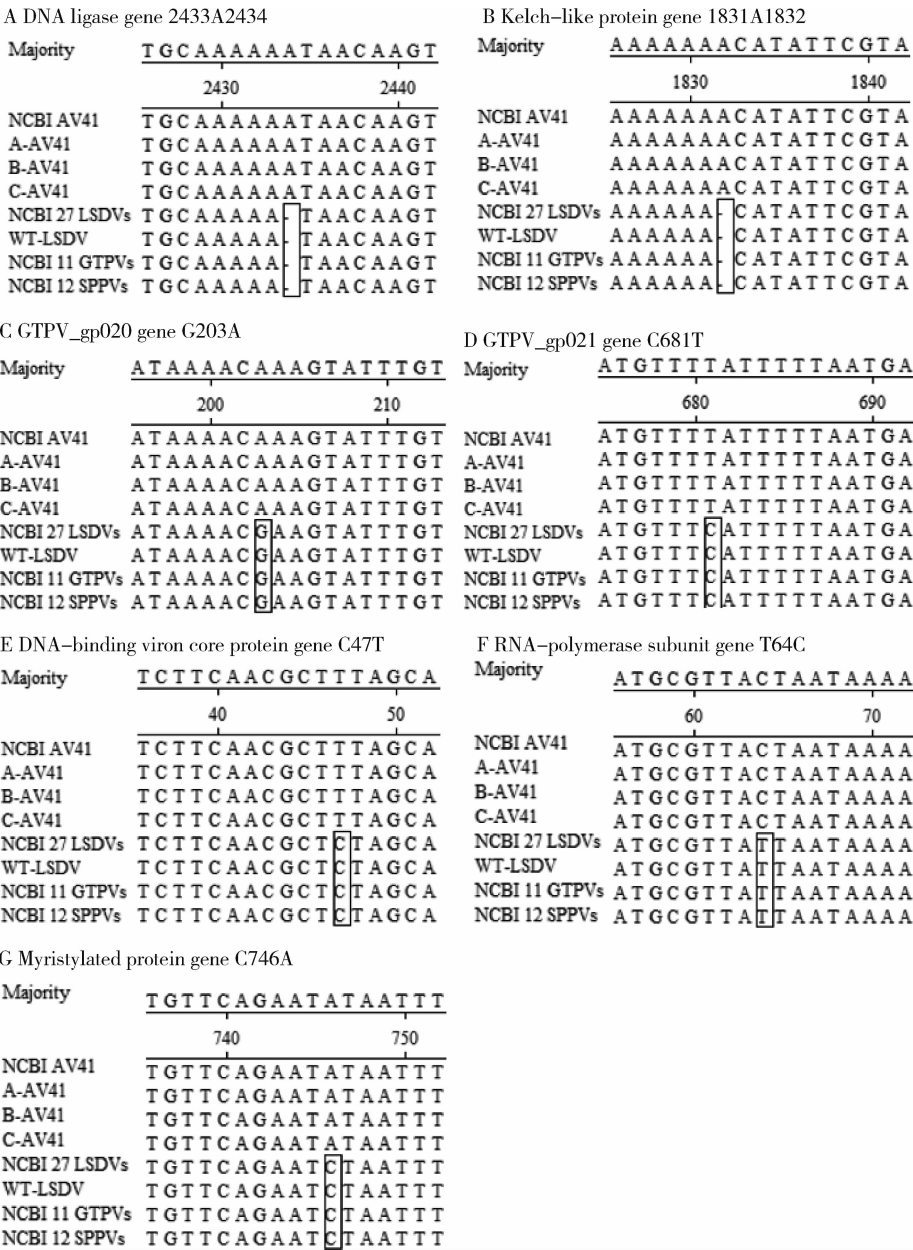
基因名称	上游引物(方向 5′-3′)	下游引物(方向 5′-3′)	片段大小/bp
GTPV_gp001	CACTAAATTTTACAGCTGAGCA	TCATACGTTGAGAGTGTAAGTTTTA	200
IL-1R	ATAAAATACCACTATCATCATGTGTT	AACAGTACATTGTATGGATATTGAC	163
EEV maturation protein	GGAGTATCTGGAATAAATAATTCAG	TACAGTTATAGGATTGTATTTGGTT	155
GTPV_gp058	CAACTGTGCGGTGCATATT	TTGAAAAGTTGCTAGTGACC	193
GTPV_gp066	AACCATATTGGATGTATGATAGG	TCATGCAAACGATCAGATG	230
Virion core protein	CGCGCTACCACTAACTATCATA	TAGAATCGACATTTGTATGTGCC	227
DNA ligase	CTACAGTAATGACAACACCGTTAT	CGGATCTGTTGAGACATTAACAG	216
GTPV_gp021	CTACTATTGCTGTTGTATGGCT	ATTCATCAACGATGTTCAATTGG	283
GTPV_gp020	GTAGTGCAAACACTATTATGTGC	ACCTACATAACGATTATCCAATGG	116
DNA-binding virion core protein	CTATTCTTTTAGCGAGTGGCTT	CTTAAATGGCGGATAATGACGAT	162
EEV maturation protein	GCCACTCATAATAAAATCTCCTTC	GTATTTGGTTAAATTAACACGAAAAATG	176
RNA polymerase subunit	TAGTTTGTTCAACATGCGGT	CTGTGTTGATAACTTTACTCTGC	137
Myristylated protein	GAGAGTGTGGGACCCAAATT	GCAAGACATACGTACACTAGATCC	158
TK	ACTCATCGGGGGTAAGGA	CTATCACCTTTAAGAAGTTCAACATTC	223
RING finger host range protein	GTGGTATAAAATTCGTCATGGATACC	TTCACTGTTTCTCTCCATCTA	353
Kelch-like protein	ACGTTGTGTGAATATGTGAGC	GGTTCATCATTAACGATACACCATA	211
Ankyrin-like protein	GAATCGTGTTACATTTCTATTTCATGAG	AACTTATCATTGCCCAAAAACTTC	293



1:15-3000bp Marker;2:GTPV_gp001 gene;3:IL-1R gene;4:EEV maturation protein gene (G2261T);5:GTPV_gp058 gene;
6:GTPV_gp066gene;7:Virion core protein gene;8:DNA ligase gene;9:GTPV_gp021 gene;10:GTPV_gp020 gene;
11:DNA-binding virion core protein gene;12:EEV maturation protein gene (2285C2286 + ΔC2293 ~ 2294);13:RNA polymerase subunit gene;
14:Myristylated protein gene;15:TK gene;16:RING finger host range protein gene;17:Kelch-like protein gene;18:Ankyrin-like

图 1 AV41 分子标记所在基因 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR amplification of marker genes of AV41



NCBI AV41、NCBI 27 LSDVs、NCBI 11 GTPVs、NCBI 12 SPPVs；NCBI 数据库中的 1 株 AV41、27 株 LSDV、除 AV41 外的 11 株 GTPV、12 株 SPPV 序列；A - AV41、B - AV41、C - AV41；不同厂家生产的 AV41；WT - LSDV；中国 LSDV 野毒株；
方框所示碱基为差异碱基；“-”：表示该处碱基缺失

NCBI AV41，NCBI 27 LSDVs，NCBI 11 GTPVs，NCBI 12 SPPVs；1 strain of AV41，27 strains of LSDV，11 strains of GTPV except for AV41 and 12 strains of SPPV in NCBI database；A - AV41，B - AV41 and C - AV41；AV41 strains produced by different manufacturers；WT - LSDV；wild - type LSDV in China. The bases shown in the box are different bases；" - "：base deletion

图 2 AV41 7 个独特分子标记所在基因序列对比

Fig 2 Sequence comparison of seven specific molecular markers for AV41

括 DNA ligase 基因 2433A2434、Kelch - like protein 基因 1831A1832、GTPV_gp020 基因 G203A、GTPV_gp021 基因 C681T、DNA - binding viron core protein 基因 C47T、RNA polymerase subunit 基因 T64C、Myristylated protein 基因 C746A。上述结果显示，所选分子标记可用于我国山羊痘弱毒 AV41 株和 LSDV

野毒株的病原鉴别,即对分子标记位置采用直接测序的方法,可鉴定为疫苗株或野毒株;或基于分子标记中的 SNP 位点,开发可用于区分相关 SNP 位点的荧光定量 PCR 方法;或基于插入位点,建立可区分野毒株与疫苗株不同熔解曲线峰图的高分辨率熔解峰分析法等。本研究可为我国 LSD 防控工作提供技术支持,也可进一步为山羊痘弱毒 AV41 株与国内山羊痘病毒、绵羊痘病毒野毒株的鉴别提供参考。

参考文献:

- [1] Lafar S, Zro K, Ennaji M M. Chapter 28 Capripoxvirus diseases: Current updates and developed strategies for control [M]. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. 2020;635 – 656.
- [2] OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019; Chapter 3. 4. 12. Lumpy skin disease [EB/OL]. [2020 – 12 – 20]. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.12_LSD.pdf.
- [3] Badhy S C, Chowdhury M G A, Settypalli T B K, *et al.* Molecular characterization of Lumpy skin disease virus (LSDV) emerged in Bangladesh reveals unique genetic features compared to contemporary field strains[J]. *BMC Veterinary Research*, 2021,17(1):1 – 11.
- [4] 农业农村部畜牧兽医局. 农业农村部畜牧兽医局关于浙江发生牛结节性皮肤病疫情有关情况的通报[EB/OL]. [2020 – 07 – 15]. www.xmsyj.moa.gov.cn/yqfb/202007/t20200715_6348686.htm.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Circular of animal husbandry and Veterinary Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs on the epidemic situation of Lumpy skin disease in Zhejiang Province[EB/OL]. [2020 – 07 – 15]. www.xmsyj.moa.gov.cn/yqfb/202007/t20200715_6348686.htm.
- [5] 李金明. 牛结节性皮肤病防治技术规范[J]. *兽医导刊*, 2020 (21): 4 – 5.
Li J M. Technical specification for prevention and treatment of Lumpy skin disease[J]. *Veterinary Orientation*, 2020(21): 4 – 5.
- [6] Biswas S, Noyce R S, Babiuk L A, *et al.* Extended sequencing of vaccine and wild - type Capripoxvirus isolates provides insights into genes modulating virulence and host range [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019,67(1):80 – 97.
- [7] Wolff J, Moritz T, Schlottau K, *et al.* Development of a safe and highly efficient inactivated vaccine candidate against Lumpy skin disease virus[J]. *Vaccines*, 2021, 9(1):1 – 30.
- [8] 张敏敏, 孙亚杰, 刘文兴, 等. 我国首次牛结节性皮肤病病毒的分离鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(10): 1 – 5.
Zhang M M, Sun Y J, Liu W X, *et al.* Isolation and identification of Lumpy skin disease virus from the first outbreak in China[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*. 2020, 42(10): 1 – 5.
- [9] Boshra H, Truong T, Nfon C, *et al.* Capripoxvirus – vectored vaccines against livestock diseases in Africa [J]. *Antiviral Research*, 2013, 98(2):217 – 227.
- [10] Gari G, Abie G, Gizaw D, *et al.* Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three Capripoxvirus vaccine strains against Lumpy skin disease virus[J]. *Vaccine*, 2015, 33(28): 3256 – 3261.
- [11] Agianniotaki E I, Chaintoutis S C, Haegeman A, *et al.* Development and validation of a TaqMan probe – based real – time PCR method for the differentiation of wild type Lumpy skin disease virus from vaccine virus strains [J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 249: 48 – 57.
- [12] Gelaye E, Mach L, Kolodziejek J, *et al.* A novel HRM assay for the simultaneous detection and differentiation of eight poxviruses of medical and veterinary importance [J]. *Scientific Reports*, 2017,7(42892):1 – 11.
- [13] Chibssa T R, Settypalli T B K, Berguido F J, *et al.* An HRM Assay to differentiate Sheeppox virus vaccine strains from Sheeppox virus field isolates and other Capripoxvirus species[J]. *Scientific Reports*, 2019,9(6646):1 – 9.
- [14] 何宇乾, 段笑笑, 刘枢清, 等. 羊痘病毒活载体疫苗研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(15):51 – 54.
He Y Q, Duan X X, Liu S Q. *et al.* Research progress of Capripoxvirus – vectored vaccines [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*. 2019(15):51 – 54.
- [15] Zhu Y, Li Y, Bai B, *et al.* Construction of an attenuated Goatpox virus AV41 strain by deleting the TK gene and ORF8 – 18[J]. *Antiviral Research*, 2018,157:111 – 119.
- [16] 聂福平, 孟向阁, 王 昱, 等. 牛结节性皮肤病病毒野毒株 TaqMan – MGB 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2019, 49(4): 403 – 409.
Nie F P, Meng X G, Wang Y, *et al.* Development of TaqMan – MGB real – time PCR for rapid detection of wild type Lumpy skin disease virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(4): 403 – 409.

(编辑:李文平)