

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.06.02

# 一株 1 型非洲马瘟疫疫苗毒种的初步鉴定

王静文,张敏,宋亚芬,张兵,张桂铭,王磊,苗清新,陈玲,杨承槐\*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-02-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 06-0009-06 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为做好非洲马瘟疫疫苗的储备性研究,以更好应对我国周边地区非洲马瘟疫传入风险,对中国兽医微生物菌种保藏管理中心的一株 1 型非洲马瘟病毒鼠脑组织毒进行了复壮和细胞适应性培养,并对其病毒含量、特异性、对小鼠毒力等进行测定。结果显示,该毒种在 Vero 细胞连续传代至 F10 代后病变产生明显,病毒含量可稳定在  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL 以上;对小鼠毒力表现稳定,细胞适应毒也可达  $10^{6.5}$  LD<sub>50</sub>/0.1 mL。根据 OIE 参考引物进行 RT-PCR 鉴定,序列比对证实该毒株为血清 1 型,与泰国毒株 THA2020/01 拥有 99.7% 的同源性。血清学试验结果表明,该毒株可被非洲马瘟 1 型特异性血清中和。本研究获得了一株 Vero 细胞适应毒,可作为良好的疫苗毒株候选株,适用于规模化生产,为疫苗储备奠定良好基础。

**[关键词]** 非洲马瘟病毒;血清 1 型;Vero 细胞;疫苗种毒

## Preparation and Primary Identification of One African Horse Sickness Virus Serotype 1 Vaccine Seed

WANG Jing-wen, ZHANG Min, SONG Ya-fen, ZHANG Bing, ZHANG Gui-ming,

WANG Lei, MIAO Qing-xin, CHEN Ling, YANG Cheng-huai\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: YANG Cheng-huai, E-mail: ychenghuai@163.com

**Abstract:** In order to better tackle with the risk of introduction of African Horse Sickness from neighboring countries and to maintain the vaccine emergency stockpile, one African Horse Sickness Virus (AHSV) serotype 1 vaccine seed was prepared by rejuvenation and adaptation in Vero cells, and its characteristics, viral titers, virulence in mice and specificity were determined. Results showed that this seed strain has a good characteristic. Virus titers could reach  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL, as well as the virulence in mice reaching  $10^{6.5}$  LD<sub>50</sub>/0.1 mL. Furthermore, sequence and alignment analysis indicated that the strain shares 99.7% homology of nucleotide sequence with isolate THA2020/01, and serum neutralization test showed that it could be neutralized by specific serum, suggesting this prepared culture could be a good candidate as a vaccine strain, laying the foundation for subsequent research.

**Key words:** AHSV; serotype 1; Vero; vaccine seed

**基金项目:** 国家重点研发计划“边境地区和重要口岸动物病原监测溯源技术研究及应用”(2021YFD1800504);中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项“非洲马瘟病毒毒种研究”(GY202030)

**作者简介:** 王静文,助理研究员,从事兽用生物制品检验工作。

**通讯作者:** 杨承槐。E-mail: ychenghuai@163.com

非洲马瘟是由非洲马瘟病毒 (African Horse Sickness Virus, AHSV) 引起的以马属动物为主的非接触性传染病, 以发热、皮下水肿及脏器出血为主要特征, 临床上多表现为急性或亚急性, 感染马匹的致死率最高可达 95%, 被 OIE 列为必须上报的动物传染病, 同时也是我国一类疫病中唯一的马属动物疫病<sup>[1]</sup>。我国是 OIE 认可的非洲马瘟无疫国, 历史上从未发生过非洲马瘟。2020 年 3 月以来, 泰国和马来西亚相继暴发非洲马瘟疫情, 已引起 500 多匹马匹死亡, 这不仅是时隔 60 年后亚洲地区再次发生非洲马瘟疫情, 也是在非洲大陆外首次出现血清 1 型 AHSV (AHSV - 1) 的流行<sup>[2-3]</sup>。随着国际贸易的深化和该疫情在东南亚地区的传播, 非洲马瘟传入我国的风险亦随之增大<sup>[4]</sup>。

为应对传入风险, 2020 年 3 月 28 日海关总署发布《关于泰国非洲马瘟传入的警示报通报》, 4 月 1 日海关总署联合农业农村部发布《关于防止泰国非洲马瘟传入我国的公告》(2020 年第 48 号)<sup>[5]</sup>, 同年 9 月 11 日, 海关总署再次联合农业农村部发布《关于防止马来西亚非洲马瘟传入我国的公告》(2020 年第 105 号)<sup>[6]</sup>。

2020 年 4 月 22 日, 农业农村部办公厅专门印发了《关于做好非洲马瘟防范工作的通知》(农办牧[2020]22 号), 要求各单位积极做好相关技术储备。中国兽药药品监察所负责组织开展有关非洲马瘟疫苗种毒匹配性分析, 并组织具备条件企业紧急生产、储备相应数量应急用疫苗<sup>[7]</sup>。由于无特效治疗性药物, 疫苗免疫是目前防控非洲马瘟最有效的方法。常见的商品化 AHSV 疫苗包括弱毒活疫苗和灭活疫苗。近年来随着生物技术的不断进步, 新型疫苗如核酸疫苗、病毒样颗粒疫苗、亚单位疫苗和活载体疫苗等的研发也取得了较大进展<sup>[8]</sup>。

虽然弱毒苗的使用存在着基因重组导致的遗传变异或是毒力返强的隐患, 但相对于灭活苗, 弱毒苗仍是目前防控非洲马瘟的生力军。且相对于多价苗, 单价苗能提供更有效的免疫保护, 特别对于单一血清型病毒流行的地区, 单价苗的应用更为重要。鉴于此, 根据计划安排, 我们对库存的一株 1 型非洲马瘟病毒疫苗株进行了扩繁和细胞适应性

研究, 并对其病毒含量、特异性、对小鼠毒力等方面做出初步鉴定。

## 1 材料

1.1 毒株 AHSV - 1 (AV1311 株) 由中国兽医微生物菌种保藏管理中心保存。

1.2 细胞 非洲绿猴肾细胞 (Vero)、仓鼠肾细胞 (BHK - 21), 由中国兽医微生物菌种保藏管理中心保存并提供。

1.3 试剂 DMEM 培养液、胰酶、胎牛血清购自 Gibco 公司; PBS 溶液购自北京中海生物有限公司; RNA 提取试剂盒和 RT - PCR 相关试剂购自 Takara 公司; 非洲马瘟 1 型阳性血清引进自 OIE 非洲马瘟参考实验室 Pirbright 研究所。

1.4 实验动物 昆明小鼠、豚鼠购自北京维通利华有限公司。

## 2 方法

2.1 毒种复壮 取一支 AHSV - 1 (M3 代, 鼠脑组织毒) 用无血清 DMEM 培养基进行 100 倍稀释后, 经脑内接种 18 ~ 22 g 小鼠, 0.05 mL/只, 共接种 18 只, 设接种生理盐水的阴性对照及不接种病毒的空白对照各 3 只。每日观察小鼠发病及死亡情况。及时解剖死亡小鼠并取其脑组织冻存。试验结束后, 将所有死亡小鼠的脑组织取出研磨, 保存于 -70 °C 备用。

2.2 细胞适应及传代 取 1 支 AHSV - 1 (M3 代, 鼠脑组织毒) 用无血清 DMEM 培养基进行 100 倍稀释, 接种 75 cm<sup>2</sup> 细胞瓶的 Vero 细胞, 每瓶 1 mL, 37 °C 孵育 1 h 后, 补加含 2% FBS 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每日观察, 无病变时每 120 h 进行一次盲传, 至出现 80% 细胞病变时收获, 反复冻融三次后, 再接种 Vero 细胞传代。收获的病毒液保存于 -70 °C 备用。

2.3 病毒含量测定 用无血清 DMEM 培养基进行 10 倍系列稀释, 取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 四个稀释度接种 96 孔板已长至良好单层的 Vero 细胞, 每个稀释度接种 5 孔, 每孔 0.1 mL, 同时设正常细胞对照组, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 120 h。观察到期后, 逐个观察每孔细胞病变情况, 按照 Reed - Muench 法进行病毒含量计算。

2.4 小鼠毒力测定 用无血清 DMEM 培养基进行 10 倍系列稀释,取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  四个稀释度脑内接种 18 ~ 22 g 小鼠,每个稀释度接种 5 只,每只接种 0.1 mL。连续观察 14 d 看是否出现死亡或神经症状等,按照 Reed - Muench 法计算  $LD_{50}$ 。

## 2.5 特异性试验

2.5.1 PCR 法 取 F2 代的细胞扩繁毒,按照 Takara 试剂盒说明书提取病毒 RNA 并进行反转录后,根据 OIE 推荐的参考引物,进行 PCR 扩增。引物序列(表 1)和扩增条件如下。

表 1 AHSV - 1 通用型和血清分型检测引物序列

Tab 1 Sequence of Universal primers and type - specific primer

引物名称	上游引物(5 pmol/μL)	下游引物(5 pmol/μL)
通用型引物	F: 5' - GTT AAA ATT CCG TTA GGA TG - 3'	R: 5' - GTA AGT GTA TTC GGT ATT GA - 3'
AHSV - 1 分型引物	F: 5' - GTT TAA TTC ACC ATG GCG TC - 3'	R: 5' - TGT TTG GCG ATA CAT CGT A - 3'

95 °C 5 min 预热后进行如下 30 个循环(94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min), 72 °C 8 min, 4 °C + ∞。在确定分型为 AHSV - 1 型的毒株基础上,扩增 VP7 基因 PCR 条件如下:95 °C 5 min 预热后,进行如下 30 个循环(94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 2 min), 72 °C 8 min, 4 °C + ∞。将条带正确的 PCR 产物送中美泰和有限公司进行测序。

2.5.2 血清中和实验 随机抽取 1 支 F25 代细胞适应毒,用细胞培养液稀释至 200 EID<sub>50</sub>/0.1 mL。取 1 mL 与等体积倍比稀释的非洲马瘟 1 型阳性血清混合,37 °C 作用 1 h(期间振摇 1 次),接种 5 孔长成单层的 Vero 细胞,每孔 0.1 mL,同时设置病毒对照组和空白对照组。置于 37 °C 孵育,观察记录 120 h 内出现 CPE 的孔数。

## 3 结果与分析

3.1 毒种复壮及细胞扩繁 经脑内接种 AHSV - 1 (M3 代)的昆明小鼠,在接种后 72 h 开始发病,主要表现为精神沉郁,食欲减退,弓背,呼吸微弱且出现明显的神经症状,剖检发现死亡及濒死小鼠脑组织可见严重出血,96 h 后小鼠全部死亡。收集死亡小鼠脑组织,制备一批鼠源基础种毒,小鼠发病症状和剖检情况见图 1。

病毒接种 Vero 细胞后盲传至第 5 代时,可在接种后 144 h 出现细胞病变,主要表现为细胞变圆、皱缩,开始脱落(图 2)。自第 6 代开始,孵育 120 h 后可出现细胞病变,继续传代至第 10 代后可稳定

在 48 ~ 72 h 内出现细胞病变。

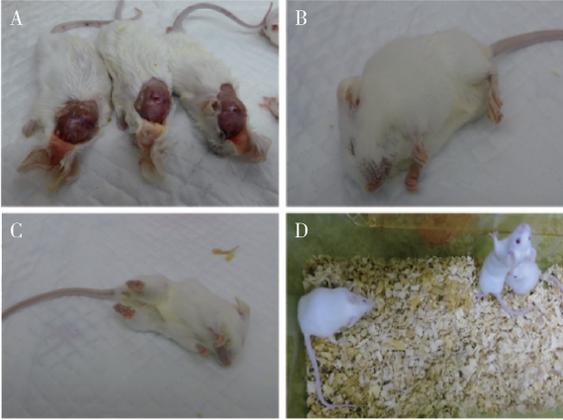
3.2 病毒含量测定 采用 Vero 细胞测定 AHSV - 1 不同代次毒种的病毒含量,结果显示 F10、F15、F20 代病毒含量分别为  $10^{6.5}$ 、 $10^{6.5}$  和  $10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL,符合《OIE 陆生动物诊断试验与疫苗手册》中对非洲马瘟疫苗病毒含量的要求。

3.3 对小鼠毒力测定结果 AHSV - 1 细胞扩繁毒 F10、F15、F20 代对小鼠的半数致死量分别为  $10^{6.5}$ 、 $10^{6.8}$  和  $10^{6.5}$  LD<sub>50</sub>/0.1 mL,鼠源基础种毒对小鼠的半数致死量为  $10^{7.8}$  LD<sub>50</sub>/0.1 mL。

3.4 特异性分析结果 根据群特异性引物,可扩增得到约 229 bp 的 AHSV - 1 型特异性条带(图 3),同时以该毒株为模版,扩增 VP7 基因可得到长度为 1179 bp 的条带(图 4)。测序结果经 Blast 比对发现,该毒株与 AHSV 1180 株(基因序列号为 KP009718)同源性达 99.47%,同为血清 1 型,与 2020 年泰国暴发的疫情病原核苷酸同源性可达 96.47%。血清学试验亦表明,该病毒可被非洲马瘟 1 型阳性血清完全中和,特异性良好。

## 4 讨论

2022 年 3 月 30 日,OIE 宣布我国浙江省杭州市桐庐县为无规定马属动物疫病区,这对于提升我国在全球动物卫生领域的影响力具有重要意义<sup>[9]</sup>,也对我国防控非洲马瘟提出了更高要求。因无特效治疗性药物,疫苗免疫成为防控非洲马瘟最有效的方法<sup>[10-11]</sup>。



A. 脑内出血症状;B. 精神沉郁、弓背;

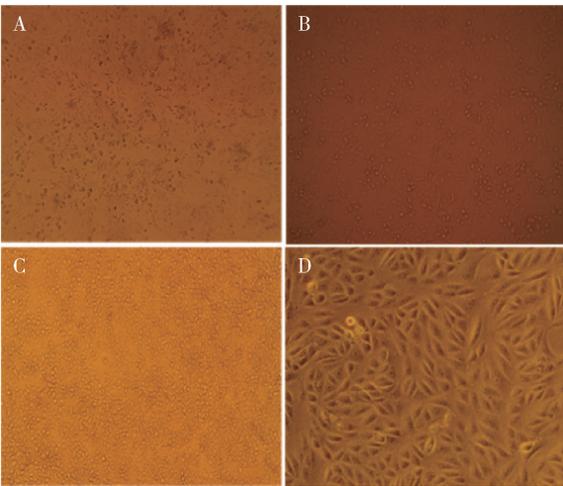
C. 强直等神经症状;D. 接种生理盐水对照

A. Intracerebral hemorrhage; B. Depression and hunched back;

C. Muscle Rigidity; D. Negative Control with saline

图 1 脑内接种小鼠临床症状

Fig 1 Clinical signs in inoculated mice



A. F3 代 48 h Vero 细胞病变;B. F10 代 48 h Vero 细胞病变;

C. F15 代 48 h Vero 细胞病变;D. 正常细胞对照

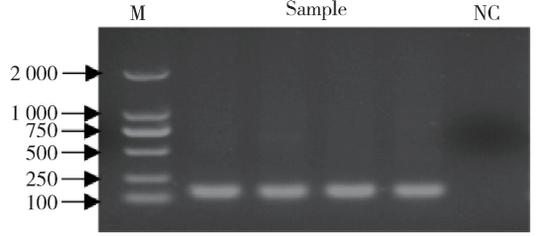
A. 48 h CPE of F3 - passage; B. 48 h CPE of F10 - passage;

C. 48 h CPE of F15 - passage; D. Normal Control

图 2 AHSV 在 Vero 细胞上引起的细胞病变 (1000 ×)

Fig 2 CPE in Vero cell caused by AHSV

常见 AHSV 疫苗主要包括弱毒活疫苗和灭活疫苗。20 世纪 80 年代末,商品化灭活疫苗曾被广泛用于西班牙、葡萄牙和摩洛哥等地的疫情防控,但因生产成本高、安全风险大等原因,目前已停产<sup>[12]</sup>。AHSV 弱毒苗研究始于 20 世纪 30 年代的

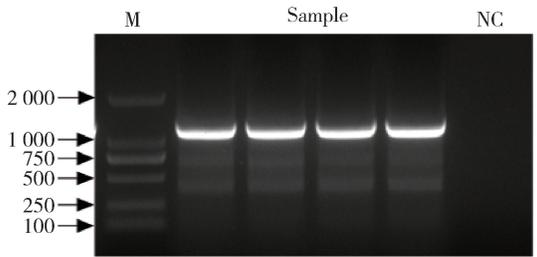


M: Marker; Sample: AV1311 - M3/F10/F15/F20;

NC: Negative control

图 3 分型 PCR 电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of type - specific gel - based RT - PCR



M: Marker; Sample: AV1311 - M3/F10/F15/F20;

NC: Negative control

图 4 VP7 基因扩增 PCR 电泳图

Fig 4 Electrophoretogram of VP7 - gene amplification

南非,通过将多株 AHSV 在小鼠脑内进行约 100 次连续传代,成功获得嗜神经性人工致弱毒株,并利用其制备了多价弱毒苗。试验结果证明,这种嗜神经性毒株制备的弱毒苗可诱导较高滴度的中和抗体<sup>[8]</sup>。20 世纪 60 年代之后,利用细胞培养的疫苗毒逐渐取代了上述弱毒苗,并在中东及北非等地区广泛应用。20 世纪 90 年代,南非生产的两种 4 价弱毒苗(一种含 1、3、4、5 型抗原,另一种含 2、6、7、8 型抗原)对非洲地区的非洲马瘟起到了有效的防控作用。然而,有报道称 5 型 AHSV 可对动物产生不良影响甚至导致其死亡,因此基于安全考虑,含 5 型病毒的弱毒苗于 20 世纪 90 年代初停止使用。南非 OBP 公司生产的多价疫苗是最为经典的非洲马瘟弱毒苗,多年来在南非等地广泛使用<sup>[13]</sup>。该弱毒苗由两种疫苗构成,即疫苗 I 和疫苗 II。疫苗 I 含 1、3、4 型抗原;疫苗 II 含 2、6、7、8 型抗原,

免疫程序为用疫苗 I 对动物进行首免,3 周后用疫苗 II 对其进行二免。各国通常针对本国疫情流行特点制定相关单价苗或多价苗的免疫策略,对于单一血清型病毒流行的地区,单价苗的应用更为重要<sup>[14]</sup>。

AHSV 共有 9 个不同的血清型,之间存在一定的交叉反应。为做好紧急防控,此次疫苗种毒扩繁和鉴定工作主要围绕 AHSV-1 展开。本试验所用原始毒株为中监所老专家于 1960 年代从国外引进,年代久远,其来源背景和病毒活性等情况不是很清楚,且引进毒均为鼠脑组织毒,不便于疫苗的大规模生产。我们经小鼠脑内接种复壮后,证明病毒具有繁殖活性,且选用 18~22 g 体重区间的小鼠,潜伏期更短,出现症状更快。在细胞驯化试验中也采用了鼠源细胞 BHK-21 作为对比。虽然病毒在 BHK-21 细胞上的增殖速度较 Vero 细胞更快,出现病变时间也更早,但考虑到 BHK-21 细胞存在致瘤性问题,我们仍选择在 Vero 细胞上进行病毒鉴定的后续研究。不同代次病毒含量测定结果表明,病毒含量随着代次增高趋于稳步提升,且该 Vero 细胞适应毒对小鼠也能保有相应的毒力。

AHSV 属于呼肠孤病毒科,环状病毒属,其基因组由 10 个双链 RNA 片段组成,编码 7 种结构蛋白(VP1~VP7)和 4 种非结构蛋白(NS1、NS2、NS3 和 NS3a),其中 VP7 是形成内衣壳的主要蛋白,相对比较保守;VP2 蛋白变异性最高,有 15 个抗原位点,是主要的血清型特异性抗原。RT-PCR 检出率高、特异性强,且快速便捷,是 OIE 推荐的检测方法<sup>[15-16]</sup>。赵文华等基于 AHSV L2 片段设计了型特异性引物,可对 9 个血清型进行分型,基于 S7 片段设计了 2 对引物,可检测出 6 种血清型(2、3、4、7、8 和 9)的 AHSV<sup>[17]</sup>。此外,荧光定量 RT-PCR 法也逐步建立,如赵文华等根据 VP7 蛋白 ORF 全长建立的“三步法”,可对全部 9 个血清型扩增<sup>[18]</sup>;高志强等建立了 VP7 蛋白和 NS2 蛋白的双重 Taqman 荧光定量法,灵敏度更高,有效降低漏检率<sup>[19]</sup>。本实验中,我们采用的是 OIE 推荐的通用型引物和自行设计的型特异性引物,建立了 AHSV

通用型及分型分子鉴别方法,经扩繁的鼠源毒和细胞毒验证具有良好的敏感性和特异性,可用于毒种的快速鉴别检验。Napawan Bunpapong 等使用纳米孔测序技术对 8 株 2020 年泰国分离株分析发现,所有毒株在 95V、166S 和 660I 位置都含有独特的氨基酸,提示传入泰国的毒株为同一分支<sup>[20]</sup>。经比对 VP7 基因保守区域发现,该毒株与泰国疫情毒株的 VP7 蛋白只有一个氨基酸的差异,氨基酸同源性达 99.7%,可作为一株良好的疫苗毒株候选株。

需要特别说明的是,因 AHSV 的特殊性,所有试验均经主管部门审批后,严格在 ABSL-3 实验室按照生物安全要求操作,严防病毒的泄漏或扩散<sup>[21]</sup>。非洲马瘟虽不属于人兽共患病,但亦有报道显示一种疫苗毒株可导致人的脑炎和视网膜炎<sup>[22]</sup>。下一步拟按照《OIE 陆生动物诊断试验与疫苗手册》中关于疫苗毒种的要求,采用蚀斑技术对该毒种进行克隆纯化,并评价其安全性与免疫原性,以进一步完善生产用毒种的鉴定;同时开展 RT-PCR 和 ELISA 抗体检测方法研究,为建立我国高风险地区乃至整个亚太地区非洲马瘟快速预警和监测机制提供技术支撑。

## 参考文献:

- [1] World Organization for Animal Health(OIE) Terrestrial Manual 2019 [M].
- [2] Webinar #2: AHS diagnostic tests and possible support from the OIE Reference Laboratories[EB/OL][2020-02-23]. [https://rr-asia.oie.int/wp-content/uploads/2020/04/ahs-webinar-2\\_ahs-diagnosis-oie-reflabs\\_ruben-villalba-martinez-carrie-batten-1.pdf](https://rr-asia.oie.int/wp-content/uploads/2020/04/ahs-webinar-2_ahs-diagnosis-oie-reflabs_ruben-villalba-martinez-carrie-batten-1.pdf).
- [3] King S, Rajko-Nenow P, Ashby M. Outbreak of African horse sickness in Thailand [J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2020(67): 1764-1767.
- [4] Lu G, Pan J, Ou J, et al. African horse sickness: its emergence in Thailand and potential threat to other Asian countries [J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2020, 67(5): 1751-1753.
- [5] 海关总署. 农业农村部公告 2020 年第 48 号[EB/OL]. 2020. Announcement No. 48 of General administration of Customs and

- Ministry of Agriculture and Rural Affairs in 2020 (Announcement on preventing African horse sickness disease from spreading into China from Thailand).
- [6] 海关总署, 农业农村部公告 2020 年第 105 号 [EB/OL]. 2020. Announcement No. 105 of General administration of Customs and Ministry of Agriculture and Rural Affairs in 2020 (Announcement on preventing African horse sickness disease from spreading into China from Malaysia).
- [7] 农业农村部. 农业农村部关于印发《关于做好非洲马瘟防范工作的通知》[EB/OL]. 2020. Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Notice of the Ministry of Ministry of Agriculture and Rural Affairs on Printing and Distributing “Precaution of African Horse Sickness Disease” [EB/OL]. 2020.
- [8] Dennis S, Meyers A, Hitzeroth I, *et al.* African horse sickness: a review of current understanding and vaccine development [J]. *Viruses*, 2019, 11: E844.
- [9] 世界动物卫生组织认可中国浙江省杭州市桐庐县无规定马属动物疫病区 [EB/OL] [2022-02-23]. <https://www.oie.int/en/what-we-offer/self-declared-disease-status/>. Recognition of Establishment of Equine Disease - Free Zone (EDFZ) in Tonglu, Hangzhou, Zhejiang province in China by OIE. [EB/OL] [2022-02-23]. 2022 <https://www.oie.int/en/what-we-offer/self-declared-disease-status/>.
- [10] Carpenter S, Mellor P S, Fall A G, *et al.* African horse sickness virus: history, transmission, and current status [J]. *Annual Review of Entomology*, 2017(62): 343-358.
- [11] Paillot R. Special issue “equine viruses”: old “friends” and new foes? [J]. *Virus*, 2020(12):153.
- [12] Mellor P S, Hamblin C. African Horse Sickness. [J]. *Veterinary Research*, 2004, 35: 445-466.
- [13] Weyer C T, Grewar J D, Burger P, *et al.* African horse sickness caused by genome reassortment and reversion to virulence of live, attenuated vaccine viruses, South Africa, 2004-2014 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22: 2087-2096.
- [14] Contingency plan for exotic notifiable diseases of animals in England [EB/OL]. <https://www.gov.uk/government/publications/contingency-plan-for-exotic-notifiable-diseases-of-animals-in-england>.
- [15] Zientara S, Sailleau C, Moulay S, *et al.* Application of the polymerase chain reaction to the detection of African horse sickness viruses [J]. *Journal of Virological Methods*, 1995, 53: 47-54.
- [16] Guthrie A J, Maclachlan N J, Joone C, *et al.* Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horse sickness virus [J]. *Journal of Virological Method*, 2013, 189(1): 30-35.
- [17] 赵文华, 杨仕标, 王金萍, 等. 非洲马瘟病毒分型 RT-PCR 检测方法的研究 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(2): 43-47. Zhao W H, Yang S B, Wang J P, *et al.* Study on development of serotype-specific RT-PCR technology for detection of AHSV [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(2): 43-47.
- [18] 赵文华, 杨仕标, 王金萍, 等. 非洲马瘟病毒群特异性 RT-PCR 检测方法的研究 [J]. *生物技术通报*, 2011(4): 204-207. Zhao W H, Yang S B, Wang J P, *et al.* Development of RT-PCR method for detection of AHSV [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(4): 204-207.
- [19] 高志强, 张鹤晓, 乔彩霞, 等. 非洲马瘟病毒 VP7 和 NS2 双重荧光 RT-PCR 检测技术的建立与应用 [J]. *中国动物检疫*, 2013, 30(4): 34-38. Gao Z Q, Zhang H X, Qiao C X, *et al.* Development and application of duplex real-time RT-PCR assay for the detection of VP7 and NS2 of African horse sickness virus [J]. *China Animal Health Inspection*, 2013, 30(4): 34-38.
- [20] Bunpapong N, Charoenkul K, Nasamran C, *et al.* African horse sickness virus serotype 1 on horse farm, Thailand, 2020. [J]. *Transboundary and Emerging Disease*, 2021, 27(8): 2208-2211.
- [21] Robin M, Page P, Archer D, *et al.* African horse sickness: the potential for an outbreak in disease-free regions and current disease control and elimination techniques [J]. *Equine Veterinary Journal*, 2016, 48(1): 659-669.
- [22] Swanepoel R, Erasmus B J, Williams R, *et al.* Encephalitis and chorioretinitis associated with neurotropic African horse sickness virus infection in laboratory workers. Part III. Virological and serological investigations [J]. *South African Medical Journal*, 1992, 81: 458-461.