



## 兔出血症病毒 2 型理化特性研究

陈婉婷<sup>1#</sup>, 周明忠<sup>2#</sup>, 陈斌<sup>2</sup>, 张鹏飞<sup>1</sup>, 姜睿姣<sup>1</sup>, 曾红梅<sup>1</sup>, 涂藤<sup>1</sup>, 陈弟诗<sup>2</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>

<sup>1</sup>四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

<sup>2</sup>四川省动物疫病预防控制中心, 四川 成都 610041

<sup>3</sup>动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

**摘要:**【目的】本研究旨在研究该病毒的理化特性, 评价不同处理条件对RHDV2的杀灭效果。【方法】本研究拟对临床疑似RHDV2感染致死的家兔进行RT-PCR鉴定病原, 并利用不同pH值、不同温度、常用兽用消毒剂、不同浓度甲醛处理RHDV2, 通过PMA-RT-qPCR对病毒理化特性进行研究。【结果】经RT-PCR检测与测序分析, 确诊为RHDV2感染, 该毒株VP60基因序列与GenBank中RHDV2 (登录号: MN276176.1)一致性为98.35%。PMA-RT-qPCR结果表明, RHDV2对酸碱、高温、兽用消毒剂、甲醛均表现不同程度的敏感性。酸碱处理病毒, 随pH值降低或升高, 病毒杀灭率均有提高。65 °C处理病毒30 min后, 病毒杀灭率可达77.61%, 83 °C处理5 min后, 病毒杀灭率可达95.10%。RHDV2对3种所测兽用消毒剂均敏感, 其中聚维酮碘对RHDV2杀灭作用最好, 作用30 min后, 病毒杀灭率达88.78%。0.3%甲醛的杀灭率优于0.2%甲醛, 作用30 min后, 其杀灭率可达82.22%。【结论】本研究探究了RHDV2的理化特性, 该病毒对酸碱、高温、兽用消毒剂、甲醛均有不同程度的敏感性。本研究为RHDV2的诊断、临床消毒剂的选择提供了参考依据, 为该病毒致病机理研究与疫苗研发奠定基础。

**关键词:** 兔出血症病毒 2 型, 理化特性, PMA-RT-qPCR, 消毒

兔出血症病(rabbit hemorrhagic disease, RHD), 又称兔瘟、兔出血症、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。经典 RHDV 呈二十面体对称球形, 是一种无囊膜的单股正链 RNA 病毒<sup>[1-2]</sup>。该病毒于 1984 年首次在我国江苏无锡等地暴发<sup>[3]</sup>, 2 月龄

基金项目: 四川省科技计划

#共同第一作者。

\*通信作者。E-mail: yaanwangyin@tom.com

收稿日期: 2020-05-28; 修回日期: 2020-08-11; 网络出版日期: 2020-12-11

以下的吮乳兔或幼兔对本病有较强的抵抗力,不表现出临床症状,而2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<sup>[4-5]</sup>。该病潜伏期短、发病急、传播快,给全国养兔业造成了巨大的经济损失。

2020年4月,我国四川省某养兔场发生疑似RHDV疫情,感染率为42.86%,死亡率高达为100%。经红细胞凝集试验、RT-PCR及测序分析等,确定该病原为兔出血症病毒2型(RHDV2),这是我国首次发现RHDV2型毒株。不同于经典RHDV<sup>[5-6]</sup>,除成年兔外,RHDV2也可感染致死幼兔与亚成年兔<sup>[7-8]</sup>,病死兔病理变化主要表现为气管充盈血色泡沫,肝脏肿大、边缘梗死,脾脏淤血、边缘钝圆,肺脏弥漫性出血等。RHDV2的感染病例由法国于2010年4月首次报道<sup>[9]</sup>,导致家养和野生兔群的大面积感染和死亡。在不到一年的时间内,RHDV2迅速席卷南欧(葡萄牙、意大利和西班牙等),北欧和一些岛屿如亚速尔群岛。2015年,RHDV2在澳大利亚、非洲与其他欧洲国家被发现,次年在加拿大被发现,并继续在欧洲传播。6年后,RHDV2在美洲和大洋洲相继出现<sup>[10]</sup>。严重影响世界各国养兔业发展,同时导致全球野兔种群数量的急剧减少,给生态平衡带来严重的负面影响。

经典RHDV组织灭活疫苗对RHDV2的感染仅有有限保护作用<sup>[11]</sup>,目前尚无有效防控措施。可通过发病兔群日龄、病死率与临床表现作出初步判断,经实验室检测确诊。应立即扑杀发病兔群,阻止感染面积的扩大,同时对养殖场环境、

圈舍、物料等进行全面消毒处理。本研究拟对四川省某兔场疑似RHDV2感染病死兔进行RT-PCR检测及测序分析。并结合PMA-RT-qPCR探究RHDV2理化特性。叠氮溴化丙锭(PMA)是一种与核酸具有高度亲和性的光反应染料<sup>[12]</sup>,可嵌入核酸分子并被强可见光激活修饰核酸,进而阻断目的基因的PCR扩增。由于PMA不能穿透病毒衣壳,因此以其处理含有失活病毒和仍具复制能力病毒的样品时,可修饰失活病毒(衣壳结构破坏)核酸,结合PCR可实现对样品中具有复制能力病毒的定性定量检测<sup>[13]</sup>。本研究结论可为RHDV2致病机理研究、疫苗研发提供参考材料和理论依据,为临床生产中饲料制粒工艺优化、高效消毒剂与疫苗灭活剂选择提供指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 病料样品来源为2020年4月四川省某兔场疑似RHDV2感染的病死兔(20-60日龄)。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 病毒基因组RNA提取试剂盒购自于宝生物工程(大连)有限公司;2×*Taq* PCR Master Mix、2×SYBR Green *Pro Taq* HS Premix、反转录试剂盒购自于湖南艾科瑞生物工程有限公司;叠氮溴化丙锭(PMA)购自 Biotium 公司;其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.3 引物序列:** PCR和qPCR引物参考本实验室已建立的方法<sup>[14]</sup>(表1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体积(20 μL)包含10 μL的2×SYBR Green *Pro Taq* HS Premix或2×*Taq* PCR Master Mix,每种引物(F/R) 1 μL (10 μmol/L), 2 μL模板, ddH<sub>2</sub>O补足20 μL。

表 1. 引物序列与退火温度  
Table 1. Primer sequences and annealing temperature

Primers	Primer sequences (5'→3')	Annealing tempe/°C	Fragment/bp
RHDV2-PCR-F	GGGTGTCATATCCACCCCAA	53.0	441
RHDV2-PCR-R	CCCAGGTTGAACACGAG		
RHDV2-qPCR-F	ACTCTACTRAACAATTACTC	55.4	101
RHDV2-qPCR-R	ATCAACTCAAGCCAAG		

## 1.2 病死兔剖解及样品处理

在严格生物安全条件下对送检病死兔进行解剖, 采集心脏、肺脏、脾脏、肝脏和肾脏用于提取病毒 RNA。

## 1.3 RNA 的提取与 cDNA 合成:

取病变组织, 按宝生物技术有限公司病毒 RNA 提取试剂盒说明书进行操作, 提取病毒 RNA, -80 °C 备用。以提取的 RNA 作为模板, 使用反转录试剂盒获得 cDNA 于 -20 °C 保存备用。

## 1.4 RT-PCR 与 RT-qPCR 检测

以上述反转录获得的 cDNA 作为模板, 以 RHDV2-PCR-F/R 引物进行扩增。反应结束后, 取 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的条带, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果用 BLAST 比对分析。核酸阳性样品以 RHDV2-qPCR-F/R 引物进行 qPCR 检测, 验证该引物的特异性。

## 1.5 病毒液的制备

含 RHDV2 肝脏和脾脏组织, 研磨成匀浆并反复冻融 3 次。用无菌 0.22 μm 滤头过滤制成病毒液, 分装后于 -80 °C 保存。

## 1.6 病毒片的制备

制备大小为 10 mm×10 mm 的无菌方形滤纸片若干作为吸附介质, 平铺于无菌平皿内, 逐片滴加病毒液, 滴加量为 10 μL/片。用接种环涂匀

整个介质表面, 置室温下自然阴干后备用。

## 1.7 RHDV2 对酸碱敏感性

用 50 μL HCl (pH=1、pH=3)或 NaOH 溶液 (pH=10、pH=13)均匀滴加于病毒片表面, 静置 30 min 后, 取病毒片于含 500 μL 无菌蒸馏水的离心管中振荡离心, 取 200 μL 备用, 每样重复 3 组。

## 1.8 RHDV2 对热敏感性

将病毒片置于离心管中, 经 65 °C 处理 30 min, 85 °C 处理 30 s、1 min、2 min、3 min 后, 分别置于含 500 μL 无菌蒸馏水的离心管中振荡离心, 取 200 μL 备用, 每处理重复 3 组。

## 1.9 RHDV2 对兽用消毒剂敏感性

将病毒片置于一次性无菌培养皿中, 用 50 μL 过硫酸氢钾(0.5%)、聚维酮碘(0.1%)、75%酒精, 均匀滴加于病毒片表面, 作用 30 min 后, 收集病毒片于含 500 μL 无菌蒸馏水的离心管中, 取 200 μL 备用, 每样重复 3 组。

## 1.10 RHDV2 对不同浓度甲醛的敏感性

用 50 μL 0.2%、0.3%甲醛分别均匀滴加于病毒片表面, 作用 30 min 后, 收集病毒片于含 500 μL 无菌蒸馏水的离心管中, 取 200 μL 备用, 每样重复 3 组。

## 1.11 PMA 处理样品与 RHDV2 PMA-RT-qPCR 检测

200 μL 各处理组样本, 分别加入 10 μL PMA

染液(至终浓度 2 mmol/μL), 1500 r/min, 离心 10 min。再置于暗室孵育 15 min。将所有管置于冰上, 在 500 W 卤素灯下照射 15 min 后保存备用。使用病毒基因组 RNA 提取试剂盒提取上述各处理组样品的病毒 RNA, 用于 RT-qPCR 检测。

### 1.12 数据分析

统计归纳各组 RT-qPCR 检测所得拷贝数, 并对拷贝数做 log 转换处理。计算各处理病毒杀灭率(公式 1)。

$$\text{病毒杀灭率} = [1 - 10^{(\text{试验组病毒拷贝数 log copies/mL} - \text{阴性对照组病毒拷贝数 log copies/mL})}] \times 100\% \quad (1)$$

## 2 结果和讨论

### 2.1 病毒 RNA 提取与核酸检测

用引物 RHDV2-PCR-F/R 扩增 *VP60* 基因序列, 产物经琼脂糖凝胶电泳可见在 441 bp 左右有一特异性扩增条带(图 1), 产物测序后经 BLAST 比对分析, 结果显示, 目的片段基因序列与 GenBank 中 RHDV2 *VP60* 基因(登录号: MN276176.1)的一致性为 98.35%。

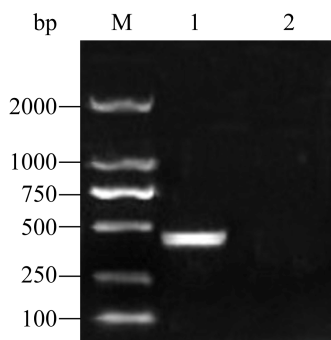


图 1. RHDV2 *VP60* PCR 扩增结果

Figure 1. PCR detection of RHDV2 *VP60* gene. M: DNA marker DL2000; 1: RHDV2 *VP60* amplification target band; 2: negative control.

组织病料提取 RNA 进行 RT-qPCR 检测, 结果表明, RHDV2 为阳性, 经典 RHDV、兔巴氏杆菌、欧洲褐兔综合征病毒(European brown hare syndrome virus, EBHSV)均为核酸阴性<sup>[15]</sup>(图 2-A、B)。

### 2.2 RHDV2 对酸碱敏感性

用不同 pH 值的酸碱处理病毒片后, 提取病毒 RNA 并进行 PMA-RT-qPCR 检测, 每处理重复 3 组, 计算病毒拷贝数均值以及病毒杀灭率。结果表明, RHDV2 对酸碱均敏感, 随 pH 值降低或升高, 病毒杀灭率均有提高(表 2)。RHDV2 对盐酸(pH=3)与氢氧化钠溶液(pH=10)敏感性较低, 随 pH 值降低或升高, 病毒杀灭率均有提高。与经典 RHDV 相比, RHDV2 同样对酸碱有一定的耐受力<sup>[16]</sup>。在实际生产应用中, 盐酸(pH=1)或氢氧

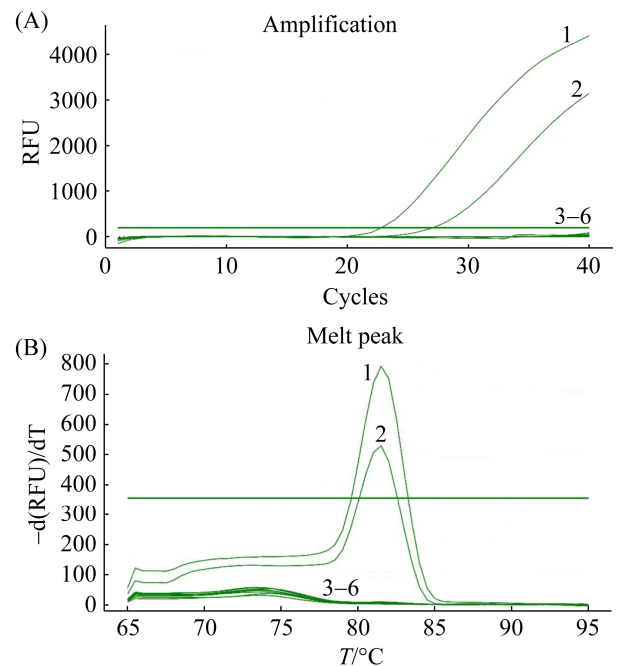


图 2. RHDV2 扩增曲线与熔解曲线

Figure 2. RHDV2 amplification curve and dissolution curve. A: amplification curve; B: dissolution curve. 1: pMD19T-RHDV2-*VP60*; 2: diseased tissue material for testing; 3-6: negative control (pMD19T), pMD19T-RHDV441, pGM-T-EBSHV, *Pasteurella multocida*.

表 2. RHDV2 对酸碱敏感性

Table 2. The sensitivity of RHDV2 to acid or alkali

Treatment	Log (Mean copy number)	Inactivation rate/%
HCl (pH=1)	3.95	95.32
HCl (pH=3)	4.37	88.78
NaOH (pH=10)	4.83	66.12
NaOH (pH=13)	4.4	87.98

化钠溶液(pH=13)可用于养殖场内环境(如地面、圈舍、沟渠等)与外环境(养殖场外围、公路等)的消毒,但在使用后需注意对废液的中和处理,以免影响环境。

### 2.3 RHDV2 对热敏感性

病毒片置于无菌离心管,经 65 °C 处理 30 min, 85 °C 处理 30 s、1 min、2 min、3 min 后,提取病毒 RNA 并进行 PMA-RT-qPCR 检测,每处理重复 3 组,计算病毒拷贝数均值以及病毒杀灭率。结果表明,两种试验温度均对 RHDV2 有杀灭作用,65 °C 处理毒片 30 min 后,病毒杀灭率可达 77.61%。用 83 °C 处理毒片,病毒杀灭率随时间的延长而升高,处理时间延长至 3 min 对病毒的杀灭率有大幅度提升(表 3)。在实际饲料生产中,调制与制粒过程(80–83 °C)不仅可以杀灭细菌<sup>[17]</sup>,也能对原料中可能存在的 RHDV2 有杀灭作用,生产中针对消除 RHDV2 潜在威胁的制粒工艺优化可考虑适当延长作用时间。

### 2.4 RHDV2 对兽用消毒剂敏感性

用不同兽用消毒剂处理病毒片后,提取病毒 RNA 并进行 PMA-RT-qPCR 检测,每处理重复

表 3. RHDV2 对热敏感性

Table 3. The sensitivity of RHDV2 to heat

Treatment	Log (Mean copy number)	Inactivation rate/%
65 °C, 30 min	4.63	77.61
83 °C, 1 min	4.65	76.56
83 °C, 3 min	4.22	92.41
83 °C, 5 min	4.06	95.10

3 组,计算病毒拷贝数均值以及病毒杀灭率。结果表明,试验所用 3 种消毒剂对 RHDV2 的杀灭率均在 80%以上,其中聚维酮碘对 RHDV2 杀灭作用最好,病毒杀灭率高达 88.78%;75%乙醇其次,杀灭率可达 84.51%;0.5%过硫酸氢钾杀灭率为 80.05% (表 4)。据此,在生产中可选择高效且成本可控的消毒剂。

### 2.5 RHDV2 对不同浓度甲醛的敏感性

用两种浓度甲醛处理病毒片后,提取病毒 RNA 并进行 PMA-RT-qPCR 检测,每处理重复 3 组,计算病毒拷贝数均值以及病毒杀灭率。两种浓度的甲醛对病毒都有杀灭作用,0.3%甲醛的杀灭率优于 0.2%甲醛,杀灭率可达 82.22% (表 5)。甲醛是灭活疫苗生产中常用的灭活剂<sup>[18]</sup>,适当浓度的甲醛灭活病毒后,病毒抗原性、血凝性均不改变,故常用于灭活疫苗的制备。其作用浓度为 0.1%–0.8%,需 37–39 °C 处理 24 h 以上。鉴于经典 RHDV 组织灭活疫苗对 RHDV2 的感染仅有有限的保护力,故需研发针对 RHDV2 的有效疫苗。本研究结果表明,甲醛可有效灭活 RHDV2,可用于疫苗制备。

表 4. RHDV2 对兽用消毒剂敏感性

Table 4. The sensitivity of RHDV2 to disinfectant for animals

Treatment	Log (Mean copy number)	Inactivation rate/%
0.5% potassium peroxymonosulfate	4.58	80.05
0.1% povidone iodine	5.06	88.78
75% ethanol	4.5	84.51

表 5. RHDV2 对不同浓度甲醛敏感性

Table 5. The sensitivity of RHDV2 to different concentrations of formaldehyde

Treatment	Log (Mean copy number)	Inactivation rate/%
0.2% formaldehyde	5.14	71.16
0.3% formaldehyde	4.53	82.22

由于 RHDV2 不能在体外培养, 阻碍了对该病毒的进一步研究。经典 RHDV 的理化特性研究是将病毒液处理后, 注射在兔体内, 以其发病率和死亡率作为研究结果<sup>[19]</sup>。但该方法受到试验动物自身健康状态、饲养环境等因素的限制, 且结果并不代表病毒拷贝数的改变。故经典 RHDV 的理化特性研究仍有待进一步完善。本研究采用 PMA-RT-qPCR 用于 RHDV2 理化特性的检测, 利用 PMA 修饰失活病毒核酸阻断 PCR 扩增, 结合 qPCR 实现了对待检病毒是否具有复制能力的区分, 为今后开展 RHDV2 相关研究提供重要的科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, 1991, 184(2): 664–676.
- [2] Parra F, Prieto M. Purification and characterization of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *Journal of Virology*, 1990, 64(8): 4013–4015.
- [3] Liu SJ, Xue HP, Pu BQ, Qian NH, Xu WY, Du NX. A new viral disease of rabbit—viral hemorrhage in rabbit. *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. *畜牧与兽医*, 1984, 16(6): 253–255.
- [4] Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J, Esteves PJ. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. *Veterinary Research*, 2012, 43(1): 12.
- [5] McIntosh MT, Behan SC, Mohamed FM, Lu ZQ, Moran KE, Burrage TG, Neilan JG, Ward GB, Botti G, Capucci L, Metwally SA. A pandemic strain of calicivirus threatens rabbit industries in the Americas. *Virology Journal*, 2007, 4: 96.
- [6] Lavazza A, Scicluna MT, Capucci L. Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 1996, 43(7): 401–410.
- [7] Puggioni G, Cavadini P, Maestrone C, Scivoli R, Botti G, Ligios C, Le Gall-Reculé G, Lavazza A, Capucci L. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 96.
- [8] Camarda A, Pugliese N, Cavadini P, Circella E, Capucci L, Caroli A, Legretto M, Mallia E, Lavazza A. Detection of the new emerging rabbit haemorrhagic disease type 2 virus (RHDV2) in Sicily from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Research in Veterinary Science*, 2014, 97(3): 642–645.
- [9] Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guérin JL, Marchandeu S. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Veterinary Record*, 2011, 168(5): 137–138.
- [10] Rouco C, Aguayo-Adán JA, Santoro S, Abrantes J, Delibes-Mateos M. Worldwide rapid spread of the novel rabbit haemorrhagic disease virus (GI.2/RHDV2/b). *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(4): 1762–1764.
- [11] 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. *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. *中国兽医科学*, 2016, 46(3): 332–337.
- [12] 於颖. PMA-qPCR 定量检测畜禽肉类中食源性致病菌活菌的研究. 东华大学硕士学位论文, 2015.
- [13] Deshmukh R, Bhand S, Roy U. A novel method for rapid and sensitive detection of viable *Escherichia coli* cells using UV-induced PMA-coupled quantitative PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(2): 773–778.
- [14] 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. 四川农业大学硕士学位论文, 2016.
- [15] 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. *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. *中国兽医科学*, 2016, 46(6): 710–716.
- [16] Tang SW. Research progress on rabbit viral hemorrhagic disease. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, (5): 21–22. (in Chinese)  
汤少伟. 兔病毒性出血症研究进展. *上海畜牧兽医通讯*, 2010, (5): 21–22.

- [17] Qin Y, Wang JR, Qiao HZ, Yu CP, Li LR, Chen YJ, Huang J. The effect of processing technology on nutritional quality of feed. *Feed Research*, 2019, 42(12): 83–86. (in Chinese)  
秦毅, 王金荣, 乔汉桢, 于翠萍, 李林儒, 陈勇江, 黄进. 加工工艺对饲料营养品质的影响. *饲料研究*, 2019, 42(12): 83–86.
- [18] Xu SZ, Yin YB, Wang X. Research progress on routine inactivants in veterinary vaccines. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37(9): 162–167. (in Chinese)  
徐守振, 尹燕博, 王新. 动物疫苗中常用抗原灭活剂的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(9): 162–167.
- [19] Du NX, Xu WY, Liu SJ, Xu FN, Yu YR, Li RJ. Studies on rabbit haemorrhagic disease. *Scientia Agricultura Sinica*, 1991, 24(1): 1–10. (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. *中国农业科学*, 1991, 24(1): 1–10.

## Physicochemical properties of rabbit hemorrhagic disease virus type 2

Wanting Chen<sup>1#</sup>, Mingzhong Zhou<sup>2#</sup>, Bin Chen<sup>2</sup>, Pengfei Zhang<sup>1</sup>, Ruijiao Jiang<sup>1</sup>, Hongmei Zeng<sup>1</sup>, Teng Tu<sup>1</sup>, Dishu Chen<sup>2</sup>, Zexiao Yang<sup>1,3</sup>, Yan Luo<sup>1,3</sup>, Xueping Yao<sup>1,3</sup>, Yin Wang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

<sup>2</sup> Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

<sup>3</sup> Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

**Abstract: [Objective]** The purpose of this study was to study the physicochemical properties of the virus RHDV2 and evaluate effect of different treatment to kill the virus. **[Methods]** The virus was identified by RT-PCR in rabbits with clinical suspected death from RHDV2 infection. The physicochemical properties of RHDV2 were studied by PMA-RT-qPCR at different pH, different temperatures, common veterinary disinfectants and different concentrations of formaldehyde. **[Results]** RHDV2 infection was confirmed by RT-PCR detection and sequencing analysis. The *VP60* gene sequence of this strain was 98.35% consistent with RHDV2 in GenBank (MN276176.1). PMA-RT-qPCR results show that RHDV2 was sensitive to pH, high temperature, animal disinfectant and formaldehyde. The killing rate of virus increased with pH decreasing or increasing. The virus killing rate reached 77.61% after being treated at 65 °C for 30 min, and 95.10% after being treated at 83 °C for 5 min. RHDV2 is sensitive to all three animal disinfectants, among which povidone iodine had the best killing effect on RHDV2, the virus killing rate reached 88.78% after 30 min. The killing rate of 0.3% formaldehyde was better than 0.2%, and after 30 min of application, the killing rate could reach 82.22%. **[Conclusion]** RHDV2 is sensitive to acid and base, high temperature, animal disinfectant and formaldehyde to varying degrees.

**Keywords:** rabbit hemorrhagic disease virus 2, physical and chemical characteristics, PMA-RT-qPCR, disinfectant

(本文责编: 李磊)

Supported by the Science and Technology Plan Projects in Sichuan Province

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

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

Received: 28 May 2020; Revised: 11 August 2020; Published online: 11 December 2020