

王隆柏, 吴晓鸣, 王晨燕, 等. 福建省猪流行性腹泻病毒检测与 S 基因遗传变异分析 [J]. 福建农业学报, 2015, 30 (7): 625-630.
WANG L-B, WU X-M, WANG C-Y, et al. Clinical Detection and Variation Analysis on S Genes of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses in Fujian [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 30 (7): 625-630.

福建省猪流行性腹泻病毒检测与 S 基因遗传变异分析

王隆柏¹, 吴晓鸣², 王晨燕¹, 车勇良¹, 吴学敏¹, 陈如敬¹, 周伦江^{1*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

2. 福建省福安市畜牧兽医局, 福建 福安 355000)

摘要: 为了解猪流行性腹泻 (PED) 在福建省的流行和流行毒株 S 基因的变异情况, 对 2011—2014 年采自 117 个规模猪场的 295 份疑似 PED 的病料进行检测, 对 14 株具有代表性的 PEDV 毒株进行 S 基因序列分析。结果显示, 2011—2014 年病料阳性率分别为 87.30%、75.00%、40.91% 和 34.15%, 总阳性率为 69.49%, 虽然 PED 阳性率在福建省有下降趋势, 但仍较高。基因序列分析表明福建省 14 株 PEDV 分离株 S 基因核苷酸之间的同源性分别为 98.5%~100.0%, 与国内其他毒株之间的同源性为 93.3%~99.5%, 其中与国内 2009 年以前流行的 PEDV 毒株的同源性较低; 与 2008 年泰国 NPPED2008_2 株的同源性分别为 95.8%~96.1%; 与 CV777 标准株的同源性为 93.8%~94.1%。分离毒株的 S 基因片段氨基酸存在多个位点突变、插入和缺失现象。遗传进化树表明 14 株 PEDV 分离株与 2008 年泰国 NPPED2008_2 毒株和 2009 年韩国毒株亲缘关系较近, 与 attenuated DR13 弱毒株及 CV777 标准株亲缘关系比较远。14 株 PEDV 的 S 基因序列已登陆 Genbank。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 检测; S 基因; 变异分析

中图分类号: S 858.2

文献标识码: A

Clinical Detection and Variation Analysis on S Genes of Porcine Epidemic Diarrhea Viruses in Fujian

WANG Long-bai¹, WU Xiao-ming², WANG Chen-yan¹, CHE Yong-liang¹, WU Xue-min¹,
CHEN Ru-jing¹, ZHOU Lun-jiang^{1*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China;

2. Station of Animal Husbandry and Veterinary of Fu'an, Fu'an, Fujian 355000, China)

Abstract: The intensity and widespread of the porcine epidemic diarrhea (PED) have continuously been on the climb in Fujian since the end of 2010. The infectious disease caused high mortalities in suckling piglets, and has become one of the most serious concerns for the pig farms in the area. To deter the epidemic and understand the genetic variations of S genes of PED viruses, 295 clinical samples from 117 sizable pig farms were collected during 2011—2014 for RT-PCR analysis. Overall, 205 out of 295 samples (69.49%) were tested positive. Annually, the infection rate declined from 87.3%, 75.00%, 40.91% to 34.15% during the year of 2011 to 2014. Nonetheless, it remained a serious problem for the industry. The study on nucleotide sequence revealed that the S genes of the 14 isolated PED strains shared 98.5%—100.0% homogeneity among themselves, and 93.3%—99.5% in comparison with other strains in China, 93.8%—94.1% with CV777, and 95.8%—96.1% with NPPED2008_2. Variants, insertions and deletions of amino acids on the genes were found. The phylogenetic analysis on the 14 PED viruses showed a close relationship with the Thailand and Korean strains, and a remote one with the attenuated DR13 and CV777. The S gene sequence obtained from this study has been filed with Genbank.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; clinical detection; S genes; variation analysis

收稿日期: 2015-04-15; 2015-05-28 改稿

作者简介: 王隆柏 (1977—), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: wanglongbai@163.com)

*通讯作者: 周伦江 (1973—), 男, 博士, 研究员, 主要从事动物病毒学与分子生物学 (E-mail: lunjiang@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2014R1023-7); 福建省自然科学基金 (2015J01112)

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea Virus, PEDV) 引起猪的一种高度接触性肠道传染病, 发病特征主要表现为感染猪群腹泻、呕吐、脱水和消瘦死亡。PEDV 与猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 均为冠状科病毒, 它们引发的临床症状和致病机理非常相似^[1]。该病于 1971 年英国首次报道, 我国在 1980 年发现该病以后^[2], 全国各地陆续有 PED 发生的报道。随着 PEDV 疫苗的问世和应用, PED 在一定程度上得到较好控制。过去的 30 多年, PEDV 主要是感染保育猪和育肥猪, 且病死率不是很高。但近年来, 包括韩国、泰国、日本在内的亚洲国家纷纷报道严重 PED 疫情, 出现 7 日龄以内哺乳仔猪发病后死亡率可达到 100%, 对养殖场造成严重损失, 这说明 PED 在亚洲区域猪群中的流行形势十分严峻。近年欧美均有 PED 的报道, 2013 年美国 PED 发病情况严重。

从 2010 年下半年开始 PED 在我国再次爆发并流行, 也造成大量哺乳仔猪发病死亡, 致死率最高可达 100%。如蔡汝健等^[3]于 2010—2013 年对华南地区 60 个规模猪场的粪便进行 PEDV 检测, 发现猪场的阳性率高达 100%, 猪群平均死亡率为 76.87%。杜晓莉等^[4]于 2010—2013 年对浙江省 342 份疑似腹泻病料样品进行检测, 病料阳性率达到 69.30%。由此, PED 在我国发病比较严重, 并再次成为大家的共同研究探讨的热点。为了解 2011 年以来 PED 在福建省的流行情况和 PEDV 的主要结构蛋白 S 蛋白的变异规律, 较系统获得 PED 流行病学数据, 本研究对 2011—2014 年采自 117 个规模猪场的 295 份疑似 PED 的病料进行检测, 并对 14 株具有代表性的 PEDV 毒株进行 S 蛋白基因序列比对分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病料来源 2011—2014 年采自全省各地疑似发生 PED 规模猪场的病料。病料均来源于发病哺乳仔猪的小肠及肠道内容物。

1.1.2 主要试剂 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自 TANGEN 公司, PCR 扩增试剂盒购自北京全式金生物科技有限公司, *Ex Taq* 酶、AMV 酶、Rnase Inhibition、dNTP 和 DNA Marker-2000、大肠杆菌感受态 DH5 α 购自 TaKaRa 公司, PMD18-T Vector 购自大连宝生生物工程有限公司,

Nuclease-Free Water 购自 Promega 公司, 胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 PEDV 检测

(1) 引物设计与合成 根据 Genbank 登录的 CV777 标准毒株 E 基因的保守序列, 设计合成了 1 对扩增片段的引物, 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。其引物序列如下 (表 1)。

表 1 基因序列扩增引物情况

Table 1 Amplification primers of gene sequence

| 片段 | 引物 | 引物序列 | 退火温度/℃ | 片段长度 |
|----|----|---------------------------|--------|-------------|
| E | F3 | 5'-TGGCGACCATTACATCACT-3' | 52 | 25235~25698 |
| | R3 | 5'-TCACCTCATCACACGGAA-3' | | |

(2) 核酸提取及 RT-PCR 反应 提取核酸 RNA: 按照 TransGen 病毒 RNA/DNA 提取试剂盒说明书进行。RT 反应: 25 μL 的反转录反应体系中先加 6 μL RNA 与 1 μL 下游引物 70℃ 水浴 10 min, 冰浴 2 min, 之后按顺序加入 DEPC 水 7.0 μL, 5×AMV Buffer 5.0 μL, dNTP Mixture 4.0 μL, Rnase Inhibition 1.0 μL, AMV 1.0 μL; 反应条件为 42℃ 60 min, 4℃ 保存。PCR 反应: *TaKaRa Ex Taq* (5 units · μL⁻¹) 0.25 μL, 10 × *Ex Taq* Buffer 5.0 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol · L⁻¹ each) 4.0 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 反转录产物 3.0 μL, DEPC 水 36.25 μL, 扩增条件为 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 52℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 终延伸 10 min, 4℃ 保存。反应结束后, 取 7 μL 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

1.2.2 14 株 PEDV 的 S 基因的扩增

(1) 引物设计与合成: 根据 CV777 标准毒株的 S 基因序列, 设计合成 2 对扩增 S 基因片段的引物, 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。其引物序列如表 2 所示。

表 2 基因序列扩增引物情况

Table 2 Amplification primers of gene sequence

| 片段 | 引物 | 引物序列 | 退火温度/℃ | 片段长度 |
|----|----|-----------------------------|--------|-------------|
| S1 | F1 | 5'-CATTGTTGGCTTTCTAAC-3' | 50 | 20598~22707 |
| | R1 | 5'-AGCACCACTAGTGACATTCTT-3' | | |
| S2 | F2 | 5'-GATTCTGGACAGTTGTTAGC-3' | 48 | 22662~24845 |
| | F2 | 5'-CTTCGAGACATCTTGACAAC-3' | | |

(2) 核酸提取及 RT-PCR 反应: 参照 1.2.1 (2), PCR 复性温度为 48~50℃。

(3) 按照 OMEGA 公司的 Gel DNA Extraction kit 200 的说明书进行目的片段回收, 回收产物连接到 PMD18-T 转化到感受态细胞, 提取阳性质粒送至生工生物工程(上海)有限公司进行序列测定。

(4) 利用 DNAMAN 软件将所测定的 S1 基因和 S2 基因进行序列拼接。利用 DNAMAN 和 DNASTar 软件对所得到的 S 基因与 GenBank 上已登录的参考毒株进行序列比对, 分析其同源性, 构建遗传进化树。

2 结果与分析

2.1 PEDV 检测结果

通过对 2011—2014 年采集的临床疑似 PEDV 病料采用 RT-PCR 方法进行检测发现, PED 一年四季都可发生, 但主要在较寒冷的冬春季节, 规模较小的猪场由于饲养管理等技术比较薄弱及疫苗免不到位的情况下, 发病较为严重, 病死率可高达 90% 以上。数据统计分析表明 2011—2014 年 PEDV 的阳性率逐年有所下降, 其中以 2011 年猪场阳性率和病料阳性率最高, 分别为 85.71% 和 87.3%, 以 2014 年猪场阳性率和病料阳性率最低, 分别为 39.13% 和 34.15%; 2011—2014 年猪场阳性率和病料阳性率分别为 64.57% 和 69.94%, 具体情况如表 3 所示。由此可见, 虽然近年来 PEDV 在福建省发病率有所下降, 仍然比较流行, 防控压力依旧十分严峻。

表 3 2011—2014 年福建省 PEDV 检测情况

Table 3 Clinical detection of PED viruses, 2011—2014

| 年份 | 猪场数 /个 | 样本数 /份 | 猪场阳性率 /% | 病料阳性率 /% |
|------|-----------|-----------|---------------|----------------|
| 2011 | 42 | 126 | 85.71(36/42) | 87.3(110/126) |
| 2012 | 38 | 84 | 71.05(27/38) | 75.00(63/84) |
| 2013 | 24 | 44 | 41.67(10/24) | 40.91(18/44) |
| 2014 | 23 | 41 | 39.13(9/23) | 34.15(14/41) |
| 合计 | 127 | 295 | 64.57(82/127) | 69.94(205/295) |

2.2 PEDV S 基因序列分析

根据样品采集时间和地点对选取的 14 株克隆毒株分别命名为 FJ-FQ1 2012 (福清)、FJ-FQ2 2012 (福清)、FJ-LY 2012 (龙岩)、FJ-ND 2012 (宁德)、FJ-CL 2013 (长乐)、FJ-QK 2013 (青

口)、FJ-LY 2013 (龙岩)、FJ-ND 2013 (宁德)、FJ-QZ 2013 (泉州)、FJ-PT 2013 (莆田)、FJ-YX 2013 (云霄)、FJ-ZP 2013 (漳浦)、FJ-FQ 2014 (福清)、FJ-ZP 2014 (漳浦), 最终将测定的基因序列分别提交到 GenBank 上, 并获得登录号 (表 4)。通过应用软件进行 S 基因序列比对分析, 发现 14 株 PEDV 的 S 基因中有 2 株 (FJ-FQ2 2012、FJ-ZP 2013) 是由 4158 个核苷酸组成, 剩下的 12 株 (FJ-FQ1 2012 等) 由 4161 个核苷酸组成。它们分别编码 1385 和 1386 个氨基酸。通过与参考毒株 (表 5) 比对分析, 发现 14 株克隆株氨基酸存在 64 个点突变、5 个插入和 2 个缺失现象, 变异情况与 2014 年王隆柏^[5]报道的基本一致。表明近年来在福建省流行的 PEDV 毒株在 S 基因片段变异程度较大。

表 4 PEDV 的 S 基因登录号

Table 4 Accession number of S gene

| virus | 登录号 | 年份 | virus | 登录号 | 年份 |
|-------------|----------|------|-------------|----------|------|
| FJ-FQ1 2012 | KJ646581 | 2012 | FJ-FQ2 2012 | KJ646582 | 2012 |
| FJ-LY 2012 | KJ646583 | 2012 | FJ-ND2012 | KJ646585 | 2012 |
| FJ-CL 2013 | KJ646579 | 2013 | FJ-LY 2013 | KJ646584 | 2013 |
| FJ-ND2013 | KJ646586 | 2013 | FJ-PT 2013 | KJ646587 | 2013 |
| FJ-QK2013 | KJ646588 | 2013 | FJ-QZ2013 | KJ646589 | 2013 |
| FJ-YX2013 | KJ646590 | 2013 | FJ-ZP 2013 | KJ646578 | 2013 |
| FJ-FQ2014 | KJ646580 | 2014 | FJ-ZP 2014 | KJ646591 | 2014 |

表 5 PEDV 的 S 基因序列比较的参考毒株

Table 5 Reference strain for S genes of PED virus

| virus | 登录号 | 分离地 | 年份 |
|-----------------|----------|-----------|------|
| CV777 | AF353511 | England | 1993 |
| KNU-0901 | GU180144 | Korea | 2009 |
| attenuated DR13 | JQ023162 | Korea | 2011 |
| SM98 | GU937797 | Korea | 2012 |
| NK | AB548623 | Japan | 2010 |
| 83P-5 | AB548618 | Japan | 2010 |
| NPPED2008_2 | KC764592 | Thailand | 2008 |
| MN | KF468752 | USA | 2013 |
| IA1 | KF468753 | USA | 2013 |
| GD-B | JX088695 | Guangdong | 2012 |
| SD-M | JX560761 | Shandong | 2012 |
| BJ 2011 1 | JN825712 | Beijing | 2011 |
| LZC | EF185992 | Lanzhou | 2006 |
| JS-2004-2 | AY653204 | JiangSu | 2004 |

2.3 14株 PEDV 的 S 基因核苷酸、推导的氨基酸同源性分析

14株 PEDV 分离株 S 基因核苷酸和推导的氨基酸序列的同源性分别为 98.5%~100.0% 和 98.1%~100.0%。它们与中国 (BJ 2011 1、GD-B、LZC、JS-2004-2、SD-M) 株之间核苷酸和推导的氨基酸序列的同源性分别为 93.3%~99.5% 和 91.7%~99.3%，其中与中国 2004 年和 2006 年发生的其他 PEDV 毒株的同源性较低，与 2011 和 2012 年流行的其他 PEDV 同源性较高；与韩国

(KNU-0901、SM98) 株的同源性分别为 93.5%~95.1% 和 92.1%~95.0%；与日本 (83P-5、NK) 株的同源性分别为 94.0~94.9% 和 93.1~94.2%；与美国 (IA1、MN) 株的同源性分别为 98.7%~99.4% 和 98.4%~99.4%；与泰国 NPPE2008_2 株的同源性分别为 95.8%~96.1% 和 94.3~95.3%；与 attenuated DR13 弱毒株的同源性分别为 93.8%~94.1% 和 92.4%~93.3%，与 CV777 标准株的同源性分别为 93.8%~94.1% 和 92.8%~93.7% (图 1)。

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | | |
|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| 1 | 99.0 | 99.0 | 99.1 | 99.5 | 99.2 | 98.8 | 99.2 | 99.0 | 99.3 | 99.5 | 98.7 | 99.1 | 99.4 | 93.9 | 93.8 | 94.9 | 93.7 | 94.0 | 94.5 | 99.1 | 96.0 | 99.3 | 99.3 | 96.0 | 93.4 | 93.8 | 1 | | | |
| 2 | 1.0 | 99.4 | 98.8 | 99.2 | 99.0 | 98.6 | 99.6 | 98.7 | 99.0 | 99.3 | 99.1 | 99.5 | 99.6 | 93.9 | 94.0 | 95.1 | 93.7 | 94.2 | 94.7 | 99.0 | 99.0 | 95.9 | 99.2 | 99.2 | 96.0 | 93.4 | 93.9 | 2 | | |
| 3 | 1.0 | 0.6 | 98.7 | 99.3 | 98.8 | 98.5 | 99.7 | 98.6 | 98.9 | 99.3 | 99.0 | 99.8 | 99.1 | 93.8 | 93.8 | 94.9 | 93.5 | 94.0 | 94.7 | 98.9 | 95.9 | 99.2 | 99.1 | 95.9 | 93.3 | 93.7 | 3 | | | |
| 4 | 0.9 | 1.2 | 1.3 | 99.2 | 99.5 | 98.7 | 98.9 | 98.9 | 99.0 | 99.3 | 98.5 | 98.8 | 99.2 | 94.2 | 94.1 | 95.1 | 93.9 | 94.3 | 94.9 | 99.2 | 99.0 | 96.0 | 99.1 | 99.0 | 96.4 | 93.6 | 94.0 | 4 | | |
| 5 | 0.5 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 99.4 | 99.0 | 99.6 | 99.1 | 99.4 | 100.0 | 98.8 | 99.4 | 99.6 | 94.1 | 94.0 | 95.0 | 93.8 | 94.2 | 94.6 | 99.2 | 96.1 | 99.4 | 99.4 | 96.2 | 93.6 | 93.9 | 5 | | | |
| 6 | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 0.5 | 0.7 | 98.9 | 99.0 | 99.0 | 99.2 | 99.4 | 98.7 | 98.9 | 99.3 | 94.1 | 94.0 | 95.1 | 93.9 | 94.2 | 94.8 | 99.4 | 99.3 | 96.1 | 99.2 | 99.1 | 96.2 | 93.6 | 93.9 | 6 | | |
| 7 | 1.2 | 1.4 | 1.5 | 1.3 | 1.0 | 1.1 | 1.1 | 98.7 | 98.6 | 98.8 | 99.0 | 98.8 | 98.6 | 98.9 | 93.9 | 93.8 | 94.7 | 93.6 | 94.0 | 94.4 | 98.7 | 98.7 | 95.8 | 98.8 | 98.8 | 95.8 | 93.3 | 93.8 | 7 | |
| 8 | 0.8 | 0.4 | 0.3 | 1.1 | 0.4 | 1.0 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 98.8 | 99.1 | 99.6 | 99.2 | 99.8 | 99.3 | 94.0 | 94.0 | 95.1 | 93.7 | 94.2 | 94.7 | 99.1 | 99.1 | 96.0 | 99.4 | 99.3 | 96.1 | 93.5 | 93.9 | 8 |
| 9 | 1.0 | 1.3 | 1.4 | 1.1 | 0.9 | 1.0 | 1.5 | 1.2 | 1.2 | 99.0 | 99.2 | 98.4 | 98.7 | 99.0 | 94.0 | 93.9 | 94.9 | 93.8 | 94.1 | 94.6 | 98.8 | 98.8 | 96.0 | 98.9 | 98.9 | 96.1 | 93.5 | 93.8 | 9 | |
| 10 | 0.7 | 1.0 | 1.1 | 1.0 | 0.6 | 0.8 | 1.3 | 0.9 | 1.0 | 1.0 | 99.4 | 98.6 | 99.0 | 99.4 | 94.0 | 94.0 | 95.0 | 93.8 | 94.2 | 94.7 | 99.0 | 99.0 | 95.9 | 99.4 | 99.4 | 96.0 | 93.5 | 93.9 | 10 | |
| 11 | 0.5 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.0 | 0.6 | 1.0 | 0.4 | 0.8 | 0.6 | 98.8 | 99.4 | 99.6 | 94.1 | 94.0 | 95.0 | 93.8 | 94.2 | 94.7 | 99.2 | 99.2 | 96.1 | 99.5 | 99.4 | 96.2 | 93.6 | 93.9 | 11 | | |
| 12 | 1.3 | 0.9 | 1.0 | 1.5 | 1.2 | 1.4 | 1.3 | 0.8 | 1.7 | 1.5 | 1.2 | 99.1 | 98.7 | 93.8 | 93.8 | 94.9 | 93.5 | 94.0 | 94.5 | 98.7 | 98.7 | 95.6 | 98.8 | 98.8 | 95.7 | 93.3 | 93.7 | 12 | | |
| 13 | 0.9 | 0.5 | 0.2 | 1.2 | 0.7 | 1.1 | 1.4 | 0.2 | 1.3 | 1.0 | 0.6 | 0.9 | 99.2 | 93.9 | 93.8 | 95.0 | 93.6 | 94.0 | 94.8 | 99.0 | 99.0 | 95.9 | 99.3 | 99.2 | 95.9 | 93.3 | 93.8 | 13 | | |
| 14 | 0.6 | 0.4 | 0.9 | 0.8 | 0.4 | 0.7 | 1.1 | 0.7 | 1.0 | 0.6 | 0.4 | 1.3 | 0.8 | 94.0 | 94.0 | 95.0 | 93.8 | 94.2 | 94.7 | 99.2 | 99.1 | 96.0 | 99.3 | 99.3 | 96.1 | 93.5 | 93.9 | 14 | | |
| 15 | 6.4 | 6.3 | 6.5 | 6.1 | 6.2 | 6.2 | 6.5 | 6.3 | 6.3 | 6.2 | 6.2 | 6.5 | 6.4 | 6.3 | 96.9 | 94.3 | 99.7 | 97.2 | 95.1 | 94.1 | 94.1 | 93.0 | 94.5 | 94.2 | 96.3 | 99.4 | 96.8 | 15 | | |
| 16 | 6.5 | 6.3 | 6.5 | 6.2 | 6.3 | 6.3 | 6.5 | 6.3 | 6.4 | 6.3 | 6.6 | 6.5 | 6.3 | 3.2 | 94.5 | 96.7 | 99.5 | 95.2 | 94.1 | 94.1 | 91.2 | 92.8 | 94.3 | 94.2 | 96.5 | 96.4 | 99.8 | 16 | | |
| 17 | 5.3 | 5.1 | 5.3 | 5.0 | 5.2 | 5.1 | 5.5 | 5.1 | 5.3 | 5.2 | 5.2 | 5.3 | 5.2 | 5.2 | 6.0 | 5.7 | 5.7 | 94.0 | 94.7 | 97.1 | 95.2 | 95.1 | 94.0 | 95.3 | 95.2 | 94.0 | 93.7 | 94.5 | 17 | |
| 18 | 6.7 | 6.7 | 6.8 | 6.4 | 6.5 | 6.4 | 6.7 | 6.6 | 6.5 | 6.5 | 6.5 | 6.8 | 6.8 | 6.5 | 0.3 | 3.4 | 6.3 | 96.9 | 94.8 | 93.8 | 93.8 | 92.7 | 94.2 | 93.9 | 96.1 | 96.6 | 18 | | | |
| 19 | 6.3 | 6.1 | 6.3 | 6.0 | 6.1 | 6.1 | 6.3 | 6.1 | 6.2 | 6.1 | 6.1 | 6.3 | 6.2 | 6.1 | 2.9 | 0.5 | 5.5 | 3.2 | 95.5 | 94.3 | 94.3 | 93.0 | 94.5 | 94.4 | 96.7 | 96.6 | 99.5 | 19 | | |
| 20 | 5.7 | 5.5 | 5.5 | 5.4 | 5.6 | 5.4 | 5.8 | 5.5 | 5.6 | 5.5 | 5.5 | 5.7 | 5.5 | 5.6 | 5.1 | 5.0 | 3.0 | 5.5 | 4.7 | 94.8 | 94.8 | 93.7 | 95.0 | 94.9 | 94.4 | 94.5 | 95.2 | 20 | | |
| 21 | 0.9 | 1.0 | 1.1 | 0.8 | 0.8 | 0.6 | 1.3 | 0.9 | 1.2 | 1.0 | 0.8 | 1.3 | 1.0 | 0.8 | 6.1 | 6.2 | 5.0 | 6.5 | 6.0 | 5.4 | 99.8 | 96.2 | 99.4 | 99.3 | 96.3 | 93.6 | 94.0 | 21 | | |
| 22 | 1.0 | 1.0 | 1.1 | 0.8 | 0.8 | 0.7 | 1.3 | 0.9 | 1.2 | 1.0 | 0.8 | 1.3 | 1.0 | 0.9 | 6.1 | 6.2 | 5.1 | 6.5 | 6.0 | 5.5 | 0.2 | 96.2 | 99.3 | 99.2 | 96.3 | 93.6 | 94.0 | 22 | | |
| 23 | 4.2 | 4.2 | 4.3 | 4.1 | 4.0 | 4.0 | 4.4 | 4.1 | 4.1 | 4.2 | 4.0 | 4.5 | 4.2 | 4.1 | 7.4 | 7.6 | 6.3 | 7.8 | 7.4 | 6.6 | 3.9 | 3.9 | 96.3 | 96.2 | 94.1 | 92.4 | 92.7 | 23 | | |
| 24 | 0.7 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 0.6 | 0.8 | 1.2 | 0.6 | 1.1 | 0.6 | 0.5 | 1.2 | 0.7 | 0.7 | 5.8 | 6.0 | 4.9 | 6.1 | 5.8 | 5.2 | 0.7 | 0.7 | 3.8 | 99.7 | 96.3 | 93.9 | 94.2 | 24 | | |
| 25 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1.0 | 0.6 | 0.9 | 1.2 | 0.7 | 1.1 | 0.6 | 0.6 | 1.2 | 0.8 | 0.7 | 6.0 | 6.1 | 5.0 | 6.4 | 5.9 | 5.3 | 0.7 | 0.8 | 4.0 | 0.3 | 96.2 | 93.7 | 94.1 | 25 | | |
| 26 | 4.1 | 4.2 | 4.3 | 3.7 | 3.9 | 3.9 | 4.3 | 4.0 | 4.1 | 4.2 | 3.9 | 4.4 | 4.2 | 4.0 | 3.8 | 3.6 | 6.2 | 4.1 | 3.4 | 5.8 | 3.8 | 3.8 | 6.2 | 3.8 | 3.9 | 95.8 | 96.3 | 26 | | |
| 27 | 7.0 | 6.9 | 7.0 | 6.7 | 6.8 | 6.7 | 7.0 | 6.8 | 6.8 | 6.8 | 6.8 | 7.1 | 7.0 | 6.8 | 0.6 | 3.7 | 6.6 | 0.9 | 3.5 | 5.7 | 6.7 | 6.7 | 8.0 | 6.4 | 6.6 | 4.3 | 96.3 | 27 | | |
| 28 | 6.6 | 6.4 | 6.6 | 6.2 | 6.4 | 6.4 | 6.6 | 6.4 | 6.5 | 6.4 | 6.4 | 6.6 | 6.5 | 6.4 | 3.2 | 0.2 | 5.8 | 3.5 | 0.5 | 5.0 | 6.3 | 6.2 | 7.7 | 6.1 | 6.2 | 3.8 | 3.8 | 28 | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | | |

图 1 PEDV 的 S 基因核苷酸同源性比较

Fig. 1 Nucleotide homology on S gene of PED virus

2.4 14 株 PEDV 的 S 基因的遗传进化树分析

遗传进化树结果表明：PEDV 可分为 2 个群 (G1、G2)，第 I 群由 2 个亚群组成，14 株 PEDV 福建分离株分属于第 I-1 亚群中，第 I-1 亚群由 FJ-FQ2 2012、FJ-ZP 2012、FJ-YX 2013、FJ-ND 2013、FJ-FQ1 2012、FJ-ZP 2014、FJ-QZ 2013、FJ-LY 2012、FJ-CL 2013、FJ-QK 2013、FJ-PT 2013、FJ-ND 2012、FJ-FQ 2014、FJ-LY 2013、中国 (BJ 2011 1、GD-B) 株、美国 (IA1、MN) 株和泰国 NPPE2008_2 株组成；第 I-2 亚群由日本 NK 株和韩国 KNU-0901 株组成。第 II 群

由 2 个亚群组成，第 II-1 亚群由 CV777 标准株、韩国 (attenuated DR13、SM98) 株、中国 (SD-M、LZC) 株和日本 83P-5 株组成；中国江苏 JS-2004 2 株独立为第 II-2 亚群。14 株福建克隆株与 2013 年美国 (IA1、MN) 株、2011 年北京 BJ 2011 1 株、2012 年广东 GD-B 株、2009 年韩国 KNU-0901 株、2008 年泰国 NPPE2008_2 株亲缘关系较近，与 attenuated DR13 弱毒株及 CV777 标准株亲缘关系比较远 (图 2)。

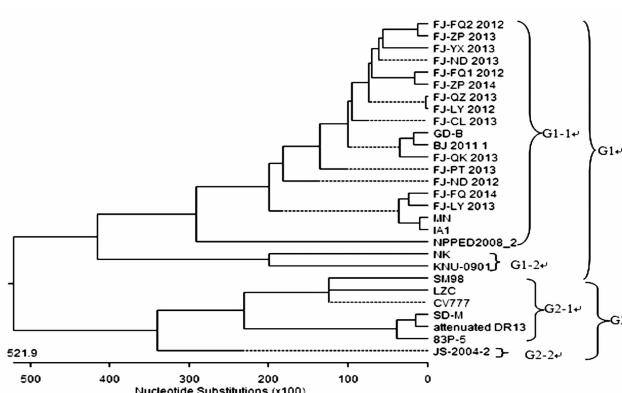


图2 PEDV的S基因核苷酸遗传进化树

Fig. 2 Construction of phylogenetic tree for S gene nucleotide sequence of PED virus

3 讨论

PED是由PEDV引起猪的一种急性、高度接触性肠道传染病，带毒猪和病猪是主要传染源，母猪的乳汁也是哺乳仔猪感染PED病毒垂直传播的途径^[6]。该病能致各种年龄的猪群感染发病，但主要发生在冬季和春季的寒冷潮湿的季节。福建地处亚热带地区，冬春季低温多雨的天气持续时间较长，对仔猪的保温不利，因此为PED的流行创造有利的条件。根据2011—2014年临床检测样品分析，猪群发病主要集中在冬春季节，少部分在炎热的夏季也有发生。在被检测的117个规模猪场的295份病料中，PEDV猪场总阳性率为64.57%，病料总阳性率为69.49%，其中PED刚开始流行不久的2011年猪场阳性率和病料阳性率最高，均在85.0%以上，以后逐年下降，以2014年猪场阳性率和病料阳性率为最低。究其原因，笔者认为自从2010年大规模发病以来，养殖企业一是更加重视种猪群各种疫苗免疫，尤其是对PEDV疫苗；二是更加注重猪群的营养、饲养管理及生物安全措施，尤其是对那些规模较小的猪场；三是历经了PED之后，养殖户对PED有更多的了解和防控经验等综合因素。

PEDV属于冠状病毒科，冠状病毒属，病毒粒子呈多形性，其基因组为单股正链RNA。编码S、E、M和N结构蛋白，其中S蛋白由1383个氨基酸组成，是病毒的囊膜蛋白，根据其他冠状病毒S蛋白序列可以将PEDV S蛋白划分为S1区(1~789位氨基酸)和S2区(790~1383位氨基酸)^[7]，S蛋白在受体细胞结合吸附、膜融合等方面发挥重要作用；也是诱导机体产生保护性中和抗

体的主要免疫蛋白^[8~9]。由于受到宿主免疫选择的压力，S蛋白易发生变异，同时作为RNA病毒，在不同的猪群环境、免疫压力和药物作用条件下极有可能发生变异^[10]，因此常被用来研究不同年代和地点发生的病毒亲缘关系。另外，研究发现与PEDV相近的猪传染性胃肠炎病毒S蛋白的变异会导致其宿主范围，组织细胞培养及毒力发生改变^[11~12]。陈建飞等^[13]发现不同地区的病毒毒株已发现明显的差异。刘孝珍^[14]等对8个省2个直辖市的多份病料分离的PEDV进行S基因变异分析，发现S基因变异程度较大。本课题组的研究结果也表明，近年临床检测到的PEDV S基因片段存在多个氨基酸突变、插入或缺失的现象，且以attenuated DR13弱毒株、CV777疫苗毒株和2010年以前国内流行的PEDV毒株的同源性较低，与近年来东南亚其他国家（如泰国）流行的PEDV和2010以后国内流行的其他毒株有较高的同源性，且隶属于同一分支，有较近的亲缘关系。由此可以推断表明，2011年以来福建流行PEDV毒株的S基因片段较以往流行毒株发生了较大幅度的变异，可能致传统疫苗毒株对猪群的保护率有所下降，病死率增多。

根据2011—2014年福建省PEDV检测和对毒株的S基因片段变异情况可知，PED在福建省的发病情况仍然比较严重，且流行毒株较以往和疫苗毒株出现的较大的变异，导致养猪企业防控压力依旧十分严峻，尤其对哪些规模较小，技术含量比较低的小型猪场，发病后能致初生仔猪90%以上发病死亡，造成重大的经济损失。因此，在做好猪群的饲养管理、其他疫苗免疫和生物安全的同时，应根据猪场的实际情况，在做好生物安全措施的同时，选用当前上市新型的PEDV疫苗，对更有效防控PED发生和流行，具有重要意义。

参考文献：

- [1] CAVANAGH D, BRIAN D A, BRUTON P, et al. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae [J]. Arch Virol, 1997, 142 (3): 629~633.
- [2] THANAWONGNUWECH R. Genetic Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Isolates from Southern Vietnam during 2009~2010 Outbreaks [J]. Board of Reviewing Editors, 2011, 41 (1): 55~64.
- [3] 董彦鹏, 白娟, 范宝超, 等. 猪流行性腹泻病毒RT-PCR检测与ORF3基因分子流行病学调查 [J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35 (7): 555~558.
- [4] 杜晓莉, 王一成, 吴润, 等. 2010—2013年浙江省猪流行性腹泻病毒临床检测及PEDV-S基因型分析 [J]. 浙江农业学

- 报, 2014, 26 (3): 581—587.
- [5] 王隆柏, 林裕胜, 车勇良, 等. 猪流行性腹泻病毒 S、N 和 ORF3 基因的遗传变异分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45 (11): 1830—1836.
- [6] SUN RUI-QIN, CAI RU-JIAN, CHEN YA-QIANG, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (1): 161—163.
- [7] SUN D B, FENG L, SHI H Y, et al. Spike protein region (aa636789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies [J]. Acta Virologica, 2007, 51 (3): 149—156.
- [8] YEO S G, HERNANDEZ M, KRELL P J, et al. Cloning and sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99 [J]. Virus Gene, 2003, 26 (3): 239—246.
- [9] KANG T, SEO J, KIM D, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41 (2): 378—383.
- [10] 甘振磊, 汤德元, 李春燕, 等. 猪流行性腹泻流行特点及流行现状的研究 [J]. 猪业科学, 2010, (12): 30—34.
- [11] KWON H M, SAIF L J, JACKWOOD D J. Field isolates of transmissible gastroenteritis virus differ at the molecular level from the Miller and Purdue virulent and attenuated strains and from porcine respiratory coronaviruses [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 1998, 60 (5): 589—597.
- [12] BALLESTEROS M L, SANCHEZ C M, ENJUANES L, et al. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism [J]. Virology, 1997, 227 (2): 378—88.
- [13] 陈建飞, 冯力, 时洪艳, 等. 猪流行性腹泻病毒 CH/S 株 N 蛋白基因的遗传变异及其原核表达 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, (11): 224—229.
- [14] 刘孝珍, 陈建飞, 时洪艳, 等. 2011 年猪流行性腹泻病毒的遗传变异分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34 (3): 180—183.

(责任编辑: 柯文辉)