

何晓明, 田小艳, 王东东, 等. 2021—2022年我国部分地区猪轮状病毒分子流行病学调查 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 77–85.

HE X M, TIAN X Y, WANG D D, et al. Molecular epidemiology investigation of porcine rotavirus in some regions of China in 2021–2022 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 77–85.

2021—2022年我国部分地区猪轮状病毒分子流行病学调查

何晓明, 田小艳, 王东东, 刘桂武, 李春梅, 叶敏慧

(温氏食品集团股份有限公司, 广东 云浮 527400)

摘要: 为了解我国部分地区猪场猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 的流行情况及分子特征, 对 2021—2022 年我国部分省份的 86 个规模化猪场的 6 472 份腹泻样品进行检测, 用 RT-PCR 方法调查 PoRV 的流行率, 并对 PoRV 阳性样本进行 VP7 和 VP4 基因扩增、测序, 使用 MegAlign 软件进行同源性分析, 利用 MEGA11.0 构建系统进化树。结果显示, PoRV 的样品阳性率为 27.89% (1 805/6 472), 猪场阳性率为 65.12% (56/86); 从 98 份阳性 PoRV 样本中扩增出 76 个 VP7 片段, G9 为优势基因型 (42.11%), 基因型 G5、G26、G3、G4、G1、G2 和 G11 各占 26.32%、9.21%、6.58%、6.58%、3.95%、2.63% 和 2.63%。扩增出的 35 个 VP4 基因片段, 以 P [13] 型为主, 占 57.14%; 其次为 P [7]、P [23]、P [3] 和 P [6] 型, 分别占 20%、14.29%、5.71% 和 2.86%。35 个毒株成功鉴定出 G/P 基因型, G9P [13] (28.57%) 为优势组合基因型, 其他基因型为 G5P [13] (11.43%)、G4P [13] (8.57%)、G9P [23] (8.57%)、G26P [13] (5.71%)、G1P [7] (5.71%)、G26P [3] (5.71%)、G5P [7] (5.71%)、G3P [7] (2.86%)、G11P [23] (2.86%)、G5P [23] (2.86%)、G11P [7] (2.86%)、G3P [13] (2.86%)、G5P [6] (2.86%) 和 G4P [7] (2.86%)。其中 G11P [7] 为国内首次鉴定到的基因型。综上, 目前 PoRV 的流行率高且基因型复杂, 优势组合基因型为 G9P [13]。该结果丰富了 PoRV 的分子流行病学资料, 对我国猪 PoRV 感染的防控具有重要意义, 也为新型疫苗研发提供了参考依据。

关键词: 猪轮状病毒; VP4 基因; VP7 基因; 分子流行病学

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)03-0077-09

Molecular epidemiology investigation of porcine rotavirus in some regions of China in 2021–2022

HE Xiaoming, TIAN Xiaoyan, WANG Dongdong, LIU Guiwu, LI Chunmei, YE Minhui

(Wen's Food Stuff Group Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

Abstract: In order to understand the prevalence and molecular characteristics of porcine rotavirus (PoRV) in some pig farms in China, in the period from 2021 to 2022, 6 472 diarrhea samples were collected from 86 large-scale pig farms in some provinces of China and were studied. The prevalence of PoRV was investigated using RT-PCR, and the VP7 and VP4 genes in the PoRV positive samples were amplified and sequenced. Then, homology analysis was performed using the MegAlign software, and a phylogenetic tree was constructed using MEGA11.0. A total of 1 805 out of 6 472 diarrhea samples were positive for PoRV, with a positive rate of 27.89% (1 805/6 472) of all the samples and 65.12% (56/86) in the pig farms. 76 VP7 fragments were amplified from 98 positive PoRV samples, G9 (42.11%) was the dominant genotype, followed by G5, G26, G3, G4, G1, G2, and G11 which accounted for 26.32%, 9.21%, 6.58%, 6.58%, 3.95%, 2.63%, and 2.63% of the samples, respectively. The P [13] genotype (57.14%) was dominant among the 35 P types, followed by P [7], P [23], P [3], and P [6] types, accounting for 20%, 14.29%, 5.71%, and 2.86%, respectively. Furthermore, the G/P combination genotype was successfully identified in the 35 strains, and the dominant combination genotype was G9P [13] (28.57%), the other weaker combinations were G5P [13] (11.43%), G4P [13] (8.57%), G9P [23] (8.57%), G26P [13] (5.71%), G1P [7] (5.71%), G26P [3] (5.71%), G5P [7] (5.71%), G3P [7] (2.86%), G11P [23] (2.86%), G5P [23] (2.86%), G11P [7] (2.86%), G3P [13] (2.86%), G5P [6] (2.86%), and G4P [7] (2.86%). Obviously, G11P [7] was first identified in China. Taken together, the current prevalence of PoRV was high and the genotypes were complex, with the dominant combination genotype being G9P [13]. The results of this study enriched the molecular epidemiology data of PoRV, which would be of great significance for the prevention and control of PoRV infection in pigs in China, and would also provide reference for the development of new vaccines.

Keywords: porcine rotavirus; VP4 gene; VP7 gene; molecular epidemiology

轮状病毒 (rotavirus, RV) 隶属呼肠孤病毒科, 是各种幼龄动物非细菌性腹泻的主要病原之一^[1]。在我国, 猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 感染非常普遍, PoRV 感染后, 使仔猪机体免疫力急剧下降, 从而诱发多种腹泻病原混合感染, 导致仔猪死亡率上升或生长缓慢、停滞^[2]。猪轮状病毒的基因组是由 11 个独立片段的双股正链 RNA (dsRNA) 组成。分别编码 6 种结构蛋白 (VP1~VP4, VP6 和 VP7) 和 6 种非结构蛋白 (NSP1~NSP6), 其中, 第 11 节段有的编码 2 种蛋白 (NSP5 和 NSP6)^[3]。PoRV 的 11 个基因之间均易发生重配事件^[4]。病毒粒子有 3 层衣壳, 呈 20 面体对称, 最外层为 VP7 和 VP4, VP7 和 VP4 的特异性可将轮状病毒分为 2 个血清型, 分别是 G 型 (VP7) 和 P 型 (VP4)^[5], 且 G 型与 P 型之间会产生不同的组合, 不同组合型的 PoRV 毒株诱导的交叉保护性低^[6]。根据 2013 年分类方法, 以及外衣壳蛋白 VP4、VP7 和 VP6 基因序列, 将轮状病毒分为 G、P 和 I 基因型^[7]。轮状病毒基因群、基因型多样, 且不同国家和地区流行类别不同。目前, 在人和动物 PoRV 中已鉴定出 35 种 G 基因型、50 种 P 基因型^[8] 和 18 种 I 基因型。

本研究拟对 2021—2022 年采自广东、广西、江西、湖南、云南和贵州 6 个省份的规模化猪场腹泻样品进行 PoRV 检测, 对阳性场样品进行 VP4 和 VP7 基因测序, 采用生物信息学软件进行氨基酸序列分析和系统进化分析, 了解猪群 PoRV 的感染情况和流行

趋势, 丰富 PoRV 分子流行病学资料, 为有效防控 PoRV 提供科学依据, 为新型疫苗研发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 病料样品

2021—2022 年来自广东、广西、江西、湖南、云南和贵州 6 省规模化猪场送检的腹泻样品, 共计 86 个猪场, 6 472 份样品。按 1:1 体积比加入无菌 PBS 并震荡混匀, 反复冻融 3 次, 4 ℃ 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液置于 -20 ℃ 保存备用。

1.2 主要试剂

核酸提取试剂盒购自杭州博日科技股份有限公司, HiScript[®] II One Step RT-PCR Kit、DL2000 plus DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 引物设计

用于检测猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV), 猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV), PoRV, 猪德尔塔冠状病毒 (porcine deltacoronavirus, PDCoV) 和猪急性腹泻综合征冠状病毒 (swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV) 的引物均参照文献 [9-10] 合成。同时, 根据 GenBank 上登录的 PoRV VP7 和 VP4 基因序列分别设计 VP7、VP4 基因特异性扩增引物。所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 引物信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃	产物长度/bp
PEDV	F: GAAATAACCAGGTCGTGGA R: GCTCACGAACAGCCACATTA	55	492
TGEV	F: GATGGCCAGCAGATAGAAGT R: GCAATAGGGTTGCTTGTACC	55	612
PoRV	F: AAAGATGCTAGGGACAAAATTG R: TTCAGATTGTGGAGCYATTCCA	55	309
PDCoV	F: TTCCGCCAATGACTGGAC R: GTAACCGCCACCAGAAAT	55	471
SADS-CoV	F: CAGTCTTGGTTTCGCAATCG R: ACCGTGCTGAACGAGGTCACT	52	449
VP7	F: GGCTTTAAACGAAGTCTTC R: GGTACATCCTCTCACTA	52	1 100
VP4	F: GGCTTCGCTCATTTATAGAC R: GTTGCATTGCATTTCTTTCC	55	810

1.4 临床样品 RT-PCR 检测

吸取备用检测样品 300 μL, 使用博日抽提试剂

盒及配套核酸提取仪, 按操作说明书进行操作, 提取的核酸于 -20 ℃ 保存。使用 HiScript[®] II One Step

RT-PCR Kit 进行配置反应体系, 2×PCR Master Mix 12.5 μL, One Step Enzyme Mix 1.25 mL, 20 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL, RNA 5 μL, RNase-free ddH₂O 5.25 μL, 混合均匀。PCR 反应条件为: 50 °C 30 min, 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物经 1.2% 琼脂凝胶电泳, 判定结果。

1.5 PoRV VP7 和 VP4 基因扩增、测序

对 PoRV 阳性感染猪场的 RT-PCR 检测条带较亮样品的核酸进行 VP7、VP4 基因的扩增, 反应体系为: 2×PCR Master Mix 12.5 μL, One Step Enzyme Mix 1.25 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, 模板 5 μL,

ddH₂O 5.25 μL。反应条件为: 94 °C 5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物经 1.2% 琼脂凝胶电泳, 将阳性扩增产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.6 PoRV VP7 和 VP4 基因型鉴定及序列分析

将测序获得的 VP7 和 VP4 基因的核苷酸序列在 NCBI BLAST 在线分析, 精准确定相应毒株的基因型, 采用 Lasergene 软件、MEGA11.0 等软件进行分析。本研究中所使用的 82 个参考序列 (表 2) 均从 GenBank 获得。

表 2 参考序列

基因名称	毒株	国家	GenBank ID	年份	分型
VP4	NIV94290-Porcine-India-2009	印度	OK398112.1	2022	P [1]
	RVC-Pig-THA-CU200C-16	泰国	MG575522.1	2018	P [1]
	RVA-wt-TWN-106-P-001-1-0278-2017	台湾	OL956956.1	2022	P [3]
	RVA-Human-wt-VNM-12067-91	越南	KX363250.1	2016	P [4]
	RVA-tc-THA-P343-1991	泰国	AB972859.1	2015	P [5]
	RVA-sewage-CHN-B24-R2-2019	中国	MW254171.1	2021	P [6]
	RVA-tc-VNM-NT0042-2007	越南	LC095889.1	2019	P [6]
	RVA-wt-CHN-R1954-2013	中国	KF726067.1	2015	P [6]
	RVA-wt-JPN-BU2-2014	日本	AB924087.1	2015	P [7]
	RVA-tc-BEL-RV277-1977	比利时	KM820722.1	2015	P [7]
	RVA-Pig-wt-VNM-12070-4	越南	KX363279.1	2016	P [8]
	RVA-wt-UGA-KYE-14-A048-2014	乌干达	KX988278.1	2017	P [13]
	CHN-AH1903	中国	OP454320.1	2023	P [13]
	RVA-Pig-wt-BRA-SUI26A-2008	巴西	MH785336.1	2019	P [13]
	RVA-Murine-tc--CHN-SCLS-M-2018	中国	MK606442.1	2019	P [13]
	RVA-Pig-wt-ESP-Orense135260.1-2020	西班牙	MZ643312.1	2022	P [13]
	RVA-wt-THA-CMP-015-12-2012	泰国	KU363154.1	2016	P [19]
	Porcin-P19 Mm17	中国	KX455847.1	2016	P [19]
	RVA-Pig-wt-BRA-SUI25B-2008	巴西	MH785335.1	2019	P [23]
	RVA-tc-CHN-SCMY-A3-2017	中国	MK026438.1	2019	P [23]
VP7	RVA-Pig-tc-JPN-S80B-1980	日本	LC081150.1	2016	G1
	RVC-Pig-THA-CU79C-15	泰国	KX911684.1	2018	G1
	RVA-ZJhz13-4	中国	JX498969.1	2012	G2
	RVA-CMP034	泰国	DQ534015.1	2007	G2
	RVA-A256-005	加拿大	KU954404.1	2016	G2
	RVA-TA-4-2	中国	KT820781.1	2016	G3
	RVA-pig-SVK-TOPC23	斯洛伐克	MN203555.1	2020	G3
	RVA-HeN3	中国	JX498968.1	2012	G3
	RVA-Pig-THA-CU200-16	泰国	KX911622.1	2018	G3

续表2

基因名称	毒株	国家	GenBank ID	年份	分型
	RVA-Pig-wt-THA-CMP-011-09-2009	泰国	MG781057.1	2018	G4
	RVA GZMJ02	中国	KX010477.1	2016	G4
	RVA CMP121	泰国	DQ683522.1	2016	G4
	RVA HLJqqhe-1	中国	JX498960.1	2012	G5
	RVA WF-5-2	中国	KT820783.1	2016	G5
	RVA-Pig-w-ZAF-MRC-DPRU1576-2007	南非	KP752773.1	2015	G5
	RVA-Pig-wt-THA-CMP-001-12-2012	泰国	KT727252.1	2016	G5
	RVA ZJhz9-2	中国	JX498962.1	2012	G5
	RVA-Human-wt-BEL-B10925-1997	比利时	EF554120.1	2011	G6
	RVA-Human-tc-ITA-PA169-1988	意大利	EF554131.1	2011	G6
	RVC-Pig-wt-KOR-1027-2012	韩国	KJ814508.1	2015	G7
	RVA-Turkey-tc-IRL-Ty-3-1979	爱尔兰	LC088119.1	2021	G7
	RVA C-1	韩国	KF500223.1	2014	G8
	RVA-Human-wt-MLI-Mali-048-2008	马里	KP883022.1	2015	G8
	RVB-Pig-wt-USA-MN09-65-2009	美国	JQ043812.1	2012	G8
	PoRV-1-CBNU1	韩国	JQ343835.1	2012	G9
	RVA-pig-China-HN03-2015	中国	KY649279.1	2018	G9
	RVA-Pig-wtCHNSCLSHL-2-32017	中国	MH137265.1	2018	G9
	TA-1-2	中国	KT820779.1	2016	G9
	K-1	日本	AB045374.1	2003	G9
	RVA-pig-CHN-SCSN-96-2017	中国	MT198731.1	2021	G9
	RVA-Pig-wt-CHN-CQ-2015	中国	KX831100.1	2018	G9
	RVA-Pig-wt-USA-Indiana119-1-2014	美国	MN862142.1	2020	G9
	RVA-Pig-wt-CHN-HBHP-2015	中国	KX831114.1	2018	G9
	RVA-Goat-wt-MAR-S19-2012	摩洛哥	MN067449.1	2020	G10
	Por-AM-P66-2012	印度	KF170900.1	2013	G10
	RVA-Pig-wt-CHN-GDSZ-2016	中国	KX831106.1	2018	G11
	RVA-pig-SVK-4CICIAK	斯洛伐克	MN203541.1	2020	G11
	RVA-pig-SVK-3CICIAK	斯洛伐克	MN203540.1	2020	G11
	RVA-A251-092	加拿大	KU954409.1	2016	G11
	RVA ZJhz13-3	中国	JX498966.1	2012	G11
	RVB-Pig-wtUSAMN09-682009	美国	JQ043815.1	2012	G12
	RVA-Pig-wt-UGA-BUW-14-A008-2014	乌干达	KY055421.1	2017	G12
	RVA-Horse-tc-GBR-L338-1991	英国	JF712560.1	2012	G13
	RVA-Horse-wt-ARG-E4040-2008	阿根廷	JN872873.1	2012	G14
	RVA-Cow-wt-ARG-B383-1998	阿根廷	FJ347116.1	2011	G15
	RVA-Mouse-tc-USA-EDIM	美国	MT276814.1	2021	G16
	RVB-wt-USAIA09-672009	美国	JQ043814.1	2012	G16
	Human_RVA-hubei-G17-2013	中国	MG788536.1	2018	G17
	RVB-wt-USAOK09-512009	美国	JQ043799.1	2012	G17
	RVA-Bat-wt-CRC-KCR10-93-2010	哥斯达黎加	MN551603.1	2020	G20
	RVB-wtUSAMO09-132009	美国	JQ043760.1	2012	G20

续表2

基因名称	毒株	国家	GenBank ID	年份	分型
	RVA-Human-wt-SUR-2014735512-2013	苏里南	KX257415.1	2017	G20
	RVB-wtUSAMN09-372009	美国	JQ043784.1	2012	G20
	Human_RVA-hubei-G22-2013	中国	MG788522.1	2018	G22
	Human_RVA-hubei-G21-2014	中国	MG788537.1	2018	G21
	Human_RVA-hubei-G25-2013	中国	MG788524.1	2018	G25
	RVA-Human-wt-BRA-rj24598-2015	巴西	MG407650.1	2018	G26
	TR-RV-SW51	印度	KT277526.1	2015	G26
	RVA-Pig-wt-VNM-VN-72-12-2014	越南	KY021153.1	2017	G26
	RVA-Mouse-CHN-RA61-2013	中国	KU243691.1	2016	G28
	RVA-Buffalo-wt-ZAF-4426-2002	南非	MT234359.1	2021	G29
	RVA-Bat-wt-GHA-K212-2009	加纳	MN567267.1	2020	G30

2 结果

2.1 腹泻样本 PoRV 的检测

2021—2022 年间,共检测了 86 个种猪场的 6 472 份腹泻样品,所有样品均未检测到 TGEV 和 SADS-CoV 病原。PEDV、PoRV 和 PDCoV 猪场阳性率分别为: 11.63% (10/86)、65.12% (56/86) 和 4.65% (4/86), 样品阳性率分别为: 11.80% (764/6 472)、27.89% (1 805/6 472) 和 2.92% (189/6 472), 提示 PoRV 可能是引起这些猪场腹泻的主要病因。此外,几种腹泻病毒还呈现不同程度的混合感染,如 PoRV 和 PEDV 的混合感染率为 4.57% (296/6 472), PoRV 和 PDCoV 的混合感染率为 0.32% (21/6 472)。

2.2 PoRV VP7 基因分型及系统进化分析

将本研究中测序获得的 76 株 PoRV VP7 基因序列与 GenBank 中已知 G 基因型的代表毒株通过 MEGA11.0 软件进行遗传进化分析,结果显示(图 1): 共检测到 8 种基因型,其中 G9 为优势基因型 (42.10%), G5、G26、G3、G4、G1、G2 和 G11 各占 26.32%、9.21%、6.58%、6.58%、3.95%、

2.63% 和 2.63%。云南省猪场检测到除 G4 型以外的 7 种基因型,YNLSTC 猪场在 2 年内监测到 3 种 G 型,分别为 G1、G3 和 G5; 其余监测猪场暂未检测到不同的 G 基因型; 广东省猪场检测到的毒株以 G9 (11/21) 和 G5 (8/21) 为主; 江西省猪场检测到的毒株以 G9 (9/15) 为主; 广西省猪场检测到的毒株以 G9 (4/15) 为主; 湖南省猪场检测到 G9 (5/7) 和 G26 (2/7) 两种基因型。由于轮状病毒各 G 型毒株之间氨基酸的同源性较低,仅对测序获得的 32 株 G9 优势基因型和 9 株参考 G9 基因型的氨基酸进行同源性分析,VP7 基因之间氨基酸同源性为 72.1%~100% (图 2)。测序所获得的 32 株 P [13] 基因与 GenBank 上美国参考毒株 RVA-Pig-wt-USA-Indiana119-1-2014-G9 同源性仅为 72.1%~74.9%。从氨基酸同源性结果来看,监测的猪场目前暂未发现感染美国流行的 G9 基因型毒株。江西的 JXJGC20210102、JXJGC20221027 和广东的 GDH-SYEC20221011、GDCWC20221010 共 4 个毒株同其他 G9 毒株的同源性最高只有 89.9%。



△为本研究中的毒株，▲为NCBI中代表毒株；GZ为贵州省毒株，YN为云南省毒株，JX为江西省毒株，HN为湖南省毒株，GX为广西省毒株，GD为广东省毒株。下同。

图1 基于PoRV VP7序列(1100 bp)利用邻距法构建的遗传进化树

2.3 PoRV VP4 基因分型及系统进化分析

将本研究中测序获得的35株PoRV VP4基因序列与NCBI中已知P基因型的代表毒株通过MEGA11.0软件进行遗传进化分析(图3),结果显示:共检测到5种P基因型,以P[13]型为主,占57.14%,其次为P[7]、P[23]、P[3]和P[6]型,占比分别为20%、14.29%、5.71%和2.86%。广东省猪场检测到P[6]、P[7]、P[13]和P[23]共4种基因型,云南省和江西省猪场检测到P[7]和P[13]2种基因型毒株,广西省猪场检测到P[13]和P[23]2种基因型毒株,湖南省猪场检测到P[3]和P[13]2种基因型毒株,贵州

省检测到P[7]和P[23]2种基因型毒株。由于轮状病毒各P型毒株之间的同源性较低,仅对20株P[13]优势基因型和5株参考P[13]基因型的氨基酸进行氨基酸同源性分析,VP4基因之间氨基酸同源性为72.5%~100%(图4),测序所获得的20株P[13]基因与GenBank上的P[13]型参考毒株RVA-Murine-tc-CHN-SCLS-M-2018同源性在89.3%~97.2%之间,与参考毒株RVA-Pig-wt-BRA-SUI26A-2008同源性在72.5%~76.5%之间,从氨基酸同源性结果来看,猪场P[13]基因型毒株与鼠源轮状病毒较高,推测可能是鼠源轮状病毒通过老鼠感染了猪群。

相似度/%

	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			
1	100.0	91.6	94.9	100.0	90.5	90.7	87.2	91.1	91.2	91.1	92.1	91.2	93.1	91.2	91.1	91.2	91.1	87.8	87.7	89.9	79.3	79.3	75.4	93.4	81.8	1	VP4-YNYLJC20220328.seq	
2	8.3	100.0	93.5	91.6	91.9	91.3	87.9	94.9	94.9	94.9	94.3	94.9	93.6	94.9	94.9	92.5	92.4	89.1	88.7	90.2	79.1	79.1	73.7	93.5	82.4	2	VP4-YNQLC20220519.seq	
3	3.5	5.7	100.0	94.9	93.6	92.7	88.7	94.9	94.5	94.9	95.2	94.5	96.4	94.5	94.9	92.7	92.6	89.1	89.2	91.5	81.7	81.7	74.0	96.4	84.4	3	VP4-YNPPC20220429.seq	
4	0.0	8.3	3.5	100.0	90.5	90.7	87.2	91.1	91.2	91.1	92.1	91.2	93.1	91.2	91.1	91.2	91.1	87.8	87.7	89.9	79.3	79.3	75.4	93.4	81.8	4	VP4-YNLJC20220922.seq	
5	8.7	7.7	6.6	8.7	100.0	98.0	89.2	92.4	92.6	92.4	92.7	92.6	94.1	92.6	92.4	93.4	93.3	90.3	89.9	89.4	81.2	81.2	73.8	93.5	84.2	5	VP4-JXYGC221024.seq	
6	8.5	8.1	7.8	8.5	2.0	100.0	89.4	92.0	92.2	92.0	92.9	92.2	93.6	92.2	92.0	93.6	93.5	90.6	90.2	89.7	81.6	81.6	74.0	93.9	84.6	6	VP4-JXXCC20221012.seq	
7	8.4	8.4	6.2	8.4	5.2	5.1	100.0	87.5	87.5	87.7	87.5	88.8	87.5	87.5	93.6	93.8	92.7	98.5	90.5	77.1	77.1	75.1	88.5	80.2	7	VP4-JXLHC220413.seq		
8	7.9	4.1	5.5	7.9	8.1	8.7	7.6	100.0	99.2	100.0	94.0	99.2	95.3	99.2	100.0	91.3	91.2	88.4	88.3	89.8	79.4	79.4	72.5	94.4	83.3	8	VP4-XJFSC20220810.seq	
9	7.7	4.1	5.9	7.7	7.8	8.4	7.6	0.8	100.0	99.2	95.3	100.0	95.9	100.0	99.2	91.3	91.2	88.4	88.3	89.8	79.8	79.8	72.5	94.8	83.7	9	VP4-JXDWC20220916.seq	
10	7.9	4.1	5.5	7.9	8.1	8.7	7.6	0.0	0.8	100.0	94.9	99.2	95.3	99.2	100.0	91.3	91.2	88.4	88.3	89.8	79.4	79.4	72.5	94.4	83.3	10	VP4-JXATC20220910.seq	
11	6.7	4.8	5.1	6.7	7.7	7.6	7.4	5.4	5.0	0.8	5.0	0.0	4.3	100.0	91.3	91.2	88.4	88.3	89.8	88.4	90.6	80.8	80.8	73.9	96.4	85.1	11	VP4-HNBZTC20220524.seq
12	7.7	4.1	5.9	7.7	7.8	8.4	7.6	0.8	0.0	0.8	5.0	100.0	95.9	100.0	99.2	91.3	91.2	88.4	88.3	89.8	79.8	79.8	72.5	94.8	83.7	12	VP4-GXZGC20221023.seq	
13	5.5	5.5	3.7	5.5	6.0	6.8	6.0	5.0	4.3	5.0	4.6	4.3	100.0	95.9	95.3	93.4	93.3	89.4	89.6	93.1	80.5	80.5	73.9	97.2	84.6	13	VP4-GXFCC202211118.seq	
14	7.7	4.1	5.9	7.7	7.8	8.4	7.6	0.8	0.0	0.8	5.0	0.0	4.3	100.0	91.3	91.2	88.4	88.3	89.8	79.8	79.8	72.5	94.8	83.7	14	VP4-GXFCC20221026.seq		
15	7.9	4.1	5.5	7.9	8.1	8.7	7.6	0.0	0.8	0.0	5.4	0.8	5.0	0.8	100.0	91.3	91.2	88.4	88.3	89.8	79.4	79.4	72.5	94.4	83.3	15	VP4-GXCC20211024.seq	
16	7.3	6.7	5.2	7.3	4.2	4.0	3.3	6.8	6.8	6.8	6.1	6.8	4.5	6.8	6.8	100.0	99.9	94.0	94.3	92.6	79.8	79.8	76.3	93.6	84.0	16	VP4-GDXEC20221011.seq	
17	7.3	6.7	5.2	7.3	4.2	4.0	3.3	6.8	6.8	6.8	6.1	6.8	4.5	6.8	6.8	0.0	100.0	94.1	94.4	92.7	79.6	79.6	76.5	93.5	83.8	17	VP4-GDJSYC20221012.seq	
18	7.7	7.1	5.9	7.7	4.0	3.9	3.0	6.6	6.6	6.6	6.1	6.6	5.4	6.6	6.6	3.0	3.0	100.0	96.0	91.3	77.5	77.5	75.1	89.4	80.3	18	VP4-GDJSYC20220608.seq	
19	8.8	8.5	6.5	8.8	5.3	5.2	0.7	7.6	7.6	7.6	7.5	7.6	6.1	7.6	7.6	3.5	3.5	2.5	100.0	91.2	77.2	77.2	75.4	89.3	80.9	19	VP4-GDGQC20220226.seq	
20	7.9	8.6	5.8	7.9	8.0	7.8	8.0	7.8	7.8	7.8	6.9	7.8	3.9	7.8	7.5	7.5	7.1	8.1	78.2	78.2	76.0	92.1	80.9	80.9	20	V4-HNXOC20220524.seq		
21	23.6	24.7	22.2	23.6	22.7	22.2	21.9	25.7	25.2	25.7	23.7	25.2	24.0	25.2	25.7	22.1	22.1	21.5	22.8	23.5	0.0	100.0	82.6	82.4	78.6	21	RVA-wt-UGA-KYE-14-A048-2014-P	
22	23.6	24.7	22.2	23.6	22.7	22.2	21.9	25.7	25.2	25.7	23.7	25.2	24.0	25.2	25.7	22.1	22.1	21.5	22.8	23.5	0.0	100.0	82.6	82.4	78.6	22	RVA-UGA-KYE-14-A048-2014-P	
23	27.2	29.4	26.8	27.2	27.3	27.0	27.5	29.5	29.5	29.5	27.0	29.5	27.0	29.5	29.5	27.3	27.3	27.9	28.0	28.8	13.9	13.9	74.0	70.9	23	RVA-Pig-wt-BRA-SUI26A-2008-P		
24	5.2	5.7	3.7	5.2	6.8	6.5	6.3	6.0	5.6	6.0	3.8	5.6	2.9	5.6	6.0	4.2	4.2	5.4	6.4	5.1	21.2	21.2	26.8	85.9	24	RVA-Murine-tc-CHN-SCLS-M-2018-P		
25	17.2	17.1	15.8	17.2	15.8	15.4	14.5	17.2	16.7	17.2	14.9	16.7	15.5	16.7	17.2	13.4	13.5	14.5	14.5	16.7	23.7	23.7	28.6	13.9	25	CHN-AH1903.seq		

图 4 P [13] 型毒株 VP4 基因氨基酸同源性比较

2.4 PoRV G/P 基因型分型

35 份样本成功鉴定出 G/P 组合基因型，共包括 15 种 G/P 基因型组合，G9P [13] (28.57%) 为优势组合基因型，其他基因型为 G5P [13] (11.43%)、G4P [13] (8.57%)、G9P [23] (8.57%)、G26P [13] (5.71%)、G1P [7] (5.71%)、G26P [3] (5.71%)、G5P

[7] (5.71%)、G3P [7] (2.86%)、G11P [23] (2.86%)、G5P [23] (2.86%)、G11P [7] (2.86%)、G3P [13] (2.86%)、G5P [6] (2.86%) 和 G4P [7] (2.86%)，其中 G11P [7] 为国内首次鉴定的基因型组合，PoRV 的基因型详细分布见表 3。

表 3 猪场 PoRV 感染基因型的分布

省份	猪场数	样本数	阳性数	G 型	P 型	G/P 组合型
贵州	9	296	135	G1, G3, G5, G11	P [7], P [23]	G1P [7], G3P [7], G11P [23]
云南	15	1 780	512	G1, G2, G3, G5, G9, G11, G26	P [7], P [13]	G5P [7], G5P [13], G9P [13], G11P [7], G26P [13], G3P [13]
江西	15	1 730	487	G3, G4, G5, G9	P [7], P [13]	G5P [7], G4P [13], G9P [13]
湖南	11	563	165	G5, G9, G26	P [3], P [13]	G5P [13], G26P [3], G26P [13]
广西	13	543	134	G2, G5, G9	P [13], P [23]	G5P [13], G5P [23], G9P [13]
广东	23	1 560	372	G4, G5, G9	P [6], P [7], P [13], P [23]	G5P [6], G5P [13], G4P [7], G4P [13], G9P [13], G9P [23]
共计	86	6 472	1 805	G1, G2, G3, G4, G5, G9, G11, G26	P [3], P [6], P [7], P [13], P [23]	G1P [7], G3P [7], G3P [13], G4P [7], G4P [13], G5P [6], G5P [7], G5P [13], G5P [23], G9P [13], G9P [23], G11P [7], G11P [23], G26P [3], G26P [13]

3 讨论

本研究通过对 2021—2022 年贵州、云南、江西、湖南、广西和广东 6 个省共 86 个规模化猪场的 6 472 份仔猪腹泻粪便样本进行了腹泻相关病毒检测，PoRV、PEDV 和 PDCoV 阳性率分别为 27.89%、11.80% 和 2.92%，猪场阳性率分别为 65.12%、

11.63% 和 4.65%；PoRV 和 PEDV 的混合感染率为 4.57%，PoRV 和 PDCoV 的混合感染率为 0.32%。本研究结果表明 PoRV 在不用地区猪场中感染严重且分布广泛，有必要继续加强对不同猪场 PoRV 的监测，为 PoRV 感染的防控提供了重要的科学依据。

VP7 和 VP4 分别决定轮状病毒的 G 型和 P 型，且 G 型与 P 型之间会产生不同的组合，不同组合型

的轮状病毒毒株诱导的交叉保护性低^[3,5]。目前PoRV在全球范围内广泛流行,基因型多样,加强对PoRV不同G/P基因型的监测和研究,对了解PoRV的遗传进化和疫苗研究非常重要。在本研究中,G9和G5为流行G基因型,分别占分型毒株的42.11%和26.32%;P[13]、P[7]和P[23]为流行P基因型,分别占分型毒株的57.14%、20%和14.29%,其中P[13]型PoRV最具多样性和复杂性;优势G/P组合基因型为G9P[13],占分型样本的28.57%。其中广东和云南的组合基因型最为复杂,存在6种不同的基因型组合,推测原因可能是广东和云南猪场PoRV感染率升高的同时,PoRV流行基因型之间重组频率也在逐渐增高,后期应加强对广东、云南地区猪群PoRV分子流行病学的监测,重视对猪群轮状病毒的防控与管理。本研究还在云南地区检测出了G11P[7],该组合基因型首次在国内出现。周群等^[11]对2017—2019年四川省猪A群轮状病毒分子流行病学进行调查,揭示G9型和P[13]型为分别为优势G基因型和P基因型,G9P[23]为优势组合基因型。本研究结果也表明G9和P[13]型为主要的基因型,与周群等^[11]的监测结果一致,但优势组合基因型为G9P[13],与2017—2019年四川地区优势基因型不同。

猪轮状病毒流行率不断增加,遗传多样性越来越复杂。因此,分子流行病学方面的研究应该不断更新,有助于更好地了解PoRV的流行病学特征,对PoRV感染的防控具有重大指导意义,也为新型疫苗候选株的筛选提供了参考。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 456-466.
- [2] 宣长和,孙福先,朱战波,等. 猪病学 [M]. 2版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003: 29-32.
- [3] DICKMAN K G, HEMPSON S J, ANDERSON J, et al. Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cell [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000, 279 (4): G757-766.
- [4] HOSHINO Y, SERENO M M, MIDTHUN K, et al. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity [J]. *PNAS*, 1985, 82 (24): 8701-8704.
- [5] 高华英, 孟红. VP7、VP4与轮状病毒装配及分子流行病学 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2006, 33 (2): 115-117.
- [6] GREENBERG H, MCAULIFFE V, VALDESUSO J, et al. Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus, using monoclonal antibodies [J]. *Infect and Immun*, 1983, 39 (1): 91-99.
- [7] KNIPE D M, HOWLEY P M, COHEN J I, et al. Rotaviruses [M] // RAMING R F. *Fields Virology*; 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013: 1347-1401.
- [8] ROJAS M A, GONCALVES J L S, DIAS H G, et al. Identification of two novel *Rotavirus A* genotypes, G35 and P[50], from Peruvian alpaca faeces [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 55: 71-74.
- [9] 田小艳, 孙华, 邓雨修, 等. 3种致猪腹泻病毒的多重RT-PCR检测 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30 (9): 54-57.
- [10] 刘雨桐, 姚妍婷, 黎芮伶, 等. 中国西南部分地区2020—2021年猪流行性腹泻病毒遗传变异分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (6): 2279-2290.
- [11] 周群, 陈小飞, 阚蕊蕊, 等. 2017—2019年四川地区猪A群轮状病毒的分子流行病学调查 [J]. *中国农业科学*, 2021, 54 (5): 1063-1072.