

张志豪, 李建达, 曹志, 等. 山东地区猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及流行毒株的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 80-88.
ZHANG Z H, LI J D, CAO Z, et al. Molecular epidemiological investigation of porcine epidemic diarrhea virus and isolation and identification of epidemic strains in the Shandong area [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 80-88.

山东地区猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及流行毒株的分离鉴定

张志豪^{1,2#}, 李建达^{2#}, 曹志¹, 曾昊², 任素芳², 张玉玉², 丁罗刚²,
刘飞², 陈智², 孙文博², 于江^{2*}, 吴家强^{2*}

(1. 青岛农业大学动物医学院, 山东 青岛 266109;

2. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所/山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室/农业农村部畜禽生物学重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要: 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 感染可引起仔猪急性腹泻和脱水, 死亡率高。为了明确山东地区 PEDV 的流行趋势与遗传进化情况, 本研究于 2022—2023 年对山东省的 13 个地级市进行了流行病学调查。通过对 PEDV N 基因的 RT-PCR 检测, 结果在 228 份疑似腹泻样本中, PEDV 阳性率达 48.68%; 同时, 在 PEDV 感染的样本中, 发现 PEDV 与猪德尔塔冠状病毒 (PDCoV)、猪轮状病毒 (PoRV) 共感染的现象。对 PEDV 阳性样本进行 S1 基因的扩增测序, 通过 MEGA6 软件对 PEDV 阳性样本进行 S1 基因的遗传进化分析, 发现扩增的 4 株流行毒株属于 G II c 型, 1 株流行毒株属于 G II a 型。进一步对流行毒株进行分离, 通过 PEDV N 基因的检测和间接免疫荧光染色, 证实成功分离到 1 株 PEDV (命名为 SDQD20230628)。对分离株进行 S 基因的遗传进化分析, 发现分离株 S 基因与 G II c 亚型毒株同源性较近。本研究发现 PEDV 仍是引起山东地区猪场腹泻猪主要病毒, 且呈现出 G II c 亚型毒株趋于流行的趋势, 研究结果丰富了山东地区 PEDV 分子流行病学数据, 也为 PEDV 感染的防控提供了理论依据。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 流行病学调查; 病毒分离鉴定; S 基因; 遗传进化; 山东地区

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)07-0080-09

Molecular epidemiological investigation of porcine epidemic diarrhea virus and isolation and identification of epidemic strains in the Shandong area

ZHANG Zhihao^{1,2#}, LI Jianda^{2#}, CAO Zhi¹, ZENG Hao², REN Sufang², ZHANG Yuyu², DING Luogang²,
LIU Fei², CHEN Zhi², SUN Wenbo², YU Jiang^{2*}, WU Jiaqiang^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences/
Shandong Province Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding/Key Laboratory of Livestock
and Poultry Multi-omics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jinan 250100, China)

Abstract: Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection causes acute diarrhea and dehydration in piglets, with a high mortality rate, posing a serious threat to the healthy development of the swine industry in China. In order to clarify the epidemic trend and genetic evolution of PEDV in Shandong Province, we conducted an epidemiological survey in 13 prefecture-level cities in Shandong Province from 2022 to 2023. The detection of the N gene of PEDV showed a positive rate of PEDV in 228 suspected diarrhea samples to be 48.68%. Meanwhile, the co-infection of PEDV with porcine deltacoronavirus (PDCoV) and porcine rotavirus (PoRV) was found in the PEDV-positive samples. Subsequently, the S1 gene of PEDV-positive samples was amplified and sequenced, and the genetic evolution analysis of PEDV-positive

收稿日期: 2024-06-20; 修回日期: 2025-04-23

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2022TXD0041, 2022CXPT010); 山东省现代农业产业技术体系项目 (SDAIT-08); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目 (2023TSGC0849); 济南市新高校 20 条项目 (202333065); 山东省农业科学院农业科技创新工程项目 (CXGC2023F10); 泰山学者工程项目

第一作者: 张志豪, 男, 硕士研究生; 李建达, 男, 博士, 助理研究员。[#]共同第一作者

* 通信作者: 于江, 博士, 研究员, 研究方向为动物病原学与免疫学, E-mail: yujiang_2213@163.com; 吴家强, 博士, 研究员, 研究方向为动物病原学与免疫学, E-mail: wujiaqiang2000@sina.com。

samples was conducted using MEGA6 software, which showed that four prevalent strains belonged to the G II c type and one strain belonged to the G II a subtype. We further isolated the prevalent strains and confirmed the successful isolation of a PEDV strain (named SDQD20230628) through detection of the N gene and indirect immunofluorescence staining. The S gene genetic evolution analysis of the isolated strain showed that the isolated strain had a close homology with the G II c subtype. It was found that PEDV was still the main virus causing diarrhea in pig farms in Shandong Province, and a trend was emerging that the G II c subtype strains were getting prevalent. This study not only enriched the molecular epidemiological data of PEDV in Shandong Province, but also provided important theoretical support for prevention and control of PEDV.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; epidemiological investigation; virus isolation and identification; S gene; genetic evolution; Shandong area

猪流行性腹泻 (porcine eridemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (porcine eridemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种传染性强的猪急性腹泻疾病, 受感染猪主要临床症状为水样腹泻、呕吐、脱水和生长缓慢等, 新生仔猪感染后死亡率可高达 100%^[1]。PEDV 于 20 世纪 70 年代在欧洲被发现^[2], 1978 年比利时学者 Pensaert 首次在电镜下观察到该病毒, 并将该毒株命名为 CV777^[3]。随后在多个欧洲国家暴发^[4], 其临床症状与猪传染性胃肠炎 (transmissible gastroenteritis, TGE) 相似, 最初被称为流行性病毒性腹泻 (epidemic viral diarrhea, EVD)。中国于 1984 年首次发现 PED 病例, 2010 年底 PED 疫情大规模暴发, 给中国养猪业造成重大的经济损失^[5]。

PEDV 属于 α 冠状病毒属 (*Alphacoronavirus*), 基因组全长约为 28 kb^[6], 包括 5' 端和 3' 端两个非翻译区 (UTR) 和 7 个开放阅读框 (ORF1a、ORF1b、S、ORF3、E、M 和 N)^[7]。S 蛋白是 PEDV 表面的一种糖蛋白, 容易发生突变、重组^[8], 表现出遗传多样性^[9], 冠状病毒的 S 蛋白负责诱导中和抗体、与特异性受体结合和细胞膜融合, 其插入和缺失可能与冠状病毒的致病性与组织趋向性有关, 因此 S 蛋白经常被用作靶基因进行 PEDV 的遗传进化分析^[10]。S 蛋白可分为 S1 和 S2 两个亚基, S1 亚基参与病毒粒子与宿主蛋白识别, S2 亚基在病毒入侵细胞过程中发挥重要作用^[11]。

本研究对山东省 PEDV 开展分子流行病学调查, 对流行毒株进行分离鉴定, 根据 S 基因对流行毒株进行遗传进化分析, 同时检测猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV), 猪德尔塔冠状病毒 (porcine deltacoronavirus, PDCoV) 和传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 的阳性率, 分析 PEDV 与这 3 种肠道病毒的共感染情况, 以期对山东省 PEDV 毒株的遗传进化提供参考, 丰富 PED 的流行病学数据。

1 材料与方法

1.1 试剂和细胞

BioFlux RNA 提取试剂盒购自 BIOER 公司; HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)、2× Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 购自 Vazyme 公司; Premix Taq (TaKaRa Taq Version 2.0 plus dye)、DL1000 Marker、DL2000 Marker、DL5000 Marker 购自 TaKaRa 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自 BI 公司; DMEM 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; PEDV N 蛋白单克隆抗体由本实验室制备; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的兔抗鼠 IgG 二抗购自 Absin 公司。Vero E6 细胞系由本实验室保存。

1.2 临床样本采集及病毒检测

2022—2023 年, 从山东省 13 个地级市猪场共采集 228 份腹泻仔猪的小肠及粪便。取腹泻仔猪小肠组织剪碎, 加入 1×PBS 稀释并用匀浆机磨碎, 反复冻融 3 次并离心。

根据 BioFlux 核酸提取试剂盒说明书提取样本 RNA, 通过 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 对获得的 RNA 进行反转录, 反转录程序如下: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。

对获得的 cDNA 进行 PCR 扩增, 用于检测 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV, 扩增引物见表 1。扩增程序如下: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 32 个循环; 72 °C 终止延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

1.3 PEDV S1 基因 PCR 扩增及测序分析

针对 PEDV S1 基因 PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min 30 s, 循环 32 次; 72 °C 终止延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为阳性的样本送至北京擎科生物科技有限公司测序。

表 1 引物序列

目标基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp	退火温度/℃
PEDV N	PEDV-F	GAAATAACCAGGGTGGTGA	492	56
	PEDV-R	GCTCACGAACAGCCACATTA		
TGEV N	TGEV-F	GATGGCGACCAGATAGAAGT	612	56
	TGEV-R	GCAATAGGGTTGCTTGCTACC		
PDCoV M	PDCoV-F	CGCGTAATCGTGTGATCTATGT	541	56
	PDCoV-R	CCGGCCTTTGAAGTGGTTAT		
PoRV VP6	PoRV-F	CTTCGACATGGAGGTTCTGTACTC	329	56
	PoRV-R	CATTTGCTTGCGATTCTCTAG		
PEDV S1	PEDV-S1-F	TTTCTAATCATTTGGTCAAC	2 315	52
	PEDV-S1-R	CAATACTGCCAGATTTACA		
PEDV S2	PEDV-S2-F1	GTCATAGTGGTGCCAACCTTATTGC	1 815	56
	PEDV-S2-R1	CATAACGCTGAGATTGCGATTTAAC		
	PEDV-S2-F2	TACTAATGGCCTTGCTACTGTTGA	1 435	56
	PEDV-S2-R2	AAGAAACATCACTGCACGTGG		

1.4 病毒的分离与鉴定

取 PEDV 阳性组织样本进行研磨,组织匀浆液反复冻融 3 次后,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 10 min。用 0.22 μm 滤器过滤上清液,取 500 μL 过滤液与 500 μL DMEM (含 10 μg 胰酶和 1% 双抗)混合均匀,作为接毒液。

待 Vero E6 细胞密度长至 80% 左右,将处理好的接毒液接种于 Vero E6 细胞,同时设置一个阴性对照 (500 μL PBS 与 500 μL DMEM 混匀,含 10 μg 胰酶和 1% 双抗),37 ℃ 孵育 1 h。孵育结束后,用 1×PBS 清洗 3 次,加入维持液 (含 1% 双抗和 10 μg/mL 胰酶)培养 48~72 h。至细胞出现明显病变 (CPE) 时,反复冻融 3 次,收集病毒。盲传 3 代后,提取 RNA,通过 RT-PCR 扩增 PEDV N 基因 (参见 1.2) 和间接免疫荧光试验 (IFA) 鉴定。

1.5 IFA 检测

将 Vero E6 细胞铺于 24 孔板中的爬片上,待细胞融合度至 80% 左右,取 200 μL 接毒液接种。孵育 1 h 后,用 1×PBS 清洗 3 次,加入维持液 (含 1% 双抗和 10 μg/mL 胰酶),培养 48~72 h。待细胞出现 CPE 时,弃去维持液,加入 200 μL 4 ℃ 预冷的 4% 多聚甲醛固定 10 min。用 1×PBS 清洗 3 次,加入 200 μL 0.1% Triton X-100 透化细胞,室温孵育

15 min 后,用 1×PBS 清洗 3 次。用 5% BSA 封闭液室温孵育 30 min,用 1×PBS 清洗 3 次,加入抗 PEDV-N 蛋白单克隆抗体 (1:200),置于 37 ℃ 温箱中孵育 60 min。用 1×PBS 清洗 3 次,加入 FITC 标记兔抗鼠 IgG 二抗 (1:100),避光孵育 1 h 后,用 1×PBS 清洗 3 次,加入 DAPI 染液 (1:1 000) 避光孵育 10 min。用 1×PBS 清洗 3 次,滴加抗荧光淬灭封片剂封片后,置于荧光倒置显微镜下观察。

1.6 分离株的 S 基因扩增及测序

参考 PEDV CH/JLDH/2016 (GenBank: MF346935) 株,设计扩增分离毒株的 S 基因全长引物,分三段扩增,扩增引物见表 1。S1 片段扩增见 1.3。针对 PEDV S2 基因 PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,循环 32 次;72 ℃ 终止延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定为阳性的样本送至北京擎科生物科技有限公司测序。

1.7 PEDV 分离株的 S 基因序列比对和遗传进化树构建

通过 DNASTAR 软件比较分离株 S 基因序列与 NCBI 中 PEDV 毒株参考序列 (表 2) 的同源性,对分离株的序列进行遗传进化分析。

表 2 PEDV 参考毒株及序列信息

毒株名称	国家	登录号	S 基因长度/bp
AJ1102	中国	JX188454	4 158
attenuated DR13	韩国	JQ023162	4 149
CH/GDGZ/2012	中国	KF384500	4 158
CH/JLDH/2016	中国	MF346935	4 158
CV777	瑞士	AF353511	4 152
GD-1	中国	JX647847	4 158
GD-A	中国	JX112709	4 158
GER/L00719/2014	德国	LM645058	4 152
JS2008	中国	KC210146	4 149
KNU-1406-1	韩国	KM403155	4 152
LC	中国	JX489155	4 158
LZC	中国	EF185992	4 152
OH851	美国	KJ399978	4 152
OH15962	美国	KJ584361	4 161
PEDV-LN _{sy}	中国	KY007140	4 173
SM98	韩国	GU937797	4 152
USA/Colorado/2013	美国	KF272920	4 161
USA/Iowa106/2013	美国	KJ645695	4 152
virulent DR13	韩国	JQ023161	4 152
ZL29	中国	KU847996	4 152
85-7	中国	KX839246	4 143
SD-M	中国	JX560761	4 149
USA/Iowa/16465/2013	美国	KF452322	4 161
USA/Indiana34/2013	美国	KJ645641	4 161
GDS01	中国	KM089829	4 158
CH/HNLH/2015	中国	KT199103	4 161
PEDV-LYG	中国	KM609212	4 161
CH/JXJA/2017	中国	MF375374	4 161
XM1-2	中国	KX812523	4 161
PEDV-SX	中国	KY420075	4 149
CH/GZSB/05/2020	中国	MZ161080	4 164

2 结果

2.1 PEDV 分子流行病学调查

2022—2023 年, 在山东省 13 个地级市的猪场共采集 228 份疑似腹泻样本, 通过 RT-PCR 检测发现 PEDV 阳性率为 48.68% (111/228), PoRV 阳性率为 7.89% (18/228), PDCoV 阳性率为 3.07% (7/228), TGEV 未检出。对 PEDV 阳性样本溯源发现, 所采集样本的 13 个地级市均出现 PEDV 感染,

阳性率达 40%~61.54% (表 3)。此外, 在 111 份 PEDV 阳性样本中发现, PEDV 与 PoRV 共感染率为 7.21% (8/111), 与 PDCoV 共感染率为 3.6% (4/111)。

表 3 2022—2023 年山东省 PEDV 流行病学调查数据统计

地区名称	样本数/份	阳性数/份	阳性率/%
东营	26	16	61.54
德州	11	6	54.55
聊城	15	8	53.33
滨州	29	15	51.72
菏泽	30	14	46.67
泰安	15	7	46.67
烟台	13	6	46.15
临沂	11	5	45.45
济宁	9	4	44.44
淄博	18	8	44.44
济南	34	15	44.12
青岛	7	3	42.86
潍坊	10	4	40.00
合计	228	111	48.68

2.2 PEDV 阳性样本的 S1 基因扩增及遗传进化分析

为分析 PEDV 在山东省内的遗传进化规律, 进一步通过针对 PEDV-S1 设计的引物对 PEDV 阳性样本进行 S1 基因的扩增和测序。利用生物信息软件 DNASTAR 和 MEGA6, 将测序获得的 PEDV S1 基因与 NCBI 上国内外具有代表性的 PEDV 毒株 S1 基因序列进行比对分析, 发现 5 株 PEDV 均属于 G II 型, 其中 4 株属于 G II c 亚型, 1 株属于 G II a 亚型, 提示 G II c 亚型毒株在山东省有成为流行毒株的趋势 (图 1)。

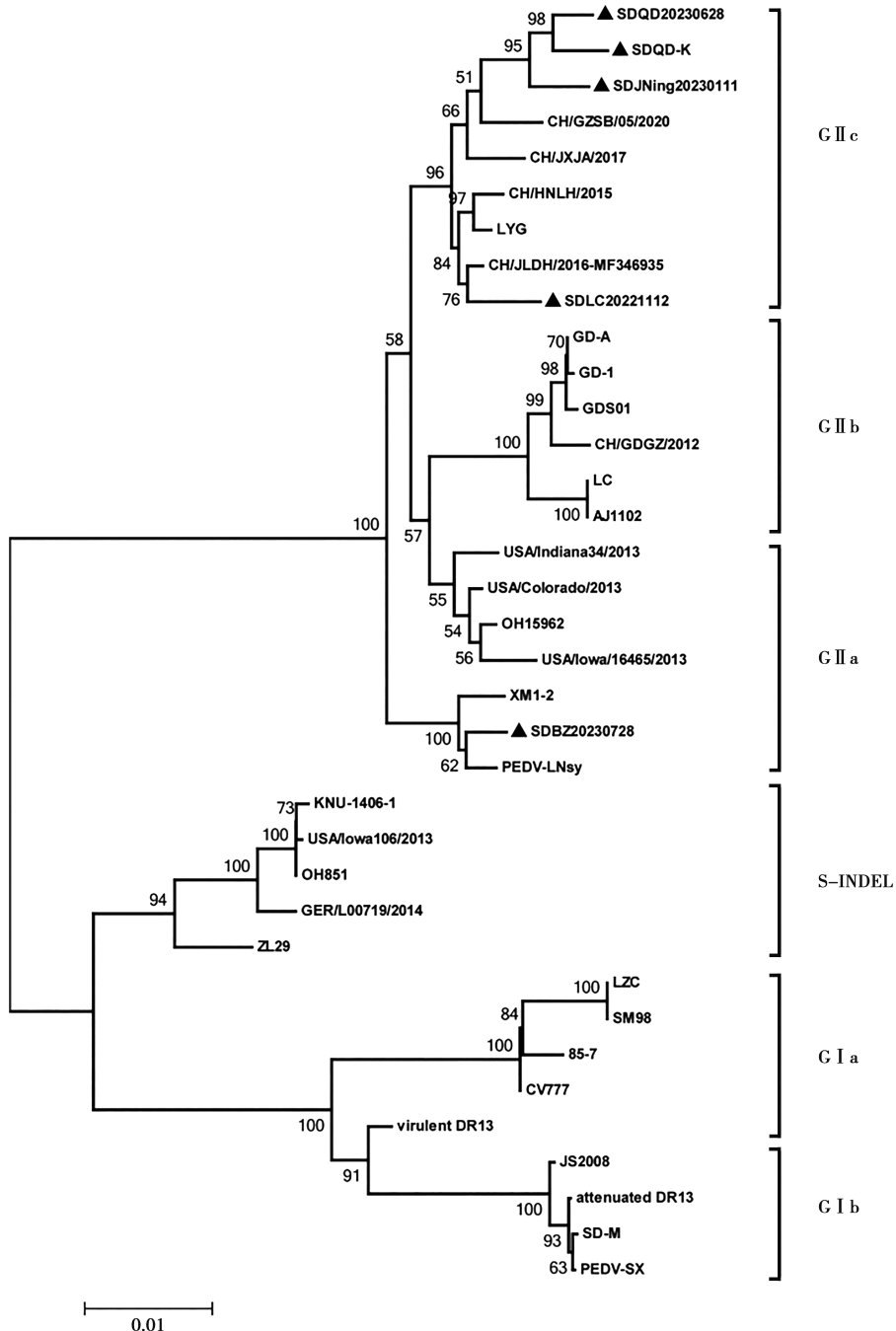
2.3 PEDV 毒株的分离鉴定

将 PEDV 阳性的小肠组织研磨、冻融后, 取过滤后的上清液接种于 Vero E6 细胞, 分离 PEDV 毒株。盲传 3 代后, Vero E6 细胞出现典型的“合胞体”样病变 (图 2A)。随后, 通过蚀斑试验纯化 PEDV 毒株。通过 IFA 试验, 利用 PEDV N 蛋白的单克隆抗体, 对纯化的 PEDV 毒株进行鉴定。结果显示, 接毒 24 h 后在细胞中形成明显的簇状荧光 (图 2B), 证实成功分离到 1 株 PEDV 毒株, 将其命名为 SDQD20230628。根据 Reed-Muench 法测定该分离株的毒价, 结果显示, SDQD20230628 株纯化后第三代接毒液的毒价为 $10^{5.9}$ TCID₅₀/mL。

2.4 SDQD20230628 株的 S 基因序列扩增及遗传进化分析

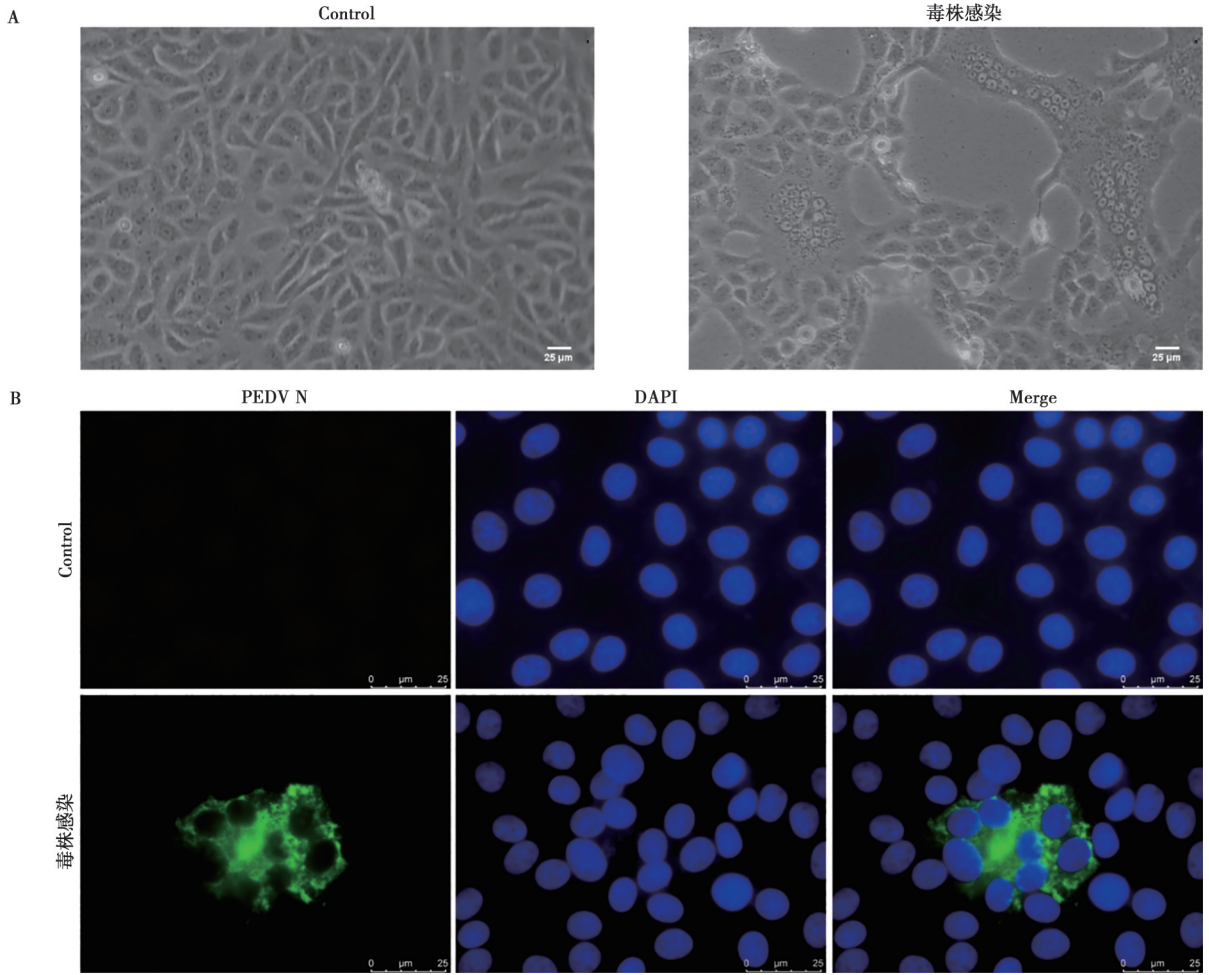
用 MEGA6 对 SDQD20230628 株和 NCBI 国内外 32 株 PEDV 参考毒株的 S 基因进行同源性对比 (图 3) 和遗传进化树构建 (图 4) 以分析其遗传变异情况, 遗传进化树采用 Neighbor-Joining 方法进行绘制, 并进行 1 000 次 Boot strap 计算。结果显示, 32 株 PEDV 序列主要形成 G I a、G I b、G II a、G II b、

G II c 和 S-INDEL 这 6 个基因亚型, 本研究分离株属于 G II 基因群, 与 G I a 代表毒株同源性为 93.6%~94.8%, 与 G I b 代表毒株同源性为 93.7%~94%, 与 S-INDEL 代表毒株同源性为 96.1%~96.2%, 与 G II a 代表毒株同源性为 98.1%~98.5%, 与 G II b 代表毒株同源性为 97%~98.4%, 与 G II c 亚型代表毒株同源性为 98.6%~98.8%。遗传进化树和同源性分析结果显示, SDQD20230628 株属于 G II c 亚型。



▲代表本研究测序的 PEDV 阳性样品。

图 1 基于 PEDV S1 基因对本研究测序毒株构建遗传进化树



A. 毒株感染 24 h 后的细胞病变 (标尺 = 25 μm); B. 通过 IFA 观察毒株感染 24 h 后在细胞中的分布 (标尺 = 25 μm)。

图 2 PEDV SDQD20230628 株感染 Vero 细胞引起的病变观察

		同源性/%																																		
		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	29	30	31	32	33		
差异性/%	1	■	98.7	93.4	96.1	98.5	98.2	93.7	93.7	93.4	98.5	98.3	98.4	96.1	94.7	98.1	96.2	93.4	97.3	93.7	97.0	98.8	98.7	98.4	98.6	93.9	93.7	97.3	97.3	97.2	96.2	94.0	96.1	97.4	1	SDQD20230628.seq
	2	1.3	■	93.6	96.7	98.9	98.7	94.0	94.0	93.6	99.1	98.9	98.8	96.6	95.1	98.7	96.8	93.6	97.6	94.1	97.3	99.1	99.5	99.0	99.1	94.1	94.0	97.6	97.7	97.5	96.8	94.3	96.6	97.6	2	LYG_HM609212(Glc).seq
	3	7.0	6.7	■	95.3	93.6	93.5	96.4	96.3	100.0	93.6	93.5	93.9	95.2	97.9	93.5	95.0	98.8	93.7	96.4	93.3	93.4	93.5	93.6	93.5	99.4	96.3	93.5	93.4	95.4	96.4	95.3	93.7	3	LZC_EF185992.seq	
	4	4.0	3.4	4.9	■	96.8	96.8	96.0	95.9	93.3	97.0	97.1	97.1	99.9	97.0	96.6	98.9	95.2	95.3	96.0	95.1	96.4	96.7	96.3	96.5	96.8	95.9	95.2	95.1	99.6	96.2	99.9	95.3	4	CH551_K059978.seq	
	5	1.5	1.1	6.8	3.2	■	98.7	94.1	94.0	93.6	99.8	99.5	99.7	96.8	95.0	98.7	96.8	93.5	98.1	94.1	97.7	98.6	98.9	98.5	98.7	94.1	94.0	98.0	97.9	96.7	94.4	96.8	98.1	5	CH5962_K684361.seq	
	6	1.9	1.4	6.8	3.3	1.3	■	93.9	93.9	93.5	98.8	98.8	98.6	96.7	95.0	99.4	97.0	93.5	97.3	93.9	97.0	98.4	98.7	98.2	98.4	94.1	93.9	97.2	97.3	97.2	96.9	94.1	96.7	97.4	6	PEDV_Unby_K007140.seq
	7	6.7	6.3	3.7	4.2	6.2	6.4	■	99.9	98.4	94.0	93.9	94.3	95.9	98.4	93.9	95.5	96.4	94.0	99.9	93.7	93.7	93.9	94.0	93.7	96.9	99.9	93.8	93.9	93.8	96.0	98.7	95.9	94.0	7	PEDV_Sx_K0820075.seq
	8	6.7	6.3	3.8	4.2	6.2	6.4	0.1	■	96.3	94.0	93.9	94.3	95.9	98.3	93.8	95.4	96.3	93.9	99.8	93.6	93.7	93.9	94.0	93.7	96.8	99.8	93.8	93.8	93.7	96.0	99.6	95.9	93.9	8	SD_M_J660761.seq
	9	7.0	6.7	0.0	4.9	6.8	6.8	3.7	3.8	■	93.6	93.5	93.9	95.2	97.9	93.5	95.0	98.8	93.7	96.4	93.3	93.4	93.5	93.6	93.5	99.4	96.3	93.5	93.5	93.4	95.4	96.4	95.3	93.7	9	SM88_GL83797.seq
	10	1.5	0.9	6.7	3.1	0.2	1.2	6.3	6.3	6.7	■	99.6	99.6	97.0	95.1	98.8	96.9	93.6	98.1	94.1	97.7	98.7	99.0	98.6	98.8	94.2	94.0	98.0	97.9	96.8	94.3	97.0	98.2	10	USAQIcrado2013_KF272920.seq	
	11	1.6	1.0	6.7	2.9	0.4	1.1	6.3	6.3	6.7	0.3	■	99.3	97.0	95.0	98.8	96.7	93.4	97.8	94.0	97.4	98.6	98.9	98.5	98.6	94.0	93.9	97.6	97.7	97.6	96.8	94.2	97.0	97.8	11	USAIrindras34.2013_K0645641.seq
	12	1.7	1.2	6.4	3.0	0.3	1.5	5.9	6.0	6.4	0.4	0.6	■	97.1	95.3	98.5	97.1	93.8	97.9	94.4	97.6	98.4	98.8	98.3	98.5	94.4	94.3	97.8	97.8	97.7	97.0	94.6	97.1	97.9	12	USALova164652013_KF452322.seq
	13	4.1	3.4	4.9	0.1	3.3	3.3	4.2	4.3	4.9	3.1	2.9	3.0	■	97.0	96.6	98.9	95.2	95.2	96.0	95.1	96.3	96.7	96.2	96.5	96.8	95.9	95.2	95.2	95.1	99.6	96.2	99.9	95.3	13	USALova1062013_K0645695.seq
	14	5.5	5.1	2.1	3.0	5.2	5.2	1.6	1.7	2.1	5.1	5.1	4.8	3.1	■	95.0	96.6	97.8	95.0	98.4	94.7	94.7	95.0	95.0	94.8	98.5	98.4	94.9	94.9	94.8	97.2	98.4	97.0	95.0	14	Virus1_DR13_J023161.seq
	15	1.9	1.4	6.8	3.5	1.3	0.6	6.4	6.5	6.8	1.2	1.1	1.5	3.5	5.2	■	96.8	93.5	97.3	93.9	97.0	98.3	98.6	98.1	98.4	94.0	93.8	97.3	97.2	96.8	94.1	96.6	97.3	15	XM1-2_K0812523.seq	
	16	3.9	3.3	5.2	1.1	3.3	3.1	4.7	4.8	5.2	3.2	3.3	3.0	1.1	3.5	3.3	■	94.9	95.4	95.5	95.2	96.5	96.8	96.3	96.6	95.5	95.4	95.3	95.4	95.3	99.0	95.8	99.9	95.4	16	Z29_KL847896.seq
	17	7.0	6.7	1.2	5.0	6.9	6.9	3.7	3.8	1.2	6.8	6.8	6.5	5.0	2.2	6.9	5.3	■	93.7	96.4	93.3	93.3	93.5	93.6	93.4	99.3	96.4	93.4	93.4	95.3	95.3	96.4	95.2	93.7	17	85-7_K0830246.seq
	18	2.7	2.5	6.6	4.9	1.9	2.7	6.3	6.4	6.6	1.9	2.2	2.2	4.9	5.2	2.8	4.8	6.6	■	93.9	98.7	97.4	97.6	97.9	97.4	94.2	93.9	98.2	99.2	99.2	95.3	94.2	95.2	100.0	18	AI1102_J0188454.seq
	19	6.7	6.2	3.7	4.1	6.2	6.4	0.1	0.2	3.7	6.2	6.2	5.9	4.2	1.6	6.4	4.7	3.7	6.4	■	93.7	93.7	94.0	94.0	93.7	96.9	99.9	93.9	93.9	93.8	96.1	99.6	96.0	93.9	19	Atenuated_DR13_J023162.seq
	20	3.1	2.7	7.0	5.1	2.4	3.1	6.6	6.7	7.0	2.4	2.6	2.5	5.1	5.5	3.0	5.0	7.1	1.3	6.6	■	97.1	97.4	97.7	97.1	93.8	93.7	99.3	99.3	99.2	95.1	94.0	95.1	98.7	20	CHCZ2012_KF384500.seq
	21	1.2	0.9	6.9	3.7	1.4	1.6	6.7	6.7	6.9	1.3	1.4	1.6	3.8	5.5	1.7	3.6	7.0	2.7	6.6	2.9	■	99.0	98.7	99.4	93.9	93.7	97.4	97.5	97.4	96.5	94.0	96.3	97.4	21	CHZSB052020_M2161080(Glc).seq
	22	1.3	0.5	6.8	3.4	1.1	1.4	6.4	6.4	6.8	1.0	1.3	3.4	5.2	1.4	3.3	6.9	2.4	6.3	2.7	1.0	■	98.9	98.1	94.1	93.9	97.6	97.7	97.5	96.9	94.2	96.6	97.7	22	CHNLH2015_KT199103(Glc).seq	
	23	1.6	1.0	6.7	3.8	1.5	1.8	6.3	6.3	6.7	1.4	1.5	1.7	3.9	5.2	1.9	3.8	6.8	2.2	6.3	2.4	1.1	■	98.7	94.1	94.0	98.0	98.1	98.0	96.4	94.3	96.2	97.9	23	CHLJD2016-MF346935.seq	
	24	1.4	0.9	6.9	3.6	1.4	1.6	6.6	6.7	6.9	1.2	1.3	1.5	3.6	5.5	1.7	3.5	7.0	2.7	6.6	2.9	0.7	0.9	1.3	■	94.0	93.7	97.4	97.5	97.4	96.6	94.0	96.4	97.4	24	CHLJXA2017-MF375374(Glc).seq
	25	6.4	6.1	0.6	4.4	6.2	6.2	3.2	3.2	0.6	6.1	6.2	5.8	4.4	1.5	6.3	4.6	0.7	6.0	3.2	6.5	6.4	6.2	6.1	6.3	■	96.9	94.0	94.0	95.9	97.0	95.8	94.2	25	CH177_AF335111.seq	
	26	6.7	6.3	3.8	4.2	6.3	6.4	0.1	0.2	3.8	6.3	6.3	6.0	4.2	1.7	6.5	4.7	3.7	6.4	0.1	6.7	6.7	6.4	6.3	6.7	3.2	■	93.8	93.9	96.0	96.0	95.9	93.9	26	CH177_AF335111.seq	
	27	2.8	2.4	6.9	5.0	2.1	2.8	6.5	6.5	6.9	2.3	2.3	2.3	5.0	5.3	2.8	4.9	6.9	0.8	6.4	0.7	2.6	2.4	2.0	2.6	6.3	6.5	■	100.0	99.8	95.3	94.1	95.1	99.2	27	GD-1_J0647847.seq
	28	2.7	2.4	6.8	4.9	2.0	2.8	6.4	6.5	6.8	2.0	2.3	2.2	5.0	5.3	2.8	4.8	6.8	0.8	6.4	0.7	2.6	2.4	2.0	2.6	6.3	6.4	0.0	■	99.9	95.3	94.2	95.2	99.2	28	GD-A_J0112709.seq
	29	2.8	2.5	6.9	5.1	2.2	2.9	6.5	6.6	6.9	2.1	2.4	2.4	5.1	5.4	2.9	4.9	6.9	0.8	6.5	0.8	2.5	2.1	2.7	6.3	6.6	0.2	0.1	■	95.2	94.0	95.1	99.2	29	GD31-M089829.seq	
	30	3.9	3.2	4.8	0.4	3.4	3.2	4.1	4.1	4.8	3.3	3.2	3.1	0.4	2.9	3.3	1.0	4.9	4.8	4.0	5.1	3.6	3.2	3.7	3.4	4.2	4.1	4.9	4.9	5.0	■	96.3	99.5	95.4	30	GERUD07192014-IM645058.seq
	31	6.3	5.9	3.7	3.9	5.9	6.1	0.3	0.4	3.7	5.9	6.0	5.6	4.0	1.6	6.2	4.4	3.7	6.0	4.4	6.3	6.3	6.1	6.0	6.3	3.1	0.4	6.2	6.1	6.3	3.8	■	96.2	94.2	31	JS2008-KC210146.seq
	32	4.1	3.5	4.9	0.1	3.3	3.4	4.2	4.3	4.9	3.1	3.0	3.0	0.1	3.0	3.5	1.1	5.0	4.2	5.1	3.8	3.4	3.9	3.7	4.4	4.2	5.0	5.0	5.1	0.5	4.0	■	95.3	32	KNJ-1406-1_KM03155.seq	
	33	2.7	2.4	6.6	4.9	1.9	2.7	6.3	6.4	6.6	1.9	2.1	2.1	4.9	5.2	2.7	4.7	6.6	0.0	6.4	1.3	2.7	2.4	2.1	2.7	6.0	6.4	0.8	0.8	0.8	4.8	6.0	4.9	■	33	LC_J049155.seq
	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	29	30	31	32	33			

图 3 SDQD20230628 株与参考毒株 S 基因的同源性比对

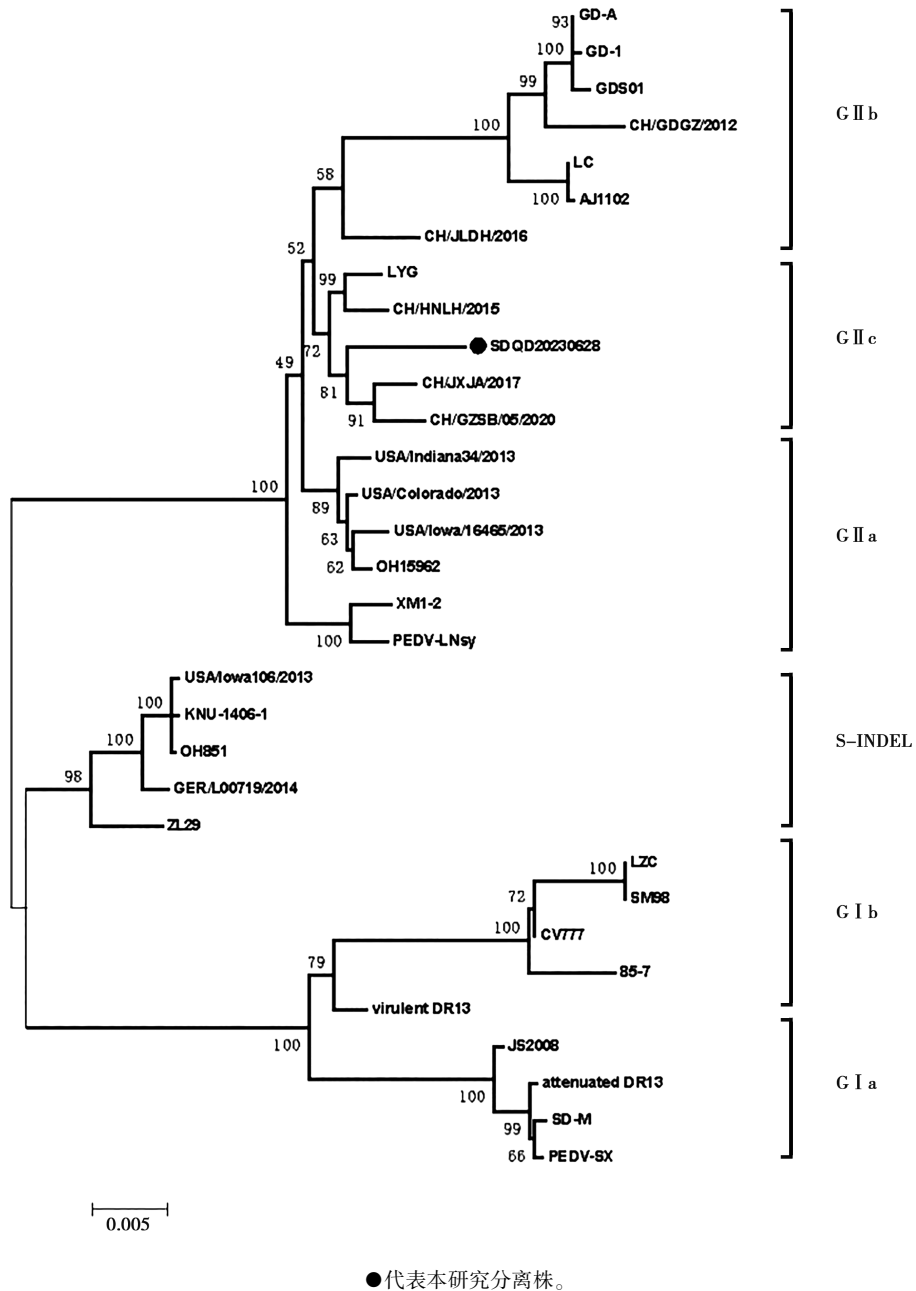


图 4 基于 PEDV S 基因对分离株 SDQD20230628 构建遗传进化树

3 讨论

自从 PEDV 被首次发现以来, 该病毒已经在全球范围内传播, 尽管在全国范围内开展了 PEDV 疫苗接种, 但由于 PEDV S 基因表现出遗传多样性, 传统毒株疫苗保护效果不佳, 并未对该病毒产生有效控制, PEDV 的传播和流行至今仍然威胁着我国养猪业的健康发展。我国于 1973 年首次出现 PED 相关报道, 但只是描述其症状与传染性胃肠炎相似, 直到 1984 年才确定病原体是 PEDV^[12]。在 2010 年前, PEDV 在我国呈地区性流行, 猪感染后死亡率较低, 造成经济

损失相对较小。2010 年底, PEDV 发生变异, 导致我国猪场暴发仔猪腹泻和极高死亡率的疫情^[13], 对我国养猪业造成了较大的经济损失^[14]。近年来, 国内研究人员对 PEDV 分子流行病学进行了大量的持续性跟踪研究。据报道, 2011—2012 年, 我国 12 个省份的 PEDV 阳性率高达 61.11%^[15]。2012—2016 年, 张月等^[16]在山东省 13 个地区的 PEDV 分子流行病学调查发现, PEDV 的年检出率高达 72.1%。2016—2018 年, 四川地区 PEDV 阳性率为 49.29%^[17]。2015—2018 年, Su 等^[10]对我国 PED 进行了区域较为广泛的流行病学调查, 发现 PEDV 阳性率高达

66.85%。2017—2020年,华北地区猪场 PEDV 核酸阳性率平均为 27.63%^[18]。赵文影等^[19]在 2020—2021 年对我国 16 个省份腹泻病料的临床检测发现, PEDV 总阳性率为 66.80%, 且大部分为 G II 型流行毒株。本研究在 2022—2023 年采集的 228 份腹泻样本中发现, PEDV 阳性率为 48.68%, PoRV 阳性率为 7.89%, PDCoV 阳性率为 3.07%, TGEV 未检出, 表明目前 PEDV 仍是导致山东省猪场腹泻的主要病毒。

PEDV 目前共有 G I a、G I b、G II a、G II b、G II c 和 S-INDEL 这 6 个基因亚型。在 2010 年前, PEDV 在我国呈零星散布, 以 G I 型为主; 2010 年后, G II 型变异毒株在我国广泛传播。根据李智丽等^[20]在 2011—2015 年对我国南方 5 个省份的 PEDV 分子流行病学调查数据统计, G II 型毒株占比为 88.57%。我国东部地区 2017—2018 年间, PEDV G II 型毒株占比 92%^[21]。根据大量 PEDV S 基因的规模相似性比较和重组分析, 证明 G II c 亚型是由 G II b 亚型和 S-INDEL 型毒株重组而来^[22]。Tian 等^[23]在 2014—2018 年从我国西南地区分离出的 9 株 PEDV 中, 有 7 株属于 G II c 亚型。Bai 等^[24]研究发现, 2017—2022 年检测到的 G II c 亚型毒株数量有所增加。本研究对成功测序的 5 个 PEDV S1 基因的遗传进化分析结果表明, 其中 4 株属于 G II c 亚型; 从山东省分离出的 SDQD20230628 株的 S 基因与 G II c 亚型代表毒株 S 基因同源性高达 98.6%~98.8%, 表明该毒株属于 G II c 亚型。这提示 G II c 亚型毒株在山东省有成为流行毒株的趋势。

PEDV 的靶细胞是猪小肠上皮细胞, 小肠肠腔内部环境复杂, 常存在各种内源性或外源性病原体, PEDV 感染可能伴随其他肠道病毒的混合感染。有研究表明, 通过给母猪口服表面活性素, 可以提高母猪初乳中细胞免疫和体液免疫水平, 从而提高仔猪肠道免疫力, 降低仔猪 PED 发病率^[25]。Zhang 等^[26]2013 年报道, PEDV 单一感染仅占 13.9%, 多数病例为混合感染。Zhang 等^[27]2014 年的研究表明, 在中国, 猪腹泻病原共同感染流行率很高, 所有样本都同时感染了至少 2 种不同的病毒, 且病毒群落多样。Su 等^[10]报道, 2015—2018 年在 363 例 PEDV 阳性样本中, PEDV 单一感染比例仅占 1.38%, 与 PDCoV 的共感染率为 69.23%, 与 TGEV 的共感染率为 45.65%。本研究发现, 在 PEDV 阳性样本存在与其他肠道病毒共感染的现象, 与 PoRV 共感染率为 7.21%, 与 PDCoV 共感染率为 3.6%, 严重加剧了 PEDV 的防控难度。

4 结论

本研究对 2022—2023 年山东地区 PEDV 分子流

行病学调查发现, PEDV 阳性率达 48.68%, 表明 PEDV 仍是引起山东地区仔猪腹泻的主要病毒; 同时, PEDV 存在与其他肠道病毒共感染。通过对 PEDV 阳性样本分离纯化, 得到 1 株 PEDV 毒株, 命名为 SDQD20230628, 遗传进化分析表明该毒株属于 G II c 亚型。本研究丰富了山东地区 PED 的流行病学数据, 为 PED 的防控提供理论基础。

参考文献:

- [1] XIN Y, WEN T Q, YU Q Z, et al. A new PEDV strain CH/HLJS/2022 can challenge current detection methods and vaccines [J]. *Virology Journal*, 2023, 20 (1): 13.
- [2] 张海明, 田野, 王艳丽, 等. 猪流行性腹泻病毒流行病学调查综述 [J]. *猪业科学*, 2014, 31 (3): 90-91.
- [3] PENSEART M B, DE BOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. *Archives of Virology*, 1978, 58 (3): 243-247.
- [4] PARK N G, SONG S, CHOE S, et al. Spike gene analysis and prevalence of porcine epidemic diarrhea virus from pigs in South Korea; 2013-2022 [J]. *Viruses*, 2023, 15 (11): 2165.
- [5] LEE C H. Porcine epidemic diarrhea virus; an emerging and re-emerging epizootic swine virus [J]. *Virology Journal*, 2015, 12: 193.
- [6] 尤永君, 刘思桐, 王幸, 等. 猪流行性腹泻病毒流行病学调查及毒株致病力研究 [J]. *天津科技*, 2023, 50 (S1): 81-87.
- [7] 郭子仪, 孙亚威, 许夕雅, 等. 2 株 G II b 亚群猪流行性腹泻病毒分离、鉴定及变异分析 [J]. *中国兽医学报*, 2023, 43 (10): 2005-2012.
- [8] LIUH X, YIN X R, YIAN H L, et al. The S protein of a novel recombinant PEDV strain promotes the infectivity and pathogenicity of PEDV in mid-west China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69 (6): 3704-3723.
- [9] 邱存义, 杨业民, 张静雅, 等. 猪流行性腹泻病毒 PEDV-NX-2022 株的分离鉴定及遗传进化分析 [J]. *中国动物传染病学报*, 2023, DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20230712.002.
- [10] SU M J, LI C Q, QI S S, et al. A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67 (3): 1129-1140.
- [11] 熊谋康, 梁太润, 刘献辉, 等. 2020—2021 年我国部分地区猪流行性腹泻病毒 S1、M 和 ORF3 基因遗传进化分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023 (15): 8-17.
- [12] WANG D, FANG L, XIAOS. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7-13.
- [13] ZHANG H, ZOU C C, PENG O Y, et al. Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution and transmission [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40 (3): ms-ad052.
- [14] FENG B H, LI C, QIU Y J, et al. Genomic characterizations of porcine epidemic diarrhea viruses (PEDV) in diarrheic piglets and clinically healthy adult pigs from 2019 to 2022 in China [J]. *Animals*, 2023, 13 (9): 1562.

- [15] LI W T, LI H, LIU Y B, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18 (8): 1350-1353.
- [16] 张月, 李玉杰, 马慧玲, 等. 山东省 2012 年~2016 年猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及对其 ORF3 基因分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40 (5): 447-450.
- [17] 德西措姆, 王印, 杨泽晓, 等. 2016—2018 年四川地区猪流行性腹泻病毒流行病学调查与 ORF3、S1 部分基因序列分析 [J]. *浙江农业学报*, 2019, 31 (9): 1423-1428.
- [18] 齐海涛, 王利, 颜忠, 等. 2017—2020 年华北地区猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022 (22): 91-96.
- [19] 赵文影, 黄柏成, 谢莉敏, 等. 我国 16 省份猪流行性腹泻病毒临床检测及基于 S 基因的遗传进化分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55 (11): 94-103.
- [20] 李智丽, 黄淑坚, 马静云, 等. 2011—2015 年我国南方地区 PEDV 分子流行病学调查及 S 基因遗传变异分析 [J]. *广东农业科学*, 2016, 43 (11): 127-135.
- [21] 程亚豪, 胡灵子, 刘雅琦, 等. 2015 年~2021 年我国东部地区猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白关键表位的变异分析 [J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45 (9): 968-972.
- [22] LI X W, LI Y, HUANG J P, et al. Isolation and oral immunogenicity assessment of porcine epidemic diarrhea virus NH-TA2020 strain: one of the predominant strains circulating in China from 2017 to 2021 [J]. *Virologica Sinica*, 2022, 37 (5): 646-655.
- [23] TIAN Y M, YANG X, LI H, et al. Molecular characterization of porcine epidemic diarrhea virus associated with outbreaks in southwest China during 2014-2018 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 68 (6): 3482-3497.
- [24] BAI J G, DU C, LU Y, et al. Phylogenetic and spatiotemporal analyses of porcine epidemic diarrhea virus in Guangxi, China during 2017-2022 [J]. *Animals*, 2023, 13 (7): 1215.
- [25] 张齐, 刘朋, 杨诚洁, 等. 口服表面活性素对母猪乳源性免疫力的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2024, 47 (6): 1122-1129.
- [26] ZHANG Q, HU R M, TANG X B, et al. Occurrence and investigation of enteric viral infections in pigs with diarrhea in China [J]. *Archives of Virology*, 2013, 158 (8): 1631-1636.
- [27] ZHANG B, TANG C, YUE H, et al. Viral metagenomics analysis demonstrates the diversity of viral flora in piglet diarrhoeic faeces in China [J]. *J Gen Virol*, 2014; 95 (Pt 7): 1603-1611.