

引用格式:

梁跃, 肖犟, 尹杰, 黄颖, 伍玉梅, 苏焕, 禹爱春, 莫凌云, 刘国华. 湖南省猪轮状病毒分子流行病学调查及遗传变异分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(6): 88–93.

LIANG Y, XIAO J, YIN J, HUANG Y, WU Y M, SU H, YU A C, MO L Y, LIU G H. Epidemiological investigation and genetic variation analysis of *Porcine rotavirus* in Hunan Province[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(6): 88–93.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



湖南省猪轮状病毒分子流行病学调查及遗传变异分析

梁跃¹, 肖犟¹, 尹杰², 黄颖¹, 伍玉梅¹, 苏焕¹, 禹爱春¹, 莫凌云¹, 刘国华^{3*}

(1.正大集团湖南区, 湖南 怀化 418000; 2.湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 3.湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 2023年1—12月从湖南省9个地区119个规模化猪场采集1 036份仔猪腹泻粪便样品, 采用RT-PCR检测猪轮状病毒(PoRV)的流行率, 并对PoRV的VP7基因进行扩增并测序; 采用MegAlign 软件进行序列同源性分析, 通过MEGA 7.0 软件构建系统进化树。结果表明: 仔猪腹泻样品检出PoRV阳性样本168份, 阳性率约为16.22%; 冬季PoRV的检出率高于春、夏、秋季的; 从PoRV阳性样本中扩增出9个VP7基因序列, G9为优势基因型(占比约77.8%), 其次为G4型和G5型, 二者占比均为11.1%。综上, 湖南省腹泻仔猪粪便中PoRV的流行率高且基因型复杂, 其中G9型为优势基因型。

关键词: 猪轮状病毒; 流行病学; VP7基因; 遗传多样性

中图分类号: S858.280.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)06-0088-06

Epidemiological investigation and genetic variation analysis of *Porcine rotavirus* in Hunan Province

LIANG Yue¹, XIAO Jiang¹, YIN Jie², HUANG Ying¹, WU Yumei¹,
SU Huan¹, YU Aichun¹, MO Lingyun¹, LIU Guohua^{3*}

(1.Hunan District of Charoen Pokphand Group, Huaihua, Hunan 418000, China; 2.College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 3.College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: From January to December 2023, the 1 036 samples were collected from 119 pig farms in 9 representative regions of Hunan Province. The prevalence of *Porcine rotavirus*(PoRV) were detected by RT-PCR, and then positive VP7 amplification samples was sequenced. Sequence homology was analyzed by MegAlign software. Phylogenetic tree was constructed by using MEGA 7.0 software. Of the 1 036 samples examined, 16.22% were positive for PoRV. The prevalence of PoRV in winter was significantly higher than those in other three seasons. Among the 9 sequenced VP7 sequences, G9(77.8%) was the dominant genotype, followed by G4 and G5, both accounting for 11.1% of the total genotypes. These results indicated that the prevalence of PoRV in pig farms was high and the genotypes were complex in Hunan Province. The G9 was the dominant genotype in pig farm in Hunan Province.

Keywords: *Porcine rotavirus*; epidemiology; VP7 gene; genetic diversity

猪轮状病毒(PoRV)是呼肠孤病毒科轮状病毒属(*Rotavirus*)成员, 是引起仔猪腹泻的主要病原体

收稿日期: 2024-04-26

修回日期: 2024-09-10

基金项目: 湖南省自然科学基金联合基金项目(2023JJ5005)

作者简介: 梁跃(1982—), 男, 湖南双峰人, 硕士, 兽医师, 主要从事猪病诊断及健康管理研究, 289629018@qq.com; *通信作者, 刘国华, 博士, 教授, 主要从事动物疫病流行病学与病原生态学研究, liuguohua5202008@163.com

之一^[1]。各国猪场中 PoRV 的阳性率为 3.3%~67.3%，给养猪业造成了严重的经济损失^[1]。PoRV 经粪-口传播，主要感染小肠上皮细胞，造成仔猪水样腹泻、脱水、消瘦甚至死亡^[2-3]。不同年龄和性别的猪均可能感染 PoRV，哺乳期和断奶期仔猪感染后临床症状较明显，成年猪多为隐性感染，但也可作为传染源，对其他健康猪群构成潜在威胁^[4]。自 1975 年 PoRV 首次被报道后，其已在世界范围内广泛流行，严重损害猪群健康安全，须引起高度重视^[5]。

轮状病毒(RV)是一种无囊膜、分段的 dsRNA 病毒，其基因组由 11 个片段组成，共编码 6 种结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7)和 5 种非结构蛋白(NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、NSP5)^[6]。根据 VP6 蛋白的抗原性可将 RV 分为 10 个血清群(A、B、C、D、E、F、G、H、I、J)，A 群是感染人类和动物最常见的轮状病毒，即为 RVA^[7-8]。RV 的基因型主要根据 VP4 基因和 VP7 基因进行分型，迄今，VP4 基因有 37 种 P 基因型，VP7 基因有 27 种 G 基因型^[9]。流行病学及分子生物学分析表明，G3、G4、G5、G9 型是中国暴发腹泻的仔猪群中检测到的主要基因型，猪群阳性率约为 3.3%~67.3%^[10-13]。

近年来湖南省猪场仔猪腹泻疾病高发，但 PoRV 的流行情况及其基因型仍不清楚。为了解湖南省猪 PoRV 的遗传进化特征，预测湖南地区猪 PoRV 的流行现状及流行趋势，笔者采集了湖南省 9 个地区养猪场仔猪腹泻粪便样本，对其进行 PoRV 分子检测及基因型的鉴定，以期对猪 PoRV 疫苗的研制提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品

2023 年 1 月至 12 月，采集湖南省 9 个地区(长沙、怀化、湘西州、岳阳、衡阳、郴州、湘潭、株洲、娄底)的 119 个规模化猪场的 1 036 份仔猪腹泻粪便样本，置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 PoRV 核酸提取及阳性率的检测

取仔猪粪便样本，加入装有 200 μL 生理盐水的 EP 管中溶解，使用核酸提取试剂盒(深圳市海腾生

物科技有限公司)提取核酸。按照猪轮状病毒实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒(北京世纪元亨动物防疫技术有限公司)使用说明书，配制 RT-PCR 反应液(宝生物工程(大连)有限公司)并设置阳性对照和阴性对照，通过全自动 PCR 分析系统(Bio-Rad 公司)检测样本的 PoRV 阳性率。

1.2.2 VP7 基因 PCR 扩增及测序

参考文献[14]的方法合成 VP7 基因特异性引物 PoRV-VP7，上游引物 5'-GGCTTTAAAAGAGAGA ATTTTC-3'，下游引物 5'-GGTCACATCATAACAGTT CTAAC-3'，交由北京擎科生物技术有限公司合成。提取 PoRV 阳性样本 RNA，以其为模板进行扩增。反应体系总体积为 25 μL：PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 1 μL；2×1 Step Buffer 12.5 μL；PoRV-VP7 引物各 1 μL，无酶水 7.5 μL；模板 2 μL。PCR 反应条件：94℃预变性 2 min；94℃变性 1 min，50℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，进行 35 个循环；72℃延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物在 1%TBE 琼脂糖凝胶电泳及在紫外投射仪下观察结果，取 9 份(每个地区 1 份)阳性 PCR 产物送中农华大(武汉)检测科技有限公司进行双向测序。

1.2.3 基因型鉴定及序列分析

用 DNAMAN 7.0 软件分析测序结果。利用 Blast 分析鉴定 VP7 基因序列相对应的 PoRV 基因型。使用 MegAlign 7.1 软件对 22 株参考株进行核苷酸同源性分析及差异位点分析，使用 MEGA 7.0 软件选用邻接法(选用 Kimura-2-parameter 模型，自举检验 1 000 次)构建种系发育进化树。应用 SPSS 软件对 9 个地区以及不同季节的 PoRV 阳性率进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 湖南省猪轮状病毒感染情况

对湖南 1 036 份仔猪腹泻粪便样本进行 PoRV 检测，结果(表 1)显示，168 份样本呈 PoRV 阳性，阳性率为 16.22%，其中长沙的阳性率最高，为 42.86%，娄底的阳性率最低，为 10.91%。不同季节 PoRV 阳性率为 13.57%~23.12%(表 2)，春季的阳性率最低，冬季的阳性率最高。

表 1 2023 年湖南省 9 个地区 PoRV 阳性率统计值
Table 1 The prevalence of PoRV in 9 regions of Hunan Province in 2023

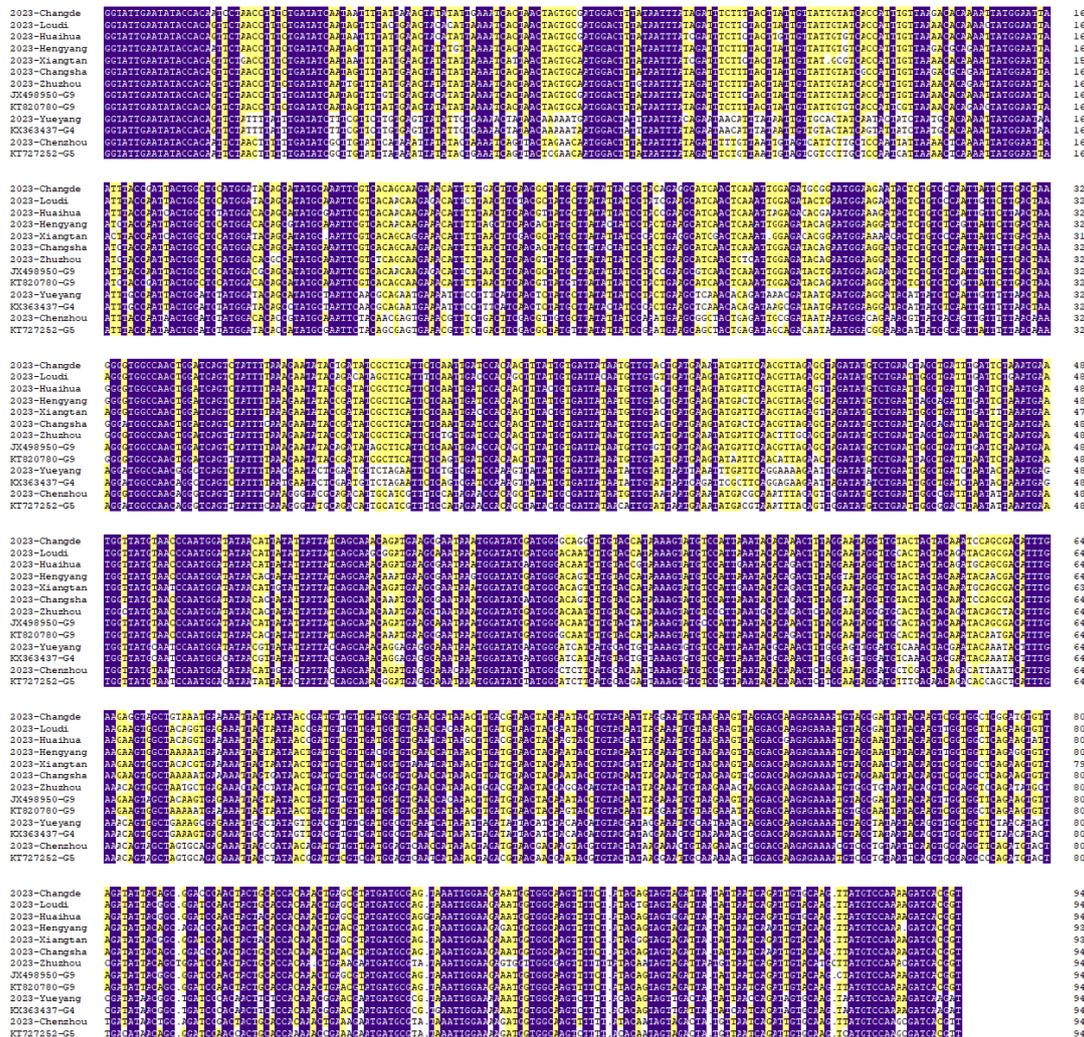
地区	检测数量/个	阳性数/个	阳性率/%	P 值
娄底	55	6	10.91	参考
长沙	21	9	42.86	0.003
怀化	106	43	40.57	0.001
湘西州	10	3	30.00	0.135
衡阳	37	9	24.32	0.148
岳阳	146	21	14.38	0.645
郴州	23	3	13.04	1.000
湘潭	197	25	12.69	0.820
株洲	441	49	11.11	1.000
合计	1 036	168	16.22	

表 2 2023 年湖南省不同季节的 PoRV 阳性率
Table 2 The prevalence of PoRV in different seasons in Hunan Province in 2023

季节	样品数/个	阳性数/个	阳性率/%	P 值
春季	361	49	13.57	参考
夏季	406	59	14.53	0.755
秋季	83	17	20.48	0.124
冬季	186	43	23.12	0.006

2.2 PoRV 的 VP7 基因部分序列的分析

图 1 结果表明, 9 份样品编号分别为 2023–Zhuzhou、2023–Hengyang、2023–Changsha、2023–Huaihua、2023–Xiangtan、2023–Changde、2023–Loudi、2023–Yueyang、2023–Chenzhou, VP7 基因



标注黄色的碱基为差异碱基。

图 1 本研究获得的 PoRV 与参考株的 VP7 核苷酸序列的比较
Fig.1 Nucleotide sequence comparison between PoRV from present study and reference strains

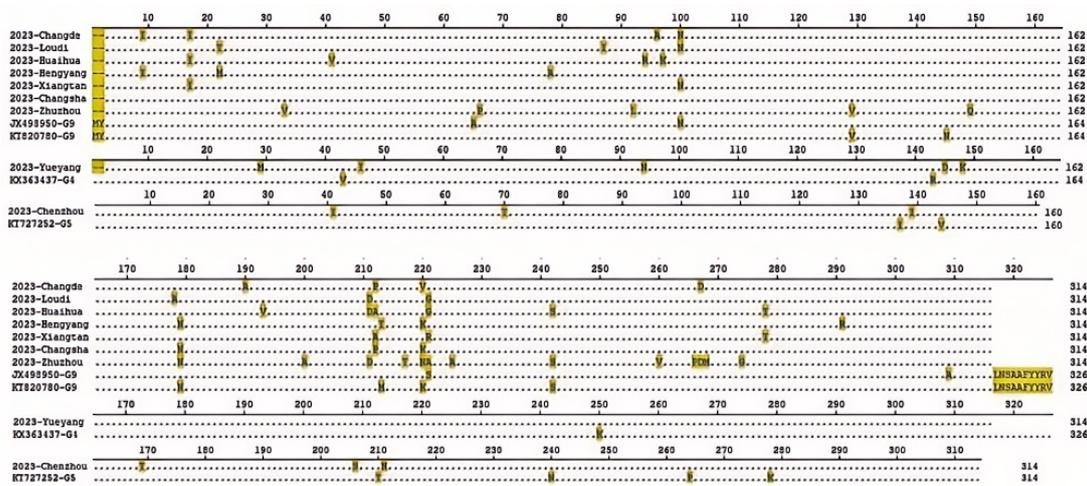
序列长度为 936~942 bp。样品序列与 NCBI 数据库中参考株序列的同源性对比结果显示, 2023–Zhuzhou、2023–Hengyang、2023–Changsha、2023–Huaihua、

2023–Xiangtan、2023–Changde、2023–Loudi 等 7 份样品的序列与 G9 型核苷酸序列的同源性较高; 2023–Yueyang 序列与 G4 型核苷酸序列同源性较

高；2023-Chenzhou 序列与 G5 型核苷酸序列同源性较高。

9 份样品的 VP7 基因编码的氨基酸序列长度为 312~314 aa，氨基酸同源性为 72.90%~97.5%。与 NCBI 数据库中的参考株序列对比结果显示，2023-Zhuzhou、2023-Hengyang、2023-Changsha、2023-Huaihua、2023-Xiangtan、2023-Changde、2023-Loudi 等 7 份的 VP7 编码的氨基酸序列与 G9 型的同源性较高；2023-Yueyang 的 VP7 基因片段与 G4 型的同源性较高；2023-Chenzhou 与 G5 型的同源性较高。

对 9 份样品的 VP7 基因核苷酸序列及氨基酸序列与 NCBI 数据库的参考株序列进行差异分析，结果显示，2023-Zhuzhou、2023-Hengyang、2023-Changsha、2023-Huaihua、2023-Xiangtan、2023-Changde 和 2023-Loudi 等 7 份核苷酸序列与参考株 (JX498950 和 KT820780) 序列差异主要为碱基替换、缺失、插入(图 1)，而其他 2 份样品序列与参考株序列(KX363437 和 KT727252)差异均为碱基替换(图 1)。9 份样品的氨基酸序列与参考株的氨基酸序列也存在差异(图 2)。



标注黄色的为差异的氨基酸。

图 2 本研究获得的 PoRV 与参考株的 VP7 基因编码氨基酸序列的比较

Fig. 2 Amino acid sequence comparison between PoRV from the present study and reference strains

2.3 PoRV的VP7基因的进化分析

将 9 份 PoRV 的 VP7 基因序列与其他已知的不同基因型的轮状病毒 VP7 基因序列构建的系统进化树(图 3)显示，2023-Zhuzhou、2023-Hengyang、2023-Changsha、2023-Huaihua、2023-Xiangtan、2023-Changde、2023-Loudi 与 GenBank 收录的 G9 型亲缘关系最近，聚在同一分支；2023-Yueyang 与 G4 型的亲缘关系最近，聚在同一分支；2023-Chenzhou 与 G5 型的亲缘关系最近，聚在同一分支。

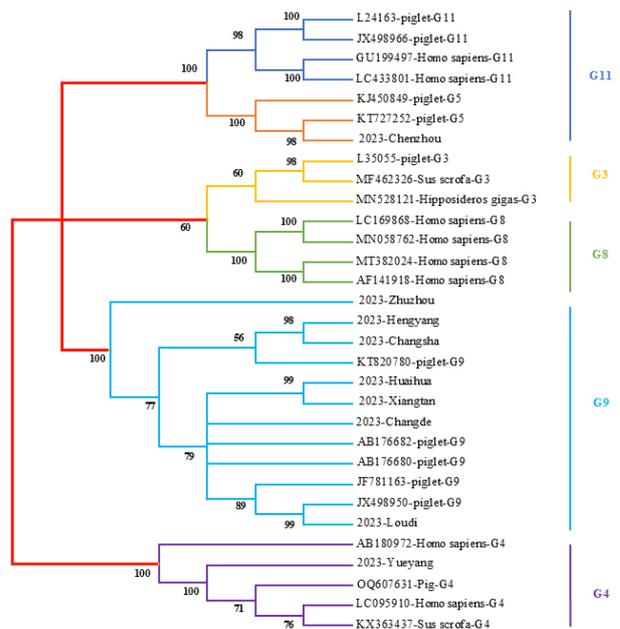


图 3 基于 VP7 基因序列以邻接法构建的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree based on VP7 gene sequences constructed using the neighbor-joining method

3 结论与讨论

随着生猪养殖集约化程度的扩大,仔猪腹泻疾病呈现高发态势^[15]。

从湖南省9个地区119个规模化猪场共采集1036份仔猪腹泻粪便样本,检测出仔猪PoRV感染率约为16.22%,感染率低于安徽(82.4%,42/51)、广东(36.44%,289/793)、广西(37.13%,186/501)、江西(38.98%,145/372)、福建(30.49%,25/82)等省区的,高于江苏(12.6%,31/247)、山东(11.0%,25/228)、浙江(1.5%,1/66)等省的^[12,15],这表明湖南省PoRV的感染处于中度水平。长沙市的PoRV阳性率最高,达42.86%,可能是长沙市生猪养殖场主要集中在宁乡市和浏阳市2个地区(占比85%左右),区域内较易传播,猪群传染疫病风险较高。此外,怀化和湘西州的阳性率也较高,这可能是湘西州散养户较多,猪只流动较大,感染风险较高所致。从不同季节PoRV阳性率来看,猪轮状病毒全年均可检出,秋冬季较为高发,主要可能是秋冬季气温较低,适宜病原微生物的存活,这与先前的研究结果^[16-18]相似。

研究^[7]表明,轮状病毒VP7基因中存在高变区,分别是VR1到VR9的区域,其中氨基酸位点为87~101 aa的A区域、氨基酸位点为145~152 aa的B区域以及氨基酸位点为211~223 aa的C区域均为中和抗原的主要决定簇,是轮状病毒疫苗无法进行不同基因型交叉保护及保护率低的主要原因。笔者对9株PoRV的VP7编码的氨基酸序列与参考株序列进行差异分析,发现G9型序列在3个中和抗原簇区域均出现高度氨基酸位点变异,变异位点较多;G4型序列在A区域和B区域分别出现了1个和2个氨基酸位点变异,在C区域未发生变化;G5型序列在C区域存在1个氨基酸位点变异,在A区域和B区域未发生变化,这些结果提示轮状病毒A群G4、G5和G9型VP7基因抗原决定簇区域的氨基酸位点均易发生变异。

中国PoRV流行的基因型主要为G3、G4、G5、G9型^[19]。G9型PoRV可以在人和动物之间发生基因重组,是一种在世界范围内广泛流行的新兴基因型^[20-22]。本研究中的9份PoRV的VP7序列和遗传进化分析结果表明,2023-Zhuzhou、2023-Hengyang、2023-Changsha、2023-Huaihua、2023-Xiangtan、

2023-Changde、2023-Loudi为G9型,2023-Yueyang为G4型,2023-Chenzhou为G5型,这表明G9型为湖南省PoRV优势基因型,且还存在G4型和G5型的PoRV。

参考文献:

- [1] VLASOVA A N, AMIMO J O, SAIF L J. Porcine rotaviruses: epidemiology, immune responses and control strategies[J]. *Viruses*, 2017, 9(3): 48.
- [2] MARTHALER D, ROSSOW K, CULHANE M, et al. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada[J]. *Virology*, 2013, 446(1/2): 189-198.
- [3] 樊高, 申翰钦, 王连想, 等. 猪轮状病毒的分离鉴定和全基因组序列分析[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(6): 47-54.
- [4] 刘小兰, 刘昌锦, 余文洋, 等. 猪轮状病毒江西株AY01的分离鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(8): 3151-3162.
- [5] PAPP H, LÁSZLÓ B, JAKAB F, et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 165(3/4): 190-199.
- [6] 魏春华, 李佳睿, 杨圆, 等. 1株G26P[23]型猪A群轮状病毒的基因组特征[J]. *中国人兽共患病学报*, 2023, 39(5): 426-432.
- [7] PRASAD B V, WANG G J, CLERX J P, et al. Three-dimensional structure of rotavirus[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1988, 199(2): 269-275.
- [8] LÓPEZ T, CAMACHO M, ZAYAS M, et al. Silencing the morphogenesis of rotavirus[J]. *Journal of Virology*, 2005, 79(1): 184-192.
- [9] TROJNAR E, SACHSENRODER J, TWARDZIOK S, et al. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94: 136-142.
- [10] BOENE S S, JOÃO E D, STRYDOM A, et al. Prevalence and genome characterization of porcine rotavirus A in southern Mozambique[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 87: 104637.
- [11] XUE R, TIAN Y, ZHANG Y, et al. Diversity of group A rotavirus of porcine rotavirus in Shandong Province, China[J]. *Acta Virologica*, 2018, 62(3): 229-234.
- [12] 赵冉, 蔡振鸿, 陈琼, 等. 厦门地区规模猪场八种致猪腹泻病毒病感染调查[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2023(2): 36-40.
- [13] TAO R, CHANG X J, ZHOU J Z, et al. Molecular epidemiological investigation of group A porcine rotavirus in East China[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10:

- 1138419.
- [14] 高秀春, 时洪艳, 佟有恩, 等. A 群猪轮状病毒 JS 株 VP6 基因序列分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007, 29(7): 27–29.
- [15] ZHANG F F, LUO Y Y, LIN C, et al. Epidemiological monitoring and genetic variation analysis of pathogens associated with porcine viral diarrhea in Southern China from 2021 to 2023[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1303915.
- [16] LUO S C, CHEN X Q, YAN G Z, et al. Emergence of human-porcine reassortment G9P[19] porcine rotavirus A strain in Guangdong Province, China[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 9: 1111919.
- [17] QIAO M L, LI M Z, LI Y, et al. Recent molecular characterization of porcine rotaviruses detected in China and their phylogenetic relationships with human rotaviruses[J]. *Viruses*, 2024, 16(3): 453.
- [18] GENZ B, GERSZON J, POLLOCK Y, et al. Detection and genetic diversity of porcine rotavirus A, B and C in eastern Australian piggeries[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2023, 101(4): 153–163.
- [19] 周群, 陈小飞, 阚蕊慈, 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.
- [20] AMIMO J O, VLASOVA A N, SAIF L J. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic(2004) and recent(2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(4): 1142–1151.
- [21] LACHAPELLE V, SOHAL J S, LAMBERT M C, et al. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(7): 1771–1779.
- [22] YAN N, YUE H, WANG Y W, et al. Genomic analysis reveals G3P[13] porcine rotavirus A interspecific transmission to human from pigs in a swine farm with diarrhoea outbreak[J]. *Journal of General Virology*, 2021, 102(2): 10.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维

(上接第 35 页)

- [8] 王宁, 许丽莉, 刘幽燕, 等. 固定化米根霉全细胞催化 α -萜烯环氧化反应[J]. *化学工程*, 2023, 51(12): 15, 40.
- [9] JEREZ LAZO C, LEE N, TRIPATHI P, et al. A fungus-based soil improvement using *Rhizopus oryzae* inoculum[J]. *Geo-Engineering*, 2024, 15: 18.
- [10] 申高忠, 王怡明, 王芳, 等. 乳酸的发展现状、应用与挑战[J]. *当代化工研究*, 2023(9): 6–8.
- [11] RAWOOF S A A, KUMAR P S, VO D V N, et al. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2021, 19(1): 539–556.
- [12] DULF E H, VODNAR D C, DULF F V. Modeling tool using neural networks for L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol[J]. *Chemistry Central Journal*, 2018, 12(1): 124.
- [13] 郑志, 杜威, 姜绍通, 等. 米根霉不同菌丝体形态对重复间歇发酵生产 L-乳酸的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(9): 166–170.
- [14] WU N, ZHANG J H, QU W, et al. Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* seed pellet formation using triethanolamine[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14: 230.
- [15] ZAIN N A M, AZIMAN S N, SUHAIMI M S, et al. Optimization of L(+) lactic acid production from solid pineapple waste(SPW) by *Rhizopus oryzae* NRRL 395[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2021, 29: 230–249.
- [16] SHAN W W, YAN Y L, LI Y D, et al. Microbial tolerance engineering for boosting lactic acid production from lignocellulose[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16: 78.
- [17] 凌荔, 方尚玲, 牟飞燕, 等. 基于高通量测序技术分析南方清香型白酒大曲的微生物多样性[J]. *酿酒科技*, 2023(1): 51–60.
- [18] CUI Y Y, LIU R, XU L L, et al. Fermentation kinetics of enzymatic hydrolysis bagasse solutions for producing L-lactic acid[J]. *Sugar Tech*, 2018, 20(3): 364–370.
- [19] FU Y Q, SUN X L, ZHU H Y, et al. An optimized fed-batch culture strategy integrated with a one-step fermentation improves L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(6): 74.

责任编辑: 伍锦花
英文编辑: 柳正