

# 河南省部分地区腹泻仔猪流行性腹泻病毒和 $\delta$ 冠状病毒检测与分析

李炳晓<sup>1,2</sup>, 丁庆文<sup>1</sup>, 韦学雷<sup>1</sup>, 郑兰兰<sup>1</sup>, 魏战勇<sup>1,2</sup>

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 河南郑州 450002; 2. 河南省动物性食品安全重点实验室, 河南郑州 450002)

**摘要:** 为了解河南省部分地区猪流行腹泻病毒(PEDV)和猪  $\delta$  冠状病毒(PDCoV)的流行状况, 根据 GenBank 中登录的 PEDV M 基因及 PDCoV M 基因序列, 分别设计扩增引物, 采用单一 RT-PCR 方法对 2017 年 3 月至 2018 年 1 月采集的 154 份样品进行检测。结果显示, PEDV 的阳性率为 51.92%, PDCoV 的阳性率为 35.06%, 混合感染率为 24.03%。说明 PEDV 和 PDCoV 是普遍存在于腹泻猪群中的病毒, 是引起河南仔猪腹泻的重要原因。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; 猪  $\delta$  冠状病毒; 流行

DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2020.04.004

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2020)04-0017-05

猪的腹泻是猪生产中最常见的一种影响猪生产的疾病, 其致病因素很多, 如细菌和病毒感染、饲料、猪场饲养管理、季节气候变化等多种因素均可引发腹泻。其中猪传染性胃肠炎病(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪  $\delta$  冠状病毒(Porcine deltacoronavirus, PDCoV)、猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)等引起的猪病毒性腹泻, 大肠埃希菌引起的猪细菌性腹泻。2010 年以来, 河南省很多地区猪群反复出现大规模的腹泻疫情, 主要症状为猪发生水样腹泻、精神不振、生长发育缓慢等, 各种年龄猪和不同品种的猪群都有易感性, 但对哺乳仔猪的危害更大, 1 周龄内的仔猪一旦发病, 病死率高达 70%~90%。随着病毒性腹泻的不断流行, 河南省猪场的猪群深受腹泻困扰, 造成很大的经济损失。我们对腹泻样品进行病原鉴定, 从中检测到了猪流行性腹泻病毒和猪  $\delta$  冠状病毒, 并且两种病毒的混合感染率极高。

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(PEDV)引起, 该病的典型临床症状包括严重腹泻、呕吐、脱水和死亡<sup>[1]</sup>。PEDV 在英国首先被发现, 欧洲和亚洲是主要的流行区域<sup>[2-3]</sup>。我国在 1980 年就有该病发生的相关报道, 自 2010 年, PED 在我国很多地区暴发<sup>[4-6]</sup>, 2015 年又在我国西北地区暴发 PED<sup>[1]</sup>。猪  $\delta$  冠状病毒(PDCoV)是近年来新发现的一种肠道冠状病毒, 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒<sup>[7]</sup>。PDCoV 引起的疾

病症状与 PEDV 非常相似, 都以呕吐、水样腹泻、脱水和食欲下降为基本特征, 且各年龄段猪群均可感染, 尤其新生仔猪感染率和发病率较高, 感染后病死率可达 30%~40%<sup>[8-10]</sup>。

这两种病毒引起猪的临床症状十分相似, 并且常常存在混合感染, 给两种病毒性腹泻病的防控带来巨大的挑战, 给养猪业造成了巨大的经济损失, 也给养殖户及养殖企业带来了很大的恐慌。近几年, 河南省部分地区的养殖场(户)仔猪反复发生以腹泻为主要症状的疾病。为了解河南省病毒性腹泻的感染情况和流行状况, 自 2017 年 3 月至 2018 年 1 月, 采集河南省部分地区猪场仔猪腹泻样品, 进行 PEDV 和 PDCoV 的病原检测和分析, 以期能为这两种疫病的防控提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病料来源 采集自 2017 年 3 月至 2018 年 1 月从河南省鹤壁市采集 5 份新鲜仔猪腹泻粪样, 开封市采集 4 份新鲜仔猪腹泻粪样, 漯河采集 3 份新鲜仔猪腹泻粪样, 驻马店采集 13 份新鲜仔猪腹泻粪样和 8 份小肠组织, 安阳采集 6 份新鲜仔猪腹泻粪样, 南阳采集 10 份新鲜仔猪腹泻粪样和 13 份小肠组织, 周口采集 30 份新鲜仔猪腹泻粪样和 5 份小肠组织, 平顶山采集 16 份新鲜仔猪腹泻粪样, 信阳采集 7 份新鲜仔猪腹泻粪样, 濮阳采集 13 份新鲜仔猪

收稿日期: 2019-02-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0501205)

作者简介: 李炳晓(1992-), 男, 河南鹤壁人, 硕士研究生, 主要从事动物微生物与免疫学研究。

腹泻粪样,新乡采集7份新鲜仔猪腹泻粪样,济源采集8份小肠组织,洛阳采集6份新鲜仔猪腹泻粪样,共154份病料样品。

1.1.2 主要试剂 PBS缓冲液,TRIzol试剂为康为世纪公司产品;反转录试剂盒为Vazyme生物技术有限公司产品;KOD酶、TaKaRa LA Taq、DNA Marker为生工生物工程(上海)有限公司产品。

1.1.3 主要仪器 恒温水浴锅,移液枪、PTC-200型PCR扩增仪均为Thermo Forma公司产品;台式

小离心机为德国Sigma公司产品;JY-SCZ-2电泳槽、JY600C电泳仪均为北京君意东方电泳设备有限公司产品;-40℃冰箱为美菱公司产品。

1.1.4 引物设计 参照GenBank登录的PEDV的M基因序列和猪 $\delta$ 冠状病毒的M基因序列,用Primer premier 5.0分别设计PEDV M基因和猪 $\delta$ 冠状病毒M基因的特异性引物(表1),引物合成于武汉奥科鼎盛生物科技有限公司。

表1 RT-PCR引物及其反应条件

Table 1 Primers and conditions used for RT-PCR assays

病毒 Virus	序列号 Serial number	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增长度/bp Size of amplicon
PEDV	KY619838.1	TGGTGGTCTTTCAATCCTG	CTGAGTAGTCGCCGTGTTT	58.0	298
PDCoV	KX443143.1	CGCGTAATCGTGTGATCTATGT	CCGCCTTTGAAGTGGTTAT	56.0	541

## 1.2 方法

1.2.1 样品处理 根据不同样品,采用不同处理方法:①肠道组织:取小肠不同位置2~3段长度大约为1 cm~2 cm,置于研钵中,倒入适量液氮进行研磨,然后加入适量PBS缓冲液制成组织匀浆。将组织匀浆吸入EP管中,5 000 r/min离心10 min,吸取上清放入-40℃保存;②粪便:取适量粪便置于EP管中,加入无菌PBS缓冲液。剧烈振荡2 min后,5 000 r/min离心10 min。取上清放入-40℃保存。

1.2.2 提取RNA与反转录 取400  $\mu$ L处理好的样品液,加入800  $\mu$ L的Trizol,振荡混匀,室温放置8 min;加入160  $\mu$ L的氯仿,剧烈振荡1 min,室温静置5 min,12 000 r/min离心10 min;取上清置于新的EP管中,加入相等体积的异丙醇,颠倒混匀,室温静置10 min;12 000 r/min离心10 min,弃上清;加入1 mL 75% RPE洗涤沉淀,将RNA沉淀弹起,进行漂洗;8 000 r/min离心2 min,倒出液体,瞬间后,用移液器吸出剩余液体,自然干燥1 min~

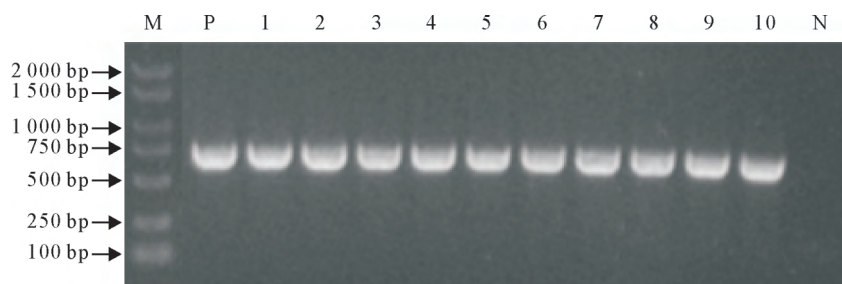
3 min,加入30  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O溶解RNA用于反转录。按照Vazyme反转录试剂盒说明书进行反转录出cDNA。

1.2.3 PCR鉴定 PCR体系总体积为25  $\mu$ L:2 $\times$ Taq DNA Master Mix 13  $\mu$ L,上、下游引物各0.5  $\mu$ L,RNase Free d<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O 9  $\mu$ L,模板cDNA 2  $\mu$ L。反应条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,35个循环;72℃ 10 min。PCR产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果

### 2.1 PDCoV和PEDV的RT-PCR检测结果

以PDCoV阳性样品为对照,采用单重RT-PCR方法进行扩增。结果显示部分阳性样品RT-PCR扩增产物片段与预期大小一致为541 bp(图1)。以PEDV阳性样品为对照,采用单一RT-PCR方法进行扩增。结果显示,部分阳性样品RT-PCR扩增产物片段与预期大小一致为298 bp(图2)。

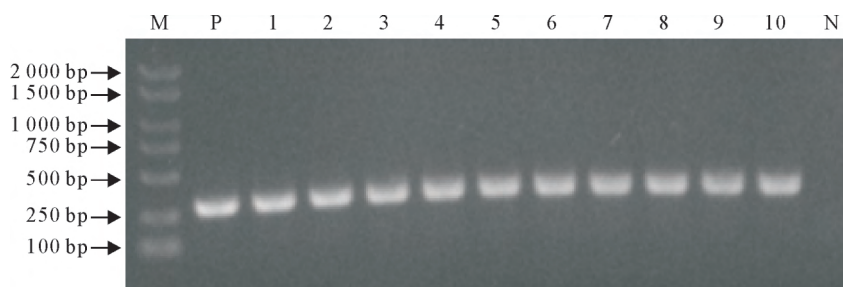


M.DNA 标准 DL 2 000; P.PDCoV 的阳性对照; 1~10.PDCoV PCR 产物; N.PDCoV 的阴性对照

M.DNA Marker DL 2 000; P.PDCoV positive control; 1-10.PCR products of PDCoV; N.PDCoV negative control

图1 PDCoV的RT-PCR扩增产物

Fig.1 Products of amplification of PDCoV by RT-PCR



M.DNA 标准 DL 2 000; P.PEDV 的阳性对照; 1~10.PEDV PCR 产物; N.PEDV 的阴性对照

M.DNA Maker DL 2 000; P.PEDV positive control; 1-10.PCR product of PEDV; N.PEDV negative contro

图 2 PEDV 的 RT-PCR 扩增产物

Fig.2 Products of amplification of PEDV by RT-PCR

## 2.2 临床样品 PDCoV 和 PEDV 的检测结果

采用 2 对引物对 154 份病料进行 RT-PCR 检测。结果显示, PEDV 阳性率为 51.92% (80/154),

PDCoV 阳性率为 35.06% (54/154), PEDV 与 PDCoV 的混感染阳性率为 24.03% (表 2)。只有在开封地区没有检测出 2 种病毒。

表 2 临床病料样品的 RT-PCR 检测结果

Table 2 Detection results of RT-PCR in clinical samples

地区 Region	样品总计 Total sample	阳性样品 Positive sample		PEDV 和 PDCoV 混合感染样品 PEDV and PDCoV co-infection sample
		PDCoV	PEDV	
漯河 Luohe	3	1	3	1
安阳 Anyang	6	4	0	0
南阳 Nanyang	23	7	18	6
周口 Zhoukou	35	18	18	13
平顶山 Pingdingshan	16	10	8	8
驻马店 Zhumadian	21	2	5	0
信阳 Xinyang	7	4	6	4
濮阳 Puyang	13	1	7	0
新乡 Xinxiang	7	5	4	4
鹤壁 Hebi	5	0	5	0
开封 Kaifeng	4	0	0	0
济源 Jiyuan	8	2	3	1
洛阳 Luoyang	6	0	3	0
总计 Totle	154	54	80	37
阳性率 Positive rate		35.06%	51.92%	24.03%

## 2.3 PDCoV 和 PEDV 在不同地区的阳性率

对样品阳性的地区进行分析, 结果显示, 有 10 个地区的仔猪腹泻样品中检测出 PDCoV, 其中安阳、周口、平顶山、信阳、新乡的阳性率较高, 均达到 50% 以上, 提示该病毒在这些地区的潜伏和流行风险很大。有 11 个地区的病料样品中检测出 PEDV, 其中南阳、周口、平顶山、信阳、濮阳、新乡的阳性率较高, 尤其漯河和鹤壁阳性率最高, 达到 100% (图 3)。说明在河南省地区两种腹泻病毒普遍存在, 给猪场稳定生产带来巨大隐患。

## 2.3 PDCoV 和 PEDV 在不同时间的流行情况

对两种病毒检测, 并对阳性感染的时间进行分析。结果发现, 两种病毒一年四季均可流行, 但在秋冬季节感染率更高, 且 PEDV 比 PDCoV 的感染率高。在 2018 年初 PDCoV 感染率明显上升, PEDV

感染也有增加(图 4)。说明两种病毒感染无季节规律性, 并且有扩大流行的趋势, 养殖场(户)需要做好日常饲养管理及生物安全消毒等措施。

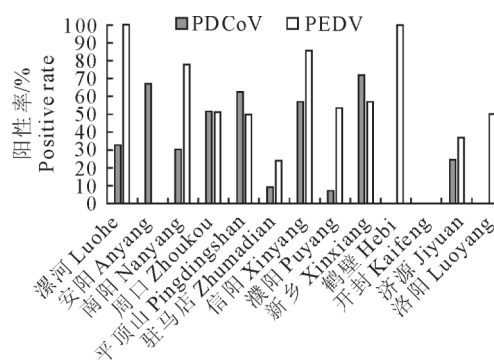


图 3 河南省不同地区来源的病料样品的阳性率

Fig.3 Positive rate of samples from different areas of Henan province

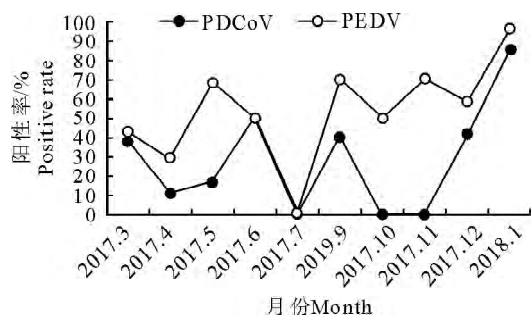


图4 PEDV和PDCoV在不同时间的流行情况

Fig.4 The epidemics of PEDV and PDCoV at different time

### 3 讨论

仔猪腹泻病的存在和流行是导致仔猪成活率不高的重要因素,对养猪业健康发展造成严重危害。河南省作为中国生猪养殖大省,其仔猪腹泻情况也比较严重,但相关的分子流行病学调查却少有报道。本文采用 RT-PCR 方法对河南省 13 个地区进行 PEDV 和 PDCoV 病原调查,结果显示有 11 个地区猪场病料中检测出 PEDV,154 份病料中有 80 份感染,其阳性感染率达 51.92%,有些猪场腹泻仔猪 PEDV 感染阳性率更高达 100%;有 10 个地区的仔猪腹泻病料样品中检测出 PDCoV,其中安阳与新乡的阳性率较高,达到 70%左右。研究表明 PEDV 和 PDCoV 在河南省猪场普遍存在,并且两种病毒性腹泻的分布不均,给防治和净化带来困难,同时也给附近无感染地区带来威胁,必须引起高度重视。

猪流行性腹泻虽然无明显季节性,但是当季节变换或温度突然下降时发病率较高,天气温暖的季节发病率较低。通常临床症状主要表现为发热、精神沉郁、厌食、呕吐、脱水及饲料转化率下降等现象。本试验采集病料的猪场主要是发病后突然腹泻,开始排黄色黏稠粪便,而后呈灰黄色或灰色的水样腹泻,常常伴有黄白色的乳凝块。而且发病后有些猪场增加人力物力去治疗控制,效果却不明显,哺乳仔猪整窝死亡,幸存猪很少。猪只日龄越小,临床症状越严重,病死率越高,成年猪呈一过性发病。病理变化主要是在小肠,其变化主要是肠管胀气扩张,充满黄色液体,肠壁变薄,肠系膜充血,肠系膜淋巴结水肿,消化道黏膜发炎、糜烂<sup>[5]</sup>。显微镜观察可见小肠绒毛萎缩、脱落,绒毛与肠腺的比率从正常的 7:1 下降到约 3:1。

猪  $\delta$  冠状病毒是近年来新发现的一种冠状病毒,2012 年首先从香港猪粪便拭子中检出 PDCoV<sup>[11]</sup>,随后美国、韩国等国家的研究人员先后从腹泻仔猪粪便及肠道样品中检出该病毒<sup>[12-13]</sup>,迄今

为止已经在亚洲的猪、猫及多种禽类中检测出该病毒<sup>[10-12]</sup>。PDCoV 的流行十分迅速,短短几年就已经在河南地区猪场流传开来,随着饲料运输车,生猪运输车等车辆转运,增加病原微生物在不同养殖场进行潜伏和传播的风险。已证明该病毒可导致仔猪发生水样腹泻、呕吐等与猪流行性腹泻相似的临床症状<sup>[8]</sup>。研究发现,自然感染或人工感染 PDCoV,造成的仔猪腹泻症状及病理变化与 PEDV 都非常相似,临床上很难区分<sup>[7,9]</sup>。因此,需要用实验室检测进行鉴别诊断。RT-PCR 方法操作简单、快速准确、特异性强,具有较高的临床实用价值,适用于 PEDV 和 PDCoV 的快速鉴别诊断<sup>[6,14]</sup>。

PEDV、PDCoV 病毒都属于猪肠道常发传染病,呕吐、腹泻为其主要临床特征。病毒可在猪群中持续存在,各种年龄的猪都易感,并且传染性强,一旦发病很难根除和净化<sup>[15]</sup>。而且这两种病毒都属于冠状病毒科,临床常呈单独感染或相互混合感染,临床鉴别诊断很难区分。PDCoV 作为一种新发冠状病毒,逐步在世界各地流行,对养殖业构成极大的危害<sup>[16]</sup>。目前关于 PDCoV 的研究报道较少,其致病机理、感染机制都不了解,尚无有效的治疗方法和疫苗,因此做好预防和早期诊断工作极为重要。

本研究用于采集病料的猪场大多使用了胃流轮三联苗进行免疫,但是哺乳仔猪的发病率和死亡率依然很高。因为 PEDV 和 PDCoV 主要感染哺乳仔猪,而哺乳仔猪日龄小,抵抗力低,感染发病时,疫苗免疫产生的抗体在体内的效价还很低,而母源抗体还并不足以中和病毒使猪只免受现有 PEDV 流行毒株的感染。另外,由于流行毒株易发生变异或流行毒株毒力增强,从而导致免疫失败;同时两种病毒容易交叉混合感染也使该病的防控难上加难。所以,病毒性腹泻应该受到重视,认真做好这两种疫病的防控工作。

#### 参考文献:

- [1] WANG X Y,JI C J,ZHANG X, et al. Infection, genetic and virulence characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in northwest China [J]. *Infect Genet Evol*, 2018; S1567134818301746.
- [2] JUNG K, SAIF L J. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis [J]. *Vet J*, 2015, 204(2): 134-143
- [3] DUY D T, TOAN N T, PURANAVEJA S. Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009-2010 outbreaks [J]. *Israel J Vet Med*, doi: 10.1016/j.cvsm.2011.01.005.
- [4] 施 标,董世娟,朱于敏,等.中国猪流行性腹泻病毒分子流行病学研究进展. *中国农业科学*, 2013, 46(20): 4362-4369.

- [5] 杨丽梅,马力,徐倩倩,等.我国猪病毒性腹泻的诊断与流行病学调查研究概况[J].动物医学进展,2014,35(2):115-119.
- [6] 张利卫,曹贝贝,李炳晓,等.新发猪 Delta 冠状病毒和猪流行性腹泻病毒 SYBR Green I 双重荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J].中国兽医学报,2018(4):618-624.
- [7] MARTHALER D, RAYMOND L, JIANG Y, et al. Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(8): 1347-1350.
- [8] MA Y M, ZHANG Y, LIANG X Y, et al. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronavirus in the United States[J]. MBio, 2015, 6(2): e00064-15.
- [9] CHEN Q, GAUGER P, STAFNE M, et al. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets[J]. Virology, 2015, 482: 51-59.
- [10] LI W, LI H, LIU Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhoea virus, China, 2011[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(8): 1350-1353.
- [11] WOO P C, LAU S K, LAM C S, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus [J]. J Virol, 2012, 86(7): 3995-4008.
- [12] LI G, CHEN Q, HARMON K M, et al. Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734[J]. Genome Announcements, 2014, 2(2): e00278-14.
- [13] LEE S, LEE C. Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNUI4-04/2014 [J]. Genome Announcements, 2014, 2(6): e01191-14.
- [14] 韦学雷,梁青青,曹贝贝,等.猪 Delta 冠状病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪流行性腹泻病毒多重 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J].中国兽医学报,2018(1):11-16.
- [15] AJAYI T, DARA R, MISENER M, et al. Herd-level prevalence and incidence of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) in swine herds in Ontario, Canada[J]. Transb Emerg Dis, 2018: 1-11. doi: 10.1111/tbed.12858.
- [16] SAENG-CHUTO K, LORSIRIGOO A, TEMEEYASEN G, et al. Different lineage of porcine deltacoronavirus in thailand, vietnam and lao PDR in 2015[J]. Transb Emerg Dis, 2017, 64:3-10.

## Detection and Analysis of PEDV and PDCoV Infections in Piglets with Diarrhea in Some Areas of Henan Province

LI Bing-xiao<sup>1</sup>, DING Qing-wen<sup>1</sup>, WEI Xue-lei<sup>1</sup>, ZHENG Lar-lan<sup>1</sup>, WEI Zhan-yong<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan, 450002, China;

2. Henan Key Laboratory of Animal Food Safety, Zhengzhou, Henan, 450002, China)

**Abstract:** In order to understand the prevalence of PEDV and PDCoV in Henan province, according to the pig epidemic diarrhoea virus (PEDV) M gene and porcine delta virus (PDCoV) M gene sequences in GenBank, primers were designed, 154 samples of diarrhoea collected from March 2017–January 2018 were detected using the RT-PCR method. Results showed that the positive rate of PEDV was 51.92%, positive rate of PDCoV 35.06%, mixed infection rate was 24.03%. Results demonstrated that PEDV and PDCoV are prevalent in swine, and important causes of diarrhoea of piglets in Henan.

**Key words:** Porcine epidemic diarrhoea virus; Porcine delta virus; prevalence