

陈瑛琪, 蔡 瑶, 龚双燕, 等. 四川地区一株猪塞内加谷病毒的分离鉴定及 *VPI* 基因的序列分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1390-1396.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.017

四川地区一株猪塞内加谷病毒的分离鉴定及 *VPI* 基因的序列分析

陈瑛琪¹, 蔡 瑶¹, 龚双燕¹, 李小璟¹, 李雨濛¹, 李幽幽¹, 徐逸飞¹, 徐志文^{1,2}, 朱 玲^{1,2}

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要: 猪塞内加谷病毒(Seneca Valley virus, SVV)是一种新出现的小RNA病毒科病毒,感染该病毒的猪群,尤其是仔猪可能出现严重的病理症状甚至死亡。2015年之前,该病毒主要流行于美国、加拿大及巴西等地区,并于2015年3月传入中国^[1],给养猪业带来了严重的经济损失。2018年2月,本实验室检测并收集了阳性病料,采用PK-15细胞对病料进行病毒分离,并通过观察细胞CPE(细胞病变效应)、RT-PCR扩增和*VPI*基因序列测定进行鉴定。结果显示,成功分离到四川地区第一株SVV并将其命名为CH-MS-2018。对*VPI*基因的扩增测序及序列分析结果表明,本次分离得到的CH-MS-2018株*VPI*基因与GenBank上分别于2015年分离的2株和2016年分离的3株美国株的亲缘关系较近,同源性为98.6%。而与最早分离的SVV原始株关系较远,仅为88.0%~89.8%。本研究结果为进一步探索四川地区SVV的生物学性质奠定了基础。

关键词: 猪塞内加谷病毒; 分离; 鉴定; *VPI* 基因; 序列分析

中图分类号: S852.65; Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)06-1390-07

Isolation and identification of the Seneca Valley virus strains in Sichuan province and analysis of *VPI* gene sequences

CHEN Ying-qi¹, CAI Yao¹, GONG Shuang-yan¹, LI Xiao-jing¹, LI Yu-meng¹, LI You-you¹, XU Yi-fei¹, XU Zhi-wen^{1,2}, ZHU Ling^{1,2}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Seneca Valley virus (SVV) is an emerging virus of the family Picornaviridae. Pigs infected with SVV, especially piglets, may have severe pathological symptoms or even death. Before 2015, the disease was mainly prevalent in the United States, Canada and Brazil, and was introduced into China in March 2015^[1]. The epidemic brought serious economic losses to the pig industry. In February 2018, the laboratory of animal biotechnology center used the PCR technology to

detect and collect a number of SVV-positive materials. The virus was isolated from samples by PK-15 cells, and identified by cytopathic effect (CPE), RT-PCR amplification and *VPI* gene sequencing. The results showed that the first SVV strain in Sichuan province was successfully isolated and named as CH-MS-2018. According to the available data in the GenBank database, the *VPI* gene of CH-MS-2018 strain was closely related to that of two American

收稿日期: 2019-01-10

基金项目: 四川省“十三五”育种攻关项目(2016NYZ0052); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2015BAD12B04-2.3 国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP))

作者简介: 陈瑛琪(1994-), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 主要从事动物传染病病原分子生物学方向的研究。(E-mail) 865659992@qq.com

通讯作者: 徐志文, (Tel) 13981604765; (E-mail) abtcxzl72@126.com

strains isolated in 2015 and three American strains isolated in 2016, with the homology of 98.6%. However, the relationship between VP1 gene of CH-MS-2018 strain and its original strain was far away, with the homology of 88.0%–89.8%. The results of this study lay the foundation further exploring the biological properties of SVV in Sichuan province.

Key words: Seneca Valley virus; isolation; identification; VP1 gene; sequence analysis

作为小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 的一种较为新型的病毒,猪塞内加谷病毒 (Seneca Valley virus, SVV) 属于单独为其划分的塞内卡病毒属 (Senecavirus)。塞内加谷病毒与心病毒属 (Cardiovirus) 成员 (如脑心肌炎病毒) 的亲缘关系相对较近^[1]。SVV 病毒粒子直径为 24~30 nm, 在电镜下呈二十面体, 无囊膜结构^[2]。SVV 的基因组为单股正链 RNA, 全长大约为 7.3 kb, 由 5' 端非编码区 (5' UTR)、一个开放阅读框 (ORF) 和 3' 端非编码区 (3' UTR) 三部分组成。核糖体可将唯一的 ORF 翻译成“多聚蛋白”。该多聚蛋白随后被加工为 4 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白^[3]。而在这 4 种结构蛋白中, 对于 SVV 及其所属的小 RNA 病毒科而言, VP1 是目前研究较多且免疫原性最强的蛋白质^[4]。

最初, SVV 被认为是细胞培养过程中的污染物, 推测其可能来源于培养细胞所需营养液的配方, 如猪的胰酶或胎牛血清。2002 年, Hales 等成功分离了 SVV 的原型毒株 SVV-001, 在对该毒株进行鉴定后并将其归入小 RNA 病毒科, 并在之后将其单独归为塞内卡病毒属^[1]。2006 年, 部分学者分析了 12 株来自美国的且能导致猪发生明显水疱症状的微小 RNA 病毒样 (Picorna like) 病毒, 并借助实验室方法证实上述毒株具有抗原性, 提示 SVV 感染极可能导致猪发病^[5]。2007 年, SVV 在北美地区, 主要是美国和加拿大的猪群间传播, 并于同年被学者成功分离^[6-7], 2014 年巴西出现 SVV 的相关报道。2015 年及 2016 年, SVV 先后在中国广州及湖北出现^[8-9], 华南农业大学成功分离出国内首株 SVV 毒株, 并命名为 SVV CH-01-2015^[8]。

尽管早期的研究结果表明, 猪感染 SVV 早期分离株无症状表现^[10], 但近年来随着毒株的基因组发生变化, 越来越多的研究发现, 猪群感染 SVV 后, 其鼻镜及蹄冠表面会出现水疱, 进而皮肤发生溃烂从而导致跛足, 严重者可能死亡^[11]。而根据不同地区的毒株之间的差异, 猪群可出现的症状各异, 如不同程度的昏睡、精神沉郁和腹泻等, 但病猪体温往往无明显变化。有研究结果表明该病毒可使猪场新生仔

猪的死亡率升高, 最高时可达 70% 左右, 但感染该病毒的母猪产仔率并未受到影响^[12]。值得一提的是, 猪群感染 SVV 后的临床症状与口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的症状极其相似, 因此往往需要采集病料通过实验室方法进行区分。

2017 年 12 月份, 四川眉山某猪场开始发生水疱性疾病, 主要表现为母猪精神沉郁、口鼻及蹄冠部出现水疱, 且严重者皮肤表面发生溃烂并且流出水疱液。我们采集病料进行口蹄疫、猪水疱病等常见猪水疱性疾病检测, 结果均呈阴性。本实验室采集病变部位水疱皮及水疱液进行 PCR 检测, 证实所采病料呈 SVV 阳性之后, 我们从所采病料中分离得到四川首株 SVV 毒株。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

病料样品为采自 2018 年四川眉山某规模化猪场疑似 SVV 感染病猪的内脏、水疱皮及水疱液。猪肾细胞系 (PK-15) 保存于四川农业大学动物生物技术中心。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中登记的 SVV-001 (DQ641257) 序列中的 VP1 基因保守区设计 1 对特异性检测引物及 1 对 VP1 蛋白全基因引物。2 对引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。检测引物序列为: SVV-VP1 F₁: 5'-TTGAGGCGGGTAACACTGAC-3'; SVV-VP1 R₁: 5'-GAGTTCCAAGGGAGCACGAA-3', 扩增片段长度为 529 bp。VP1 蛋白全基因引物序列为: SVV-VP1 F₂: 5'-TCCACCGACAACGCCGAGACTG-3'; SVV-VP1 R₂: 5'-TTTGATCAGCATCTTCTGCTTG-3', 扩增片段长度为 792 bp。

1.3 阳性病料的检测

在无菌条件下, 将待检样品 (内脏、水疱皮或水疱液等) 用液氮充分研磨, 用生理盐水适当稀释后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液按照 Trizol 法提取总 RNA。用 Prime Script RTKit 反转录试剂盒操

作进行反转录,将 cDNA 产物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。按照常规 PCR 方法进行扩增,50 μl 反应体系如下:25 μl PrimeSTAR Max Premix、SVV 检测上下游引物各 1 μl (浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)、cDNA 模板 4 μl ,剩余通过加 ddH₂O 进行补充。

用上述合成的检测引物(SVV-VP1 F₁和 SVV-VP1 R₁)进行扩增。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳检测。

1.4 病毒的分离与纯化

1.4.1 病毒分离 将鉴定好的阳性病料充分冻融 3 次,12 000 r/min 离心 5 min,用青霉素和链霉素处理上清液 12 h 以上,在无菌环境下将处理后的病毒悬液以 0.22 μm 的滤头过滤,并于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按细胞培养方法制备符合接毒要求的 PK-15 细胞,即培养瓶中细胞生长状况良好且汇合度约 70%~80%时,取 1 ml 病毒悬液接种于细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h,期间每隔 20 min 摇晃 1 次,倒掉瓶中液体后,用无钙镁水(PBS)清洗 3 次,加入含有 20 ml/L 犊牛血清的 DMEM,设置阴性对照组。每隔 12 h 观察接毒组和对照组细胞的状态,连续观察 4 d,若未出现明显病变,则收取细胞瓶在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中反复冻融 3 次,将液体转移至离心管后 3 000 r/min 低速离心 10 min,取上清液收毒。收毒后继续接毒 500 μl ,盲传 3 代,观察每代细胞能否观察到 CPE(细胞病变效应),当第一次出现 CPE 时,等到 CPE 达到 75%左右时收毒。如此传代至接毒后出现稳定的 CPE 为止。

1.4.2 病毒蚀斑纯化 PK-15 提前备好铺满单层 PK-15 细胞的六孔板,将病毒悬液按照 6 种梯度(病毒原液及 10^{-5} ~ 10^{-1})进行稀释。将稀释的病毒悬液分别加入 6 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 2 h 后吸去病毒悬液。将配制好的 2% 琼脂糖与 2 倍细胞维持液按 1:1(体积比)的比例混匀后,加入各培养孔中,每孔 2 ml,冷却后凝固成覆盖层。倒置培养板,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养,逐天观察细胞病变情况,出现明显病变时可进行二次覆盖。取上述方法混合的混合液,加入中性红(3-氨基-7-甲氨基-2-甲基吩嗪盐酸盐)水溶液使其浓度为 0.002%,向各培养孔中加入 2 ml 混合液,使其冷却凝固形成第二覆盖层,再倒置培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱中培养,48 h 内观察结果。以提前剪掉尖头的 1 ml 枪头移液器吸取合适大小的蚀斑,将获得

的病毒悬液扩大培养后进行鉴定。

采用本实验室建立的 RT-PCR 方法检测口蹄疫病毒(FMDV)、猪水疱病病毒(SVDV)、猪 2 型圆环病毒(PCV2)、猪轮状病毒(RV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪传染性胃肠炎病毒(TGEV),并设阴性对照。将以上 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 病毒株鉴定

1.5.1 VP1 基因的扩增 用 Trizol 法从病毒培养物中提取 RNA 并用 Prime Script RTKit 反转录试剂盒进行反转录,得到 cDNA 后用上述的 VP1 测序引物进行 PCR 扩增。反应体系参照方法 1.3 中阳性病料检测中 PCR 反应体系,采用 VP1 全长扩增引物(SVV-VP1 F₂及 SVV-VP1 R₂)进行扩增,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 VP1 测序及分析 将观察到的大小符合预期的目的片段用凝胶回收试剂盒进行纯化回收,与 pMD19-T 载体在 16 $^{\circ}\text{C}$ 环境下连接 12 h 以上,转化 DH5 α 感受态细胞。将感受态细胞涂布于含氨苄青霉素的培养板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后,挑取单一无污染菌落。用含氨苄青霉素的 LB 培养基进行扩大培养,抽提质粒进行 PCR 检测,将筛选的阳性重组质粒和扩增所用上、下游引物(SVV-VP1 F₂及 SVV-VP1 R₂)送宝生物工程(上海)有限公司测序。使用 DNASTar 软件对获得的 SVV VP1 基因片段进行拼接,并由此推导 VP1 蛋白的氨基酸序列。对比所得序列与国际参考株序列后,利用基因分析软件 MEGA6.0 构建系统进化树,进一步对 SVV 分离株的同源性和分子遗传进化进行分析。

1.6 TCID₅₀ 的测定

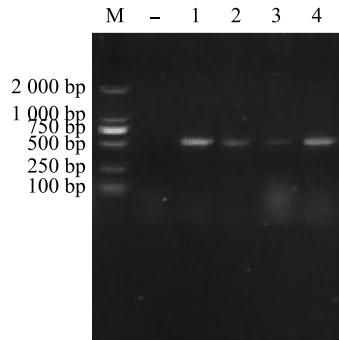
将分离纯化得到的病毒悬液在离心管中用 MEM 培养基作连续 10 倍的梯度稀释。将稀释好的病毒接种到已培养了单层 PK-15 细胞的 96 孔培养板中,每一稀释度接种一纵排,共 8 孔,每孔接种 100 μl 。设正常细胞对照组共两纵排。逐日观察并记录有病毒增殖的细胞孔,按 Reed-Muench 法计算得到病毒的半数细胞感染量(TCID₅₀)。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测

以 SVV-VP1 F₁和 SVV-VP1 R₁ 为检测引物,对 4

份病料进行 PCR 扩增,结果 4 份病料全部扩增出约 592 bp 的特异性条带,与预期片段大小一致(图 1)。



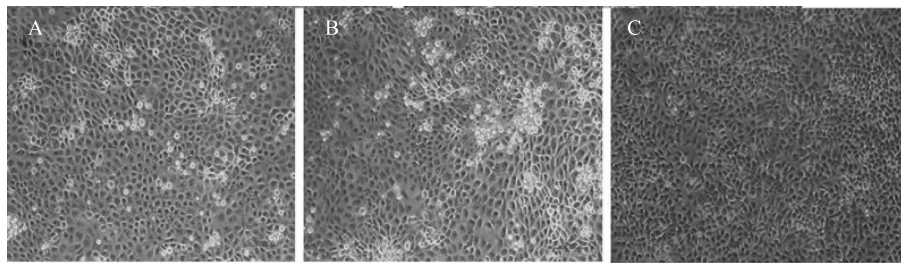
M:DNA 分子质量标准; -:阴性对照; 1~4:被检样品。

图 1 病料 PCR 检测结果

Fig.1 The PCR detection results of the samples

2.2 病毒分离

PK-15 细胞接种病毒悬液后,从第 1 代至第 3 代未见明显 CPE,至第 4 代开始,48 h 左右即出现 CPE,个别细胞变圆,表面变粗糙,折光性增强,从 72 h 开始,CPE 明显,大量细胞堆积破碎,有死细胞漂浮于液面上。目前该病毒株已分离到 9 代,而随着接毒代数的增加,PK-15 细胞出现 CPE 的时间逐渐变短,可观察到的 CPE 程度也更明显,存在一种规律性病变。即接毒 24 h 细胞生长良好,未见异常,培养 48 h 后,部分细胞变圆且不贴壁,CPE 约为 50%,对照细胞生长良好,培养 72 h,细胞破碎脱落且聚集现象明显,而对照组单层细胞保持致密排布,轮廓清晰,细胞脱落极少(图 2)。收获的病毒悬液经测序验证,分离到 1 株新的 SVV 毒株,命名为 CH-MS-2018。



A:接毒后第 48 h 出现细胞病变;B:接毒后第 72 h 细胞病变明显;C:正常对照组。

图 2 接毒后 PK-15 细胞的病变情况

Fig.2 The cytopathic effect (CPE) of PK-15 cells after virus inoculation

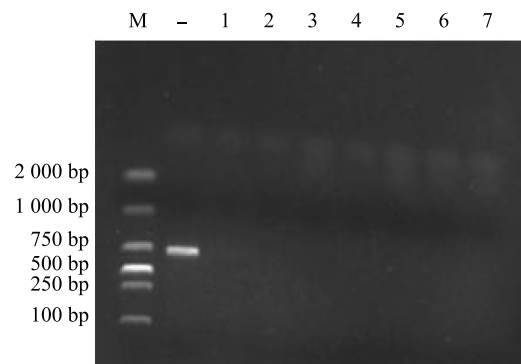
2.3 PCR 鉴定及毒株的纯净性

抽提 CH-MS-2018 株的细胞培养物和正常 PK-15 细胞的总 RNA,利用 RT-PCR 技术对病毒细胞培养液进行跟踪检测,在阴性对照组电泳样品无明显条带的情况下,第 1~9 代的病毒细胞培养液经电泳均能检测到大小约为 592 bp 的目的片段。

对分离株 CH-MS-2018 进行纯净性检测,经验证,CH-MS-2018 株在采用 PCR 及 PT-PCR 对 FM-DV、SVDV、PCV2、PEDV、TGEV、和 PoRV 进行检测后,均呈阴性(图 3)。

2.4 VP1 基因的扩增

用上述 VP1 全基因测序引物(SVV-VP1 F₂ 及 SVV-VP1 R₂)对 CH-MS-2018 的 VP1 基因进行 RT-PCR 扩增,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳得到大小约 792 bp 的片段,与预期片段大小相符。



M:DNA 分子质量标准;1:猪塞内加谷病毒; -:阴性对照;2:猪口蹄疫病毒;3:猪水疱病病毒;4:猪 2 型圆环病毒;5:猪流行性腹泻病毒;6:猪传染性胃肠炎病毒;7:猪轮状病毒。

图 3 RT-PCR 检测组织样品中 SVV 的纯净性

Fig.3 Purity detection of Seneca Valley virus (SVV) in tissue by RT-PCR

2.5 *VP1* 基因序列及遗传进化树分析

在对序列测定结果进行拼接后, CH-MS-2018 *VP1* 基因全长为 792 bp, 将获得的 *VP1* 基因序列与 GenBank 上已经公布的 SVV 世界参考株的 *VP1* 基因序列进行比对, 并通过 MEGA 6.0 软件构建 *VP1* 基因的遗传进化树(图 4)。结果如图 5 显示, CH-

MS-2018 的 *VP1* 基因与已公布的其他株之间的同源性为 88.0%~98.6%, 本次分离得到的毒株 *VP1* 基因与分离于 2015 年的 2 株及 2016 年的 3 株美国株的亲缘关系最近, 同源性为 98.6%。而与 SVV 原始株 SVV-001 株、美国 1989 年报道的 2 株和 1997 年报道的 2 株亲缘关系较远, 同源性为 88.0%~89.8%。

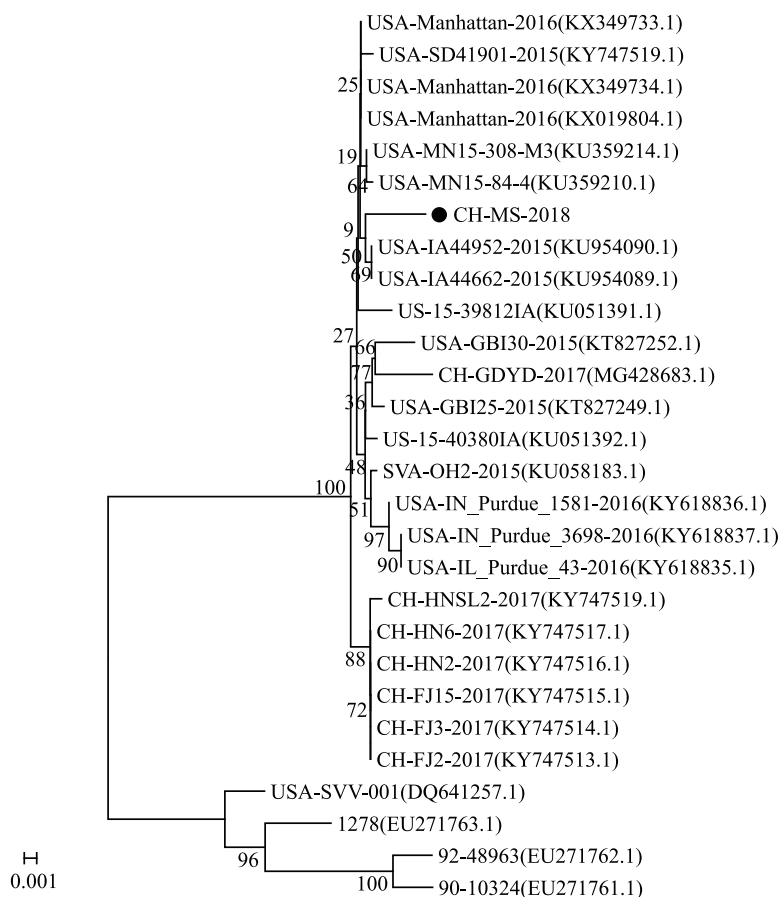


图 4 CH-MS-2018 *VP1* 基因的遗传进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of the *VP1* gene of CH-MS-2018

2.6 病毒 $TCID_{50}$

经观察病变孔及计算得出该 SVV 分离株的 $TCID_{50}$ 为 $1 \times 10^{-6.66}$ ml。

3 讨论

虽然 SVV-001 在早些年就被成功分离鉴定, 但之后存在一段较长的研究空白期, 直到近 5 年, 才在美国、加拿大及巴西等美洲地区发现新的疫情, 并且与 SVV-001 株不同, 在近些年分离的 SVV 病毒株对猪具有更强的致病性, 严重时甚至会导致跛行及初

生仔猪的死亡, 如 2015 年巴西出现的 SVV 感染, 该猪场的仔猪死亡率高达 70%。自 2015 年开始, 中国广东及福建一些猪场相继发生水疱性疾病, 相关研究机构收集病料进行分离鉴定后, 首次分离得到了中国首株 SVV 分离株, 在之后的研究中, 也陆续分离到其他 SVV 毒株。本研究首次在眉山某猪场发现疑似 SVV 感染的猪群, 经采样检测后证实为 SVV 感染, 分离鉴定得到了四川第一株 SVV 毒株。进一步对 *VP1* 基因进行序列分析, 结果显示该毒株与美国 2015-2016 年分离的毒株亲缘关系相近, 但与美国

	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		90.8	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.5	98.4	98.4	98.2	98.2	98.0	98.2	98.2	98.1	97.9	98.1	98.0	97.9	97.6	97.6	97.3	97.0	89.8	88.0	88.0	CH-MS-2018		
2	10.1		91.7	91.7	91.9	91.9	91.9	91.9	91.8	91.7	91.5	91.5	91.5	91.5	91.5	91.9	91.7	91.7	91.5	91.7	91.4	91.4	90.9	90.9	96.7	95.3	95.2	USA-SVV-001(DQ641257.1)		
3	1.4	9.0		100.0	99.7	99.7	99.7	99.6	99.5	99.5	99.4	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	99.2	99.0	99.2	99.1	99.0	98.7	98.7	98.5	98.1	90.4	88.6	88.6	USA-IA44952-2015(KU954090.1)	
4	1.4	9.0	0.0		99.7	99.7	99.7	99.6	99.5	99.5	99.4	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	99.2	99.0	99.2	99.1	99.0	98.7	98.7	98.5	98.1	90.4	88.6	88.6	USA-IA44662-2015(KU954089.1)	
5	1.4	8.7	0.3	0.3		100.0	100.0	99.9	99.7	99.7	99.4	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	99.5	99.2	99.5	99.4	99.2	99.0	99.0	98.7	98.4	90.7	88.9	88.9	USA-Manhattan-2016(KX349734.1)	
6	1.4	8.7	0.3	0.3	0.0		100.0	99.9	99.7	99.7	99.4	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	99.5	99.2	99.5	99.4	99.2	99.0	99.0	98.7	98.4	90.7	88.9	88.9	USA-Manhattan-2016(KX349733.1)	
7	1.4	8.7	0.3	0.3	0.0	0.0		99.9	99.7	99.7	99.4	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	99.5	99.2	99.5	99.4	99.2	99.0	99.0	98.7	98.4	90.7	88.9	88.9	USA-Manhattan-2016(KX019804.1)	
8	1.5	8.7	0.4	0.4	0.1	0.1	0.1		99.9	99.6	99.2	99.2	99.0	99.2	99.2	99.2	99.4	99.1	99.4	99.2	99.1	98.9	98.9	98.6	98.2	90.7	88.9	88.9	USA-MN15-308-M3(KU359214.1)	
9	1.7	8.9	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3	0.1		99.5	99.1	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	99.2	99.0	99.2	99.1	99.0	98.7	98.7	98.5	98.1	90.5	88.8	88.8	USA-MN15-84-4(KU359210.1)	
10	1.7	9.0	0.5	0.5	0.3	0.3	0.3	0.4	0.5		99.1	99.1	98.9	99.1	99.1	99.1	99.2	99.0	99.2	99.1	99.0	98.7	98.7	98.5	98.1	90.4	88.6	88.6	USA-SD41901-2015(KY747519.1)	
11	1.8	9.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9		100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	98.9	98.6	98.9	98.7	98.6	98.4	98.4	98.1	97.7	90.5	88.8	88.8	CH-HN6-2017(KY747517.1)	
12	1.8	9.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9	0.0		99.7	100.0	100.0	100.0	98.9	98.6	98.9	98.7	98.6	98.4	98.4	98.1	97.7	90.5	88.8	88.8	CH-HN2-2017(KY747516.1)	
13	2.1	9.2	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.1	1.1	0.3	0.3		99.7	99.7	99.7	98.6	98.4	98.6	98.5	98.4	98.1	98.1	97.9	97.5	90.5	89.0	89.0	CH-HN12-2017(KY747515.1)	
14	1.8	9.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9	0.0	0.0	0.3		100.0	100.0	98.9	98.6	98.9	98.7	98.6	98.4	98.4	98.1	97.7	90.5	88.8	88.8	CH-FJ15-2017(KY747515.1)	
15	1.8	9.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9	0.0	0.0	0.3	0.0		100.0	98.9	98.6	98.9	98.7	98.6	98.4	98.4	98.1	97.7	90.5	88.8	88.8	CH-FJ3-2017(KY747514.1)	
16	1.8	9.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0		98.9	98.6	98.9	98.7	98.6	98.4	98.4	98.1	97.7	90.5	88.8	88.8	CH-FJ2-2017(KY747513.1)	
17	1.9	8.7	0.8	0.8	0.5	0.5	0.5	0.6	0.8	0.8	1.1	1.1	1.4	1.1	1.1	1.1		98.7	99.5	99.4	99.2	99.0	99.0	98.7	98.4	90.7	88.9	88.9	US-15-40380(AKU051392.1)	
18	2.2	9.0	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	0.9	1.0	1.0	1.4	1.4	1.7	1.4	1.4	1.4	1.3		99.0	98.6	98.5	98.2	98.2	98.0	97.6	90.2	88.6	88.6	US-15-39812(AKU051391.1)	
19	1.9	9.0	0.8	0.8	0.5	0.5	0.5	0.6	0.8	0.8	1.1	1.1	1.4	1.1	1.1	1.1	0.5	1.0		99.4	99.5	99.2	99.2	98.7	98.4	90.4	88.9	88.9	SVA-OH2-2015(KU058183.1)	
20	2.1	9.2	0.9	0.9	0.6	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9	1.3	1.3	1.5	1.3	1.3	1.3	0.6	1.4	0.6		99.1	98.9	98.9	98.9	98.5	90.3	88.5	88.5	USA-GB25-2015(KT82749.1)	
21	2.2	9.0	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	0.9	1.0	1.0	1.4	1.4	1.7	1.4	1.4	1.4	0.8	1.5	0.5	0.9		99.7	99.7	98.5	98.1	90.4	88.9	88.9	USA-IN_Purdue_1581-2016(KY618836.1)	
22	2.5	9.3	1.3	1.3	1.0	1.0	1.0	1.1	1.3	1.3	1.7	1.7	1.9	1.7	1.7	1.7	1.0	1.8	0.8	1.1	0.3		100.0	98.2	97.9	90.4	88.6	88.6	USA-IN_Purdue_3698-2016(KY618837.1)	
23	2.5	9.3	1.3	1.3	1.0	1.0	1.0	1.1	1.3	1.3	1.7	1.7	1.9	1.7	1.7	1.7	1.0	1.8	0.8	1.1	0.3	0.0		98.2	97.9	90.4	88.6	88.6	USA-IL_Purdue_43-2016(KY618835.1)	
24	2.7	9.9	1.5	1.5	1.3	1.3	1.3	1.4	1.5	1.5	1.9	1.9	2.2	1.9	1.9	1.9	1.3	2.1	1.3	1.1	1.5	1.8	1.8		98.0	89.6	87.9	87.9	USA-GB30-2015(KT827252.1)	
25	3.1	9.9	1.9	1.9	1.7	1.7	1.7	1.8	1.9	1.9	2.3	2.3	2.6	2.3	2.3	2.3	2.3	2.5	1.7	1.5	1.9	2.2	2.2	2.0		89.6	87.9	87.9	CH-GDYD-2017(MG428683.1)	
26	11.3	3.4	10.5	10.5	10.2	10.2	10.2	10.2	10.4	10.5	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.4	10.2	10.8	10.5	10.7	10.5	10.5	10.5	11.4	11.4		95.3	95.2		1278(EU271763.1)
27	13.6	4.9	12.8	12.8	12.4	12.4	12.4	12.4	12.4	12.6	12.8	12.6	12.6	12.3	12.6	12.6	12.6	12.4	12.8	12.4	12.9	12.4	12.8	12.8	13.6	13.7	4.9		98.4	92-48963(EU271762.1)
28	13.6	5.0	12.8	12.8	12.4	12.4	12.4	12.4	12.6	12.8	12.6	12.6	12.6	12.3	12.6	12.6	12.6	12.4	12.8	12.4	12.9	12.4	12.8	12.8	13.6	13.7	5.0	1.7		90-10326(EU271761.1)

图5 SVV VP1 基因核苷酸序列相似性分析

Fig.5 Homology analysis of the SVV isolates to reference strains based on the VP1 gene nucleotide sequences

国早期报道的毒株亲缘关系较远,这种基因上的变异可能会导致该毒株的性质发生变化。

在 CH-MS-2018 株的分离鉴定及基因分析过程中,我们发现该毒株存在一定特别之处。第一,与之前的毒株相比,CH-MS-2018 株分离首次出现典型 CPE 的时间更长。无论是国外还是中国本地 SVV 毒株,接毒后细胞出现典型 CPE(细胞病变效应)的时间一般在 24 h 到 48 h 之间,48 h 后出现 80% 以上 CPE。而 CH-MS-2018 在分离的第 1 代至第 3 代间 PK-15 细胞均未出现明显 CPE,至第四代开始,接毒后细胞 48 h 左右才开始出现 CPE,直至 72 h, CPE 才达 80% 以上。第二,与其他毒株相比,CH-MS-2018 株 VP1 基因序列存在基因突变,导致 3 处密码子编码的氨基酸由丝氨酸突变为苯丙氨酸(³⁴PHE³⁵),1 处密码子编码的丝氨酸突变为天冬酰胺(⁶⁷ASN⁶⁸)。由于 SVV 的衣壳蛋白 VP1 包含多个中和域,且暴露在病毒颗粒的表面,最具免疫显性,所以在诱导中和抗体方面起着最主要的作用。该序列的突变是否导致所编码的 SVV 衣壳蛋白 VP1 发生变化,甚至影响该毒株的毒力、感染周期及理化性质等,都有待更深入的研究。

另一方面,就临床症状来看,被 SVV 感染的猪群会出现与 FMD 类似的部分症状。由于临床症状难以区分,2 种病毒引起的疾病都无疑会给猪场带来重大的风险和影响,应将其列为重大疾病对待。

相比于口蹄疫病毒这类长期受到研究领域及各大猪场重视的疾病而言,SVV 由于全世界对其认知都比较有限往往被忽视,尤其在四川地区,以前尚未有该病毒的报道。因而本毒株的分离鉴定对于 SVV 在四川地区的研究具有重要意义,为后期研究提供了更多关于其病原学、流行病学与防治的理论基础。

参考文献:

- [1] HALES L M, KNOWLES N J, REDDY P S, et al. Complete genome sequence analysis of Seneca Valley virus-001, a novel oncolytic picornavirus. [J]. Journal of General Virology, 2008, 89 (5):1265.
- [2] LEME R A, ZOTTI E, ALCANTARA B K, et al. Senecavirus A: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds [J]. Transboundary & Emerging Diseases, 2015, 62(6):603-611.
- [3] VENKATARAMAN S, REDDY S P, LOO J, et al. Structure of Seneca Valley Virus-001, An oncolytic picornavirus representing a new genus [J]. Structure, 2008, 16(10):1555-1561.
- [4] GIMENEZ-LIROLA L G, RADEMACHER C, LINHARES D, et al. Serological and Molecular detection of senecavirus a associated with an outbreak of swine idiopathic vesicular disease and neonatal mortality [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2016, 54 (8): 2082.
- [5] KNOWLES N J, HALES L M, JONES B H, et al. Epidemiology of seneca valley virus: identification and characterization of isolates from pigs in the United States [JEB/OL]. (2014-11-05) [2018-11-07]. <https://www.researchgate.net/publication/267416696>.
- [6] PASMA T, DAVIDSON S, SHAW S L. Idiopathic vesicular disease in swine in Manitoba. [J]. Canadian Veterinary Journal-revue

- Veterinaire Canadienne, 2008, 49(1):84-85.
- [7] SINGH K. Seneca valley virus and vesicular lesions in a pig with idiopathic vesicular disease[J]. Journal of Veterinary Science & Technology, 2012, 3(6):e1000123.
- [8] 赵晓亚,伍绮文,伍子娴,等. 国内首株猪塞内加谷病毒(Seneca Valley virus)的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(11):839-843.
- [9] QIAN S, FAN W, QIAN P, et al. Isolation and full-genome sequencing of Seneca Valley virus in piglets from China, 2016[J]. Virology Journal, 2016, 13(1):173.
- [10] YANG M, VAN B R, XU W. Generation and diagnostic application of monoclonal antibodies against Seneca Valley virus. [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc, 2012, 24(1):42.
- [11] LEME R A, OLIVEIRA T E S, Alcântara B K, et al. Clinical manifestations of senecavirus a infection in neonatal pigs, Brazil, 2015[J]. Emerging Infectious Diseases, 2016, 22(7):1238-1241.
- [12] VANNUCCI F A, LINHARES D C L, BARCELLOS D E S N, et al. Identification and complete genome of seneca valley virus in vesicular fluid and sera of pigs affected with idiopathic vesicular disease, Brazil[J]. Transboundary & Emerging Diseases, 2015, 62(6):589-593.

(责任编辑:陈海霞)