

DOI: 10.13376/j.cblls/2016039

文章编号: 1004-0374(2016)03-0303-08



涂长春, 军事医学科学院军事兽医研究所研究员, 世界动物卫生组织(OIE) 狂犬病参考实验室主任。实验室主要从事动物病毒学及人兽共患病病毒的预防控制研究, 在猪瘟、狂犬病、蝙蝠病毒等重要动物疫病及人兽共患病病原生态学、致病机制、诊断技术研究等方面取得了创新性的突破, 形成了特色与优势。获得国家科技进步奖一等奖1项、广东省科学技术奖励特等奖1项、省及军队科技进步奖二等奖4项。在国内外专业期刊发表论文190多篇, 培养硕、博士研究生60多名。现任畜牧兽医学动物传染病学分会副理事长、OIE 狂犬病咨询专家、全国动物防疫专家委员会狂犬病专家组组长、国家病原微生物实验室生物安全专家委员会委员、中华预防医学会科学技术奖评审委员会委员等十多项学术任职。

猪瘟病毒的遗传多样性与进化

龚文杰^{1,2}, 史记暑², 涂长春^{1*}

(1 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130122; 2 美国堪萨斯州立大学兽医学院, 堪萨斯州曼哈顿市 66506)

摘要: 猪瘟是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的一种严重危害全球养猪业的烈性传染病, 是被 OIE 列为必须通报的动物疫病之一。基于病毒基因组片段核苷酸序列的系统进化分析, 将猪瘟病毒分为 3 个基因型(基因 1~3 型)和 11 个基因亚型(1.1~1.4、2.1~2.3 和 3.1~3.4)。不同基因型或基因亚型病毒株的流行与进化受到了时空、宿主动物和猪瘟防控策略的制约。欧洲流行的猪瘟病毒株从 20 世纪 70 年代由基因 1 型转变为基因 2 型, 其中该地区野猪群中流行的毒株属于基因 2.2 和 2.3 亚型, 拉丁美洲国家流行的猪瘟病毒株一直为基因 1 型, 韩国和我国台湾流行的毒株在 20 世纪末由基因 3 型转换为基因 2.1 亚型。随着鉴定的基因 2.1 亚型毒株的增加, 该亚型可进一步划分为 3 个亚亚型(2.1a~2.1c), 这 3 个亚亚型的毒株在我国都有流行, 其中 2.1b 是我国流行的优势毒株。研究表现突变是促进猪瘟病毒进化的主要动力, 同时, 同源重组和准种在猪瘟病毒进化过程中也扮演了一定角色。综上所述, 对猪瘟病毒流行毒株进行遗传与进化分析可以追踪病毒的来源和掌握该病毒的流行现状以及进化规律, 为有效防控猪瘟的发生与流行提供理论指导。

关键词: 猪瘟病毒; 遗传多样性; 进化

中图分类号: Q939.47; S852.65 文献标志码: A

Genetic diversity and evolution of classical swine fever virus

GONG Wen-Jie^{1,2}, SHI Ji-Shu², TU Chang-Chun^{1*}

(1 Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130122, China;

2 College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan 66506, Kansas, USA)

Abstract: Classical swine fever (CSF), caused by the CSF virus, is a highly contagious swine disease leading to significant economic losses for the pig industry worldwide. CSF is recognized as one of OIE notifiable diseases.

收稿日期: 2015-09-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31130052, 31572528); 中国博士后科学基金项目(2013M532129)

*通信作者: E-mail: changchun_tu@hotmail.com

Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of viral gene fragments shows that CSFV isolates can be divided into three genotypes (genotypes 1~3), which are further separated into 3 to 4 subgenotypes (1.1~1.4, 2.1~2.3 and 3.1~3.4). The temporal-spatial dynamics, host factors and control strategies have significant impact on the genetic diversity, distribution and evolution of CSFV isolates. It has been demonstrated that in Europe, where culling of infected pigs as control strategy was performed, genotype 1 isolates were switched to genotype 2 since 1970s, while CSF isolates circulating in wild boar population remain to be subgenotypes 2.2 and 2.3. In Latin America, genotype 1 viruses are only isolates circulating in this region. Furthermore, the major genotypes of CSF viruses in Korea and Taiwan were switched from genotype 3 to subgenotype 2.1 since the end of 20th century. The latter along with subgenotype 1.1 are predominant in mainland China. As the increasing number of CSF viruses detected in recent years, subgenotype 2.1 has been further classified into 3 sub-subgenotypes (2.1a~2.1c) and all of them have been found present in China. Most recent studies showed that nucleotide mutation has been recognized as the key factor to drive CSFV evolution. Moreover, homologous recombination and quasispecies also play important roles in the adaptation of CSFV to the environment. In conclusion, studies on genetic variation, genotype distribution and evolution of CSF viruses may provide useful insights into the control and prevention of this devastating disease.

Key words: classical swine fever virus; genetic diversity; evolution

猪瘟是由猪瘟病毒引起的,以高热、免疫抑制、全身广泛性出血和高发病率及死亡率特征的高度接触性传染病,是被 OIE 列为必须通报的动物疫病之一^[1]。猪瘟病毒主要危害家猪和野猪,其与牛病毒性腹泻病病毒 (bovine viral diarrhea virus, BVDV) 以及羊边界病病毒 (border disease virus, BDV) 一起为黄病毒科瘟病毒属成员。猪瘟的流行每年给全世界的养猪业造成了严重的经济损失,该病在我国被列为 A 类传染病。猪瘟病毒基因组由一个大的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和基因组 RNA 两端非翻译区 (non-translated region, NTR) 组成。ORF 编码一个由 3 898 个氨基酸组成的多聚蛋白,其在翻译时和翻译后被病毒和宿主蛋白酶进一步加工产生 4 个病毒结构蛋白 (Core、E^{ns}、E1 和 E2) 和 8 个非结构蛋白 (N^{pro}、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)^[2-3]。

猪瘟是一个较为古老的动物疫病,该病首次于 1810 年在美国田纳西州发现^[4],1822 年在法国有流行^[5]。此后,猪瘟疫情在全世界都有报道,如 1864 年英国、1888 年日本、1930 年加勒比海和 1925 年中国都报道有猪瘟的发生与流行^[4,6-7]。随着核苷酸测序技术和生物信息学的兴起和发展,猪瘟病毒流行毒株的进化地位及其地区分布情况已经比较清楚。基于病毒基因组 5'-NTR、E2 和 NS5B 核苷酸序列的系统发生分析,将猪瘟病毒分为 3 个基因型 (基因 1~3 型),每个基因型又进一步划分为 3~4 个基因亚型 (1.1~1.4、2.1~2.3 和 3.1~3.4)^[8]。这些不同基因型或基因亚型的毒株具有不同的地理分布特征,同时,毒株的传播与进化也受到了时空、宿主

动物和防控策略的影响,如我国 20 世纪 80 和 90 年代流行的猪瘟病毒分别属于 1.1、2.1、2.2 和 2.3 亚型^[7],而目前主要以基因 1.1 亚型和 2.1 亚型毒株流行为主,其中的基因 2.1 亚型因不断出现新的变异株,又进一步分为 3 个亚亚型^[9-11]。因此,综合分析猪瘟病毒的遗传多样性和进化特点不仅对揭示全球猪瘟病毒的遗传进化规律和分布特征,掌握流行现状,追溯传播来源具有十分重要的科学意义,也对发现和监测新毒株的流行以及毒株之间的联系,预报流行趋势,监测现行使用疫苗的有效性,提出新的防治策略具有重要作用。

1 猪瘟病毒的基因分型及遗传多样性

目前用于猪瘟病毒基因分型的基因片段主要有 5'-NTR、E1/E2、E2、NS2、NS2/3、NS3、NS5B 以及 3'-UTR,其中 5'-NTR、E2 和 NS5B 最为常用。20 世纪 90 年代,英国威桥兽医实验室 Lowings 等^[12]通过对 E2 基因 190 个核苷酸 (2 518~2 707 位核苷酸) 的区段比较分析,首次较为系统地对猪瘟病毒株进行了遗传进化分析,他们将 1945 至 1994 年间从 14 个不同国家和地区分离到的 115 株猪瘟病毒毒株分成了 2 个基因型,5 个基因亚型以及 2 个完全不同的毒株 (英国先天性震颤分离株 Congenital Tremor 和日本神奈川分离株 Kanagawa,其后来被分别划分为基因 3.1 亚型和 3.4 亚型),其中基因 1 型可再分成 2 个亚型 (1.1 和 1.2 亚型),基因 2 型则进一步分成 3 个亚型 (2.1、2.2 和 2.3 亚型)。此后,同样来自英国威桥兽医实验室的 Paton 等^[8]选择 5'-NTR 基因长度为 150 个核苷酸的区段 (200~349 位

核苷酸, 以 Alfort 187 为参考)、E2 基因长度为 190 个核苷酸的区段(2 518~2 707 位核苷酸)和 NS5B 基因长度为 459 个核苷酸的区段(11 158~11 586 位核苷酸)对来自不同国家和实验室的猪瘟疫病毒株进行了基因分型, 猪瘟疫病毒被分为 3 个基因型共 10 个基因亚型, 这是到目前为止国际上公认的、最为精确的猪瘟疫病毒基因分型。其中基因 1 型可再分成 3 个亚型(1.1、1.2 和 1.3 亚型), 主要由 20 世纪 80—90 年代亚洲和南美洲的分离毒株组成; 此外, 还有一些古典的欧洲和美洲及日本的分离毒株, 我国的石门毒株、猪瘟疫兔化弱毒株(HCLV)均属于此基因型。基因 2 型可再分成 3 个亚型(2.1、2.2 和 2.3 亚型), 主要由 20 世纪 80—90 年代欧洲的分离毒株组成。基因 3 型可再分成 4 个亚型(3.1、3.2、3.3 和 3.4 亚型), 主要由 20 世纪 90 年代在韩国、泰国、日本和我国台湾发现的独特毒株构成。因此, 猪瘟疫病毒 5'-NTR、E2 和 NS5B 基因 3 个分析区段已成为国际上比较认可的用于猪瘟疫病毒基因分型的靶标区段。

由于上述猪瘟疫病毒基因片段所含的核苷酸序列较短, 常常难以区分亲缘关系较近的毒株, 并导致系统进化分析的统计学意义偏低。为此, 2012 年, 德国汉诺威兽医大学欧盟与 OIE 猪瘟疫参考实验室的 Postel 等^[13]对 33 个猪瘟疫病毒分离毒株基因组 5'-NTR-E2 区段的约 3 508 个核苷酸进行了分析。基于 5'-NTR-E2、5'-NTR 和 E2 片段以及 E2 全长基因的系统进化分析显示, E2 全长基因编码序列构建的进化树更具有统计学意义。此外, 5'-NTR-E2 多序列比对发现, 不同基因型之间的核苷酸同源性差异为 14.5%~19.9%, 同一基因型不同亚型之间则为 5.5%~12.1%, 而同一基因型不同毒株之间的同源性差异为 $\leq 7.7\%$; 全长 E2 编码基因的多序列比对则发现, 猪瘟疫病毒不同基因型之间的遗传差异为 15.6%~23%, 同一基因型不同亚型之间的遗传差异为 6.3%~14%, 同一基因型不同毒株之间的遗传差异则为 $\leq 8.5\%$ 。在此研究基础上, Postel 等^[14]发现基于 5'-NTR-E2 和 E2 全长编码基因序列的系统进化分析, 将以前 E2 基因片段系统进化分析鉴定的 1.2 亚型古巴猪瘟疫病毒流行毒株重新划分为一个新的基因亚型, 即基因 1.4 亚型。

随着猪瘟疫病毒基因分型研究的深入, 许多学者发现有些猪瘟疫病毒流行毒株可在基因亚型基础上进一步划分为多个亚亚型。2005 年, 我国台湾学者将 1996—2001 年分离的猪瘟疫病毒 2.1 基因亚型流行毒

株进一步划分为 2.1a 和 2.1b 两个亚亚型^[15], 前者包括德国(Paderborn 株)和意大利等欧洲国家的分离株, 而后者主要由我国台湾、大陆、韩国和东南亚国家的猪瘟疫病毒分离株组成。2013 年, Jiang 等^[10]对 2011—2012 年分离自我国湖南省的 8 株猪瘟疫病毒流行毒株进行系统进化分析, 结果表明其中 5 株病毒株在 2.1 亚型中形成一个新的分支, 即 2.1c 亚亚型, 其与 2.1a 和 2.1b 亚亚型毒株的 E2 全长基因核苷酸同源性分别为 90.2%~94.9% 和 89.9%~93.8%, 低于 2.1a 和 2.1b 之间的同源性(91.1%~95.7%)。实际上, 该亚亚型毒株最早于 1998 年在广西首次发现, 目前在泰国和老挝两个东南亚国家也发现有该亚亚型毒株的流行。与此同时, 彭志成等^[11]对 2011 年分离自广东省的 56 株猪瘟疫病毒流行毒株进行 E2 序列比对发现, 其中 25 株病毒属于 2.1c 亚亚型。近年来, 随着更多 2.1c 毒株在云南、福建、湖北、河南和辽宁等省份的发现, 表明该亚亚型毒株的流行分布较为广泛。

为了系统地分析基因 2.1 亚型毒株的遗传多样性, 笔者收集了实验室及其合作伙伴近年来获得的毒株序列与 GenBank 发布的大量猪瘟疫病毒 E2 基因序列, 利用 Mega 6.0 进化分析软件对各基因型代表毒株的 E2 基因片段(190 nt)进行了分析, 绘制了较全面的猪瘟疫病毒系统进化树(图 1)。从进化树中可以看出, 猪瘟疫病毒毒株仍可为 3 个基因型和 11 个基因亚型(1.1、1.2、1.3、1.4; 2.1、2.2、2.3; 3.1、3.2、3.3、3.4), 2.1 亚型又进一步分为 3 个亚亚型(2.1a~2.1c), 这 3 个亚亚型的毒株在我国都有流行, 其中 2.1b 是我国目前的优势流行毒株, 每一亚亚型毒株的地理分布情况在下文中进行了详细地分析。2010 年, Blome 等^[16]研究表明, 欧洲流行的 2.3 亚型还可进一步划分为 2.3.1 和 2.3.2 两个亚亚型, 前者分布在保加利亚、德国、波兰、捷克、斯洛文尼亚和克罗地亚等国家, 后者则主要分布在罗马尼亚、克罗地亚、西班牙和科索沃等国家和地区。

2 猪瘟疫病毒流行的区域分布特点

猪瘟疫病毒的流行传播具有明显的地域性。由于不同地区或国家采取不同的策略来控制 and 消灭猪瘟疫, 如欧盟采取捕杀发病猪的策略来消灭猪瘟疫, 而我国采用疫苗免疫结合捕杀的策略来防控猪瘟疫的流行, 这些防控措施也导致在这些地区流行的猪瘟疫病毒优势毒株随着时间的推移而发生变化。同时, 猪瘟疫病毒进化也与宿主有关, 如分离自欧洲野猪的病

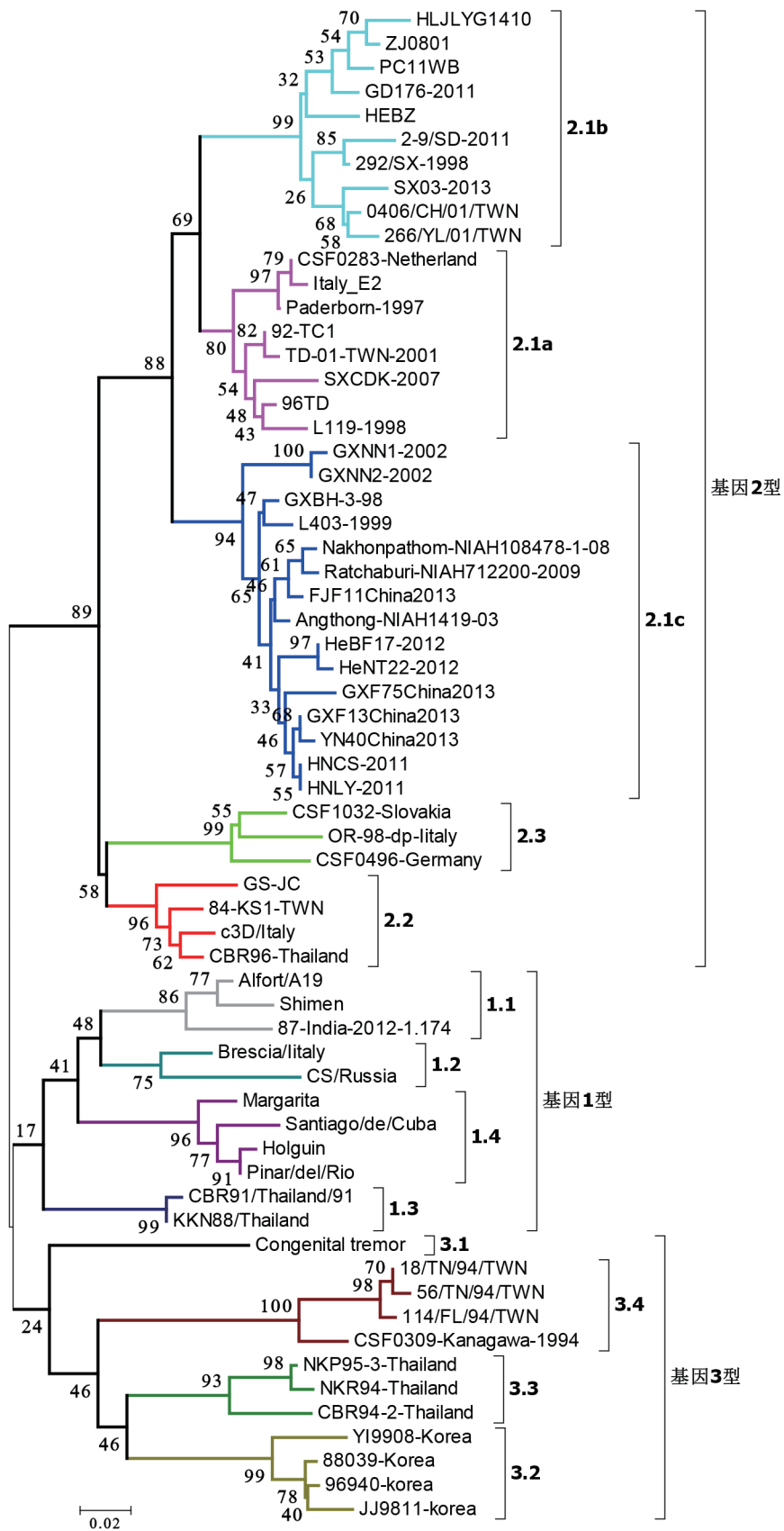


图1 基于190-nt E2基因核苷酸序列的猪瘟病毒系统进化树

毒株主要为基因 2.2 和 2.3 亚型^[8]。通过分子流行病学研究掌握猪瘟流行规律和区域分布特点, 可以为制定科学的猪瘟防控策略提供帮助。

2.1 欧洲猪瘟病毒流行的区域分布特点

除了 20 世纪 60 年代在英国分离的遗传差异很大的先天性震颤分离株(基因 3.1 亚型)以外, 1920—1970 年间欧洲分离获得的猪瘟病毒毒株都属于基因 1 型, 其中大部分为 1.1 亚型, 这些毒株与广泛用于血清学诊断的法国株 Alfort 187 株亲缘关系较近。分离时间较早的意大利 Brescia 株属于 1.2 亚型, 而 1.3 亚型的毒株在欧洲没有报道。1970 年以来, 除了 1989 年在比利时分离到的 1.1 亚型毒株和 20 世纪 90 年代乌克兰分离的 1.1 和 1.2 亚型的毒株外, 有关基因 1 型毒株在欧洲流行的报道很少^[8]。

实际上, 20 世纪 80 年代和 90 年代欧洲分离的大量猪瘟病毒毒株都属于基因 2 型。2.1 和 2.2 亚型毒株在欧洲的分布范围较窄, 而在欧洲不同地区的野猪中分离到了 2.2 和 2.3 亚型的毒株, 最早确定的 2.3 亚型是 1971 年来源于远东地区日本的 Osaka 株, 之后在许多欧洲国家的家猪中也陆续分离到 2.3 亚型^[17-19]。2.3 亚型的毒株于 1982 年在德国首次发现, 该亚型的毒株随后在意大利、法国、比利时、英国、奥地利、瑞士、匈牙利、捷克、波兰和斯洛伐克共和国等国家都有发现^[1]。

20 世纪 90 年代末以前, 2.1 亚型毒株在欧洲仅有零星报道, 这一亚型于 1989 年首次在德国分离获得, 随后在荷兰(1992 年)和瑞士(1993 年)也报道过它的踪迹。除此之外, 在该地区的野猪中没有该亚型毒株流行。但是, 1997—1998 年, 该亚型毒株在西欧引起了一次猪瘟大流行。这次大流行于 1997 年在德国爆发, 随后传入荷兰, 再传播到意大利、西班牙和比利时, 历时 1 年 5 个月, 引发 400 多起大大小小的暴发, 造成数十亿欧元的经济损失^[20]。此外, 1997 年 6 月克罗地亚和 2000 年英国也分离出 2.1 亚型毒株^[13]。20 世纪 90 年代末, 俄罗斯流行的猪瘟病毒株为 1.1 亚型; 2003 年, 在该国也发现 2.3 亚型猪瘟病毒株的流行^[21]。

2.2 美洲猪瘟病毒流行的区域分布特点

到目前为止, 美洲仅有基因 1 型病毒株的流行, 其可进一步划分为 4 个基因亚型。20 世纪 40 年代美国流行毒株 (Oldlederle USA'46) 属于 1.1 基因亚型, 与英国 20 世纪 50 年代 (Fortdodge USA'54 和 Liphook UK'57) 和德国 20 世纪 60 年代 (Eystrup Germany'64) 的病毒分离株亲缘关系较近。巴西在

20 世纪 80 年代和 20 世纪 90 年代末以及墨西哥在 90 年代分离的猪瘟病毒也属于 1.1 亚型, 该亚型的毒株还在阿根廷和哥伦比亚等国家流行^[22]。1990 年底古巴暴发了由 1.2 亚型病毒株引起的猪瘟疫情^[23]。在美洲, 基因 1.3 亚型毒株的流行在洪都拉斯和危地马拉两国均有已报道^[22]。Postel 等^[14]选择 E2 全长基因序列对古巴猪瘟病毒流行毒株进行系统进化分析, 结果表明古巴有基因 1.4 亚型的毒株流行。可以说, 1.1 亚型的猪瘟病毒在全球范围内是一个古老的毒株, 而且一直在全球大部分地区流行至今。

2.3 亚洲猪瘟病毒流行的区域分布特点

除了 1.4 和 3.1 亚型外, 其他 9 个基因亚型在亚洲的不同地区或不同时期均有流行。现存的古老毒株来自于 1966 年日本分离的北海道株 (Hokkaido), 属于 1.1 亚型, 而 1971 年分离的大阪株 (Osaka) 及 1974 年分离的神奈川株 (Kanagawa) 分别是 2.3 亚型和 3.4 亚型中最早的代表株^[24]。在 20 世纪 80 年代, 1.1 亚型和 1.2 亚型毒株在泰国发现, 20 世纪 90 年代后泰国又出现了 1.3、2.2 和 3.3 亚型病毒株的流行^[8]。中国和马来西亚分别于 1979 年和 1986 年发现有 2.1 亚型毒株流行; 20 世纪 90 年代在我国台湾地区鉴定了相似的病毒株。然而, 在韩国, 3.2 亚型毒株从 1999 年以后逐步被 2.1 亚型流行毒株 (2.1b) 所替代^[25]; 在我国台湾地区, 3.4 亚型毒株在 1996 年以后也逐步被 2.1 亚型毒株替代^[15]。通过对 1997~1999 年老挝分离的猪瘟病毒流行毒株进行分析发现, 该国中北部地区和中南部地区分别流行着 2.1 和 2.2 基因亚型毒株^[26]。2005 年以来, 印度报道的猪瘟病毒流行毒株主要是 1.1 亚型, 同时也有 2.1 和 2.2 亚型毒株流行^[27-29]。Postel 等^[30]对最近引起尼泊尔猪瘟暴发的两株流行毒株进行进化分析, 结果发现它们均属于 2.2 亚型, 与目前流行于印度的 2.2 亚型毒株亲缘关系较近。2009 年, 以色列暴发的猪瘟是由 2.1 亚型毒株感染导致的, 这些毒株与我国流行的基因 2.1b 亚型毒株同源性较高^[31]。除此之外, 中东其他国家猪瘟毒株的流行情况目前尚不了解。

为了掌握我国猪瘟病毒的流行态势及其遗传多样性分布, Tu 等^[7]对 1993—1999 年间的 110 个流行毒株 E2 基因序列进行了遗传进化分析, 结果表明在此期间, 我国流行的猪瘟病毒毒株分别属于 1.1、2.1、2.2 和 2.3 基因亚型, 其中 2.1 和 2.2 亚型毒株占据主导地位。近年来的研究表明, 我国 2000

年以后未检测到 2.3 亚型毒株, 2009 年以后未检测到 2.2 亚型毒株, 目前在我国流行的毒株主要是 2.1 和 1.1 基因亚型, 其中前者是我国最主要的流行毒株, 分布于绝大部分省市自治区^[9-11]。

由于近年来我国发现的 2.1 亚型毒株迅速增加, 每一个亚亚型毒株的分布区域都有一定特点, 如 2.1a 亚亚型毒株曾在广西、贵州、湖南、陕西和台湾流行, 但 2007 年以后就消失了。该亚亚型毒株与 20 世纪 90 年代于德国和意大利等欧洲国家导致猪瘟暴发的病毒分离株以及老挝分离株亲缘关系较近, 同时, 位于进化支最外侧的德国分离株 Paderborn 在进化时间上可能较其他 2.1a 毒株要早, 该结果显示我国和老挝流行的 2.1a 毒株可能来源于欧洲。2.1b 亚亚型分布于我国大陆的绝大部分省市自治区、台湾地区以及韩国和俄罗斯等国家。此外, 2009 年以色列暴发猪瘟的病毒株也属于该亚亚型。2.1c 亚亚型毒株最早于 1998 年在广西出现 (GXBH-3-98), 但直到近几年来才逐步引起重视。目前在我国湖南、湖北、广西、广东、云南、福建、河南和辽宁等省份以及泰国和老挝均发现有该亚亚型毒株的流行, 在该群毒株中进化地位最早的是 2002 年于广西分离的病毒株 GXNN1-2002 和 GXNN2-2002, 据此推测, 其他地区流行的 2.1c 毒株可能来源于广西^[10-11]。除了以上鉴定的 3 个 2.1 亚亚型的病毒株外, 更多新的 2.1 亚型毒株逐步被发现, 如 2011 年首次在印度报道流行的 2.1 亚型猪瘟病毒株, 这些病毒株与已鉴定的 2.1 亚型毒株相比具有一定的遗传距离。随着近年来收集和进行序列测定的 2.1 亚型毒株的增加, 2.1 亚型有可能会进一步划分为更多的亚亚型。

上述分析表明, 在我国 2.1a 亚亚型毒株与欧洲分离株的亲缘关系较近, 这可能是由于欧洲一直是我国进口猪的主要来源地, 猪瘟病毒有可能通过引进种猪而传入, 同时, 我国从未向欧盟出口活猪及猪肉制品, 因此, 猪瘟从我国传入欧洲的可能性很小。值得注意的是, 3 个 2.1 亚亚型毒株在广西均有分布, 表明该地区面临着严峻的猪瘟防控压力, 在与其他省市或周边的东南亚国家进行生猪贸易时应进行严格检验检疫, 防止猪瘟病毒的肆意扩散。

3 猪瘟病毒的进化

系统进化分析显示, 在不同地区或不同时期流行的猪瘟病毒株具有明显的遗传多样性, 这些遗传差异是猪瘟病毒受到了生存环境的选择压力(比如

疫苗免疫), 从而获得进化的结果。进化产生的猪瘟病毒变异株可能获得了更好地适应环境的能力, 表现为毒力和免疫逃逸等表型的变化。目前研究发现, 猪瘟病毒在选择压力下获得进化的主要方式有突变、同源重组和准种, 其中突变是促进猪瘟病毒进化的主要动力, 而同源重组和准种多样性也在猪瘟病毒进化过程中扮演一定角色^[32]。

3.1 突变与猪瘟病毒进化

基于猪瘟病毒每一基因和全基因组的贝叶斯分析推测, 猪瘟病毒最近的共同祖先出现在 1583~1859 年, 平均为 1 771 年。同时, 每一病毒基因或病毒全基因组的进化速率(每年每个位点的替换率)为 $3.17 \times 10^{-4} \sim 1.16 \times 10^{-3}$ ^[32], 但每一个病毒基因的进化速率有一定差异, 结构蛋白与非结构蛋白相比具有更快的变化速率, 这可能是结构蛋白受到机体免疫应答的选择压力导致的。病毒基因的选择分析显示, 猪瘟病毒每一基因的非同义突变与同义突变的比率 (dN/dS) 小于 1, 表明负选择(纯化选择)是猪瘟病毒进化的主要驱动力^[32]。然而, 阳性选择在某些密码子的进化过程中发挥重要作用, 如 E^{ms} 蛋白有一阳性选择位点 (⁴⁷⁶S→R), 该阳性选择使猪瘟病毒的入侵从肝素依赖途径转变为肝素非依赖途径^[33]。同时, 在 E2 蛋白中也发现有 2 个位点 (34 位和 39 位氨基酸) 发生了阳性选择^[34-36]。到目前为止, 除了点突变外, 尚未在猪瘟病毒的开放阅读框 ORF 中发现碱基缺失或插入引起的移码突变。然而, 病毒基因组两端的非翻译区 5'-NTR 和 3'-NTR 则有碱基缺失或插入的现象, 特别是兔体传代后获得的猪瘟兔化弱毒疫苗株 C 株在 3'-NTR 有 13 个碱基的插入, 该位点的插入可能会改变该病毒株在体内的复制特性。

3.2 同源重组与猪瘟病毒进化

同源重组是许多病毒重要的进化方式, 与黄病毒科其他成员, 如登革热病毒 DENV、丙肝病毒 HCV 和牛病毒性腹泻病毒 BVDV 一样, 有些猪瘟病毒也由其亲本毒株通过同源重组产生。研究人员利用重组检测程序软件包 (random recombination program, RDP) 鉴定出多个发生同源重组的猪瘟病毒株, 包括基因 2.2 亚型的 39 株和 IND/UK/LAL-290 株^[33,37-39]。分离自我国的 39 株是首次被证实存在同源重组的猪瘟病毒株, 该病毒基因组有两处发生了重组, 第一处重组的主要亲本株 (major parent) 和次要亲本株 (minor parent) 分别为基因 2.1a 亚亚型的 Paderborn 株和我国兔化弱毒疫苗株 C 株 (基

因 1.1 亚型), 重组的起始和终止点分别为 8 421 和 12 260 位核苷酸; 第二处重组的主要亲本株和次要亲本株分别为基因 2.1a 亚型的 96TD 株和基因 1.1 亚型的 cF114 株, 重组的起始和终止点分别为 19 和 639 位核苷酸^[37-38]。上述数据显示, 猪瘟疫病毒 39 株主要由基因 2.1a 亚型和基因 1.1 亚型病毒株重组而来。流行毒株与疫苗株 C 株的重组可能是这两种病毒同时感染同一宿主的结果, 这种疫苗株与野毒株发生重组的情况在其他病毒也有报道^[37]。由于我国利用 C 株对猪群进行大规模免疫, 鉴于 C 株能与其他基因型流行毒株发生重组以及基因 2.1 亚型毒株的遗传多样性, 且在同一地区存在多个亚型毒株的流行, 目前尚未清楚近些年来不断出现的新的基因 2.1 亚型毒株的产生是否为 C 株和流行毒株发生同源重组的结果。下一步需对这些毒株的遗传进化特点及其与 C 株的关系进行深入分析。如果使用弱毒活疫苗进行免疫能促进新的流行毒株的产生和流行, 这样新型亚单位疫苗的使用可能更安全。另一个重组病毒 IND/UK/LAL-290 株的主要亲本株为基因 2.2 亚型的 Bergen 株, 但次要亲本株的来源尚不清楚, Bergen 株与未知亲本株之间的重组区域位于 NS3 和 NS5A 基因之间^[39]。此外, 目前已鉴定的猪瘟疫病毒同源重组株还有 SWH 株、Heb52010 株和 ALD 株^[32]。

3.3 准种与猪瘟疫病进化

猪瘟疫病毒为单股正链 RNA 病毒, 其自身编码的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶缺乏校正修复功能, 因此, 病毒在复制时通常被认为具有较高的突变率, 这种容易发生错配的病毒复制会导致在一个病毒群体中具有较高的基因组遗传多样性。一般认为, 一个具有遗传多样性的病毒在环境适应性方面具有优势, 如免疫逃逸突变株的存在。Töpfer 等^[40]利用第二代测序技术对猪瘟疫病毒强毒 Koslov 株和 Brescia 株的 E2 和 NS5B 蛋白编码区的核苷酸序列进行了准种分析, 结果发现这两个强毒株与中等毒力毒株 (Uelzen、Paderborn 和 Hennef 株) 相比具有更高的准种多样性和核苷酸变异性, 但这两个蛋白编码区都没有碱基插入或缺失的现象发生。然而, 强毒株的高复制效率也可能导致较高的准种多样性, 但是病毒准种多样性的来源及其相应的表型尚不清楚。此外, 同一基因组 cDNA 构建的重组病毒的高毒力表明, 遗传多样性和准种不是猪瘟疫病毒的毒力因子。

综上所述, 猪瘟疫病毒在全球的流行具有明显的时空特点: 流行于欧洲的猪瘟疫病毒毒株在 20 世纪

70 年代发生了从基因 1 型向基因 2 型的转变, 目前在野猪中流行的基因 2.3 亚型猪瘟疫病毒是优势流行毒株; 美洲国家到目前为止只有基因 1 型毒株的流行, 而亚洲国家除了 1.1 亚型毒株外, 还有基因 2 型和 3 型毒株的流行, 20 世纪末流行于我国台湾地区和韩国的 3.4 亚型和 3.2 亚型毒株在本世纪初被基因 2.1 亚型毒株所替代。目前引起我国猪瘟疫流行的毒株主要是有 2.1 亚型和 1.1 亚型。鉴于基因 2.1 亚型和 1.1 亚型的遗传多样性, 下一步应研究 C 株大规模免疫与 2.1 和 1.1 亚型毒株遗传多样性和进化之间的关系, 并鉴定不同亚型代表性毒株的毒力和致病特性, 从而为制定有效的猪瘟疫防控策略提供重要的科学依据。同时, 由于我国流行的猪瘟疫病毒株与欧洲、东南亚和东亚地区的毒株亲缘关系较近, 在与这些国家进行贸易往来时应进行严格地检验检疫, 防止猪瘟疫病的跨境传播。

[参 考 文 献]

- [1] Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J*, 2003, 165: 11-20
- [2] King AM, Adams MJ, Carstens EB, et al. Family flaviviridae. [M]//Andrew MQ. *Virus taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of virus*. San Diego: Academic Press, 2011: 1010-14
- [3] Thiel H, Stark R, Weiland E, et al. Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J Virol*, 1991, 65: 4705-12
- [4] Agriculture U. UK Agriculture livestock Classical swine fever[EB/OL]. http://www.ukagriculture.com/livestock/classical_swine_fever.cfm. 2010
- [5] Cole CG. History of Hog Cholera Research in the US Department of Agriculture. Agricultural Research Service[R]. US Department of Agriculture, 1962: 1884-960
- [6] Edwards S, Fukusho A, Lefevre PC, et al. Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol*, 2000, 73: 103-19
- [7] Tu C, Lu Z, Li H, et al. Phylogenetic comparison of classical swine fever virus in China. *Virus Res*, 2001, 81: 29-37
- [8] Paton D, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, et al. Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, 2000, 73: 137-57
- [9] Chen N, Hu H, Zhang Z, et al. Genetic diversity of the envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus: recent isolates branched away from historical and vaccine strains. *Vet Microbiol*, 2008, 127: 286-99
- [10] Jiang D, Gong W, Li R, et al. Phylogenetic analysis using E2 gene of classical swine fever virus reveals a new subgenotype in China. *Infect Genet Evol*, 2013, 17: 231-8
- [11] 彭志成, 龚文杰, 吕宗吉, 等. 广东省猪瘟疫病流行毒株的遗传多样性分析. *中国兽医学报*, 2014, 34: 894-903

- [12] Lowings P, Iбата G, Needham J, et al. Classical swine fever virus diversity and evolution. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1311-21
- [13] Postel A, Schmeiser S, Bernau J, et al. Improved strategy for phylogenetic analysis of classical swine fever virus based on full-length E2 encoding sequences. *Vet Res*, 2012, 43: 50
- [14] Postel A, Schmeiser S, Perera C, et al. Classical swine fever virus isolates from Cuba form a new subgroup 1.4. *Vet Microbiol*, 2013, 161: 334-8
- [15] Deng M, Huang C, Huang T, et al. Phylogenetic analysis of classical swine fever virus isolated from Taiwan. *Vet Microbiol*, 2005, 106: 187-93
- [16] Blome S, Grotha I, Moennig V, et al. Classical swine fever virus in South-Eastern Europe: retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. *Vet Microbiol*, 2010, 146: 276-84
- [17] Bartak P, Greiser-Wilke I. Genetic typing of classical swine fever virus isolates from the territory of the Czech Republic. *Vet Microbiol*, 2000, 77: 59-70
- [18] Fritzscheier J, Teuffert J, Greiser-Wilke I, et al. Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol*, 2000, 77: 29-41
- [19] Jemeršić L, Greiser-Wilke I, Barlic-Maganja D, et al. Genetic typing of recent classical swine fever virus isolates from Croatia. *Vet Microbiol*, 2003, 96: 25-33
- [20] Greiser-Wilke I, Fritzscheier J, Koenen F, et al. Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic in the European Union in 1997-1998. *Vet Microbiol*, 2000, 77: 17-27
- [21] Vlasova A, Grebennikova T, Zaberezhny A, et al. Molecular epidemiology of classical swine fever in the Russian Federation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2003, 50: 363-7
- [22] Sabogal Z, Mogollón J, Rincón M, et al. Phylogenetic analysis of recent isolates of classical swine fever virus from Colombia. *Virus Res*, 2006, 115: 99-103
- [23] Arce H, Ganges L, Barrera M, et al. Origin and evolution of viruses causing classical swine fever in Cuba. *Virus Res*, 2005, 112: 123-31
- [24] Sakoda Y, Ozawa S, Damrongwatanapokin S, et al. Genetic heterogeneity of porcine and ruminant pestiviruses mainly isolated in Japan. *Vet Microbiol*, 1999, 65: 75-86
- [25] Cha S, Choi E, Park J, et al. Phylogenetic characterization of classical swine fever viruses isolated in Korea between 1998 and 2003. *Virus Res*, 2007, 126: 256-61
- [26] Blacksell S, Khounsy S, Boyle D, et al. Phylogenetic analysis of the E2 gene of classical swine fever viruses from Lao PDR. *Virus Res*, 2004, 104: 87-92
- [27] Sarma D, Mishra N, Vilcek S, et al. Phylogenetic analysis of recent classical swine fever virus (CSFV) isolates from Assam, India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2011, 34: 11-5
- [28] Patil SS, Hemadri D, Veeresh H, et al. Phylogenetic analysis of NS5B gene of classical swine fever virus isolates indicates plausible Chinese origin of Indian subgroup 2.2 viruses. *Virus Genes*, 2012, 44: 104-8
- [29] Patil S, Hemadri D, Shankar B, et al. Genetic typing of recent classical swine fever isolates from India. *Vet Microbiol*, 2010, 141: 367-73
- [30] Postel A, Jha V, Schmeiser S, et al. First molecular identification and characterization of classical swine fever virus isolates from Nepal. *Arch Virol*, 2013, 158: 207-10
- [31] David D, Edri N, Yakobson BA, et al. Emergence of classical swine fever virus in Israel in 2009. *Vet J*, 2011, 190: 146-9
- [32] Ji W, Niu D, Si H, et al. Vaccination influences the evolution of classical swine fever virus. *Infect Gen Evol*, 2014, 25: 69-77
- [33] Hulst MM, van Gennip HG, Moormann RJ. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E^{ms}. *J Virol*, 2000, 74: 9553-61
- [34] Pérez LJ, Díaz de Arce H, Perera CL, et al. Positive selection pressure on the B/C domains of the E2-gene of classical swine fever virus in endemic areas under C-strain vaccination. *Infect Genet Evol*, 2012, 12: 1405-12
- [35] Shen H, Pei J, Bai J, et al. Genetic diversity and positive selection analysis of classical swine fever virus isolates in south China. *Virus Genes*, 2011, 43: 234-42
- [36] Tang F, Pan Z, Zhang C. The selection pressure analysis of classical swine fever virus envelope protein genes E^{ms} and E2. *Virus Res*, 2008, 131: 132-5
- [37] Chen YH, Chen YF. Extensive homologous recombination in classical swine fever virus: A re-evaluation of homologous recombination events in the strain AF407339. *Saudi J Biol Sci*, 2014, 21: 311-6
- [38] He C, Ding N, Chen J, et al. Evidence of natural recombination in classical swine fever virus. *Virus Res*, 2007, 126: 179-85
- [39] Weber M, Streck A, Silveira S, et al. Homologous recombination in pestiviruses: Identification of three putative novel events between different subtypes/genogroups. *Infect Gen Evol*, 2015, 30: 219-24
- [40] Töpfer A, Höper D, Blome S, et al. Sequencing approach to analyze the role of quasispecies for classical swine fever. *Virology*, 2013, 438: 14-9