

李 飞,李岳洋,张路瑶,等. 我国小反刍兽疫病毒 *H* 基因序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):149–152,158.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2017.07.040

我国小反刍兽疫病毒 *H* 基因序列分析

李 飞,李岳洋,张路瑶,马海璐,张保军,蒋秀梅,马世强,赵 丽,刘永宏
(塔里木大学动物科学学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300)

摘要:为了分析我国小反刍兽疫疫情的特点,从 GenBank 下载我国和其他国家小反刍兽疫病毒(PPRV)毒株 *H* 基因全序列,应用分子生物学软件 DNASTar 进行序列分析。结果显示,始于 2007 年的我国首次 PPR 疫情中,我国西藏地区 PPRV 各毒株间 *H* 基因核苷酸同源性介于 99.6%~100.0% 之间,我国西藏与其他国家 PPRV 毒株核苷酸同源性介于 86.7%~98.3% 之间;我国西藏地区 PPRV 毒株间氨基酸序列同源性介于 99.7%~100.0% 之间,我国西藏与其他国家 PPRV 毒株氨基酸序列同源性介于 89.3%~98.4% 之间。始于 2013 年年底的我国又一次 PPR 疫情中,我国 PPRV 毒株间核苷酸同源性介于 99.7%~99.8% 之间,我国与其他国家 PPRV 毒株核苷酸同源性介于 87.2%~97.5% 之间;我国 PPRV 毒株间氨基酸序列同源性介于 99.2%~99.8% 之间,我国与其他国家 PPRV 毒株氨基酸序列同源性介于 89.0%~98.4% 之间。*H* 基因进化树分析结果显示,我国的 9 株 PPRV 划分为基因 IV 系。我国 PPRV 毒株与印度毒株及土耳其毒株同源性最高,可能由这 2 个国家传入我国。

关键词:小反刍兽疫;*H* 基因;序列分析;核苷酸同源性;氨基酸同源性

中图分类号:S855.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2017)07–0149–04

小反刍兽疫(peste des petits ruminants,简称 PPR)是由小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus,简称 PPRV)感染小反刍动物(绵羊、山羊、鹿、长角大羚羊和骆驼等)引起的一种急性、高度接触性传染病,临床以高热、口炎、肠炎和肺炎为特征。

PPR 最初报道于非洲西部象牙海岸的科特迪瓦^[1],随后传播到西非国家。1987 年出现了跨洲传播,由非洲传入亚洲国家。1993—1995 年间在阿拉伯半岛、中东地区及南亚次大陆地区逐渐流行^[2–5]。2006 年初,我国周边国家暴发了大规模 PPR 疫情^[6];2007 年 7 月,我国西藏阿里地区首次暴发 PPR 疫情;2010 年赞比亚、不丹相继暴发 PPR 疫情;2015 年 7 月摩洛哥、赞比亚暴发 PPR 疫情;2016 年 2 月格鲁吉亚暴发 PPR 疫情。

依据我国农业部消息,2003 年我国周边国家频频发生 PPR 疫情^[7]。2007 年 7 月 9 日西藏自治区阿里地区日土县龙门卡村首次发现 PPR 疫情^[8]。2007 年 11 月 15 日,先后在西藏自治区阿里地区改则、札达、日土、革吉等 4 个县发现疫情。2010 年 5 月 14 日,西藏自治区阿里地区日土县乌江村

发生 1 起 PPR 疫情。2013 年,我国农业部报道新疆多地区发生疫情,并呈现由边境逐渐向内传播的趋势^[9]。2013 年 11 月 30 日,新疆伊犁霍城县发生 PPR 疫情^[10]。2013 年 12 月份,新疆哈密、轮台、库车、柯坪等县发生了 PPR 疫情。2014 年 1 月份在我国新疆、西藏等地发生 5 起疫情,甘肃省武威市古浪县于 1 月 22 日发生 PPR 疫情^[11]。2014 年 2 月宁夏、内蒙古等地区发生 PPR 疫情;2 月 10 日,内蒙古自治区巴彦淖尔市杭锦后旗团结镇建设村、乌拉特后旗乌盖苏木和丰村发生 PPR 疫情^[12];3 月初,修水县发生 PPR 疫情^[13]。2014 年 3 月 17 日,辽宁省锦州市发生 PPR 疫情^[14]。2014 年 3 月 18 日,黑山县白厂门镇闫屯村发生 PPR 疫情^[15]。2014 年 5 月 2 日南宁市某养殖场羊群经确诊为 PPRV 感染,出现 PPR 疫情^[16]。

PPRV 分子属副黏病毒科麻疹病毒属,基因组为单股负链 RNA,病毒大小为 15 948 nt,基因组包括 6 个基因,分别编码 8 种蛋白,即 N 蛋白、P 蛋白、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素蛋白(H)、大蛋白(L)和 C、V 非结构蛋白^[17]。H 蛋白是副黏病毒表面的一种糖蛋白,基因全长 1 852 bp,该蛋白由 609 个氨基酸构成,分子量为 70 ku。H 蛋白是 PPRV 编码的 8 种蛋白中最不保守的蛋白,是一种跨膜蛋白。H 糖蛋白具有血凝素和神经氨酸酶活性,能引起细胞病变(CPE),但是对山羊、绵羊、猴、猪、牛、马、犬等大多数哺乳动物和禽类的红细胞不具有凝集性^[18]。研究发现,H 蛋白存在多个翻译后的修饰位点,包括 6 个糖基化位点 G1~G6(G5 和 G6 未被糖基化),不同麻疹病毒及同一病毒的不同菌株之间糖基化位点的数目有所不同,糖基化对血凝素神经氨酸酶(HN)的翻译后加工、神经氨酸酶活性以及稳定性等起着重要的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从 GenBank 下载我国和世界各 PPR 发病国家已登录的

收稿日期:2016–03–12

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划(编号:201510757011);塔里木大学动物科学学院大学生创新项目(编号:DKY2014004;DKY2014009);华中农业大学塔里木大学科研联合基金(编号:HNTDLH1404)。

作者简介:李 飞(1992—),男,甘肃天水人,硕士,主要从事动物群发疾病的防控与检测;E-mail:1072679913@qq.com;李岳洋(1994—),男,陕西榆林人,主要从事动物群发疾病的诊断与防控,E-mail:875793428@qq.com。

通信作者:赵 丽,博士,副教授,研究方向为寄生虫病与免疫病理学,E-mail:zhaolidy@126.com;刘永宏,博士,副教授,研究方向为传染病与免疫病理学,E-mail:lyhdky@126.com。

PPRV *H* 基因全序列,GenBank 登录号和毒株名称等信息(表 1)。

1.2 试验方法

下载的氨基酸和核苷酸序列用 DNASTar 分子生物学软件包 EditSeq 程序分别生成“*.Pro”和“*.Seq”格式文件,首先利用 DNASTar 软件包 MegAlign 程序中 File 菜单下的 Enter

sequences 将需要比对的基因序列添加进来,然后利用 Align 菜单下的 Clustal W Method 进行多重比对,最后用 Veiw 菜单下的 Sequence Distance 程序和 Phylogenetic Tree 程序进行序列比对和进化树构建。结合毒株年代和地域分布特点,分析我国 PPRV 毒株的进化规律。

表 1 *H* 基因参考毒株信息

| 序号 | 序列名 | GenBank 登录号 | 毒株名 | 备注(菌株来源) |
|----|--------------------------|-------------|--------------------|-----------------|
| 1 | Turkey2000 | NC006383 | Turkey 2000 | 土耳其,2000 年 |
| 2 | Tibet200730 | FJ905304 | China/Tibet/Geg/07 | 我国西藏,2007 年 |
| 3 | Kenya2011 | KM463083 | KN5/2011 | 肯尼亚,2011 年 |
| 4 | ChinaXJYL2013 | KM091959 | China/XJYL/2013 | 我国新疆伊犁,2013 年 |
| 5 | Nigeria2005 | X74443 | Nigeria/75/1 | 尼日利亚,2005 年 |
| 6 | Senegal1969 | KP789375 | E32/1969 | 塞内加尔,1969 年 |
| 7 | India1994 | KR140086 | Izatnagar/94 | 印度,1994 年 |
| 8 | ChinaHNZM2014 | KM089832 | China/HNZM/2014 | 我国河南,2014 年 |
| 9 | ChinaHNZK2014 | KM089831 | China/HNZK/2014 | 我国河南,2014 年 |
| 10 | ChinaHNZY2014 | KM089830 | China/ HNZY/2014 | 我国河南,2014 年 |
| 11 | United Arab Emirates1986 | KJ867545 | UAE/1986 | 阿拉伯联合酋长国,1986 年 |
| 12 | Oman1983 | KJ867544 | Oman1983 | 阿曼,1983 年 |
| 13 | Uganda2012 | KJ867543 | Uganda2012 | 乌干达,2012 年 |
| 14 | Ethiopia1994 | KJ867540 | Ethiopia1994 | 埃塞俄比亚,1994 年 |
| 15 | Morocco2008 | KC594074 | Morocco2008 | 摩洛哥,2008 年 |
| 16 | Tibet2008 | JX217850 | Tibet/Bharal/2008 | 我国西藏,2008 年 |
| 17 | Ghana2010 | KJ466104 | Ghana/NK1/2010 | 加纳,2010 年 |
| 18 | Nigeria1975 | HQ197753 | Nigeria/75/1 | 尼日利亚,1975 年 |
| 19 | ChinaGZL2014 | KM816619 | GZL - 14 | 我国吉林,2014 年 |
| 20 | Cotod Ivoire2009 | KR781451 | CIV/01P/2009 | 科特迪瓦,2009 年 |
| 21 | Tibet0701 | EU364809 | China/Tibet/0701 | 我国西藏,2007 年 |
| 22 | ChinaTibet2007 | JF939201 | China/Tib/07 | 我国西藏,2007 年 |

2 结果与分析

2.1 PPRV *H* 基因核苷酸同源性

将 22 个来源不同的 PPRV 毒株 *H* 基因全序列进行核苷酸同源性比较,由表 2 可知,2007 年 PPR 疫情初次传入我国时,我国西藏地区各毒株间 *H* 基因核苷酸同源性介于 99.6%~100.0%之间;我国西藏 China/Tibet/Geg/07 与 China/Tib/07 毒株的核苷酸同源性为 100.0%,China/Tibet/0701 与 China/Tib/07 毒株的核苷酸同源性为 99.9%,那曲地区 Tibet/Bharal/2008 与阿里地区 China/Tib/07 毒株的核苷酸同源性为 99.7%。我国西藏毒株与其他国家毒株核苷酸同源性介于 86.7%~98.3%之间,同源性最高的为印度 1994 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株。2013 年当 PPR 疫情再次传入我国时,我国各毒株间核苷酸的同源性介于 99.7%~99.8%之间;我国新疆伊犁 China/XJYL/2013 毒株与吉林省 GZL-14 毒株、河南省 China/HNZM/2014 毒株的同源性最高,为 99.8%。我国毒株与其他国家毒株核苷酸同源性介于 87.2%~97.5%之间,同源性最高的为印度 1994 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株。

2.2 PPRV *H* 蛋白氨基酸序列同源性

将 22 个来源不同的 PPRV 毒株 *H* 蛋白全序列进行氨基酸序列同源性比较,由表 2 可知,2007 年我国 PPR 疫情暴发初期,我国西藏地区各毒株间的氨基酸序列同源性介于 99.7%~100.0%之间;我国西藏阿里地区的 3 株毒株氨基酸序列同源性为 100.0%,那曲地区 Tibet/Bharal/2008 和阿里地区 China/Tib/07 毒株的氨基酸序列同源性为 99.7%。我

国西藏毒株与其他国家毒株氨基酸序列同源性介于 89.3%~98.4%之间,同源性最高的为土耳其 2000 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株。2013 年当 PPR 再次传入我国时,我国各毒株的氨基酸序列同源性介于 99.2%~99.8%之间,河南省 China/HNZM/2014 毒株、新疆伊犁 China/XJYL/2013 毒株和吉林省 GZL-14 毒株的同源性最高,为 99.8%。我国毒株与其他国家毒株氨基酸序列同源性介于 89.0%~98.4%之间,同源性最高的为土耳其 2000 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株。

2.3 PPRV *H* 基因核苷酸进化树

有文献报道,根据 *F* 基因或 *N* 基因进行遗传变异分析和分子流行病学研究可将全球 PPRV 的流行株分成 I~IV 4 个谱系。将 22 个来源不同的 PPRV 毒株 *H* 基因核苷酸全序列进行进化树分析,结果显示,来自塞内加尔的 1 个毒株单独构成 1 个分支(I 系);分离自西非科特迪瓦的 1 个毒株及尼日利亚的 2 个毒株和非洲西部加纳的 1 个毒株共同构成了 1 个分支(II 系);来自亚洲阿曼、阿拉伯联合酋长国和非洲东北部埃塞俄比亚、非洲东部肯尼亚及非洲中部乌干达的毒株构成了 1 个分支(III 系);11 个亚洲毒株(包含 9 个我国毒株)和 1 个非洲西北部摩洛哥的毒株构成了 1 个分支(IV 系)。我国分离的 9 株毒株与印度 1994 年的毒株进化关系最近,与阿曼、阿拉伯联合酋长国、埃塞俄比亚、肯尼亚和乌干达的毒株进化关系最远。而我国新疆伊犁地区 China/XJYL/2013 毒株和河南省 China/HNZY/2014 毒株进化关系最近,我国吉林省 GZL-14 毒株与河南省 China/HNZK/2014 毒株进化关系最近(图 1)。

表 2 PPRV H 基因核苷酸和氨基酸同源性比较

| 序号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 序列 |
|----|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|------|------|------|------|--------------------------|
| 1 | | 99.5 | 99.3 | 98.2 | 99.7 | 99.8 | 92.1 | 90.8 | 92.6 | 97.9 | 89.5 | 97.2 | 92.8 | 92.6 | 90.3 | 91.6 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 89.3 | 90.3 | ChinaGZL2014 |
| 2 | 99.7 | | 99.2 | 98.0 | 99.5 | 99.7 | 92.0 | 90.6 | 92.4 | 97.7 | 89.3 | 97.0 | 92.6 | 92.4 | 90.1 | 91.5 | 98.0 | 98.0 | 98.0 | 98.0 | 89.2 | 90.1 | ChinaHNZK2014 |
| 3 | 99.7 | 99.6 | | 97.9 | 99.3 | 99.5 | 91.8 | 90.5 | 92.3 | 97.5 | 89.2 | 96.9 | 92.4 | 92.3 | 90.0 | 91.3 | 97.9 | 97.9 | 97.9 | 97.9 | 89.0 | 90.0 | ChinaHNZY2014 |
| 4 | 97.8 | 97.8 | 97.8 | | 98.2 | 98.4 | 92.3 | 90.8 | 92.8 | 98.0 | 89.5 | 97.4 | 92.9 | 92.8 | 90.3 | 91.5 | 100.0 | 100.0 | 99.7 | 98.4 | 89.3 | 90.3 | ChinaTibet2007 |
| 5 | 99.8 | 99.7 | 99.8 | 97.9 | | 99.8 | 92.1 | 90.8 | 92.6 | 97.9 | 89.5 | 97.2 | 92.8 | 92.6 | 90.3 | 91.6 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 98.2 | 89.3 | 90.3 | ChinaXJYL2013 |
| 6 | 99.7 | 99.6 | 99.7 | 97.8 | 99.8 | | 92.3 | 91.0 | 92.8 | 98.0 | 89.7 | 97.4 | 92.9 | 92.8 | 90.5 | 91.8 | 98.4 | 98.4 | 98.4 | 98.4 | 89.5 | 90.5 | ChinaHNZM2014 |
| 7 | 90.2 | 90.0 | 90.1 | 90.6 | 90.2 | 90.3 | | 90.0 | 99.0 | 92.6 | 88.8 | 92.0 | 95.9 | 95.7 | 90.1 | 92.1 | 92.3 | 92.3 | 92.4 | 92.9 | 88.7 | 90.1 | Cotod Ivoire2009 |
| 8 | 88.6 | 88.6 | 88.6 | 88.1 | 88.7 | 88.7 | 88.2 | | 90.5 | 91.5 | 96.9 | 90.6 | 91.1 | 91.0 | 96.4 | 91.6 | 90.8 | 90.8 | 90.8 | 91.3 | 96.7 | 96.4 | Ethiopia1994 |
| 9 | 90.8 | 90.7 | 90.7 | 91.0 | 90.8 | 90.9 | 98.8 | 88.9 | | 93.1 | 89.3 | 92.4 | 96.6 | 96.4 | 90.6 | 92.8 | 92.8 | 92.8 | 92.9 | 93.4 | 89.2 | 90.6 | Ghana2010 |
| 10 | 97.4 | 97.3 | 97.4 | 98.3 | 97.5 | 97.4 | 91.1 | 88.9 | 91.6 | | 90.0 | 97.7 | 93.6 | 93.4 | 90.8 | 92.0 | 98.0 | 98.0 | 98.0 | 99.0 | 89.8 | 90.8 | India1994 |
| 11 | 87.6 | 87.7 | 87.5 | 87.5 | 87.6 | 87.6 | 86.6 | 96.5 | 87.4 | 88.4 | | 89.3 | 89.7 | 89.5 | 95.1 | 90.5 | 89.5 | 89.5 | 89.8 | 90.0 | 99.8 | 95.1 | Kenya2011 |
| 12 | 96.2 | 96.2 | 96.2 | 96.8 | 96.3 | 96.2 | 90.2 | 87.6 | 90.5 | 97.4 | 87.3 | | 92.6 | 92.4 | 90.1 | 91.0 | 97.4 | 97.4 | 97.4 | 98.0 | 89.2 | 90.1 | Morocco2008 |
| 13 | 91.4 | 91.3 | 91.4 | 91.5 | 91.5 | 91.5 | 95.3 | 89.7 | 95.7 | 92.2 | 88.7 | 91.2 | | 99.8 | 91.1 | 93.4 | 92.9 | 92.9 | 93.1 | 93.6 | 89.5 | 91.1 | Nigeria1975 |
| 14 | 91.3 | 91.3 | 91.3 | 91.4 | 91.4 | 91.4 | 95.1 | 89.6 | 95.5 | 92.1 | 88.7 | 91.2 | 99.8 | | 91.0 | 93.3 | 92.8 | 92.8 | 92.9 | 93.4 | 89.3 | 91.0 | Nigeria2005 |
| 15 | 87.7 | 87.7 | 87.7 | 87.2 | 87.8 | 87.8 | 87.7 | 97.3 | 88.3 | 87.9 | 94.9 | 86.7 | 89.1 | 89.1 | | 91.5 | 90.3 | 90.3 | 90.5 | 90.8 | 94.9 | 99.7 | Oman1983 |
| 16 | 89.9 | 89.8 | 89.8 | 90.1 | 89.9 | 89.8 | 90.2 | 90.5 | 90.8 | 90.9 | 89.2 | 90.1 | 92.4 | 92.3 | 90.1 | | 91.5 | 91.5 | 91.8 | 92.0 | 90.3 | 91.5 | Senegal1969 |
| 17 | 97.7 | 97.7 | 97.7 | 99.9 | 97.8 | 97.7 | 90.4 | 88.7 | 90.9 | 98.3 | 87.4 | 96.9 | 91.8 | 91.7 | 87.8 | 90.0 | | 100.0 | 99.7 | 98.4 | 89.3 | 90.3 | Tibet0701 |
| 18 | 97.8 | 97.8 | 97.8 | 100.0 | 97.9 | 97.8 | 90.6 | 88.1 | 91.0 | 98.3 | 87.5 | 96.8 | 91.5 | 91.4 | 87.2 | 90.1 | 99.9 | | 99.7 | 98.4 | 89.3 | 90.3 | Tibet200730 |
| 19 | 97.7 | 97.6 | 97.7 | 99.7 | 97.8 | 97.7 | 90.5 | 88.1 | 91.0 | 98.1 | 87.7 | 96.7 | 91.3 | 91.3 | 87.2 | 90.2 | 99.6 | 99.7 | | 98.4 | 89.6 | 90.5 | Tibet2008 |
| 20 | 96.3 | 96.3 | 96.3 | 97.2 | 96.4 | 96.3 | 90.4 | 88.6 | 90.8 | 98.0 | 87.4 | 96.6 | 91.7 | 91.7 | 87.8 | 90.1 | 97.2 | 97.2 | 97.0 | | 89.8 | 90.8 | Turkey2000 |
| 21 | 87.3 | 87.4 | 87.2 | 86.7 | 87.3 | 87.3 | 86.5 | 96.4 | 87.3 | 87.4 | 99.7 | 86.4 | 88.2 | 88.1 | 94.7 | 88.9 | 87.2 | 86.7 | 86.8 | 87.2 | | 94.9 | Uganda2012 |
| 22 | 87.3 | 87.8 | 87.8 | 87.3 | 87.9 | 87.9 | 87.8 | 97.3 | 88.4 | 88.0 | 94.9 | 86.8 | 89.2 | 89.2 | 99.7 | 90.2 | 87.9 | 87.3 | 87.3 | 88.0 | 94.7 | | United Arab Emirates1986 |

注:右上为氨基酸序列同源性(%),左下为核苷酸序列同源性(%).

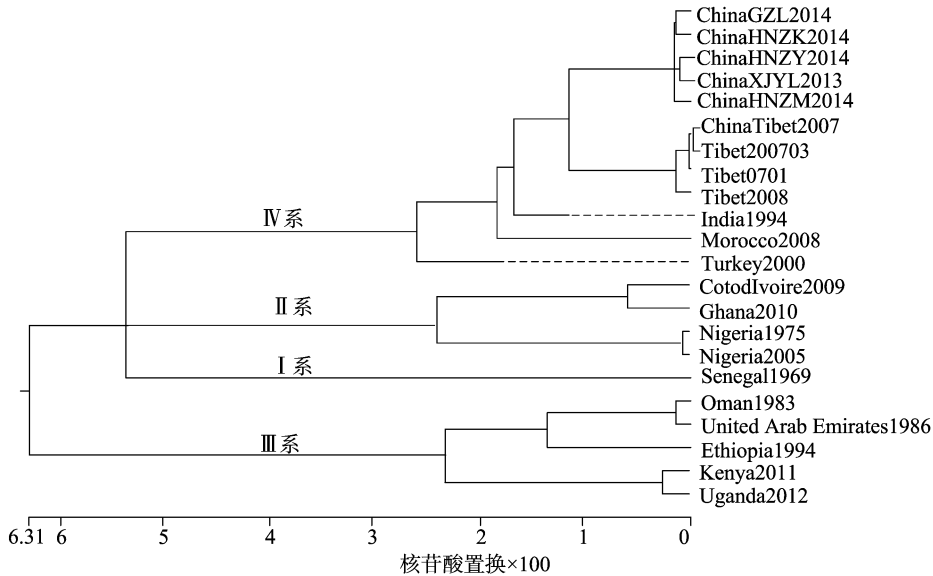


图1 来自不同地区和不同年代的小反刍兽疫病毒毒株H基因系统进化树

3 讨论

2007 年 PPR 疫情初次传入我国时,将我国西藏毒株与世界其他国家毒株的 PPRV H 基因核苷酸进行同源性比较发现,我国西藏毒株与其他国家毒株核苷酸同源性最高的为印度 1994 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株,推测造成该现象的原因有以下几点:首先从地理位置来看,我国西藏东南部与印度接壤,疫情最有可能从印度传入西藏地区;其次我国周边国家中印度的 PPR 疫情最为严重,有研究表明我国西藏的毒株与印度等国流行毒株遗传进化关系最近^[19],所以说同源性最高很有说服力。2013 年 PPR 疫情再次传入我国新疆伊犁,根据 GenBank 数据库中已登录的我国吉林省、河

南省的毒株进行核苷酸同源性比对,结果显示我国新疆伊犁 China/XJYL/2013 毒株和吉林省 GZL-14 毒株的同源性最高,推测造成这一现象的原因可能是利益驱动下的羊群交易,导致疫病从新疆通过病羊、隐性感染羊、交通运输车辆等传到吉林省。我国毒株与其他国家毒株核苷酸同源性最高的为印度 1994 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株。由于疫病的流行遵循“三间”分布的原则(即时间、地区间、畜禽群间),从时间分布来看我国西藏阿里地区最早暴发 PPR 疫情,从地区分布来看印度与我国西藏周邻,PPR 很有可能跨越喜马拉雅山传入我国西藏地区,畜禽间主要感染绵羊、山羊和羚羊等小反刍动物,而我国和印度边境地区野生小反刍动物的频繁接触也可以导致疫病的传播,同样可以说明我国与印度

1994 年毒株关系最近。

通过氨基酸序同源性比较发现,2007 年我国 PPR 疫情暴发初期,通过我国西藏毒株与其他国家毒株的 PPRV H 蛋白氨基酸序列同源性比较发现,我国西藏地区各毒株间氨基酸序列的同源性介于 99.7% ~ 100.0% 之间,我国西藏毒株与其他国家毒株氨基酸序列同源性最高的为土耳其 2000 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株。1993—1995 年,PPR 在阿拉伯半岛、中东地区及印度次大陆及南亚次大陆部分地区逐渐流行,包括阿联酋、伊朗、伊拉克、叙利亚和土耳其均发现 PPR 疫情的存在。由于土耳其周边国家都有 PPR 疫情的发生,推测 PPR 可能是从土耳其传播到伊朗、巴基斯坦和印度然后传入我国。因此,氨基酸序列同源性最高也很有可能。2013 年 PPR 疫情再次传入我国新疆伊犁,通过新疆伊犁毒株与我国吉林省、河南省的毒株氨基酸同源性比对发现,我国新疆伊犁 China/XJYL/2013 毒株与河南省 China/HNZM/2014 毒株的氨基酸同源性最高。我国毒株与其他国家毒株氨基酸同源性最高的为土耳其 2000 年毒株,同源性最低的为乌干达 2012 年毒株,与 2007 年我国西藏第 1 次疫情氨基酸的比对结果一致。

有文献报道,根据 *F* 基因或 *N* 基因进行遗传变异分析和分子流行病学研究,可将全球的流行株分为 I ~ IV 谱系,Kwiatek 等利用 PPRV *N* 基因 1 253 ~ 1 507 位核苷酸序列进行系统进化分析,将来源不同的 PPRV 毒株划分为 4 个系,其中基因 I 系由分离自西非的病毒组成,基因 II 系由来源于尼日利亚、加纳、马里的病毒构成,基因 III 系病毒来自阿拉伯半岛南部和东非,基因 IV 系的病毒全部来源于亚洲^[20]。本研究利用 PPRV *H* 基因全序列进行系统进化树分析,将 22 个来源不同的 PPRV 毒株划分基因系,结果显示我国西藏 2007 年和 2008 年、新疆伊犁 2013 年、河南省 2014 年、吉林省 2014 年、印度 1994 年、土耳其 2000 年以及摩洛哥 2008 年的流行毒株均可划分到第 IV 谱系,与 Kwiatek 等利用 PPRV *N* 基因的核苷酸系统进化分析所划分的谱系^[20]一致。我国的 9 个毒株均被划分到第 IV 谱系,与 Kwiatek 等的研究相符合。由于摩洛哥是非洲西北部的一个国家,按照 Kwiatek 等的划分依据应将其划分到第 I 谱系,本研究将其划分到第 IV 谱系,所以与 Kwiatek 等的研究结果^[20]产生了矛盾,而之前刘永宏等通过 PPRV *F* 和 *N* 基因同源性比较也证明了摩洛哥 2008 年毒株被划分到了第 IV 谱系^[21]。阿曼、阿拉伯联合酋长国和非洲东北部埃塞俄比亚、肯尼亚和乌干达的毒株构成了 1 个分支(III 系)与 Kwiatek 等的结果^[20]一致,尼日利亚、科特迪瓦和加纳的毒株被划分到了第 II 谱系,与 Kwiatek 等的结果^[20]相符,来自塞内加尔的 1 个毒株被划分到第 I 谱系,这与 Kwiatek 等的结论^[20]相符。

PPRV 在动物体内繁殖期间是否会传播病毒还不确定,存在散毒和毒力返强风险;血清学检测也不能区分自然感染(感染抗体)和疫苗免疫(免疫抗体)的动物。目前世界动物卫生组织(OIE)规定的 PPR 抗原检测方法为 PCR 和酶联免疫吸附测定(ELISA)。建议我国与 PPR 发生国相邻的省份加强活羊调运和进出口疫病检测工作,尤其是新疆、西藏 2 个地区是我国疫病最难以控制的地区。2013 年新疆伊犁再次暴发 PPR 疫情,我国农业部将新疆和西藏定为强制免疫的地

区。新疆历史上从来没有 PPR 疫情报道,2013 年新疆伊犁 PPR 疫情的发生存在 2 种可能:(1)当 PPR 可以跨越喜马拉雅山传入我国西藏地区时,可以推测存在新疆伊犁暴发的 PPR 是由西藏通过昆仑山脉传入的可能性;(2)我国新疆伊犁地区的 PPR 也可能由于活羊调运时病羊、隐性感染羊、交通运输车辆等携带的病原传播导致的。自从 2013 年我国新疆伊犁暴发 PPR 以来疫情由北疆迅速传播至南疆多地,此后疫情迅速播至全国 20 多个省(区),而造成 PPR 的传播这一现象的原因大多数也是由于活羊调运机制的不完善。2014 年 10 月,我国农业部研究起草了《全国小反刍兽疫消灭计划(征求意见稿)》,提出到 2020 年全国消灭 PPR 的目标^[22]。2015 年欧洲食品安全局(EFSA)发布了 PPR 传入欧盟和邻近国家的风险评估报告^[23],可见 PPR 对我国及世界各地养殖业所造成的危害程度之大。建议各地加强 PPR 疫病防控的宣传力度,加强动物疫病预防控制机构、实验室建设,且实验室工作人员具备疫病病原学检测能力;强化边境地区防控,重点要做好公路、铁路口岸和港口进口易感动物及其动物性产品的监督检查工作,严防疫情传播。

参考文献:

- [1] Banyard A C. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control [J]. Journal of General Virology, 2010, 91 (12): 2885 - 2897.
- [2] Nanda Y P, Chatterjee A, Purohit A K, et al. The isolation of peste des petits ruminants virus from northern India [J]. Veterinary Microbiology, 1996, 51 (3/4): 207 - 216.
- [3] Shaila M S, Peter A B, Varalakshmi P, et al. Peste des petits ruminants in Tamilnadu goats [J]. Indian Veterinary Journal, 1996, 73 (5): 587 - 588.
- [4] Shaila M S, Shamaki D, Forsyth M A, et al. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus [J]. Virus Research, 1996, 43 (2): 149 - 153.
- [5] Singh V P, Chum V K, Mondhe K S. Peste des petits ruminants: an outbreak in sheep in Rajasthan [J]. Indian Veterinary Journal, 1996, 73 (4): 466 - 467.
- [6] Hopewell - Smith A. Peste des petits ruminants in goats in Pakistan [J]. Veterinary Record, 1996, 139 (5): 118 - 119.
- [7] 农业部关于做好小反刍兽疫防范工作的紧急通知 [J]. 饲料广角, 2003 (19): 18.
- [8] 陆则基, 王志亮, 刘雨田, 等. 西藏阿里地区小反刍兽疫流行病学调查研究 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25 (12): 44 - 47.
- [9] Wang Z, Bao J, Wu X, et al. Peste des petits ruminants virus in Tibet, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2009, 15 (2): 299 - 301.
- [10] 中华人民共和国农业部. 新疆伊犁州霍城县发生一起小反刍兽疫疫情 [EB/OL]. (2013 - 12 - 05) [2016 - 03 - 10]. http://www.moa.gov.cn/zwllm/yjgl/yqfb/201312/t20131205_3699251.htm.
- [11] 中华人民共和国农业部. 小反刍兽疫 [EB/OL]. (2014 - 02 - 17) [2016 - 03 - 10]. <http://www.moa.gov.cn/zwllm/pjgl/pqfb/201402/t20140217-3764785.htm>.
- [12] 中华人民共和国农业部. 内蒙古巴彦卓尔发生小反刍兽疫疫情 [EB/OL]. (2014 - 02 - 17) [2016 - 03 - 10]. http://www.gov.cn/jrzq/2014-02/17/content_2609621.htm

区临床采集的 120 份肺组织和鼻拭子进行检测,结果检出率达 51.67%^[7];李娟等、徐慧等和李雪霞等分别证实了该病原在江苏、新疆和云南地区的流行^[5,9-10]。

本研究从发病羊肺脏中分离并纯化细菌,经菌落形态、生化特征和 PCR 鉴定,最终确定其为溶血性曼氏杆菌。综合临床症状、染色镜检可以有效缩小病原菌范围,结合 PCR 和测序鉴定,能够更加准确地确定该病原。致病性结果表明,10⁸、10⁷ CFU/mL 剂量组感染小白鼠后,6 h 出现不同程度发病症状,表现为精神沉郁、食欲废绝等,12 h 相继出现死亡,而对照组未见异常。死亡小鼠的剖检病变为肺脏充血,肝脏和脾脏肿大等,从死亡小鼠脏器中分离出与感染菌株形态特征一致的菌株。

抗生素的使用是养殖户预防和治疗疾病的重要手段,细菌的耐药性是困扰养殖户的一大难题。本研究的试验结果表明,溶血性曼氏杆菌对庆大霉素和头孢噻肟高度敏感;对青霉素、四环素、红霉素、利福平、卡那霉素、恩诺沙星和大观霉素等药物产生了耐药性,与冯旭飞等^[6]、Katsuda 等^[11]和 Lubbers 等^[12]报道不尽相同,说明不同地域分离株耐药性存在一定差异。该试验结果也为发病羊群正确合理用药提供参考。

目前,疫苗免疫是控制溶血性曼氏杆菌病的重要措施之一,由于各血清型之间交叉免疫保护性较低,疫苗的免疫谱窄,以至于本病未能得到有效的控制。因此,有待于研发预防溶血性曼氏杆菌病更佳的疫苗^[13-14]。

参考文献:

- [1] Rice J A, Carrasco - Medina L C, Hodgins D C, et al. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2008, 8(2): 117 - 128.
- [2] 陈艳红, 颜 忠, 查振林, 等. 溶血性曼氏杆菌致病机制的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(12): 153 - 155.
- [3] 韩猛立, 康立超, 钟发刚, 等. 细菌性牛呼吸道疾病的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(5): 165 - 172.
- [4] Alexander T W, Cook S R, Yanke L J, et al. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosidal* and *Mannheimia ruminalis* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1/2): 165 - 175.
- [5] 李 娟, 刘 阳, 彭欠欠, 等. 羊溶血性曼氏杆菌的分离与鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013(20): 96 - 97.
- [6] Shanthalingam S, Goldy A, Bavananthasivam J, et al. PCR assay detects *Mannheimia haemolytica* in culture - negative pneumonic lung tissues of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) from outbreaks in the western USA, 2009 - 2010 [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2014, 50(1): 1 - 10.
- [7] 冯旭飞, 刀筱芳, 王志敏, 等. 绵羊肺脏中溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及其药物敏感性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(8): 224 - 228.
- [8] 冯旭飞, 刀筱芳, 李定菲, 等. 溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国兽医科学*, 2014, 44(6): 624 - 629.
- [9] 徐 慧, 贺霞霞, 龚玉梅, 等. 溶血性曼氏杆菌的分离鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医(科技版)*, 2009(12): 97 - 98.
- [10] 李雪霞, 李富祥, 赵文华, 等. 云南羊溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2014(1): 36 - 38.
- [11] Katsuda K, Kohmoto M, Mikami O. Relationship between serotype and the antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates collected between 1991 and 2010 [J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 94(2): 205 - 208.
- [12] Lubbers B, Hanzlicek G. Antimicrobial multidrug resistance and coresistance patterns of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine respiratory disease cases—a three - year (2009—2011) retrospective analysis [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(3): 413 - 417.
- [13] Ayalew S, Confer A, Hartson S, et al. Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of *Mannheimia haemolytica* and identification of potential vaccine candidates[J]. *Proteomics*, 2010, 10(11): 2151 - 2164.
- [14] Confer A, Ayalew S, Panciera R, et al. Recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE enhances commercial *M. haemolytica* vaccine - induced resistance against serotype 6 challenge[J]. *Vaccine*, 2006, 24(13): 2248 - 2255.
- [15] 史学波, 苏成石. 黑山县小反刍兽疫科学防控体会[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2014(10): 63 - 64.
- [16] 张 兵. 依法处置一起输入性小反刍兽疫疫情[J]. *广西畜牧兽医*, 2014, 30(5): 276 - 277.
- [17] 刘玉洪, 徐自忠, 花群义, 等. 小反刍兽疫病毒分子生物学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(12): 1 - 6.
- [18] 南文金, 王清华, 赵永刚, 等. 携带小反刍兽疫病毒 *H* 基因的重组山羊痘病毒构建和鉴定[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28(7): 33 - 35.
- [19] Mcginnes L W, Morrison T G. Disulfide bond formation is a determinant of glycosylation site usage in the hemagglutinin - neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus [J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(4): 3083 - 3089.
- [20] Kwiatek O, Minet C, Grillet C, et al. Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2007, 136(2/3): 111 - 119.
- [21] 刘永宏, 曹胜波, 赵 丽, 等. 中国小反刍兽疫疫情分析[J]. *西北农业学报*, 2014, 23(9): 19 - 26.
- [22] 中华人民共和国农业部. 农业部办公厅关于推进做好小反刍兽疫防控工作的通知[EB/OL]. (2014 - 04 - 10) [2016 - 03 - 10]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201404/t20140411_3847701.htm.
- [23] EFSA Panel on Animal Health and Welfare. Scientific opinion on peste des petits ruminants [J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(1): 3985.

(上接第 152 页)