

## 研究报告

## 猪流行性腹泻病毒在规模化抗体阳性猪场的动态传播

亢麒翔, 胡广利, 耿瑞, 王暄慈, 邝展鹏, 黄逸晖, 曾思莹, 彭欧阳, 张灏, 曹永长\*

中山大学 生命科学学院, 广东 广州 519000

亢麒翔, 胡广利, 耿瑞, 王暄慈, 邝展鹏, 黄逸晖, 曾思莹, 彭欧阳, 张灏, 曹永长. 猪流行性腹泻病毒在规模化抗体阳性猪场的动态传播[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3572-3580.

KANG Qixiang, HU Guangli, GENG Rui, WANG Xuanci, KUANG Zhanpeng, HUANG Yihui, ZENG Siying, PENG Ouyang, ZHANG Hao, CAO Yongchang. Dynamic transmission of PEDV in a large antibody-positive swine farm[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3572-3580.

**摘要:**【背景】猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)是导致仔猪腹泻的最主要病原之一。因其发病迅速难以记录, 目前尚无关于 PEDV 感染仔猪后病原在猪场内分布的动态研究报道。【目的】探索 PEDV 在规模化猪场内的动态传播过程, 改进防控猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)的策略。【方法】模拟 PEDV 在封闭的规模化养殖场中感染仔猪后的传播过程, 检测猪群及场内不同区域的病毒丰度。【结果】仔猪肛拭子和空气样品病毒丰度在仔猪感染 PEDV 初期具有明显的一致性变化, PEDV 在场内的传播与员工移动密切相关, 并且洗澡间可能是 PEDV 的重要藏匿点。【结论】猪舍空气的病毒丰度有可能作为 PED 早期的监测指标, 并且员工相关的介质和场地是 PEDV 生物安全防护的重要对象。本研究为改进猪场针对 PED 的生物安全防护提供了一定参考, 并且为类似病毒在规模化猪场传播的研究工作奠定了基础。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; 外环境; 生物安全防护

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1801101)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1801101).

\*Corresponding author. E-mail: caoych@mail.sysu.edu.cn

Received: 2024-01-02; Accepted: 2024-03-14; Published online: 2024-04-22

# Dynamic transmission of PEDV in a large antibody-positive swine farm

KANG Qixiang, HU Guangli, GENG Rui, WANG Xuanci, KUANG Zhanpeng, HUANG Yihui, ZENG Siying, PENG Ouyang, ZHANG Hao, CAO Yongchang\*

School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 519000, Guangdong, China

**Abstract:** [Background] Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is one of the major pathogens causing diarrhea in piglets. The rapid onset makes it difficult to document the cases, and few studies have reported the dynamics of PEDV distribution in pig farms after PEDV infection in piglets. [Objective] To explore the transmission dynamics of PEDV in large swine farms and improve the strategy for the prevention and control of porcine epidemic diarrhea (PED). [Methods] The transmission process of PEDV after infection in piglets in a closed large farm was simulated and the virus abundance in piglets and different areas of the farm was determined. [Results] The virus abundance of anal swabs and air samples presented consistent changes in the early stage of PEDV infection in piglets. The spread of PEDV in the farm was closely related to the movement of employees, and the bathing room might be a major hiding place of PEDV. [Conclusion] The virus abundance in the air of swine barns has the potential to be used as a monitoring indicator in the early stage of PED, and employee-associated media and sites are key targets for the prevention and control of PEDV. This study provides a reference for improving the control of PED and lays a foundation for research on the spread of similar viruses in large pig farms.

**Keywords:** porcine epidemic diarrhea virus; external environment; prevention and control for biosecurity

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的,在我国生猪养殖中常见的导致猪腹泻的传染性疾病<sup>[1-2]</sup>。2010年10月, PEDV的变异毒株造成了PED在中国境内的大面积暴发,并在此后长期流行,给我国生猪养殖业造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。PED主要通过口口和粪口途径传播,其次也可以通过运输、员工移动等方式进行传播<sup>[4]</sup>。生物安全防控是预防PED的主要方式和手段, PED的高度变异性、高传播性对PEDV生物安全的研究和防控提出了更高要求<sup>[5]</sup>。为探究PEDV在规模

化抗体阳性猪场中的动态分布, 本文使用PEDV攻毒模型模拟PEDV的发生,记录PEDV在场内的动态传播过程, 以期为PEDV在养殖场的传播规律及PEDV的生物安全防控提供重要理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

以广东省内某猪场的生猪及猪场环境为研究对象。其中生猪为5头经荧光定量PCR检测PEDV阴性的母猪生产的仔猪, 每窝随机选取3头, 共15头3日龄仔猪。动物实验方案经过

中山大学实验动物伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定(批准编号为SYSU-IACUC-2023-B0469)。

环境采样点主要分为3个部分:生产区(图1斜线区域)、过渡区、生活区(图1点状区域)。生产区为包含猪舍的猪场工作区域,包括两个未投入使用的猪舍,一个实验用仔猪舍(图1网状区域)及猪舍配套的洗澡间(包括第一更衣室、冲凉房、第二更衣室)、操作间、物料房等,其中猪舍风机位于猪舍内东南方向。过渡区指在生活区与生产区之间的部分,主要为员工通勤的道路及场内其他设施。生活区主要包括员工宿舍、厨房、大厅、水房、洗澡间(包括第一更衣室、冲凉房、第二更衣室),此外,还采集了厂区门外5–10 m(位于生活区东北方向)的环境拭子样品。

## 1.2 病毒来源

攻毒所用毒株为本实验室分离的 PEDV GDS01<sup>[6]</sup>,该毒株属 PEDV G2 亚群。

## 1.3 主要试剂和仪器

Vero 细胞及 PEDV 毒株,由本实验室保存;Hifair® V C58P2 Multiplex One Step RT-qPCR 探针法试剂盒,翌圣生物科技(上海)股份有限公司;荧光定量探针和引物,生工生物工程(上海)股份有限公司;PEDV IgA 抗体检测(ELISA)试剂盒,爱德士生物科技公司。便携式大流量生物气溶胶采样器,北京鼎蓝科技有限公司;全自动核酸提取纯化仪,杭州博日科技股份有限公司;实时荧光定量 PCR 系统,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

## 1.4 方法

使用荧光定量 PCR 方法检测 PEDV N 基因,并以  $C_t$  值作为病毒载量的参考标准。 $C_t$  值

是指循环阈值,设定  $C_t$  值的检测阈值,当 PEDV 扩增到一定程度,达到检测阈值时,就可被设备检测到。国家市场监督管理总局发布的《猪流行性腹泻检疫技术规范(SN/T 1699—2017)》<sup>[7]</sup>中规定: $C_t$  值 $\geq 40$  为阴性, $C_t$  值 $\leq 35$  为阳性。根据实验目的为探究病毒在场内的动态分布情况,将  $C_t$  值 $\leq 38$  视为阳性,以便获取更多场内病毒分布的信息。

使用全自动核酸提取纯化仪提取样本中的 RNA,之后使用 Hifair® V C58P2 Multiplex One Step RT-qPCR 探针法试剂盒检测样本  $C_t$  值。荧光定量 PCR 所用引物和探针序列如下:上游引物:5'-CCAGTACTTTCAACACTTAGCCTA-3';下游引物:5'-GCCACTAGCAGTTGGATG-3';探针:5'-CAAGTTGAATTGACACCCTGGTTT-3'。

荧光定量 PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ Hifair® V C58P2 MP Buffer 10  $\mu$ L, Hifair® V C58P2 Enzyme Mix 0.8  $\mu$ L, 探针(10  $\mu$ mol/L) 0.1  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.2  $\mu$ L、RNA 模板 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.7  $\mu$ L。荧光定量 PCR 反应条件: 50  $^{\circ}$ C 20 min; 95  $^{\circ}$ C 20 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

为模拟真实生产情景,参考国内预防 PEDV 的一般做法<sup>[5]</sup>,在母猪产前 4 周和产前 2 周免疫商品化灭活疫苗,并使用 PEDV IgA 抗体检测(ELISA)试剂盒检测初乳中的 IgA 抗体水平。为避免生产母猪排毒对实验产生影响,攻毒前采集母猪肛拭子样本,用荧光定量 PCR 方法检测母猪肛拭子 PEDV N 基因,确保其均为阴性。

根据受感染仔猪一般在 2–4 d 内开始出现大量死亡的报道<sup>[8]</sup>,将实验分为两个部分:第一部分持续 6 d,在第 0 天攻毒,攻毒方法为仔猪口服 1 mL  $1\times 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub> 病毒液,此剂量攻毒可以引起仔猪明显症状<sup>[9]</sup>。攻毒后记录仔猪

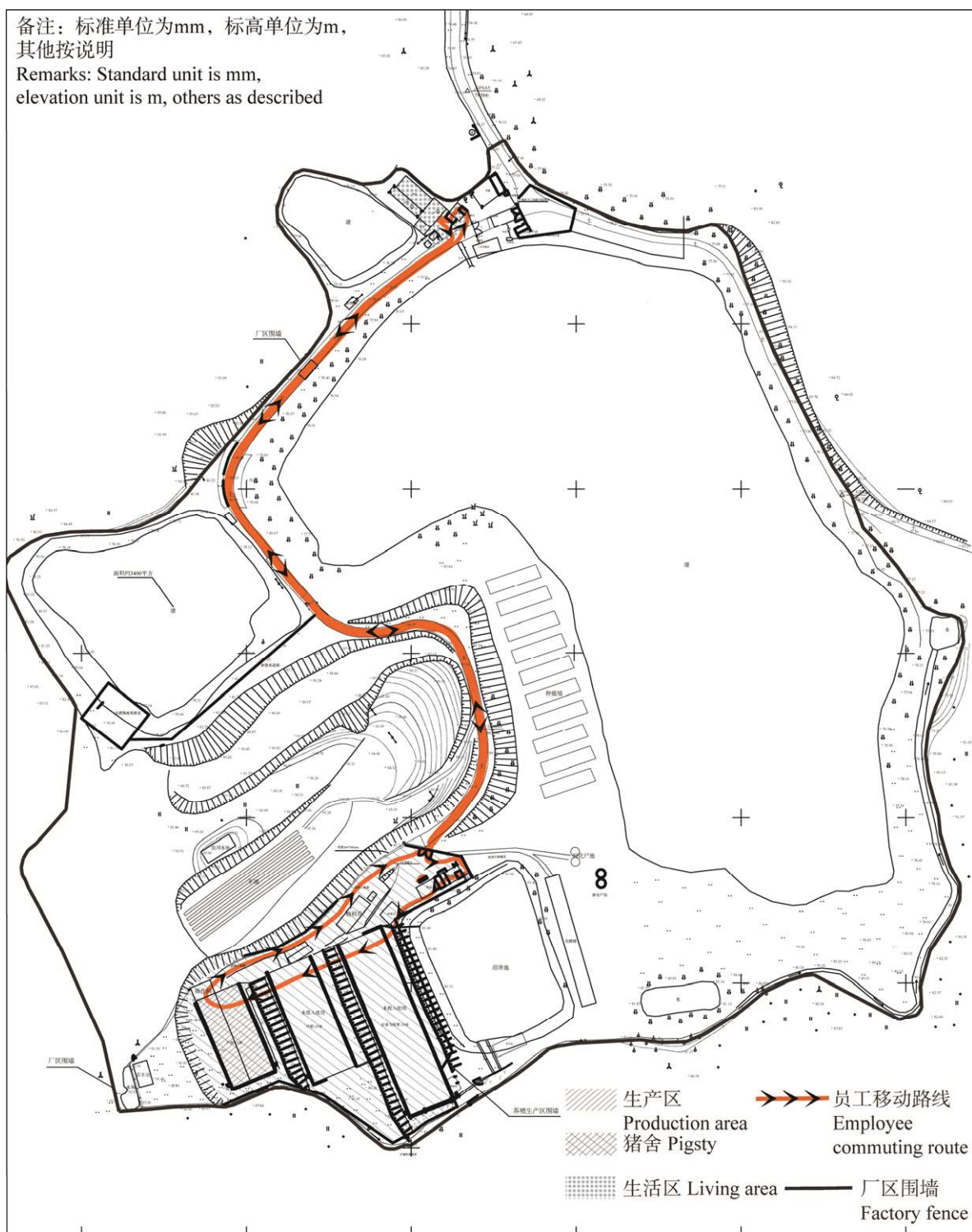


图1 猪场地图 斜线区域：生产区；网状区域：猪舍；点状区域：生活区；橙色路线及黑色箭头：员工移动路线；黑色粗线：厂区围墙

Figure 1 Map of pig farm. Diagonal area: Production area; Mesh area: Pigsty; Dot area: Living area; Orange route and black arrows: Employee commuting route; Thick black line: Factory fence.

的腹泻情况、体温、体重作为临床指标。每天收集仔猪的肛拭子样本及猪舍内距离定位栏 1 m、高度 0.5 m 处的空气样本,测量其 PEDV 的  $C_t$  值。

第二部分,在第 1–7、14、21 天采集场内 15 个地点的环境拭子样本,其中包括生产区的 8 个采样点:猪舍采样点 A (位于猪舍西北角),猪舍采样点 B (位于猪舍东南角)、操作间(位于猪舍西北方向,和猪舍相通)、操作间外(位于操作间东侧)、猪舍拖把(置于操作间东南角)、风机(猪舍东南面墙壁)、猪舍冲凉房(生产区东北区域)、物料房(生产区中部,猪舍东北偏东方向);过渡区一个采样点:生产区-生活区路面;生活区 6 个采样点:生活区路面、生活区冲凉房毛巾、厨房、厨房外、客厅及场外路面(生活区区域较集中,均位于厂区的北角,图 1)。测量环境拭子样本 PEDV 的  $C_t$  值。

### 1.5 数据处理

使用 Python 中的 Numpy、Seaborn、Matplotlib 库绘制第 1–6 天环境  $C_t$  值和猪群  $C_t$  值的回归曲线。

利用 Python 中的 Numpy、Sklearn、Matplotlib 库将第 1–7、14、21 天的猪场内环境拭子的  $C_t$  值转化为热图,进行可视化处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 攻毒后仔猪临床症状

第 1、2 天,半数仔猪出现糊状便;第 3 天,所有仔猪均出现糊状便;第 4、5 天,所有仔猪均出现较严重的腹泻症状,其中大部分仔猪表现为水样腹泻,3、4 头仔猪粪便为半流体状;第 6 天,水样腹泻的占比略有下降,约为 50%。

所有仔猪的体温、体重在攻毒后未出现显著的波动。攻毒后 6 d 内仔猪未出现死亡。

### 2.2 初乳 IgA 水平

采用爱德士 PEDV IgA 抗体检测(ELISA)试剂盒检测了初乳中 IgA 水平,5 头母猪初乳的平均  $S/P$  值为 2.622,最小值为 1.79。根据试剂盒说明书, $S/P \geq 0.5$  时判定为阳性,结果说明初乳 IgA 抗体都呈现阳性且抗体水平较高。

### 2.3 猪舍空气与仔猪肛拭子病毒丰度的相关性分析

采用定量 PCR 检测了猪群和环境 PEDV 的变化。如图 2 所示,在仔猪感染 PEDV 的初期, PEDV 的  $C_t$  值有明显下降的趋势,之后有缓慢增长的趋势。环境中的  $C_t$  值变化基本和猪群的平均  $C_t$  值相符合,尤其在猪群  $C_t$  值急剧降低的同时,环境  $C_t$  值也同样明显减少,在实验的第 4–6 天,可以看到环境  $C_t$  值和仔猪平均  $C_t$  值有相互接近的趋势,后期的变化趋势也明显小于前期, $C_t$  值趋于平稳。

### 2.4 PEDV 感染仔猪后的猪场内不同区域 PEDV 的分布

实验设置了 15 个环境采样点,虽然自猪肛

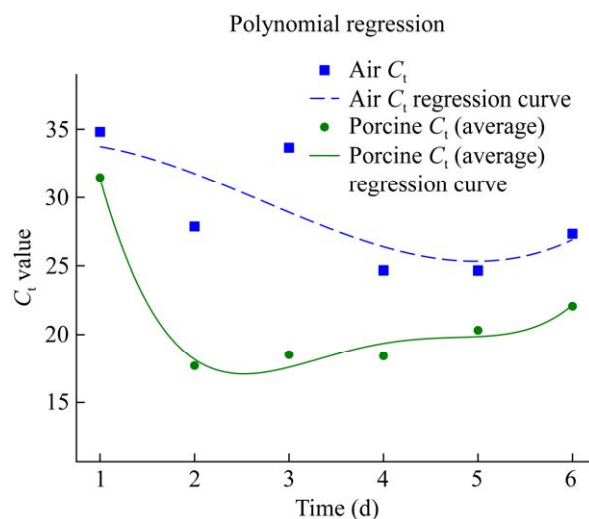


图 2 猪群和环境的 PEDV  $C_t$  值的回归曲线

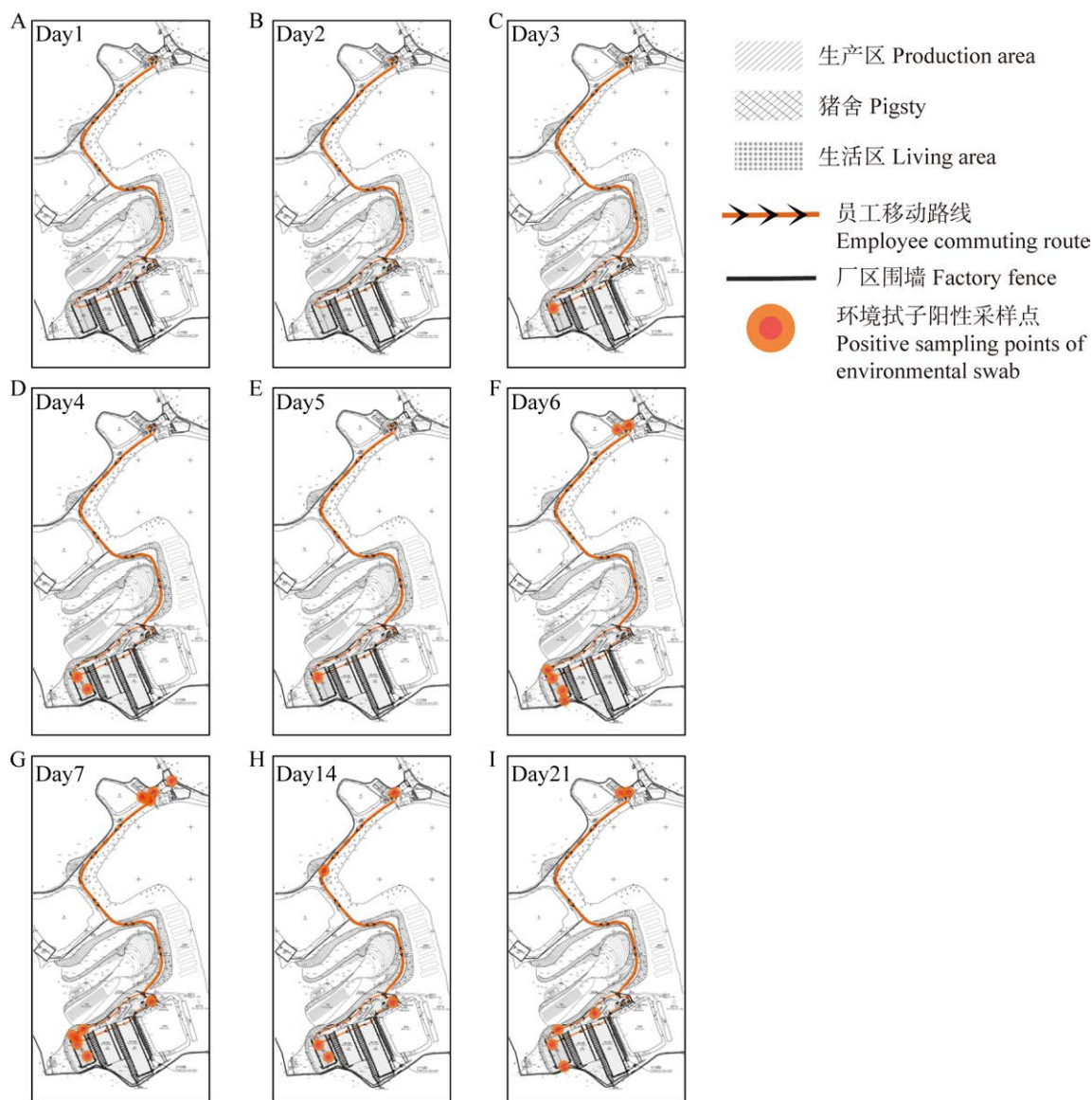
Figure 2 Regression curve of PEDV  $C_t$  values in pigs and the environment.



门拭子可以测出 PEDV 的第一天起猪舍空气中就可以测出 PEDV, 但场内的环境采样点在第 1 天和第 2 天均未出现阳性。在第 7 天场内可以检测到阳性的区域最多, 其次是第 6 天和第 21 天,

说明在 PEDV 感染仔猪的初期(第 0-5 天), 场内环境中的病毒丰度并不高。

图 3 是实验过程中不同日期场内阳性环境采样点的分布示意图, 可以看到自第 3 天开始厂



**图 3 养殖场阳性采样点分布** A-I: 第 1-7、14、21 天的阳性位点分布. 斜线区域: 生产区; 网状区域: 猪舍; 点状区域: 生活区; 橙色路线及黑色箭头: 员工通勤路线; 黑色粗线: 厂区围墙; 橙红色点: 环境拭子阳性采样点

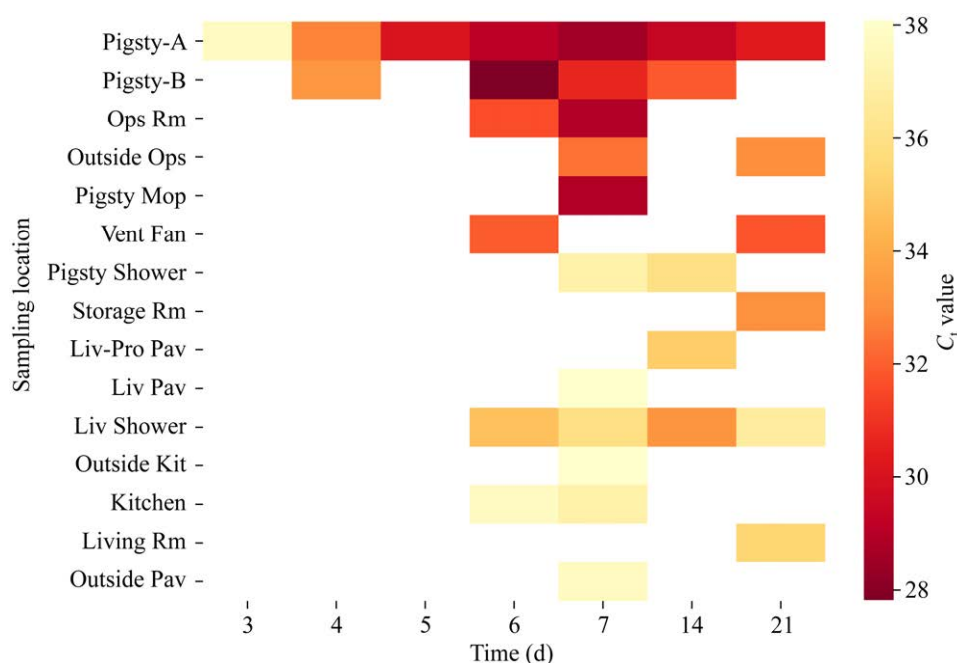
**Figure 3** Distribution of positive sampling points of farm. A-I: Distribution of positive sampling points from day 1 to day 7, day 14, day 21. Diagonal area: Production area; Mesh area: Pigsty; Dot area: Living area; Orange route and black arrows: Employee commuting route; Thick black line: Factory fence; Orange-red dots: Positive sampling points of environmental swab.

区内不同区域开始检测到环境拭子样本, 但第 3–5 天阳性位点一直仅限在生产区检测到, 直到第 6 天生活区开始出现阳性采样点, 之后的第 7、14、21 天阳性采样点较为均匀地分布在生产区和生活区。结合员工的移动路线可知, 在员工退出生产区后进入生活区的第一个区域是生活区的冲凉房, 结合这个信息, 可以看到当第六天阳性位点出现在猪舍外开始, 生活区冲凉房采样点便持续呈现阳性。另一方面, 猪舍的冲凉房是员工自生活区进入生产区的第一个区

域, 可以看到当生活区的阳性位点增多时, 猪舍冲凉房就会呈现阳性。

在对猪场内不同环境位点的病毒  $C_t$  值进行定性研究后, 进一步分析了病毒在场内的定量情况, 并绘制了相应的热图(图 4)。图 4 中纵坐标的采样点顺序根据自上到下越来越远离猪舍的顺序排列。

首先在猪舍内, 采样点 A 的病毒含量高于采样点 B, 这可能与猪舍风机的位置有关, 风机更接近采样点 B, B 点的通风性明显优于 A 点。



**图 4 场内不同地点的 PEDV  $C_t$  值** Pigsty-A: 猪舍内采样点 A; Pigsty-B: 猪舍内采样点 B; Ops Rm: 操作间; Outside Ops: 操作间外; Pigsty Mop: 猪舍拖把; Vent Fan: 风机; Pigsty Shower: 猪舍冲凉房; Storage Rm: 物料房; Liv-Pro Pav: 生活区-生产区路面; Liv Pav: 生活区路面; Liv Shower: 生活区冲凉房毛巾; Outside Kit: 厨房外; Kitchen: 厨房; Living Rm: 客厅; Outside Pav: 厂外路面; 空白部分为未检测出  $C_t$  值

Figure 4 PEDV  $C_t$  values at different locations within the pig farm. Pigsty-A: Sampling point A within the pigsty; Pigsty-B: Sampling point B within the pigsty; Ops Room: Operations room; Outside Ops: Outside the operations room; Pigsty Mop: Mop used in the pigsty; Vent Fan: Ventilation fan; Pigsty Shower: Shower room in the pigsty; Storage Rm: Storage room; Liv-Pro Pav: Pavement between living area and production area; Liv Pav: Pavement in the living area; Liv Shower: Shower room in the living area; Outside Kit: Outside the kitchen; Kitchen: Kitchen area; Living Rm: Living room; Outside Pav: Pavement outside the facility; The blank areas indicate the absence of detected  $C_t$  values.

其次根据图 4 也可以看到在 PEDV 感染仔猪的初期(第 1–5 天),环境拭子阳性位点明显集中于猪舍及猪舍周围的工作区,而随着时间的推移,阳性位点有逐渐向外扩散的趋势,其中第 7 天的阳性位点最多,分布也最广泛。另外,根据图 4 可知,在几个采样日中, PEDV 感染仔猪后,第 1–7 天的环境病毒丰度逐渐升高,并在第 7 天达到最高,之后第 14 天和第 21 天的病毒丰度逐渐下降。

### 3 讨论与结论

实验中仔猪在接毒后 6 d 内未出现死亡,这可能是由于实验所用的经产母猪进行了多次 PEDV 疫苗免疫,母猪体内有高水平抗体,且抗体可以进入初乳,仔猪可以通过摄食母乳获得被动免疫。

为减少经济损失,在 PED 暴发后迅速采取应急措施,早期发现和诊断 PED 是非常重要的<sup>[10]</sup>。但在实际生产中,对每头仔猪进行采样会大幅度增加生产成本,并且患病仔猪常常发病迅速,立即死亡<sup>[11]</sup>,因此,规模化养殖亟须一种简单有效的监测手段。有研究表明,依靠一定数量的采样即可定性非洲猪瘟疫情并采取相应措施<sup>[12]</sup>。目前也有研究将空气样本作为禽流感病毒监测的手段<sup>[13]</sup>。在此次实验中,仔猪肛拭子和空气样品病毒丰度在 PEDV 感染猪群的初期具有明显的一致性变化。因此,猪舍空气的病毒丰度有可能作为 PED 早期的监测指标。

有文献报道,员工防护服等防护用品以及饲料等都是潜在的 PEDV 的传播媒介<sup>[14–15]</sup>,本研究结果发现员工可通过防护服等介质将 PEDV 病毒携带出生产区,证实了这一可能。另一方面,本研究发现洗澡间是 PEDV 传播的重要藏匿点, PEDV 在生产区外的传播可能与员工的移动密切相关。因此,结果提示与员工相关的

介质和场地也是今后 PEDV 生物安全防护的重要对象。

### REFERENCES

- [1] ZHANG H, ZOU CC, OUYANG P, ASHRAF U, XU QP, GONG L, FAN BC, ZHANG Y, XU ZC, XUE CY, WEI XN, ZHOU QF, TIAN XY, SHEN HQ, LI B, ZHANG XB, CAO YC. Global dynamics of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution, and transmission[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(3): msad052.
- [2] LI M, PAN YY, XI Y, WANG M, ZENG QY. Insights and progress on epidemic characteristics, genotyping, and preventive measures of PEDV in China: a review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2023, 181: 106185.
- [3] WANG D, FANG LR, XIAO SB. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 7–13.
- [4] SUN RQ, CAI RJ, CHEN YQ, LIANG PS, CHEN DK, SONG CX. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(1): 161–163.
- [5] 李化东, 陈昌林. 非洲猪瘟形势下猪流行性腹泻的防控措施[J]. *猪业科学*, 2021, 38(1): 102–104.  
LI HD, CHEN CL. The prevention and control measures of porcine epidemic diarrhea in the African swine fever situation[J]. *Swine Industry Science*, 2021, 38(1): 102–104 (in Chinese).
- [6] HAO J, XUE C, HE L, WANG Y, CAO Y. Bioinformatics insight into the spike glycoprotein gene of field porcine epidemic diarrhea strains during 2011–2013 in Guangdong, China[J]. *Virus Genes*, 2014, 49: 58–67.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. 猪流行性腹泻检疫技术规范: SN/T 1699—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Quarantine protocol for porcine epidemic diarrhea: SN/T 1699—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018 (in Chinese).
- [8] THOMAS JT, CHEN Q, GAUGER PC, GIMÉNEZ-LIROLA LG, SINHA A, HARMON KM, MADSON DM, BURROUGH ER, MAGSTADT DR, SALZBRENNER HM, WELCH MW, YOON KJ, ZIMMERMAN JJ, ZHANG JQ. Effect of porcine epidemic diarrhea virus infectious doses on infection outcomes in naïve conventional neonatal and weaned



- pigs[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139266.
- [9] XU ZC, LIU Y, PENG P, LIU YF, HUANG MY, MA YH, XUE CY, CAO YC. Aloe extract inhibits porcine epidemic diarrhea virus *in vitro* and *in vivo*[J]. Veterinary Microbiology, 2020, 249: 108849.
- [10] SOZZI E, MORENO A, LELLI D, PERULLI S, PROSPERI A, BROCCHI E, CAPUCCI L, PAPETTI A, GIACOMINI E, ALBORALI GL, LAVAZZA A. Development and validation of a monoclonal antibody-based competitive ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV)[J]. Research in Veterinary Science, 2018, 121: 106-110.
- [11] WANG K, LU W, CHEN JF, XIE SQ, SHI HY, HSU H, YU WJ, XU K, BIAN C, FISCHER WB, SCHWARZ W, FENG L, SUN B. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production[J]. FEBS Letters, 2012, 586(4): 384-391.
- [12] ZHANG XH, RONG XM, LI J, FAN M, WANG YM, SUN XD, HUANG BX, ZHU HP. Modeling the outbreak and control of African swine fever virus in large-scale pig farms[J]. Journal of Theoretical Biology, 2021, 526: 110798.
- [13] CORZO CA, CULHANE M, DEE S, MORRISON RB, TORREMORELL M. Airborne detection and quantification of swine influenza A virus in air samples collected inside, outside and downwind from swine barns[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71444.
- [14] KIM Y, YANG M, GOYAL SM, CHEERAN MCJ, TORREMORELL M. Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus[J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(1): 89.
- [15] DEE S, CLEMENT T, SCHELKOPF A, NEREM J, KNUDSEN D, CHRISTOPHER-HENNINGS J, NELSON E. An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naïve pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept[J]. BMC Veterinary Research, 2014, 10: 176.