

某猪场猪瘟典型病例综合诊断及病毒E2基因分析

李焱¹ 马梓承¹ 刘照虎¹ 王宏宇¹ 孟凡亮¹ 曹龙龙¹ 焦秋林¹
刘蒙达¹ 李宝全^{1*} 刘思当^{1,2,3*}

(¹山东农业大学动物科技学院, 泰安 271000; ²山东省动物生物工程与疾病防治重点实验室, 泰安 271018;

³山东省畜禽疫病防控工程技术研究中心, 泰安 271018)

摘要 2018年7月, 山东省某育肥猪场猪群突然发病并出现大量死亡, 病猪临床表现高热、皮肤潮红并布满点状出血。为查明发病原因, 对病猪进行病理剖检并采样, 经实验室综合检测, 初步诊断为猪瘟病毒感染。对检测到的CSFV E2基因进行了分子测序及核酸序列同源性对比, 最终确诊为2.1d亚型猪瘟病毒感染。结果显示, 本实验室分离到的CSFV(命名为SDXT2018)与21株参考毒株的E2基因核苷酸序列同源性为81.3%~96.2%。与21株参考毒株中同源性最高的是2.1d亚型的JQ001834, 同源性达96.2%; 与2.3亚型的经典毒株HQ148061的同源性最低, 为81.3%。结果说明, 我国猪瘟病毒流行毒株的变异趋势越发严峻, 以致于常规疫苗免疫的猪场有可能爆发典型猪瘟疫情, 这对养猪业构成了严重威胁。因此, 亟待人们开展病毒遗传变异趋势的研究, 并针对病毒抗原特性研制、生产高效疫苗。

关键词 猪瘟病毒; E2基因; 同源性比对; 综合诊断

Comprehensive Diagnosis and Analysis of Virus E2 Gene in Typical Cases of Classical Swine Fever in a Swine Farm

Li Yan¹, Ma Zicheng¹, Liu Zhaohu¹, Wang Hongyu¹, Meng Fanliang¹, Cao Longlong¹,
Jiao Qiulin¹, Liu Mengda¹, Li Baoquan^{1*}, Liu Sidang^{1,2,3*}

(¹College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271000, China; ²Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; ³Shandong Provincial Engineering Technology Research Center of Animal Disease Control and Prevention, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract In July 2018, a deathful disease outbreak in a fattening pigs farm in Shandong province. Clinical symptoms included high fever, flushed skin with dotted bleeding. It was preliminarily diagnosed as Classical Swine Fever (CSF) after autopsy and a comprehensive laboratory detection. Then, the E2 gene of Classical Swine Fever virus (CSFV) was detected and sequenced. This outbreak was confirmed as infection of CSFV. The nucleotide sequence homology between the strain in this study (named SDXT2018) and reference strains was from 81.3% to 96.2%. In reference strains, SDXT2018 was closest to JQ001834 that belongs to 2.1d subtype. The homology between SDXT2018 and AF091507, which was classical attenuated hog fever vaccine strain, was just 81.3%. The results showed variation of the epidemic strains of CSFV in China is becoming severe, which seriously threat the

收稿日期: 2018-12-12 接受日期: 2019-01-16

国家重点研发计划资助(批准号: 2017YFD0500600)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13905388709, E-mail: liusid@sdau.edu.cn; Tel: 13455732645, E-mail: libq72@163.com

Received: December 12, 2018 Accepted: January 16, 2019

This work was supported by National Key Research and Development Programme (Grant No.2017YFD0500600)

*Corresponding authors. Tel: +86-13905388709, E-mail: liusid@sdau.edu.cn; Tel: +86-13455732645, E-mail: libq72@163.com

网络出版时间: 2019-04-01 11:42:50 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190401.1142.016.html>

swine industry. Classical Swine Fever could outbreak in immunity-failure farms and cause enormous economic loss. It is urgent to research the trend of viral variation and produce new efficient vaccine.

Keywords Classical Swine Fever virus; *E2* gene; homology comparison; comprehensive diagnosis of disease

猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical Swine Fever virus, CSFV)引起的一种猪的高度传染性疾病,给养猪业造成重大经济损失^[1],在我国属一类传染病。CSFV为有囊膜的小RNA病毒,主要通过口腔、鼻腔、眼结膜和生殖道黏膜等途径水平传播,也可经胎盘垂直传播,最初病毒主要在扁桃体内复制,病毒从扁桃体扩散至周围淋巴结后继续增殖,然后通过外周血到达骨髓、全身各处淋巴结、脾、肠道淋巴组织等,脾、骨髓、淋巴结和小肠的淋巴组织病毒载量迅速升高并导致高水平的病毒血症^[2]。CSFV在单核巨噬细胞和血管内皮细胞内复制。发病猪白细胞减少,尤其淋巴细胞减少是典型的早期反应。

CSFV的E2蛋白是位于病毒囊膜表面的囊膜糖蛋白,是猪瘟病毒主要的毒力因子,参与病毒的感染过程,是病毒的保护性蛋白和参与免疫的重要蛋白^[3],能够诱导机体产生抗CSFV的中和抗体,使机体能够抵抗强毒的攻击。*E2*基因上共有A、B、C、D 4个抗原表位,在这4个抗原表位中只有A抗原表位中的A1和A2表位亚区为高度保守,其余均为不保守抗原区域^[4]。因此,*E2*基因的变化可以反映猪瘟病毒的突变规律。在流行病学调查中,对猪瘟病毒的*E2*基因序列分析具有特别重要的意义。本文通过对山东某猪场疑似猪瘟病例进行综合诊断,采取针对性防控措施,最大限度地控制了疫情,减少了经济损失。分析本次猪瘟爆发的原因以及确定流行毒株的类型,可以丰富本地区的猪瘟流行流行病学资料,对免疫方案的制定和疫苗的研发具有一定的参考价值和指导意义。

1 材料与方法

1.1 发病背景及临床症状

2018年7月,山东新泰市某猪场存栏120头育肥猪,仔猪购自市场散户。进猪前仔猪可能已免疫猪瘟、蓝耳病、伪狂犬病、圆环病毒病疫苗,但免疫程序不详。进猪后不久猪群发生高热性疾病,病猪体温上升,持续高烧,部分猪拉稀,少数出现呼吸道

症状,卧地气喘,精神萎靡不振,食欲减退,皮毛杂乱无光,全身潮红,皮肤有出血点,发病70余头,死亡60余头,畜主取2头典型病猪送诊。

1.2 主要试剂

EasyPure Viral DNA/RNA Kit核酸提取试剂盒、pEASY-T1 Simlie Cloning Kit连接转化试剂盒(pEASY-T1 Simlie Cloning Vector)、Trans1-T1感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司; Biospin Gel Extraction Kit胶回收试剂盒购自杭州博日科技有限公司; 培养细胞用DMEM、犊牛血清(FBS)购自Biological Industries(BI)公司; 琼脂糖粉购自Sigma公司; DL2000 DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 病料的处理

剖检病猪,取扁桃体、淋巴结、脾、肝、肺、肾、脑等组织,一份用10%的福尔马林溶液固定,常规制片及HE(苏木素-伊红)染色,做病理组织学检查;另一份使用灭菌的研磨棒充分研磨,加入2 mL无菌PBS稀释,分装至两个1.5 mL无菌离心管中,一管放入-80 °C备用,另一管反复冻融3次后,使用EasyPure Viral DNA/RNA Kit试剂盒提取病毒核酸。

1.4 实验室诊断

1.4.1 PCR检测 在GenBank上查找猪2型圆环病毒、猪蓝耳病病毒、猪伪狂犬病病毒及猪瘟病毒全基因参考序列,根据其基因保守区设计引物,经Oligo7分析和NCBI上验证后,得到特异性的引物^[6](表1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,经平时实验证明引物具有极强的特异性。利用PCR/RT-PCR方法对目的片段进行扩增,扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳,电泳结束后在紫外线凝胶成像系统中成像,根据条带的位置即可判断检测样本的阴阳性。

1.4.2 病毒分离及CSFV *E2*基因序列分析 将经过PCR鉴定为CSFV *E2*阳性的病料匀浆液上清经0.22 μm滤器过滤后,接种于密度约70%的单层PK-15细胞中,36 h后收毒检测。继续接毒于密度约70%的单层PK-15细胞传代。盲传三代收毒,将细胞及上清按上述方法提取核酸后,进行PCR鉴定。将鉴定为

表1 病原检测引物序列

Table 1 Primer sequences used for different virus

病原 Pathogen category	引物序列(5'→3') Primers (5'→3')	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	扩增大小(bp) Fragment size (bp)
CSFV	F: ARA CCA YGC AYA TGW CAG AAG TAC C R: TRT CGA CTT CCC TGG TTT CAC TTG	57	599
PRRSV	F: CAA AGA YCA GAT GGA GGA G R: ATR ATG GCT TGA GCT GAG	55	372
PRV	F: TCC ACT CGC AGC TCZ TTC T R: GCA CGT CAT CAC GAA GGA	57	632
PCV2	F: TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT R: CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG	52	260
CSFV E2	F: GTA AAT ATG TGT GTG TTA GAC CAG A R: CAG TAT TGG TAC TCG CCC TTA AGC A	55	1 207

表2 21株参考毒株E2基因的序列表

Table 2 Information of E2 sequences of 21 CSFV reference strains

登录号 GenBank	亚型 Genotype	登录号 GenBank	亚型 Genotype	登录号 GenBank	亚型 Genotype
HM237795	1.1	AY072924	2.1a	M31768	1
AF091661	1.1	GQ923951	2.1a	JQ001834	2.1d
AF092448	1.1	GQ122383	2.1b	DQ907717	2.2
AF091507	1.1	GU592790	2.1b	KC533787	2.2
KM262189	1.1	AY526728	2.1b	HQ148061	2.3
JX028200	1.3	HQ697223	2.1c	AY646427	3.4
JX028201	1.4	HQ697227	2.1c	L49347	3.4

阳性的核酸利用CSFV E2引物进行E2基因全长的扩增。将扩增产物进行胶回收、连接pEASY-T1 Simlie Cloning Vector载体、转化Trans1-T1感受态细胞及增菌培养,最后将鉴定为E2基因阳性的菌液送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序。利用Lasergene 7.1软件对本研究中分离到的毒株和GenBank中录入的CSFV参考毒株的E2基因进行核苷酸序列比对分析,以便得出分离毒株的序列特征。同时,我们构建了E2基因遗传进化树,比较分离株与参考株亲缘关系的远近。本研究序列分析所用到的GenBank中收录的21株参考毒株见表2。

2 结果

2.1 剖检病变

剖检病死猪发现,肾脏表面密布暗红色的出血点,切面皮质部有大量的出血点,肾盂也有散在的点状出血(图1A);肺脏表面见斑点状出血(图1B);扁桃体呈暗红色充血、出血(图1C);全身各处淋巴结均见暗红色肿大,切面湿润、外翻,呈“大理石样”变或

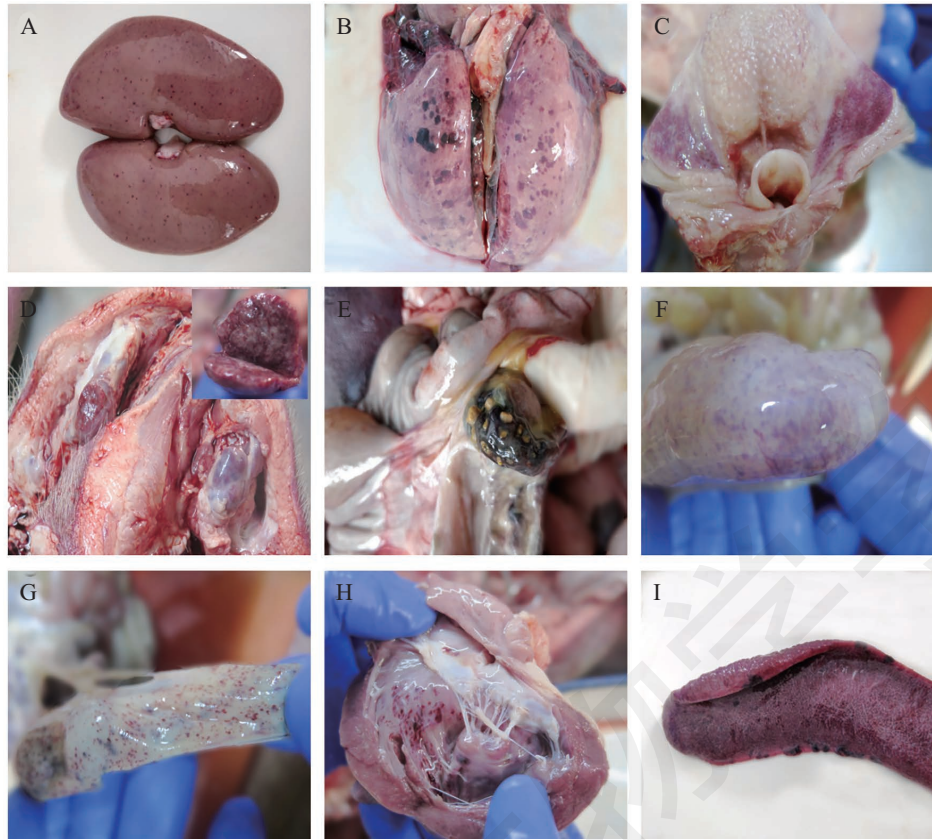
似血肿(图1D);回盲瓣黏膜因固膜性炎症而发生“纽扣”状溃疡(图1E),盲肠浆膜面有斑点状出血(图1F),黏膜面也有大量斑点状出血及溃疡灶(图1G);心内膜斑点状出血(图1H);脾脏边缘有暗红色隆起的梗死灶(图1I)。

2.2 病理组织学变化

肾小球充血出血,间质灶状出血并有多量淋巴细胞浸润(图2A);扁桃体充血、出血,淋巴细胞坏死崩解(图2B);淋巴结充血、出血,淋巴细胞坏死崩解,核浓缩、核破碎、核溶解、核消失(图2C);心脏间质出血,并见少量淋巴细胞浸润(图2D);脾脏出血,淋巴细胞坏死(图2E);可见典型的病毒性脑炎病变,脑血管充血,周围多量淋巴细胞浸润聚集形成袖套现象,神经元变性坏死并见卫星或噬神经现象(图2F)。

2.3 聚合酶链式反应检测结果

聚合酶链式反应方法检测,仅在猪瘟单泳道出现了条带,条带大小约599 bp,其他三个样品泳道并未出现条带,可判定CSFV阳性(图3A)。为了进

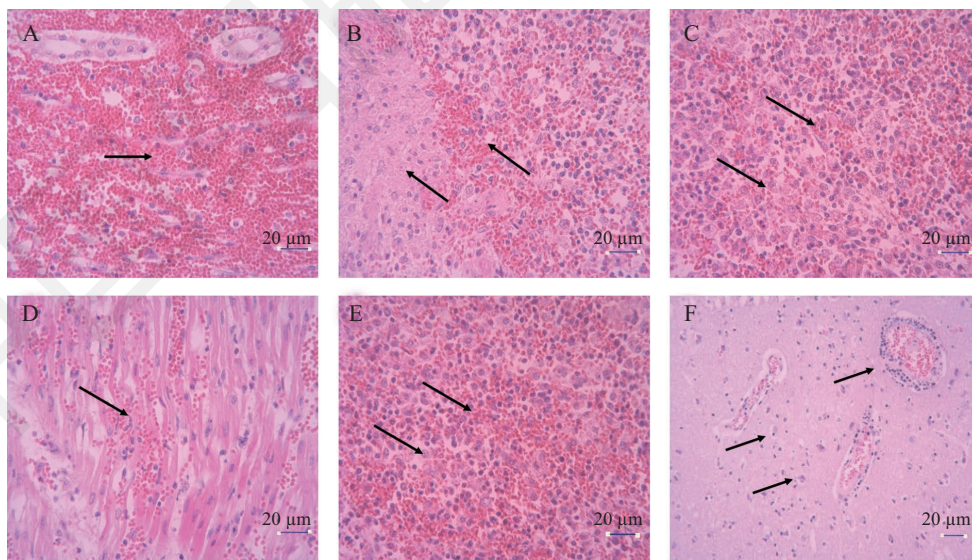


A: 肾脏弥漫性出血; B: 肺脏斑状出血; C: 扁桃体充血; D: 淋巴结呈出血性炎症; E: 回盲瓣黏膜溃疡; F: 盲肠浆膜面出血; G: 盲肠黏膜出血; H: 心内膜出血; I: 脾脏边缘出血性梗死。

A: diffuse renal hemorrhage; B: pulmonary spot hemorrhage; C: tonsil congestion; D: hemorrhagic inflammation of lymph nodes; E: ileocecal mucosal ulcer; F: cecal serosal hemorrhage; G: cecal mucosal hemorrhage; H: endocardial hemorrhage; I: splenic marginal hemorrhagic infarction.

图1 病猪剖检病变

Fig.1 Autopsies of the pigs

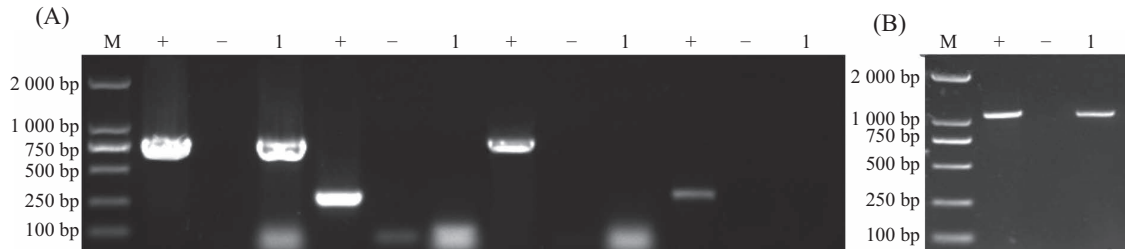


A: 肾出血性炎症; B: 扁桃体坏死出血; C: 淋巴实质细胞变性, 伴有出血现象; D: 心肌出血; E: 脾脏出血性坏死; F: 脑炎血管套现象, 神经元变性坏死。箭头处表示病理变化。

A: renal hemorrhagic inflammation; B: tonsillar necrotic hemorrhage; C: lymphoid cell degeneration with bleeding; D: myocardial hemorrhage; E: hemorrhagic necrosis of spleen; F: encephalitis vasculoid phenomenon, neuronal degeneration and necrosis. The arrows represent pathological changes.

图2 病理组织学变化

Fig.2 Histopathological changes of the pigs



A: 送检样品电泳结果; B: CSFV E2基因扩增结果。M: DL2000 DNA marker; +: 阳性对照; -: 阴性对照; 1: 检测样品。

A: etiologic detection results of the pigs; B: detection results of the virus E2 gene. M: DL2000 DNA marker; +: positive control; -: negative control; 1: inspected sample.

图3 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Etiological detection results

		Percent identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Divergence	1	█	81.3	82.9	83.1	82.9	82.8	82.7	81.6	83.4	93.8	90.9	96.1	94.4	95.5	90.4	90.9	96.2	88.5	85.7	86.6	81.8	81.7
	2	22.5	█	93.9	96.0	95.3	94.5	91.5	88.6	89.3	83.6	82.4	81.9	81.8	81.9	81.7	81.9	81.5	84.6	82.3	83.2	84.1	83.7
	3	20.2	6.4	█	95.4	95.8	94.4	92.1	88.9	90.4	85.1	84.1	83.9	84.0	83.7	83.2	83.5	83.1	85.8	83.4	82.8	84.7	84.4
	4	20.0	4.2	4.8	█	96.6	97.1	92.8	89.3	89.8	84.9	83.6	83.6	83.3	83.7	82.7	82.9	83.1	86.1	83.7	84.5	85.2	84.8
	5	20.2	4.9	4.4	3.5	█	95.7	92.8	89.2	90.6	84.9	83.7	83.8	83.8	83.5	83.4	83.5	83.1	85.4	83.0	84.2	84.5	84.5
	6	20.3	5.7	5.9	2.9	4.5	█	91.9	88.7	89.8	85.2	83.9	83.7	83.6	83.6	83.0	83.3	83.3	86.0	83.9	84.2	85.2	85.0
	7	20.6	9.2	8.4	7.7	7.7	8.8	█	88.1	89.9	85.0	83.6	83.5	83.1	83.1	82.8	83.0	82.0	85.5	83.0	82.8	84.7	84.7
	8	22.0	12.7	12.3	11.9	12.0	12.5	13.3	█	87.4	84.1	82.6	82.8	82.6	82.1	82.4	81.3	84.5	82.3	82.6	83.2	83.0	83.0
	9	19.5	11.8	10.5	11.2	10.2	11.2	11.0	14.2	█	86.1	84.4	84.6	84.9	84.3	84.0	84.3	83.5	85.7	82.8	83.6	84.4	84.1
	10	6.5	19.3	17.2	17.5	17.5	17.1	17.3	18.5	15.8	█	95.4	95.1	95.3	94.7	93.4	94.0	93.7	91.3	87.8	88.7	83.2	82.8
	11	9.9	20.9	18.5	19.2	19.1	18.8	19.3	20.6	18.0	4.8	█	92.6	92.6	91.8	90.6	91.1	91.2	89.6	87.0	86.7	81.4	81.4
	12	4.1	21.7	18.8	19.3	19.0	19.1	19.5	20.4	17.8	5.1	8.0	█	95.7	97.0	91.6	92.2	96.4	89.7	87.0	87.3	81.9	82.3
	13	5.9	21.8	18.7	19.8	19.0	19.3	19.9	20.4	17.4	4.9	8.0	4.5	█	95.0	92.4	92.5	94.5	89.8	87.3	87.6	82.3	82.3
	14	4.7	21.6	19.1	19.1	19.5	19.2	20.0	20.7	18.2	5.5	8.9	3.1	5.2	█	91.2	91.7	96.1	89.4	86.7	87.6	81.8	81.9
	15	10.5	21.9	19.8	20.6	19.6	20.0	20.4	21.2	18.6	7.0	10.3	9.1	8.1	9.5	█	98.8	90.3	89.2	86.1	86.2	83.0	82.8
	16	9.9	21.5	19.4	20.2	19.4	19.6	20.0	20.8	18.2	6.3	9.7	8.4	8.0	9.0	1.2	█	90.8	89.6	86.5	86.7	83.1	82.9
	17	3.9	22.2	19.9	20.0	20.0	19.7	21.5	22.4	19.3	6.6	9.6	3.7	5.8	4.1	10.6	10.0	█	88.8	86.1	86.7	81.3	81.5
	18	12.9	17.8	16.3	15.8	16.8	16.0	16.6	17.9	16.3	9.4	11.4	11.3	11.2	11.8	12.0	11.4	12.4	█	93.7	89.9	84.1	84.1
	19	16.4	21.0	19.5	19.1	20.1	18.8	20.0	21.0	20.2	13.6	14.8	14.7	14.3	15.2	15.9	15.3	15.8	6.6	█	87.0	82.8	83.0
	20	15.3	19.8	20.5	18.1	18.5	18.4	20.3	20.6	19.1	12.6	15.2	14.4	14.1	14.0	15.7	15.2	15.2	11.1	14.8	█	81.1	81.1
	21	21.7	18.5	17.6	17.1	18.0	17.1	17.6	19.8	18.2	19.7	22.2	21.5	20.9	21.8	19.8	19.7	22.4	18.4	20.1	22.8	█	98.4
	22	21.8	19.0	18.2	17.7	18.0	17.4	17.7	20.1	18.6	20.2	22.2	21.0	21.0	21.6	20.1	20.0	22.1	18.4	19.9	22.8	1.6	█
		1	2	3	4	5	7	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

图4 SDXT2018核苷酸同源性比对

Fig.4 Nucleotide similarities between SDXT2018 and 21 reference strains

表3 SDXT2018与21株参考毒株E2基因核苷酸(nt)序列的相似度(%)

Table 3 Nucleotide (nt) and amino acid similarities (%) between SDXT2018 and 21 reference strains

地区	相似度(%)
Areas	Similarities (%)
China	81.3~96.2
Italy	82.7~82.9
Germany	82.9~93.8
India	82.9~85.7
Cuba	81.6~83.4

的E2基因进行基因序列及核苷酸序列的比对分析发现, 本次检测到的CSFV(命名为SDXT2018)与21株参考毒株的E2基因核苷酸序列相似性为81.3%~96.2%(图4)。分离株与参考株对比分析发现, 核苷酸同源性差异性最高的是与2012年在湖南分离到的2.1d亚型的JQ001834, 同源性达到96.2%; 与1999年分离的1.1亚型的经典毒株AF091507的同源性最低, 为81.3%(表3)。通过分析本次分离毒株与21株参考毒株变异趋势, 发现SDXT2018猪瘟病毒与我国报道的猪瘟变异株的同源性高于古巴、印度和欧洲的两个国家的毒株。

行基因序列分析, 使用1 151 bp的E2基因全长引物利用RT-PCR方法对提取的核酸进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳, 在1 151 bp出现了目的条带(图3B)。

2.4 CSFV E2基因的分析结果

将本次分离的CSFV E2基因序列用分子生物学软件lasergene7.1进行处理, 与上述21株参考株

将本次病毒与猪瘟各基因亚群的21株参考毒株建立遗传进化树(图5)。21株参考毒株包括目前发现猪瘟的11个基因亚群, 分离病毒与2.1d亚型的JQ001834遗传距离最近, 与2株3.4型的AY646427和L49347遗传距离最远。结果表明, 检测到的CSFV为2.1b亚群枝。

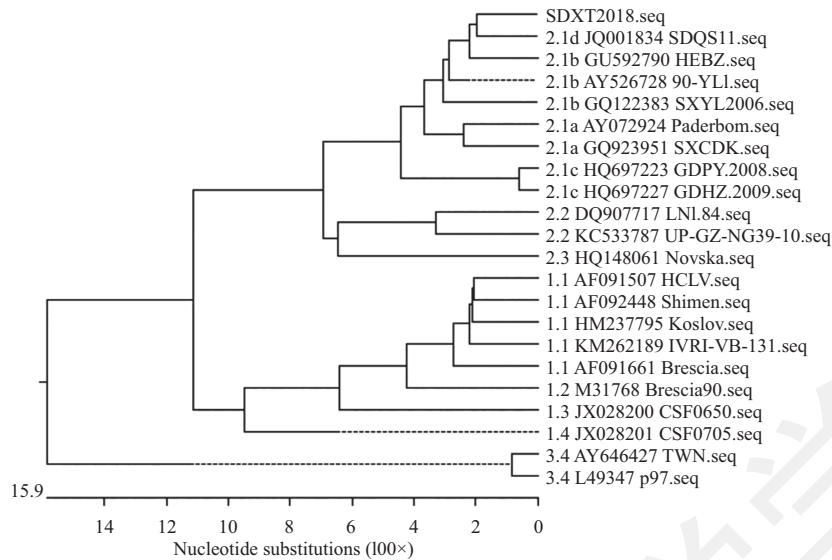


图5 SDXT2018遗传进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of SDXT2018 and the reference strains

3 讨论

现今猪瘟在我国广泛流行,我国养猪行业正面临着前所未有的挑战,尤其是首例非洲猪瘟在辽宁省被确诊^[7],对猪瘟和非洲猪瘟的确诊及鉴别显得尤其重要。猪瘟和非洲猪瘟病症类似,两者均为猪的热性、高度接触性、出血性传染病,且发病率和死亡率都较高^[8]。非洲猪瘟和猪瘟病毒都仅感染猪(家猪和野猪),两者都可存在于带病猪的血液、粪便、精液及其他分泌物等,亦可通过带毒物感染易感猪,可通过带毒的猪肉及猪肉制品和空气传播病毒。急性CSFV和ASFV经过口、鼻以及其他途径进入机体后,都会在机体的免疫器官内增殖并造成一定的病理损伤,表现出出血性坏死及严重的免疫抑制^[9-10]。所以,当前典型猪瘟的确切诊断及排查具有特别重要的意义。

我国于1956年就提出了清除猪瘟的计划,虽然有效地控制了猪瘟在我国的急性发生和大流行,但猪瘟仍在我国不间断地流行^[11]。自2014年底以来,我国一些进行常规疫苗免疫的猪场发生典型猪瘟疫情,发病率较高,造成了不同程度的经济损失^[12],可能与猪瘟流行毒株的变异有一定的关系。本文通过对本次检到的猪瘟E2基因进行分析,检测毒株与猪瘟病毒各亚群的参考毒株进行比对,发现该病毒位于2.1d亚群。

该病例经过实验室综合诊断,最终确定山东新泰某猪场发生的疫情属猪瘟病毒感染所致。据了解,

发病猪场所进仔猪曾进行过猪瘟疫苗免疫,然而,该场爆发如此典型猪瘟并造成重大损失的原因,如果排除疫苗免疫效果欠佳的问题,我们可以推测,该场所免疫的猪瘟苗对本次爆发猪瘟疫情的交叉保护力较低。鉴于本次研究的局限性,该毒株抗原有关基因是否发生变化,有待后续研究。

参考文献 (References)

- 1 Tong C, Chen N, Liao X, Yuan X, Sun M, Li X, *et al.* Continuous passaging of a recombinant C-Strain virus in PK-15 cells selects culture-adapted variants that showed enhanced replication but failed to induce fever in rabbits. *J Microbiol Biotechnol* 2017; 27(9): 1701-10.
- 2 Blome S, Staubach C, Henke J, Carlson J, Beer M. Classical swine fever—an updated review. *Viruses* 2017; 9(4): pii: E86.
- 3 段辉. 山东省某猪场猪瘟病例的诊断及病毒分离鉴定(硕士学位论文). 山东农业大学(Duan Hui. Comprehensive diagnosis, separation and identification of Classical Swine Fever virus in a pig farm of Shandong province. Shandong Agricultural University), 2016.
- 4 Guo X, Sang S, Guo J, Jian A, Duan Q, Ji J, *et al.* A magnetoelastic biosensor based on E2 glycoprotein for wireless detection of Classical Swine Fever Virus E2 antibody. *Sci Rep* 2017; 7(1): 15626.
- 5 张瑞琴. 山西猪瘟抗体水平调查及野毒株E2遗传变异多样性分析(硕士学位论文). 吉林大学(Zhang Ruiqin. Survey of the average of CSF antibody in Shanxi and diversity of the E2 wild strain genetic variation. Ji Lin University), 2014.
- 6 马梓承, 古金元, 彭涛, 王玉超, 刘照虎, 孟凡亮, 等. 一例高致死性急性猪丹毒病例的综合诊断与防治. *中国动物检疫* (Ma Zicheng, Gu Jinyuan, Peng Tao, Wang Yuchao, Liu Zhaohu, Meng Fanliang, *et al.* Comprehensive diagnosis and control of a case of High Fatal Acute Swine Erysipelas. *China Animal Health Inspection*) 2018; 35(4): 96-100.

- 7 王清华, 任炜杰, 包静月, 戈胜强, 李金明, 李林, 等. 我国首例非洲猪瘟的确诊. 中国动物检疫(Wangle Qinghua, Ren Weijie, Bao Jingyue, Ge Shengqiang, Li Jingming, Li Lin, *et al.* The first outbreak of African Swine Fever was confirmed in China. *China Animal Health Inspection* 2018; 35(9): 1-4.
- 8 林祥梅, 韩雪清, 王景林. 外来动物疫病. 北京: 科学出版社, 2014, 258-69.
- 9 Vlasova A, Grebennikova T, Zaberezhny A, Greiser-Wilke I, Floegel-Niesmann G, Kurinnov V, *et al.* Molecular epidemiology of Classical Swine Fever in the russian federation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50(8): 363-7.
- 10 林荣泉. 非洲猪瘟与猪瘟的鉴定及防控技术. 肉类工业(Lin Rongquan. The prevention and control technology of the African Swine Fever virus and the Classical Swine Fever virus Identification. *Meat Industry*) 2001(3): 25-8.
- 11 王琴. 猪瘟病毒流行病学、病原致病特性及猪瘟综合防制研究. 中国农业科技导报(Wang Qing. Epidemiology, characterization of pathogenicity of Classical Swine Fever virus and control strategies of Classical Swine Fever. *Journal of Agricultural Science and Technology*) 2006; 8(5): 13-8.
- 12 Hu D, Lü L, Gu J, Chen T, Xiao Y, Liu S. Genetic diversity and positive selection analysis of Classical Swine Fever virus envelope protein gene E2 in eastchina under C-Strain vaccination. *Front Microbiol* 2016; 7: 85.