

云南省部分猪场猪圆环病毒 2 型病原学调查

彭洁 杨云* 刘燕 王荣琼 张自芳

云南农业职业技术学院,昆明 650212

摘要 为了解云南近 3 年来猪圆环病毒病的流行状况,以便更好地控制该病的发生,2013-2015 年在云南省部分发病猪场共收集 387 份猪组织样品,应用 PCR 方法进行 PCV2 抗原检测。结果显示,送检猪组织样品中抗原阳性总数为 91 份,总阳性率为 22.64%;2013、2014 和 2015 年送检样品的阳性率分别为 17.65%、28.67% 和 21.59%,参与的混合感染类型越发复杂。

关键词 猪;圆环病毒病;病原学;阳性率;隐性感染;混合感染

1991 年加拿大首次报道猪圆环病毒病(PMWS, Postweaning multisystemic wasting syndrome)以来,世界部分国家均有该病发生和流行的报道,已呈现全球流行的趋势。在我国,郎洪武等^[1]采用酶联免疫吸附试验对国内 7 个省(市)22 个猪群的 559 份血清进行检测,其中包括断奶仔猪、后备母猪、育肥猪及经产母猪,结果显示不同类型猪群样品 PCV-2 (Porcine circovirus type 2) 抗体总阳性率为 42.9%,证实我国猪群中存在 PCV-2 感染。据近年来国内对 PCV-2 流行病学调查显示 PCV-2 在我国猪场的存在相当普遍,由 PCV-2 感染所引起的猪相关疾病在我国的流行总体呈上升趋势^[2-6]。猪群感染 PCV-2 后,机体免疫系统受到损害,使机体免疫抵抗力下降,造成其他病原的继发或并发感染,死亡率上升,造成极大的经济损失。在 2008 年第 20 届国际猪病大会上,学者将其列为当前危害养猪业发展的重要疫病之一,并已引起各国养殖业的高度重视。PCV-2 的广泛流行给各国养殖业的发展造成了严重威胁,是继猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)之后又一个病毒性传染病,给世界各国养殖业带来了巨大的经济损失。猪圆环病毒病的临床症状一般不明显,且常容易与其

他疾病混淆,如蓝耳病、猪瘟等,因此常借助于实验室诊断方法来确诊。本试验采用 PCR 方法对云南省部分猪场开展 PCV-2 的检测,以了解云南 PCV-2 的感染情况,为 PCV-2 的防治提供依据。

1 材料与方法

1)病料。送检病料来源于云南省部分猪场的 387 份病猪组织病料。取样后将样品置于 -80 °C 冻存。

2)引物的设计和合成。设计引物 F:5-TAG-GTTAGGGCTGTGGCCTT-3, R:5-CCGCACCTTCG-GATATACTG-3, 预计条带大小为 264 bp。引物由大连宝生物工程有限公司合成。合成后将其溶解于灭菌超纯水中,引物浓度为 20 pmol/mL,保存于 -20 °C 环境中。

3)组织病料的处理及病毒核酸提取。取与疾病相关的组织器官,在无菌研钵中剪碎,加石英砂研磨。加无菌 PBS 混匀,制成悬液,-20 °C 冻融 3 次。转入离心管中 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为病毒核酸提取的原料。病毒提取使用试剂盒 MiniBEST Viral DNA Extraction Kit Ver.4.0,购自大连宝生物工程有限公司,操作参照试剂盒说明进行。

收稿日期:2016-11-24

基金项目:云南省教育厅科学研究基金项目(2016ZDX181);云南省教育厅科学研究基金项目(YNAVC201303)

* 通讯作者

彭洁,女,1981 年生,硕士,讲师,研究方向:动物传染病防治。

①准备: RinseA 中加 12.5 mL 100%乙醇, RinseB 中加入 31.5 mL 100%乙醇, 混合均匀; 异丙醇(1%冰乙酸): 99 mL 异丙醇中加入 1 mL 冰乙酸, 混合均匀, 室温密闭保存。

②提取: 病毒核酸 200 μ L 样品加入 1.5 mL 离心管中; 加 200 μ L 的 SoLutionA, 剧烈振荡混匀, 室温放置 5 min; 加 75 μ L 的 SoLutionB, 混合均匀, 12 000 r/min 离心 5 min; 将上清液转移到新的 CoLLetctionTube(2 mL, 试剂盒中提供)中, 加 250 μ L 异丙醇(1%冰乙酸), 上下颠倒混匀; 将试剂盒中的 SpinCoLumn 置于另一新的 CoLLetctionTube(2 mL, 试剂盒中提供); 将步骤 4 的上清液移至 SpinCoLumn 中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃滤液; 将 500 μ L 的 RinseA 加入 SpinCoLumn 中, 室温静置 1 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃滤液; 将 800 μ L 的 RinseB 加入 SpinCoLumn 中, 室温静置 1 min, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃滤液; 再次 12 000 r/min 离心 1 min; 将 SpinCoLumn 置于新的 1.5 mL 离心管上, 在 SpinCoLumn 膜的正中央处加 50 μ L 纯化水(RNaseFree)或 ELutionBuffer, 室温静置 1 min; 12 000 r/min 离心 1 min 洗脱病毒 DNA, 作为 PCR 反应的模板。

4)PCR。试剂盒 Premix Taq Version 2.0 进行, 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 操作参照试剂盒说明进行。

①PCR 反应体系: 总体积为 45 μ L, 组成如下: 无核酸酶水 18 μ L, 10 mol/L F 引物 1 μ L, 10 mol/L R 引物 1 μ L, Premix Taq 25 μ L, 模板 5 μ L。

②PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 终延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min, 循环次数 35 次, 反应完后保存于 4 $^{\circ}$ C。

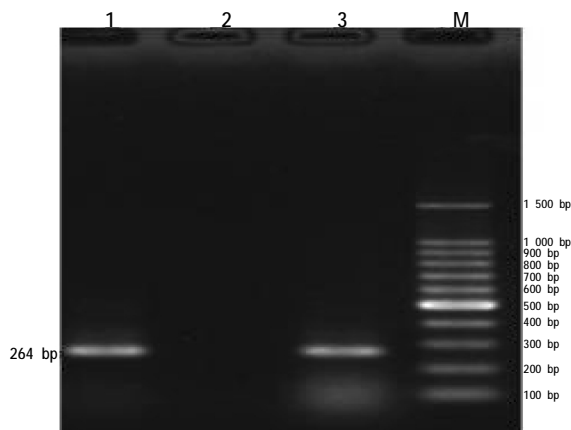
待反应结束, 取产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳, 紫外灯下观察扩增片段。统计云南部分猪场 PCV-2 感染率。

2 结果

1)临床症状及病毒变化。对云南省部分猪场进行实地调查, 了解各养猪场 PCV-2 的流行情况, 对发生疫情的养猪场询问、检查发病猪群的临床症状, 并进行病理剖检。大多数猪在断奶后 1 周左右,

出现渐进性消瘦, 生长迟缓, 贫血和黄疸等症状, 部分猪只后肢、腹部、胸部或耳等部位皮肤表面有圆形或不规则形、隆起、周围呈红色或紫色、中央黑色的病灶, 常融合形成条带和斑块。有的猪出现呼吸困难。剖检病死猪病理变化为全身淋巴结肿大, 肺脏水肿, 部分猪只心脏冠状沟见胶冻样物质, 有的还出现脾脏肿大、坏死, 有的肾脏肿大, 表面见白斑和出血点等病理变化。部分猪场母猪出现流产、产死胎、木乃伊胎, 部分新生仔猪的头和四肢发生颤抖, 安静时表现不明显, 但运动或吃奶时严重, 并常因饥饿而死。结合相应临床症状和病理学观察, 由此可初步判断大部分猪场感染 PCV2。

2)PCR 检测结果。用 PCR 方法对疑为感染的 387 份待检样品进行 PCV-2 检测。出现 264 bp 条带的为 PCV-2 阳性样品, 结果扩增出 91 份 264 bp 的特异条带, 如图 1 所示。



1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3: 样品阳性; M: DNA 分子质量标准

图 1 部分 PCV-2 感染样品的 PCR 扩增结果

2013 年检测病料 68 份, 结果阳性率为 17.65%, 2014 年检测病料 143 份, 结果阳性率为 28.67%, 2015 年检测病料 176 份, 结果阳性率为 21.59%。

2013-2015 年间所检测病料中 PCV-2 参与混合感染的情况如下: 2013 年所检测的病样中有 5 份 PRRSV+PCV-2 混合感染, 1 份 PRRSV+PCV-2+CSFV 混合感染, PCV-2 参与混合感染率为 75%; 2014 年所检测的病样中有 15 份 PRRSV+PCV-2 混合感染, 4 份 PRRSV+PCV-2+CSFV 混合感染, PCV-2 参与混合感染率为 67.9%; 2015 年所检测的病样中有 13 份 PRRSV+PCV-2 混合感染, 7 份 PCV-2+CSFV 混合感染, 1 份 PRRSV+PCV-2+CSFV 混合感染, PCV-2 参与混合感染率为 45.7%。

3 讨 论

2013-2015 年间对 387 份样品进行 PCV-2 的抗原检测,总阳性率为 22.64%。与曹胜波等^[1]报道的 PCV2 阳性率为 27.9%,梁鹏帅^[5]报道 PCV2 阳性率 15.83%~43.33%、平均为 30.61%,张振仓^[8]报道的在不同县和不同猪场 PCV-2 的检出率在 25.00%~93.33%、平均为 52.81%相近但也有不同。经笔者实地调查发现,云南省内 PCV-2 的感染普遍,但从阳性检出率结果看,据有明显的地区差异,这可能是国内所报道的阳性检出率不同的原因之一,导致这一现象的主要原因是引种的检测和饲养管理的差距。

2013、2014 和 2015 年送检样品的阳性率分别为 17.65%、28.67% 和 21.59%,2014 年阳性率升高 11.02%。2013 年检测样品为 68 份,2014 年为 143 份,由于 PCV-2 感染猪的临床症状多样性,多呈隐性感染,所以笔者加大检测力度,这有可能导致阳性率升高,但主要的原因还是圆环病毒病流行越来越广泛,云南省内猪场 PCV-2 的阳性率总体呈现上升趋势。2015 年检测样品为 176 份,阳性率相对 2014 年下降 7.08 个点,说明猪场采取了相应的措施防控 PCV-2 的感染,例如接种疫苗、加强饲养管理等。但效果仍不理想,从而致使患猪免疫力降低,给其他病原入侵提供了机会,混合感染情况更多,症状更复杂,大大提高了猪的死亡率。因此,各猪场还需结合各自具体情况制定更加全面的防控措施。

2013 年 PCV-2 参与的混合感染类型有 PRRSV+PCV-2、PRRSV+PCV-2+CSFV 两种,PCV-2 参与混合感染率为 75%;2014 年 PCV-2 参与的混合感染类型有 PRRSV+PCV-2、PRRSV+PCV-2+CSFV 两种,PCV-2 参与混合感染率为 67.9%;2015 年 PCV-2 参与的混合感染类型有 PRRSV+PCV-2、

PRRSV+PCV-2+CSFV、PCV-2+CSFV、PRRSV+PCV-2+CSFV 四种,PCV-2 参与混合感染率为 45.7%。3 年间 PCV-2 参与混合感染比率有所下降,说明采取的防控措施虽效果不明显,但仍有效。但混合感染的类型越来越复杂,这又给猪病的防控带来困难。

PCV-2 流行引起的主要原因有 4 个,一是病毒抵抗力强,一般消毒剂无效。此病毒对醇、氯、碘、苯酚等有机消毒剂具有抵抗力,但能够被碱性消毒剂(氢氧化钠)、氧化剂(次氯酸钠)和季铵盐化合物灭活。二是 PCV-2 基因变异,PCV-2 不断发生遗传变异,其不同基因型之间出现基因重组。不同国家和地区分离的 PCV-2 的基因型存在一定差异。三是传播途径多,可水平传播和垂直传播。四是养殖场对 PCV-2 的免疫抑制危害认识不够。未来几年 PCV-2 依旧是猪场防控疾病的重点。

参 考 文 献

- [1] 郎洪武,张广川,吴发权,等.断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测[J].中国兽医科技,2000,30(3):3-5.
- [2] 王忠田,杨汉春,郭鑫.规模化猪场猪圆环病毒 2 型感染的流行病学调查[J].中国兽医杂志,2002,38(10):3-6.
- [3] 王泽华,王锡祯.猪圆环病毒病的流行病学调查及其防治[J].中国动物保健,2008(2):62-65.
- [4] 万青山.四川部分地区猪圆环病毒 2 型流行病学调查研究[D].成都:四川农业大学,2013.
- [5] 梁鹏帅.广东省规模化猪场猪圆环病毒感染情况及分子特征研究[D].郑州:河南农业大学,2013.
- [6] 赵津,张小敏,周斌,等.2008-2010 年华东部分地区猪圆环病毒 2 型感染血清学调查 [J]. 中国动物传染病学报,2010,18(6):49-52.
- [7] 曹胜波,陈焕春,肖少波,等.猪环状病毒 2 型的 PCR 检测方法的建立及应用[J].华中农业大学学报,2001,20(1):53-56.
- [8] 张振仓.陕西关中 11 个猪场 PCV-2 PCR 检测及猪瘟免疫抗体水平评价[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.