

河南省猪圆环病毒 2 型感染的病原流行病学研究

薛云¹, 赵战勤^{2*}, 王清义², 龙塔², 庞有志², 董发明²

(1. 河南科技大学 医学技术与工程学院 微生物检验实验室, 河南 洛阳 471003;

2. 河南科技大学 动物科技学院 动物病原微生物学实验室, 河南 洛阳 471003)

摘要: 采用 PCR 方法, 从来自河南省不同地区的 822 份猪肺脏等病料组织中共检出 514 份猪圆环病毒 2 型(PCV2)阳性样品, 总检出率为 62.6%。2011 年 3—12 月, PCV2 在河南省的检出率介于 41.6%~85.3%。其中, 9—12 月的检出率显著高于 3—8 月($P<0.05$)。在河南省不同地区的猪群中, PCV2 的检出率介于 44.6%~87.9%; 其中, 驻马店市、漯河市、信阳市 3 个地区 PCV2 的检出率显著高于全省其他地区($P<0.05$)。PCR 检测过程中还发现, PCV2 的检出率与猪群类别(日龄)有一定关系, 其检出率随猪年龄的增长而升高($P<0.05$)。在 211 份 PCV2 阳性样品中, 有 144 份(占 69.2%)能分离出不同的共感染菌。最常见的共感染菌是链球菌(52.1%, 75/144)、副猪嗜血杆菌(42.4%, 61/144)、大肠杆菌(39.6%, 57/144)和多杀性巴氏杆菌(20.1%, 29/144)。研究表明, PCV2 在河南省 10 多个地区的猪群中广泛存在, 且与病原菌的共感染情况非常严重。

关键词: 猪圆环病毒 2 型; PCR; 流行病学; 协同感染

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)08-0159-04

Prevalence of Porcine Circovirus Type 2 in Pig Farms in Henan Province

XUE Yun¹, ZHAO Zhan-qin^{2*}, WANG Qing-yi², LONG Ta², PANG You-zhi², DONG Fa-ming²

(1. Lab of Medical Engineering, College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Lab of Veterinary Microbiology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Using the method of PCR, a total of 514 porcine circovirus type 2 (PCV2) positive samples were detected from 822 lesion lungs of diseased pigs collected from different regions in Henan province, giving the total detection rate of 62.6%. The detection ratios in the samples that were collected from different regions and at the different time points (month) ranged from 44.6% to 87.9% and 41.6% to 85.3%, respectively. The results showed that the detection rates varied significantly among the different regions ($P<0.05$) and that there was a significant increase in the detection rate of PCV2 in September to December compared to that in March to August of the year 2011. This suggests that regional and climatic factors may be important in the aetiology of PCV2 infections. Most importantly, the work demonstrated a clear association of pulmonary PCV2 infection with pig age. The isolation ratios of identified co-infection bacterial species were 52.1% (75 strains), 42.4% (61 strains), 39.6% (57 strains) and 20.1% (29 strains) for *Streptococcus*, *Haemophilus parasuis*, *Escherichia coli*, and *Pasterella multocida*, respectively. The results suggest that PCV2 infection is highly prevalent in pig farms in Henan province and is often accompanied by co-infection with other bacteria.

Key words: porcine circovirus type 2; PCR; epidemiology; co-infection

收稿日期: 2012-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001051); 河南省自然科学基金项目(0311032500)

作者简介: 薛云(1982-), 女, 湖北荆州人, 讲师, 博士, 主要从事细菌分子生物学研究。E-mail: xueyun6688@126.com

* 通讯作者: 赵战勤(1980-), 男, 河南兰考人, 副教授, 博士, 主要从事家畜传染病及疫苗研究。E-mail: zhaozhanqin@126.com

猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)为圆环病毒科圆环病毒属成员,该病毒粒子为 20 面体对称结构,直径约 17 nm,在 CsCl 中的浮密度为 1.37 g/cm³,含有单股负链环状 DNA,无囊膜,不具血凝活性。PCV 有 2 种血清型,即 PCV1 和 PCV2。PCV1 基因组全长约 1.7 kb,PCV2 为 1.768 kb,两者的核苷酸序列同源性低于 80%,而同一血清型中各毒株之间的核苷酸同源性在 96% 以上。已知 PCV1 对猪的致病性较低,但在正常猪群及猪源细胞中的污染率却极高^[1]。PCV2 对猪的危害极大,是引起猪断奶后多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)和母猪繁殖障碍、断奶和育肥猪的呼吸道疾病,猪皮炎和肾病综合征(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)以及猪的先天性震颤(congenital tremors)的主要病原。PCV2 感染的临诊表现多种多样,主要特征为体质下降、消瘦、贫血、黄疸、发育不良、腹泻、呼吸困难、母猪繁殖障碍、内脏器官及皮肤的广泛病变,特别是肾、脾脏及全身淋巴结的高度肿大、出血和坏死。该病还可导致猪群产生严重的免疫抑制,从而容易导致继发或并发其他传染病^[2]。

血清学和病原学调查结果表明,PCV2 在世界范围内流行。在德国和加拿大,猪群中 PCV2 的抗体阳性率分别为 95% 和 55%;在英国和爱尔兰,猪群中 PCV2 抗体阳性率分别为 86% 和 92%^[2]。我国于 2001 年首次报道,目前,该病在我国猪群中已广泛流行,给养猪业造成了巨大的经济损失^[3]。河南是畜牧大省,生猪和猪肉产业在畜牧业中占有重要地位。然而近年来,猪圆环病毒病、猪瘟、猪高致病性蓝耳病、副猪嗜血杆菌病等猪重大疫病的暴发与流行给养猪业带来了空前巨大的损失,严重制约了养猪业的持续健康发展。为此,对来自河南省的猪病料样本进行了检测,系统分析 PCV2 在猪群中的感染及流行规律,旨在为开展猪圆环病毒病的防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与材料

参考菌株 C 群马链球菌兽疫亚种 C55156 株和猪霍乱沙门氏菌 C78-1 株购自中国兽药监察所;参考菌株猪链球菌 SC-1 株、T+Pm HN-13 株、HPS MD0322 株和大肠杆菌 ED1 株由河南科技大学动

物科技学院动物病原微生物学实验室保存^[4-7]。胰蛋白大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)培养基购自美国 BD 公司;犊牛血清购自杭州四季青公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD, 又称 V 因子)购自美国 Sigma 公司。DL Marker 2000、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、基因组提取试剂盒等购自上海 Sangon 公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 病料采集

882 份病料来自河南省洛阳市(326 份)、驻马店市(107 份)、南阳市(81 份)、漯河市(74 份)、三门峡市(56 份)、信阳市(45 份)、焦作市(36 份)、濮阳市(32 份)和其他地区(65 份)不同日龄的猪群。发病猪多表现为发热、咳嗽、打喷嚏、呼吸困难、消瘦、生长缓慢等临床症状。采集肺脏、脑、心血、肝脏、脾脏、淋巴结等组织作为病料样本。

1.3 病料中 PCV2 的 PCR 检测

根据参考文献[8]以及 GenBank 已公布的 ORF2 序列(AF027217)设计 1 对特异性引物,上、下游引物分别为 P1:5'-GGTTTGTAGCCTCAGC-CAAAGC-3'和 P2:5'-GCACCTTCGGATATACT-GTCAAGG-3'。预期的扩增片段为 416 bp。按试剂盒说明书提取病料组织的基因组 DNA 为 PCR 模板。PCR 反应体系(25 μ L):10 \times Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 2 μ L, 2 μ mol/L 的 dNTPs 1 μ L, 10 μ g/mL 的上、下游引物各 1 μ L, 2 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 无菌水 16 μ L, 模板 1 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 病料中共感染菌的分离鉴定

将采集的病料划线接种于含犊牛血清(5%)和 NAD(10 μ g/mL)的 TSA 平皿,37 $^{\circ}$ C 下培养 18~48 h 后观察,挑取各种优势菌落进行传代纯化、革兰氏染色镜检和 PCR 鉴定^[9]。

1.5 分离菌株的 PCR 鉴定

1.5.1 PCR 引物 对疑为副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasterella multocida*, Pm)、支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)和沙门氏菌(*Salmonella*)的分离菌株分别进行 PCR 鉴定。鉴定细菌所用 PCR 引物^[9]详见表 1。

表 1 试验所用 PCR 引物

引物用途	引物编号	引物序列(5'-3')	PCR 产物/bp
鉴定 Pm	Pm-1	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	457
	Pm-2	GCTGTAAACGAACCTGCCAC	
鉴定 HPS	HPS-1	GGCTTCGTCACCCCTCTGT	822
	HPS-2	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT	
鉴定 <i>E. coli</i>	Ec-1	ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC	264
	Ec-2	GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA	
鉴定 Bb	Bb-1	TGGCGCCTGCCCTATC	237
	Bb-2	AGGCTCCCAAGAGAGAAA	
鉴定沙门氏菌	SaI-1	CAGGATACCTATAGTGCTGC	580
	SaI-2	CGCACCGTCAAAGGAACCGT	

1.5.2 PCR 鉴定 按试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA 为 PCR 模板。PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 2 μ L, 2 μ mol/L 的 dNTPs 1 μ L, 10 μ g/mL 的上、下游引物各 1 μ L, 2 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, 无菌水 16 μ L, 模板 1 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

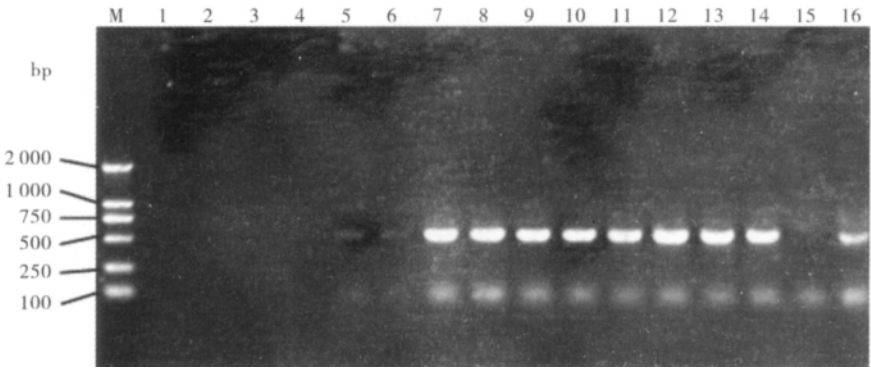
2.1 PCV2 的 PCR 检测结果

通过国外学者已经建立的 PCR 检测方法对样

本进行 PCR 检测,结果阳性样品均能扩增到大小为 416 bp 的 DNA 条带(图 1)。随机选择其中的 1 份阳性 PCR 产物进行回收测序,发现与 GenBank 上发布的 PCV2 ORF2 基因序列(AF027217)的同源性为 99%。本研究从来自河南省不同地区的 822 份发病猪肺脏和其他病料组织中共检出 514 份 PCV2 阳性样品,总检出率为 62.6%。

2.2 PCV2 的地区分布

对超过 30 份样品以上地区的统计结果表明(表 2),各地区的 PCV2 阳性率介于 44.6%~87.9%。驻马店市、漯河市、信阳市 PCV2 的检出率显著高于其他地区($P<0.05$),其中,驻马店市与三门峡市、濮阳市和其他地区的差异极显著($P<0.01$)。



M. DL Marker 2000; 1—4,15. PCV2 PCR 阴性结果; 5—14,16. PCV2 PCR 阳性结果(416 bp)

图 1 PCV2 的 PCR 检测结果

表 2 河南省不同地区猪群 PCV2 的 PCR 检测结果

来源	样本数	阳性数	阳性率/%
洛阳市	326	190	58.3Aa
驻马店市	107	94	87.9Bc
南阳市	81	47	58.0Aa
漯河市	74	57	77.0Ab
三门峡市	56	25	44.6Aa
信阳市	45	34	75.6Ab
焦作市	36	22	61.1Aa
濮阳市	32	15	46.9Aa
其他地市	65	30	46.2Aa
总计	822	514	62.6Aa

注:不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

2.3 PCV2 的时间分布

2011 年 3—12 月,PCV2 在河南省的检出率介于 41.6%~85.3%。检验结果显示(表 3),3—8 月 PCV2 在河南省的检出率无显著差异,但是 9—12 月的检出率显著高于 3—8 月($P<0.05$),且 10—12 月检出率与 3—8 月差异极显著($P<0.01$)。

2.4 PCV2 的在不同类型猪群的分布

PCR 检测过程中还发现(表 4),PCV2 的检出率与猪群类别(日龄)有一定关系,其检出率随猪的年龄增长而升高($P<0.05$)。

表 3 2011 年不同月份河南省猪群 PCV2 的 PCR 检测结果

月份	样本数/份	阳性数/份	阳性率/%
3	41	18	43.9Aa
4	54	25	46.3Aa
5	89	37	41.6Aa
6	57	29	50.9Aa
7	68	34	50.0Aa
8	112	60	53.6Aa
9	130	87	66.9Ab
10	82	67	81.7Bc
11	102	87	85.3Bc
12	87	70	80.5Bc
总计	822	514	62.6Aa

表 4 河南省不同类型猪群 PCV2 的 PCR 检测结果

猪群类别	样本数	阳性数	阳性率/%
哺乳仔猪	88	26	29.5Aa
断奶仔猪	492	293	59.6Ab
育肥猪	191	153	80.1Bc
总计	771	468	60.7Ab

2.5 PCV2 共感染菌的分离鉴定及分析结果

对部分 PCV2 阳性的样品进行了细菌的分离鉴定,结果表明,在检出 PCV2 的 211 份肺脏病料中,有 67 份没有发现其他常见的致病菌,占 31.8%;有 144 份在检出 PCV2 的同时分离出各种不同的共感染菌,占 69.2%。最常见的共感染菌是链球菌,占所有共感染病料的 52.1%(75/144),其次是 HPS,占 42.4%(61/144),大肠杆菌占 39.6%(57/144),Pm 占 20.1%(29/144),沙门氏菌占 6.3%(9/144)。在 144 份共感染病料中,有 53 份同时分离出 3 种或 3 种以上的共感染菌,占共感染病料的 36.8%(53/144)。这些数据说明临床上感染 PCV2 的猪群中,其呼吸道共感染病原菌的种类较多且极其复杂。

3 讨论

从 PCR 检测结果可以看出,PCV2 在河南省 10 多个地区的猪群中广泛存在,总检出率为 62.6%。但病毒的组织含量高低、组织分布不同以及 PCR 的敏感性等因素均可以降低 PCV2 的检出率,PCV2 实际的感染率可能高于这个数字,这也进一步说明了猪群中 PCV2 感染的广泛性。各地区的检出率介于 44.6%~87.9%,其中驻马店市、漯河市、信阳市三地区的检出率显著高于其他地区,其原因还有待进一步研究。但笔者认为,这可能是近年来该地区集约化养猪业的发展及猪的引种、调动频繁的结果。

本研究还发现,2011 年 9—12 月的检出率显著高于 3—8 月($P<0.05$),这表明 PCV2 的感染可能具有一定的季节性。检测过程中还发现,PCV2 的检出率与猪群类别(日龄)有一定关系,其检出率随猪年龄的增长而升高($P<0.05$),与报道的 PCV2 病毒感染随猪年龄的增长而升高的结论一致^[10]。

PCV2 感染可导致猪群产生严重的免疫抑制,从而容易导致继发或并发其他传染病。这样的共感染作用可提高呼吸道疾病的发病率,并增加疾病的严重程度^[2]。对 PCV2 阳性的部分样品进行了细菌的分离鉴定,结果表明,在检出 PCV2 的 211 份肺脏病料中,有 144 份在检出 PCV2 的同时还分离出各种不同的共感染菌,占 69.2%。最常见的共感染菌是链球菌(52.1%)、HPS(42.4%)、大肠杆菌(39.6%)和 Pm(20.1%)。而分离到 3 种或 3 种以上共感染菌的比例达到 36.8%(53/144)。这些数据说明,临床上感染 PCV2 的猪群中,其呼吸道共感染病原菌的种类较多且极其复杂。

参考文献:

- [1] 游文明. 猪 2 型圆环病毒福建株的分离与鉴定[J]. 现代农业科技, 2011(22): 320.
- [2] 张秀珊, 曹洪战, 张丽青, 等. 河北地区猪圆环病二型 ORF2 基因片断的克隆与原核表达[M]. 华北农学报, 2008, 23(4): 51-54.
- [3] Allan G M, John A E. Porcine circovirus: a review[J]. Vet Diagn Invest, 2000, 12: 3-14.
- [4] 赵战勤, 胡睿铭, 吴斌, 等. 猪源链球菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(4): 376-381.
- [5] 唐先春, 吴斌, 索绪峰, 等. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(6): 590-595.
- [6] 刘国平, 吴斌, 刘梦元, 等. 致仔猪水肿病大肠杆菌的分离、鉴定及生物学特性[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(1): 31-33.
- [7] Cai X, Chen H, Blackall P J, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China[J]. Veterinary Microbiology, 2005, 111(3): 231-236.
- [8] Mankertz A, Domingo M, Folch J M, et al. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France[J]. Virus Research, 2000, 66(1): 65-77.
- [9] 赵战勤, 裴洁, 薛云, 等. 猪源支气管败血波氏杆菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(12): 4209-4217.
- [10] 郎洪武, 程君生, 张广川, 等. 猪断奶后多系统衰弱综合征[J]. 中国兽医杂志, 2000, 26(1): 39-42.