

## 2015年—2017年广西规模化猪场主要 病毒性疫病流行调查

贺会利, 李军\*, 潘艳, 胡帅, 钟舒红, 冯世文, 柳锋, 谢永平, 陈泽祥

(广西兽医研究所/广西兽医生物技术重点实验室, 广西南宁 530001)

**摘要:**为了解广西地区近3年规模化猪场主要病毒性传染病的流行情况,应用PCR及RT-PCR方法对2015年—2017年广西的1648份疑似猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV-2)、猪圆环病毒3型(PCV-3)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和猪流行性腹泻病毒(PEDV)感染的病料进行病原学检测。结果显示,CSFV、PRRSV、PRV、PCV-2、PCV-3、TGEV和PEDV的阳性率分别是2.06%(13/632)、14.43%(192/1331)、12.10%(88/727)、14.32%(132/922)、53.85%(42/78)、10.87%(20/184)和32.00%(72/225)。PRV、TGEV和PEDV的感染率呈逐年上升趋势,PCV-2的感染率呈逐年递减趋势。二重感染以PCV-2和其他病毒感染为主,其中PRRSV和PCV-2的二重感染率最高,平均感染率为2.93%。CSFV、PRRSV、PRV、PCV-2、PEDV的感染率在冬季比较高,分别为3.75%、23.86%、19.02%、27.73%和57.78%。检测结果表明,PRRSV和PCV-2是目前对广西规模化猪场危害较为严重的主要病毒性疫病。PCV-3作为一种新发现病毒,引起母猪皮炎肾病综合征与繁殖障碍和仔猪腹泻,对养猪业造成了一定的威胁。规模化猪场流行的腹泻性病毒主要是PEDV和TGEV。

**关键词:**规模化猪场;病毒性疫病;聚合酶链反应;反转录-聚合酶链反应;调查

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.06.022

中图分类号:S852.65

文献标识码:B

文章编号:1007-5038(2019)06-0116-06

广西作为全国养猪大省区,养猪业发展迅速。2017年生猪出栏3355.1万头,猪肉产量255.0万t。随着规模化、集约化程度的提高,大量的种猪引进、生猪流通交易的频繁、部分规模化猪场对疫病的防控不到位,导致猪病的发生和流行情况也变得更为复杂,给防控工作带来了新的困难和挑战,不仅制约着养猪业的健康可持续发展,也严重威胁着消费者的身体健康<sup>[1-2]</sup>。目前猪场主要病毒性疫病病原为猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV-2)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)和猪流行性腹泻病毒(PEDV)。这些病原常以单独或混合感染的方式感染猪,引起猪的腹泻、繁殖障碍、呼吸困难等症状,导致猪的死亡或生长缓慢,饲料报酬降低,给养猪业造成了严重的经济损失。为了解近3年广西规模化猪场主要病毒性疫病的流行动态,制定科学的防控措施,降低该类疫病给规模化猪场带来的风险,对2015年—2017年广西部分规模化猪

场送检病料进行了CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV和PEDV检测,为广西猪传染病的综合防控措施提供流行病学数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 病毒DNA/RNA提取试剂盒、HiFiScript cDNA Synthesis Kit、2×ES Taq Master Mix、DNA Marker DL 1500等购自北京康为世纪生物科技有限公司;琼脂糖凝胶购自西班牙GENE公司;Life PCR仪购自Life Technologies公司;凝胶成像系统购自Bio-rad公司。

1.1.2 临床病料样品 1648份病料采集自2015年—2017年间广西南宁、玉林、桂林、柳州、河池、贺州、贵港、来宾、北海和钦州10个市规模化猪场发病猪,病料包括脾脏、淋巴结、肺、脑以及哺乳仔猪小肠等样品,由广西兽医生物技术重点实验室在-20℃保存。

收稿日期:2018-07-04

基金项目:广西科技重大专项(桂科AA17204057;桂科重14121003-3-1)

作者简介:贺会利(1987-),女,河南卫辉人,助理研究员,硕士,主要从事动物疫病防治与病原分子生物学研究。

\*通讯作者

## 1.2 方法

1.2.1 组织样品 RNA/DNA 提取 无菌采集适量猪的脾脏、淋巴结、肺、脑以及哺乳仔猪小肠等病变组织样品研磨,加入 1.5 mL 的灭菌生理盐水混匀,收集于 2 mL 的 EP 管中,于 -40℃ 反复冻融 3 次,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液于另一灭菌的 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 15 min,取上清,按病毒 DNA/RNA 提取试剂盒的说明书操作提取组织样品

DNA/RNA,提取的病毒核酸置 -80℃ 保存备用。

1.2.2 引物合成 CSFV 的 RT-PCR 检测按文献[3]进行;PRRSV 的 RT-PCR 检测按文献[4]进行;PCV-2 的 PCR 检测按[5]进行;PCV-3 的 PCR 检测按文献[6]进行;PRV 的 PCR 检测按文献[7]进行;TGEV 和 PEDV 的 RT-PCR 检测按文献[8]进行。引物由广州华大基因科技有限公司合成(表 1)。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

病毒 Virusts	引物序列(5'→3') Primers sequences	片段长度/bp Fragment length	退火温度/℃ Annealing temperature
CSFV	F1:GCT CCT GGT TGG TAA CCT CGG R1:TGA TGC TGT CAC ACA GGT GAA	508	57
PRRSV	F2:ATG GCC AGC CAG TCA ATC A R2:TCG CCC TAA TTG AAT AGG TG	433	57
PCV-2	F3 CCGCGGGCTGGCTGAACTT R3:ACCCCGCC ACCGCTACC	1154	55
PCV-3	F4:TTACTTAGAGAACGGACTTGTAACG R4:AAATGAGACACAGAGCTATATTACG	649	55
PRV	F5:CAGGAGGACGAGCTGGGCT R5:GTCCACGCCCGCTTGAAGCT	217	65
TGEV-N	F6:GAT GGC GAC CAG ATA GAA GT R6:GCA ATA GGG TTG CTT GTA CC	612	51
PEDV-N	F7:GAA ATA ACC AGG GTC GTG GA R7:GCT CAC GAA CAG CCA CAT TA	492	51

1.2.3 RNA 逆转录及 PCR 扩增 由于 CSFV、PRRSV、TGEV 和 PEDV 的遗传物质是 RNA,需要按照 HiFi-Script cDNA 第一链合成试剂盒说明书将 RNA 反转录为 cDNA。分别以 DNA/cDNA 为模板,以 CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV 和 PEDV 引物对 1 648 份病料进行单一 PCR 扩增。PCR 反应体系为:2×Es Taq MasterMix 13 μL,上游引物、下游引物各 1 μL(引物浓度 25 pmol/μL),DNA 模板 3 μL,ddH<sub>2</sub>O 7 μL,总反应体系 25 μL。瞬时离心混匀,PCR 反应程序为:95℃ 5 min;95℃ 1 min,退火 1 min(退火温度见表 1),72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 再延伸 10 min。扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,电压 5 V/cm,电泳时间约 30 min,以能分清扩增条带为止。

1.2.4 数据统计分析 用 Excel 软件对 2015 年—2017 年 CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV 和 PEDV 阳性率情况进行分析。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR/PCR 扩增结果

用 RT-PCR/PCR 的方法对 1 648 份病料样品和阳性对照样品进行检测。阳性样品的片段大小分别在 508、433、1154、649、217、612、492 bp,与预期

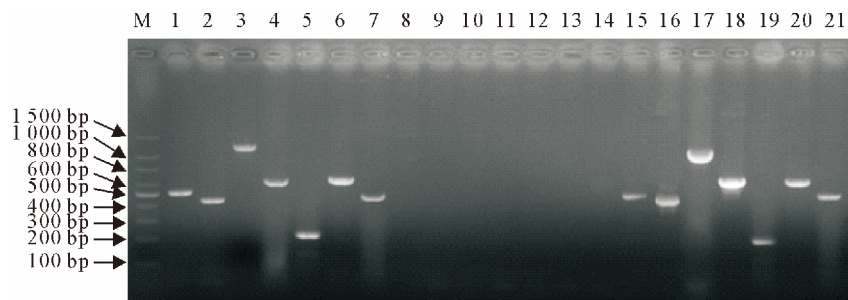
结果一致(图 1)。

### 2.2 2015—2017 年广西猪主要病毒性疫病病原检测结果

近 3 年采集的临床样品中,CSFV、PRRSV、PRV、PCV-2、PCV-3、TGEV 和 PEDV 的阳性率分别为 2.06%(13/632)、14.43%(192/1331)、12.10%(88/727)、14.32%(132/922)、53.85%(42/78)、10.87%(20/184)和 32.00%(72/225)。检测结果表明,PRRSV 和 PCV-2 感染率较高,其中 PRV、TGEV 和 PEDV 的感染率呈逐年上升趋势,PCV-2 的感染率呈逐年递减趋势。CSFV 的感染率较低,3 年平均感染率仅为 2.06%(13/632)。PCV-3 作为一种新发现病毒,2017 年感染率为 53.85%(42/78)。

### 2.3 2015 年—2017 年广西猪主要病毒性疫病混合感染结果

2015 年—2017 年单一感染以 PRRSV、PCV-2、PEDV 为主,感染率分别为 6.39%、6.29%和 28.44%。混合感染中主要以二重感染为主,二重感染以 PCV-2 和其他病毒感染为主,其中 PRRSV 和 PCV-2 的感染率最高,平均感染率为 2.93%,其次是 TGEV 和 PEDV 的混合感染,平均感染率达 2.71%。



M.DNA 标准 DL 1 500;1~7.CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV、PEDV 阳性对照;8~14.CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV、PEDV 阴性对照;15~21.CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV、PEDV 病料样品

M.DNA Marker DL 1 500;1-7.The positive controls of CSFV,PRRSV,PCV-2,PCV-3,PRV,TGEV,PEDV;8-14.The negative controls of CSFV,PRRSV,PCV-2,PCV-3,PRV,TGEV,PEDV;15-21.The positive samples of CSFV,PRRSV,PCV-2,PCV-3,PRV,TGEV,PEDV

图1 CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV 和 PEDV 的 PCR 产物电泳结果

Fig.1 PCR product electrophoregrams of CSFV,PRRSV,PCV-2,PCV-3,PRV,TGEV and PEDV

表2 2015年—2017年猪场主要病毒性疫病病原检测结果(%)

Table 2 The detecton results of main viruses in pig farms from 2015 to 2017

病毒 Viruses	2015	2016	2017	总计 Total
CSFV	1.43(3/210)	0.89(2/225)	4.57(9/197)	2.06(13/632)
PRRSV	19.60(97/495)	8.58(23/268)	9.15(52/568)	14.43(192/1331)
PRV	9.87(22/223)	10.99(20/182)	14.28(46/322)	12.10(88/727)
PCV-2	28.51(63/223)	14.29(23/161)	9.30(50/538)	14.32(132/922)
PCV-3	—	—	53.85(42/78)	53.85(42/78)
TGEV	2.22(2/90)	11.11(5/45)	26.53(13/49)	10.87(20/184)
PEDV	30.36(34/112)	32.73(18/55)	34.48(20/58)	32.00(72/225)

注：“—”表示没有检测。

Note: "—" Means no detection.

表3 2015年—2017年猪场主要病毒性疫病单一及混合感染情况(%)

Table 3 The single and mixed infections of main viruses in pig farms from 2015 to 2017

感染类型 Infections type	病毒 Viruses	2015	2016	2017	总计 total
单一感染 Single infection	CSFV	1.43(3/210)	0(0/225)	0.51(1/197)	0.63(4/632)
	PRRSV	8.89(44/495)	5.60(15/268)	4.58(26/568)	6.39(192/1331)
	PRV	3.59(8/223)	8.24(15/182)	5.59(18/322)	5.64(41/727)
	PCV-2	6.28(14/223)	11.80(19/161)	4.65(25/538)	6.29(132/922)
	PCV-3	—	—	43.59(34/78)	43.59(34/78)
	TGEV	0(0/90)	6.67(3/45)	12.24(6/49)	4.89(9/184)
	PEDV	25.89(29/112)	29.09(16/55)	32.76(19/58)	28.44(64/225)
双重感染 Double infection	CSFV+ PRRSV	0(0/210)	0.44(1/225)	0(0/197)	0.16(1/632)
	CSFV+ PRV	0(0/210)	0.44(1/225)	4.06(8/197)	1.42(9/632)
	PRRSV + PRV	1.41(7/495)	0.37(1/268)	0.88(5/568)	0.98(13/1331)
	PRRSV+ PCV-2	4.65(23/495)	1.12(3/268)	2.29(13/568)	2.93(39/1331)
	PRV + PCV-2	3.14(7/223)	1.65(3/182)	1.55(5/322)	2.06(15/727)
	PCV-2+ PCV-3	—	—	2.56(2/78)	2.56(2/78)
	TGEV+ PEDV	2.22(2/90)	4.44(2/45)	2.04(1/49)	2.71(5/184)

2.4 2015—2017年各季节广西规模化猪场主要病毒性疫病病原检测结果

2015年—2017年CSFV、PRRSV、PRV、PCV-2、PEDV的感染率在冬季比较高,分别为3.75%、23.86%、19.02%、27.73%、38.46%,CSFV、

PRRSV、PRV、PCV-2、PEDV的感染率在夏季、秋季较低。PCV-3的感染率在夏季较高(65.71%)。TGEV的感染率在春季较高(38.46%),夏季无感染情况。

表4 2015—2017年各季节猪场主要病毒性疫病感染情况(%)

Table 4 The infections of main viral pathogens in pig farms in different seasons from 2015 to 2017

季节 Season	CSFV	PRRSV	PRV	PCV-2	PCV-3	TGEV	PEDV
春季 Spring	2.65(3/113)	15.44(61/395)	15.70(19/121)	15.47(41/265)	50.0(8/16)	38.46(15/39)	31.91(15/47)
夏季 Summer	0.43(1/232)	11.30(46/407)	5.06(9/178)	14.14(42/297)	65.71(23/35)	0(0/46)	26.53(13/49)
秋季 Autumn	2.55(4/157)	8.30(22/265)	9.42(21/223)	6.64(16/241)	40.74(11/27)	3.28(2/61)	24.32(18/74)
冬季 Winter	3.75(6/160)	23.86(63/264)	19.02(39/205)	27.73(33/119)	—	7.89(3/38)	57.78(26/45)

### 3 讨论

本研究以2015年—2017年广西的1648份疑似CSFV、PRRSV、PCV-2、PCV-3、PRV、TGEV、PEDV感染的病料进行病原学检测,以便了解广西规模化猪场主要病毒性传染病的流行情况。从检测数据可以看出,PRRSV、PCV-2的单一感染率较高,混合感染以PRRSV和PCV-2为主,与周庆安等<sup>[9]</sup>调查结果基本一致。调查发现有三重感染情况,三重感染以PRRSV、PRV和PCV-2为主。PRRSV、PCV-2的感染率在冬季比较高,CSFV、PRV、PEDV的感染率也在冬季比较高。这是由于PRRSV和PCV-2是2种主要的免疫抑制性病原,导致猪群的免疫力下降,造成免疫失败,诱发其他疫病的发生。有研究发现,PRRSV和PCV-2是引起CSFV感染的一个重要因素<sup>[10]</sup>。因此,应高度重视对PRRSV和PCV-2的免疫监测,制定个性化的免疫程序。此次检测中CSFV的感染率较低,说明近年来人们对猪瘟的防控高度重视,取得了较好的防控效果。

近3年PRV的感染率呈逐年上升趋势,感染率分别9.87%、10.99%和14.28%。可能是受母源抗体的干扰,造成免疫效果不佳<sup>[11]</sup>,也可能是由于PRV的毒力和免疫原性基因发生改变有关<sup>[12]</sup>。但目前疫苗免疫仍然是控制该病的重要手段,强化免疫程序,同时加强猪场的饲养管理,不断净化猪场,对引进的种猪进行隔离饲养,进行病原检测,建立完善的监测机制,促进猪场的健康发展。

PCV-3作为一种新发现病毒,我国辽宁、江西、重庆、广东、广西等地发现有PCV-3感染<sup>[13-14]</sup>。本研究发现PCV-3平均感染率高达43.59%,夏季感染率高达65.71%,由于PCV-3检测技术建立较晚,本次调查结果不能完全反映实际流行情况。PCV-2与PCV-3混合感染率为2.56%。PCV-2和PCV-3不具有交叉免疫保护的特点,现有的PCV-2疫苗无法对PCV-3的感染提供保护,因此实时监测PCV-2和PCV-3的感染情况,强化生物安全,加强饲养管理,改善猪场环境,控制营养结构尤为重要。

本次调查发现TGEV的感染率为4.89%,PEDV的感染率达28.44%。TGEV和PEDV的二

重感染率仅次于PRRSV和PCV-2二重感染率,为2.71%。这与薛瑞雪<sup>[15]</sup>等对山东部分地区仔猪的腹泻病毒(TGEV和PEDV的感染率分别为2.21%、34.96%)检测结果趋于一致。朱子健等<sup>[16]</sup>对我国东北地区调查结果发现,腹泻发病率高达87.97%,病死率高达89.90%,以PEDV单一感染为主,感染率为48.86%,这表明我国病毒性腹泻疫情非常严重,存在单一感染,也存在混合感染,给腹泻的综合防控带来极大的困难。调查还发现PEDV多发生于PRRSV、PCV-2高发的冬季,因此,在PRRSV、PCV-2高发的季节要加强PEDV的防控工作,以减少经济损失。

#### 参考文献:

- [1] 胡帅,李军,许力干,等.2010—2011年广西规模化猪场主要病毒性疫病流行病学调查[J].黑龙江畜牧兽医,2013(7):85-86.
- [2] 魏玉明,钱振波.规模养殖猪场主要疫病流行病学和血清学调查报告[J].畜牧兽医杂志,2017(1):97-101.
- [3] 罗廷荣,孙敬锋,莫扬,等.RT-PCR检测健康猪扁桃体和流产死胎猪瘟病毒的应用及RFLP分析[J].中国预防兽医学报,2004,26(3):192-195.
- [4] 蒋小红,黄伟坚,连慧香,等.应用RT-PCR技术快速诊断广西猪繁殖与呼吸综合征病毒研究[J].广西畜牧兽医,2003,19(2):53-55.
- [5] 连慧香.6株猪圆环病毒流行毒株全基因组的序列测序及分析[D].广西南宁:广西大学,2004
- [6] Ku X, Chen F, Li P, et al. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China [J]. Transb Emerg Dis, 2017, 64(3): 703-708.
- [7] 陈焕春,何启盖,李晓成,等.伪狂犬病诊断技术[S].中华人民共和国国家标准,GB/T 18641-2002
- [8] 田小艳,孙华,邓雨修,等.3种致猪腹泻病毒的多重RT-PCR检测[J].动物医学进展,2009,30(9):54-57.
- [9] 胡帅,周庆安,李军,等.2013—2014年广西省主要猪病毒性传染病流行病学调查[J].中国畜牧兽医,2016,43(6):1618-1623.
- [10] 彭洁,高洪,严玉霖,等.云南省2013—2015年间部分猪场猪瘟感染情况调查[J].黑龙江畜牧兽医,2017(1):114-116.
- [11] 张显浩,陈瑞爱,李冰,等.2012—2013年我国集约化猪场猪伪狂犬病病毒感染情况的调查[J].动物医学进展,2015,36(3):133-136.
- [12] 董和平,杨可锋,王起峰.猪伪狂犬病的流行现状与防控措施[A].河南省第十八届猪病防控高层论坛论文集[C].2014.

- [13] Shen H, Liu X, Zhang P, et al. Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China[J]. *Transb Emerging Dis*. doi:2017.10.1111/tbed.12639.
- [14] 贺会利,李 军,潘 艳,等.广西首例猪圆环病毒 3 型的发现及其衣壳蛋白序列分析[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(8): 1499-1503.
- [15] 薛瑞雪,田 野,田夫林,等.山东省部分地区仔猪病毒性腹泻流行病学调查[J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(4): 254-257.
- [16] 朱子健,闫丽辉,鞠 妍,等.2015—2016 年我国东北地区猪病毒性腹泻流行病学调查[J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(5): 356-360.

## Investigation on Prevalences of Major Viral Diseases of Pig Farms in Guangxi During 2015 to 2017

HE Hui-li, LI Jun, PAN Yan, HU Shuai, ZHONG Shu-hong, FENG Shi-wen, LIU Feng, XIE Yong-ping, CHEN Ze-xiang

(Guangxi Veterinary Research Institute/Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Nanning, Guangxi, 530001, China)

**Abstract:** In order to understand the prevalences of major viral infectious diseases in Guangxi in the last three years, this study applied the PCR and RT-PCR methods to detect the pathogens of 1648 samples suspected CSFV (classical swine fever virus), PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), PCV-2 (porcine circovirus type 2), PCV-3 (porcine circovirus type 3), PRV (pseudorabies virus), TGEV (transmissible gastroenteritis of pigs virus) and PEDV (porcine epidemic diarrhea virus) infections in Guangxi from 2015 to 2017. The etiology detection results showed that CSFV, PRRSV, PRV, PCV-2, PCV-3, TGEV and PEDV positive rates were 2.06% (13/632), 14.43% (192/1331), 12.10% (88/727), 14.32% (132/922), 53.85% (42/78), 10.87% (20/184) and 32.00% (72/225), respectively. The infection rates of PRV, TGEV and PEDV were increasing year by year, the infection rate of PCV-2 was decreasing year by year. The mixed infections were mainly PCV-2 and other viral infections, with the highest rate of double infections in PRRSV and PCV-2, with an average infection rate of 2.93%. The infection rates of CSFV, PRRSV, PRV, PCV-2 and PEDV were higher in winter, with 3.75%, 23.86%, 19.02%, 27.73% and 57.78%, respectively. The results showed that PRRSV and PCV-2 are the main viral diseases with serious damage to the Guangxi's large-scale pig farms. As a newly discovered virus, PCV-3 can cause porcine dermatitis, nephrothy syndrome, reproductive failure and diarrhea in piglets, and the threat to the pig industry. The mainly epidemic diarrhea viruses are PEDV and TGEV in pig farms.

**Key words:** large-scale pig farm; viral disease; PCR; RT-PCR; survey