

## 2016年江苏省部分猪场猪伪狂犬病原学监测与变异性分析

袁朗<sup>1</sup>, 胡金成<sup>2</sup>, 张敬峰<sup>1</sup>, 张晓曦<sup>1</sup>, 孙华伟<sup>1</sup> (1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

**摘要** [目的]研究猪伪狂犬病毒在江苏省的遗传变异情况。[方法]对2016年1-12月江苏不同地区42家规模猪场采集或者送检的共2365份病料组织进行PCR检测,分析不同季节、猪场规模以及地区的检测结果,并把检测出的部分基因序列进行同源性分析。[结果]猪伪狂犬阳性样品364份,阳性率为15.4%;夏、秋两季的病原阳性率均低与春、冬两季;苏北以及苏中地区的病原阳性率高于苏南地区;不同规模的猪场病原阳性率随着猪场规模的扩大逐渐下降且趋势明显。11株分离株中PRV-6分离株与Barthak61疫苗株属于同一个分支。[结论]该研究可为江苏省乃至全国猪伪狂犬病的防控提供参考。

**关键词** 猪伪狂犬病毒;病原学;监测;变异性

中图分类号 S855 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)01-0091-03

## Pseudorabies Pathogen Monitoring and Variability Analysis of Part of Pig Farm in Jiangsu in 2016

YUAN Lang<sup>1</sup>, HU Jin-cheng<sup>2</sup>, ZHANG Jing-feng<sup>1</sup> et al (Veterinary Research Institute, JAAS, Nanjing, Jiangsu 210014; 2 Veterinary Medicine College, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

**Abstract** [Objective] The aim is to study genetic variation of rabies virus in Jiangsu Province. [Method] PVR detection of 2365 histopathology sampling and submittal for inspection from 42 large-scale pig farms was carried out in Jiangsu area during Jan.-Dec. 2016. Test result was analyzed in different seasons, large-scale pig farms and areas. Homology of determined part of gene sequence was analyzed. [Result] Male samples of Porcine pseudorabies were 364. Positive rate was 15.4%. Positive rate of pathogen in summer and autumn was higher than that of winter and spring. Positive rate of Northern Jiangsu and Central Jiangsu Region was higher than that of Southern Jiangsu. Positive rate of pathogen decreased with expanding large-scale pig farms. PRV-6 isolates of 11 isolates and Barthak61 Vaccine strain belong to the same branch. [Conclusion] The research can provide reference for preventing and controlling Porcine pseudorabies of Jiangsu and the whole country.

**Key words** Rabies virus; Etiology; Monitoring; Variability

猪伪狂犬病(Pseudorabies, PR)是由伪狂犬病毒(PR)感染引起的以发热、脑脊髓炎为典型症状,且严重危害全球养猪业的一类传染病<sup>[1]</sup>。从1813年美国发生以来,目前伪狂犬病已呈全球性分布,流行愈来愈严重,并造成严重的经济损失<sup>[2]</sup>。伪狂犬病在我国流行仍然普遍<sup>[3]</sup>,可致潜伏感染<sup>[4]</sup>。目前,猪伪狂犬病已被列入《国家中长期动物疫病防治规划》(2012—2020年)重点优先防治的疫病,其控制目标是:到2015年原种猪场达到净化标准,到2020年全国所有种猪场达到净化标准<sup>[5]</sup>。通过对2016年江苏省部分猪场PRV病原阳性率进行分析及对分离毒株开展遗传变异研究,根据监测和研究结果对PRV在江苏省内的流行和遗传变异情况进行分析,为江苏省乃至全国有效防控PRV提供技术储备和技术支撑。

## 1 材料与方

## 1.1 材料

**1.1.1 病料组织。**病料来自于2016年1—12月江苏不同地区42家规模猪场采集或者送检的猪的器官组织(包括脑、心脏、脾脏、肝脏、肺脏、淋巴结等)。将这些病料组织用组织剪剪取部分,放在研磨器中,加入少许PBS充分研磨,将研磨好的滤液倒入EP管中,放入-20℃冰箱冷冻保存,进行冻融,每隔40min左右解冻,然后再放入冰箱中冷冻,如此反复2~3次,保存备用。

**1.1.2 主要器材。**PCR仪(Applide Biosystems),购自ABI公司;Tanon凝胶成像系统(2500);电泳仪(cavoy),购自凯元

信瑞仪器公司;冷冻离心机型号为Centrifuge5424R,产自德国;其他化学试剂为进口产品或国产分析纯产品;各种规格移液器,购自德国Eppendorf公司。

**1.1.3 主要试剂及引物。**①核算提取及PCR试剂盒。AxyPrep 体液病毒DNA小量试剂盒购自康宁公司;PCR试剂盒等购自上海Sangon公司。②引物。根据相关文献设计引物,引物由南京思普金生物科技有限公司合成,该对引物的扩增目的片段大小为272bp(表1)。

表1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

引物名称 Primer name	序列 Sequence	长度 Length	退火温度 Annealing temperature/ °C
F1	5'-CAGGAGGACGAGCCTGGGGCT-3'	22	55
F2	5'-GTCCACGCCCGCTGAAGCT-3'	20	55

**1.2 方法** PRV核算的提取及PCR过程严格按照Sangon公司的试剂盒说明书进行相关操作;基因组测序送往南京金斯瑞公司进行测序。

## 2 结果与分析

**2.1 江苏省不同地区42家猪场的病原检测结果** 2016年全年采集或者送检的猪伪狂犬样品共2356份,结果猪伪狂犬阳性样品364份,阳性率为15.4%。表明来自这42家规模不一的猪场总体感染水平较低,这可能是区域流行的特点或者江苏近几年对猪伪狂犬的防控做的相对较好。

## 2.2 2016年4个季度猪伪狂犬阳性率状况及变化趋势

**2.2.1 季节差异不明显。**从图1可以看出,2016年江苏省4

**基金项目** 江苏省科技成果转化与推广资金项目(KF(17)1033)。

**作者简介** 袁朗(1986—),男,江苏徐州人,研究实习员,从事实验动物的饲养管理及常见畜禽疾病的诊断和控制技术研究。

**收稿日期** 2017-07-26

个季度的伪狂犬阳性检出率各不相同,春季在10%以下,其他3个季度均达到15%,其中以冬季和夏季最高,分别达到了19.3%和17.2%。可见伪狂犬病原在1~4季度的变化有一定的差异性,但是差异性不显著。似乎季节对其感染状况影响不大,全年保持在一个相对稳定的状态;另外这也可能与样本基数不够大或者病料来源的差异性有一定关系。

**2.2.2 地域特点对病原感染的影响。**从图2可以看出,在苏北、苏中、苏南的阳性检出率依次为15.3%、18.2%、12.6%。其中,苏中地区高于苏北和苏南地区,江苏南部阳性率最低。这可能与猪场空间分布有关,从江苏地区养殖特点来看,苏中地区和苏北地区养殖业较苏南密集,被感染的几率也相对较大,应当重点检测和防控,尤其是苏中地区,3个地区虽然存在一定的差异性,但是总体上的感染情况相对稳定。

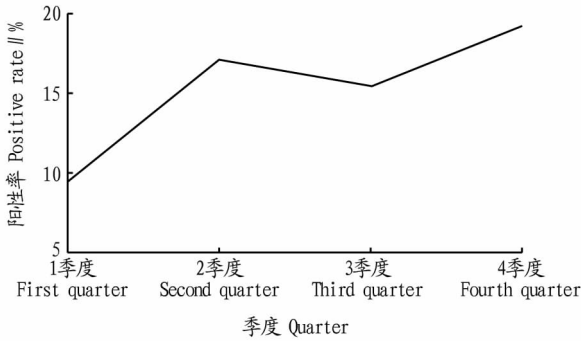


图1 不同季节 PRV 病原阳性率

Fig. 1 Positive rate of PRV pathogen in different seasons

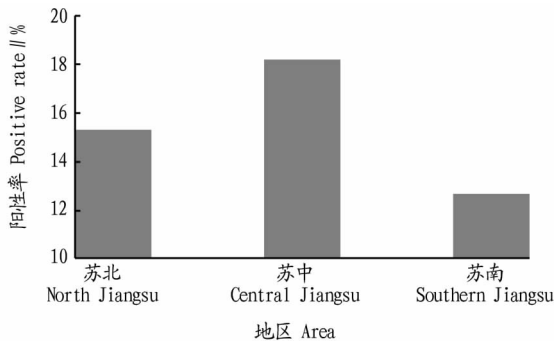


图2 不同地区 PRV 病原阳性率

Fig. 2 Positive rate of PRV pathogen in different area

**2.2.3 不同规模猪场对病原感染的影响。**把检测样品所在的猪场规模分为100头以下、100~300头、300~1000头、1000头以上进行统计,结果见图3。由图3可知,规模在100头以下的猪场阳性率为21.5%,100~300头的阳性率为19.3%,300~1000头的阳性率为12.9%,1000头以上阳性率为7.8%。不同规模猪场的伪狂犬阳性率有显著差异性,并且随着猪场规模的不断增大,阳性率总体呈下降的趋势。这可能与不同规模猪场的管理或者免疫程序有关。

小规模猪场相对大规模猪场管理不完善,如引进种猪的时候未严格进行筛选检疫导致阴性猪场被阳性猪污染,或者检疫程序不完善、不合理,有的猪场甚至未进行检疫,有时带毒猪未被及时淘汰导致其他阴性猪也被感染,有些猪场进行免疫接种时不能跟换针头,伪狂犬通过针头传播给阴性猪,导致阳性感染范围扩大。

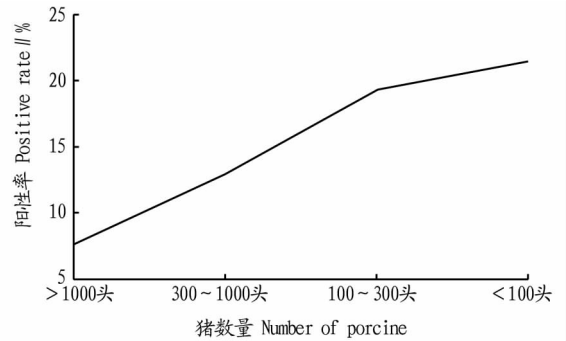


图3 不同规模猪场 PRV 病原阳性率

Fig. 3 Positive rate of PRV pathogen in different large-scale pig farms

**2.2.4 2015年低于2016年的可能原因。**与2015年相比,2016年伪狂犬阳性率有所上升,增长了6.4%。有可能是2年间猪场的免疫状况、饲养环境、引种差异以及病毒流行状况及变异等因素造成的差异。但总体上来说,2016年的感染程度较2015年严重,应当引起重视。影响病毒感染的因素是多样的,应该多方面制定防控措施。

**2.3 部分病原基因组的测序及分析** PRV gD 基因部分序列同源性及进化树分析(图4和图5)。

图4表明,11株PRV流行株的gD基因部分序列的同源

		同源性 Percent identity / %													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
差异性 Divergence / %	1	█	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	98.1	99.5	98.1	98.1	98.1	1	Barthak61
	2	1.9	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	100.0	100.0	100.0	2	PRV-1
	3	1.9	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	100.0	100.0	100.0	3	PRV-10
	4	1.9	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	100.0	98.6	100.0	100.0	100.0	4	PRV-11
	5	1.9	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	100.0	98.6	100.0	100.0	100.0	5	PRV-2
	6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	100.0	98.6	100.0	100.0	100.0	6	PRV-3
	7	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	100.0	98.6	100.0	100.0	100.0	7	PRV-4
	8	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	98.6	100.0	100.0	100.0	8	PRV-5
	9	0.5	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	█	98.6	98.6	98.6	9	PRV-6
	10	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	█	100.0	100.0	10	PRV-7
	11	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	█	100.0	11	PRV-8
	12	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	█	12	PRV-9

图4 PRV gD 基因部分序列同源性比对结果

Fig. 4 Sequence homology of PRV gD gene

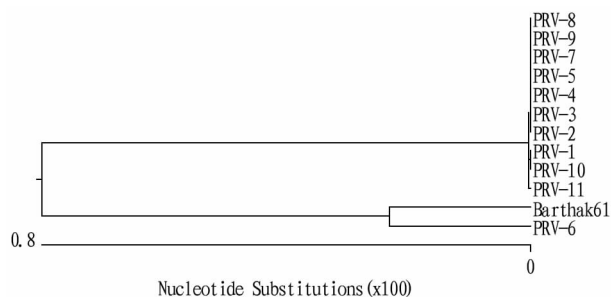


图 5 PRV gD 基因部分序列系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis based PRV gD gene

性在 98.6% ~ 100%。其中,猪伪狂犬病毒分离株和 Barthak 61 疫苗株的同源性在 98.1% ~ 99.5%。图 5 表明,11 株 PRV 流行株的 gD 基因部分序列中,PRV - 6 分离株与 Barthak61 疫苗株属于同一个分支,其他分离株共同组成另一分支。说明伪狂犬病毒存在一定程度上的变异,疫苗株对当前流行株的保护性可能有所下降。

### 3 结论

小规模猪场带毒问题普遍,科学规范的管理以及合理的免疫程序应当是其借鉴学习大规模猪场的目标。小规模猪场由于缺少检测平台的依托,或者对检测平台的不信任导致带毒猪不能及时发现,这也为该病的防治带来一定的难度。

在对 PRV gD 基因部分序列同源性及进化树分析发现,在 11 个分离株中只有 1 株病毒与疫苗株处于同一个分支,

其他毒株都属于另一个分支,说明伪狂犬病毒存在一定程度上的变异,疫苗株对当前流行株的保护性可能有所下降。因此,加强野毒监测十分重要,及时发现变异株对疫苗的研究很有帮助,这也能尽快适应猪伪狂犬流行的新形式。该病自 2012 年以来在我国流行趋势逐年上升,江苏地区 2016 年伪狂犬感染率也高于上一年,这与我国整体的流行趋势一致,所以更应该加强该病的防控。

在种猪场,公猪是 PRV 的重要感染源,加强对带毒公猪的监测与淘汰,同时确保引进健康的阴性后备公猪进行扩群。有些猪场在引种时不谨慎,引进阳性种猪导致伪狂犬暴发或转阳。有研究提出了“免疫→检测→淘汰→补充阴性后备猪→免疫→测→淘汰”的净化措施<sup>[6]</sup>,所以检测与淘汰在防控中相当关键。在制定防控措施时,应该加强与全国其他地区的交流,不能只局限于江苏地区以内,从整体再到特定区域考虑,这样对伪狂犬的防控会更有利。

### 参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.
- [2] TAMBA M, CALABRESE R, FINELLI E E, et al. Risk factors for Aujeszky's disease seropositivity of swine herds of a region of northern Italy[J]. Prev Vet Med, 2002, 54(3): 203 - 212.
- [3] 马林凤. 猪伪狂犬病的流行现状及防控措施[J]. 中国动物保健, 2014(7): 46 - 47.
- [4] 袁红, 练斯南, 张衡, 等. 新型猪伪狂犬病流行情况及净化措施[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(3): 58 - 62.
- [5] 李达, 马萍, 汤德元, 等. 规模化猪场猪瘟和伪狂犬病的净化方案[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(7): 119 - 123.
- [6] 孙华伟, 赵永前, 张敬峰, 等. 猪伪狂犬病的净化策略[J]. 猪业科学, 2016, 33(1): 59 - 61.

(上接第 90 页)

- [19] HONG L, ZHANG X M. Effects of environmental stress on plasma levels of glucose and ESR of *Sebastes schlegelii* and *Lateolabrax maculatus* [J]. Journal of fishery sciences of China, 2005, 12(4): 414 - 418.
- [20] LU S W, LIU Z P, YU Y. Effects of density stress on growth and metabolism of juvenile *Epinephelus malabaricus* [J]. Journal of fishery sciences of China, 2011, 18(2): 322 - 328.
- [21] HU Y, HUANG Y, ZHONG L, et al. Effects of ammonia stress on the gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*) [J]. Journal of fisheries of China, 2012, 36(4): 538 - 545.
- [22] LIU Y. Ammonia-N stress on *Misgurnus anguillicaudatus* and second generation population of mass selection [D]. Suzhou: Soochow University, 2011.
- [23] WANG F, LIU H F, YANG L. Acute toxicity of nitrite nitrogen to goldfish juveniles [J]. Fisheries science, 2010, 29(6): 369 - 371.
- [24] YANG H C, CHUN S. Histopathological study of acute toxicity of ammonia

- on common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Bulletin of the Korean chemical society, 1986, 19(3): 249 - 256.
- [25] KNOPH M B, THORUD K. Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater-effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters [J]. Comparative biochemistry and physiology part A: Physiology, 1996, 113(4): 375 - 381.
- [26] JOW L Y, CHEW S F, LIM C B, et al. The marble goby *Oxyeleotris marmoratus* activates hepatic glutamine synthetase and detoxifies ammonia to glutamine during air exposure [J]. Journal of experimental biology, 1999, 202(3): 237 - 245.
- [27] IP Y, CHEW S, LEONG I, et al. The sleeper *Bostrichthys sinensis* (family Eleotridae) stores glutamine and reduces ammonia production during aerial exposure [J]. Journal of comparative physiology B, 2001, 171(5): 357 - 367.
- [28] WANG Y X, WALSH P J. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen) [J]. Aquatic toxicology, 2000, 50(3): 205 - 219.

## 科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如 1990 年不能写成 90 年,文中避免出现“去年”“今年”等写法。小于 1 的小数点前的零不能省略,如 0.245 6 不能写成 .245 6。小数点前或后超过 4 位数(含 4 位数),从小数点向左每 3 位空半格,不用“,”隔开。如 18 072. 235 71。尾数多的数字(5 位以上)和小数点后位数多的小数,宜采用  $\times 10^n$  ( $n$  为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。