

安徽省泗县猪附红细胞体病流行病学调查

许魁¹, 徐前明², 张志忠³

(1. 安徽省泗县畜牧局, 安徽宿州 234300; 2. 安徽农业大学, 安徽合肥 230036; 3. 合肥野生动物园, 安徽合肥 230000)

摘要 [目的]对安徽省泗县猪附红细胞体病进行流行病学调查。[方法]从泗县3个乡镇收集300份疑似病例血样, 对其进行血液涂片检查、PCR检测和基因测序。[结果]不同规模或饲养方式的猪场猪附红细胞体感染情况不同。从调查地点来看, 墩集镇猪场感染率最高, 达65%; 其次是黄圩镇, 感染率为44%; 大庄镇猪场猪附红细胞体感染率最低, 为39%。仔猪感染率低于育肥猪, 育肥猪感染率为54.67%, 仔猪感染率仅44.00%。[结论]安徽省泗县猪附红细胞体病感染率较高, 应加强预防和控制。

关键词 泗县; 猪附红细胞体病; 流行病学; 调查

中图分类号 S851.31⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)16-0079-03

Epidemiological Investigation on Porcine Eperythrozoonosis in Sixian County of Anhui Province

XU Kui¹, XU Qian-ming², ZHANG Zhi-zhong³ (1. Animal Husbandry Bureau in Sixian County of Anhui Province, Suzhou, Anhui 234300; 2. Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036; 3. Hefei Wildlife Park, Hefei, Anhui 230000)

Abstract [Objective] To make the epidemiological investigation of porcine eperythrozoonosis in Sixian County of Anhui Province. [Method] 300 suspected blood samples were collected from three towns of Sixian County to make blood smear test, PCR detection and gene sequencing. [Result] The infection situations of *Eperythrozoon suis* in pig farms with different scale or feeding methods were different. From the survey locations, the infection rate in pig farms of Dunji Town was the highest (65%), followed by that in Huangwei Town (44%), the infection rate in pig farms of Dazhuang Town was the lowest (39%). The infection rate of piglets was lower than that of fattening pigs (54.67%), while the infection rate of piglets was 44.00%. [Conclusion] The infection rate of *E. suis* in Sixian County was higher, so its prevention and control should be strengthened.

Key words Sixian County; Porcine eperythrozoonosis; Epidemiology; Investigation

猪附红细胞体病是危害养猪业较为严重的疫病之一, 常引起溶血性黄疸、呼吸困难、身体虚弱、体温升高、血液稀薄等症状, 造成病猪高热稽留不退、厌食绝食、咳嗽和气喘。公猪尿鞘积尿, 精神差; 母猪产后奶水不足、哺育功能较弱。患病猪主要表现为繁殖障碍或生育障碍, 这些问题给我国畜牧业带来了巨大的经济损失^[1-2]。为了全面了解安徽省泗县猪感染附红细胞体情况, 笔者选取黄圩镇、大庄镇和墩集镇为调查点, 选择30个具有代表性的猪场作为调查对象, 采集全血300份, 对其进行血液涂片检查、PCR检测和基因测序。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与载体。大肠杆菌 DH5 α ; pMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂。血液基因组 DNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒, 均购自美国 Omega 公司; DNA Maker 2000、琼脂糖和溴化乙锭 (EB) 等均购自天根生物有限公司。

1.1.3 调查地点和调查对象。选择具有代表性的墩集镇、黄圩镇、大庄镇3个乡镇为调查地点, 选取30个具有代表性的猪场作为调查对象, 调查这3个乡镇养殖场猪附红细胞体的感染情况。

1.2 方法

1.2.1 血液基因组提取。血液基因组提取按照 Omega 血液基因组提取试剂盒说明书操作。

1.2.2 引物设计。参照 Messick^[3]的方法进行引物设计。结合 GenBank 数据库中登录的 16S rRNA 序列, 并将其作为模板, 使用 Primer primer 5.0 软件设计引物, P1 为 AAAAAGGC-

CCTCGGGTCTTT, P2 为 TCAATTATGTCCAGGCACT。

1.2.3 目的基因的 PCR 扩增。PCR 反应条件如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 最后 4 °C 下保存。

1.2.4 基因测序与分析。对菌落 PCR 鉴定为阳性的菌株进行序列测定, 对所测定的序列在 NCBI 网站进行 Blast 序列分析, 并使用 MEGA 4.0 软件构建遗传进化树。

1.2.5 数据统计与分析。将试验数据进行汇总与统计分析, 比较不同地点、规模、月龄和症状猪附红细胞体的感染情况。

2 结果与分析

2.1 临床症状观察 试验猪均表现出一定的患附红细胞体病的特征。抽检猪中, 体温升高 30 头, 检出 23 头感染附红细胞体, 检出率为 76.67%; 皮肤变色 40 头, 检出 24 头感染附红细胞体, 检出率为 60%; 饮食减少 60 头, 检出 24 头感染附红细胞体, 检出率为 40%; 气喘咳嗽 20 头, 检出 12 头感染附红细胞体, 检出率为 60%; 排泄稀薄 70 头, 检出 35 头感染附红细胞体, 检出率为 50%; 精神萎靡 80 头, 检出 30 头感染附红细胞体, 检出率为 37.50%。

2.2 血涂片染色镜检结果 取血样制成血涂片, 采用瑞氏血涂片染色法进行染色并镜检。从图 1 可以看出, 猪血液红细胞发生变形, 且表面有附红细胞体分布^[4-5]。

2.3 PCR 检测结果 从图 2 可以看出, PCR 扩增产物经电泳检测后发现 700 bp 左右的条带, 与预期结果相符。

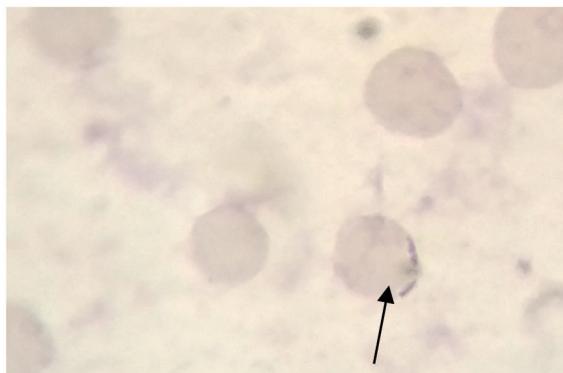
2.4 基因测序结果 阳性克隆经序列测定后, 其大小 700 bp, 同源性分析结果表明其与猪附红细胞体的同源性达 85%。

2.5 不同地点养殖场的感染情况比较 由表 1 可知, 虽然取样猪场都在泗县范围内, 由于地理位置和环境不同, 猪感染附红细胞体情况也存在差异。总体来看, 在黄圩镇检测的

作者简介 许魁(1980—), 男, 安徽泗县人, 畜牧师, 从事动物寄生虫学研究。

收稿日期 2018-03-15

100头猪中,可检出44头附红细胞体呈阳性,感染率达44%;在大庄镇检测的100头猪中,39头猪呈阳性,感染率达39%;在对墩集镇检测的100头猪中,有65头猪体检测出附红细胞体,感染率达65%。由此可见,墩集镇受检猪附红细胞体的感染率明显高于黄圩镇和大庄镇。

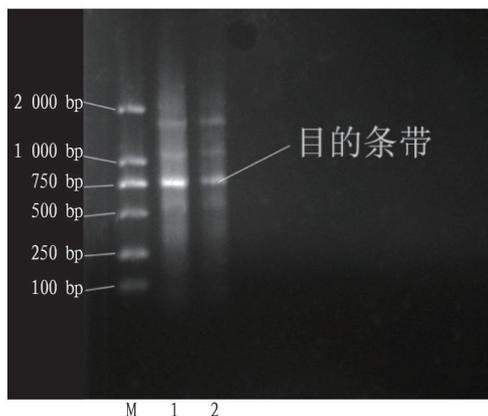


注:箭头处为猪附红细胞体

Note:The arrow showed *E. suis*

图1 血液涂片检查结果

Fig.1 The results of blood smear test



注:M.Marker DL 2000;1~2.阳性菌 PCR 扩增产物

Note:M stands for Marker DL 2000;lane 1-2 was PCR products of positive bacteria

图2 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification results

表1 不同地点养殖场猪附红细胞体的感染情况比较

Table 1 Infection rat comparison of *E. suis* in pig farms among different sites

地点 Sites	抽检数 Detection number 头	阳性数 Positive number 头	感染率 Infection rate//%
墩集镇 Dunji Town	100	65	65
黄圩镇 Huangwei Town	100	44	44
大庄镇 Dazhuang Town	100	39	39

2.6 不同规模养殖场的感染情况比较 由表2可知,50头以下规模的猪场附红细胞体感染率明显高于200头以上规模的猪场。200头以上猪场共检出48头(黄圩镇15头、大庄镇12头、墩集镇21头),50头以下猪场共检出100头(黄圩

镇29头、大庄镇27头、墩集镇44头)。

表2 不同规模养殖场猪附红细胞体的感染情况比较

Table 2 Infection rate comparison of *E. suis* in different scales of pig farms

规模 Scale 头	抽检数 Detection number 头	阳性数 Positive number 头	感染率 Infection rate//%
>200	150	48	32.00
<50	150	100	66.67

2.7 不同月龄猪群的感染情况比较 由表3可知,1~3月龄猪共150头,附红细胞体感染检出头数为66头(黄圩镇19头、大庄镇17头、墩集镇30头),检出率为44%;4~6月龄猪共150头,附红细胞体感染头数82头(黄圩镇25头、大庄镇22头、墩集镇35头),感染率为54.67%。4~6月龄猪附红细胞体的感染率高于1~3月龄。

表3 不同月龄猪群附红细胞体的感染情况比较

Table 3 Infection rate comparison of *E. suis* in different month ages of pigs

月龄 Month age	抽检数 Detection number 头	阳性数 Positive number 头	感染率 Infection rate//%
1~3	150	66	44.00
4~6	150	82	54.67

3 讨论与结论

3.1 附红细胞体感染情况 此次对泗县猪感染附红细胞体情况的调查发现,抽检猪群感染率总体达49.33%,其中低月龄仔猪感染率为44%。此次调查结果与邵秀珍等^[6]报道的夏秋季猪群附红细胞体的感染率基本相一致。这说明该地区存在猪感染附红细胞体情况,在不同规模猪场均有附红细胞体污染现象,其中育肥感染率相对最高,总体达54.67%。

3.2 猪附红细胞体病的诊断 建立猪附红细胞体病的高效诊断方法是控制该病的有力手段和前提条件。附红细胞体病症状临床上并不是同时发生和存在的,而且还有别的疾病有同样的症状,这就要求提高鉴别诊断手段的准确率。临床上最需要鉴别诊断的是猪瘟、猪巴贝斯虫(猪焦虫)和猪肺疫,尤其与猪瘟的外部表现较为类似,在发病初期极端仅仅通过对症状进行观察是很难做出准确判断,只有等到发病中后期通过尸体解剖检测的方式才能够进行鉴别。

血涂片检查法是血涂片经姬姆萨染色或吡啶橙染色对血液样本进行染色,然后用显微镜对涂片进行观察。附红细胞体姬姆萨氏染色呈蓝紫色或粉红紫色。瑞氏染色呈淡蓝色。吡啶橙染色呈淡绿色荧光。它们的优点都是简单易操作,特征明显易观察。姬姆萨氏染色、瑞氏染色需注意要避免变性红细胞如豪-周氏小体红细胞、嗜碱性点彩红细胞和多染性红细胞等以及血小板、抗凝剂、染料颗粒这些因素的干扰;吡啶橙染色过程中也常常会发生假阳性事件。此外,这2种检测方法的缺点是敏感性都较低,吡啶橙染色法还需有暗室和

荧光显微镜^[4]。此外,上述这些方法只能观测到附着于红细胞表面的附红细胞体,而游离于红细胞内部的附红细胞体却无法得到有效地观察。若采用改良方法,将血液经生理盐水进行一定比例稀释后再染色,可在一定程度上减少染色颗粒的发生,降低假阳性率。该试验中血涂片检查也需要对猪全血进行稀释,然后染色镜检,结果发现该方法在去除杂质和染色颗粒方面有明显地改善。

PCR 诊断方法具有高敏感性和特异性强等优点。在分子生物学诊断方法中最常用此方法。关于 PCR 方法诊断附红细胞体病报道较多。张浩吉等^[7]以 16S rRNA 为检测目的基因,建立了 PCR 诊断猪附红细胞体感染情况的检测方法,证实该方法具有良好的特异性和敏感性。Oberst 等^[8]在猪附红细胞体感染高峰期取样,从中分离出猪附红细胞体。提取 DNA 后以 32P 标记制成探针,能区别感染猪和非感染猪,且不与感染其他病的猪血清中 DNA 发生杂交反应。后来,进一步利用 PCR 技术检测猪附红细胞体的感染情况,证明其敏感性高,同时证明感染猪附红细胞体的猪在 24 h 后即可检测出。

兽医临床诊断方法不准确,而 PCR 检测方法对于仪器设备以及操作人员的要求都过高,不适合乡镇级畜牧兽医水

(上接第 74 页)

长越旺盛,积累重金属的量越多。第 4 和第 5 个群落的富集系数明显低很多,说明土壤中过多的水分影响了根部对重金属的富集。

虽然 Cd 在野生大豆中的含量比其他 3 种重金属低,但 Cd 的富集系数是最高的,说明 Cd 在野生大豆中的迁移强度和吸收利用程度高于其他 3 种,Cd 更容易从土壤中进入野生大豆体内^[13]。Cd 的转移系数表现为前 3 个群落小于后 2 个群落,这可能与后 2 个群落土壤的含水量大有关,因为 Cd 是水易溶性元素,在这 4 种重金属中 Cd 的水溶性是最大。

野生大豆对 Cu、Zn、Cd、Pb 4 种重金属富集特征都呈现出地下部分明显大于地上部分。这可能是由于土壤中重金属直接与野生大豆根系接触,根部有大量的微生物,能将重金属离子吸收或固定,增强了根部对重金属的吸收和富集能力^[14]。

比较野生大豆地上部分与地下部分积累重金属,积累主要集中在根部,这是由于野生大豆对将重金属从地下部转运到地上部的能力较差,它尽量把吸收到体内的重金属束缚在根部,避免地上部茎和叶的细胞受到重金属的直接伤害。野生大豆对 Cd 的积累很高,但是将 Cd 运输到地上部的能力较差,从这一点讲,野生大豆只能算是一种富集植物,而不是超富集植物,因为超富集植物的一个主要特征就是植物地上部重金属含量大于根部该重金属含量^[15]。野生大豆能够从土壤中吸收重金属,并把它们固定在根部,限制重金属向地上部转移,使重金属污染土壤的植物稳定。植物稳定的作用是通过植物根部积累、沉淀、转化土壤中有毒金属,或通过根部吸附来加强对污染物的固定,以降低其生物有效性和防止其进入地下水和食物链,从而减少其对环境 and 人类健康的污染

产站和一般规模养殖场使用,还是需要用病原学检测方法(如瑞氏血涂片染色法)进行确诊。因为病原学方法无论是成本还是设备仪器以及对操作人员的要求,都更适合乡镇兽医站和一般规模养殖场使用。

参考文献

- [1] 李昕,张学军,王近香,等.猪附红细胞体病[J].中国畜牧兽医,2005,32(11):54-57.
- [2] 韩子强,杨宏军,李建基.动物附红细胞体病的研究进展[J].动物科学与动物医学,2002,19(7):21-24.
- [3] MESSICK J B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): A review and new insights into pathogenic potential [J]. Veterinary clinical pathology, 2004, 33(1): 2-13.
- [4] 赵晓薇,巴彩凤.附红细胞体病的研究进展[J].中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 1047-1049, 1058.
- [5] 魏梅雄,马杏宝,王龙英.附红细胞体病及其分子生物学和发病机制的研究进展[J].旅行医学科学,2006,12(3):1-7.
- [6] 邵秀珍,杨殿相,秦林金,等.人类附红细胞体形态学特点[J].中国人兽共患病杂志,1998,14(5):83-84.
- [7] 张浩吉,谢明权,张健骅,等.猪附红细胞体 PCR 检测方法的建立和初步应用[J].中国兽医学报,2005,25(5):480-483.
- [8] OBERST R D, GWALTNEY S M, HAYS M P, et al. Experimental infections and natural outbreaks of eperythrozoonosis in pig identified by PCR-DNA hybridizations [J]. J Ver Diagn Invest, 1993, 5(3): 351-358.

风险^[16]。野生大豆可以阻止重金属进入地上部分,减少毒害作用,具有对重金属的排斥机制,这可能也是它生态幅大的部分原因。

参考文献

- [1] WHITE P J. Cation channels in the plasma membrane of rye roots [J]. Journal of experimental botany, 1997, 48: 499-514.
- [2] FOX T C, GUERINOT M L. Molecular biology of cation transport in plants [J]. Annual review of plant biology, 1998, 49: 669-696.
- [3] MORSOMME P, BOUTRY M. The plant plasma membrane H(+)-ATPase: Structure, function and regulation [J]. Biochimica biophysica acta, 2000, 1465(1/2): 1-16.
- [4] WILLIAMS L E, PITTMAN J K, HALL J L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants [J]. Biochimica biophysica acta, 2000, 1465(1/2): 104-126.
- [5] 张乃明. 土壤-植物系统重金属污染研究现状与展望 [J]. 环境科学进展, 1999, 7(4): 30-33.
- [6] MARSCHNER H. Mineral nutrition of higher plants [M]. 2nd ed. London, UK: Academic Press, 1995.
- [7] REEVES R D, BAKER A J M. Metal-accumulating plants [M] // RASKIN I, ENSLEY B D. Phytoremediation of toxic metals; Using plants to clean up the environment. New York, USA: John Wiley Sons Inc, 2000: 193-229.
- [8] 多立安,高玉葆,赵树兰.早熟禾对 4 种重金属胁迫生长响应特征 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(1): 183-187.
- [9] 李福山. 中国野生大豆资源的地理分布及生态分化研究 [J]. 中国农业科学, 1993, 26(2): 47-55.
- [10] 赵欣如,房继明,宋杰,等.北京的公园鸟类群落结构研究 [J]. 动物学杂志, 1996, 31(3): 17-21.
- [11] 刘阳,高新宇,袁锋,等.北京地区蜻蜓区系及分布 [J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2004, 40(3): 375-379.
- [12] 杨刚,伍钧,唐亚,等.铅锌矿业废弃地草本植物重金属耐性研究 [J]. 四川环境, 2006, 25(4): 18-21, 38.
- [13] 孙力,杨元根,闭向阳,等.黔西北土法炼锌区典型植物体内重金属的积累研究 [J]. 地球与环境, 2006, 34(2): 61-66.
- [14] 李铨红,李侠,宋瑞生,等.受污农田中农作物对重金属 Pb 的富集特征研究 [J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(S1): 109-113.
- [15] 黄运湘,廖柏寒,王志坤.超积累植物的富集特征及耐性机理 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(6): 693-697.
- [16] 弓清秀. 园林绿化与城市污染土地的植物修复 [J]. 北京园林, 2005, 21(2): 29-33.