

2005 ~ 2006年广西地区猪流感的分子流行病学调查

蒙雪琼¹, 黄 夏², 陈义祥³, 胡 杰³, 黄胜斌³,
赵国明³, 李华明², 何贻坚³, 陆文俊³, 梁 媛³

(1. 广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530005;

2. 广西兽医卫生监督检验所, 广西 南宁 530001;

3. 广西动物疾病预防控制中心, 广西 南宁 530001)

摘要:为了解广西猪群中猪流感 (Swine influenza, SI) 的流行情况, 本调查主要采用 RT-PCR 方法, 对 2005 ~ 2006 年从 12 个规模猪场随机采集的 530 份猪鼻腔棉拭子 (不同年龄段) 和 108 个猪场送检的 239 份有呼吸道症状病猪的组织病料样品 (肺、脾和淋巴结等) 进行了 SI 检测; 同时, 对 SI 阳性组织病料样品进行了猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV) 和猪细小病毒 (PPV) 的检测, 以确定猪群中 SI 的感染以及与其他病毒混和感染情况。结果显示: 从不同年龄段猪的鼻腔棉拭子中均能检测到 SI, 且平均阳性率为 15.85% (84/530)。从 11 个市 30 个猪场 54 份的组织病料中检出 SI, 组织病料和猪场的平均阳性率分别为 22.59% (54/239) 和 27.78% (30/108)。SI 常常与 PRRSV、PCV2、CSFV、PPV 和 PRV 二重或多重组混和感染, 占检测样品的 19.25% (46/239), 其中以 SI 与 PCV2 和 PRRSV 混合感染最为常见, 阳性率分别占检测样品的 13.81% (33/239) 和 8.37% (20/239)。由此可见, SI 已经感染广西猪群, 且 SI 常与其他病原体以混合感染的方式对广西养猪业构成潜在危害。

关键词: 广西; 猪流感 (SI); 病原学监测

中图分类号: S851.38

文献标识码: B

文章编号: 0529-5130(2008)06-0042-03

猪流感 (Swine influenza, SI) 是由猪流感病毒 (Swine influenza virus, SI) 所引起的一种急性呼吸道传染病, 多发生于冬季、早春等天气骤变季节, 其特征为突然发热、咳嗽、呼吸困难, 鼻中流出分泌物, 猪不分年龄、品种和性别均能感染^[1-2]。目前, SI 已遍布美洲、亚洲、欧洲和非洲成为规模化猪场的常发传染病^[2-3]。单纯的 SI 感染表现为发病率高, 死亡率低, 其严重程度与流行毒株、猪只日龄和健康状况、环境条件以及与其他病原体并发继发感染相关, 常因与其他病原体混合感染, 使死亡率明显增高^[4-5]。SI 是猪呼吸道疾病综合征 (Porcine respiratory disease complex, PRDC) 的主要病原体之一, 感染后常发生肺炎, 还可引起怀孕母猪繁殖障碍^[2,6]。猪可被禽流感病毒和人流感病毒感染, 因此, 猪被认为是人、禽和/或猪流感病毒通过基因重排产生新的亚型流感病毒的“混合器”^[7]。SI 不仅可感染猪, 同时也具有感染禽、人、马等鸟类和其他哺乳动物的能力^[2,8]。因此, 猪流感的影响不仅在于其显而易见的兽医传染病学的意义, 更在于其深远的公共卫生意义。为了解 SI 在广西猪群中的感染状况, 本调查主要采取 RT-PCR 方法对 2005 ~ 2006 年期间, 猪群中的 SI 的感染情况进行了调查, 为猪流感疫情的诊断和监测提供科学依据。

收稿日期: 2007-11-27

作者简介: 蒙雪琼 (1982-), 女 (壮族), 硕士研究生。

1 材料与方法

1.1 试剂和试剂盒

总 RNA 抽提试剂 TRIZOL 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司; RNasin 购自 TOYOBO 公司; dNTPs 和 Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker 和蛋白酶 K 均购自 TaKaRa 公司。

1.2 检测样品

530 份鼻腔棉拭子来自 2005 ~ 2006 年广西 7 个地市 12 个规模猪场不同年龄段的猪; 239 份组织病料 (肺、脾、淋巴结等) 来自 2005 ~ 2006 年 11 个市 108 个发病猪场; 均为 -20℃ 保存。

1.3 引物合成

检测 SI 引物^[9]是扩增 A 型流感病毒核蛋白 (NP) 基因的特异性引物, 预期扩增目的片段长度为 330 bp。

NP1200: 5'-CA GRT ACTGGGCHA TAA GRAC-3';

NP1529: 5'-GCA TTGTCTCCGAA GAAA TAAG-3'。

检测 PRRSV 引物和猪瘟病毒 (CSFV) 引物^[10-11], 预期扩增目的片段长度均为 508 bp; 检测猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 引物^[12], 预期扩增目的片段长度为 1154 bp; 检测猪伪狂犬病病毒 (PPV) 引物^[13], 预期扩增的片段长度为 445 bp; 检测猪细小病毒 (PRV) 引物参考中华人民共和国猪伪狂犬病诊断技术标准, 预期扩增目的片段长度 217 bp。以上

6对引物均由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.4 病料中总 RNA 的抽提

取约 1 g 痘猪肺脏、脾脏和淋巴结于研钵充分研磨，用 Hank 液/PBS/生理盐水 1:5 稀释，反复冻融 3 次以上，8 000 r/min 离心 10 min，取上清液 350 μL，加入 800 μL 的 TRIZOL，混合均匀，室温放置 5~10 min。加入 200 μL 氯仿，旋涡振荡 15 s 混匀，室温下放置 2~3 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清，再加入等量的异丙醇混匀，在室温下放置 10 min。12 000 r/min 离心 10 min，弃上清，再加入 75% 无水乙醇 1 000 μL，用旋涡振荡混匀，12 000 r/min 离心 5 min。晾干后，用无 RNase 的水 35 μL 溶解，-20℃ 冻存备用或即用。

1.5 SIV 目的基因片段扩增

RT-PCR 反应体系：10×PCR buffer 3.0 μL，dNTPs (2.5 mmol/L) 3.0 μL，上游引物 (25 mmol/L) 1.0 μL，下游引物 (25 mmol/L) 1.0 μL，RNA 模板 3.0 μL，Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μL，RNasin 0.5 μL，M-MLV 反转录酶 0.5 μL，加 H₂O 至 25 μL。反应参数：42℃ 45 min；95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 30 s；55℃ 40 s；72℃ 延伸 40 s，共 35 个循环；72℃ 再延伸 10 min。反应结束后取 5 μL PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统上观察目的片段。

1.7 混合感染病毒 PRRSV、CSFV、PCV2、PPV 和 PRV 目的基因片段的扩增

运用已建立的 RT-PCR 和 PCR 方法，对病料进行 PRRSV、CSFV、PCV2、PPV 和 PRV 的检测。

2 结果

2.1 组织病料中 SIV 感染情况

运用 RT-PCR 方法，从来自 11 个市 30 个猪场的 54 份组织病料中检测到 SIV 特异目的基因片段，猪场平均阳性率为 27.78% (30/108)，组织样品的平均阳性率为 22.59% (54/239)，不同地区的阳性率有一定的差异。结果见表 1。

2.2 猪鼻腔棉拭子中 SIV 的 RT-PCR 检测

检测结果显示：不同年龄阶段的猪（断奶仔猪、中猪、育肥猪等）都有带毒现象。猪鼻腔棉拭子 SIV 检出阳性率为 15.85% (84/530)，部分阳性鼻腔棉拭子 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

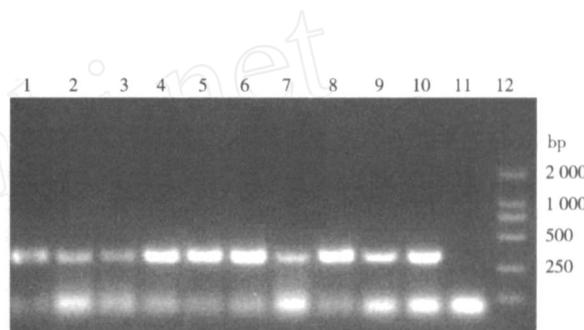
2.3 混合感染病毒的检测

运用已建立 RT-PCR 和 PCR 方法从 SIV 阳性组织病料中检测出被 PCV2、PRRSV、CSFV、PPV 和/或 PRV 二重或多重混合感染样品占 19.25% (46/239)，其中以 SIV 与 PCV2 或 PRRSV 混合感染较多，分别

占 13.81% (33/239) 和 8.37% (20/239)。结果见图 2 和表 2。

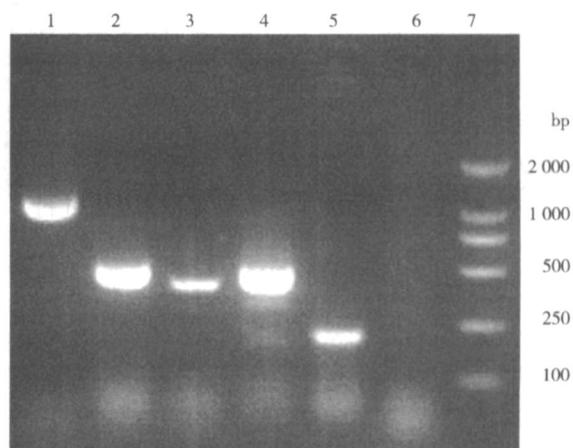
表 1 广西不同地区 SIV 感染情况

来源	检测数	阳性数	阳性率 /%
南宁	50	16	32.00
玉林	78	17	21.79
来宾	8	3	37.50
北海	7	2	28.57
桂林	7	2	28.57
贺州	19	1	5.26
柳州	29	4	13.79
钦州	7	2	28.57
防城港	2	1	50.00
贵港	25	4	16.00
崇左	7	2	28.57
合计	239	54	22.59



1-9. 为猪鼻腔棉拭子样品；10. 猪流感病毒阳性标准；11. 阴性对照；12. DNA 分子量标准

图 1 猪鼻腔棉拭子 SIV RT-PCR 扩增产物电泳图



1. 猪圆环病毒 2 型；2. 猪瘟病毒；3. 猪繁殖与呼吸综合征病毒；4. 猪细小病毒；5. 猪伪狂犬病病毒；6. 阴性对照；7. DNA 分子量标准

图 2 感染样品 PCR 产物电泳图

表 2 组织病料的混合感染情况

感染类型	阳性病料数	占检测病料的百分率 /%
SIV ^a	8	3.35
SIV + PCV2	18	7.53
SIV + CSFV	2	0.84
SIV + PRRSV	7	2.93
SIV + PCV2 + CSFV	4	1.67
SIV + PCV2 + PRRSV	7	2.93
SIV + PCV2 + PRV	2	0.84
SIV + PRRSV + PRV	1	0.42
SIV + CSFV + PRRSV	3	1.26
SIV + PCV2 + PRRSV + PPV ^b	1	0.42
SIV + PCV2 + CSFV + PRRSV	1	0.42
合计	54	22.59

注：a 指仅有 SIV 而无 CSFV、PRRSV、PCV2、PPV 和 PRV（不包括其他病原体）。

b PPV 只进行了部分样品检测。

3 讨论

PCR 技术具有敏感度高、特异性好、快速简便等优点，已成为诊断或流行病学调查比较理想的选择。SIV 感染猪体后，病毒的复制通常局限在呼吸道，主要的复制部位在呼吸道上皮细胞。一般情况下 SIV 单独感染只引起轻微临床症状，体温升高，持续约一周时间，能自然康复，但在这段时间内从鼻腔检测 SIV 的检出率较高，感染后康复猪能产生比较坚强持久的免疫力，也可能成为较长期的带毒者和排毒者。本调查结果显示：组织病料和猪场的平均阳性率分别为 22.59% (54/239) 和 27.78% (30/108)。鼻腔棉拭子 SIV 平均阳性率达到 15.85% (84/530)，且从不同年龄段猪的鼻腔棉拭子中均能检测到 SIV。另外，在检测中发现 2005 年 5~7 月份期间从几个规模场采集的鼻腔棉拭子 SIV 检测出率高达 60% 以上（数据未显示）。SIV 感染常常可增加猪群对其他呼吸道病原的易感性，增加了继发或混合感染的几率，从而发生猪的呼吸道综合征 (PRDC)，使猪群呼吸道疾病更为复杂，给猪场带来严重的经济损失。顾小根对 2001 年浙江省发生的“猪高热症”病因进行了研究，证实当时的疫情是由猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 和猪流感 (SI) 并发造成的，继发感染则加重了疫情^[4]。本次病原学检测结果显示：SIV 与 PCV2、PRRSV、CSFV、PPV 和 PRV 存在二重或多重混和感染比较普遍，阳性率达 19.25% (46/239)，其中以 SIV 与 PCV2 和 PRRSV 混合感染最为常见，阳性率分别占检测样品的 13.81% (33/239) 和 8.37% (20/239)。可见，在我区 SIV 主要以混合感染的方式存在，使疫情复杂，并引发疾病，因此，

在预防和诊断猪的传染病过程中应引起足够的重视。

最近有关于从猪体内检测到禽源流感病毒的报道^[14]，引起了人们的关注。在流感病毒情况复杂的今天，我们要严密监控流感在猪群中的发展动向，加强对我国 SIV 的监测，防患于未然。目前，广西猪群基本不进行 SIV 疫苗免疫，因而，加强饲养管理，做好常发病的免疫接种和药物预防，提高猪群整体抵抗力和健康水平，强化生物安全措施，防止易感猪与感染动物以及疑似流感感染的人员接触等等，将有助于减少猪流感的发生。

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] Brown IH, The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs [J]. Vet Microbiol, 2000, 74: 29~46.
- [3] 李海燕, 于康震, 辛晓光, 等. 部分省市猪群猪流感的血清学调查及猪流感病毒的分离与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2003, 24(3): 67~72.
- [4] 顾小根, 俞国乔, 朱家新, 等. 猪繁殖与呼吸综合征和猪流感混合感染的诊断 [J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(6): 464~467.
- [5] 黄如渠, 潘新尤, 钟志林. 猪流感和猪瘟混合感染并发细菌感染的控制案例 [J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(10): 48~49.
- [6] Choi Y K, Goyal SW, Joo H S. Prevalence of swine influenza virus subtype on swine farms in the United States [J]. Arch Virol, 2002, 147: 1209~1220.
- [7] Scholtissek C. Pig as the “mixing vessel” for the creation of new pandemic influenza A viruses [J]. Med Princ Pract, 1990, (2): 65~71.
- [8] Goldfield M, Bartley J D, Pizutti W, et al. Influenza in New Jersey in 1976: isolations of influenza A/New Jersey/76 virus at Fort Dix [J]. J Infect Dis, 1977, 136: 347~355.
- [9] Lee M S, Chang P C, Shien J H, et al. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR [J]. J Virol Methods, 2001, 97: 13~22.
- [10] 姜高明, 杜伟贤, 谢明权, 等. 猪繁殖与呼吸道综合征 RT-PCR 诊断方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20(2): 141~144.
- [11] 罗廷荣, 莫扬, 吴文德, 等. RT-PCR 技术诊断猪瘟的应用研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2004, 26(4): 307~310.
- [12] 芦银花, 许立华, 陈溥言, 等. 猪圆环病毒 2 型及猪繁殖与呼吸综合征病毒的快速检测 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(2): 184~186.
- [13] 赵俊龙, 陈焕春, 吕建强, 等. 猪细小病毒 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(2): 142~144.
- [14] Xu C T, Fan W X, Wei R, et al. Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003 (H9N2) virus [J]. Microbes Infect, 2004, 24: 919~925.