

山东省猪圆环病毒2型的分离鉴定及其 *ORF2*基因遗传进化分析

彭涛^{1,2,3#} 马梓承^{1,2,3#} 张黎斌⁴ 李宝全^{1,2,3*} 王方昆^{1,2,3*}

(¹山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; ²山东省动物生物工程与疾病防治重点实验室, 泰安 271018;

³山东省畜禽疫病防控工程技术研究中心, 泰安 271018; ⁴新希望六和股份有限公司, 潍坊 261000)

摘要 该研究对山东省某猪场疑似患有断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的病猪进行了临床病理学检测和病理组织切片观察。PCR检测阳性的病料处理后接种PK-15细胞, 通过连续传代培养分离到一株猪圆环2型病毒(porcine circovirus type 2, PCV2)(SDWF20107), 并对其进行*ORF2*基因扩增、遗传进化分析以及氨基酸突变位点分析。序列分析表明, 该毒株与其他参考毒株的核苷酸相似性介于77.2%~99.6%之间, 氨基酸相似性介于82.1%~99.6%之间; 分离株与2.1d亚型的毒株位于同一分支, 表明分离毒株属于2.1d亚型。根据流行毒株的特征, 该猪场改用高效圆环2型病毒疫苗并调整了免疫程序, 使该猪场患病猪群症状很快消失, 恢复正常生产水平。该研究结果为猪场中PCV2的基因分型及其变异情况提供了参考资料, 也为今后PMWS的流行病学研究和防控提供理论依据。

关键词 猪圆环病毒2型; 分离鉴定; 遗传进化分析

Isolation, Identification and Analysis of *ORF2* Gene Evolution of Porcine Circovirus Type 2 in Shandong Province

Peng Tao^{1,2,3#}, Ma Zicheng^{1,2,3#}, Zhang Libin⁴, Li Baoquan^{1,2,3*}, Wang Fangkun^{1,2,3*}

(¹Department of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; ²Shandong Provincial Key Laboratory of Animal Biotechnology and Disease Control and Prevention, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

³Shandong Provincial Engineering Technology Research Center of Animal Disease Control and Prevention, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; ⁴New Hope Liuhe Co., Ltd, Weifang 261000, China)

Abstract In this study, we made a pathological diagnosis of swine which suspected of suffering from postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in one swine farm in Shandong province, by pathological examination and histopathological section observation. Then, PK15 cells were inoculated with the samples that were positive for PCV2 by PCR, and a strain of PCV2 (SDWF20107) was isolated by continuous subculture. The results of similarity analysis of the *ORF2* gene showed that the nucleotide similarity between this strain and other reference strains ranged from 77.2% to 99.6%, and the amino acid similarity ranged from 82.1% to 99.6%. Phylogenetic analysis based on *ORF2* genes indicated that the isolated strain belongs to the 2.1d subtype. According

收稿日期: 2018-01-30 接受日期: 2018-03-02

国家重点研发计划项目“猪重要疫病免疫防控新技术研究”课题(批准号: 2017YFD0500605)和山东省“双一流”资金资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 18853857500, E-mail: wangfangkun@sdau.edu.cn; Tel: 13455732645, E-mail: libq72@163.com

Received: January 30, 2018 Accepted: March 2, 2018

This work was supported by the Research and Development of the National Key Project “Pig Important Disease Immune Prevention and Control of New Technology Research” (Grant No.2017YFD0500605) and Shandong “Double Tops” Funds

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-18853857500, E-mail: wangfangkun@sdau.edu.cn; Tel: +86-13455732645, E-mail: libq72@163.com

网络出版时间: 2018-06-01 13:59:05 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180601.1358.010.html>

to the characteristic of the epidemic strain, the swine farm switched to a highly efficient and adjusted the immune program. As a result, the symptoms of the diseased swine soon disappeared and the normal production levels were restored. The present study provided reference data for the genotyping and variation of PCV2 in swine farms, and provided theoretical basis for future epidemiological studies and prevention and control of PMWS.

Keywords porcine circovirus type 2; isolation and identification; genetic evolution analysis

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 是圆环病毒科、圆环病毒属的一种单股、负链、环状的DNA病毒。PCV分为PCV1、PCV2两种基因型, 其中PCV1对猪是非致病性的, PCV2是引起PMWS的主要病原, 给养猪业带来了严重的经济损失, 是危害全球养猪业的重大疾病^[1]。PCV2主要分为五个亚型, 即PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d和PCV2e^[2]。

流行病学调查结果表明, 我国PCV2的优势流行毒株1999–2002年为基因PCV2a; 从2003年开始优势流行毒株逐渐变为基因PCV2b^[3–4]。本研究在山东地区2016年送检病料进行PCV2流行病学监测的基础上, 对PCV2 PCR阳性病料进行PCV2的分离鉴定, 并获得1株PCV2毒株, 命名为SDWF20107。利用生物学软件DNASTar对该毒株的基因组序列进行比对和系统进化树分析, 确定了分离株的基因亚型, 为山东省猪场中PCV2的基因分型及其变异情况提供了参考资料, 也为该病的分子流行病学调查及防控提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

取病猪场病死猪2头, 剖检并采集病猪的淋巴

结、脾、肺、肾、肠道等器官组织, 一部分用磷酸盐缓冲液研磨提取病毒DNA/RNA进行病毒检测; 一部分置于10%福尔马林溶液中固定, 用于组织病理学检查。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCV2抗体ELISA检测试剂盒(间接法)为韩国金诺公司产品, 病毒DNA或RNA的提取采用北京全式金Easy Pure Viral DNA/RNA提取试剂盒。

1.2 引物设计与合成

根据NCBI发布的猪瘟病毒、猪蓝耳病病毒、猪伪狂犬病病毒及猪2型圆环病毒的全基因序列, 利用Primer Premier 6.0引物设计软件, 设计合成几种病毒的检测引物及PCV2 ORF2基因的全基因扩增引物, 经Blast验证, 初步判定引物具有较好的特异性(表1)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 正常组织与病变组织病理切片对比

将福尔马林固定好的病死猪组织样品和正常猪组织, 以常规方法制作石蜡切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察组织病理学变化。

1.4 病原核酸RT-PCR鉴定

将冻存病死猪的淋巴结、脾、肺、肾、肠道等各取豆粒大组织置于灭菌的匀浆器中, 加入1 mL冰浴的灭菌PBS, 研磨至组织液黏稠、无明显颗粒

表1 用于检测不同病毒的引物序列及反应体系

Table 1 The primers and reaction systems of different viruses

病原 Etiology	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	延伸时间(s) Extension length (s)	扩增大小(bp) Amplification size (bp)	参考文献 References
CSFV	F: TRA CCA YGC AYA TGW CAG AAG TAC C R: AGT CGA CTT CCC TGG TTT CAC TTG	57	40	600	[5]
PRRSV	F: GCG GAT CCA TGC CAA ATA ACA AC R: AGC TCG AGT CAT GCT GAG GGT GA	51	30	372	[5]
PRV	F: CGG ATC CCC GAG CCT CTC CGC CGA GAC R: GAA GGC GTC GAC GGG TCA GGC GGT CAG	68	90	1 245	[5]
PCV2	F: GAA CCG CGG GCT GGC TGA ACT TTT GAA AGT R: GCA CCG CGG AAA TTT CTG ACA AAC GTT ACA	52	120	1 769	[5]
PCV2 Complete RF2	F: AAT GGT ACC ATG ACG TAT CCA AGG AG R: AAT AAG CTT TTA AGT GGG GGG TCT TTA	65	70	702	This work

R=A/G, Y=C/T, W=A/T.

时,将匀浆物转移至灭菌1.5 mL离心管中。而后置于-20 °C冰箱中进行反复冻融3次,匀浆液于9 000 r/min离心3 min后,上清吸入新的灭菌离心管内备用,操作过程严格按照试剂盒说明书进行。取病料样品DNA/RNA,分别对猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、蓝耳病病毒(porcine reproductive respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)和PCV2进行RT-PCR/PCR扩增检测。

1.5 病毒的细胞分离与鉴定

将病料的匀浆液经0.22 μm滤膜过滤后接种于长满单层的PK15细胞,37 °C、5% CO₂的条件下培养,收集盲传10代的PK-15细胞。将细胞瓶置于-20 °C冰箱中反复冻融后,10 000 r/min离心5 min,然后,对细胞上清提取核酸后进行PCR/RT-PCR检测。

1.6 PCV2 ORF2基因遗传进化分析

通过序列同源性分析及系统进化树分析软件:DNASar软件包(Editseq和MegAlign模块)进行基因序列以及氨基酸序列的分析,并进行进化树的构建及分析。

1.7 PCV2免疫程序调整以及抗体检测

首先,改换高效PCV2疫苗,并对猪场PCV2免疫程序进行了调整:种猪免疫程序由之前的一年1次改为一年2次。后备母猪在临配种2个月前免疫1次。仔猪在14日龄免疫1次,断奶后1个月加免1次。对发病时期各个阶段猪群进行采血,共采集96份血清样本进行PCV2抗体水平检测。免疫程序调整后,再次对不同阶段猪采集相同数量的血清样本进行检测,比较综合防治前后的PCV2抗体水平差异。采用IDEXX公司的PCV2抗体检测试剂盒进行PCV2抗体水平检测,具体操作严格按照试剂盒说明书的步骤进行。

2 结果

2.1 临床剖检结果

病猪耳部可见全身皮肤散在红色斑块,在耳部、背部明显(图1A)。剖检病猪发现,肝脏肿大,表面布满灰白色斑点(图1B);肺脏两侧尖叶和心叶均呈肉样实变,隔叶明显肿胀,触摸稍僵硬实(图1C);肾脏表面有白色斑点(图1D);脾脏淤血肿大(图1E);腹股沟淋巴结明显肿大,为正常的3~4倍,灰白色、硬实(图1F)。

2.2 病理组织学检查结果

光镜下,可见肺泡壁增厚,淋巴细胞、巨噬细胞

浸润,肺泡壁毛细血管充血(图2A);肾间质大量淋巴细胞呈灶状或弥漫性浸润增生(图2B);淋巴结内淋巴细胞坏死崩解(图2C);肝间质淋巴细胞浸润,结缔组织增生,呈明显间质性肝炎病变(图2D)。与正常组织相比,各组织有明显的病理变化,同时病理学观察结果符合PCV2引起的间质性肺炎、间质性肾炎以及间质性肝炎的病理性质(图3)。

2.3 病原学检查结果

对采集的病料进行PCV2、CSFV、PRRSV、PRV检测,检测结果显示,送检的病料样品中仅检出了PCV2,其他病毒未检出,结果如图4所示。

2.4 病毒接种细胞后分离与鉴定结果

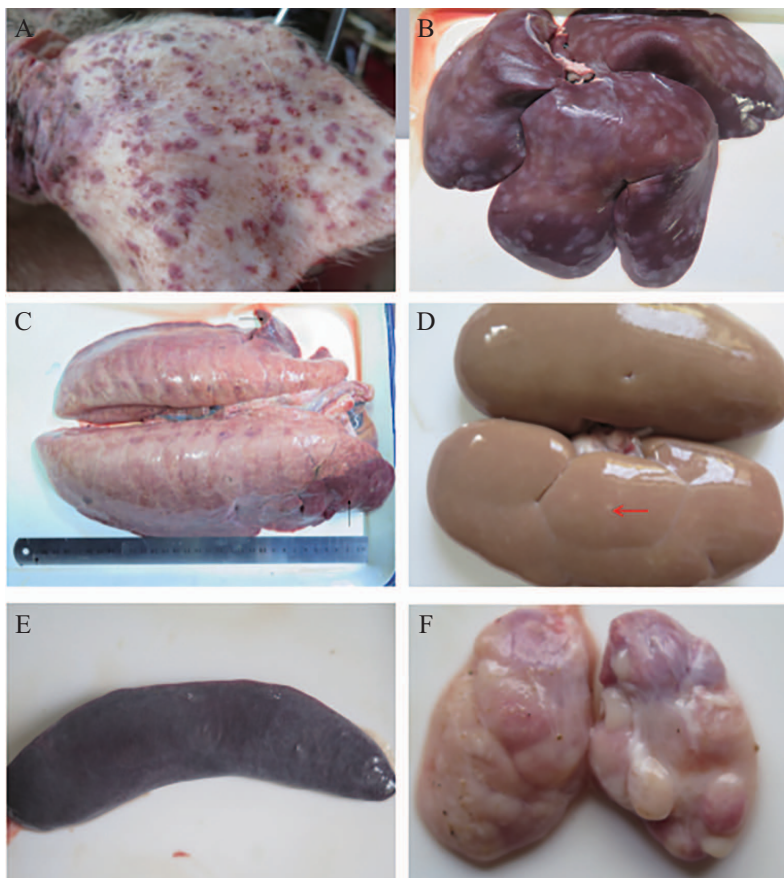
将病料接种到PK15细胞,传代培养后,收取细胞进行PCR/RT-PCR检测,仅有PCV2检出,未检出CSFV、PRRSV和PRV,成功分离到PCV2毒株,并命名为SDWF2017。结果表明,该病料中只有PCV2存在,该猪场发病原因为PCV2感染。

2.5 分离毒株与参考毒株ORF2基因核苷酸及氨基酸序列相似性分析结果

该毒株的ORF2全基因扩增后被测序,扩增片段为702 bp,其中ORF2基因全长为702 bp,共编码233个氨基酸。相似性分析表明,该毒株与其他参考毒株的核苷酸相似性介于77.2%~99.6%(图5),氨基酸相似性介于82.1%~99.6%(图6)。分离株与各基因亚型的参考毒株相比,与2.1d亚型的毒株具有较高的核苷酸(90.5%~99.6%)和氨基酸相似性(97.0%~99.6%);而与2.1e亚型的参考毒株具有较低的核苷酸(84.0%~84.3%)和氨基酸相似性(82.1%~82.5%)。其中,SDWF2017与AY181947 2.1d亚型参考毒株(SD毒株)的相似性最高,核苷酸为99.6%,氨基酸为99.6%。

2.6 分离毒株与参考毒株氨基酸序列比对

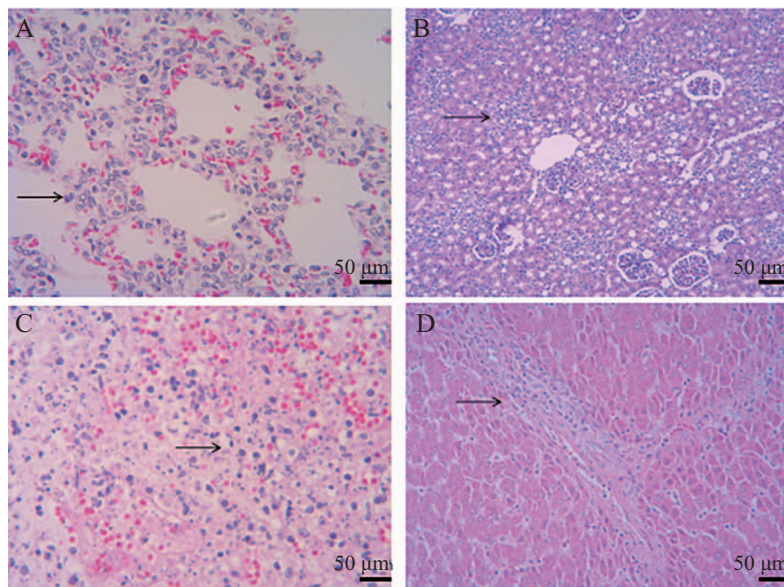
SDWF2017分离毒株ORF2与已发表的国内外毒株ORF2推导的氨基酸序列进行比对,由图7可知,分离毒株的ORF2氨基酸序列与氨基酸同源性最接近的AY181947 2.1d亚型参考毒株(SD毒株)相比,只在12位氨基酸发生了由H替代R的改变,其他位点无变化。分离毒株的ORF2氨基酸序列除了在12位氨基酸发生改变,还分别在35、53、63、90、101、151、206、215位发生了单个氨基酸的替换。2.1e亚型的ORF2氨基酸序列的变化最大,主要集中在47~64氨基酸残基、106~137氨基酸残基和190~233



A: 耳部红色斑块; B: 肝脏布满白斑; C: 肺脏肿大, 实变; D: 肾脏出现白点; E: 脾脏肿大; F: 腹股沟淋巴结肿大。
A: ear red patches; B: the liver is full of white spot; C: lung swelling, consolidation; D: kidney white spots; E: the spleen; F: inguinal lymph node enlargement.

图1 病猪的剖检病变

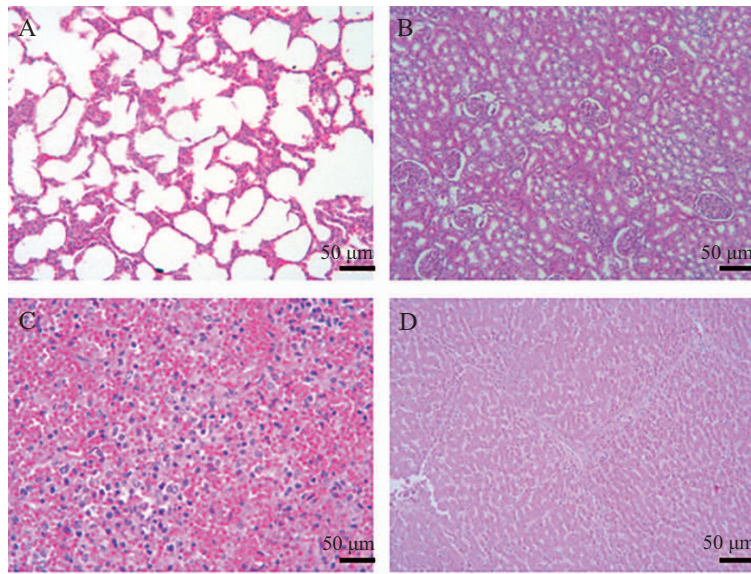
Fig.1 Autopsylesions of the pigs



A: 间质性肺炎症状; B: 间质性肾炎症状; C: 淋巴细胞坏死崩解; D: 间质性肝炎症状。
A: symptoms of interstitial pneumonia; B: symptoms of interstitial nephritis; C: the lymphocyte necrosis collapse; D: interstitial hepatitis symptoms.

图2 病猪的组织病理学变化

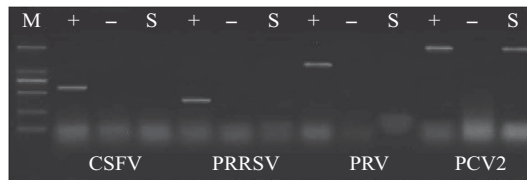
Fig.2 Histopathological changes of the pigs



A: 正常肺脏; B: 正常肾脏; C: 正常淋巴结; D: 正常肝脏。
A: normal lung; B: normal kidney; C: the normal lymph nodes; D: the normal liver.

图3 健康猪的组织病理学观察

Fig.3 Histopathological observation of healthy pigs



M: DL2000 DNA标记; +: 阳性对照; -: 阴性对照; S: 待检样品。
M: DL2000 DNA marker; +: positive control; -: negative control; S: inspected sample.

图4 病料样品中相关病原的检测结果

Fig.4 Etiological detection results of the pigs

		Percent identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	█	97.4	91.7	89.8	89.8	90.1	98.2	85.0	85.1	84.8	84.8	85.0	97.7	91.0	93.1	97.7	98.2	93.6	95.0	95.6	1	EF524517.2.1d.seq
	2	2.6	█	91.5	89.2	89.2	89.5	99.0	84.4	84.5	84.3	84.3	84.4	97.7	90.5	93.1	97.7	98.2	93.0	93.3	93.6	2	EF524539.2.1d.seq
	3	8.8	9.1	█	86.9	86.9	86.6	91.5	81.6	82.3	81.8	81.8	81.9	91.7	95.4	93.0	92.5	92.2	95.0	92.0	92.3	3	EU136711.2.1a.seq
	4	11.0	11.6	14.4	█	86.9	89.1	89.1	84.7	85.1	84.8	85.0	85.0	89.6	88.5	91.0	90.8	90.1	86.6	89.9	90.3	4	EU148503.2.1c.seq
	5	11.0	11.6	14.4	0.6	█	99.1	89.1	84.8	85.2	85.0	85.1	85.1	89.6	88.5	91.3	90.8	90.1	86.6	90.0	90.5	5	EU148504.2.1c.seq
	6	10.7	11.3	14.8	0.9	0.9	█	89.4	84.8	85.2	85.0	85.1	85.1	89.9	88.2	91.3	91.1	90.4	87.0	90.2	90.6	6	EU148505.2.1c.seq
	7	1.9	1.0	9.1	11.8	11.8	11.5	█	84.5	84.7	84.4	84.4	84.5	97.3	91.0	93.6	97.3	97.7	93.0	94.0	94.6	7	KP698402.2.1d.seq
	8	16.8	17.5	21.1	17.2	17.0	17.3	█	99.2	99.6	99.6	99.7	99.7	84.1	76.7	77.2	84.7	84.4	84.6	82.8	83.0	8	KT795287.2.1e.seq
	9	16.6	17.3	20.2	16.6	16.5	16.5	17.1	0.8	█	99.3	99.3	99.4	84.3	77.2	77.7	85.1	84.5	85.3	83.2	83.5	9	KT795288.2.1e.seq
	10	17.0	17.7	20.9	17.0	16.8	16.8	17.5	0.4	0.7	█	99.7	99.9	84.0	76.9	77.4	84.8	84.3	84.8	82.9	83.2	10	KT795289.2.1e.seq
	11	17.0	17.7	20.9	16.8	16.6	16.6	17.5	0.4	0.7	0.3	█	99.9	84.3	76.9	77.4	84.8	84.5	84.8	82.9	83.2	11	KT795290.2.1e.seq
	12	16.8	17.5	20.7	16.8	16.6	16.6	17.3	0.3	0.6	0.1	0.1	█	84.1	76.9	77.4	85.0	84.4	84.9	83.0	83.3	12	KT870146.2.1e.seq
	13	2.3	2.3	8.8	11.1	11.1	10.8	2.7	17.9	17.7	18.1	17.7	17.9	█	90.8	92.8	98.0	99.6	93.6	93.6	93.9	13	SDWF2017.seq
	14	9.6	10.1	4.8	12.5	12.5	12.6	9.6	28.0	27.2	27.6	27.6	27.6	9.8	█	93.3	91.3	91.6	92.3	93.0	93.3	14	AF055392.2.1a.seq
	15	7.2	7.2	7.3	9.5	9.2	9.2	6.7	27.3	26.5	26.9	26.9	26.9	7.5	7.0	█	94.1	93.6	92.8	99.5	100.0	15	AF055394.2.1b.seq
	16	2.3	2.3	8.0	9.8	9.8	9.5	2.7	17.2	16.6	17.0	17.0	16.8	2.0	9.3	6.1	█	98.4	94.0	95.0	95.3	16	AY181946.2.1d.seq
	17	1.9	1.9	8.3	10.7	10.7	10.3	2.3	17.5	17.3	17.7	17.3	17.5	0.4	9.0	6.7	1.6	█	94.0	94.0	94.3	17	AY181947.2.1d.seq
	18	6.7	7.3	5.2	14.8	14.8	14.2	7.3	17.2	16.3	17.1	17.1	16.9	6.7	8.2	7.6	6.2	6.2	█	92.5	92.7	18	AY874169.2.1a.seq
	19	5.2	7.0	8.4	10.9	10.7	10.5	6.2	19.6	19.1	19.4	19.4	19.3	6.7	7.3	0.5	5.2	6.2	8.0	█	99.1	19	DQ629118.2.1b.seq
	20	4.6	6.7	8.1	10.4	10.2	10.0	5.6	19.3	18.7	19.1	19.1	18.9	6.4	7.0	0.0	4.9	5.9	7.6	0.9	█	20	DQ923524.2.1b.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			

图5 SDEF2017与19个参考毒株ORF2基因核苷酸序列的相似性

Fig.5 Nucleotide similarities between SDWF2017 and 19 reference strains of ORF2 gene

氨基酸残基上; 其次为2.1c变化较大, 主要集中在47~64氨基酸残基和200~213氨基酸残基上; 其他亚型变化不大, 只是单个氨基酸的替换。结果表明, 该猪场PCV2致病毒株的氨基酸序列发生突变, 推测该毒株在传统疫苗免疫压力下发生了适应性进化。并

且PCV2各亚型中, 2.1e亚型氨基酸序列突变最多。

2.7 分离毒株与参考毒株ORF2基因系统发育进化树分析结果

将新分离毒株SDWF2017与19株参考序列构建进化树。结果显示, 这19株序列被分到了5个基因亚

		Percent identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	96.1	94.4	93.1	98.3	99.6	95.3	94.8	92.3	88.8	89.3	89.3	95.7	84.1	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0	94.0	93.6	1	AF055394 2.1b.pro
	2	4.0	98.3	92.3	95.3	95.7	96.6	96.7	93.6	89.3	89.7	89.7	93.6	83.8	83.8	83.8	83.8	83.8	83.8	97.9	93.1	2	AY181947 2.1d.pro
	3	5.8	1.7	91.4	93.6	94.0	97.4	97.9	92.7	88.0	88.5	88.5	97.0	82.9	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	99.6	92.3	3	AY181947 2.1d.pro
	4	7.2	8.2	9.1	92.3	92.7	91.0	91.0	97.0	84.5	85.0	85.0	90.6	83.3	85.0	84.1	84.1	84.1	84.1	91.0	95.3	4	AY874169 2.1a.pro
	5	1.7	4.9	6.7	8.2	98.7	94.4	94.0	91.4	87.6	88.0	88.0	94.0	83.3	84.1	84.1	84.1	84.1	84.1	93.1	92.7	5	DQ629118 2.1b.pro
	6	0.4	4.4	6.3	7.7	1.3	95.7	94.4	91.8	88.4	88.8	88.8	95.3	83.7	84.5	84.5	84.5	84.5	84.5	93.6	93.1	6	DQ923524 2.1b.pro
	7	4.9	3.5	2.6	9.6	5.8	4.4	97.0	92.3	87.6	88.0	88.0	97.9	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	97.0	92.7	7	EF524517 2.1d.pro
	8	5.3	1.3	2.2	9.6	6.3	5.8	3.1	92.3	88.0	88.5	88.5	99.1	83.8	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	97.4	91.8	8	EF524539 2.1d.pro
	9	8.2	6.7	7.7	3.1	9.1	8.7	8.2	8.2	84.5	85.0	85.0	91.8	82.0	83.7	82.8	82.8	82.8	82.8	92.3	96.1	9	EU136711 2.1a.pro
	10	12.1	11.6	13.1	17.3	13.6	12.6	13.6	13.1	17.3	99.6	99.6	87.6	86.3	87.2	87.2	87.2	87.2	87.2	87.6	85.4	10	EU148503 2.1c.pro
	11	11.6	11.1	12.6	16.8	13.1	12.1	13.1	12.6	16.8	0.4	100.0	88.0	86.8	87.6	87.6	87.6	87.6	87.6	88.0	85.8	11	EU148504 2.1c.pro
	12	11.6	11.1	12.6	16.8	13.1	12.1	13.1	12.6	16.8	0.4	0.0	88.0	86.8	87.6	87.6	87.6	87.6	87.6	88.0	85.8	12	EU148505 2.1c.pro
	13	4.4	2.2	3.1	10.1	6.3	4.9	2.2	0.9	8.7	13.6	13.1	13.1	83.8	83.3	83.3	83.3	83.3	96.6	92.3	13	KP698402 2.1d.pro	
	14	17.9	18.9	19.5	19.0	19.0	18.4	18.9	18.4	20.7	15.1	14.6	14.6	18.4	97.9	99.2	99.2	99.2	99.2	82.5	82.4	14	KT795287 2.1e.pro
	15	16.8	18.4	20.0	16.8	17.9	17.3	18.9	18.9	18.4	14.1	13.6	13.6	18.9	2.1	98.7	98.7	98.7	82.1	83.3	15	KT795288 2.1e.pro	
	16	16.8	18.4	20.0	17.9	17.9	17.3	18.9	18.9	19.5	14.1	13.6	13.6	18.9	0.8	1.3	100.0	100.0	82.1	83.3	16	KT795289 2.1e.pro	
	17	16.8	18.4	20.0	17.9	17.9	17.3	18.9	18.9	19.5	14.1	13.6	13.6	18.9	0.8	1.3	0.0	100.0	82.1	83.3	17	KT795290 2.1e.pro	
	18	16.8	18.4	20.0	17.9	17.9	17.3	18.9	18.9	19.5	14.1	13.6	13.6	18.9	0.8	1.3	0.0	0.0	82.1	83.3	18	KT870146 2.1e.pro	
	19	6.3	2.2	0.4	9.6	7.2	6.7	3.1	2.6	8.2	13.6	13.1	13.1	3.5	20.0	20.6	20.6	20.6	20.6	91.8	19	SDWF2017.pro	
	20	6.7	7.2	8.2	4.9	7.7	7.2	7.7	8.7	4.0	16.3	15.7	15.7	8.2	20.1	19.0	19.0	19.0	19.0	8.7	20	AF055392 2.1a.pro	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			

图6 SDWF2017与19个参考毒株ORF2推导氨基酸序列的相似性

Fig.6 Amino acid similarities between SDWF2017 and 19 reference strains of ORF2

		Majority																																																																															
		10	20	30	40	50	60	70	80																																																																								
1H.....H.....I.....R.....																																																																															SDWF2017.pro	
1I.....I.....R.....																																																																															AY181947 2.1d.pro	
1I.....R.....H.....																																																																															EF524539 2.1d.pro	
1F.....L.....																																																																															EU136711 2.1a.pro	
1H.....A.....S.V...N.SQ.SF.....Q.....																																																																															EU148503 2.1c.pro	
1H.....A.....S.V...N.SQ.SF.....Q.....																																																																															EU148504 2.1c.pro	
1H.....A.....S.V...N.SQ.SF.....Q.....																																																																															EU148505 2.1c.pro	
1R.....K.....H.....																																																																															KP698402 2.1d.pro	
1A.....S.V...VTS...P.....G.....																																																																															KT795287 2.1e.pro	
1A.....S.V...VTS...P.....G.....																																																																															KT795288 2.1e.pro	
1A.....S.V...VTS...P.....G.....																																																																															KT795289 2.1e.pro	
1A.....S.V...VTS...P.....G.....																																																																															KT795290 2.1e.pro	
1A.....S.V...VTS...P.....G.....																																																																															KT870146 2.1e.pro	
1R.....K.....K.D.V.....																																																																															AF055392 2.1a.pro	
1R.....K.....																																																																															AF055394 2.1b.pro	
1I.....R.....																																																																															AY181946 2.1d.pro	
1F.....L.....V.....																																																																															AY874169 2.1a.pro	
1I.....R.....																																																																															DQ629118 2.1b.pro	
1I.....R.....K.....																																																																															DQ923524 2.1b.pro	
1I.....R.....K.....																																																																															EF524517 2.1d.pro	
		Majority																																																																															
		90	100	110	120	130	140	150	160																																																																								
81T.....I.....P.....																																																																															SDWF2017.pro	
81T.....I.....P.....																																																																															AY181947 2.1d.pro	
81T.....I.....P.....																																																																															EF524539 2.1d.pro	
81T.KI.I.....P.....																																																																															EU136711 2.1a.pro	
81T.....FAR.....N.....																																																																															EU148503 2.1c.pro	
81T.....FAR.....N.....																																																																															EU148504 2.1c.pro	
81T.....FAR.....N.....																																																																															EU148505 2.1c.pro	
81T.....N.....P.....																																																																															KP698402 2.1d.pro	
81T.....FAR.....E.....S.....N.TNN.S.....																																																																															KT795287 2.1e.pro	
81T.....FAR.....E.....S.....N.TNN.S.....																																																																															KT795288 2.1e.pro	
81T.....FAR.....E.....S.....N.TNN.S.....																																																																															KT795289 2.1e.pro	
81T.....FAR.....E.....S.....N.TNN.S.....																																																																															KT795290 2.1e.pro	
81T.....FAR.....E.....S.....N.TNN.S.....																																																																															KT870146 2.1e.pro	
81T.KI.I.....P.....																																																																															AF055392 2.1a.pro	
81R.....S.....																																																																															AF055394 2.1b.pro	
81T.....P.....																																																																															AY181946 2.1d.pro	
81T.KI.I.....S.....T.....P.....																																																																															AY874169 2.1a.pro	
81T.....I.....H.....P.....																																																																															EF524517 2.1d.pro	
		Majority																																																																															
		170	180	190	200	210	220	230																																																																									
161K.....I.....																																																																															SDWF2017.pro	
161K.....I.....																																																																															AY181947 2.1d.pro	
161E.....I.....																																																																															EF524539 2.1d.pro	
161K.....SA.....K.....K.....																																																																															EU136711 2.1a.pro	
161S.....M.....H.Q...HA.A.V.....																																																																															EU148503 2.1c.pro	
161S.....M.....H.Q...HA.A.V.....																																																																															EU148504 2.1c.pro	
161S.....M.....H.Q...HA.A.V.....																																																																															EU148505 2.1c.pro	
161I.....I.....																																																																															KP698402 2.1d.pro	
161S.....I.....QH.TA.A.V.L.....M.....PSPLSYM																																																																															KT795287 2.1e.pro	
161S.....I.....QH.TA.A.V.L.....M.....PSPLSYM																																																																															KT795288 2.1e.pro	
161I.....S.....I.....QH.TA.A.V.L.....M.....PSPLSYM																																																																															KT795289 2.1e.pro	
161I.....S.....I.....QH.TA.A.V.L.....M.....PSPLSYM																																																																															KT795290 2.1e.pro	
161I.....S.....I.....QH.TA.A.V.L.....M.....PSPLSYM																																																																															KT870146 2.1e.pro	
161S.....A.....K.....K.....																																																																															AF055392 2.1a.pro	
161S.....I.....E.....																																																																															AF055394 2.1b.pro	
161G.....SA.....K.....K.....																																																																															AY181946 2.1d.pro	
161S.....A.....I.....E.....																																																																															AY874169 2.1a.pro	
161S.....I.....E.....																																																																															DQ629118 2.1b.pro	
161S.....I.....E.....																																																																															DQ923524 2.1b.pro	
161K.....I.....																																																																															EF524517 2.1d.pro	

图7 SDWF2017分离毒株与已发表毒株ORF2推导氨基酸序列的比对

Fig.7 Comparison of deduced amino acid sequences of SDWF2017 isolates ORF2 with other isolates

群(2.1a、2.1b、2.1c、2.1d、2.1e)。此次分离得到的SDWF2017毒株在进化树中属于2.1d亚型,与2.1b亚型处在一个大的分支,但与2.1e亚型属于不同分支(图8)。结果表明,该猪场PCV2致病毒株属于2.1d

亚型,与2.1e亚型属于不同分支,有很大的差异。

2.8 猪场进行综合防治后结果对比

由表2可知,共采取发病时期血清样本96份,其中阳性血清66份,整体阳性率为68.75%,阳性率较

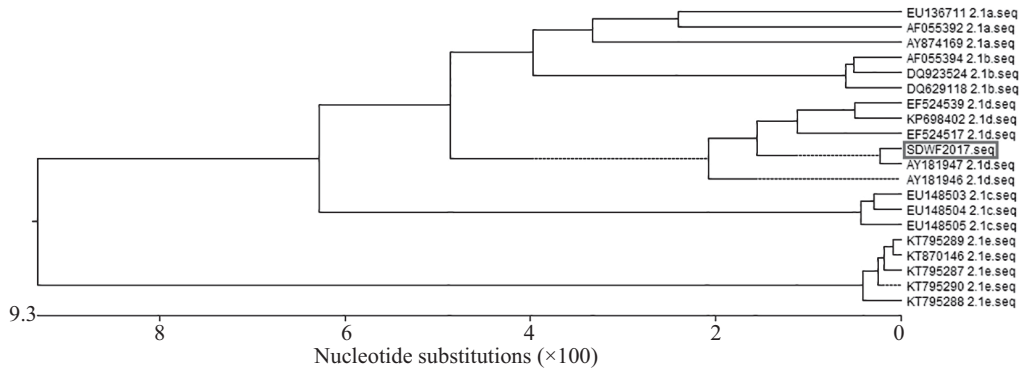


图8 分离株与参考毒株的进化树分析结果

Fig.8 Phylogenetic analysis of SDWF2017 and the reference strains

表2 发病时期不同阶段猪群PCV2抗体水平

Table 2 Anti-PCV2 antibody levels of pigs from different production phases in occurrent time

猪群类别 Classification of pig herd	血清数(份) Serum (portion)	阳性数(份) Positive number (share)	阳性率(%) Positive rate (%)	平均S/P值 The average S/P value	离散度(##%) Dispersion rate (##%)
Service boar	14	11	78.57	0.85	42.56
Replacement gilt	8	6	75.00	1.02	28.30
Multiparous sows	33	25	75.76	0.95	43.23
Suckling pig	8	5	62.50	0.79	41.23
Nursery pig	25	13	52.00	0.49	55.74
Fattening pigs	8	6	75.00	0.63	38.15

#: 离散度=标准方差/抗体平均值 $\times 100\%$, 该值反映猪群抗体水平的离散度, 变异系数越大表示抗体水平越不均匀。

#: dispersion=standard variance/antibody mean $\times 100\%$, which reflects the dispersion degree of the antibody level of the pig group, and the larger the variation coefficient indicates that the antibody level is more uneven.

表3 后期不同阶段猪群PCV2抗体水平

Table 3 Anti-PCV2 antibody levels of pigs from different production phases in later period

猪群类别 Classification of pig herd	血清数(份) Serum (portion)	阳性数(份) Positive number (share)	阳性率(%) Positive rate (%)	平均S/P值 The average S/P value	离散度(##%) Dispersion rate (##%)
Service boar	14	12	85.71	1.02	40.67
Replacement gilt	8	7	87.50	1.13	25.00
Multiparous sows	33	29	87.89	1.25	33.01
Suckling pig	8	6	75.00	0.89	40.23
Nursery pig	25	17	68.00	0.66	43.16
Fattening pigs	8	6	75.00	0.63	38.15

#: 离散度=标准方差/抗体平均值 $\times 100\%$, 该值反映猪群抗体水平的离散度, 变异系数越大表示抗体水平越不均匀。

#: dispersion=standard variance/antibody mean $\times 100\%$, which reflects the dispersion degree of the antibody level of the pig group, and the larger the variation coefficient indicates that the antibody level is more uneven.

低。种公猪、后备母猪以及育肥猪抗体达到合格水平, 但是哺乳仔猪和育肥猪PCV2抗体水平差, 说明PCV2疫苗在哺乳期和保育期未能起到良好的保护力, 所以在保育期发病。

进行综合防治后, 对各个阶段猪群再次采集相同数量血清。由表3可知, 后期共采取血清96份, 其

中阳性血清77份, 整体阳性率为80.21%, 与发病时期比较, 阳性率上升10.42%。不同阶段猪群抗体阳性率在64.00%~87.89%之间, 平均S/P值在0.56~1.25之间。各个阶段猪群PCV2抗体在阳性率、平均S/P值以及离散度等方面均有提升。在综合防治后, 猪场保育猪发病率和病死率显著下降, 病猪群逐渐恢复

且疫情消除, 猪场恢复了正常的生产。

3 讨论

猪圆环病毒病是国际上公认的危害养猪业的重要传染病之一, 其主要特征为体质下降、消瘦、贫血、黄疸、生长发育受阻、腹泻、呼吸困难、母猪繁殖障碍及特有的内脏器官与皮肤病变等^[7]。该猪场保育中期猪群发生以生长发育不良、进行性消瘦、部分猪只呼吸道症状、全身性淋巴结肿大、衰竭无力、皮肤与可视黏膜苍白、病猪体表散在红色斑块等临床症状, 病理学检查发现, 病死猪有急性间质性肺炎、间质性肾炎、间质性肝炎及淋巴结坏死增生性病变, 符合PCVD的病变特征, 采集的病料PCV2检出阳性, 并分离到一株PCV2。本研究中, 我们利用PCV2 ORF2基因^[8]全长构建了系统发育进化树, 发现分离株与AY181947 2.1d亚型参考毒株(SD毒株)具有较高的核苷酸(90.5%~99.6%)和氨基酸相似性(97.0%~99.6%)。另外, 新分离株与2.1b亚型的同源性高于2.1a、2.1c以及2.1e, 表明2.1d亚型和2.1b亚型具有较高的相似度, 这与之前的报道一致^[6]。结果表明, 该猪场PCV2致病毒株与2.1d亚型具有最高的核苷酸和氨基酸相似性, 并且与2.1b亚型也有较高的相似性。因而可以判定造成该场猪圆环病毒疫情发生和流行的毒株属于2.1d亚型。

该猪群发病率为20%左右(78/380), 病死率为15%左右(12/78), 病死率较高, 仅为单一圆环病毒感染, 并不能引起如此高的病死率。对猪瘟病毒、猪蓝耳病病毒及猪伪狂犬病毒也进行了检测, 检测结果为阴性, 并不存在这些病毒感染。因此, 我们怀疑有细菌性疾病混合感染, 从肺部剖检病变看, 该猪群确实伴有支原体肺炎感染。该猪群不能排除还有副猪嗜血杆菌以及胸膜肺炎放线杆菌等混合感染的可能, 并存在其他应激诱发因素。基于此, 首先加强了猪场的饲养管理, 改善环境卫生, 健全生物安全措施, 降低保育猪饲养密度。饲料中额外添加多维生素及氨基酸, 饲料中还添加了替米考星和黄芪多糖以防治呼吸道细菌感染并增强机体免疫力^[9]。另外, 调整优化了猪场PCV2的免疫程序, 并对免疫效果进行了检测评估, PCV2抗体水平明显提高。结果说明, 对猪场进行的一系列综合防治, 对预防PCV2具有很大的作用。

由于本研究的局限性, 未能对该毒株的分子生物学特性、抗原性及病毒毒力等进行更深入的探究, 但是可以推测该毒株在传统疫苗免疫压力下发生了适应性进化, 使猪圆环病毒疫苗免疫效果有所下降。对本地PCV2流行毒株分离鉴定及基因遗传变异研究, 对于研制更具针对性的候选疫苗研制具有重要的意义^[10]。本研究确定了分离毒株属于2.1d亚型, 为山东省猪场中PCV2的基因分型及其变异情况提供了参考资料, 也为该病的分子流行病学调查及防控提供了理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Cortey M, Olvera A, Grau-Roma L, Segalés J. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) geno type definition and nomenclature. *Vet Microbiol* 2011; 149(3/4): 522-3.
- 2 Ramamoorthy S, Huang FF, Huang YW, Meng XJ. Interferon-mediated enhancement of *in vitro* replication of porcine circovirus type 2 is influenced by an interferon-stimulated response element in the PCV2 genome. *Virus Res* 2009; 145(2): 236-43.
- 3 Zhang D, He K, Wen L. Genetic and phylogenetic analysis of a new porcine circovirus type 2 (PCV2) strain in China. *Arch Virol* 2015; 160(12): 3149-51.
- 4 Yang S, Yin S, Shang Y, Liu B, Yuan L, Zafar Khan MU, *et al.* Phylogenetic and genetic variation analyses of porcine circovirus type 2 isolated from China. *Transbound Emerg Dis* 2017; 65(2): e383-92.
- 5 古金元, 吕 林, 胡东方. 一起猪蓝耳病与局部水肿病混合感染病例的综合诊断与防治. *猪业科学*(Gu JinYuan, Lu Lin, Hu Dongfang. Together with local edema disease of blue ear pig disease comprehensive diagnosis and prevention and control of mixed infection cases. *Journal of Pig Industry Science*) 2016; 33(4): 71-3.
- 6 冯丽苹, 张洪亮, 刘春晓. 2015年我国部分地区2.1d新基因亚型猪瘟病毒的分子流行病学分析. *中国预防兽医学报*(Feng Liping, Zhang Hongliang, Liu Chunxiao. 2015, 2.1 d parts of our country new gene subtype of swine fever virus molecular epidemiology analysis. *Chinese Journal of Preventive Veterinary*) 2015; 37(9): 651-5.
- 7 Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, Tang MH, Wang FG, Li XJ, *et al.* Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control. *Virol J* 2014; 11: 88.
- 8 Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol J* 2010; 7: 273.
- 9 陶 平. 兽药和饲料添加剂在畜产品中的残留原因及控制措施. *中国畜牧兽医文摘*(Tao Ping. Residues of veterinary drugs and feed additives in livestock causes and control measures, *Journal of China Animal Husbandry and Veterinary Abstract*) 2014; 7: 178.
- 10 Liu C, Liu Y, Chen H, Feng H, Chen Y, Wang Y, *et al.* Genetic and immunogenicity analysis of porcine circovirus type 2 strains isolated in central China. *Arch Virol* 2018; 163(4): 937-46.