doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.9.02

青海省海北州藏羊群中牛病毒性腹泻病毒和羊边界病毒的流行病学调查

陈云政[1], 保广财[1], 张生祥[2], 韩 梅[1]

(1.青海省门源县农牧和科技局, 青海门源 810300; 2.青海省门源县东川镇克图畜牧兽医站,青海门源 810300)

[收稿日期] 2017-03-10 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2017) 09-0007-05 [中图分类号]S852.65

[摘 要] 为掌握青海省海北州藏羊群中牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和羊边界病毒(BDV)的感染情况,采用 RT-PCR 方法分别对青海省海北州的 161 份健康藏羊血清样品和 34 份腹泻藏羊组织样品进行了 BVDV 和 BDV 的抗原核酸检测。结果显示:195 份样品中 BVDV 和 BDV 总阳性率分别为 29.74%和 14.36%;161 份健康藏羊血清样品中 BVDV 和 BDV 平均阳性率分别为 26.71%和 11.80%,BVDV/BDV 混合感染率为 4.35%;34 份腹泻藏羊组织样品中 BVDV 和 BDV 平均阳性率分别为 44.12%和 26.47%,BVDV/BDV 混合感染率为 17.65%。本研究表明青海省海北州健康藏羊群和腹泻藏羊群中均存在 BVDV、BDV 的单独感染以及混合感染,且感染情况在个别养殖场(户)较为严重。

[关键词] 藏羊;牛病毒性腹泻病毒;羊边界病毒;流行病学调查

Epidemiological Investigation of Bovine Viral Diarrhea Virus and Sheep Boundary Virus in Tibetan Sheep in Haibei Area, Qinghai Province

CHEN Yun-zheng[1], BAO Guang-cai[1], ZHANG Sheng-xiang[2], HAN Mei[1]

(1. *Menyuan County of Qinghai Province Agriculture and Animal Husbandry Science and Technology Bureau, Menyuan, Qinghai* 810300, *China*; 2. *Menyuan County of Qinghai Province Town of Dongchuan Animal Husbandry and Veterinary Station of Timbuktu, Menyuan, Qinghai* 810300, *China*)

Abstract: To master the situation of bovine viral diarrhea virus and sheep border virus infection in Tibetan sheep in Haibei area of Qinghai province, this research uses the RT-PCR method to detect 161 healthy Tibetan sheep serum samples and 34 diarrhea Tibetan sheep tissue samples for antigen nucleic acid detection of BVDV and BDV in Haibei area of Qinghai province. The results showed that 195 copies of BVDV and BDV in the sample of total positive rates were 29.74% and 14.36%; 161 healthy Tibetan sheep serum samples BVDV and BDV average positive rates were 26.71% and 11.80%, BVDV/BDV mixed infection rate was 4.35%; 34 diarrhea Tibet sheep BVDV and BDV tissue samples average positive rate was 44.12% and 26.47%, BVDV/BDV mixed infection rate was 17.65%. This study shows that BVDV and BDV infection alone or mixed infection in health area and Tibetan diarrhea sheep in Haibei area of Qinghai province is in existence, and infection in individual farms (households)

基金项目: 绒毛用羊产业技术体系(CARS-40-34)

作者简介: 陈云政,兽医师,从事畜牧兽医研究。E-mail:3132809011@qq.com

is more serious, the study provides guidance for comprehensive prevention and control measures in Qinghai Tibetan sheep, which enrich the epidemiologic information of BVDV and BDV in China sheep.

Key words: Tibetan sheep; bovine viral diarrhea virus; sheep border virus; epidemiological survey

牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)和羊边界病毒(Border disease virus, BDV)同属于黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(Pestivirus),分别是牛病毒性腹泻病(Bovine viral diarrhea, BVD)和羊边界病(Border disease, BD)的致病原[1]。BVDV 除感染牛外,还可感染羊、猪以及野生动物,羊感染 BVDV 后可引起腹泻、母畜流产、死胎和畸胎等[2-3]。BDV 主要感染绵羊和山羊,偶有牛、猪和野生反刍动物的感染,羊感染 BDV 后可引起母羊不孕、流产、产死胎和畸形胎等繁殖障碍和羔羊畸形发育、顽固性腹泻等[4-5]。BVDV 和 BDV 感染均可造成持续性感染和免疫抑制,持续性感染使病畜常年带毒、排毒,成为畜群中的传染源,并可降低机体的免疫力,导致其他病原体的混合和继发感染。藏羊为我国青藏高原所特有畜种,是我国三大原始绵羊品种之一[6]。为调查研究藏羊群中 BVDV 与 BDV 的感染现状,丰富我国羊群中 BVDV 与 BDV 感染的流行病学资料,为藏羊群中 BVDV 和 BDV 综合防控措施的制定提供指导依据,有效保护青海藏羊及藏羊养殖业的健康发展,本研究首次对采集自青海省海北州健康藏羊和腹泻藏羊共计 195 份样品进行了 BVDV 和 BDV 的流行病学调查。

1　材料与方法

1.1　样品来源　2014 年 10 月至 2016 年 6 月,采自青海省海北州 6 个规模养殖场和 8 个散养户的健康藏羊血清样品 161 份,腹泻藏羊组织样品 34 份,检测样品共计 195 份。

1.2　主要试剂　一步法 RT-PCR 扩增试剂盒、DL-2000 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;病毒基因组 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物科技有限公司。

1.3　引物设计与合成　参照参考文献[7-8]中的方法,分别设计 BVDV 和 BDV 的特异性检测引物(表 1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1　引物序列表

Tab 1　Primer sequences

病原 Pathogeny	引物序列 Primer sequence	扩增长度 Amplification length
BVDV	P1:5′-AGGGACAAATCCTCCTTAGC-3′ P2:5′-GCCTCTGCAGCACCCTATC-3′	279 bp
BDV	P3:5′-TCGTGGTGAGATCCCTGAG-3′ P4:5′-GCAGAGATTTTTATACTAGCCTATAC-3′	225 bp

1.4　病毒基因组 RNA 的提取　按病毒基因组 RNA 提取试剂盒说明书分别提取 195 份检测样品的病毒基因组 RNA。

1.5　RT-PCR 扩增与检测　参照一步法 RT-PCR 扩增试剂盒使用说明书,以提取的病毒 RNA 为模板,参考文献[7-8]中的方法进行 BVDV 和 BDV 的 RT-PCR 扩增反应(表 2),RT-PCR 扩增结束后,取扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

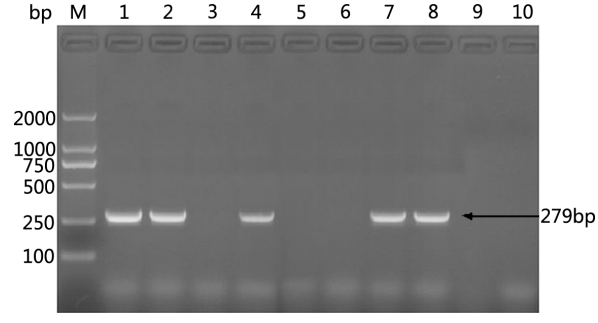
表 2　RT-PCR 扩增参数

Tab 2　RT-PCR amplification parameters

病原 Pathogeny	RT-PCR 反应体系 RT-PCR reaction system	RT-PCR 反应程序 RT-PCR reaction program
BVDV	2 X Buffer 12.5 μL、引物 P1、P2 各 0.5 μL、RNA 5 μL、酶 0.5 μL、水 6 μL	50 ℃ 30 min;94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 10min。
BDV	2 X Buffer 12.5 μL、引物 P3、P4 各 0.5 μL、RNA 5 μL、酶 0.5 μL、水 6 μL	50 ℃ 30 min;94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。

2　结果与分析

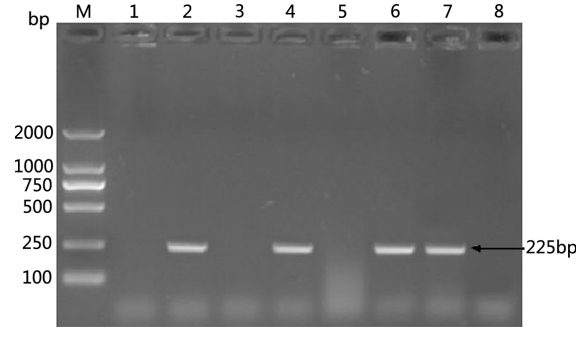
2.1　全部样品检测结果　分别采用 RT-PCR 方法对 2014~2016 年采自青海省海北州的 195 份样品进行了 BVDV 和 BDV 的检测,共检出 BVDV 阳性样品 58 份(部分样品的电泳图见图 1),总阳性率为 29.74%;共检出 BDV 阳性样品 28 份(部分样品的电泳图见图 2),总阳性率为 14.36%。



M 为 DL-2 000 Marker; 1.2.4.7.8 为阳性样品 PCR 产物;
3.5.6.9.10 为阴性样品 PCR 产物
M. DL-2 000 Marker; 1.2.4.7.8 Positive sample PCR product;
3.5.6.9.10 Negative sample PCR product

图 1　部分样品 BVDV RT-PCR 检测结果

Fig 1　BVDV RT-PCR results of some samples



M 为 DL-2 000 Marker; 2.4.6.7 为阳性样品 PCR 产物;
1.3.5.8 为阴性样品 PCR 产物
M. DL-2 000 Marker; 2.4.6.7 Positive sample PCR product;
1.3.5.8 Negative sample PCR product

图 2　部分样品 BDV RT-PCR 检测结果

Fig 2　BDV RT-PCR results of some samples

2.2　健康样品检测结果　采用 RT-PCR 方法分别对 161 份健康藏羊血清样品进行了 BVDV 和 BDV 抗原核酸的检测,结果如表 3 所示,BVDV 阳性率在 0~66.67%之间,平均阳性率为 26.71%;BDV 阳性率在 0~44.44%之间,平均阳性率为 11.80%;其中 BVDV/BDV 混合感染样品数为 7 份,混合感染率为 4.35%。该结果表明青海省不同地区的健康藏羊群已经存在 BVDV、BDV 感染,且感染在个别养殖场或散养户较为严重,同时存在 BVDV 与 BDV 的混合感染。

2.3　腹泻样品检测结果　如表 4 所示,采用 RT-PCR 方法检测腹泻的藏羊组织样品 34 份,BVDV 阳性率在 0~66.67%之间,平均阳性率为 44.12%;BDV 阳性率在 0~66.67%之间,平均阳性率为 26.47%。其中BVDV/BDV混合感染样品数为 6 份,混合感染率为 17.65%。该结果表明青海省不同地区的腹泻藏羊群存在 BVDV、BDV 的单独感染以及混合感染,且感染情况在个别养殖场或散养户较为严重,但并非所有出现腹泻症状的场(户)都能检出 BVDV 或 BDV,说明青海省部分地区引起藏羊腹泻的致病原除 BVDV 和 BDV 外,还有其他致病原。

表 3　健康藏羊血清样品检测结果

Tab 3　Results of serum samples from healthy Tibetan Sheep

样品来源 Sample source	样品数(份) Sample number (share)	BVDV 检测结果 BVDV detection results		BDV 检测结果 BDV detection results		BVDV/BDV 混合感染 BVDV/BDV mixed infection	
		阳性数(份) Positive number (share)	阳性率/% positive rate/%	阳性数(份) Positive number (share)	阳性率/% positive rate/%	阳性率/% positive rate/%	阳性数(份) Positive number (share)
规模场 A	18	7	38.89	4	22.22	2	11.11
规模场 B	17	5	29.43	3	17.65	0	0
规模场 C	15	4	26.67	0	0	0	0
规模场 D	19	4	21.05	3	15.79	1	5.26
规模场 E	17	0	0	0	0	0	0
规模场 F	18	7	38.89	0	0	0	0
散养户 G	9	6	66.67	4	44.44	3	33.33
散养户 H	5	2	40	0	0	0	0
散养户 I	7	0	0	2	28.57	0	0
散养户 J	8	0	0	0	0	0	0
散养户 K	7	4	57.14	2	28.57	1	14.29
散养户 L	7	0	0	0	0	0	0
散养户 M	6	0	0	1	16.6	0	0
散养户 N	8	4	50.0	0	0	0	0
合计	161	43	26.71	19	11.80	7	4.35

表 4　腹泻样品检测结果

Tab 4　Results of diarrhea samples

样品来源 Sample source	样品数(份) Sample number (share)	BVDV 检测结果 BVDV detection results		BDV 检测结果 BDV detection results		BVDV/BDV 混合感染 BVDV/BDV mixed infection	
		阳性数(份) Positive number (share)	阳性率/% positive rate/%	阳性数(份) Positive number (share)	阳性率/% positive rate/%	阳性数(份) Positive number (share)	阳性率/% positive rate/%
规模场 A	6	4	66.67	2	33.33	2	33.33
规模场 B	4	3	75.0	2	50.0	2	50.0
规模场 D	3	3	100	1	33.33	0	0
规模场 F	4	1	25.0	0	0	0	0
散养户 G	5	2	40.0	1	20.0	1	20.0
散养户 H	3	1	33.33	0	0	0	0
散养户 J	4	0	0	0	0	0	0
散养户 K	3	1	33.33	2	66.67	1	33.33
散养户 N	2	0	0	1	50.0	0	0
合计	34	15	44.12	9	26.47	6	17.65

3　讨论与小结

近几年来,随着我国养羊业的快速发展,羊流通量较大,各种疾病的发生率也逐渐增多,BVDV 和 BDV 的感染情况较为严重,郭芙莉等[9]采用双抗原夹心酶联免疫法(ELISA)对随机采自新疆伊犁、塔城等地区的 49 份羊血清样品进行 BVDV 抗体检测,BVDV 抗体阳性血清样品 45 份,阳性率达 91.8%,BVDV 在该地区羊群中较为流行,感染率比较高。李文良等[8]采用 RT-PCR 方法对江苏部分地区 16 个养殖场的 106 份样品进行了 BDV 的检测,16 个场中检出 BDV 阳性场 10 个,场阳性率为 62.5%,106 份样品共检出阳性样品 29 份,阳性率为 27.4%。本次应用 RT-PCR 方法对青海省海北州的 6 个规模养殖场和 8 个散养大户的 161 份健康藏羊血清样品和 34 份腹泻藏羊组织样品进行了 BVDV 和 BDV 的抗原核酸检测,161 份健康藏羊血清样品中 BVDV 平均阳性率为 26.71%,BDV 平均阳性率为 11.80%,34 份腹泻藏羊组织样品中 BVDV 平均阳性率为 44.12%,BDV 平均阳性率为 26.47%。以上流行病学调查资料共同显示我国羊群中存在 BVDV 和 BDV 的感染,且感染情况在部分地区较为严重。同时本研究发现青海藏羊群中存在 BVDV/BDV 的混合感染,健康藏羊群和腹泻藏羊群中 BVDV/BDV 的混合感染率分别为 4.35% 和 17.65%,应加强重视。目前国内尚无安全有效的羊用 BVDV 和 BDV 商品化疫苗,及时诊断和淘汰带毒病畜成为羊源 BVDV 和 BDV 的主要防治方法,故应加强羊群中 BVDV 和 BDV 的流行病学调查和监测,及时发现和剔除阳性感染羊,逐步实现羊群中 BVDV 和 BDV 的净化,保障养羊业健康发展。本研究为青海藏羊的综合防控措施提供了指导依据,丰富了我国羊群中 BVDV 和 BDV 的流行病学资料。

参考文献:

[1] 王国超, 乔 军, 孟庆玲, 等. 瘟病毒属 3 种病毒多聚蛋白酶基因同义密码子偏爱性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(1): 7-13.
Wang G, Qiao J, Meng Q L, *et al*. Analysis of synonymous codon preferences of poly protease genes in three viruses of Flaviviridae Pestivirus genus[J]. Journal of Northwest A&F University (Nat. Sci. Ed.), 2015, 43(1): 7-13.

[2] 毛 立, 李文良, 严少华, 等. 山羊源牛病毒性腹泻病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(7): 684-688.
Mao L, Li W L, Yan S H, *et al*. Chinese Veterinary Science Isolation and identification of bovine viral diarrhea virus from goats[J]. Chinese Veterinary Science, 2013, 43(7): 684-688.

[3] 徐芳芳. 羊感染牛病毒性腹泻的诊断[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2016, 32(6): 172.
Xun F F. Diagnosis of sheep infected with bovine viral diarrhea [J]. Chinese Journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2016, 32(6): 172.

[4] 刘 霞, 毛 立, 李文良, 等. 1 株绵羊边界病病毒的分离鉴定与序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(3): 434-442.
Liu X, Mao L, Li W L, *et al*. Isolation and Sequence Analysis of a Border Disease virus from Sheep [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2014, 45(3): 434-442.

[5] Mao L, Li W, Liu X, *et al*. Chinese border disease virus strain JSLS12-01 infects piglets and down-regulates the antibody responses of classical swine fever virus C strain vaccination[J]. Vaccine, 2015, 33(32): 3918-3922.

[6] 王有丰. 青海共和县放牧草场青海藏羊的饲养管理[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2015, 31(8): 79.
Wang Y F. Feeding and management of Qinghai Tibetan sheep grazing pasture in Gonghe County, Qinghai[J]. Chinese Journal of animal husbandry and veterinary medicine, 2015, 31(8): 79.

[7] 王春庆. 牛病毒性腹泻病毒一步法 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(1): 66-69.
Wang C Q. Development and Application of One Step RT-PCR Method for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus[J]. China animal husbandry and veterinary, 2013, 40(1): 66-69.

[8] 李文良, 毛 立, 赵永前, 等. 江苏部分地区羊群边界病流行情况调查[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(12): 1808-1812.
Li W L, Mao L, Zhao Y Q, *et al*. Epidemiological analysis of border disease in goat herds in Jiangsu province [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2013, 33(12): 1808-1812.

[9] 郭芙莉, 包振中, 蔡元庆, 等. 新疆北疆地区牛、羊病毒性腹泻-黏膜病的血清学调查[J]. 新疆畜牧业, 2014, (2): 40-41.
Guo F L, Bao Z Z, Cai Y Q, *et al*. Serological investigation of viral diarrhea mucosal disease in cattle and sheep in northern Xinjiang[J]. Xinjiang animal husbandry, 2014, (2): 40-41.

(编 辑:侯向辉)