

猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病复合 PCR 诊断方法的建立及应用

周海范, 夏平安*, 崔保安, 张红英, 胡梅, 党占国
(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 根据猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 美洲型标准株 (ATCC VR-2332) 的部分 ORF6 及 ORF7 保守序列和已发表的猪圆环病毒株 PCV-2 (DQ195679) 的 ORF-2 基因保守序列, 设计合成了 2 对特异引物, 分别扩增出大小为 426 bp 和 631 bp 特异性基因片段, 通过优化 RT-PCR 和 PCR 条件, 最终建立了可同时检测 PRRSV 和 PCV-2 的复合 PCR 诊断方法。应用此方法分别对河南省不同地区送检的 15 头份病、死猪的血清、淋巴结、肺、肝等组织进行检测, 结果 8 头份 PRRSV 阳性, 5 头份 PCV-2 阳性, 其中 3 头份 PCV-2 和 PRRSV 同时为阳性, 其余猪为阴性, 健康猪对照样品全部阴性。结果表明, PRRSV 和 PCV-2 复合 PCR 诊断方法具有高度特异性和敏感性, 可用于兽医临床诊断。

关键词: 复合 PCR; PRRSV; PCV-2

中图分类号: S828 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)01-0106-04

Multiplex PCR for Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2 (PCV-2)

ZHOU Hai fan, XIA Ping an*, CUI Bao an, ZHANG Hong ying, HU Mei, DANG Zhan guo
(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Based on conserved sequences in ORF6 and ORF7 fragments of PRRSV American strain (ATCC VR-2332) and that in ORF2 of PCV-2 (DQ195679) strain, two pairs of specific primers were respectively designed, through optimizing of RT-PCR and PCR conditions, multiplex PCR for detection of PRRSV and PCV-2 was established. Fifteen organ samples from different farms of Henan province were respectively detected by the duplex PCR, out of which eight were PRRSV positive, five were PCV-2 positive, three were both PRRSV and PCV-2 positive, the control samples were negative, suggesting that the multiplex PCR of PRRSV and PCV-2 was a rapid, specific and sensitive diagnostic method.

Key words: Multiplex PCR; PRRSV; PCV-2

猪繁殖与呼吸道综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由 PRRS 病毒引起的猪的一种传染病, 以母猪妊娠后期的早产、流产、产弱胎、死胎、木乃伊胎为特征, 仔猪主要表现呼吸道症状及断奶后死亡率升高等特点^[1]。该病首先

爆发于美国, 现已传播到世界各地, 给养猪业造成了巨大的经济损失。断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 是新近发生的一种传染病, 与猪圆环病毒 II 型 (PCV-2) 的感染有关^[2]。血清学检测表明, PCV-2 在我国猪群中的感染非常普遍^[3,4], 由于该

收稿日期: 2006-10-17

作者简介: 周海范 (1972-), 女, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物分子病毒学。

通讯作者: 夏平安 (1964-), 男, 湖北鄂州人, 副教授, 博士, 主要从事动物病原学与分子免疫学研究工作。

病毒能引起免疫抑制导致继发感染,给养猪业带来了重大的经济损失,尤其同其他猪的传染病,如PRRS,PR,PP等混合感染时危害更加严重⁵。已有研究表明,在猪病毒性繁殖障碍性疾病中,猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)和猪圆环病毒(主要是PCV-2)的混合感染率更高^{6,7},而且在断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)的病例中两者的混合感染也非常严重⁸。

PCR技术具有快速、特异、敏感和易于操作的特点,在畜禽传染病的检测、鉴别诊断方面已得到了广泛应用。而复合PCR技术具有单联PCR技术同样的优点,又能一次反应同时检测鉴别多种不同病原体,因此,更方便快捷。针对可引起猪免疫抑制病的重要病原PRRSV和PCV-2建立了一种复合PCR检测方法,可在分子水平上对PRRSV,PCV-2的混合感染进行早期快速诊断。

1 材料和方法

1.1 病毒株和细胞株

PRRSV Henan/05分离株、PCV-2 Henan/05分离株、Marc-145细胞株和PK-15细胞株由河南农业大学兽医微生物室保存。

1.2 病料

采集河南不同地区猪场送检的流产与死产胎儿的肺、淋巴结、脾和急性发病期的血清样品。

1.3 主要试剂

RNA提取TRIZOL试剂盒,购自Promega公司;蛋白酶K、反转录酶AMV, RNA酶抑制剂、rTaq酶等,购自大连宝生物工程有限公司。

1.4 病毒增殖

待Marc-145细胞长成单层后,接种PRRSV,于37℃,5%CO₂条件下培养3~5d,当细胞出现80%以上病变时,收获病毒悬液于-80℃保存。待PK-15细胞长成单层后,接种PCV-2,于37℃,5%CO₂条件下培养3~5d,收获病毒悬液于-80℃保存。

1.5 引物设计

根据猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)美洲型标准株(ATCC VR-2332)的部分ORF6及ORF7保守序列和已发表的猪圆环病毒株PCV-2(DQ195679)的ORF2基因保守序列,设计了扩增片段分别为426bp和631bp的2对特异引物:PRRSV(P1)5'-AAA GCC TCG TGT TGG GTG-3',(P2)5'-TGA GGG TGA TGC TGT GAC-3';

PCV-2(P3)5'-GGT TAC ACG GAT ATT GTA GTC C-3',(P4)5'-CGT TAC CGC AGA AGA AGA CAC-3'。以上引物均由TaKaRa生物公司合成。

1.6 PRRSV RT-PCR

PRRS病毒RNA的提取方法按RNA提取Trizol试剂盒说明书进行。RT-PCR反应条件为:42℃反转录1.5h;94℃灭活5min后进入PCR;94℃预变性5min,PCR循环为94℃30s,56℃30s,72℃1min,33个循环后72℃延伸10min。反应结束后,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 PCV-2 PCR

参照文献[3]提取病毒DNA。PCR反应条件为:94℃预变性5min;PCR循环为94℃30s,56℃30s,72℃1min,33个循环后72℃延伸10min。反应结束后,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 PRRSV和PCV-2复合PCR

在25μL反应体系中加入PRRSV和PCV-2的上游、下游引物(25-pmol/μL)各0.5μL,PCV-2的DNA和PRRSV的反转录产物模板各4μL;加rTaq酶10μL后灭菌三蒸水补至25μL。反应条件为:94℃预变性5min,随后作如下循环:94℃30s,56℃30s,72℃1min,共33个循环,循环结束后72℃10min,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.9 复合PCR的特异性与应用

分别提取PCV-2,PPV和PRV DNA,PRRSV RNA及正常PK-15细胞、Marc-145细胞基因组DNA,应用复合PCR分别进行扩增。同时利用复合PCR对15份临床病料进行检测。

2 结果

2.1 PRRSV RT-PCR

RT-PCR扩增出目的DNA片断与预期大小相当(图1),经酶切鉴定后,亚克隆到pGEM-T载体中测序。序列分析表明,所克隆的目的DNA片段大小为426bp,与PRRSV VR-2332病毒基因组中14829~15254之间的核酸序列同源率为99%以上,证明RT-PCR产物为预期目的DNA片段。

2.2 PCV-2 PCR

PCR扩增出目的DNA片断与预期大小相当(图2),经酶切鉴定后,亚克隆到pGEM-T载体中测序。序列分析表明,所克隆的目的DNA片段大小为631bp,与PCV-2的基因组中1087~1718之间的核酸序列同源率为98%以上,证明PCR产

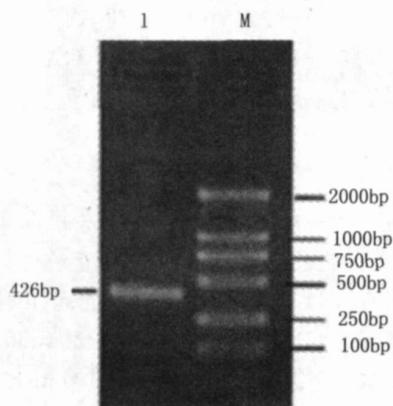


图 1 PRRSV RT-PCR 产物

物为预期目的 DNA 片段。

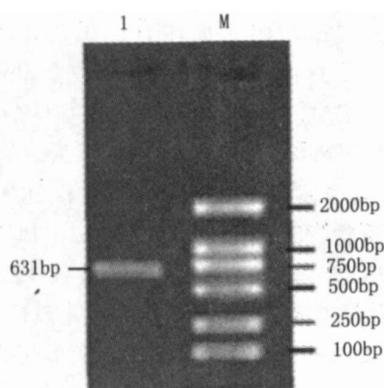


图 2 PCV-2 PCR 产物

2.3 复合 PCR

利用引物 P1, P2, P3 和 P4 同时在一个 PCR 反应体系中按本文 1.8 的方法成功地扩出了 PRRSV 基因组中的 426 bp 和 PCV-2 基因组中的 631 bp 2 个片段,同时利用这 2 对引物分别对已知的 PCV-2 和 PRRSV 样品进行扩增也只扩增出了相应的 DNA 片段,结果见图 3。

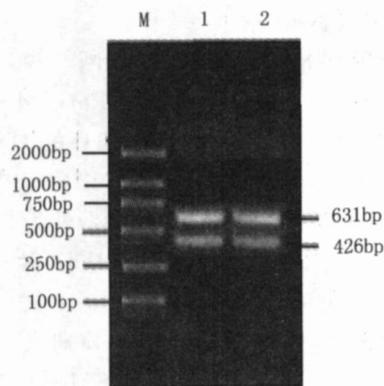


图 3 PRRSV 与 PCV-2 的 PCR 产物

2.4 复合 PCR 特异性与应用

复合 PCR 仅扩增出 PRRSV 和 PCV-2 目的

DNA 片段,而对其他基因组不扩增;应用该方法分别对河南省不同地区送检的 15 头份病死猪的淋巴结、肺、肝等组织进行检测,结果 8 头份 PRRSV 阳性,5 头份 PCV-2 阳性,其中,3 头份 PCV-2 和 PRRSV 同时为阳性。

3 讨论

流行病学资料表明,PRRSV 和 PCV-2 在我国猪群中感染率非常高,而 PRRSV 和 PCV-2 的混合感染情况也十分严重。据报道,美洲株 PRRSV 血清阳性率达 40%~50%^[9],PCV-2 血清阳性率达 42%~95%^[4];PRRSV 阳性率分别为 12.5%~22.58%^[9]和 71%^[9],PCV-2 阳性率占到样品总数的 57.9%^[6]。在对患呼吸道疾病的病料检测中,2 种病毒混合感染率达 47.4%^[9];在对猪繁殖障碍性疾病病料检测中,2 种病毒混合感染率达 31.2%^[7]。最近,杨汉春教授对不同地区规模化猪场死亡猪只 57 份病料的检测结果中发现,PRRSV 与 PCV-2 混合感染率达到 54.4%。这说明,PRRSV 和 PCV-2 混合感染十分普遍。因此,建立 PRRSV 和 PCV-2 复合 PCR 诊断方法是非常适用的。

本方法在引物设计过程中,除考虑避免引物二聚体外,还优先考虑所扩增片段的保守性,保证了该方法在临床应用中即使发生毒株变异,也能够准确诊断;在复合 PCR 反应体系中,同时含有 2 对或 2 对以上引物和模板时,反应总是有利于片段较小的一方,即短片段优先扩增的原理。依据这一原则,本方法扩增的 2 个片段大小分别为 426 bp 和 631 bp,所扩增的 2 条片段大小比较接近,这使复合 PCR 产物的产量高而便于结果观察。本方法依据单联 PCR 反应条件确定复合 PCR 最佳条件时,选取较高的退火温度,以提高扩增产物的特异性,结果表明,这一措施是比较理想的。试验对 15 头份可疑病料进行检测,复合 PCR 与单联 PCR 检测结果一致,说明复合 PCR 与单联 PCR 具有相同的灵敏性。

参考文献:

- [1] Hall W V. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus a significant disease of pigs [J]. Aust Vet J, 2005, 83(5): 260-261.
- [2] Ellis J L, Hassard E, Clark, Harding J, *et al.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multi-systemic wasting syndrome [J]. Canada Veterinary Journal, 1998, 39: 44-51.

畜禽粪便无害化处理技术探讨

马 强,白献晓,魏凤仙,邢宝松

(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所,河南 郑州 450002)

中图分类号: S851 文献标识码: B 文章编号: 1004 - 3268(2007)01 - 0109 - 03

近年来,畜牧业发展异常迅猛,已成为农村经济的支柱产业。但在发展的同时,畜牧业的污染问题非常严峻,已引起全社会的高度重视。如何处理畜禽粪便,变废为宝,实现畜牧业的可持续发展,是科技工作者和社会各界面临的重大课题。

1 畜禽养殖污染的现状

粪尿污染是无公害畜产品生产的最大危害之一。我国畜禽养殖业每年平均产生粪便约 17.3 亿 t,是每年排放工业固体废弃物(约 6.34 亿 t)的 2.7 倍。特别是近年来,畜禽养殖从农户分散养殖转向规模化养殖后,导致农牧脱节、粪污密度增加。以年出栏 1 万头育肥猪的猪场为例,其每天产生 73t 污水;而饲养量为 1000 头的奶牛场,年产粪尿 1.1 万多 t;1 个 20 万只的蛋鸡场,仅成年鸡每天就要产生鸡粪近 20-t。畜禽粪尿中含多种污染物,主要包括粪尿厌氧分解产生的硫化氢、氨、醇类、酚类、酰胺类、胺类和吡啶等有机物,以及大量的病原菌、微生物等,这些污染物对环境造成了严重威胁。一些大中型畜禽养殖场,还分布在人口较为集中的大、中城市周围,不少粪污直接排入池塘、渠道、河流,造成水体富营养化。目前,国家有关部门开始着手治理养

殖场污染问题,但还缺乏必要的污染防治措施;大多数养殖场对环境治理投入不足,往往形成了在污染问题出现后才寻求对策的被动局面。

2 粪污无害化处理技术

养殖场的畜禽粪尿及污水若处置不当,不仅对土壤、水体、大气产生严重的污染,而且还严重危害人类的健康和畜禽养殖业的生产安全。

2.1 肥料化技术

2.1.1 土地还原法 畜禽粪便还田是我国传统农业的重要环节,在改良土壤、提高农作物产量方面起着重要的作用。土壤在获得肥料的同时净化粪便,节省了粪便的处理费用。凡是周围有农田的畜禽养殖场,都宜尽最大可能将粪便及污水就地用于农田,以较低的投入达到较高的生态、社会和经济效益。但是,畜禽粪便作为有机肥直接施用,其最大的障碍是含水量高、有恶臭,而且氨的大量挥发造成肥效降低,病原微生物还会对环境构成威胁。土壤的自净能力有限,施用过多粪便容易造成污染;鲜粪在土壤里发酵产热及其分解物对农作物生长发育都有不利影响,所以施用量受到很大的限制。鲜粪的利用,还受季节的影响,淡季往往没法及时、充分地利用,需

收稿日期: 2006 - 10 - 20

作者简介: 马 强(1977 -),男,河南南阳人,助理研究员,本科,主要从事畜牧科技工作。

[3] 周继勇,陈庆新,叶菊秀,等.猪圆环病毒 2 型感染的血清学分析[J].中国兽医学报,2004,24(1):1-3.

[4] 郎洪武,张庆川,吴发权,等.断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测[J].中国兽医科技,2000,30(3):3-5.

[5] Ellis I, Clark E, Haines D, et al. Porcine circovirus - 2 and concurrent infections in the field[J]. Vet Microbiol, 2004, 98(2):159-163.

[6] 芦银华,许立华,华修国,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.

[7] 许立华,王玲,芦银华,等.三种猪繁殖障碍性病毒混合感染的分子生物学调查[J].中国兽医科技,2004,34(7):40-43.

[8] Pallares F J, Halbur P G, Ppriansnig T, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV - 2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)[J]. J Vet Diagn Invest, 2002, 14(6):515-519.

[9] 高显明,高步先,籍玉川,等.我国部分地区猪繁殖与呼吸综合征的调查与分析[J].动物医学进展,2005,26(6):89-91.