

孙春亮,赵敬慧,刘月,等. 区分高低致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法的建立[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):226-228.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.077

区分高低致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法的建立

孙春亮¹, 赵敬慧², 刘月¹, 蔡锦顺¹

(1. 延边大学农学院动物医学系, 吉林延吉 133002; 2. 中国军事医学科学院军事兽医研究所流行病学四室, 吉林长春 130122)

摘要:为了在临床上快速、有效区分高低致病性 PRRSV, 参考 GenBank 发表的代表性毒株, 根据高致病性毒株 *Nsp2* 基因上有 30 个氨基酸不连续缺失的特点, 设计并合成 1 对引物, 扩增高低致病性 PRRSV *Nsp2* 基因的目的条带长度分别为 644、734 bp, 从而将二者区分开来。用本方法对长春及其周边地区送检 60 份病料进行盲检, 检出 10 份高致病性 PRRSV。并与 N 蛋白基因引物 RT-PCR 诊断方法进行比较, 结果均一致, 表明该方法准确性高。本研究所建立的 RT-PCR 方法为 PRRSV 在临床上的快速诊断和实验室流行病学调查提供了简捷的技术手段。

关键词:PRRSV; *Nsp2* 基因; RT-PCR 诊断; 流行病学调查

中图分类号: S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0226-02

2006 年以来, 中国南方部分地区猪场暴发高热为特征的传染性疾病, 并逐渐蔓延扩散到北方各地区, 给养猪业带来了巨大的经济损失。这种传染性疾病后来被命名为猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS), 该病具有传播速度快、发病率高、病死率高的特征, 并且继发感染链球菌等, 与伪狂犬等病毒混合感染增加了临床诊断的难度。因此, 建立一种能够快速、有效、准确的检测方法在 PRRS 的防控上具有重要意义。经病原分离及分子流行病学分析, 国内流行的高致病性毒株主要是由 1 种带有 *Nsp2* 基因部分缺失以及多个位点发生突变对猪呈高致病性的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)。

PRRSV 基因组毒株间具有较高的遗传变异性, M 蛋白在各毒株间比较保守, 同型毒株间 M 蛋白序列同源性大于 96%, 欧洲、美洲型毒株间序列同源性在 78%~81% 之间^[1]; 其次 N 蛋白保守性较高, 欧洲、美洲型毒株间的同源性在 59%~63% 之间, 同基因型毒株之间的同源性可达 96%~100%^[2]。GP5、GP3、NSP2 是容易发生变异的 3 个蛋白, 其中 GP5 变异程度最大, 欧洲、美洲型毒株间 GP5 同源性仅为 52%~55%^[3] 其次为 GP3, 同一毒株间同源性为 86%~98%, 2 个基因型毒株间 GP3 氨基酸同源性为 54%~60%, GP3 多数变异发生在 N 末端, 2 个基因型 GP3 N 末端 35 个氨基酸残基的一致性不到 30%^[4]。

在 PRRSV 基因组中非结构蛋白 NSP2 变异程度最显著, 美洲型同型毒株间同源性约为 80%, 美洲型、欧洲型毒株间同源性仅为 40% 左右, NSP2 的中心区易变异, 并且变异不仅表现为个别碱基的置换, 还表现在缺失和插入上。Gao 等对

PRRSV 分离株 HB-2 (sh)/2002 的全基因序列测定分析表明, NSP2 蛋白存在编码 12 个氨基酸的连续 36 个核苷酸的缺失, 这是国内首次发现的 NSP2 蛋白存在缺失变异现象^[5]。

本研究根据 *Nsp2* 基因序列设计引物, 该引物包含 *Nsp2* 基因缺失序列, 分别对高致病和经典毒株的基因片段进行特异性扩增, 通过 RT-PCR 扩增目的基因片段长度的不同可将二者区分开来。试验结果表明, 新建立的 RT-PCR 鉴别方法可以达到快速、简捷、有效区分高致病性变异 PRRSV 与经典型 PRRSV 的目的。

1 材料与方法

参考 GenBank 上多株 PRRSV 毒株序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计并合成 1 对引物, 所设计这对引物覆盖 *Nsp2* 基因整个缺失区域。由于高致病性 PRRSV 变异株与低致病株相比发生 90 个核苷酸的缺失, 所以高致病性株和经典株的预期扩增产物长度分别约 644、734 bp。

上游引物: 5'-CGAGCTTAAGACCAGATGGAGGAG-3'; 下游引物: 5'-CTTGAGCTGAGTATTTTGGCGCTGT-3'。

按照 Simply P 总 RNA 提取试剂盒说明书, 分别对 PRRSV CC-13 分离株 RNA 基因组进行提取, 进行反转录。

临床送检样品来源长春及周边地区猪场疑似 PRRS 病死猪的组织病料 (肺脏、脾脏、肾脏、子宫和淋巴结等), 组织剪碎, 在冰浴中匀浆, 4℃ 静置一段时间 (0.5~1.0 h), 10 000 r/min 离心 10 min 取上清, 提取 RNA。取病料上清液 100 μL 到灭菌 1.5 mL 离心管中, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取病料 RNA, 进行反转录, 制备 cDNA, 进行 PCR 扩增。

将 PRRSV (CC-13 株)、PCV2、CSFV、PRV 病毒用合成的 F/R 引物进行 PCR 扩增。

用 Marc-145 细胞对 PRRSV (CC-13 株) 进行病毒效价滴定, 计算病毒 TCID₅₀, 经测定病毒效价为 10⁵ TCID₅₀/0.1 mL。然后依次稀释成 10 000、1 000、100、10、1、0.1、0.01 TCID₅₀, 提取病毒 RNA 并制备 cDNA, 用建立的 RT-PCR 方法进行检测。

收稿日期: 2014-08-04

基金项目: 国家“973”计划 (编号: 2011CB500705)。

作者简介: 孙春亮 (1988—), 男, 吉林通化人, 硕士, 助理兽医师, 主要从事预防兽医学研究。Tel: (0433) 2435591。

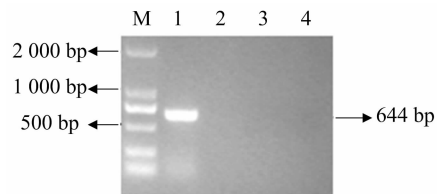
通信作者: 蔡锦顺 博士, 副教授, 主要从事预防兽医学研究。
E-mail: jinshuncai@163.com。

对上述的敏感性和特异性试验重复 3 次,以检验该方法的重复性情况。用建立的 RT-PCR 方法检测临床送检样品,鉴定结果与 N 蛋白基因引物 RT-PCR 鉴定结果进行对比。

2 结果与分析

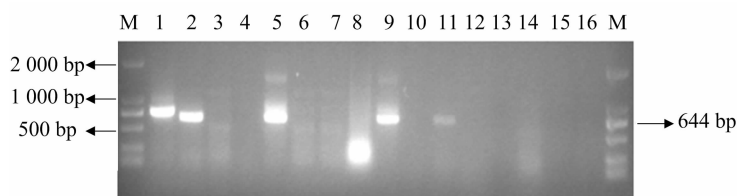
对 PRRSV CC-13 株、PCV2、CSFV、PRV 进行扩增,结果只有 PRRSV CC-13 株出现预期结果扩增出 644 bp 的目的片段,说明本方法特异性较好。根据扩增片段大小判断可知 PRRSV CC-13 株为高致病性 PRRSV 变异株,结果见图 1。自 1996 年首次确定 PRRSV 在中国存在以来,针对 PRRSV 建立了很多种检测方法,主要包括普通 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR、环介导等温扩增技术 RT-LAMP、ELISA、胶体金、免疫荧光试验等。其中就有高灵敏度的检测方法如荧光定量 RT-PCR、环介导等温扩增技术等,但这些检测方法价格高,操作技术要求严,不适合用于普通临床检测。ELISA、胶体金等检测方法操作容易,但检测灵敏度与重复性又受到质疑。简单、快速、准确的 RT-PCR 检测方法成为目前诊断的主要方法。

经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察,在 0.01 TCID₅₀ 处仍可看到



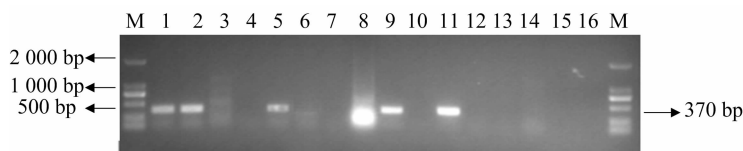
M—DL 2000 DNA marker; 1—PRRSVCC-13株; 2—PCV2; 3—PRV; 4—CSFV

图1 特异性试验鉴定结果



M—DL 2000 marker; 1—普通株阳性对照; 2—高致病性毒株阳性对照; 3~14—临床检测样品; 15—阴性对照; 16—PCR阴性对照

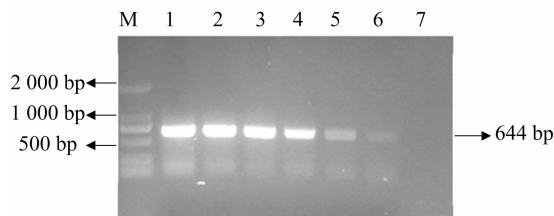
图3 部分临床样品的 *Nsp2* 基因的 RT-PCR 鉴定结果



M—DL 2000 marker; 1—普通株阳性对照; 2—高致病性毒株阳性对照; 3~14—临床检测样品; 15—阴性对照; 16—PCR阴性对照

图4 部分临床样品 N 蛋白基因的 RT-PCR 扩增结果

特异性条带,结果表明,本方法敏感度可达 0.1 TCID₅₀ (图 2)。本方法具有很好的特异性,可以实现 PRRSV 的特异性扩增;敏感性试验表明,该方法检测的敏感度可达 0.1 TCID₅₀,表明本方法的敏感性较高,可以较敏感地检测到样品中的 PRRSV。重复性试验表明,重复 3 次检测结果基本一致,说明本方法的重复性较好。



M—DL 2000 DNA marker; 1—10 000 TCID₅₀; 2—1 000 TCID₅₀; 3—100 TCID₅₀; 4—10 TCID₅₀; 5—1 TCID₅₀; 6—0.1 TCID₅₀; 7—0.01 TCID₅₀

图2 敏感性鉴定结果

对上述的敏感性和特异性试验重复 3 次,阳性情况以及扩增条带大小情况与上述结果一致。

用本试验建立的 RT-PCR 方法,对长春及周边送检的 60 份病料进行盲检,结果有 10 份病料为阳性,与研究中用针对 N 蛋白基因的引物进行 RT-PCR 检测结果相一致。从图 3 可看出,上述部分样品中分别位于 5、9、11 的 3 个样品的扩增片段约为 644 bp 片段,与图 4 中 N 蛋白基因引物鉴定结果基本一致,并且可以判断出这 3 个阳性样品为高致病性 PRRSV 毒株。本试验所建立的 RT-PCR 鉴别诊断方法,它不仅能够为流行病学研究提供辅助手段和方法,而且还能够为流行病学研究指引方向,在辨明毒株的类型前提下,可以有的放矢地开展相关研究。

3 结论

建立一种快速、准确区分高致病性 PRRSV 与低致病性 PRRSV 的 RT-PCR 方法,通过验证该方法可以应用于临床诊断,快速鉴别出高低致病性 PRRSV 毒株。

参考文献:

- [1] Meng X J, Paul P S, Halbur P G, et al. Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the

胡新岗,黄银云,徐婷婷,等. 江苏泰州地区山羊传染性胸膜肺炎血清学调查[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):228-230.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.078

江苏泰州地区山羊传染性胸膜肺炎血清学调查

胡新岗¹, 黄银云¹, 徐婷婷¹, 朱止南², 田亚军³, 许余良⁴

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏省泰州市高港区动物卫生监督所, 江苏泰州 225300;

3. 江苏省泰州市高港区胡庄镇畜牧兽医站, 江苏泰州 225300; 4. 江苏省泰兴市畜牧兽医技术推广中心, 江苏泰兴 225400)

摘要:为了调查江苏省泰州市山羊传染性胸膜肺炎的流行情况,利用山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)、丝状支原体山羊亚种(Mmc)、绵羊肺炎支原体(Movi)抗体检测间接血凝试剂盒对江苏省泰州市各市(区)的1157份山羊血清进行检测。结果发现,发病场山羊Mccp、Mmc血清平均阳性率为51.85%、39.81%;未发病场Mccp、Mmc血清平均阳性率为10.52%、5.84%,合计支原体感染阳性率为16.37%。由此可见,泰州市的山羊支原体性疫病的感染率较高,应加强对该病的防控。

关键词:江苏泰州地区;山羊;支原体;传染性胸膜肺炎;血清学;调查

中图分类号:S858.272.62 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-0228-03

山羊传染性胸膜肺炎(contagious caprine pleuropneumonia, CCPP)是山羊特有的急性或慢性高度接触性传染病,以呈现纤维素性肺炎和胸外膜炎为特征^[1],该病严重影响亚洲和非洲山羊养殖业的发展,被世界动物卫生组织(OIE)列为法定报告动物传染性之一,自20世纪末首次分离到CCPP病原并证实该病病原为山羊支原体山羊肺炎亚种(Mccp)以来,已经有40多个国家报道过有此病发生^[2]。在我国,由支原体引起且与CCPP类似的山羊胸膜肺炎症状的山羊支原体性肺炎广泛流行,据文献报道,我国各省(市、区)不同地区流行株各不相同,除了Mccp,主要还有丝状支原体山羊亚种(Mmc)、绵羊肺炎支原体(Movi),而且同一羊群中常出现几种支原体的混合感染现象,使病情复杂化,给疫病的防控带来了困难^[3]。由于支原体分离比较困难,加上基层兽医技术条件的限制,长期以来广大基层兽医工作者甚至研究人员对山羊传染性胸膜肺炎病原的认识还比较模糊,由Mmc、Movi引起的这些病例在临床上往往因依据临床症状及病理剖检结果被诊断为CCPP^[4]。

近年来,泰州各市(区)大力发展山羊养殖业,从山东省、

江苏省的其他县(市、区)大批引进羊,由于长途运输、饲养管理水平与地域性差异等因素影响,羊群引进后常发生支原体性肺炎,给养羊场(户)造成了很大的损失。为尽快探明泰州市各地支原体性肺炎的流行情况,为该病的防制提供理论依据,2013年9月至今,江苏农牧科技职业学院课题组联合有关基层兽医及防检部门专家开展该病的血清学微量间接血凝试验抽样检测,现将检测情况报道如下,供同行们参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 被检血样 被检山羊来自泰州市各地的35个养羊场(户),共分为2类:一是疑似支原体感染发病羊群,共采集12个场(户)血样216份;二是无临床表现羊群(均未接种山羊传染性胸膜肺炎疫苗),共采集28个场(户)血样941份。均于羊群早晨喂料前,随机抽样,用一次性采血盛血管经静脉采血3~5 mL,摆成30°~45°斜面,置于4℃冰箱内5 h后取出放在室温下,待血清析出后分装,-20℃保存待检^[5]。

1.1.2 试剂盒材料 采用购自中国农业科学院兰州兽医研究所研制的山羊支原体性肺炎病原体山羊支原体山羊肺炎亚种Mccp正向间接血凝诊断试剂盒、丝状支原体山羊亚种Mmc正向间接血凝诊断试剂盒、绵羊肺炎支原体Movi正向间接血凝诊断试剂盒,按照使用说明书操作,分别对分离的待检血清进行血清学正向微量间接血凝试验检测。

existence of two genotypes of PRRSV in the U. S. A. and Europe[J]. Archives of Virology, 1995, 140(4): 745-755.

[2] Magar R, Larochelle R, Dea S, et al. Antigenic comparison of Canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein[J]. Canadian Journal of Veterinary Research - Revue Canadienne de Recherche Veterinaire, 1995, 59(3): 232-234.

[3] Suárez P, Zardoya R, Martín M J, et al. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome

virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes[J]. Virus Research, 1996, 42(1/2): 159-165.

[4] Murtaugh M P, Elam M R, Kakach L T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus[J]. Archives of Virology, 1995, 140(8): 1451-1460.

[5] Gao Z Q, Guo X, Yang H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus[J]. Archives of Virology, 2004, 149(7): 1341-1351.