

# 猪圆环病毒 2 型、猪繁殖与呼吸综合征病毒及猪细小病毒混合感染的流行病学调查\*

贾 赟<sup>1,2</sup>, 芦银华<sup>1</sup>, 张素芳<sup>1</sup>, 周 斌<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>1\*\*</sup>

(1.南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 江苏南京 210095; 2.沈阳农业大学畜牧兽医学院, 辽宁沈阳 110161)

## Investigation on Epidemiology of Co-infection of Porcine Circovirus Type 2, Porcine Reproductive and Respiratory Disease Syndrome

### Virus and Porcine Parvovirus

JIA Yun<sup>1,2</sup>, LU Yin-hua<sup>1</sup>, ZHANG Su-fang<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup>, CHEN Pu-yan<sup>1\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture at Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095 China; 2. Department of Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China.)

**Abstract:** According to the published genomic sequences of *Porcine reproductive and respiratory disease syndrome virus* (PRRSV), *Porcine parvovirus* (PPV) and *Porcine circovirus type 2*, primers were designed and RT-PCR, PCR and multiplex PCR were set up for the detection of PRRSV, PPV and PCV, respectively. 127 samples were detected for PCV by the multiplex PCR. With the established methods, 67 clinical samples positive for porcine circovirus type 2 (PCV2) were tested for the presence of PRRSV and PPV. The results demonstrated that the co-infection rate of PRRSV/PCV2, PPV/PCV2 and PRRSV/PPV/PCV2 were detected in 52.3% (35/67), 26.9% (18/67) and 7.5% (5/67), respectively. The data obtained in the present study indicated that it is very prevalent for the co-infection of PRRSV, PPV and PCV2.

**Key words:** PCV2; PRRSV; PPV; Co-infection.

**摘要:** 根据 GenBank 上发表的 PRRSV ORF7、PPV VP2 及 PCV 的基因组序列设计合成引物, 建立了分别用于检测 PRRSV、PPV 和 PCV 的 RT-PCR、PCR 及复合 PCR 方法。应用建立的复合 PCR 方法对送检的 127 份病料进行了 PCV 的检测, 对鉴定为 PCV2 阳性的 67 份病料再分别进行 PRRSV 和 PPV 的检测, 以确定猪群中 PCV2 与 PRRSV 和/或 PPV 混合感染情况, 结果表明, 35 份样品表现为 PRRSV 与 PCV2 混合感染, 占样品总数的 52.3%; 18 份样品表现为 PCV2 与 PPV 混合感染, 占 26.9%。另外, 还有一定比例的三重感染, 共 5 个样品, 占 7.5%。由此可见, 猪群中 PCV2 与 PRRSV 及 PPV 混合感染比较普遍。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 猪细小病毒; 混合感染

中国分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0467-04

猪圆环病毒(*Porcine circovirus*, PCV)为单股环状 DNA 病毒, 基因组约 1.76kb。根据基因组及抗原性不同, PCV 分为两种血清型 PCV1 与 PCV2, 两者核苷酸序列同源性为 68%~75%。PCV1 无致病

性, 广泛存在于健康猪群中<sup>[1]</sup>; PCV2 与多种新的猪传染病的发生密切相关, 包括断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS)、猪呼吸道病复合征 (PRDC) 及猪增生性和坏死性肺炎 (PNP) 等<sup>[2,3]</sup>, 其中以

收稿日期: 2004-03-05, 修回日期: 2004-04-12

\* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 课题) 资助 (项目编号: 2001AA249012)

作者简介: 贾 赟 (1975-), 男, 河南省籍, 硕士研究生, 研究方向动物分子病毒学。

\*\* 通讯作者: 陈溥言 (1942-) 男, 江苏省籍, 教授, 从事动物传染病与分子病毒学研究。

Corresponding Author. Tel: 025-84396028. E-mail: aid@njau.edu.cn

PMWS 的影响最为严重,给世界养猪业带来巨大的经济损失。病原学研究表明,PCV-2 为 PMWS 的主要病原,但不是唯一的病原。在 PMWS 的发生过程中猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine parvovirulent and respiratory disease syndrome virus*, PRRSV)及猪细小病毒(*Porcine circovirus*, PPV)可能也起着非常重要的作用<sup>[4-8]</sup>。动物试验表明,PRRSV 或/和 PPV 与 PCV2 混合感染会明显促进 PCV2 病毒的复制,从而增强 PCV2 的致病作用<sup>[4,5]</sup>。因此,为了更好地预防和控制 PCV2 相关疾病,我们需对我国猪群中 PCV2 与 PRRSV 或/和 PPV 混合感染情况有较清楚的认识,以便制定更有针对性的防治措施。

为此,本研究在系统分析 PCV、PRRSV 及 PPV 基因组的基础上,分别针对 PCV 两种血清型的核苷酸序列、PRRSV ORF7 基因及 PPV 的 VP2 结构基因设计合成引物,分别建立了用于检测 PCV1、PCV2 的复合 PCR 方法和检测 PRRSV、PPV 的 RT-PCR 与 PCR 方法。应用复合 PCR 方法先对 127 份病料进行 PCV 的检测。对 67 份结果为 PCV2 阳性的病料再分别进行 PRRSV 及 PPV 的检测,发现有 35 份表现为 PRRSV 阳性,11 份表现为 PPV 阳性。这几种检测方法的建立为临床上进行 PCV2、PRRSV 及 PPV 混合感染的流行病学调查及相关疾病的诊断打下了基础,同时亦为更好的预防和控制 PCV2 相关疾病提供了科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

PCV2 阳性毒株、PRRSV 阳性毒株为本实验室分离鉴定;PPV 阳性毒株由江苏省农科院兽医研究所惠赠。送检病料:来源于华东地区上海、江苏、浙江及山东等四省市猪场的 127 份临床病料,病料采集于临床表现为呼吸困难,体温升高及消瘦的病断奶仔猪及表现为呼吸困难和繁殖障碍的母猪。取样前置-80℃冻存。蛋白酶 K, RNasin, PCR 试剂均购自大连 TaKaRa 公司;反转录酶 M-MLV、Trizol 为 Promega 公司产品;PCR 仪为 AmpGene 公司产品;胶回收试剂盒购自上海生工;其他常规试剂均为分析纯。

### 1.2 引物设计

PCV 引物:在参考 GenBank 中公开发表的 PCV1 与 PCV2 基因组核苷酸序列的基础上,合成以下三条引物。

P1: 5'-CCGCGGGCTGGCTGAACTT-3'

P2: 5'-CTCGGCTATGCGCTCCAAAATG-3'

P3: 5'-ACCCCCGCCACCGCTACC-3'

其中引物 1, 2 用于扩增 PCV1 的基因片段,跨幅为 652bp。引物 1, 3 用于特异扩增 PCV2 基因片段,长度为 1154bp。

PRRSV 引物:在参考美洲代表株 VL2332 ORF7 的基础上,设计合成了以下 2 条引物,片段跨幅为整个 ORF7,长 372bp。引物序列如下:

5'-primer: 5'-GCGGATCCATGCCAAATAACAAC-3'

3'-primer: 5'-ATCTCGAGTCATGCTGAGGGT GA-3'

PPV 引物:参考 PPV 基因组主要中和抗原基因 VP2 中的一段,设计合成了以下 2 条引物,扩增片段长 848bp,引物序列如下:

5'-primer: 5'-CAGGATCCGCAACCTCACCAC C-3'

3'-primer: 5'-GCCTCGAGTGCATGTTAGATTTCCC-3'

以上引物均由 TaKaRa 公司合成。

### 1.3 组织病料 DNA 的提取

将病猪的肺、脾、淋巴结等组织充分研磨,-20℃冻融 3 次,4℃12000r/min 离心 10min,取 500μL 细胞悬浮液,加入蛋白酶 K 至终浓度 500μg/mL,SDS 至终浓度 1%,充分混匀后,置 55℃水浴作用 30min。然后分别用 Tris 饱和苯酚(pH8.0)、苯酚:氯仿(1:1)及氯仿各抽提一次,吸取水相,加 1/10 体积 3mol/L NaAc 及 2.5 倍体积无水乙醇沉淀,-20℃放置 2h 以上。12 000r/min 离心 15min,沉淀用 75%乙醇洗涤,烘干后悬浮于 20μL 灭菌超纯水中。

### 1.4 复合 PCR 和 PCR 体系

复合 PCR 体系:引物浓度为 20pmol/μL,dNTPs 每种浓度为 2.5mmol/L,MgCl<sub>2</sub> 浓度为 25mmol/L,rTaq 酶为 5U/μL,整个 PCR 体系为 50μL。反应成分如下:10×PCR buffer 5μL,dNTPs 4μL,MgCl<sub>2</sub> 3μL,三个引物各 1μL,模板 DNA 10Ml,rTaq 酶 0.5μL,加超纯水至 50μL,混合均匀,将混合物 95℃变性 10min 后,进入 PCR 循环,94℃ 1min,53℃ 1min,72℃ 1.5min,进行 35 个循环,最后 72℃延伸 10min。琼脂糖电泳鉴定以出现 1154bp 条带的为 PCV2 阳性,652bp 的为 PCV1 阳性,如同时出现上述两条带则表示 PCV1 与 PCV2 均为阳性。

PCR 体系:组成为:10×PCR buffer 5μL,dNTPs (2.5mmol/L) 4μL,MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 3μL,2 条 PPV 引物各 1μL,模板 DNA 10μL,rTaq 酶 0.5μL (5U/μL),加灭菌超纯水至 50μL,混合均匀,将混合物 95℃变性 5min 后,进入 PCR 循环,94℃变性 1min,56℃退火 1min,72℃延伸 2min,进行 30 个循环,最后 72℃延伸 10min。琼脂糖电泳鉴定,以出现 848bp 特异条带的样品为阳性。

### 1.5 组织病料 RNA 的提取

取按步骤 1.4 制备的 500 $\mu$ L 组织病料悬浮液上清, 加入 700 $\mu$ L Trizol 混匀, 室温放置 10min; 加入 200 $\mu$ L 氯仿, 混匀, 12000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 吸取水相, 再用等体积氯仿抽提一次; 将水相转移至另一管中, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 室温放置 10min 后, 12000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10min; 沉淀用 75% 乙醇洗涤, 在超净台中通风晾干; RNA 沉淀溶解于 20 $\mu$ L 用 DEPC 处理过的灭菌超纯水中。同法制备 PRRSV 阳性毒株的 RNA 模板。

### 1.6 RT-PCR

RT: 总体积为 20 $\mu$ L, 反应体系如下: 5 $\times$ RT buffer 4 $\mu$ L, dNTPs (10mmol/L) 2 $\mu$ L, RNasin (40U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L, P1,P2 各 1 $\mu$ L, RNA 模板 10 $\mu$ L, 混匀离心。65 $^{\circ}$ C 作用 15min, 稍冷却后, 加入 M-MLV (200U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L, 42 $^{\circ}$ C 1h。95 $^{\circ}$ C 作用 5min, 冷却后即可进行 PCR。

PCR: PCR 反应总体积为 50 $\mu$ L, 包括: 10 $\times$  PCR buffer 5 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 3 $\mu$ L, RT 产物 10 $\mu$ L, rTaq 酶 (5U/ $\mu$ L) 0.5 $\mu$ L, 加超纯水至 50 $\mu$ L, 混匀, 将混合物 95 $^{\circ}$ C 变性 5min 后进入 PCR 循环。参数设置为 94 $^{\circ}$ C 1min, 51 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min。进行 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以出现 372bp 条带的样品为阳性。

### 1.7 PCR 及 RT-PCR 产物的特异性鉴定

分别随机选取复合 PCR、PCR 及 RT-PCR 产物用胶回收试剂盒纯化后直接进行测序, 此工作由大连 Takara 公司协助完成。应用 DNASTAR 软件将所测序列与 GenBank 中发表的 PCV、PRRSV 及 PPV 的相应片段区域进行同源性分析, 进一步证实扩增片段的特异性。

## 2 结果

### 2.1 PCV 复合 PCR 扩增结果

应用建立的复合 PCR 方法对来自华东地区 127 份临床组织病料进行 PCV 检测, 结果从 67 份样品中扩增出 PCV2 特异条带, 与阳性对照扩增结果一致。从 21 份样品中同时扩增出 1154bp 和 652bp 两条特异条带, 单独扩增出一条 652bp 条带的有 7 份样品。电泳结果见图 1。

### 2.2 PRRSV RT-PCR 扩增结果

RT-PCR 结果显示, 67 份 PCV2 阳性样品中的 35 份可扩增出 372bp 的片段, 与阳性对照组 VL2332 株结果完全相符, 部分电泳结果见图 2。由此可见,

待检样品中 PRRSV 与 PCV2 的混合感染率达 52.3%, 说明在猪群中 PRRSV 与 PCV2 的混合感染已经非常普遍。



图 1 部分临床组织样品 PCR 检测结果

Fig. 1 The PCR results of some part clinical tissue samples 8. Positive control; 2/3/5/7. PCR products positive for PCV2; 1/6, PCR products positive for both types of PCV; 4; PCR products positive for PCV1; M: DL-2000marker

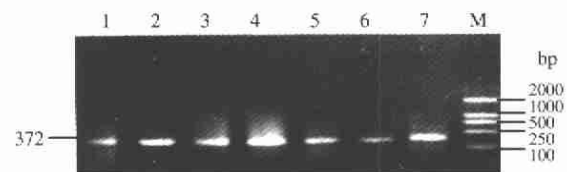


图 2 部分 PRRSV 感染组织样品的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR products of tissues samples by PRRSV infected 7. positive control; 1-6. RT-PCR product of tissue samples. M: 2000 marker

### 2.3 PPV PCR 扩增结果

用 PCR 方法对 67 份 PCV-2 阳性的临床组织病料进行了 PPV 检测, 结果从 18 份待检样品中扩增出了 PPV 848bp 的特异条带, 与阳性对照扩增结果一致 (图略)。

### 2.4 扩增片段特异性鉴定

为了进一步确定 PCR 反应的特异性, 各随机选取复合 PCR、PCR 及 RT-PCR 产物纯化后进行测序, 并对序列进行了同源性分析, 结果显示, 两个复合 PCR 产物的序列与 GenBank 中 PCV1 毒株 AF071879 与 PCV2 毒株 AF381177 相应区域的序列同源性分别可达 97.9% 和 98.8%。而 PCR 和 RT-PCR 扩增产物与标准毒株的序列同源性均在 99% 以上, 说明扩增产物具有良好的特异性。

表 1 PCV2 与 PRRSV 和/或 PPV 混合感染的检测结果

	Positive case	Positive rate
PCV2+PRRSV	35	52.3% (35/67)
PCV2+PPV	18	26.9% (18/67)
PCV2+PRRSV+PPV	5	7.5% (5/67)

## 2 讨论

PCV2 是 PMWS 的主要病原, 但可能不是唯一

的病原。PMWS 很可能是 PCV2 与 PPV、PRRSV 及其它一些病原混合感染的结果。Pallares 等(2002)<sup>[7]</sup>对 369 份临床 PMWS 病例进行病原分析显示, PRRSV 与 PCV2 混合感染率达到了 51.9%, 只感染 PCV2 的病例仅占 1.9%。Pogranichnyy 等(2002)<sup>[8]</sup>对许多病原与 PMWS 的相关性进行了分析表明, 就单个病原而言, PCV2 与 PMWS 的发生相关性最强, 但如果与 PRRSV 混合感染则 PMWS 发生的危险系数比单独感染 PCV2 更高。而且实验还显示, 健康猪群中 PCV2 的阳性率也达到了 62.5%。因此他们认为 PMWS 的发生过程中其它病原如 PRRSV 可能起着非常重要的作用。Choi 等对 10 个临床 PMWS 病例进行 PPV 检测, 发现其中 4 个同时感染有 PPV 病毒<sup>[9]</sup>。另外许多动物实验也证实 PPV 或 PRRSV 与 PCV2 混合感染可产生 PMWS 症状及典型的组织学病变。Krakowka 等应用 PCV2 分离毒株实验感染未经母乳喂养的仔猪或悉生仔猪仅产生轻微的 PMWS 症状, 但如将 PPV 及 PCV2 共同实验感染仔猪则可以成功复制出典型的 PMWS 症状及病变, 但如用 PPV 单独感染没有任何症状和病变<sup>[5]</sup>。同样, 利用 PRRSV 与 PCV2 混合感染仔猪也已成功复制出 PMWS 典型临床症状及特征性病变<sup>[5,6]</sup>。另外最近研究也表明, PCV2 与 PRRSV 混合感染在猪增生性和坏死性肺炎 (PNP) 的发生过程中起着关键作用。在该项研究中, 作者共对 192 份 PNP 样病损的肺样品进行了检测, 发现有 164 份样品 (85.6%) 共同存在 PRRSV 和 PCV2。因此可以认为 PRRSV 或 PPV 与 PCV2 的混合感染在 PCV2 的致病过程起着重要的作用。

至今, 国内尚没有 PRRSV 或 PPV 与 PCV 混合感染的报道, 对猪群中这三种病毒混合感染的情况也很不了解, 为此本研究建立了分别用于检测 PCV、PPV 与 PRRSV 的复合 PCR、PCR 及 RT-PCR 方法。这几种检测方法的建立为临床上进行 PCV2、PRRSV 及 PPV 混合感染的流行病学调查及相关疾病的诊断打下了基础, 同时也为更好的预防和控制 PCV2 及其相关疾病提供了科学依据。

应用建立的复合 PCR 方法对来自华东地区 4 省市的 127 份表现呼吸道症状的断奶仔猪和繁殖障碍母猪病料进行了 PCV 的检测, 然后应用建立的 PCR 及 RT-PCR 方法对 67 份 PCV2 阳性病料进行了检测, 发现比较严重的二重感染, 其中 PRRSV

与 PCV2 二重混合感染占样品总数的 52.3%; 18 份样品表现为 PCV2 与 PPV 二重混合感染, 占 26.9%。另外, 还有一定比例的三重感染, 共 5 个样品, 占 7.5%。由此可见, 猪群中 PCV2 与 PRRSV 及 PPV 混合感染比较普遍, 其中尤以 PCV2 与 PRRSV 最为严重, 应该针对此流行现状采取综合性的防控措施。

## 参考文献

- [1] Tischer I, Miels W, Wolff D, *et al.* Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus[J]. Arch Virol, 1986, 91(3-4): 271-6.
- [2] Allan G M, McNeilly F, Meehan B M, *et al.* Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland[J]. Vet Microbiol, 1999, 66(2): 115-23.
- [3] Halbur P G, Paul P S, Andrews J J. Viral contributors to the porcine respiratory disease complex[A]. In: Proc Am Assoc Swine Pract[C] 1993. pp 343-350.
- [4] Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, *et al.* Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus[J]. J Comp Pathol, 2000, 122: 9-24.
- [5] Krakowka S, Allan G M, Ellis J, *et al.* Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentiates PCV2 replication[J]. Vet Pathol, 2000, 37: 254-263.
- [6] Harms P A, Sorden S, Halbur P, *et al.* Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine respiratory and reproductive syndrome virus[J]. Vet Pathol, 2001, 38: 528-539.
- [7] Pallares F J, Halbur P G, Ppriessnig 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): 515-9.
- [8] Pogranichniyy R M, Yoon K J, Harms P A, *et al.* Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. J Vet Diagn Invest, 2002, 14(6): 449-560.
- [9] Choi C, Chae C. In-situ hybridization for the detection of porcine parvovirus in pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome [J]. J Comp Pathol, 1999, 121(3): 265-267.