维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷5期
2004年10月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（5）：514-516
October 2004

猪瘟和猪繁殖与呼吸综合征混合感染的快速检测及地域流行性分析*

贾 赟[1,2]，张素芳[1]，周 斌[1]，郑其升[1]，赵玉军[2]，陈溥言[1**]

（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）

Quick Detection for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Classical Swine Fever Virus Mixed Infection and Regional Epidemiology Analysis

JIA Yun[1,2], ZHANG Su-fang[1], ZHOU Bin[1], ZHENG Qi-sheng[1], ZHAO Yu-jun[2], CHEN Pu-yan[1**]

(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: Using a pair of specific primers designed according to the relevant nucleotide sequence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus(PRRSV)VL2332 strain, Lv strain and Classical Swine Fever Virus(CSFV) C strain from GenBank, RT-PCR method was established to detect these two viruses at the same time. With this method, 87 tissue samples of 24 pig farms from Jiangsu, Shanghai and Fujian were tested. Among these samples 75 were PRRS positive, 56 were CSF positive, 53 were both PRRS and CSF positive, which amounts to 60.9 percent of all samples. Combined with regional epidemiology analysis, We concluded that samples from Fujian mainly mixed infected with PRRSV and CSFV, but samples from Jiansu simply infected with PRRSV.

Key words: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*; Classical Swine Fever Virus; Detecting analysis

关键词：猪瘟病毒；猪繁殖与呼吸综合征病毒；检测；流行性分析

中图分类号：S852.65　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2004)05-0514-03

呼吸道和繁殖障碍疾病是猪场最常见的两种疾病，严重影响猪群的健康和正常生产，已经给世界养猪业造成了很大的经济损失[1]。而且这两种疾病的病原复杂多样，不同的猪场病因可能完全不同，从而给疾病的诊断与防治带来了极大的困难。多年的研究表明，呼吸道和繁殖障碍疾病的病原包括猪繁殖与呼吸综合征病毒（*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*，PRRSV）、伪狂犬病病毒（Pseudorabies virus，PRV）、猪瘟病毒（*Classical swine fever virus*，CSFV）、猪圆环病毒2型（*Porcine circovirus*，PCV2）、猪细小病毒（PPV）、猪乙型脑炎病毒（JEV），猪肺炎支原体（Mycoplasma hyopneumoniae，MH）、猪流感病毒、猪沙门氏菌等。其中PRRSV为近几年新发现的一种引起猪繁殖障碍病的传染性病原，而CSFV感染的症状和病变也越来越呈非典型的趋势，给临床鉴别诊断带来了极大的麻烦，在呼吸道和繁殖障碍病的发生过程中所起的作用日益增强[2~4]。

根据PRRSV基因序列差异，PRRSV可分2种基因型：欧洲型（以LV株为代表）及美洲型（以VR-2332株为代表）。2种基因型的N基因编码区ORF7比较保守，利用这一特点可对PRRSV进行分子水平的诊断。CSFV为单股正链RNA病毒，只有一种血清型，E2基因是CSFV的主要保护性抗原，

收稿日期：2004-03-01，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（项目号：2001AA249012）
作者简介：贾赟（1975-），男，河南籍，在读硕士，研究方向为动物分子病毒学。
** 通讯作者：陈溥言（1942-）男，江苏籍，教授，从事动物传染病与分子病毒学研究. Corresponding auther. E-mail: aid@njau.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.c

其 A/D 区最保守[5]。本文在系统分析 PRRSV 及 CSFV 基因组的基础上，应用 Primer 软件设计合成引物，建立了在相同 PCR 扩增条件下能同时检测 PRRSV 和 CSFV 的 RT-PCR 检测方法。此方法的建立为临床上进行 PRRSV、CSFV 的快速检测和流行病学调查打下了基础，同时亦为呼吸道和繁殖障碍性疾病的确诊与有效防治提供了有力工具。

1 材料与方法

1.1 实验材料

CSFV 阳性毒株、PRRSV 阳性毒株为本实验室分离鉴定。送检病料：来源于福建、上海及江苏等 24 个猪场的 87 份病猪组织病料，患病猪表现为呼吸困难，淋巴结肿大，母猪表现产死胎、胎儿异常化等繁殖障碍，病猪消瘦等。蛋白酶 K，RNasin，PCR 试剂均购自大连 TaKaRa 公司；反转录酶 M-MLV、Trizol 试剂盒为 Promega 公司产品。PCR 仪为 Amp-Gene 公司产品。其他常规试剂均为分析纯。

1.2 引物设计

为了在 PCR 扩增仪上能够同时进行两种病毒核酸片段的扩增，缩短检测病料的时间，快速诊断疾病。笔者设计引物时，将其扩增两种病毒的引物指标：包括 Tm 值、GC 含量、优化的退火温度、扩增片段长度均要求接近，以期达到相同的 PCR 扩增条件。

参考 GenBank 公布的 VL2332（美洲代表株）及 LVORF7（欧洲代表株），设计合成了以下 2 条 PRRSV 引物，片段跨幅为整个 ORF7，长 372bp。引物序列如下：

上游引物：5'-GCGGATCCATGCCAAATAACAAC -3'

下游引物：5'-AGCTCGAGTCATGCTGAGGGTGA-3'

参考中国猪瘟兔化弱毒（C-株）E2 区基因设计合成了两条 CSFV 引物，片段跨幅为 A/D 抗原区，长 375bp。引物序列如下：

上游引物：5'-CGCGTCGACCGATACTTGGCATCA TT G-3'

下游引物：5'-AACCTGCAGCCCCAACTTACAGTA GA-3'

引物由大连 TaKaRa 公司合成。

1.3 病料的处理和 RNA 的提取

将病猪的肺、脾、淋巴结等组织与 PBS 按 1:4 混合充分研磨，冻融 3 次，4℃12000r/min 离心 10min，取上清 500μL，加入 700μL Trizol 后按常规方法提取 RNA。同法制备 PRRSV 阳性毒株和 CSFV 阳性毒株的 RNA 模板。

1.4 RT-PCR

RT 为 20μL 反应体积，组成如下：5×Buffer 4μL，10mmol/L dNTP 2μL，Rnasin 1μL，上下游引物各 1μL，RNA 溶液 10μL。65℃作用 15min，待稍微冷却后，加入 M-MLV1μL，42℃作用 1h，95℃变性 5min。PCR 总体积为 50μL，包括 10×PCR buffer 5μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 3μL，超纯水 31.5μL，10μL RT 产物，0.5μL Taq 酶，将各组分混匀 95℃变性 5min 后进入 PCR 循环。扩增 PRRSV 和 CSFV 基因片段的参数设置均为 95℃1min，51℃1min，72℃1min，35 个循环，然后 72℃延伸 10min。待 PCR 结束，取 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，观察扩增片段大小。

1.5 扩增片段的测序分析

将部分 RT-PCR 扩增产物用胶回收试剂盒纯化后进行直接测序，此工作由大连 Takara 公司完成。然后用 DNAstar 软件进行序列同源性分析，进一步证实扩增产物的特异性，防止假阳性的出现。

2 结果和讨论

2.1 PRRSV 检测

从 PRRSV 阳性毒株中扩增出了 372bp 的目的条带，说明设计的引物具有良好的特异性。用此 RT-PCR 方法对 87 份临床组织病料进行了 PRRSV 检测，结果从 75 份待检样品中扩增出了 PRRSV 372bp 的特异条带。PRRSV 阳性占样品总数的 86.2%。

2.2 CSFV 检测

用 RT-PCR 方法扩增出了 375bp 的核酸条带（与阳性对照结果相符），待检病料有 56 份表现为 CSFV 阳性，CSFV 阳性率高达 70.1%。PRRSV 与 CSFV 两者皆为阳性的占待检病料的 60.9%。

2.3 扩增片段的特异性鉴定

随机分别选取 PRRSV 和 CSFV 的 2 个 RT-PCR 产物纯化后进行测序，并对部分序列进行同源性分析，所扩增产物与标准毒株的部分序列同源性均在 99%左右（结果未显示），说明扩增产物具有良好的特异性，用本实验建立的方法进行 PRRSV 与 CSFV 检测是可行的。

PRRSV 与 CSFV 在患呼吸道及繁殖障碍性疾病的病猪中感染非常普遍，而且经常表现为混合感染，特别是感染 CSFV 的猪中，大部分都感染了 PRRSV（94.6%），而 PRRSV 则呈大面极感染（占样品总数的 86.2%），侧面也说明了混合感染的原因可能是 PRRSV 感染后，造成免疫力低下，而引起

维普资讯 http://www.cqvip.com

CSFV 的继发混合感染。因此，PRRSV 和 CSFV 在呼吸道和繁殖障碍性疾病的发生过程中起着重要作用。

2.4 检测病料的地域流行性分析

对福建、上海及江苏的 13 个猪场的 87 份病料的地域分布进行了分析，结果见表 1。

表 1 病料地域分布

Table 1 Analysis of regional epidemology

	PRRSV	CSFVV	PRRSV/CSFV	Total
Fujian(福建)	3	2	45	50
Jiangshu(江苏)	17	3	5	25
Shanghai(上海)	6	3	3	12

检测表明在混合感染的 53 份病料中，福建最多，占混合感染病料总数的 77.4%。提示福建省 PRRSV 和 CSFV 的混合感染正在呈大面积的流行，而上海和江苏是呈零星个别混合感染，尚未形成规模流行。两种疾病单独发病则以江苏的 PRRS 为最高，已经形成规模流行，但尚未引发 CSF 和 PRRS 的规模混合感染流行，因此应针对此流行现状，采取相应必要的防治措施。另外，因为呼吸道和繁殖障碍疾病两种疾病的病原复杂多变，所以在本试验所表现为单发 PRRSV 阳性、CSFV 阳性的组织病料中也可能还存在其他致病因素，尚需在进一步的实验中验证。

参考文献

[1] DesRosiers R. Diagnosis and control of swine respiratory diseases[J]. Proc Am Assoc Swine Pract[C]. 1997,333-344.

[2] Harding J C S. Clark E G. Recognizing and diagnosing Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) [J]. Swine Health and Production. 1997, 5(5): 201-203.

[3] Dea S, Bilodean R, Sauvageau R, et *al*. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs [J]. J Vet Diagn Invest, 1992, 4:380-392.

[4] Rekik M R, Arora D J S, Dea S. Genetic variation in swine influenza virus A isolate associated with proliferative and necrotizing pneumonia in pigs [J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(2): 515-518.

[5] 殷 震，刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版，北京：科学出版社，1997.