

猪传染性胸膜肺炎病料中 PCV-2 和 PRRSV 的 PCR 检测

刁有祥 丁家波 姜世金 崔治中* 陈本龙

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘 要 :应用 PCR 方法对从山东省不同地区采集的 253 份猪传染性胸膜肺炎肺脏和 125 份临床健康猪肺脏进行 PCV-2 和 PRRSV 的检测。结果显示,在传染性胸膜肺炎猪肺脏中,171 份为 PCV-2 阳性,阳性率达 67.5%;101 份样品为 PRRSV 阳性,阳性率达 40%;其中 68 份样品同时检出 PCV-2 和 PRRSV,共感染阳性率达 26.8%。而临床健康猪肺组织中 21 份样品 PCV-2 检测结果为阳性,阳性率为 16.8%;12 份样品 PRRSV 检测结果阳性,阳性率为 9.6%,PCV-2 和 PRRSV 共感染未检出。统计结果显示,传染性胸膜肺炎发病猪与临床健康猪 PCV-2、PRRSV 及 PCV-2 和 PRRSV 共感染的阳性率差异极显著,传染性胸膜肺炎发病猪的肺脏中 PCV-2 和 PRRSV 的检出率明显高于临床健康猪。上述检测结果提示,猪传染性胸膜肺炎的发生可能与 PCV-2 和 PRRSV 的感染和共感染有关。

关键词 猪传染性胸膜肺炎 圆环病毒 呼吸与繁殖综合征病毒 共感染

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0397-04

猪传染性胸膜肺炎(Porcine pleuropneumonia)是由胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)引起的一种高度致死性的传染性呼吸道病,以急性出血和慢性的纤维素性坏死性胸膜炎为主要特征^[1]。本病能使各日龄的猪感染和发病,1~4 月龄的幼龄猪最易感,死亡率 5%~30%,在新引进猪群多呈急性暴发,其发病率和死亡率常在 20%以上,最急性型的死亡率可高达 80%~100%。该病在我国的发生呈逐年上升趋势,已成为危害养猪业最严重的疾病之一,给我国养猪业造成严重的经济损失^[2~4]。

猪胸膜肺炎放线杆菌可存在于健康猪的扁桃体和鼻腔、气管中,当猪群抵抗力降低时,胸膜肺炎放线杆菌迅速增殖^[5],而引起猪群发生传染性胸膜肺炎。猪 PCV-2(猪圆环病毒 2 型)和 PRRSV(猪呼吸与繁殖综合征病毒)是我国近年来新发现的两种免疫抑制性病毒,二者均可侵害免疫系统,导致猪的抵抗力下降,而易继发其它疾病^[6]。为了解猪传染性胸膜肺炎病料中 PCV-2 和 PRRSV 的感染情况,我们对从山东省不同地区采集的患传染性胸膜肺炎猪和临床健康猪肺脏进行了 PCV-2 和 PRRSV 的检测,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料 :从山东省不同地区,未经 PCV-2 和 PRRSV 灭活疫苗或弱毒疫苗免疫的养猪场,采集具有呼吸困难、剖检变化表现为纤维素性胸膜炎和出血性坏死性肺炎为特征的 1~4 月龄病死猪的肺脏,按文献^[1]的方法进行胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定,对放线杆菌阳性病料进行 PRRSV 和 PCV-2 的检测。相同日龄范围的临床健康猪肺脏也采自上述地区的养猪场,按上述方法进行胸膜肺炎放线杆菌的分离鉴定,对阴性病料进行 PRRSV 和 PCV-2 的检测。

PRRSV 和 PCV-2 阳性猪肺脏是由本实验室经 PCR 检测和测序确定为阳性的病料;PRRSV 和 PCV-2 阴性对照为 SPF 猪肺脏,由山东省医学科学院实验动物中心提供。

1.1.2 仪器和试剂 :PCR 仪(Eppendorf);电泳仪、凝胶成像仪(Biorad);DNA 回收试剂盒、反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L),dNTP、10 \times PCR buffer (TaKaRa)。

1.1.3 PCR 引物 :根据 GenBank 已发表的序列,设计引物序列如下:PCV-2 上游引物 5'-CGACTTTTA-AATCCG-3';下游引物 5'-AACAAAGTTGTTTCGCTA-3',

基金项目:山东省重大科技攻关项目(011020102)

* 通讯作者。Tel:86-538-8241560 E-mail:zzcui@sdau.edu.cn

作者简介:刁有祥(1962-),男,山东省胶州市人,教授,博士,主要从事畜禽病原分离鉴定与防制研究。E-mail:yxdiao@163.com

收稿日期:2004-11-03,修回日期:2008-02-28

预期扩增的片段为 862bp。PRRSV 上游引物 5'-GTT-GACGCTATGTGAGC-3' ;下游引物 5'-ACCATCAAGCA-CAACTC-3' ,预期扩增的片段为 419bp ,引物由上海 Sangon 公司合成。

1.2 猪传染性胸膜肺炎肺脏中 PCV-2 的 PCR 检测

1.2.1 样品总 DNA 的提取 :

取少量传染性胸膜肺炎发病猪肺组织及 PCV-2 阳性及阴性对照猪组织 ,分别加入 0.5mL 的组织抽提缓冲液(100mmol/L NaCl ,10mmol/L Tris·Cl pH8.0 ,25mmol/L EDTA pH8.0 ,0.5% SDS) ,研磨离心后 ,取上清液。于每份样品中加入蛋白酶 K 5 μ L ,52 $^{\circ}$ C 消化 24h ,而后加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25 :24 :1)混和液 ,振荡均匀 1min。12000r/min 离心 5min ,将上清液转移至另一个离心管中 ,加入 0.5mL 氯仿 ,振荡摇匀 ,12000r/min 离心 5min ,将上清液转移至另一个离心管中 ,加入 1mL 的无水乙醇 , -20 $^{\circ}$ C 2h ,12000r/min 离心 5min ,弃上清液 ,加入 1mL 70% 的乙醇漂洗 ,12000r/min 离心 3min ,将上清液弃去 ,自然干燥后 ,加入 50 μ L 的 TE 缓冲液。

1.2.2 PCR 检测 :

50 μ L PCR 反应体系含 10 \times PCR buffer 5 μ L ,10mmol/L 的 dNTP 4 μ L ,5U/ μ L Taq DNA 酶 0.5 μ L ,25 μ mol/L 上、下游引物各 1.5 μ L ,模板 DNA 1 μ L ,ddH₂O 36.5 μ L。PCR 反应条件 :95 $^{\circ}$ C 5min ,95 $^{\circ}$ C 30s ,54 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 2min ,共进行 28 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10min。然后取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 ,在凝胶成像仪中观察并记录结果。

1.3 猪传染性胸膜肺炎肺脏中 PRRSV 的 RT-PCR 检测

1.3.1 样品总 RNA 的提取 :

按 Catrimox-14TM RNA 提取试剂盒说明书进行。分别取研磨后的传染性胸膜肺炎发病猪肺组织及 PRRSV 阳性和阴性对照猪肺组织各 10mg ,加入 1mL 的 Catrimox-14TM Solution ,然后充分混匀。3000r/min 离心 5min ,除去溶液 ,加入 1mL DEPC 处理过的 ddH₂O ,12000r/min 离心 2min。向沉淀中加入 0.5mL Guanidinium 溶液 ,混匀 ,加入 0.5mL 水饱和的苯酚/氯仿/异戊醇(25 :24 :1)混合液 ,12000r/min 离心 5min。将上清移至新的微量离心管中 ,加入等量的异丙醇 , -20 $^{\circ}$ C 放置 30min 后 ,12000r/min 离心 10min。沉淀用 70% 的冷乙醇清洗 1 次 ,经真空干燥后 ,溶于 DEPC 处理的 ddH₂O。

1.3.2 RT-PCR 检测 :

按 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 说明书进行反转录。反应总体积 10 μ L :MgCl₂ 2 μ L ,10 \times RT Buffer 1.0 μ L ,RNase Free

ddH₂O 3.75 μ L ,10mmol/L dNTP mixture 1 μ L ,RNase inhibitor 0.25 μ L ,AMV Reverse Transcriptase 0.5 μ L ,PRRSV 下游引物 0.5 μ L ,肺脏提取总 RNA 1 μ L。将上述反应物混合均匀后 ,42 $^{\circ}$ C 1h ,95 $^{\circ}$ C 5min 灭活反转录酶。利用 RT 产物建立 50 μ L 的 PCR 反应体系 :2.0 μ L 反转录 cDNA ,25 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L ,1.0 μ L 10mmol/L 的 dNTP ,5.0 μ L 10 \times Buffer ,0.5 μ L Taq DNA 聚合酶 ,40.5 μ L ddH₂O。PCR 反应条件 :94 $^{\circ}$ C 5min ;94 $^{\circ}$ C 45s ,55 $^{\circ}$ C 45s ,72 $^{\circ}$ C 60s ,共进行 28 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10min。取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳 ,凝胶成像仪中观察并记录结果。

1.4 PCR 产物的克隆和序列测定

为确定 PCR 产物的特异性 ,按 DNA 回收试剂盒的方法 ,回收 PCV-2 和 PRRSV PCR 扩增产物 ,并将回收的 PCR 产物分别与 pMD-18-T 载体连接 ,转化大肠杆菌 TG1 ,按常规方法鉴定克隆。随机挑取 4 份病料 PCV-2 和 PRRSV PCR 扩增产物的阳性克隆 ,进行序列测定与分析。

1.5 数据处理

对传染性胸膜肺炎病料中 PCV-2 和 PRRSV 及共感染的阳性数与临床健康猪肺脏中 PCV-2 和 PRRSV 及共感染的阳性数进行方差分析 ,以确定差异的显著性。

2 结果

2.1 病料检测结果

经细菌的分离鉴定 ,在具有纤维索性胸膜炎和出血性坏死性肺炎为特征的肺脏中 ,253 份病料猪胸膜肺炎放线杆菌阳性 ;在临床健康猪肺脏中 ,125 份猪胸膜肺炎放线杆菌阴性。

2.2 PCR 产物的克隆和序列测定

PCV-2 和 PRRSV PCR 产物经克隆、测序 ,结果 4 个 PCV-2 扩增产物的序列之间及 4 个 PRRSV 扩增产物的序列之间同源性均非常高 ,介于 97.2% ~ 99.3% 之间 ,PCV-2 扩增产物的序列与已发表的 PCV-2 相关区域的核苷酸序列同源性均高于 96%^[7] ,PRRSV 扩增产物的序列与已发表的美洲株相关区域的核苷酸序列同源性均高于 95%^[8]。表明建立的 PCV-2 和 PRRSV 的 PCR 检测方法可行。

2.3 传染性胸膜肺炎猪肺脏及临床健康猪肺脏中 PCV-2、PRRSV 及 PCV-2 和 PRRSV 共感染的检测

253 份传染性胸膜肺炎猪肺脏和 125 份临床健康猪肺脏经 PCR 扩增 ,结果 253 份传染性胸膜肺炎猪肺脏中 ,171 份 PCV-2 阳性 ,101 份 PRRSV 阳性。

阳性率分别为 67.5% 和 40% ;其中 ,68 份肺脏样品同时检出 PCV-2 和 PRRSV ,两者共感染的阳性率为 26.8%。而在 125 份临床健康猪肺脏中 ,21 份检出 PCV-2、12 份检出 PRRSV ,阳性率分别为 16.8% 和 9.6% ;两者共感染的肺脏未检出。部分传染性胸膜肺炎猪肺脏中 PCV-2 和 PRRSV PCR 扩增结果见图 1-A、图 2-A ;部分临床健康猪肺脏中 PCV-2 和 PRRSV PCR 扩增结果见图 1-B、图 2-B。

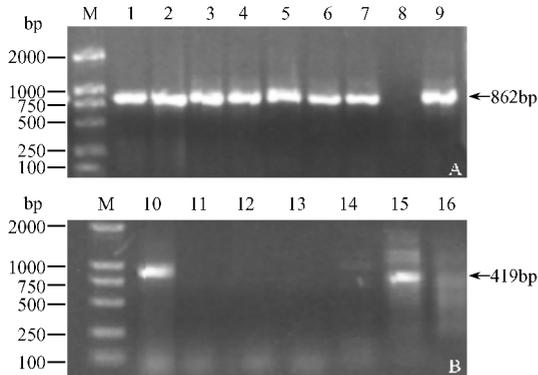


图 1 部分猪传染性胸膜肺炎肺脏 (A) 及临床健康猪肺脏 (B) 中 PCV-2 扩增结果

Fig.1 The PCR amplification result of PCV-2 detected in parts of porcine pleuropneumonia lungs and in clinically healthy pig lungs

A. Porcine pleuropneumonia lungs ; B. Clinically healthy pig lungs. M. DL2000 marker ; 1~7 ,12~16. Detected samples ; 8 ,11. Negative control ; 9 ,10. Positive control.

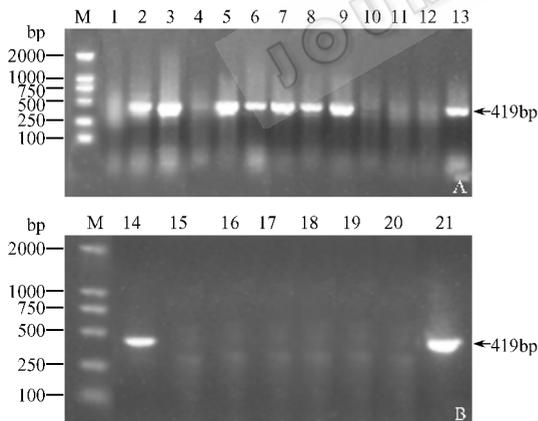


图 2 部分猪胸膜肺炎肺脏 (A) 及临床健康猪肺脏 (B) 中 PRRSV 的 PCR 扩增结果

Fig.2 The PCR amplification result of PRRSV detected in parts of porcine pleuropneumonia lungs and in clinically healthy pig lungs

A. Porcine pleuropneumonia lungs ; B. Clinically healthy pig lungs. M. DL2000 marker ; 1~11 ,16~21. Detected samples ; 12 ,15. Negative control ; 13 ,14. Positive control.

2.4 数据处理结果

统计结果表明 ,传染性胸膜肺炎发病猪肺脏中 PCV-2 和 PRRSV 阳性率及 PCV-2、PRRSV 共感染的

阳性率明显高于临床健康猪肺脏中 PCV-2、PRRSV 阳性率及 PCV-2 和 PRRSV 共感染的阳性率 ,差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

猪胸膜肺炎放线杆菌是一种条件性致病菌 ,可存在于正常猪的鼻、咽中 ,当饲养管理不良 ,猪群受到应激而使机体抵抗力降低时 ,扁桃体内及上呼吸道存在的胸膜肺炎放线杆菌迅速增殖 ,并且释放出毒素而引起传染性胸膜肺炎的发生。近年来 ,随着集约化养猪业的发展 ,由 PCV-2 和 PRRSV 感染引起的免疫抑制是造成机体抵抗力降低的主要因素^[6]。上述两种病毒感染猪后 ,侵害机体的免疫系统 ,尤其是侵害肺泡巨噬细胞 ,造成呼吸系统的抵抗力下降 ,使猪易继发感染胸膜肺炎放线杆菌、巴氏杆菌、支原体、链球菌等^[9~11]。

崔治中^[6]对我国集约化养鸡场流行病学调查中发现 ,我国鸡群中免疫抑制性病毒二重及多重感染现象非常普遍。不仅造成明显的生长迟缓 ,特别重要的是引起中枢免疫器官的严重萎缩 ,而易继发其它疾病的发生。近年来 ,在集约化饲养猪群中的 PRRSV 和 PCV-2 共感染现象也日益为人们所关注^[12,13]。我们对山东省不同地区采集的 253 份传染性胸膜肺炎放线杆菌阳性猪肺脏和 125 份临床健康猪肺脏检测结果表明 ,发生传染性胸膜肺炎猪的肺脏中 PCV-2 和 PRRSV 的检出率明显高于临床健康猪。该结果提示 ,猪传染性胸膜肺炎的发生可能与 PCV-2 和 PRRSV 的感染有关 ,但三者之间的确切关系有待进一步研究确定。随着我国集约化养猪业的发展 ,免疫抑制性病毒的感染或共感染的现象会日趋严重 ,将对我国养猪业造成严重影响。所以 ,我国应加强对猪双重或多重免疫抑制性病毒共感染的研究 ,以保护和促进我国养猪业的发展。

参 考 文 献

- [1] 杨旭夫,彭发泉.胸膜肺炎嗜血杆菌的分离和鉴定.中国畜禽传染病,1990(4):1-3.
- [2] 陈如明,谢鸣星,李云峰,等.鲁豫地区驻军猪传染性胸膜肺炎血清学调查.中国畜禽传染病,1990(4):38-40.
- [3] 郭捷,姜永康,曹国文,等.四川猪嗜血杆菌胸膜肺炎血清学调查.动物检疫,1990(6):21-22.
- [4] 华云龙,张应国,钟南.云南猪传染性胸膜肺炎血清抗体调查.动物检疫,1992(3):27.
- [5] Nderson C, Potter A A, Gerlach G F. Isolation and molecular characterization of spontaneously occurring cytolysin negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect and Immun*, 1991, 59: 4110-4116.

- [6] 崔治中. 免疫抑制性病毒多重感染在鸡群疫病发生和流行中的作用. 畜牧兽医学报 2003 34(5): 417 - 421.
- [7] 郝 鑫, 陈焕春, 陈华平, 等. 猪 II 型圆环病毒全基因组的克隆及感染性鉴定. 微生物学报 2004 44(4): 172 - 176.
- [8] 杨汉春, 黄芳芳, 郭 鑫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) BJ-4 株全基因组序列测定与分析. 农业生物技术学报 2001 9(3): 212 - 218.
- [9] Jake W. Immunosuppressive viruses—a new pattern in pig disease. *Pig International* , 1996 8 : 27 - 28.
- [10] Gutierrez-Martin C B , Rodriguez-Delgado O , Alvarez-Nistal D. Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* , PRRS , Aujeszky 's disease and *influenza viruses* in Spanish finishing pigs. *Res Vet Sci* , 2000 68(1) : 9 - 13.
- [11] 邓汉虹, 刘炳林. 猪繁殖与呼吸综合征继发传染性胸膜肺炎的诊治. 湖南畜牧兽医 2002 2 : 23.
- [12] 蒋小红, 黄伟坚, 连慧香, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪圆环病毒 2 型混合感染的诊断. 广西畜牧兽医 2003 19(3) : 106 - 108.
- [13] 李玉峰, 王先炜, 姜 平. 上海地区出现猪繁殖与呼吸综合征和 2 型猪圆环病毒混合感染. 中国兽医学报 2003 23(23) : 442 - 444.

PCR detection of PCV-2 and PRRSV in porcine pleuropneumonia samples

DIAO You-xiang DING Jia-bo JIANG Shi-jin CUI Zhi-zhong* CHEN Ben-long

(College of Animal Science and Technology , Shandong Agricultural University , Tai 'an 271018 , China)

Abstract : PCV-2 (*Porcine circovirus type-2* , PCV-2) and PRRSV (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* , PRRSV) were detected by PCR from 253 porcine pleuropneumonia samples and 125 clinically healthy lung samples were collected from different districts of Shandong province . The results showed that 171 samples for PCV-2 and 101 samples for PRRSV were positive . The positive ratio were 67.5% and 40% , respectively . The co-infection number of PCV-2 and PRRSV was 68 in 253 samples , the positive ratio was 26.8% . While in the clinically healthy samples , only 21 samples for PCV-2 and 12 samples for PRRSV were detected positive , the positive ratio were 16.8% and 9.6% , respectively , no co-infection samples were found . Statistical result showed significant difference between positive ratio for PCV-2 and PRRSV in porcine pleuropneumonia samples and that of in clinically healthy samples . The above results demonstrated that there maybe some relationship between the infection of porcine pleuropneumonia and PCV-2 and PRRSV in pigs .

Key words : Porcine pleuropneumonia , PCV-2 , PRRSV , Co-infection

Foundation item : Key Project for Science and Technology Development of Shandong Province (011020102)

* Corresponding author . Tel 86-538-8241560 ; E-mail : zzcui@sdau.edu.cn

Received date : 11-03-2004

《微生物学报》加入“万方数据”等数字化期刊群的声明

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库, 请在投稿时声明, 否则本刊将视为同意收录。

另外, 从 2002 年开始, 凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”, 进入因特网提供信息服务。有不同意见者, 请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

读者可上网查询浏览本刊内容, 刊物网址: <http://wsxb.periodicals.com.cn>

《微生物学报》编辑部