

高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 快速鉴别诊断方法的建立与临床应用

刘忠华 余兴龙* 李润成 黄泽彬 廖立珊 白霞 李晶 向卫军 汪镇南 丁建

(湖南农业大学动物医学院 长沙 410128)

摘要: 根据高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)Nsp2 基因的缺失信息, 设计了 3 条特异性引物, 以含高致病性 PRRSV Nsp2 基因的质粒 pMDNSP2 及普通 PRRSV VR2332 株 RNA 为模板, 建立了快速诊断高致病性 PRRSV RT-PCR 方法。通过对临床组织病料的总 RNA 进行不同稀释倍数检测, 结果表明该方法能从 0.265 pg 的总 RNA 中检测到 PRRSV 的基因, 说明敏感性高。用该方法对猪瘟病毒(CSFV)、II 型圆环病毒(PCV-2)、伪狂犬病病毒(PRV)、链球菌(*Streptococcus*)、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)同条件检测, 结果都为阴性。进一步对 36 份疑似高致病性 PRRSV 临床组织病料细胞培养物、2 株 PRRSV 商品活疫苗以及 52 个猪场所送检的 184 份临床样品进行了检测应用, 结果 36 份疑似高致病性 PRRSV 临床组织病料的细胞培养物有 5 份样品为阳性且都为高致病性 PRRSV, 2 株 PRRSV 商品活疫苗为普通 PRRSV, 52 个猪场中有 42 个猪场(123 份样品)呈阳性, 其中只有 1 份为普通 PRRSV。实验表明该方法能够准确地鉴别诊断高致病性 PRRSV 和普通 PRRSV, 且具有快速、敏感和特异的特点, 具有临床实用性。

关键词: 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病, RT-PCR, 鉴别诊断

Development and Clinical Application of RT-PCR Differential Diagnosis Method for High Virulent Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

LIU Zhong-Hua YU Xing-Long* LI Run-Cheng HUANG Ze-Bin LIAO Li-Shan
BAI Xia LI Jing XIANG Wei-Jun WANG Zhen-Nan DING Jian

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: Based on the deletion information of high virulent PRRSV genome, 3 oligonucleotide primer were designed and synthesized. Specific and sensitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) assays were developed for the detection of high virulent PRRSV. The sensitivity and specificity of RT-PCR assays were evaluated, the results showing that the detection limit of the assay was found to be 0.265 pg of tissue total RNA, and the protocol have no cross-reaction with classical swine fever virus, porcine circovirus type 2,

基金项目: 湖南省科技重大专项(No. 2007FJ1003); 湖南农业大学人才引进基金(No. 04YJ03)

* 通讯作者: Tel: 0731-4673623; E-mail: xlyu999@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-01-07; 接受日期: 2008-03-14

pseudorabies virus, streptococcus, haemophilus parasuis and *Escherichia coli*. Then 36 cell cultures, two PRRSV live vaccine strains and 184 clinical specimens from 52 farms were tested. Five PRRSV field isolates were the high virulent PRRSV; two PRRSV live vaccine strains from normal PRRSV, and 123 specimens from 42 farmer were positive (only 1 specimen was normal PRRSV). This RT-PCR method proved to be accurate differential diagnosis of the high virulent PRRSV and normal PRRSV with the characteristics of rapidity, sensitivity and specificity, and has a strong clinical relevance.

Keywords: High virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus, RT-PCR, Differential diagnosis

猪繁殖障碍与呼吸道综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由猪繁殖障碍与呼吸道综合征病毒(PRRSV)引起的猪RNA病毒病,以母猪发热、厌食与流产、死产、木乃伊胎和产弱仔猪等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征^[1]。猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)为有囊膜的单股正链RNA病毒,属动脉炎病毒科成员(Arteriviridae)^[2]。根据基因的变异程度,目前将PRRSV分为2个不同的地理群^[3]:以欧洲标准毒株Lelystadvirus(简称LV)为代表的A群和以美国标准毒株ATTC VR-2332为代表的B群。1987年首次在美国报道了此病和发生以后,猪繁殖与呼吸综合征几乎传遍了世界其他养猪的国家^[4]。1996年郭宝清等首次在国内疑似PRRSV感染的猪群中分离出PRRSV,从而证明了该病毒在我国的存在^[5]。目前我国将其定为二类传染病,此病的存在,对养猪业造成了巨大的经济损失。

2006年夏初,浙江、江苏、江西、上海、湖南、湖北等长江流域多个省市开始发生猪“高热病”疫情,继而广东、广西、福建、河南等多个省市也持续暴发了该病,至今该病已传到我国绝大多数养猪地区,导致猪大量死亡,给养猪业造成了巨大的经济损失^[6,7],并成为日前生猪与猪肉价格大幅上升的最主要原因。农业部通过组织有关单位对“高热病”疫情的调查研究,证实疫情主要是由高致病性PRRSV变异株所引起。自2006年夏发病以来,到目前该病还没有得到有效的控制,为了有效控制该病的发生,建立一种快速、准确、敏感的病原检测方法十分必要。本实验室自猪“高热病”疫情以来,开展了大量的工作,分离得到了5株高致病性PRRSV,完成了高致病性蓝耳病毒部分基因的测序,发现*Nsp2*基因与中国动物疫病预防与控制中心登录至GenBank上的4条变异株基因序列*Nsp2*基因的缺失

一致。根据*Nsp2*基因的缺失信息和PCR技术原理,设计了3条特异性引物,建立了高致病性PRRSV RT-PCR快速诊断方法,并用该方法对临床样品进行了检测。

1 材料与方法

1.1 酶和试剂

RNA抽提试剂 Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司; First Strand Synthesis Kit 购自 TOYOBO 公司; PCR试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 引物设计

通过本实验室测序的5株PRRSV变异株*Nsp2*基因(GenBank登录号分别是: EF471924, EF471926, EF460487, EF471921, EF471925)以及中国动物疫病预防与控制中心登录至GenBank上的4条变异株基因序列(GenBank登录号: EF075945, EF112445, EF112446, EF112447)和国内PRRSV美洲株序列进行同源性比较,获得PRRSV变异株*Nsp2*基因的变异信息(见图1),即:*Nsp2*基因2781 nt~2783 nt(以GenBank登录号AY15031的序列为准)和2934 nt~3020 nt出现缺失。根据PRRSV变异株*Nsp2*基因的缺失信息,借助DNASar和Vector 3.0软件设计了3条引物(见表1)。

1.3 病毒分离

36份疑似高致病性PRRSV临床组织病料及血液,按文献[8]使用的方法接种Marc-145细胞,进行PRRSV的分离。

1.4 病毒和质粒

PRRSV ATCC VR2332株和含高致病性PRRSV *nsp2*基因的质粒pMDNSP2 (GenBank登录号为EF471924),分别由实验室保存和构建。

1.5 总RNA的提取

总RNA的提取按Invitrogen公司Trizol Re-

1.9 检测样品

检测样品分为 3 类：即上述 36 份疑似高致病性 PRRSV 临床组织病料细胞培养物；2 株 PRRSV 商品活疫苗：猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(CH-1R 株)活疫苗(生产批号：71910505216)和 Ingelvac PRRS MLV 株(生产批号：245-986)以及近一年来湖南省部分猪场送检病猪的临床样品。

2 结果

2.1 特异性试验

用建立的 RT-PCR 方法对 pMDNSP2 和普通 PRRSV ATCC VR2332 株的 RNA 进行扩增，用 P1 和 P3 引物进行 PCR 扩增，PRRSV 普通株 ATCC VR2332 可扩增出 529 bp 条带，高致病性 PRRSV 扩增条带为 439 bp(见图 2)；用 P2 和 P3 引物扩增高致病性 PRRSV，可扩增出 218 bp 条带，PRRSV 普通株

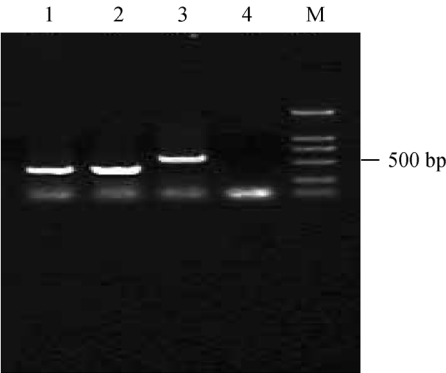


图 2 P1 和 P3 引物 RT-PCR 检测结果
Fig. 2 RT-PCR detection results of P1-P3 primer
1: PRRSV VR2332 临床样品; 2: pMDNSP2; 3: PRRSV VR2332; 4: 阴性对照; M: DNA Marker DL2000
1: Clinical sample; 2: pMDNSP2; 3: PRRSV VR2332; 4: Negative control; M: DNA Marker DL2000

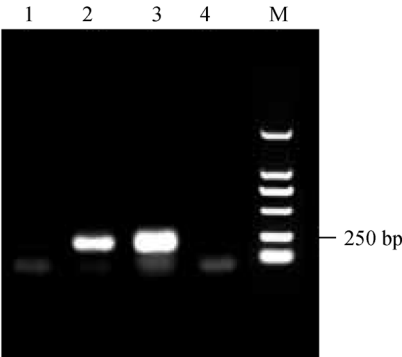


图 3 P1 和 P3 引物 RT-PCR 检测结果
Fig. 3 RT-PCR detection results of P2-P3 primer
1: PRRSV VR2332; 2: 临床样品; 3: pMDNSP2; 4: 阴性对照; M: DNA Marker DL2000
1: PRRSV VR2332; 2: Clinical sample; 3: pMDNSP2; 4: Negative control; M: DNA Marker DL2000

ATCC VR2332 没有条带(见图 3)，而其他对照猪病原体在相同位置无扩增条带。

2.2 敏感性试验

将高致病性 PRRSV 为阳性的组织病料总 RNA $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 梯度稀释后，用建立的 RT-PCR 方法检测，结果在 10^{-5} 稀释(总 RNA 浓度为 0.265 ng/mL)，即：总 RNA 检测量为 0.265 pg 总 RNA 时仍然可以扩增出清楚的目的条带(见图 4)。

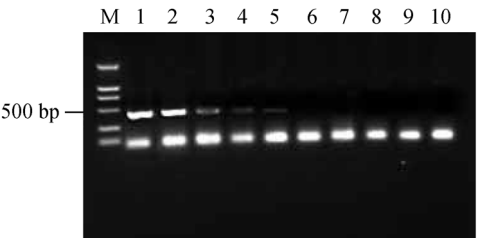


图 4 临床组织病料不同稀释度检测结果
Fig. 4 Sensitive analysis of different dilutions of clinical samples
M: DNA Marker DL2000; 1: 10^{-1} ; 2: 10^{-2} ; 3: 10^{-3} ; 4: 10^{-4} ; 5: 10^{-5} ; 6: 10^{-6} ; 7: 10^{-7} ; 8: 10^{-8} ; 9: 10^{-9} ; 10: 阴性对照
M: DNA Marker DL2000; 1: 10^{-1} ; 2: 10^{-2} ; 3: 10^{-3} ; 4: 10^{-4} ; 5: 10^{-5} ; 6: 10^{-6} ; 7: 10^{-7} ; 8: 10^{-8} ; 9: 10^{-9} ; 10: Negative control

2.3 样品检测的应用

36 份临床疑似高致病性 PRRSV 的组织病料及血液样品接种 Marc-145 细胞，盲传 3 代后，细胞培养物用构建的 RT-PCR 方法进行检测，结果只有 5 份组织病料接种的细胞培养物可检出 PRRSV 且都为高致病性 PRRSV；2 株 PRRSV 商品活疫苗为普通 PRRSV；在湖南省 52 个猪场送检的 184 份临床疑似病猪临床样品的检测中，结果有 42 个猪场(123 份样品)为阳性，其中，只有 1 份样品为普通 PRRSV，另 10 个猪场为阴性。

3 讨论

用于 PRRSV 诊断的方法主要有病毒的分离法、血清学方法(IFA、ELISA、IPMA、SN)和 RT-PCR 等方法^[9]。血清学方法中 IFA 和 ELISA 方法应用较广泛，IFA 方法需要荧光显微镜且结果通过肉眼观察，有一定的主观性，ELISA 主要用于检测抗体，血清学方法不能区分高致病性 PRRSV 和普通 PRRSV。病毒分离法是一种传统的检测方法，但作者通过对 36 份疑似高致病性 PRRSV 临床组织病料用 Marc-145 细胞进行病毒分离，只有 5 份样品可分离到 PRRSV，而这些样品经 RT-PCR 方法检测则均呈高致病性的

PRRSV 阳性。说明目前广泛用于 PRRSV 分离的 Marc-145 对本病毒的易感性较差,且病毒分离所需时间长,因此病毒分离法不适合用于该病的快速诊断。因此,根据高致病性 PRRSV *Nsp2* 基因的缺失情况,建立了高致病性 PRRSV 的 RT-PCR 快速检测技术。

本实验根据高致病性 PRRSV *Nsp2* 基因的缺失信息,设计了 3 条引物,以含高致病性 PRRSV *nsp2* 基因的质粒 pMDNSP2 和普通 PRRSV ATCC VR2332 株的 RNA 为模板,建立了快速诊断高致病性 PRRSV RT-PCR 方法。通过特异性实验和敏感性实验证明所建立的方法对 PRRSV 特异性、敏感性高且能够鉴别诊断高致病性 PRRSV 和普通 PRRSV 毒株。湖南省 52 个猪场送检的 184 份临床疑似病猪临床样品的检测中,结果有 42 个猪场(123 份样品)为阳性,阳性率为 66.8%,其中,只有 1 份样品为普通 PRRSV,表明 2006 年夏初以来,在“高热病”疫情中流行的 PRRSV 毒株为高致病性 PRRSV。通过对临床样品检测表明该方法能够准确地诊断高致病性 PRRSV,且具有快速、敏感和特异的特点,具有临床实用性。

参 考 文 献

- [1] Collins, JE, Benfield DA, Christianson WT, *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *Vet Diagn Investig*, 1992, 4: 117-126.
- [2] SERGE DEA, CARL A, GAGNON, *et al.* Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein. *J Clin Microbio*, 1996, 34(6): 1488-1493.
- [3] A Wasilk, Callahan JD, Christopher-Hennings J, *et al.* Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(10): 4453-4461.
- [4] Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 309-316.
- [5] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究. 中国预防兽医学报(中国畜禽传染病), 1996, 87(2): 1-5.
- [6] 朱连德. 南方猪“高热病”的原因分析与控制策略. 猪业科学, 2006, 9: 24-27.
- [7] Kegong Tian, Xiuling Yu, Tiezhu Zhao, *et al.* Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS ONE*, 2007, 6: 1-10.
- [8] 黄金海, 李秀丽, 鄢明华, 等. 天津地区猪繁殖与呼吸综合征病毒株的分离与鉴定. 动物科学与动物医学, 2002, 19(3): 21-23.
- [9] 胡建华, 高 骏, 孙凤萍, 等. 猪繁殖与呼吸综合征诊断技术研究进展. 上海农业学报, 2004, 20(2): 106-108.

新辟栏目介绍

生 物 实 验 室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度,深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果,交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室,以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。