

# 北美型猪蓝耳病病毒鉴别 RT-PCR 检测方法的建立及应用

张燕霞, 吴发兴, 郑辉, 刘爽, 张志, 李晓成

(中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032)

**摘要:** 参考 Genbank 发表的美洲型猪蓝耳病病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) CH-1a (北美型经典 PRRSV)、JXA1 (北美型 HP-PRRSV) 等毒株的主要结构蛋白基因序列, 应用 Primer5.0 软件设计了一对特异性的北美型 PRRSV 鉴别检测引物, 其对经典 PRRSV 的扩增片段为 511 bp, 对 HP-PRRSV 的扩增片段为 421 bp。进行了该方法的特异性、敏感性、重复性试验, 建立了美洲型 PRRSV 鉴别 RT-PCR 检测方法。应用此法对 2010 年 1—12 月收集的 126 份临床样品进行了检测, 总体检出率达 53.17%。结果表明该方法具有特异、敏感、重复性好等优点, 可用于北美型 PRRSV 的临床发病鉴别检测及流行病学监测等工作。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 北美型; Nsp2 基因; RT-PCR; 鉴别

**中图分类号:** S852.659.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-944X (2011) 12-0036-03

## Establishment and Application of Identifiable RT-PCR Method for North American Type PRRSV Strains

Zhang Yanxia, Wu Faxing, Zheng Hui, Liu Shuang, Zhang Zhi, Li Xiaocheng

(China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao Shandong, 266032)

**Abstract:** According to the Nsp2 genomic sequence of CH-1a, JXA1 and the other American genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) published in GenBank, a pair of specific and identifiable primer were designed using the Primer5.0 software, the motive segment of amplification is 511bp for classical PRRSV and 421bp for HP-PRRSV. An identifiable RT-PCR method was established and its specificity, sensibility and reproducibility were tested. The method was used to detect 126 clinic samples of PRRS collected from January to December 2010, the positive rate was 53.17%, including 2 classical PRRSV and 65 HP-PRRSV. The results showed that this method was specific, sensitive, repeatable and could be used to detect and epidemiological surveillance of American-genotype PRRSV.

**Keywords:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; North American genotype; Nsp2 gene; RT-PCR; Identification

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS), 又称猪蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的一种猪的传染病, 各种年龄的猪均可感染。1987 年该病首次报道于美国, 随后在北美、欧洲及亚洲各国和地区迅速蔓延, 目前已成为一种地方性流行病<sup>[1]</sup>。1996 年, 我国郭宝清首次分离到病毒(北美型经典毒株), 证实我国也存在此病<sup>[2]</sup>, 之后我国相继有 20 多个省份报道发生了该病或者流行<sup>[3-4]</sup>; 尤其是 2006 年下半年来, 我国有 25 个省份发生了由高致病性猪蓝耳病病毒(HP-PRRSV)为主要病原的“猪高热病”。这一病原的传染性极强, 一旦感染猪, 会引起妊娠母猪早产、流产、死胎、弱胎和木乃伊胎, 导致公猪种用性能下降, 并常导致混合感染和 / 或继发感染从而加重病情, 死

亡率升高, 给养猪业造成更为严重的经济损失。

因此, 在临床上, 当一个猪场存在北美型经典 PRRSV 和 HP-PRRSV 以及猪瘟病毒(CSFV)、圆环病毒 2 型(PCV2)等病原的混合感染时, 仅凭临床症状很难做出确诊, 必须结合实验室诊断。目前, 国内外已经建立的猪蓝耳病实验室诊断方法有: 病毒分离与鉴定、间接 ELISA、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)、间接免疫荧光试验(IFA)等<sup>[5-7]</sup>。但是, 这些诊断方法存在或特异性、敏感性差, 或操作技术复杂、费时费力等缺点, 且诊断结果滞后, 不能满足快速鉴别经典 PRRSV 和 HP-PRRSV 的诊断需要。实践中亟待建立一种快速、灵敏而特异并能区别不同基因型 PRRSV 的方法。为此, 结合我国蓝耳病流行现状, 本研究拟建立了鉴别北美型不同 Nsp2 基因缺失情况 PRRSV RT-PCR 鉴别诊断技术, 为该病的实验室诊断提供了一种快速、准确的 PRRS 诊断方法, 为开展大规模流行病学调查与疫情监测提供技术支持。

**基金项目:** 农业部财政项目——动物疫情监测与防治, 广西科技攻关项目(桂科攻 0815009-3-9)

**并列第一作者:** 张燕霞、吴发兴

**通讯作者:** 李晓成

## 1 材料与方法

### 1.1 参考毒株

北美型经典 PRRSV、北美型 HP-PRRSV、CSFV、PRV、PCV-2、猪细小病毒(PPV)参考毒株均由中国动物卫生与流行病学中心分离、保存并提供。

### 1.2 病料来源及预处理

组织病料 126 份,来自 2010 年 1 月—2010 年 12 月期间辽安、河北、山东、河南、江苏共 5 个省的疑似猪蓝耳病发病场,病料主要包括:肺脏、淋巴结、脾脏等。取 2.0 g 左右病料,加少量灭菌 PBS (含青、链霉素 1 000 U/mL)用无菌研磨器研磨至糊状,再用 PBS 按 1:4 的体积比稀释成乳剂, -20 °C、37 °C 反复冻融 2 次, 8 000 r/min、4 °C 离心 10 min,取上清, -80 °C 保存备用。

### 1.3 主要试剂

Trizol LS<sup>®</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司; AMV 反转录酶、Rnase-Inhibitor、rTaq 酶等 PCR 试剂、DL 2 000 DNA Marker 均购自宝生物(大连)工程有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.4 引物

根据 Genbank 中收录的 PRRSV CH-1a (经典 PRRSV, Nsp2 不缺失)、JXA1 (HP-PRRSV, Nsp2 缺失 90 个碱基)等相关毒株的 Nsp2 基因序列,设计了一对跨越 Nsp2 基因缺失区域的引物,预期扩增片段的大小分别为 511 bp (经典 PRRSV 毒株)、421 bp (HP-PRRSV 毒株)。引物的序列为: PF: 5'-ATG GGCGACAATGTCCTAAC-3'; PR: 5'-GAGCTGAGT ATTTTGGCGTG-3', 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.5 PRRSV 等参考毒株、病料中病毒总 RNA 提取

取 -80 °C 保存的北美型经典 PRRSV、HP-PRRSV、CSFV 等 6 个参考毒株及待检样品上清液各 250 μL,按 Trizol LS<sup>®</sup> Reagent 试剂盒操作说明书,提取病毒总 RNA,最后分别用 20 μL DEPC 水溶解, -20 °C 冻存备用。

### 1.6 RT-PCR 检测体系及程序

反转录(RT)反应用 20 μL 体系,取经典 PRRSV、HP-PRRSV RNA 3 μL 作模板,加入 PR 引物 1 μL、dNTP 4 μL、Rnase-Inhibitor 0.5 μL、AMV 0.5 μL、5 × AMV Buffer 4 μL,加 DEPC H<sub>2</sub>O 至 20 μL, 42 °C 1.5 h 得 cDNA 模板。PCR 反应用 25 μL 体系: 10 × PCR Buffer 2.5 μL、dNTPs 2 μL、PF 和 PR 引物各 0.5 μL、rTaq 0.5 μL、cDNA 3 μL、加灭菌水至 25 μL。反应程序: 95 °C 变性 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40

s, 72 °C 50 s,共 32 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应结束后取 5 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶、100 V、45 min 电泳检查扩增结果并照相。

### 1.7 RT-PCR 检测方法特异性、敏感性、重复性试验

1.7.1 特异性试验 以 1.6 节所述方法,分别对提取的经典 PRRSV、HP-PRRSV、CSFV、PCV-2、PRV、PPV 以及阴性水对照总基因组进行 RT-PCR 扩增、电泳检测及回收测序,以验证该方法的特异性。

1.7.2 敏感性试验 取 1.5 节中得到的经典 PRRSV、HP-PRRSV 总 RNA 10 μL,分别进行 10 倍系列稀释至 10<sup>-6</sup>,按 1.6 节方法进行 RT-PCR 检测,以验证该方法的敏感性。

1.7.3 重复性试验 将提取的两种 PRRSV RNA 在相同条件下,由 5 位检测人员进行平行检测,验证方法重复性。

### 1.8 北美型 PRRSV RT-PCR 鉴别检测方法的应用

用本试验建立的北美型 PRRSV RT-PCR 方法,对辽宁等 5 省疑似猪蓝耳病发病场的 126 份组织样品按 1.6 节所述方法进行了应用检测。

## 2 结果

### 2.1 特异性试验

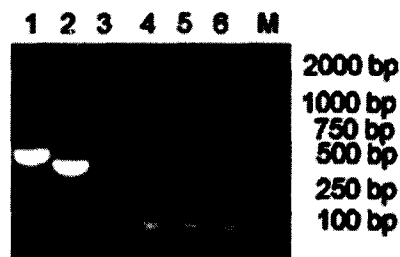
对阳性对照(经典 PRRSV 和 HP-PRRSV)、CSFV、PRV、PCV-2、PPV 毒株进行 RT-PCR 检测,验证该方法的特异性(图 1)。取阳性对照(经典 PRRSV 和 HP-PRRSV)的 PCR 扩增产物,经电泳回收目的片段后送上海生工进行测序,将测序所得两种北美型 PRRSV 的部分 Nsp2 基因(检测引物的预期扩增片段)序列登录 NCBI 进行 Blast 比对,分别为北美型经典毒株、HP-PRRSV 的部分 Nsp2 基因序列,其序列分别为 511 bp(经典 PRRSV)、421 bp(HP-PRRSV)。

### 2.2 引物敏感性试验

用 RT-PCR 方法扩增 cDNA 模板和稀释模板 1:10、1:100、1:1 000、1:10 000 等系列倍比稀释,结果当将模板稀释至 10 000 时仍能得到目的片段(图 2)。

### 2.3 重复性试验

按同样的方法分别将提取的 RNA 样品在相同条



M. Marker2000; 1, 普通型 PRRSV 对照 (511); 2, HP-PRRSV 对照 (421bp); 3, HCV; 4, PRV; 5, PCV2; 6, DEPC 水

图 1 特异性试验结果图

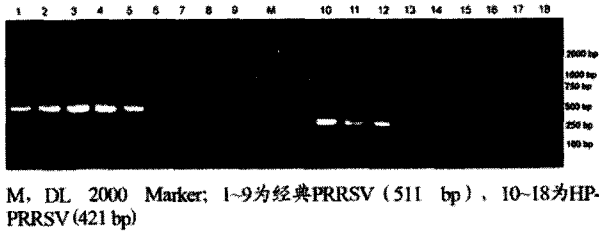


图 2 敏感性试验结果图

件下,重复 5 次 RT-PCR 扩增,结果均能出现相同的检测结果。

### 2.4 临床样品检测

用所建立的 RT-PCR 方法对门诊收集的来自辽宁等 5 个省份的 126 份疑似猪蓝耳病发病样品进行检测,结果有 67 份样品为 PRRSV 核酸阳性,其中 2 份属北美型经典毒株,65 份为 HP-PRRSV 阳性;其他样品为 PRRSV 核酸阴性,检出率为 53.17%。

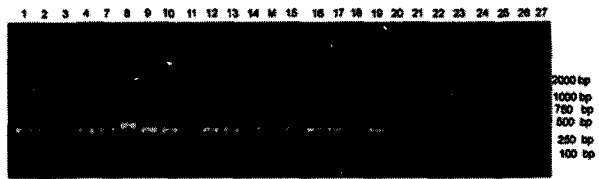


图 3 部分组织样品HP-PRRSV检测电泳图

## 3 讨论

### 3.1 RT-PCR 方法特异性

在临床上,由猪蓝耳病病毒感染引起疾病的临床症状与 CSFV、PRV、PCV-2、PPV 所引起的疾病的临床症状具有相似性,极易混淆,因此必须结合实验室检测来确诊。从实验结果来看,设计的引物仅能扩增出北美型 PRRSV,对其他混合和 / 或继发感染的病原均无任何目的条带检出,说明本方法具有较好的特异性;同时,这对特异性的 RT-PCR 引物还能够起到一次扩增鉴定两种 Nsp2 基因型的北美型 PRRSV,即经典 PRRSV、HP-PRRSV,其对应的目的条带分别为 511 bp、421 bp (处于 DL 2 000 Marker 的 500 bp 检测线上下,易于肉眼识别),说明该方法具有较好的鉴别作用。

### 3.2 RT-PCR 方法敏感性及重复性

RT-PCR 技术可对存在于分泌物、组织样品、血液样品、细胞培养物中的病原做出快速检测,结合样品的背景资料,包括发病动物的临床症状、病理变化等信息,可以在数小时内做出诊断<sup>[8-9]</sup>。本研究所建立的 RT-PCR 方法对效价为  $10^{-4.75}$ TCID<sub>50</sub>/0.1 mL 的 PRRSV 参考毒株 RNA 模板作 10 000 倍稀释仍能扩增出明显的目的条带,该方法能够检测到的浓度下限为  $10^{-3}$  ng,灵敏度很高,而多次重复性试验仍能得到同样的结果,表明本研究所建立的针对 PRRSV 的 RT-PCR

快速检测方法具有很好的敏感性和重复性。

### 3.3 RT-PCR 的应用

在猪蓝耳病诊断技术中,常见的病原分离鉴定、间接免疫荧光(IFA)、免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)等检测方法因需要进行细胞培养、耗时长,不能对发病进行及时诊断,不能满足基层的实际需要。而现行的 ELISA 方法仅针对非中和性抗体,在猪早期感染 PRRSV 时的抗体水平较低,ELISA 不易检出,且难以区分自然感染和被动免疫。本研究参考 Genbank 中收录的不同基因缺失类型的美洲型 PRRSV 毒株 Nsp2 基因序列,设计并合成了一对特异性引物,所建立的美洲型 PRRSV 鉴别 RT-PCR 方法具有快速、特异性强、灵敏度高、稳定性好的特点。通过试验,验证了 PRRSV RT-PCR 检测方法的特异性和敏感度,并对来自辽宁等 5 个省份的部分猪场送检的 126 份疑似猪蓝耳病样品进行了应用检测,其中检出 2 份经典 PRRSV 感染样品,65 份 HP-PRRSV 感染样品,总体检出率达 53.17%。说明本方法可用于美洲型猪蓝耳病的临床发病快速鉴别检测,也可以用于针对该病的大规模流行病学调查,可在县级以上动物疫病预防控制中心进行推广和应用,也开展猪蓝耳病监测预警提供了方法。

### 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M].2 版. 北京: 科学出版社, 1985: 517-532.
- [2] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等. 从疑似 PRRSV 感染的流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1996, 87 (2): 1-4.
- [3] Tian K G, Yu X L, Zhao T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J/OL]. PLoS ONE, 2007, 2 (6): e526.http://www.plosone.org/article/info:doi/journal.pone.0000526.
- [4] 田克恭,吴佳俊,赵铁柱,等. 高致病性 PRRSV 分离株分子特征与遗传变异分析 [C]// 金宁一. 第三届猪病防控学术研讨会会议论文集. 大连: 中国畜牧兽医学动物传染病学分会, 2008.
- [5] 孟令伟,孙颖杰. 猪蓝耳病的几种血清学诊断方法 [J]. 中国动物检疫, 1995, 12 (2): 14-15.
- [6] 孙淑芳,包振民,郭福生,等. 竞争 ELISA 检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体研究 [J]. 中国动物检疫, 2006, 23 (8): 19-22.
- [7] 谭斌,刘长明,危艳武,等. PRRSV-IPMA 抗体检测试剂盒的研制及应用 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36 (11): 880-884.
- [8] 吴国平,郭川. RT-PCR 快速检测猪繁殖与呼吸综合征临床组织样品的研究 [J]. 动物医学进展, 2004, 25 (6): 78-80.
- [9] 何世成,邹敏,刘道新,等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(7): 10-13.

### 被引格式:

张燕霞,吴发兴,郑辉,等. 北美型猪蓝耳病病毒鉴别 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国动物检疫, 2011, 28 (12): 36-38.