

# 一例猪圆环病毒2型与猪肺炎支原体混合感染的诊断

谷建

(辽宁省营口市动物疫病预防控制中心 辽宁 营口 115000)

**摘要** 辽宁营口某猪场发生猪消瘦、呼吸系统疾病甚至死亡的疫情。采集病料提取病变组织总DNA或RNA进行猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒2型、猪细小病毒、猪伪狂犬病病毒、猪瘟病毒、猪肺炎支原体的PCR或RT-PCR检测。PCR扩增出353 bp的猪圆环病毒2型特异性条带和670 bp的猪支原体肺炎特异性条带。诊断为猪圆环病毒2型和猪肺炎支原体混合感染。

**关键词** 猪圆环病毒2型 猪肺炎支原体 混合感染 PCR 诊断

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1672-9692(2015)01-0040-04

## Diagnosis of mixed infection of porcine circovirus 2 and mycoplasma hyopneumoniae

Gu Jian

(Yingkou city animal disease prevention and control center, Liaoning Yingkou 115000)

**Abstract:** A pig farm in Yingkou broke out disease which caused swine weight loss, disease of respiratory system, even death. Samples of diseased pigs were collected. Total DNA and RNA of the samples were extracted. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus type 2(PCV2), classic swine fever virus(CSFV), pseudorabies virus(PRV), porcine parvovirus(PPV) and mycoplasma hyopneumoniae(Mhp), were detected by PCR or RT-PCR. A 353 bp production which correspond to porcine circovirus type 2 was amplified and a 670 bp production which correspond to mycoplasma hyopneumoniae was amplified. Finally, the diagnosis was a mixed infection of PCV2 with MHP.

**Key words:** Porcine circovirus type 2; Mycoplasma hyopneumoniae; Mixed infection; PCR; Diagnosis

2013年12月,辽宁省营口市某猪场部分断奶猪和育肥猪生长缓慢、体温升高、呼吸困难、消瘦等主要特征的传染病。具体症状为精神沉郁,体温为40~41℃,双耳及四肢末端发绀,妊娠母猪流产,仔猪呼吸困难,育肥猪清晨和傍晚出现咳嗽现象,眼结膜炎,眼睑水肿,有呼吸道症状,后躯无力,共济失调。新生仔猪发生死亡,伴有呕吐、腹泻及发抖,震颤和运动失调等神经症状。根据症状,初步怀疑为猪繁殖与呼吸综合

征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪肺炎支原体(Mhp)一种或者几种混合感染。

采集病死猪及病危猪的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等病料进行猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪瘟病毒(CSFV)、猪肺炎支原体(Mhp)的PCR或RT-PCR检测。

收稿日期 2014-11-24

作者简介:谷建(1983-),男,兽医师,硕士,主要从事动物疫病防控与检测工作。

## 1 材料与方法

**1.1 样品的采集** 辽宁省营口市某养猪场送检猪的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、血清等病料共10份。

**1.2 培养基** TSA 固体培养基, 含5%小牛血清和0.5% NAD。

**1.3 主要酶和试剂** RNA 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; 琼脂糖凝胶电泳染色剂 Goldview 购自赛百盛生物公司; 蛋白酶K、SDS、Trizol 试剂购自欣经科化学试剂公司; 苯酚、氯仿、异戊醇及常用化学试剂购自北京市化学试剂公司; 生化鉴定试剂盒购自杭州天和微生物试剂有限公司; 管式液体样品病毒DNAout 试剂盒购自 TIANDZ 公司。

**1.4 引物** 参考岳丰雄设计引物<sup>[1]</sup>(见表1), 引物由上海 Invitrogen 合成, 用高压灭菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解配成 10 pmol/L, -20 °C 保存备用。

表1 引物设计  
Table1 Primer Design

| 引物名称    | 引物序列(5'→3')              | 片段长度 |
|---------|--------------------------|------|
| PCV2-F  | AAGGGCTGGGTTATGGTATG     | 353  |
| PCV2-R  | CGCTGGAGAAGGAAAATGG      |      |
| Mhp-F   | AGGATACAACTGAGAAACCGACTA | 670  |
| Mhp-R   | CAAGACCGAGTGGGTATGACCT   |      |
| PRV-F   | GAAGGGTTGGACAGGAAGGAC    | 194  |
| PRV-R   | ACCAGCCGCTCAAGTTCTACGA   |      |
| PRRSV-F | GCCAGTCCAGCCAGTCAATCA    | 434  |
| PRRSV-R | GCCCCGATTGAATAGGTGAC     |      |
| CSFV-F  | GTGCGTCAGTAGTTCGACG      | 777  |
| CSFV-R  | ATGCTCTTTGGGGCTAT        |      |
| PPV-F   | GAATAGGATGCGAGGAAAG      | 271  |
| PPV-R   | GTGGAAATCTGAGAGTCTGT     |      |

## 1.5 PRRSV和CSFV的RT-PCR检测

**1.5.1 病毒总RNA的提取** 病毒总RNA的提取按 Trizol 试剂使用说明书提取样品总RNA进行, 室温自然干燥, 加入适量 DEPC 处理过的水溶解沉淀, 待 RNA 沉淀完全溶解后, -20 °C 保存备用。

**1.5.2 RT-PCR** 反转录反应按 Promega 公司的使用说明书进行: 取总 RNA 7 μL, 加入 20 μL 反转录体系中, 包括 4 μL 反转录溶液(50 mmol/L, pH 8.3 Tris-HCl, 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L DTT), 6 μL dNTPs, 1 μL OligodT 引物(50 pmol/L), 1 μL M-MLV 反转录酶(200 U/μL)和 1 μL RNase Inhibitor(40 U/μL), 用 DEPC 水补至 20 μL, 42 °C 水浴 1 h, 70 °C 10 min, 置 -20 °C 备用。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 58.6 °C (PRRSV)或 55.6 °C (CSFV)退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 5 μL PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定<sup>[2]</sup>。

## 1.6 PCV2和PRV的PCR检测

**1.6.1 病毒总DNA的提取** 采用酚氯仿抽提法提取病料中的DNA, 室温干燥, 加入 20 μL 灭菌 ddH<sub>2</sub>O, -20 °C 保存备用。

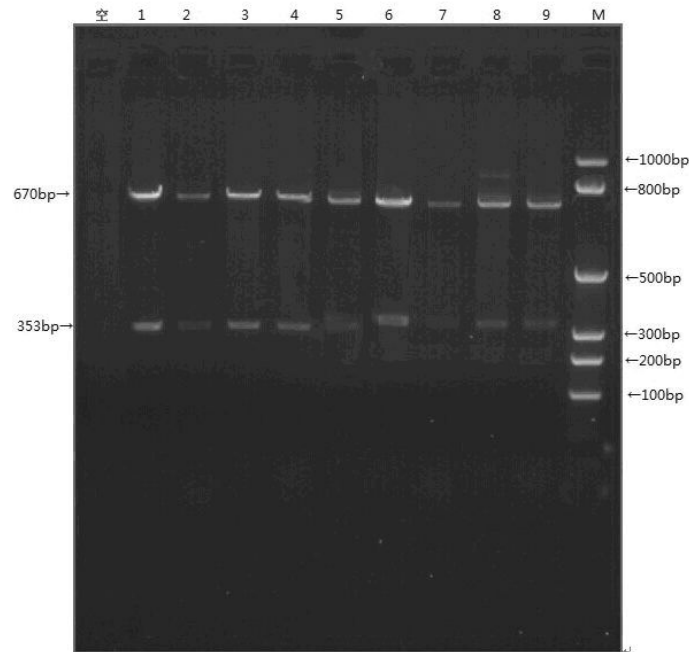
**1.6.2 PCV2和PRV的PCR扩增** PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 58.6 °C (PCV2)、55 °C (PPV)、61 °C (PRV)退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 5 μL PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定<sup>[3]</sup>。

**1.6.3 Mhp基因组的提取** 按 TIANDZ 公司柱式细菌 DNAout 试剂盒说明书进行。-20 °C 备用。

PCR 反应体系(50 μL)如下: TaKaRa Taq(5 U/μL)25 μL; 10xPCR Buffer(Mg<sup>2+</sup> Plus)5 μL; dNTP Mixture(各 2.5 mM)4 μL; Mhp 基因组溶液 5 μL; DDW 加至 50 μL。混匀后放入 PCR 自动扩增仪中进行扩增, 扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min<sup>[4]</sup>。

## 2 结果与分析

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图见图 1。



空为空白对照, 1~9为组织样品, M为maker

图1 PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

PCR或RT-PCR检测结果表明, PCV2扩增为阳性, 片段大小约353 bp; Mhp扩增为阳性, 片段大小为670 bp; 均与预期相符, 其他病毒检测结果均为阴性。

### 3 讨论

通过对猪场进行流行病学调查, 并且结合对病死猪的临床症状及剖检变化进行观察和实验室诊断, 最终确诊此次猪场发生的疾病为猪圆环病毒2型和猪支原体肺炎的混合感染。猪圆环病毒2型是断奶仔猪多系统衰竭综合征的主要病原<sup>[5]</sup>。各种年龄、不同性别的猪都可以感染, 但以哺乳期和育成期的猪最易感, 病死率可达10%<sup>[6]</sup>。猪圆环病毒2型及其相关疾病已在全世界范围内发生与流行, 它属于一种免疫抑制性疾病<sup>[7]</sup>, PCV-2主要侵害机体的免疫系统, 单核细胞和巨噬细胞是PCV-2的靶细胞, 可以造成机体的免疫抑制<sup>[8-9]</sup>。

猪支原体肺炎属于猪的一种高发慢性呼吸道传染病, 主要症状为气喘, 主要病理变化为肺脏的肉变、胰变, 病变呈对称性分布。此病在畜牧业发达的国家普遍流行, 同时也广泛存在于世界各

国, 在我国也属养猪业的主要接触性传染病之一。如若诊治不及时甚至可能造成死亡, 也可继发其他病原体感染, 包括猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒2型(PCV2)、伪狂犬病毒(ADV)以及猪流感病毒(SIV)。多病原混合感染导致产生所谓的猪呼吸系统疾病综合征(porcine respiratory disease complex, PRDC)<sup>[10]</sup>。本病例可能为圆环病毒2型引发猪免疫能力下降, 导致继发猪支原体肺炎。

PCR扩增是一种快速、特异、易于操作、广泛应用于实验室的检测方法。本次发病在临床初步诊断的基础上, 采用PCR方法进行了实验室诊断, 从而确定有猪圆环病毒2型和猪肺炎支原体感染, 确诊为猪圆环病毒2型、猪肺炎支原体混合感染。

针对该病例的诊断, 猪场应该加强管理, 及时隔离病患猪只, 阻断疾病蔓延, 改善饲养条件, 提高猪只的免疫力, 饲养技术专业化, 尽量做到自繁自养, 合理用药, 不滥用抗生素, 建立准入和淘汰制度, 维护健康猪群<sup>[11]</sup>。

参考文献

[1] 岳丰雄. 鉴别 PCV2、PPV、PRV、PRRSV、CSFV 多重 PCR 诊断方法的建立及初步应用[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2008.

[2] SEGALES J, ROSELL C, DOMINGO M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease [J]. *V Microbial*, 2004, 98(2): 137-149.

[3] RoSELL C, SEGALES J, RAMOS VARA J A, et al. Identification of porcine circovirus in tissue of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome[J]. *V Rec*, 2000, 146(2): 40-43.

[4] 丁敏. 实时荧光 PCR 技术检测猪肺炎支原体研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2008.

[5] Allan G M, Meehan B M, Todd D, et al. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome[J]. *Vet Rec*, 1998, 142:467-468.

[6] Pallares C, Neumann G, Grutze I, et al. Case report: Porcine circovirus type 2 infection in an European wild boar[J]. *Vet Res*, 2004, 35(2): 243-253.

[7] 高生智. 非典型猪瘟、猪圆环病毒型与猪传染性胸膜肺炎混合感染的诊断[J]. *甘肃畜牧兽医*, 2009, 209(6): 26-27.

[8] Royer R L. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfection[J]. *J Swine Health Prod*, 2007, 96(6): 281-284.

[9] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 5版. 北京:中国农业出版社, 2007: 231-234.

[10] Thacker E L. Immunology of the porcine respiratory disease complex[J]. *Vet Clin North Am Food Anim Prac*, 2001, 17(3): 551-565.

[11] 赵东升, 刘有昌, 李祥健, 等. 猪肺炎支原体与其他病原的相互作用[J]. *养猪*, 2008(5): 66-68.

(编辑:张婷婷)

### 2015年《现代畜牧兽医》杂志征订启事

《现代畜牧兽医》杂志创刊于1972年,月刊,全年12期。邮发代号8-75,国内刊号CN21-1515/S,国际刊号ISSN1672-9692。杂志内容丰富、品质卓越、装帧精美、品位时尚,深受行业人喜爱。欢迎广大读者订阅,如错过邮局订阅时间,可直接与本刊联系。

电话:024-23448255

地址:沈阳市和平区太原北街二号(110001)