

曹东阳, 王小敏, 钱爱东, 等. 江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型(PCV2) 分子流行病学调查[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 390-398.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.024

江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型(PCV2) 分子流行病学调查

曹东阳^{1,2}, 王小敏², 钱爱东¹, 何孔旺², 茅爱华²

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了解中国江苏省及周边地区猪圆环病毒 II 型(PCV2) 的分子流行病学以及毒株的遗传变异情况, 本研究运用 PCR 技术对来源于不同地区、不同猪场且 PCV2 检测为阳性的样品进行全基因组序列的扩增和测序, 共获得 18 株 PCV2 全基因序列, 并对所得到的毒株进行遗传变异分析。结果表明, 18 株毒株与国内外的参考毒株同源率为 93.5%~99.7%, 而 ORF2 核苷酸及其推导的氨基酸序列同源率分别为 87.1%~99.9% 和 84.2%~99.6%, 说明毒株存在一定程度的变异。系统进化树分析结果显示 18 株毒株中有 5 株 PCV2a, 7 株 PCV2b, 6 株 PCV2d, 其中 20150429YC 全长为 1 766 bp, 与(HM038031.1 PCV2d 等) 参考毒株的同源率为 100.0%, 未发现 PCV2c。同时, Cap 蛋白的抗原表位和抗原性也发生了变化。说明, 目前江苏省及周边地区猪群中 PCV2 感染较为普遍, PCV2 的流行毒株以 PCV2b 基因型为主, PCV2d 次之。

关键词: 猪圆环病毒 II 型; 分子流行病学; 遗传变异

中图分类号: S852.65⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)02-0390-09

Molecular epidemiological investigation of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Jiangsu and surrounding areas

CAO Dong-yang^{1,2}, WANG Xiao-min², QIAN Ai-dong¹, HE Kong-wang², MAO Ai-hua²

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Engineering Research of Veterinary Bio-products, Ministry of Agriculture/ National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: Porcine circovirus type 2 (PCV2) positive samples from Jiangsu province and surrounding areas were examined by PCR and sequenced to get the complete viral genome. Total 18 isolates were identified and analyzed for their genetic variations. For viral genomes, 18 isolates shared 93.5%~99.7% similarities with reference viruses. For ORF2 nucleotide and amino acid sequences, 87.1%~99.9% and 84.2%~99.6% similarities were found between the examined isolates and references, respectively, indicating certain level of genetic variations among PCV2 isolates. Among 18 isolates, there were 5 PCV2a strains, 7 PCV2b strains, and 6 PCV2d strains, and no PCV2c was found. One tested isolate, 20140429YC with full length of 1 766 bp, was identical to the PCV2d reference sequence

收稿日期: 2015-09-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302071); 公益性行业(农业)科研专项(201303046); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2045]; 江苏省第四期“333 高层次人才培养工程”(第二层次)资助项目(BRA2012194)

作者简介: 曹东阳(1989-), 女, 吉林长春人, 硕士研究生, 研究方向:

微生物与免疫。(E-mail) 569212988@qq.com

通讯作者: 钱爱东, (E-mail) qianaidong0115@163.com

and amino acid sequences, 87.1%~99.9% and 84.2%~99.6% similarities were found between the examined isolates and references, respectively, indicating certain level of genetic variations among PCV2 isolates. Among 18 isolates, there were 5 PCV2a strains, 7 PCV2b strains, and 6 PCV2d strains, and no PCV2c was found. One tested isolate, 20140429YC with full length of 1 766 bp, was identical to the PCV2d reference sequence

(HM038031.1). There were changes in the epitopes and antigenicity of ORF2 encoded protein. This study indicated that the epidemic situation of PCV2 in Jiangsu province and surrounding areas was fairly common, and PCV2b was the dominant subtype and PCV2d was the second.

Key words: porcine circovirus type 2 (PCV2); molecular epidemiology; genetic variation

猪圆环病毒(Porcine circovirus PCV)属于圆环病毒科(Circoviridae)圆环病毒属(Circovirus)^[1],是无囊膜包裹的、单股环状DNA病毒,主要分为PCV1和PCV2两种血清型^[2-3]。其中PCV1在猪群中广泛存在,且无致病性,而PCV2是断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原体^[4]。该病主要发生在5~12周龄的仔猪,患病动物表现为渐进性消瘦、皮肤苍白、淋巴结肿大、偶有黄疸等病理症状^[5-6]。自1997年在加拿大西部发现PMWS以后,在世界上许多国家和地区都有该病的报道。在中国,该病是由郎洪武等首次发现的^[7]。除此之外,PCV2也能够引起猪皮炎肾病综合征(PNDS)、母猪繁殖障碍、猪呼吸道综合征及仔猪先天性震颤等多种猪圆环相关疾病(PCVAD)^[8]。近年来,以PCV2为主要病原引起的猪圆环病毒病在世界范围内广泛流行,该病毒主要侵害猪的免疫系统,并能够造成机体的免疫抑制,给国内外养猪业造成不可估量的经济损失。

PCV2的全长基因组大小为1 766 bp、1 767 bp或1 768 bp^[7],有研究发现PCV2基因组可能含有11个开放阅读框(ORF)^[9],其中以ORF1和ORF2最为重要。ORF1是最大的开放阅读框,位于病毒基因组上的第51~995 nt处,主要编码Rep和Rep'蛋白(314 aa),与病毒的滚环复制有关,且高度保守^[10]。ORF2位于病毒基因组互补链上的第1 735~1 034 nt或1 734~1 033 nt或1 735~1 030 nt,编码Cap结构蛋白(233 aa或234 aa),构成病毒核衣壳,具有较大的变异性^[11]。有研究认为ORF3可能与编码病毒致病性相关蛋白以及诱导病毒凋亡有关。ORF4是病毒复制非必需的,但具有抑制细胞凋亡的作用^[12],而其他开放阅读框的功能尚不明确,需要进一步的研究阐释。

国内外学者根据ORF2基因进行进化树分析,将PCV2分为4个基因亚型:PCV2a包括5个分支(2A~2E)^[13];PCV2b包括3个分支(1A~1C);PCV2c以及PCV2d。但有学者认为PCV2d是PCV2b的突变体即mPCV2b^[14]。PCV2a和PCV2b

在世界范围内广泛分布,自2003年以来PCV2b取代PCV2a成为主要流行的基因型,PCV2c只存在于丹麦,而PCV2d首先被中国分离得到^[15]。近年来陆续有PCV2新的基因型出现,也说明该病毒的遗传变异正在不断地更新变化。

为更好地监控江苏省及周边地区PCV2的流行、遗传进化以及毒株的变异情况,本研究运用PCR技术对来源于不同地区、不同猪场且PCV2检测为阳性的样品进行全基因组序列的扩增和测序。对获得的PCV2全基因序列进行进化分析,探讨该病的分子流行病学变化趋势和遗传变异规律,为PCV2的免疫预防和分子致病机制等研究工作提供相关的理论依据。

1 材料和方法

1.1 病料

本研究所用病料包括淋巴结、脾脏、肺脏和血清等,为2014至2015年5月来自江苏、浙江、安徽以及河北4个省份猪场送检的健康猪病料58份,发病猪病料186份(表1)。

表1 检测的临床组织或血清样品

Table 1 Samples of clinical tissues or sera for detection

地区	健康样品(份)	发病样品(份)	总计(份)
江苏	27	79	106
浙江	16	58	74
安徽	11	32	43
河北	4	17	21
总计	58	186	244

1.2 主要试剂

2×Taq PCR Master Mix和柱式病毒DNAout试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司,pMD19-T载体、DL2000 DNA marker购自宝生物工程(大连)有限公司,axygen DNA凝胶回收试剂盒购自杭州都泰生物科技有限公司,大肠杆菌感受态细胞Trans5α购自北京全式金生物技术有限公司,PCV2阳性样品为PCV2b型毒株在PK15细胞上传代的病毒液

所提取的 DNA 样品,由江苏省农业科学院兽医研究所人兽共患病研究室分离、保存。

1.3 提取病料 DNA 和筛选阳性病料

按照天根病毒 DNA 提取试剂盒的方法,提取所有样品的 DNA 并用 PCV2 的检测引物筛选出阳性病料。反应体系为 25.0 μl ,包括 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μl ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μl ,DNA 模板 1.0 μl ,ddH₂O 10.5 μl 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 42 s,33 个循环,并用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 PCV2 全基因序列的扩增

分别用 PCV2-N1 和 PCV2-N2 两对引物对 PCV2 阳性的 DNA 样品进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μl : 2 \times Taq PCR Master Mix 25.0 μl ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μl ,DNA 模板 3.0 μl ,ddH₂O 20.0 μl 。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,38 个循环,并用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.5 目的片段回收、纯化以及测序

用胶回收试剂盒纯化扩增出的目的片段,并与 pMD19-T Vector 连接,转化至大肠杆菌感受态细胞 Trans-5 α 中,重组质粒 PCR 鉴定后送上海英俊测序公司完成测序。

1.6 全基因序列的拼接以及系统进化树分析

将测序获得的 2 段序列进行拼接后得到 PCV2 的全基因序列,再将分离株的序列与 GenBank 中登录的 PCV2 参考毒株序列进行比对分析,同源性以及遗传变异规律等。用 MEGA 6.0 的 Neighbor-joining 算法,基于 PCV2 的 ORF2 序列生成系统进化树。

2 结果

2.1 阳性病料的筛选结果

使用引物 PCV2-F 和 PCV2-R 对病料进行 PCV2 的特异性检测,结果显示病料中 PCV2 的总阳性率为 24.59%,其中发病猪 PCV2 感染率为 29.03%(54/186),健康猪 PCV2 感染率为 10.34%(6/58)。说明 PCV2 在猪群中感染情况较为普遍,其中健康猪群里存在较高的隐形感染情况。

2.2 PCV2 全长基因的测序结果

经 PCV2-N1、PCV2-N2 两对引物对阳性病料进行 PCV2 的全长序列扩增后,测序及序列拼接结果

显示:共得到 18 株 PCV2 毒株,其中全长序列包括 13 株 1 767 bp、4 株 1 768 bp 和 1 株 1 766 bp,各毒株的详细情况见表 2。

2.3 PCV2 全基因组同源性比较和遗传变异分析

2.3.1 PCV2 全基因组核苷酸同源性比较 利用 DNASTar 的 MegAlign 软件将 18 株分离株与 GenBank 中登录的 PCV2 全基因序列进行同源性比对分析。结果(图 1)表明,18 株分离株之间的核苷酸同源性为 94.2%~99.9%,与参考毒株的核苷酸同源性为 93.5%~99.7%,所有毒株的同源性为 93.5%~99.9%。

2.3.2 ORF2 以及推导出的氨基酸同源性比较 将 18 个毒株用 DNASTar 的 MegAlign 软件与参考毒株比较 ORF2 以及 ORF2 推导出的氨基酸同源性(图 2、图 3)。结果显示:分离株之间 ORF2 同源性为 89.5%~100.0%,分离株与参考毒株 ORF2 的同源性为 87.1%~99.9%,所有毒株 ORF2 的同源性为 87.1%~100.0%;分离株之间氨基酸同源性为 87.2%~99.6%,分离株氨基酸与参考毒株氨基酸的同源性为 84.2%~99.6%,所有毒株氨基酸的同源性为 84.2%~99.6%。

2.3.3 ORF2 及其推导的氨基酸序列分析

ORF2 主要负责编码 PCV2 的 Cap 蛋白,该蛋白是刺激机体产生中和抗体的重要结构蛋白,异质性高^[14]。序列分析结果表明,PCV2 毒株 ORF2 基因核苷酸序列主要分 702 bp 和 705 bp 两种类型,其中 705 bp 有 12 株,6 株为 702 bp。ORF2 推导出的氨基酸序列分析结果表明,ORF2 编码的 Cap 蛋白含 233 aa 或 234 aa。对 Cap 蛋白的多态性进行分析(图 4)后发现:18 株 PCV2 毒株共有 37 个突变位点(37/233),其中 8、53、57、59、68、88、89、90、121、134、151、169、185、187、190、191、206、210 和 232 位点碱基为高频突变位点,这些突变位点使氨基酸由疏水性变为亲水性,从而导致猪圆环病毒毒株的抗原性发生了改变。20141122AH、20150430YC、20141219PZ、20141023NT、20150110TZ 和 20150429YC 这 6 株毒株的第 87 到 90 位氨基酸由原来的 KIS 突变为 PLT,第 233 位氨基酸由 N(蛋氨酸)突变为 K(赖氨酸),ORF2 编码的 Cap 蛋白 C 末端出现了一个赖氨酸的延伸。

表 2 18 株 PCV2 分离株的背景信息

Table 2 The background information of 18 PCV2 strains

毒株名称	序列长度 (bp)	流行地区	临床病料	背景
20141210TZ	1 768	泰州	淋巴结	5 日龄仔猪 断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 患病猪群 淋巴结肿胀
20141219PZ	1 768	邳州	肺和淋巴结	PMWS 患病猪群 间质性肺炎 淋巴结出现病变
20141105XZ	1 767	徐州	脑	母猪流产 呕吐 脑膜表面见充血
20141027HB	1 767	河北	脾	发病猪腹泻 黄疸
20141108NJ	1 767	南京	脾和淋巴结	8 周龄保育猪 淋巴结肿大 呼吸困难
20140617ZJ	1 767	浙江	脾和淋巴结	仔猪呼吸困难 体质量下降
20141023NT	1 767	南通	肺和脾	7 日龄、8 日龄仔猪腹泻 肺水肿
20141122AH	1 767	安徽	肺和脾	PMWS 患病猪群 呼吸道综合症
20150110TZ	1 768	泰州	肺	散发症状 PMWS 患病仔猪
20150430YC	1 767	盐城	血清	5 周龄仔猪 腹泻
20150429YC	1 766	盐城	肺	母猪流产 呼吸困难
20150429ZJ	1 767	镇江	肺	仔猪呼吸急促 腹泻 多灶性粘液性气管炎
20150108SQ	1 767	宿迁	肺	育肥猪消瘦 间质性肺炎
20150126DT	1 767	东台	肺和淋巴结	母猪腹泻 流产 淋巴结肿大
20150420XZ	1 768	徐州	肺	PMWS 患病猪群
20150326NT	1 767	南通	肺	仔猪腹泻、呼吸困难
20150403NJ	1 767	南京	血清	20 日龄仔猪
20150423YX	1 767	宜兴	血清	育肥猪

相似度 (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28		
1	100	96.0	95.1	95.0	95.1	95.1	94.8	96.1	94.9	95.1	96.0	95.7	99.9	97.2	95.1	99.9	95.9	99.9	97.2	96.0	94.2	95.1	97.1	95.1	96.0	95.2	96.7	96.0	1	20141219PZ
2	4.1	100	96.4	97.2	96.3	96.4	98.4	99.8	96.2	96.4	99.6	99.3	95.9	95.8	97.1	96.0	99.4	96.0	96.2	98.6	95.0	96.4	95.9	96.4	98.7	96.4	95.8	98.6	2	20141027HB
3	5.0	3.7	100	98.6	99.9	99.8	95.2	96.3	99.7	99.9	96.4	96.0	95.0	94.9	98.4	95.1	96.3	95.1	95.4	96.3	94.3	99.9	95.0	99.9	96.2	99.9	95.6	96.3	3	20141023NT
4	5.2	2.9	1.4	100	98.5	98.6	95.7	97.1	98.2	98.5	97.0	96.9	94.9	94.9	99.5	94.9	97.3	94.9	95.3	96.3	94.2	98.6	95.0	98.6	96.2	98.6	95.4	96.3	4	20140617ZJ
5	5.1	3.8	0.1	1.5	100	99.7	95.1	96.3	99.6	99.9	96.4	95.9	95.0	94.8	98.4	95.0	96.2	95.0	95.3	96.2	94.3	99.8	95.0	99.8	96.2	99.9	95.6	96.2	5	20141108NJ
6	5.1	3.7	0.2	1.4	0.3	100	95.2	96.4	99.5	99.8	96.4	96.0	95.0	94.8	98.4	95.0	96.3	95.0	95.3	96.3	94.3	99.8	95.0	99.8	96.3	99.8	95.6	96.3	6	20141105XZ
7	5.4	1.6	5.0	4.4	5.0	4.9	100	98.4	95.0	95.2	98.2	97.8	94.7	94.6	95.6	94.7	97.9	94.7	95.0	97.4	93.8	95.2	94.6	95.2	97.4	95.2	94.5	97.4	7	20141210TZ
8	4.0	0.2	3.8	2.9	3.8	3.7	1.7	100	96.1	96.3	99.5	99.2	96.0	95.8	97.1	96.0	99.3	96.0	96.2	98.6	95.0	96.3	95.8	96.3	98.6	96.4	95.7	98.6	8	20141122AH
9	5.3	4.0	0.3	1.8	0.4	0.5	5.2	4.0	100	99.7	96.2	95.7	94.7	94.6	98.1	94.8	96.0	94.8	95.1	96.0	94.1	99.5	94.7	99.5	95.9	99.6	95.4	96.0	9	20150429YC
10	5.0	3.7	0.1	1.5	0.1	0.2	5.0	3.8	0.3	100	96.4	96.0	95.0	94.9	98.4	95.1	96.3	95.1	95.4	96.3	94.3	99.8	95.0	99.8	96.2	99.9	95.6	96.3	10	20150110TZ
11	4.1	0.4	3.7	3.1	3.7	3.7	1.8	0.5	3.9	3.7	100	99.0	95.9	95.9	97.1	95.9	99.1	95.9	96.1	98.5	95.0	96.4	95.8	96.4	98.6	96.5	95.8	98.5	11	20150108SQ
12	4.4	0.7	4.1	3.2	4.2	4.1	2.2	0.8	4.4	4.1	1.0	100	95.6	95.6	96.8	95.6	99.4	95.6	96.0	98.6	94.8	96.0	95.8	96.0	98.6	96.0	95.6	98.6	12	20150126DT
13	0.1	4.2	5.2	5.3	5.2	5.2	5.5	4.1	5.5	5.2	4.3	4.5	100	97.1	95.0	99.8	95.8	99.8	97.1	95.9	94.1	95.0	96.9	95.0	95.9	95.1	96.6	95.9	13	20150326NT
14	2.9	4.3	5.3	5.3	5.4	5.4	5.7	4.4	5.6	5.3	4.3	4.5	3.0	100	95.2	97.1	95.6	97.1	97.6	95.8	94.1	94.8	97.5	94.8	95.7	94.9	96.9	95.8	14	20150429ZJ
15	5.0	2.9	1.6	0.5	1.7	1.6	4.5	3.0	2.0	1.7	3.0	3.2	5.2	5.0	100	95.1	97.3	95.1	95.4	96.3	94.4	98.4	95.1	98.4	96.3	98.5	95.6	96.3	15	20150403NT
16	0.1	4.1	5.1	5.3	5.2	5.2	5.5	4.1	5.4	5.1	4.2	4.5	0.2	2.9	5.1	100	95.9	99.9	97.1	96.0	94.2	95.1	97.0	95.1	95.9	95.1	96.7	96.0	16	20150420XZ
17	4.2	0.6	3.8	2.7	3.9	3.8	2.1	0.7	4.1	3.8	0.9	0.6	4.3	4.5	2.8	4.2	100	95.9	96.2	98.7	94.9	96.3	95.9	96.3	98.8	96.3	95.8	98.7	17	20150423YX
18	0.1	4.1	5.1	5.3	5.2	5.2	5.5	4.1	5.4	5.1	4.2	4.5	0.2	2.9	5.1	0.1	4.2	100	97.1	96.0	94.2	95.1	97.0	95.1	95.9	95.1	96.7	96.0	18	20150430YC
19	2.9	3.9	4.8	4.8	4.8	4.8	5.2	4.0	5.1	4.8	4.0	4.1	3.0	2.5	4.7	2.9	3.9	2.9	100	96.4	94.7	95.4	99.5	95.4	96.3	95.4	97.5	96.4	19	AF055392 PCV2a
20	4.1	1.4	3.8	3.8	3.9	3.8	2.7	1.4	4.1	3.8	1.5	1.4	4.2	4.4	3.8	4.1	1.3	4.1	3.7	100	95.2	96.3	96.0	96.3	99.9	96.3	96.0	100.0	20	AF055394 PCV2b
21	6.0	5.2	5.9	6.0	5.9	5.9	6.5	5.2	6.2	5.9	5.2	5.4	6.1	6.2	5.8	6.1	5.3	6.1	5.5	4.9	100	94.3	94.5	94.3	95.2	94.4	94.2	95.2	21	EU148503 PCV2c
22	5.0	3.7	0.1	1.4	0.2	0.2	4.9	3.8	0.5	0.2	3.7	4.1	5.2	5.3	1.6	5.1	3.8	5.1	4.8	3.8	5.9	100	95.0	100.0	96.2	99.9	95.6	96.3	22	HM038030 PCV2d
23	3.0	4.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.6	4.3	5.5	5.2	4.4	4.3	3.1	2.6	5.1	3.1	4.2	3.1	0.5	4.1	5.8	5.2	95.0	96.0	95.1	97.2	96.0	23	GU049340 PCV2a	
24	5.0	3.7	0.1	1.4	0.2	0.2	4.9	3.8	0.5	0.2	3.7	4.1	5.2	5.3	1.6	5.1	3.8	5.1	4.8	3.8	5.9	0.0	5.2	96.2	99.9	95.6	96.3	24	HM038030 PCV2d	
25	4.1	1.3	3.9	3.9	3.9	3.8	2.6	1.4	4.2	3.9	1.4	1.4	4.2	4.4	3.8	4.2	1.3	4.2	3.8	0.1	5.0	3.9	4.1	3.9	96.3	95.9	99.9	25	HQ378160 PCV2b	
26	5.0	3.7	0.1	1.4	0.1	0.2	4.9	3.7	0.4	0.1	3.6	4.1	5.1	5.3	1.5	5.0	3.8	5.0	4.7	3.8	5.8	0.1	5.1	0.1	3.8	95.7	96.3	26	KP67050 PCV2d	
27	3.4	4.4	4.5	4.8	4.5	4.5	5.7	4.4	4.8	4.5	4.3	4.5	3.5	3.2	4.5	3.4	4.3	3.4	2.6	4.1	6.1	4.5	2.8	4.5	4.2	4.4	96.0	27	AB426905 pcv2a	
28	4.1	1.4	3.8	3.8	3.9	3.8	2.7	1.4	4.1	3.8	1.5	1.4	4.2	4.4	3.8	4.1	1.3	4.1	3.7	0.0	4.9	3.8	4.1	3.8	0.1	3.8	4.1	28	AF055394 PCV2b	

图 1 18 株分离株全基因组核苷酸同源性比较

Fig.1 Nucleotide similarity for complete genomic sequences of 18 PVC2 strains

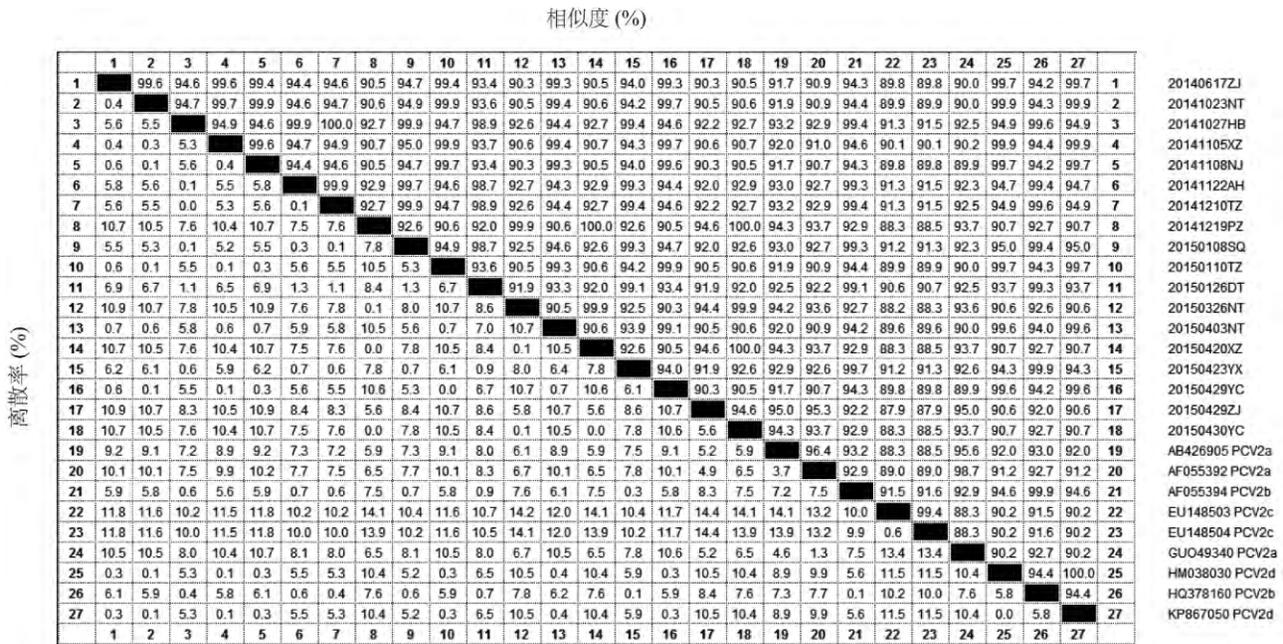
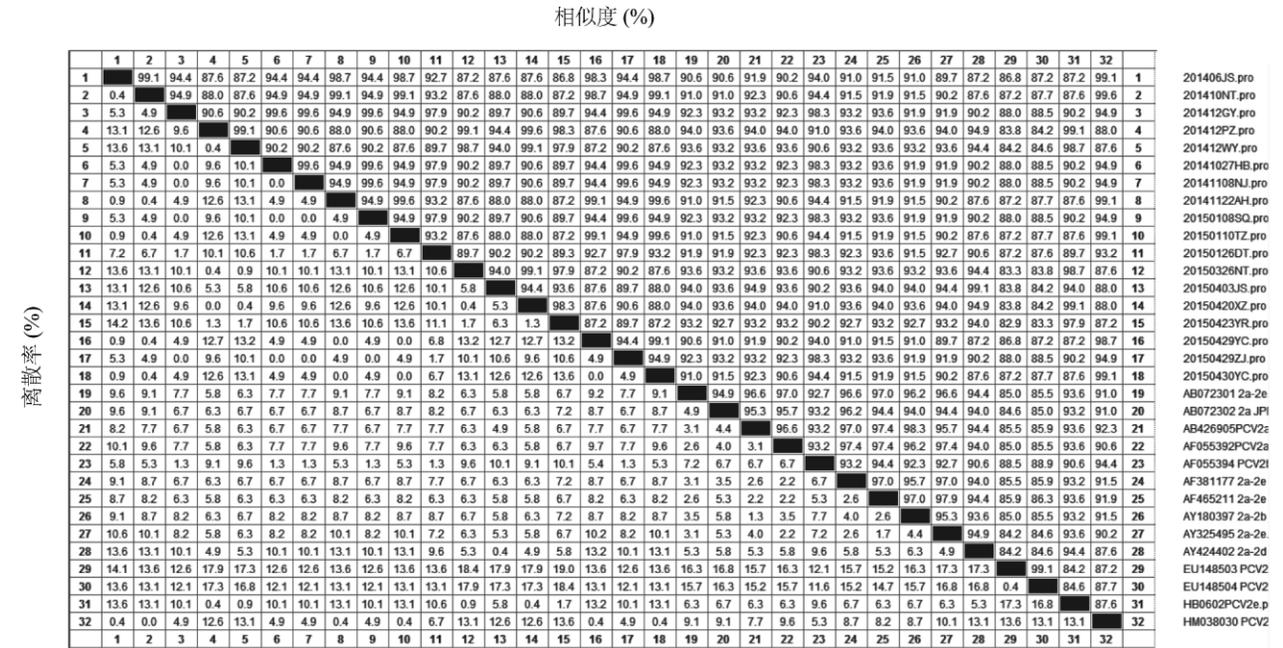


图2 18株PCV2毒株ORF2同源性比较

Fig.2 Similarity of the ORF2 nucleotide sequences for 18 PCV2 strains



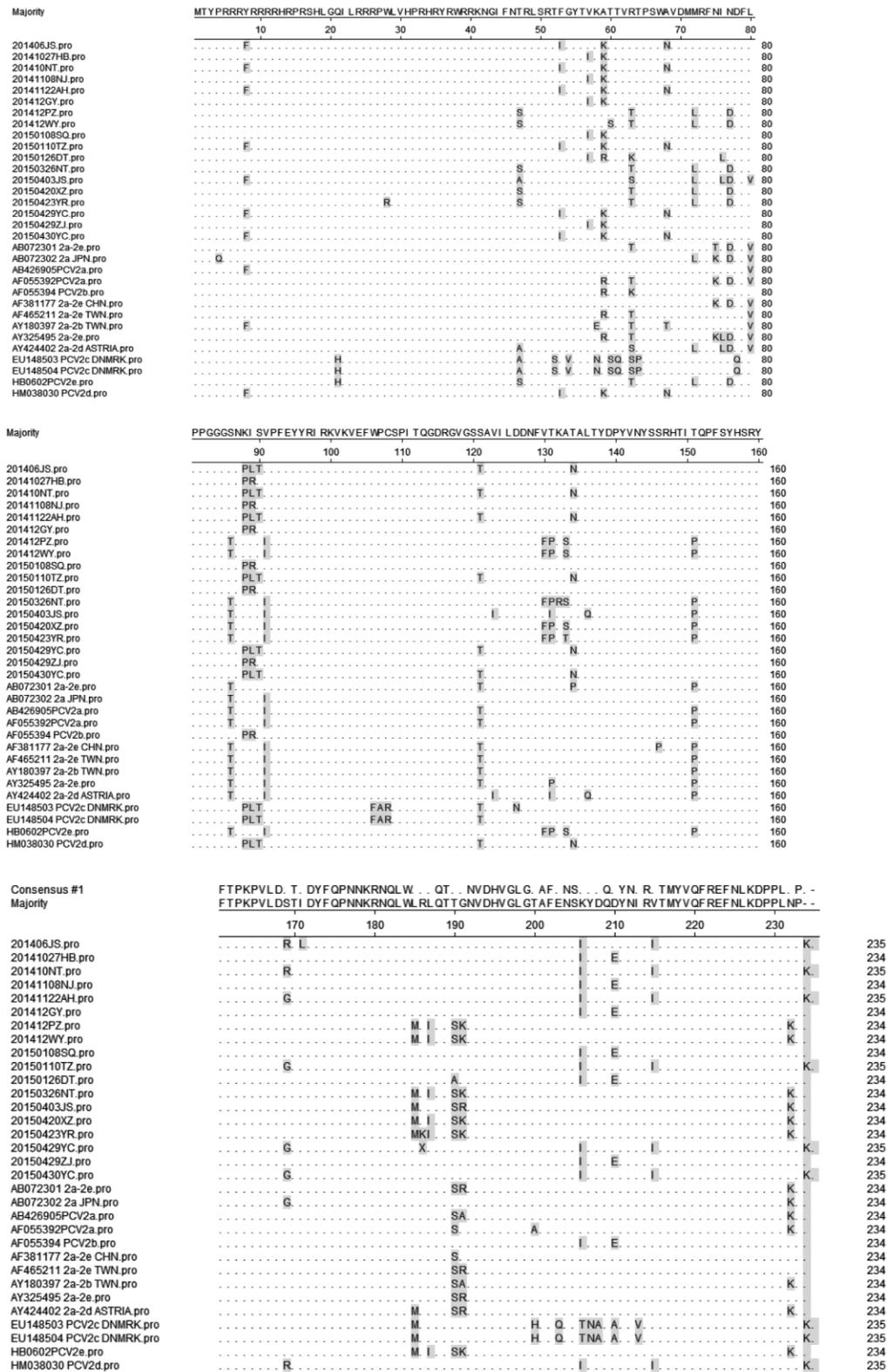
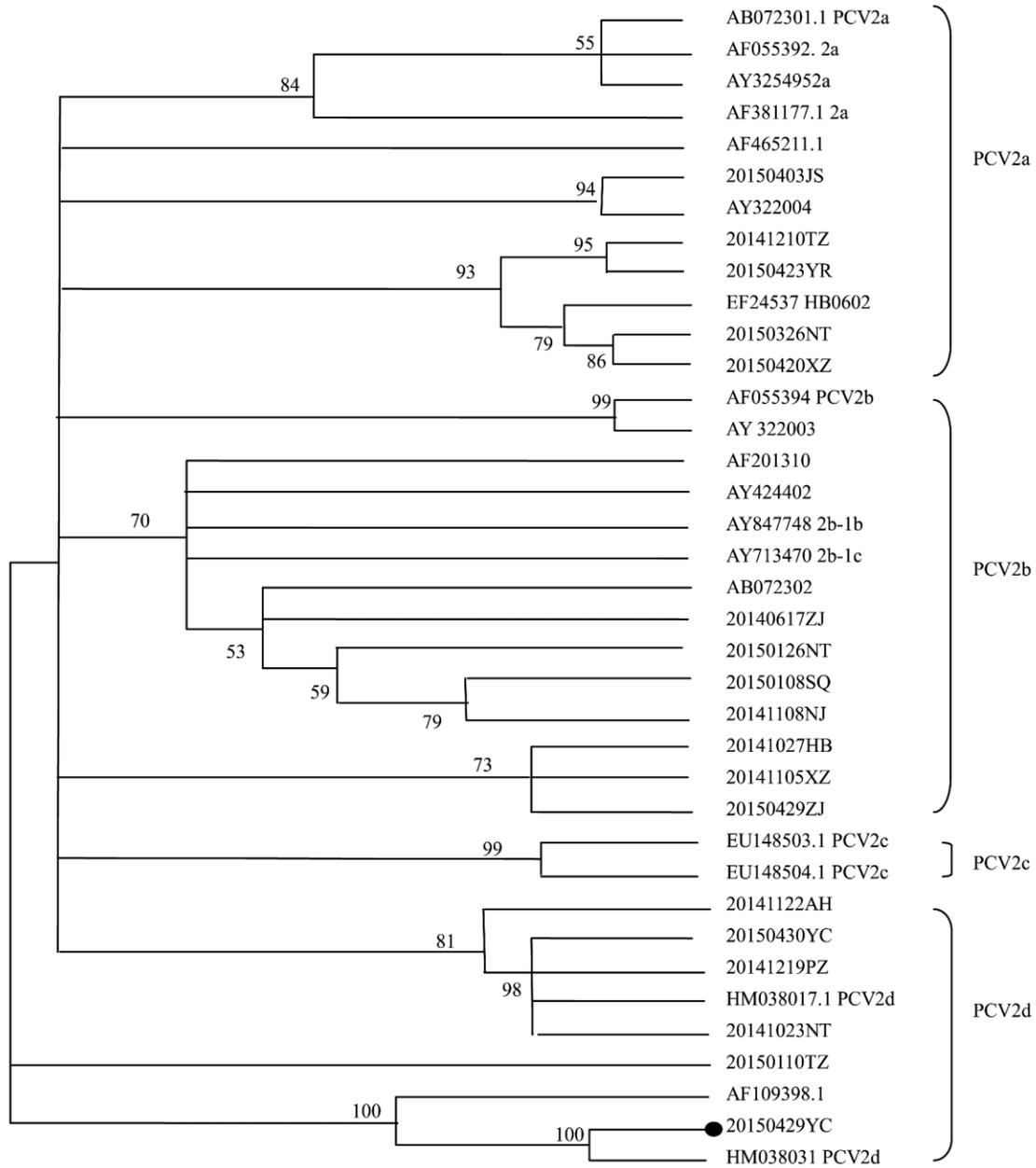


图 4 18 株 PCV2 毒株 Cap 蛋白氨基酸序列多态性分析
 Fig.4 Polymorphism of the Cap protein amino sequence for 18 PCV2 strains

株,与参考毒株 (HM038031.1 PCV2d 等) 同源性 为 100.0%。



圆形表示 2015 年发现的与 PCV2d 相似性很高的特殊毒株。

图 5 基于 18 株 PCV2 ORF2 序列系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree based on the ORF2 nucleotide sequences of 18 PCV2 strains

3 讨论

PCV2 引起的 PMWS 在世界范围内广泛流行,对养猪业造成了严重的经济损失^[16-17]。近年来对江苏省、浙江省等地的 PCV2 流行病学调查结果显示 2012 年至今 PCV2 的阳性率为 40%~50%,有些地区猪场的阳性率甚至达到 50% 以上,说明 PCV2

已在猪场广泛存在,并严重影响了养猪业的经济发 展^[18]。本研究对来自江苏、浙江、河北以及安徽 4 个省份共 244 份临床病料的 PCV2 检测结果显示,健康猪病料的 PCV2 感染率为 10.34%,而发病猪中 PCV2 的感染率为 24.59%。该结果说明 PCV2 在猪群中较为普遍,同时健康猪中存在隐性感染的情况。

本研究对 PCV2 检测为阳性的毒株进行了全长

基因的扩增,共得到 18 支 PCV2 毒株,并利用 DNASTar 的 MegAlign 软件将获得的 18 株全基因组序列与 GenBank 中登录的 PCV2 参考毒株进行同源性比对分析。18 株毒株之间的核苷酸同源性为 94.2%~99.9%,差异并不明显,与参考毒株的核苷酸同源性为 93.5%~99.7%;18 株毒株与参考毒株 ORF2 的同源性为 87.1%~99.9%,与参考毒株氨基酸的同源性为 84.2%~99.6%,说明江苏省及周边地区 PCV2 毒株与国内外参考毒株之间存在着较高的同源性。

ORF2 编码的 Cap 蛋白是 PCV2 的主要编码蛋白,具有较高的异质性^[19],本次研究也对毒株 ORF2 的核苷酸以及其所推导的氨基酸进行了系统的分析比对。结果显示 Cap 蛋白异质性较高,其中的 5 个主要抗原表位都发生了不同程度的基因突变现象,6 株 PCV2d 分离株(20141122AH、20150430YC、20141219PZ、20141023NT、20150110TZ、20150429YC)第 87~90 位氨基酸序列由 KIS 突变为 PLT,而 PLT 这 3 个连续碱基序列是 PCV2a 型毒株的特有形式,说明 PCV2 毒株在自然情况下也存在不同基因型之间的交叉突变现象^[20]。同时发现 6 个毒株的第 232 位氨基酸均由 N 突变为 K,PCV2 的第 232 位氨基酸处于 Cap 蛋白的一个抗原表位,通过对毒株亲水性的改变而影响其抗原性^[21]。同时赖氨酸属于限制性氨基酸,也有研究认为机体免疫系统的活性与赖氨酸的水平密切相关,因此推测这一基因突变也可能对 Cap 蛋白的功能或病毒的致病力造成影响^[22]。

自 2003 年以后 PCV2b 取代 PCV2a 成为当前的主要流行毒株^[23]。有报道认为,PCV2b 毒株在细胞间的扩散能力以及对宿主的吸附能力均强于 PCV2a 是造成毒株转移的主要因素^[24]。而 PCV2c 是 20 世纪 80 年代在丹麦被鉴别出来的,至今在中国未被发现^[25]。PCV2d 是一种新出现的基因型,也被称为 mPCV2b,是 2009 年由 Wang 等^[26]在多个省份分离鉴定了 49 株 PCV2 并对其进行了亚型区分后发现。2010 年 Long 等^[27]分离到了 1 766 bp 碱基缺失的 PCV2d 毒株。徐廷川等^[28]对 2007 到 2011 年间广东省不同地区分离到的 49 个 PCV2 流行毒株进行了遗传变异分析,发现所分离的毒株归属于 PCV2b 和 PCV2d 两大亚群。唐志玲等^[29]曾对广东省的 5 个分离毒株进行序列分析,其中有 3 个毒株属于 PCV2b 亚型,2 个毒株为 PCV2d 亚型。除此之外,徐妮等^[30]对山东省 7 株 PCV2 分离毒株的调查

中发现有 6 株 PCV2d 亚型和 1 株 PCV2b 亚型。本研究中的 18 个毒株包括 5 株 PCV2a(2014 年 1 株,2015 年 4 株),7 株 PCV2b(2014 年 4 株,2015 年 3 株),6 株 PCV2d(2014 年 3 株,2015 年 3 株),没有 PCV2c 出现。且在 6 株 PCV2d 亚型中有 1 株长度为 1 766 bp,其余 5 株为 1 767 bp,说明 PCV2 基因亚型在中国江苏、浙江等地流行情况较为复杂,结果对该地区猪圆环病毒 2 型疫苗的研制起到一定程度的导向作用。

PCV2d 的毒力强弱至今为止尚不明确,有研究认为 PCV2d 较传统的 PCV2b 具有更强的致病性,也有研究认为美国分离到的 1 株 PCV2d 毒力介于 PCV2a 和 PCV2b^[23]。而在 2015 年德国 PCVAD 流行的猪场中分离得到了一株高病毒滴度 PCV2d 毒株,并且用常规 PCV2 疫苗免疫对猪群没有明显的治疗效果^[31]。本次分离的 6 株 PCV2d 毒株与强毒株(HM038017)有较高的同源性,证实 HM038017 毒株的抗原表位发生了变化,不会与 PCV2 的中和抗体发生免疫反应,但这 6 支毒株是否存在较强毒性仍需进一步试验探索。

通过对江苏省及周边地区 PCV2 流行毒株的分子流行病学调查,并从分子进化水平分析毒株之间的遗传及变异情况。结果表明江苏省及周边地区 PCV2 流行较为普遍,健康猪群中存在一定程度的隐性感染;PCV2 毒株以 PCV2a、PCV2b 以及 PCV2d 3 种基因型共同流行,且 PCV2b 占主导地位,PCV2d 次之。

参考文献:

- [1] DELWART E, LI L. Rapidly expanding genetic diversity and host range of the Circoviridae viral family and other rep encoding small circular ssDNA genomes[J]. Virus Res, 2012, 164: 114-121.
- [2] 王涛,王海燕,徐向明,等. 2009—2011 年某猪场 PCV2 血清学监测及分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(7): 229-230.
- [3] EDDICKS M, FUX R, SZIKORA F, et al. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 176(3-4): 337-343.
- [4] 吴璟,章红兵,王鑫炎,等. 2007~2012 年浙江省及周边地区猪圆环病毒 2 型(PCV2)分子流行病学调查[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(4): 456-463.
- [5] CHAE C. An emerging porcine circovirus type 2b mutant (mPCV2b) originally known as PCV2d[J]. Veterinary Journal, 2015, 203(1): 6-9.
- [6] 吴胜昔,梁望旺,徐斌,等. PCV2 WH 株人工感染断奶仔猪复制多系统衰竭综合征[J]. 南方农业学报, 2014, 45(5): 864-869.
- [7] 郎洪武,张广川,吴发权,等. 断奶猪多系统衰竭综合征血清抗体检测[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(3): 3-5.

- [8] 邓静,赵春容,曹三杰,等.2010-2013年四川地区猪圆环病毒2型的分子流行病学调查[J].中国兽医学报,2014,34(12):1868-1876.
- [9] KOINIG H C, TALKER S C, STADLER M, et al. PCV2 vaccination induces IFN-gamma/TNF-alpha co-producing T cells with a potential role in protection[J]. Vet Res, 2015, 46: 20-24.
- [10] 徐君,郭万柱,陈杨,等.四川省PPV与PCV2的病原流行病学调查[J].中国兽药杂志,2012(4):44-47.
- [11] 刘建波.猪细小病毒与猪圆环病毒2型分子生物学特性研究[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [12] ZHAI S L, CHEN S N, WEI Z Z, et al. Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China[J]. Virology Journal, 2011, 8(1): 517-522.
- [13] TIPPAWAN J, ALONGKOT B, PARIWAT P, et al. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and-negative farms in Thailand [J]. Virology Journal, 2011, 8(1): 88-94.
- [14] LONG J G, YUE H L, YAN W W, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China [J]. Virology Journal, 2010, 7(1): 273-285.
- [15] 管萌.2012-2013年江苏部分地区猪圆环病毒2型分子流行病学调查及其单克隆抗体的研制[D].扬州:扬州大学,2014.
- [16] SEGALES J, OLVERA J, GRAU-ROMA L, et al. PCV2 genotype definition and nomenclature [J]. Veterinary Record, 2008, 162: 867-868.
- [17] GRAU-ROMA L, CRISCI E, SIBILA M, et al. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 128: 22-35.
- [18] 赵津.我国东南地区猪圆环病毒流行病学调查及PCV2、PEDV、TGEV和GAR复合PCR方法的建立与应用[D].南京:南京农业大学,2013.
- [19] KWEON C H, NGUYEN L T, YOO M S, et al. Differential recognition of the ORF2 region in a complete genome sequence of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolated from boar bone marrow in Korea [J]. Gene, 2015, 569(2): 308-312.
- [20] 于学武.辽宁省规模化养猪场PCV2感染流行病学调查及其研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [21] FRANZO G, TUCCIARONE C M, DOTTO G, et al. International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy [J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2015, 12: 131-139.
- [22] KREIKEMEIER C A. Genome-wide analysis of TNF-alpha response in pigs challenged with porcine circovirus 2b [J]. Anim Genet, 2015, 46(2): 205-208.
- [23] ANOOPRAJ R, RAJKHOWA T K, CHERIAN S, et al. Genetic characterization and phylogenetic analysis of PCV2 isolates from India: indications for emergence of natural inter-genotypic recombinants [J]. Infection, Genetics and Evolution, Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2015, 31: 25-32.
- [24] LI W L, WANG X W, MA T, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China [J]. Virus Genes, 2010, 40: 244-251.
- [25] PARK C H, YEONSU O H, SEO H W, et al. Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2013, 20(3): 369-376.
- [26] WANG F, GUO X, GEA X, et al. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2 [J]. Virus Research, 2008, 145: 151-156.
- [27] LONG J G, YUE H L, YAN W W, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China [J]. Virology Journal, 2010, 7(1): 273-285.
- [28] 徐廷川,王衡,张得玉,等.广东省猪圆环病毒2型感染的血清学调查[J].动物医学进展,2011,12(5):79-83.
- [29] 唐志玲,肖建雄,陈瑞爱,等.5株猪圆环病毒2型全基因克隆和序列分析[J].中国畜牧兽医,2013,40(5):14-18.
- [30] 徐妮.山东省猪圆环病毒病的血清学调查及PCV2分离株的遗传变异分析[D].泰安:山东农业大学,2014.
- [31] GUO L, FU Y, WANG Y, et al. A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence *in vivo*, compared with classical PCV2a/b strain [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41463.

(责任编辑:陈海霞)