

网络出版时间:2018-05-25 09:43

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.11.002

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180525.0939.004.html>

陕甘地区猪 PCV3 流行毒株的检测

朱小甫, 吴旭锦

(咸阳职业技术学院 畜牧兽医研究所 动物疫病分子生物学诊断实验室, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] **【目的】**调查陕甘地区猪场 PCV3 流行情况,为进一步研究与防控 PCV3 奠定基础。**【方法】**根据 GenBank 中 PCV3 基因序列,设计并合成了 1 对引物,对 96 个猪场的 96 份混合样本进行 PCV3 检测,将阳性样品进行序列测定分析,同时对 PCV3 阳性样品进行 6 种常见猪群病毒病检测。**【结果】**检测出了 PCV3 阳性样品 8 份,阳性率为 8.33%。其中 7 份样品与其他 6 种常见猪群病毒存在不同程度的混合感染现象,混合感染率 87.5%。序列分析表明,陕甘地区猪场 8 株 PCV3 基因片段核苷酸同源性在 98.3%~100%,与不同地域参考毒株的同源性在 97.6%~100%。**【结论】**陕甘地区 2015 年样品中即存在 PCV3 感染,不同地区的 PCV3 基因同源性较高,遗传稳定;基因进化树显示不同地域 PCV3 毒株交叉分布,没有明显的地域特征。

[关键词] 猪圆环病毒 3 型;陕甘地区;序列分析;流行病学

[中图分类号] S852.65⁺9.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2018)11-0011-07

Detection of PCV3 prevalent strains in pigs in Shaanxi and Gansu

ZHU Xiaofu, WU Xujin

(Animal Epidemic Disease Diagnostic Laboratory of Molecular Biology, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: **【Objective】** This paper investigated the prevalence of PCV3 in pig farms in Shaanxi and Gansu to provide basis for further research as well as prevention and control of PCV3. **【Method】** According to the sequence of PCV3 gene in GenBank, a pair of primers were designed and synthesized, and PCV3 was detected in 96 pig farms samples. The positive samples were sequenced and analyzed, and six swine herd virus tests were also performed on PCV3-positive samples. **【Result】** Eight PCV3 positive samples were obtained with the positive rate of 8.33%. Among them, 7 were mixed with six swine herd viruses, and the mixed infection rate was 87.5%. Sequence analysis showed that the homology of 8 PCV3 gene fragments in Shaanxi and Gansu pig farms was 98.3%—100%, and the homology with reference strains in different regions was 97.6%—100%. **【Conclusion】** There was PCV3 infection in Shaanxi and Gansu in 2015 with high homology among different regions and stable genetic inheritance. Phylogenetic tree showed that the PCV3 strains were cross-distributed in different regions without significant regional characteristics.

Key words: porcine circovirus type 3; Shaanxi-Gansu region; sequence analysis; epidemiology

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是单股环状 DNA 病毒,直径为 17 nm,是迄今发现的最小

的动物病毒^[1-3]。PCV 分为 3 个基因型 PCV1、PCV2 和 PCV3,其中 PCV1 是在污染的 PK-15 细

[收稿日期] 2018-03-28

[基金项目] 陕西省科技计划项目(2017NY-097)

[作者简介] 朱小甫(1977—),男,陕西眉县人,执业兽医师,硕士,主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究。
E-mail: zhuxiaofu2004@aliyun.com

[通信作者] 吴旭锦(1979—),女,陕西西安人,教授,博士,主要从事动物疫病分子病原学与免疫学研究。
E-mail: yaoyuanwxj@163.com

胞中发现的,不引起细胞病变,对猪无致病性。PCV2 主要引起断奶仔猪多系统衰竭综合征、皮炎肾炎综合征、仔猪先天性震颤和母猪繁殖障碍,是严重危害养猪业的重要病原^[4-8]。PCV3 是由 Palinski 等^[9]从患病母猪及流产胎儿体内首次鉴定,其基因组长 2.0 kb,PCV3 与圆环病毒科病毒具有类似基因组结构和遗传相似性,但与其他圆环病毒衣壳蛋白氨基酸序列同源性低于 70%,因而认为 PCV3 是一种新的圆环病毒基因型。

我国学者对国内部分省区的 PCV3 流行情况进行了调查,湛洋等^[10]对江苏、湖南、湖北疑似猪皮炎肾炎综合征的病猪组织样品进行 PCV3 巢式 PCR 检测,结果在这些病料中检测到 PCV3 的存在,部分病料表现为 PCV2 和 PCV3 共感染的特性。贺会利等^[11]从广西某猪场腹泻死亡仔猪的病料样品中检测到 PCV3 并进行了测序分析,发现 13 株国内 PCV3 毒株间及 5 株美国 PCV3 毒株间的 Cap 基因序列同源性分别在 96.9%~99.4%和 98.3%~99.5%。刘晓东等^[12]对我国 10 个省区 106 份样品进行 PCR 检测,结果表明,安徽、江西、山东、福建、河南和广西存在 PCV3 阳性猪场,从 106 份样品中检测出阳性样品 19 份,样品阳性率为 18.0%。庞笑语等^[13]建立了 PCV3 PCR 检测方法,对从河北省猪场收集的 168 份疑似样品进行检验,检出阳性样品 9 份,表明河北猪群存在 PCV3 感染。迄今为止,尚未见到对西北地区猪场 PCV3 感染情况的调查报道,本研究拟对陕西省和甘肃省猪场 PCV3 感染状况进行检测,并对病毒序列进行测序分析,以期为防控 PCV3 在猪群中的蔓延提供技术基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料和血清 病料和血清由咸阳职业技术学院畜牧兽医研究所采集,样品来源猪群存在发热、呼吸道症状、流产、渐进性消瘦或腹泻等不同临床表现,共采集 96 个猪肺脏、肝脏、脾脏、肠道、流产胎儿与血清样本,样品中组织病料共 85 份,血清样品共 11 份。其中陕西陕南地区 22 份、关中地区 35 份、陕北地区 23 份,甘肃 16 份。每个猪场的组织病料按照脏器种类研磨处理,13 000 g 离心 10 min,收集上清液,与血清样品同置于-70℃冰箱保存备用。

1.1.2 试剂与仪器 DNAliso Reagent、RNAiso plus、rTaq DNA 聚合酶、dNTP、pMD18-T 载体等

分子生物学试剂购自宝生物工程(大连)有限公司,无水乙醇、异丙醇和氯仿等化学试剂为国产分析纯级试剂,DH5 α 感受态细胞、超纯水为实验室自制。PCR 仪为美国 ABI 公司生产的 9700 型,高速冷冻离心机为 Sigma 公司 1-15K 型,凝胶成像系统为英国 SYNGENE 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 参考 GenBank 上公开的 PCV3 全基因组序列,包括 GD2016 株(登录号 KY418606)、CC2016 株(登录号 KY421348)、Anhui-14 株(登录号 MF084994)、GDBL1 株(登录号 MF405272)和 GXHJ1 株(登录号 MF405273),经过综合分析比对,设计 2 条引物,其序列为,PCV3-F: 5'-TTGAACGGTGGGGTCATATGTGT-3'(1 445-1 467); PCV3-R: 5'-AGATGAAAGTTACACT-CAGCCC-3'(1 734-1 713),预期扩增片段长度 290 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,工作浓度为 20 μ mol/L。

1.2.2 其他 6 种常见猪病毒病检测引物的合成 为了查明 PCV3 阳性样品中是否存在其他常见猪病毒的混合感染,按照文献[14-18]的方法,合成了猪瘟病毒(CSFV)、猪伪狂犬病病毒(PRV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、流行性腹泻病毒(PEDV)和传染性胃肠炎病毒(TGEV)检测引物,用于对 PCV3 阳性样品进行这 6 种病原的 PCR/RT-PCR 检测分析。

1.2.3 样品中 DNA 的提取 吸取病料上清液或血清 100 μ L 于无菌 1.5 mL 离心管中,加入 DNAliso Reagent 700 μ L,颠倒混匀后静置裂解 10 min,加入 600 μ L -20℃保存的无水乙醇,混匀后沉淀 10 min。4℃、13 000 g 离心 10 min,弃去上清,加入 1 mL -20℃保存的体积分数 70%乙醇,轻轻颠倒数次,弃去清洗的乙醇,3 000 g 离心 1 min,用移液器吸去残留在管底的乙醇,离心管倒置在无菌滤纸上干燥 2 min,用 40 μ L 超纯水充分吹打溶解 DNA,即得到用于核酸扩增的 DNA 模板。

1.2.4 样品中 PCV3 的检测 取上述 DNA 模板,进行 PCV3 目的基因扩增。25.0 μ L 反应体系中, DNA 模板 2.0 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,dNTP 2.0 μ L,PCV3-F、PCV3-R、rTaq DNA 聚合酶各 0.5 μ L,超纯水 17.0 μ L,混合均匀。PCR 条件为:95℃预变性 5 min;94℃40 s 变性,58℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,共进行 35 个循环;循环结束后 72℃延伸 10 min。反应完成后取 5.0 μ L PCR 产物,进行 15

g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统中照相观察。

1.2.5 PCV3 阳性样品中 6 种常见猪病毒的检测

直接用 PCV3 阳性样品 DNA 模板进行 PCV2 和 PRV 检测,试验条件见参考文献[15,18]。CSFV、PRRSV、PEDV 和 TGEV 4 种 RNA 病毒检测,首先进行 RNA 提取与第一链 cDNA 的合成,在 1.5 mL 无菌无 RNA 酶离心管中加入 PCV3 阳性病料上清或血清 250 μ L,加 750 μ L RNAiso plus 裂解 10 min,再加 200 μ L 氯仿后剧烈振摇乳化,静置 10 min 后于 4 $^{\circ}$ C、13 000 g 离心 10 min;吸取 600 μ L 上清液置入另一离心管中,加入 750 μ L 异丙醇混匀后在-20 $^{\circ}$ C 沉淀 20 min;4 $^{\circ}$ C、13 000 g 离心 10 min,弃去上清液,加入 1 mL 体积分数 75%乙醇洗涤 1 次,弃去乙醇,倒置离心管自然干燥即得总 RNA,然后按照参考文献[14,16,18]的体系与条件进行 CSFV、PRRSV、PEDV 和 TGEV 检测。

1.2.6 PCV3 基因片段序列分析 将 PCV3 阳性 PCR 产物纯化回收,连接 pMD18-T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,经 Amp 筛选,挑取单个菌落,空气浴摇床 37 $^{\circ}$ C 摇动培养 12 h,菌液 PCR 鉴定为阳性的菌液送生工生物工程(上海)有限公司测序。从 GenBank 上下载美国、韩国、意大利、巴西及我国不同地区 PCV3 参考序列 20 个,将参考序列统一按照 PCV3 扩增引物位置进行截短,用 DNASTar 软件进行序列比对分析,并构建进化树。

2 结果与分析

2.1 样品中 PCV3 的检测结果

通过 PCR 扩增与电泳,从 96 个猪场的组织样品或血清中检测出 8 份样品(组织 6 份,血清 2 份)出现 290 bp 的目的条带,即有 8 份阳性结果(图 1),PCV3 阳性率为 8.33%。

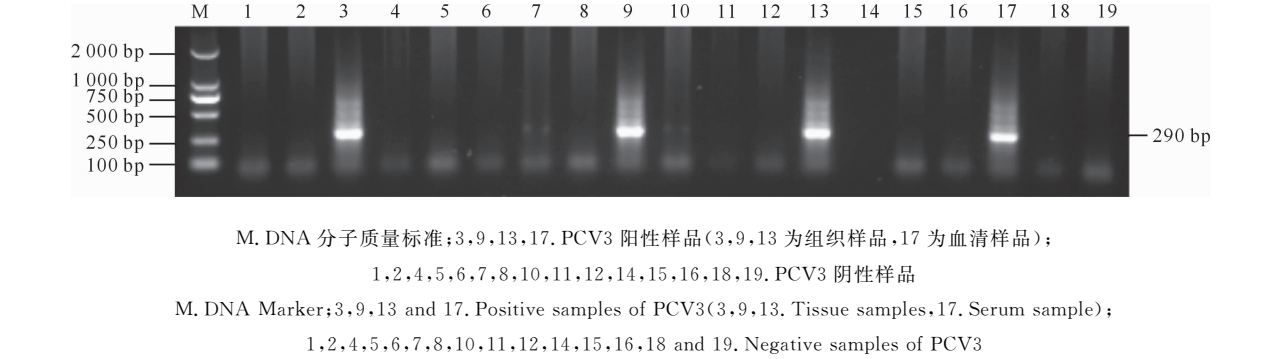


图 1 部分猪场样品 PCV3 检测结果

Fig. 1 Electrophoresis detection PCV3 from some samples

8 份阳性样品来源与分布见表 1。从表 1 可见,陕西和甘肃地区猪场均有 PCV3 阳性场,2015—2017 年均有 PCV3 阳性样品检出,样品来源多样,包括小肠及内容物、流产胎儿、肺脏、肝脏、脾脏以及血清等。

表 1 陕甘地区 PCV3 阳性样品来源与分布情况

样品编号 Sample number	毒株名称 Strain name	来源地点 Location	样品类型 Sample type	发病特点 Disease characteristics	采样年份 Sampling time
12	12-PCV3	陕西宁强县 Ningqiang, Shaanxi	小肠及内容物 Small intestine and contents	腹泻 Diarrhea	2017
20	20-PCV3	陕西兴平市 Xingping, Shaanxi	流产胎儿 Abortion fetus	母猪流产 Sow abortion	2017
25	25-PCV3	陕西西乡县 Xixiang, Shaanxi	肺脏、肝脏和脾脏 Lung, liver and spleen	败血症 Septicemia	2017
35	35-PCV3	甘肃古浪 Gulang, Gansu	小肠及内容物 Small intestine and contents	腹泻 Diarrhea	2016
40	40-PCV3	陕西延安市 Yan'an, Shaanxi	小肠及内容物 Small intestine and contents	腹泻 Diarrhea	2017
58	58-PCV3	陕西户县 Huxian, Shaanxi	血清 Serum	母猪流产 Sow abortion	2017
59	58-PCV3	陕西扶风县 Fufeng, Shaanxi	肺脏、肝脏和脾脏 Lung, liver and spleen	败血症 Septicemia	2015
86	86-PCV3	甘肃天水市 Tianshui, Gansu	血清 Serum	败血症 Septicemia	2015

2.2 PCV3 阳性样品中 6 种常见猪病毒检测结果

品进行 PCV2、PRV、CSFV、PRRSV、PEDV 和
应用 PCR/RT-PCR 技术对 8 份 PCV3 阳性样 TGEV 检测,检测结果见表 2。

表 2 PCV3 阳性样品中其他 6 种病毒检测结果

Table 2 Results of 6 other virus tests for PCV3 positive samples

样品编号 Sample number	毒株名称 Strain name	PCV3	PCV2	PRV	CSFV	PRRSV	PEDV	TGEV
12	12-PCV3	+	—	—	—	—	+	—
20	20-PCV3	+	+	—	—	—	—	—
25	25-PCV3	+	+	+	—	+	—	—
35	35-PCV3	+	—	—	—	—	+	+
40	40-PCV3	+	—	—	—	—	+	—
58	58-PCV3	+	—	—	—	—	—	—
59	59-PCV3	+	—	+	—	—	—	—
86	86-PCV3	+	+	—	—	+	—	—

注:“+”表示阳性,“—”表示阴性。

Note:“+” indicates positive pathogen detection,and “—” indicates negative pathogen detection.

从表 2 结果可以看出,在检测的 7 种病原中,与 PEDV,均为 37.5%(3/8)。

PCV3 单一感染的仅 1 份(58 号),其他均为混合感 2.3 PCV3 基因片段序列分析比对结果

染,混合感染率为 87.5%(7/8)。25 号样品的病原 8 株 PCV3 流行毒株与 20 株参考毒株核苷酸

最为复杂,存在 PCV3、PCV2、PRV 和 PRRSV 四重 和氨基酸序列的同源性比对见表 3。

混合感染。与 PCV3 混合感染机率最大的是 PCV2

表 3 8 株 PCV3 流行毒株与 20 株参考毒株核苷酸和氨基酸序列的同源性比对

Table 3 Nucleotide and amino acid homology of 8 PCV3 epidemic strains in
Shaanxi and Gansu and 20 reference sequences

序号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		98.3	98.6	98.6	100.0	99.3	98.6	98.3	98.6	98.3	98.6	99.0	99.0	98.6
2	95.8		99.0	99.0	98.3	99.0	99.0	100.0	98.3	98.6	98.3	98.3	98.3	97.9
3	96.9	96.9		99.3	98.6	99.3	99.3	99.0	98.6	99.0	98.6	98.6	98.6	98.3
4	96.9	96.9	97.9		98.6	99.3	99.3	99.0	98.6	99.0	98.6	98.6	98.6	98.3
5	100.0	95.8	96.9	96.9		99.3	98.6	98.3	98.6	98.3	98.6	99.0	99.0	98.6
6	99.0	96.9	97.9	97.9	99.0		99.3	99.0	99.3	99.0	99.3	99.3	99.3	99.0
7	96.9	96.9	97.9	97.9	96.9	97.9		99.0	98.6	99.7	98.6	99.3	99.3	99.0
8	95.8	100.0	96.9	96.9	95.8	96.9	96.9		98.3	98.6	98.3	98.3	98.3	97.9
9	96.9	94.8	95.8	95.8	96.9	95.8	95.8	94.8		98.3	99.3	98.6	98.6	98.3
10	95.8	95.8	96.9	96.9	95.8	96.9	99.0	95.8	94.8		98.3	99.0	99.0	98.6
11	96.9	94.8	95.8	95.8	96.9	95.8	95.8	94.8	97.9	94.8		98.6	98.6	98.3
12	97.9	94.8	95.8	95.8	97.9	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8		100.0	99.7
13	97.9	94.8	95.8	95.8	97.9	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8	100.0		99.7
14	96.9	93.8	94.8	94.8	96.9	94.8	96.9	93.8	94.8	95.8	94.8	99.0	99.0	
15	97.9	94.8	95.8	95.8	97.9	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8	100.0	100.0	99.0
16	97.9	94.8	95.8	95.8	97.9	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8	100.0	100.0	99.0
17	97.9	94.8	95.8	95.8	97.9	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8	100.0	100.0	99.0
18	96.9	94.8	95.8	95.8	96.9	95.8	95.8	94.8	97.9	94.8	97.9	95.8	95.8	94.8
19	97.9	95.8	96.9	96.9	97.9	96.9	99.0	95.8	96.9	97.9	96.9	99.0	99.0	97.9
20	96.9	96.9	97.9	97.9	96.9	97.9	97.9	96.9	97.9	96.9	97.9	95.8	95.8	94.8
21	95.8	97.9	96.9	96.9	95.8	96.9	99.0	97.9	94.8	97.9	94.8	96.9	96.9	95.8
22	96.9	96.9	97.9	97.9	96.9	97.9	100.0	96.9	95.8	99.0	95.8	97.9	97.9	96.9
23	99.0	94.8	95.8	95.8	99.0	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8	99.0	99.0	97.9
24	99.0	94.8	95.8	95.8	99.0	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8	99.0	99.0	97.9
25	93.8	93.8	94.8	94.8	93.8	94.8	96.9	93.8	92.7	95.8	92.7	94.8	94.8	93.8
26	99.0	94.8	95.8	95.8	99.0	95.8	97.9	94.8	95.8	96.9	95.8	99.0	99.0	97.9
27	95.8	93.8	94.8	94.8	95.8	94.8	96.9	93.8	94.8	95.8	94.8	96.9	96.9	95.8
28	94.8	94.8	95.8	95.8	94.8	95.8	97.9	94.8	93.8	96.9	93.8	95.8	95.8	94.8

表 3(续) Continued table 3

序号 No.	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	99.0	99.0	99.0	98.6	99.0	98.6	98.3	98.6	99.3	99.3	97.6	99.3	98.3	97.9
2	98.3	98.3	98.3	98.3	98.6	99.0	99.3	99.0	98.3	98.3	97.9	98.3	97.9	98.3
3	98.6	98.6	98.6	98.6	99.0	99.3	99.0	99.3	98.6	98.6	98.3	98.6	98.3	98.6
4	98.6	98.6	98.6	98.6	99.0	99.3	99.0	99.3	98.6	98.6	98.3	98.6	98.3	98.6
5	99.0	99.0	99.0	98.6	99.0	98.6	98.3	98.6	99.3	99.3	97.6	99.3	98.3	97.9
6	99.3	99.3	99.3	99.3	99.7	99.3	99.0	99.3	99.3	99.3	98.3	99.3	99.0	98.6
7	99.3	99.3	99.3	98.6	99.7	99.3	99.7	100.0	99.3	99.3	99.0	99.3	99.0	99.3
8	98.3	98.3	98.3	98.3	98.6	99.0	99.3	99.0	98.3	98.3	97.9	98.3	97.9	98.3
9	98.6	98.6	98.6	99.3	99.0	99.3	98.3	98.6	98.6	98.6	97.6	98.6	98.3	97.9
10	99.0	99.0	99.0	98.3	99.3	99.0	99.3	99.7	99.0	99.0	98.6	99.0	98.6	99.0
11	98.6	98.6	98.6	99.3	99.0	99.3	98.3	98.6	98.6	98.6	97.6	98.6	98.3	97.9
12	100.0	100.0	100.0	98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
13	100.0	100.0	100.0	98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
14	99.7	99.7	99.7	98.3	99.3	98.3	98.6	99.0	99.3	99.3	97.9	99.3	98.6	98.3
15		100.0	100.0	98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
16	100.0		100.0	98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
17	100.0	100.0		98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
18	95.8	95.8	95.8		99.0	99.3	98.3	98.6	98.6	98.6	97.6	98.6	98.3	97.9
19	99.0	99.0	99.0	96.9		99.0	99.3	99.7	99.0	99.0	98.6	99.0	98.6	99.0
20	95.8	95.8	95.8	97.9	96.9		99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
21	96.9	96.9	96.9	94.8	97.9	96.9		99.7	99.0	99.0	98.6	99.0	98.6	99.0
22	97.9	97.9	97.9	95.8	99.0	97.9	99.0		99.3	99.3	99.0	99.3	99.0	99.3
23	99.0	99.0	99.0	95.8	96.9	99.0	96.9	97.9		100.0	98.3	100.0	99.0	98.6
24	99.0	99.0	99.0	95.8	96.9	99.0	96.9	97.9	100.0		98.3	100.0	99.0	98.6
25	94.8	94.8	94.8	92.7	95.8	94.8	95.8	96.9	94.8	94.8		98.3	97.9	98.3
26	99.0	99.0	99.0	95.8	96.9	99.0	96.9	97.9	100.0	100.0	94.8		99.0	98.6
27	96.9	96.9	96.9	94.8	95.8	96.9	95.8	96.9	96.9	96.9	93.8	96.9		98.3
28	95.8	95.8	95.8	93.8	96.9	95.8	96.9	97.9	95.8	95.8	94.8	95.8	94.8	

注:右上角为核苷酸同源性,左下角为氨基酸同源性。1~28 分别代表我国的 12-PCV3、20-PCV3、25-PCV3、35-PCV3、40-PCV3、58-PCV3、59-PCV3、86-PCV3、PCV3 CN Anhui-14、PCV3 CN Chongqing-156、PCV3 CN Fujian-12、PCV3 CN GDBL1、PCV3 CN GDLC1、PCV3 CN GDQG1、PCV3 CN GDSJ1、PCV3 CN GXHJ1、PCV3 CN GXLJ1、PCV3 CN Henan-13、PCV3 CN Jiangxi-B1、PCV3 CN Shandong-1 毒株,韩国的 PCV3 KU-1608、PCV3 KU-1609 毒株,巴西的 PCV3-BR RS8 毒株,我国的 PCV3-CHN CC2016、PCV3-CHN GD2016 毒株,意大利的 PCV3-IT MN2017 毒株,美国的 PCV3-US MN2016、PCV3-US MO2015 毒株。

Note: Nucleotide homology in the upper right corner and amino acid homology in the lower left corner. Strains 1—28 are 2-PCV3, 20-PCV3, 25-PCV3, 35-PCV3, 40-PCV3, 58-PCV3, 59-PCV3, 86-PCV3, PCV3 CN Anhui-14, PCV3 CN Chongqing-156, PCV3 CN Fujian-12, PCV3 CN GDBL1, PCV3 CN GDLC1, PCV3 CN GDQG1, PCV3 CN GDSJ1, PCV3 CN GXHJ1, PCV3 CN GXLJ1, PCV3 CN Henan-13, PCV3 CN Jiangxi-B1, PCV3 CN Shandong-1, PCV3 KU-1608, PCV3 KU-1609, PCV3-BR RS8, PCV3-CHN CC2016, PCV3-CHN GD2016, PCV3-IT MN2017, PCV3-US MN2016, and PCV3-US MO2015.

从表 3 可见,28 株 PCV3 基因片段核苷酸同源性在 97.6%~100%,同源性最低的是 CHN GD2016(KY421347)与 12-PCV3、40-PCV3、Anhui-14(MF084994)、Fujian-12(KY075987)、Henan-13(KY075988),同源性均为 97.6%。陕甘地区猪场 8 株 PCV3 基因片段核苷酸同源性在 98.3%~100%,其中 12-PCV3 与 40-PCV3、20-PCV3 与 86-PCV3 同源性均为 100%,12-PCV3 与 20-PCV3 同源性最低,为 98.3%。推导氨基酸序列比较,参比

序列同源性为 92.7%~100%,测定的 8 株 PCV3 基因片段氨基酸同源性为 95.8%~100%。

图 2 显示,基因进化树上不同来源的 PCV3 并没有显著的地域特征,我国不同地区、美国、韩国、意大利和巴西 PCV3 毒株交叉分布,提示不同区域 PCV3 毒株亲缘关系很近,推测 PCV3 毒株可能具有同一起源。28 个毒株中,仅有 CHN GD2016 与其他毒株遗传距离较远,形成了一个单独的进化分支,其余 27 株均处在同一个大的进化分支上。

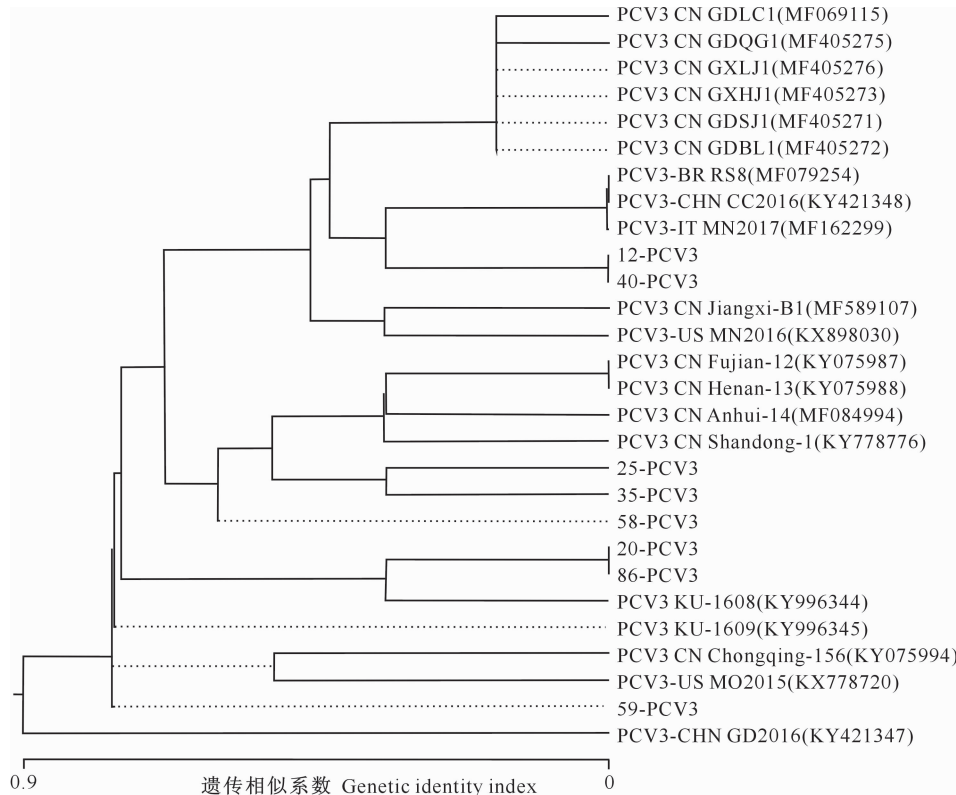


图 2 PCV3 基因进化树
Fig. 2 Evolution tree of PCV3 gene

3 讨 论

由于 PCV3 是 2016 年才首次鉴定的猪圆环病毒新的血清型,迄今还未见成功分离病毒 的报道,因此对 PCV3 的病原特征、传播方式、致病机理等方面仍然不甚了解^[19-23]。本研究参考 GenBank 上公开的 PCV3 全基因组序列,设计了 1 对引物,通过对陕甘地区 96 个猪场样本进行检测和测序分析,成功获得了 8 株 PCV3 流行毒株基因片段,阳性率为 8.33%,研究证实在陕西和甘肃猪场中存在 PCV3 感染,并发现 2015 年采集的样品中就存在 PCV3,2016、2017 年也连续检出 PCV3 阳性样品。国内有学者通过公开的 PCV3 序列设计引物进行盲检,同样发现猪场感染 PCV3^[10-14,24],与本研究结果基本一致。从样品来源来看,小肠及内容物、流产胎儿、肺脏、肝脏、脾脏和血清中均检测到 PCV3,提示 PCV3 在猪体组织中分布广泛,检测时可灵活采样。对这 8 份 PCV3 阳性样本进行 PCV2、PRV、CSFV、PRRSV、PEDV 和 TGEV 检测,发现混合感染率为 87.5%,混感病原种类复杂,包括 PCV2、PRV、PRRSV、PEDV 和 TGEV,因而难以推测 PCV3 与腹泻、母猪流产与败血症之间的联系,揭示 PCV3 的致病性仍需进一步的病原分离与攻毒试验来证实。

基因序列分析表明,28 株 PCV3 基因片段核苷酸同源性在 97.6%~100%,陕甘地区猪场 8 株 PCV3 基因片段核苷酸同源性为 98.3%~100%,氨基酸同源性为 95.8%~100%。不同地区的 PCV3 基因同源性高,显示 PCV3 遗传稳定^[25]。基因进化树显示我国不同省份、美国、韩国、意大利和巴西 PCV3 毒株交叉分布,没有显著的地域特征,推测 PCV3 毒株可能具有同一起源。

本研究通过检测与测序分析,初步获得了陕甘猪场 PCV3 流行的资料和数据,筛选了 PCV3 阳性样本,为进一步分离病毒,深入研究病毒的致病性以及疫苗制备奠定了基础。

[参考文献]

[1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. Nature, 1982, 295(5844): 64-66.
[2] Dorr P M, Baker R B, Almond G W, et al. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine [J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2007, 230(2): 244-250.
[3] Shang S B, Jin Y L, Jiang X, et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine cirovirus type 2 [J]. Molecular Immunol-

- ogy,2009,46(3):327-334.
- [4] Allan G M, Meehan B, Todd D, et al. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome [J]. Vet Rec, 1998, 142:467-468.
- [5] Allan G M, Mc Neilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pig with a wasting disease in the United States of American and Europe [J]. J Vet Diagn Invest, 1998, 10:3-10.
- [6] Kim J, Chae C. A comparison of virus isolation, polymerase chain-reaction, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs [J]. J Vet Diagn Invest, 2004, 16(1):45-50.
- [7] Pallares F J, Halbur P G, Opriessnig T, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2002, 14(6):515-519.
- [8] Ellis J L, Hansard E, Clark J, et al. Isolation of circoviruses from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. Can Vet J, 1998, 39:44-51.
- [9] Palinski R, Pineyro P, Shang P, et al. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure [J]. Virol, 2017, 91(1):1879-1891.
- [10] 湛 洋, 王东亮, 王乃东, 等. 猪圆环病毒 3 型检测及其 Cap 结构序列和抗原性预测分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(6):1076-1084.
- Zhan Y, Wang D L, Wang N D, et al. Survey on detection and analyses of cap antigenicity prediction of porcine circovirus type 3 isolated from partial provinces of southern China [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2017, 48(6):1076-1084.
- [11] 贺会利, 李 军, 潘 艳, 等. 广西首例猪圆环病毒 3 型的发现及其衣壳蛋白序列分析 [J]. 南方农业学报, 2017, 48(8):1499-1503.
- He H L, Li J, Pan Y, et al. The first report of porcine circovirus type 3 infection in Guangxi and sequence analysis of its capsid protein [J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(8):1499-1503.
- [12] 刘晓东, 杨旭兵, 郑庆礼, 等. 我国部分省(区)猪圆环病毒 3 型的分子流行病学研究 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(11):18-21.
- Liu X D, Yang X B, Zheng Q L, et al. Molecular epidemiology of porcine circovirus type 3 in some provinces of China [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(11):18-21.
- [13] 庞笑语, 王建昌, 韩庆安, 等. 河北省猪群中检出猪圆环病毒 3 型 [J]. 中国动物检疫, 2017, 34(11):70-73.
- Pang X Y, Wang J C, Han Q A, et al. Porcine circovirus type 3 was detected from swine herds in Hebei province [J]. Chinese Animal Quarantine, 2017, 34(11):70-73.
- [14] 朱小甫, 张 志, 李晓成, 等. 猪瘟病毒 RT-nested PCR 检测方法的优化和应用 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(6):11-14.
- Zhu X F, Zhang Z, Li X C, et al. Optimization and application of RT-nested PCR detection for classical swine fever virus [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2007, 35(6):11-14.
- [15] 朱小甫, 吴旭锦. 鉴别伪狂犬病毒 gE 基因缺失疫苗毒与野毒套式 PCR 方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2016, 24(4):26-30.
- Zhu X F, Wu X J. Developing complex nested PCR method for identification of pseudorabies virus gE gene deletion vaccine and field virus [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2016, 24(4):26-30.
- [16] 朱小甫, 吴旭锦. PRRSV 经典株和变异株 RT-nPCR 鉴别诊断方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(1):25-30.
- Zhu X F, Wu X J. Establishment of a RT-nPCR diagnostic method for PRRSV classical and variant strains [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2016, 44(1):25-30.
- [17] 董志强, 张 志, 李晓成, 等. 猪圆环病毒 PCR 检测方法的优化 [J]. 中国病毒学, 2006, 21(4):405-407.
- Dong Z Q, Zhang Z, Li X C, et al. Optimization of PCR for the detection of porcine circovirus 2 [J]. Virologica Sinica, 2006, 21(4):405-407.
- [18] 张 志, 李 岚, 王赛赛, 等. 猪流行性腹泻新毒株的分离鉴定和致病性研究 [J]. 中国兽医学报, 2012, 32(10):1423-1428.
- Zhang Z, Li L, Wang S S, et al. The identification and pathogenicity of porcine epidemic disease virus variant [J]. Chin J Vet Sci, 2012, 32(10):1423-1428.
- [19] Ku X, Chen F, Li P, et al. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China [J]. Transbound Emerg Dis, 2017, 64(3):703-708.
- [20] Phan T G, Giannitti F, Rossow S, et al. Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation [J]. Virol J, 2016, 13(1):184.
- [21] Kwon T, Yoo S J, Park C K, et al. Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations [J]. Vet Microbiol, 2017, 207(8):178-180.
- [22] Zheng S, Wu X, Zhang L, et al. The occurrence of porcine circovirus 3 without clinical infection signs in Shandong Province [J]. Transbound Emerg Dis, 2017, 64(5):1337-1341.
- [23] Wang J, Zhang Y, Wang J, et al. Development of a TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection of porcine circovirus 3 [J]. J Virol Methods, 2017, 248(10):177-180.
- [24] 张 志, 郝占武, 杨旭兵, 等. 猪圆环病毒 3 型半巢式 PCR 方法的建立和应用 [J]. 中国动物检疫, 2018, 35(1):81-84.
- Zhang Z, Hao Z W, Yang X B, et al. Establishment and application of half nested-PCR for porcine circovirus 3 [J]. Chinese Animal Quarantine, 2018, 35(1):81-84.
- [25] 徐朋丽, 张鸿鑫, 张 宇, 等. 猪圆环病毒 3 型 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(9):727-730.
- Xu P L, Zhang H X, Zhang Y, et al. Establishment and application of a PCR assay for detection of porcine circovirus type 3 [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(9):727-730.