

密级：

论文编号：

中国农业科学院 硕士学位论文

PCV2 和 PRRSV 混合感染对仔猪
致病性的评估

**The pathogenicity evaluation of PRRSV and PCV2
coinfection to piglets**

硕 士 研 究 生：温 永 俊

指 导 教 师：蔡雪辉 副研究员

申 请 学 位 类 别：农 学 硕 士

专 业：预 防 兽 医

研 究 方 向：动物病毒分子生物学

培 养 单 位：研 究 生 院

哈尔滨兽医研究所

提交日期 2006 年 5 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Master Dissertation

**The pathogenicity evaluation of PRRSV and PCV2
coinfection to piglets**

Ms. Candidate: Wen Yong-jun

Advisor: Cai Xue-hui

Major: Preventive Veterinary Medicine

Specialty : Molecular Biology of Animal

Viruses

Chinese Academy of Agricultural Sciences

May 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名:

时间: 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定,即:中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名:

时间: 年 月 日

导师签名:

时间: 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	PCV2 和 PRRSV 混合感染对仔猪致病性的评估				
论文作者	温永俊	指导教师	蔡雪辉副研究员	培养单位	哈兽研

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人	盲评				
	盲评				
	盲评				
答辩主席	魏萍	教授	博导	东北农业大学	预防兽医
答辩委员	魏萍	教授	博导	东北农业大学	预防兽医
	崔玉东	教授	博导	八一农垦大学	预防兽医
	仇华吉	研究员	博导	中国农业科学院	预防兽医
	冯力	副研究员	硕导	中国农业科学院	预防兽医
	乔传玲	副研究员	硕导	中国农业科学院	预防兽医
答辩时间、地点		2006 年 6 月 16 日 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所			
记 录		答辩会秘书：刘永刚			

摘 要

本研究从接种疑似 PMWS 仔猪病料的细胞中分离出一株 PCV2，经测序基因组全长为 1767bp。序列分析并与国内外毒株进行比对，发现与法国株 PCV2（GenBank: AF055394）同源性较高，可达 99.4%。并克隆该分离毒株的 *cap* 基因片段进行原核表达，获得融合蛋白 His-CAP520，试验表明该蛋白具有较好的抗原性，用该蛋白初步建立了检测 PCV2 抗体的间接 ELISA 方法。

通过 PCV2 和 PRRSV 强毒共感染 3 周龄健康仔猪来评价其致病性。试验动物随机分为 3 组，空白对照组（n=3 头），PRRSV 单独感染组（n=3 头），PCV2 和 PRRSV 共感染组（n=6 头）。通过临床症状、病理学变化、病原学和血清学检查，对混合感染仔猪的致病性进行了研究。

PCV2 和 PRRSV 混合感染组于攻毒后 7 天，开始出现呼吸困难、体温升高。PRRSV 单独组出现呼吸困难、中度嗜睡并在攻毒后 28 天恢复，空白对照组无异常。PCV2 和 PRRSV 组出现间质性肺炎，淋巴小结周围界限不清，脾脏滤泡发生崩解，细支气管周围有淋巴细胞增生灶，肝细胞胞浆糖原丢失且呈球样，组织病变与断奶后仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)相同。PRRSV 单独组出现中等程度的增生性间质性肺炎。混合感染组中 PCV2 抗体在攻毒后 7 天时开始上升，攻毒后 14 天时抗体水平达到最高，后逐渐下降；而 PRRSV 抗体消长规律与 PRRSV 单独组相同，在攻毒后 14 天时开始上升，攻毒后 21 天时达到顶峰，然后开始下降。两种病毒主要在肺脏、肝脏和脾脏中分布，在肾脏中也少量存在；混合感染组中 PRRSV 的分布较 PRRSV 单独感染组更为广泛。经 PCR 发现血清中病毒在攻毒后 4 天时检出，到试验结束时仍可检出，病毒血症的维持时间较长。

研究表明：PCV2 和 PRRSV 共同感染能引起 PMWS 的淋巴组织肿大、出血，肉芽肿性炎症，坏死性肝炎，仔猪消瘦、生长缓慢等特征性病变；混合感染能加重 PRRSV 对仔猪引起的间质性肺炎的严重程度。混合感染可以出现支气管肺炎和明显的肝病变，淋巴结多呈界限明显的块状出血,这是在混合感染组中出现的典型病变。

关键词 猪圆环病毒 II 型(PCV2)，猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)，混合感染，致病性，原核表达

Abstract

The entire genomes of one isolate of porcine circovirus type 2 (PCV2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) was cloned and sequenced. The result indicated that the PCV2 isolate complete genomes is 1767bp, and its sequence is closely identity with an France isolate (GenBank:AF055394), up to 99.4%.It was that cloned and expressed in a prokaryotic expression system to the fragment of *cap* gene of PCV2, and we got the fusion protein His-CAP520. The experiments showed that this fusion protein has good antigenicity,and the indirect ELISA method was established for detecting the bodies of PCV2 with this protein.

An attempt was made to value the coinfection effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2) to the three-week-old post-weaning piglets. Three groups were studied, including mock -infected (n=3), PRRSV alone-infected (n=3) , and PCV2 and PRRSV dually infected groups(n=6), to compare the different. We studied the pathogenicity of cochallenged with PRRSV and PCV2 through methods of clinical symptom , pathological changes , etiology and serology.

By 7days postinoculation(7dpi), PCV2 and PRRSV challenged pigs had severe dyspnea, fever. PRRSV-challenged pigs developed dyspnea and mild lethargy that resolved by 28dpi, and the control pigs were normal. In PCV2 and PRRSV group, we found mass of proliferative interstitial pneumonia, Lymph node and spleen follicle collapsed and faintness of boundary, endochylema saccharogen in liver cell was lost by pathological section. Microscopic lesions consistent with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). PRRSV-challenged pigs had moderate proliferative interstitial pneumonia, but did not develop bronchiolar or hepatic lesions or lymphoid hemorrhage. In coinfection group, both of the virus antigens were distributed predominantly in lymph nodes and lungs, followed by livers and spleens, seldom in kidneys, comparatively the distribution of PRRSV in cochallenged group is more extensive than PRRSV-alone group. In cochallenged group , the antibodies of PCV2 was appeared at 7dpi, and went to the highest level at 14dpi , and the PRRSV antibodies went up at 14dpi and went to the top at 21dpi. It is like the PRRSV-challenged pigs to the growth and decline pattern of PRRSV antibodies in coinfection group. Especially in toxemia period the virus antigens could be detected in th tissues easily. Both of virus were found at 4dpi in sera by PCR and RT-PCR, similar to the PRRSV-alone group, and maintained to the end of the experiment. That is to say the viremia is long lasting in the body of piglets.

The results indicate that PCV2 coinfection increases the severity of PRRSV-induced interstitial pneumonia in pigs and induces the lymphoid depletion,

granulomatous inflammation, and necrotizing hepatitis characteristic of PMWS. But cochallenge can result to bronchopneumonia and hepatitis obviously, and massive hemorrhage bounded. This clinical symptoms is classical pathological change in the cochallenge of PRRSV and PCV2 group.

Key word: PCV2, PRRSV, coinfection, pathogenicity, prokaryotic expression.

目 录

第一章 绪 论	1
1.1 病原简介	1
1.2 流行病学现状	3
1.3 临床表现及致病机理	4
1.4 诊断方法研究	6
1.5 防制研究	7
1.6 研究目的	7
1.7 研究内容	8
第二章 PCV2 病毒株的分离鉴定	9
2.1 材料与方法	9
2.1.1 材料	9
2.1.2 PCV2 型病毒检测引物和全基因引物设计及合成	9
2.1.3 病料PCV2 的检测	9
2.1.4 病毒的分离	10
2.1.5 间接荧光方法鉴定PCV2 分离株	10
2.1.6 分离毒株全基因组的克隆与序列分析	10
2.2 结果	10
2.2.1 病料组织的PCR检测和病毒分离	10
2.2.2 间接免疫荧光试验	12
2.2.3 PCV2 分离毒株全基因组的克隆和序列测定	12
2.2.5 分离毒株的同源性和进化	13
2.3 讨论	15
第三章 PCV2 的CAP部分基因原核表达及抗原性的研究	16
3.1 材料方法	16
3.1.1 质粒和菌株	16
3.1.2 PCV2 结构蛋白的分析	16
3.1.3 引物的设计与合成	16
3.1.4 cap部分基因的PCR扩增及克隆	17
3.1.5 重组质粒的构建	17
3.1.6 表达载体的鉴定	17
3.1.7 cap基因部分片段的诱导表达	17
3.1.8 重组蛋白的Western Blot分析	17
3.2 结果	18

3.2.1 片段的PCR扩增及克隆的鉴定	18
3.2.2 CAP蛋白功能区分析	19
3.2.3 重组原核表达载体的构建	19
3.2.4 SDS-PAGE检测重组蛋白	20
3.2.5 重组蛋白的Western Blot检测结果	21
3.3 讨论	22
第四章 PCV2 和PRRSV对仔猪混合感染试验	23
4.1 材料与方法	23
4.1.1 毒株和细胞	23
4.1.2 主要仪器	23
4.1.3 试剂及其他材料	23
4.1.4 试验设计	23
4.1.5 PCV2 病毒的增殖、DNA的提取及PCR检测	23
4.1.6 PRRSV病毒增殖及RT-PCR	24
4.1.7 组织病理学检查	25
4.1.8 间接免疫荧光试验	25
4.1.9 用ELISA方法分别检测血清中抗PCV2 和PRRSV抗体	25
4.2 结果	26
4.2.1 临床症状	26
4.2.2 肉眼病变	26
4.2.3 组织病理学变化	27
4.2.4 抗原的免疫荧光试验	27
4.2.5 PCV2 的PCR检测	27
4.2.6 PRRSV的RT-PCR检测	30
4.2.7 用ELISA检测PRRSV抗体	31
4.2.8 用ELISA检测PCV2 抗体	31
4.3 讨论	32
第五章 结 论	33
参考文献	34
附 录	38
致 谢	47
作者简介	48

英文缩略表

英文缩写	中文名称
PRRSV	猪繁殖呼吸综合征病毒
PCV2	猪圆环病毒Ⅱ型
PPV	猪细小病毒
PRV	猪伪狂犬病毒
LDV	乳酸脱氢酶增高症病毒
EAV	马动脉炎病毒
PK15	猪肾细胞
MARC-145	非洲绿猴肾细胞克隆株
PAMs	猪肺泡巨噬细胞
PIMs	肺血管内巨噬细胞
PRDC	猪呼吸道疾病综合征
PDNS	猪肾病皮炎综合征
ADE	抗体依赖性病毒增强作用
SPF	无特定病原体动物
IFA	间接免疫荧光试验
ISH	原位核酸杂交试验
IPMA	免疫过氧化物酶单层试验
Western Blot	免疫印迹法
DEPC	焦碳酸二乙酯

第一章 绪 论

1.1 病原简介

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome,PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)引起的,以母猪的繁殖障碍、仔猪的高死亡率及呼吸症状为特征的一种传染病。该病 1987 年在美国首先发生,随后在世界各主要养猪国家流行。我国 1996 年由郭宝清等首次报道该病,研究证明其为美洲型(郭宝清等, 1996)。PRRS 在我国大部分地区均有流行,造成巨大的经济损失(蔡雪辉等, 2000)。本病的主要临床症状为发病母猪出现发热、厌食、流产、弱产及木乃伊胎;种公猪出现性功能下降,精液质量和精子活力下降;仔猪和育肥猪表现呼吸系统疾病症状,呼吸困难、急促、呈间质性肺炎、耳部和肢体发绀。本病极易引起继发感染,从而加剧病情,使死亡率升高。如果猪是首次感染发生此病,可导致严重的经济损失。目前, PRRSV 感染已成为哺乳仔猪和育肥猪肺炎的主要病因之一。经常继发细菌或其它病毒感染,使临床症状变得更加复杂。PRRS 多呈地方流行。并且出现严重的生殖减退现象(赵得明等, 1999)。近年来我国分离的病毒株大多属于美洲亚群,但也发现欧洲亚群 PRRSV 的存在(姜平等, 1999)。1991 年,猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)在荷兰的莱利斯塔镇首次分离鉴定(Wensvoort et al., 1991)。PRRSV 和乳酸脱氢酶增高症病毒(Lactate Dehydrogenase-elevating Virus, LDV)、马动脉炎病毒(Equine Arteritis Virus, EAV)可能在核苷酸序列、基因结构、致病机制等方面都存在极大的相似性(Murtaugh et al., 1995)。因而推测 PRRSV, LDV, EAV 可能起源于同一病毒祖先。但目前还没有 LDV 在猪体内增殖或 PRRSV 在小鼠体内增殖的报道(Hooper et al., 1994)。PRRSV 美洲型分离株与 LDV 的核苷酸同源性高于 PRRSV 欧洲型分离株与 LDV 的同源性,说明 PRRSV 的美洲和欧洲亚群在未引起 PRRS 的临床症状之前,可能已经发生了各自的进化(Meng et al., 1995)。美洲流行 PRRS 不久,欧洲也开始流行。目前大多数学者推测 PRRSV 美洲分离株和欧洲分离株可能起源于同一病毒祖先,但属于两种不同的亚群,两个亚群分别以各自的方向进化。现在已证实美洲分离株和欧洲分离株在抗原性、基因结构、致病性方面存在较大的差异,因此已将其分为两个不同的亚群:欧洲亚群和美洲亚群(Ivelson et al., 1993)。最初依据其形态、理化特性等特点将 PRRSV 归入披膜病毒科,动脉炎病毒属。随着分子生物学的发展,研究发现动脉炎病毒与披膜病毒基因结构、蛋白合成等显著不同(Den Boon et al., 1991)。因此 1997 年将其列入动脉炎病毒科、动脉炎病毒属(Cavanaugh et al., 1997)。PRRSV 为一种有囊膜的单股正链 RNA 病毒。病毒粒子呈球形或卵圆形。直径约为 45~65nm,含有 20~35nm 的核衣壳,呈二十面体对称,外绕一层脂质双层膜,表面有小而不显著的纤突。在蔗糖中的浮密度为 1.14g/ml。在氯化铯梯度中浮密度为 1.19g/ml。

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)为无囊膜的单股环状负链DNA病毒,

病毒粒子直径约17~20nm, 是迄今发现的一种最小的动物病毒。PCV根据其抗原性及基因组成不同, 分为两种基因型或血清型, 即PCV1和PCV2。PCV1无致病性, 但广泛存在猪体内及猪源细胞系; PCV2具有致病性, 德国学者(Tischer等,1974)从多株连续传代的PK15细胞中检出一种形态学与小RNA病毒相似的小球形病毒, 该病毒可以持续感染PK15细胞, 不引起细胞病变。经进一步证实 (Tischer et al.,1982), PK15细胞中存在的这种病毒来源于当初制备PK15细胞的猪肾组织, 因该病毒的基因组由一个单股呈圆环状的DNA链组成, 故将其命名为猪圆环病毒。同属的病毒还包括鸚鵡喙羽病病毒、鸽圆环病毒 (Todd et al.,2001)、鹅的圆环病毒。PCV基因组是一条共价结合形成闭合环状的DNA单链, DNA长约为1760bp, 分子量为580Ku。病毒衣壳蛋白为一条多肽链, 分子量为360Ku。沉降系数为52S, 浮密度为137g/cm³ (Tischer et al.,1982)。该病毒无囊膜, 对外界环境的抵抗力较强, 在酸性环境及氯仿中可以存活很长时间, 即使在高温环境 (72℃) 也能存活一段时间。PCV不具有血凝活性, 不能凝集牛、羊、猪、鸡等多种动物和人的红细胞 (Allan et al.,1994)。

PCV2感染不同年龄的猪可表现出不同的临床症状。PCV基因组为单股环状负链DNA, 基因组非常小, PCV1基因组全长仅为1759bp, PCV2为1767bp或1768bp。同一血清型 (基因型) 内部各毒株核苷酸序列非常保守, 同源性均在90%以上, 而2种血清型毒株之间的序列相似性低于80% (Fenaux et al.,2000; Meehan et al.,1998)。应用软件 (Hamel et al.,1998) 对PCV两种血清型的基因组进行了分析, 发现2种PCV基因组均可能含11个开放阅读框 (open read frame, ORF) (见表1), 即ORF1~ORF11, ORFs之间大小差异悬殊。大部分阅读框都有部分重叠, 从而可以充分利用圆环病毒有限的遗传物质, 这可能是生物进化过程中自然选择的结果。PCV1与PCV2的ORF1、2、3、4、7、8具有一定的同源性, 而其余ORF无任何同源性。ORF1、2为最大的2个开放阅读框。ORF1在病毒基因组中是正链, 以顺时针方向排列; ORF2在病毒基因组中是负链, 以逆时针方向排列。两种PCV相比较, ORF1核苷酸序列同源性最高, 达85%; ORF2差异则很明显, 核苷酸序列同源性仅为66%。PCV两种血清型的基因组中含有几乎一致的病毒DNA复制起点。Mankertz等已将PCV1复制起点定位于一个长约111bp (nt728~838) 的基因片段中, 该片段介于ORF1与ORF2两阅读框之间 (Mankertz et al.,1997)。该区域具有多个特征性结构, 包括圆环病毒特有的茎环结构 (stem-loop) 及其顶部保守的九核苷酸基序 (nonanucleotide motif)、位于茎环结构下游的4个六聚体重复 (5'-CGGCAG-3') (H1、H2、H3、H4), 其中H1与H2, H3与H4相邻, 而H2与H3之间有5bp的间隔。PCV1与PCV2的九核苷酸基序略有差异, PCV1为TAGTATTAC, 而PCV2为AAGTATTAC, 仅第一个T变成了A (Todd et al.,2001)。这个九核苷酸基序对于病毒DNA的复制非常关键, 它在所有具有环状单链DNA基因组的动物圆环病毒、植物Geminiviruses和Nanoviruses、细菌复制子如 ϕ X174及质粒pC194中均高度保守 (Mankertz A et al.,2002), DNA的滚环复制 (rolling-circle replication, RCR) 从这里起始, 如发生突变将严重影响病毒的繁殖复制 (Meehan et al.,1997)。

PCV2虽能单独引发PMWS，但很难复制出呈现典型临床症状的PMWS。一些研究表明PRRSV、PPV或PCV2独自不能诱发PMWS，但这些病毒与PCV2联合感染能够加重感染猪的PMWS临床症状和病理损伤。目前认为，PCV2常常和细小病毒（PPV）、PRRSV、伪狂犬病毒（PRV）混合感染而导致猪的免疫抵抗力降低。PCV2是原发病原，但是许多刺激因子在PMWS致病机制中具有重要性。

PRRSV 和 PCV2 广泛分布于世界各地，它们主要侵害猪体的免疫系统，干扰猪体内防御系统的巨噬细胞，使猪对多种病原易感性增强。目前规模化猪场内 PRRSV 和 PCV2 混和感染十分严重。

1.2 流行病学现状

PRRSV 和 PCV2 的混合感染是目前造成养猪业严重损失的重要因素，国内外学者在这个方面进行了大量的研究。安徽某养猪场断乳仔猪发生的一种以渐进性消瘦、呼吸困难、咳喘、昏睡、死亡率增高为特征的疾病进行检测。根据发病情况、临床观察、剖检变化及试验室检验确诊为 PCV2 和 PRRSV 并发感染后继发多种细菌混合感染(周俐兵等，2002)。上海地区 6 个规模化猪场检测，剖检的 18 头发病仔猪都表现肺脏严重病变和淋巴结肿大、出血，并且采用 RT-PCR 和 PCR 方法从患病猪肺脏组织均扩增出 PRRSV 和 PCV2 的特异性基因片段。结合临床症状和流行病学调查，证实上海地区出现了 PRRSV 和 PCV2 的混合感染（李玉峰等，2003）。通过 PCR 方法检测上海、浙江、山东等地 38 份患有呼吸道疾病的组织病料，其中 PCV2 与 PRRSV 皆为阳性的比例高达 47.4%（芦银华等，2003）。南宁市郊县某养猪场送检的病猪进行检查也发现，猪只发生 PCV2 和 PRRSV 的混合感染(蒋小红等，2002)。全国 48 个发生猪呼吸道综合征（PRDC）的猪场多病原混合感染情况用 PCR 和 RT-PCR 方法检测，发现 PCV2 感染占 33.3%，PRRSV 和 PCV2 混合感染占 27.1%(卫秀余等,2004)。

Kwang Soo 等用 PCR 方法对韩国全国的猪场连续 3 年普查发现，PRRSV 和 PCV2 的混感严重，呈逐年上升趋势（Kwang et al.,2001）。Pallares 等对 2000 年 1 月至 2001 年 9 月期间送检的 4688 份样品作了 PCV2 免疫组化检测，从淋巴结和肺脏中检出 PCV2 抗原，以淋巴组织肿大、出血等作为判定发生 PMWS 的标准。大多数的 PMWS(79.2%)发生在 8~18 周龄，10 周龄为高峰期。检测样品中 1751 份样品(37.3%)为 PCV2 阳性，有 484 份样品(10.3%)满足 PMWS 诊断标准。在所有 PCV2 抗原阳性的猪中，484 份(27.6%)证实有 PMWS 的淋巴组织病变特征。由不同病原体与 PCV2 共同感染引起的 PMWS 中，经血清学分析病例数如下:PRRSV 为 51.9%，猪肺炎支原体为 35.5%，细菌性败血症为 14%，细菌性肺炎为 7.6%，猪流感病毒为 5.4%，仅由 PCV2 单独引起的只有 1.9%。细菌性败血症中分离到最多的病原体是猪链球菌。细菌性肺炎病例中以多杀性巴氏杆菌为主（Pallares et al.,2002）。

荷兰学者对 20 个呈 PMWS 临床症状猪场的 60 头和没有 PMWS 临床症状的 180

头对照猪进行检测,发现 PCV2 与 PRRSV 的混合感染率很高。利用 PCR 方法或病毒分离技术对有 PMWS 临床症状的猪进行检测,PCV2 检出率为 100%;对无 PMWS 的猪群检测,PCV2 检出率为 50%。研究结果表明,病猪消耗性临床症状的严重程度与体内病毒载量的水平呈正相关。目前在有 PMWS 临床症状的猪群中 PCV2 与 PRRSV 的混合感染发生率至少为 83%,在无 PMWS 临床症状的猪群中 PCV2 与 PRRSV 的混合感染发生率为 35%(Wellenberg et al.,2004)。

为了调查澳大利亚猪群中是否存在 PCV1 或 PCV2,进而对检测到的病毒进行基因特性分析,从而澄清为何某些国家猪群中猪圆环病毒与 PMWS 有关,而在某些国家如澳大利亚却无关,究竟是何原因目前尚不清楚。在澳大利亚西部随机抽检的 14 个猪场的血清样品;同时对一个猪场 2~12 周龄的猪每两周收集一次血清样品,来观察感染流行在日龄上的差异。用间接免疫荧光法检测血清,用套式 PCR 法检测病原,结果发现澳洲西部大约 30%猪只 PCV2 抗体阳性;在澳洲同时存在 PCV1 和 PCV2,澳洲西部、南部和新南威尔士检测到 PCV1DNA,澳洲南部、新南威尔士和昆士兰州检测到 PCV2DNA,经序列分析发现这些毒株与当前发生 PMWS 国家的毒株非常相似。但是澳大利亚没有发生 PCV2 相关的 PMWS,推测可能是在澳洲不存在能诱发 PCV2 产生 PMWS 的关键性因素 (Raye et al.,2005)。

通过上述流行病学调查显示,随着国内外 PCV2 与 PRRSV 的混合感染相关报道逐渐增多,说明猪群中发生混合感染已经十分普遍,世界养猪业又一次受到了严重的威胁。对此研究者也建立了一系列诊断和监测的方法,但确切的感染机理尚不是很明确,在混合感染发生、发展的机理和免疫预防等各方面都需要进行深入研究。

1.3 临床表现及致病机理

PCV2 和 PRRSV 共同感染猪只表现被毛粗乱、消瘦、皮肤苍白、腹泻、呼吸困难、昏迷,偶尔出现黄疸,死亡率较高。剖检发现腹股沟淋巴结和肠系膜淋巴结肿大 2~3 倍,切面多汁;整个肺颜色变浅,有点状出血,有些地方出现肉变或胰变,按压无弹性;肾脏质地变脆,表面有针尖大小出血点,甚至块状出血斑;脾脏表面有少数出血点,边缘有少量梗死灶;严重的出现增生性间质性肺炎和特别明显的肝病变。

Allan 等在 2000~2003 年分别利用剖腹产不吃初乳 (cesarean-deprived colostrums-deprived,CD) 、不吃初乳 (colostrums-deprived,CD) 和无特定病原 (SPF) 猪复制了 PCV2 与 PRRSV 的混合感染的模型,通过病理学、免疫荧光、病毒分离检测等手段证实混合感染比二者任何一种单独感染都严重 (Allan et al.,2000)。Harms 等用 3 周龄 CD 猪分别感染 PRRSV 和 PCV2 以及共同感染以上两种病毒,比较病毒单独作用或联合作用的效果,并于接种后不同日龄及猪濒死时剖检。在接种后第 10 天,PCV2 和 PRRSV 混合感染组出现严重的呼吸困难、昏迷,偶尔出现黄疸,接种 10 天后 91%死亡,20 天后全部死亡。PCV2 单独感染组出现

昏迷，散发性黄疸，42%出现渗出性皮炎，死亡率为26%。PRRSV单纯感染猪出现呼吸困难和昏迷，至28天时恢复，PCV2组和PCV2和PRRSV混合感染组都出现了与PMWS相同的组织病变。混合感染组也出现了严重的增生性间质性肺炎和特别相似的肝病变，损伤严重的绝大多数组织细胞中含有PCV2抗原。PRRSV感染猪出现中等程度的增生性间质性肺炎，但未出现支气管炎或肝病变以及淋巴组织萎缩。研究表明PCV2混合感染能加重PRRSV对CDL猪引起的间质性肺炎的损伤程度；是PCV2而不是PRRSV引起发生PMWS的猪淋巴组织萎缩，肉芽肿性炎症，坏死性肝炎等特征病变。PCV2和PRRSV混合感染的组织病理学特点主要是增生性坏死性肺炎（Harms et al.,2001）。Choi等对5只自然发生猪肾性皮炎综合征（Porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS）病猪的皮肤和肾，用双标记免疫组化和原位杂交技术检测到了PRRSV和PCV2。其中3只猪的同一皮肤坏死灶和肾分离到了PRRSV和PCV2，并且对5只病猪用RT-PCR/PCR方法进行检测，在病猪的皮肤、肾、淋巴结和扁桃体都检测到了PRRSV；在肾、淋巴结、扁桃体、肝脏和肺脏均检出PCV2。用双标记免疫组化和原位杂交检测时，在肾、淋巴结和扁桃体上着色很深，同时它们在皮肤也检到了PRRSV和PCV2。这是从形态学的角度首次确认，在发生PDNS猪只的同一器官中同时检出PRRSV和PCV2的病原。PCV2感染猪的免疫系统受损，免疫力下降，其它病原微生物继发感染或混合感染都可加重PCV2感染猪的病情，表现为明显的PCV2感染临床症状（Choi et al.,2001）。Pesch等用细菌检测和PCR方法对102个猪场中的171个PCV2疑似病例进行了病原检测，检测的病原有PCV2、欧洲型PRRSV野毒、细小病毒（PPV）、衣原体、猪流感（SIV）、肺炎支原体（M.hyo）和胸膜肺炎放线杆菌（APP）等，大约有60%样品呈现PCV2和PRRSV欧洲型血清学阳性。由此证实在调查的猪场中PMWS和间质性肺炎是由混合感染引起的；约有30%的病例中发现猪肾性皮炎综合征（PDNS）是由PCV2和PPV混合感染引起的；大约11%的PMWS的病例与PPV有关。在间质性肺炎中除了PRRSV野毒作为主要病原之外，SIV、APP和M.hyo作为继发病原体也可被检测到（Pesch et al.,2003）。PCV2和上述病原混合感染，引起的间质性肺炎比PCV2单独感染所引起的病理损伤和临床症状更为严重。研究者发现要产生PMWS的临床症状和病理变化，PCV2需与其它病原体继发感染或混合感染，这是很重要的因素。比如PCV2与呼吸道病原体混感可以引起间质性肺炎，与PPV混感可以引起PDNS和PMWS，与猪衣原体混感可以引起PMWS。因此，PCV2被作为PMWS相关疾病的主要诱因，而PRRSV和其它附加或继发的病原体则起到推波助澜的作用。PMWS大多数病例发生在10周龄左右，如果PCV2与其它病原混合感染，PCV2潜在的致病能力就会起作用。Ana等用普通发生PMWS猪，对其发病过程淋巴组织中细胞凋亡进行了评估。将21头猪按照损伤的严重程度分为三组：轻度、中度和重度（S1,n=5;S2,n=7;S3,n=9），同时设5头健康猪作为对照组。收集所有试验猪的胸腺、脾脏、扁桃体、回肠和体表淋巴结进行病理切片、原位杂交和免疫组织化学来检测细胞凋亡。用实时PCR对PCV2病毒载量进行定量；免疫组化对淋巴组织损伤进行量化的估测，评价每个组织间和损伤阶段的不同，以及凋亡、损伤阶段与病毒

载量间的关系。结果表明：总体上淋巴组织损伤越严重，细胞凋亡率越低。在胸腺皮质区，患有PMWS的猪与健康猪的区别比较明显；所有患病猪的细胞凋亡率明显低于正常对照组。在外周淋巴器官B细胞区呈现很高的细胞凋亡率；而且轻度损伤组（S1）细胞凋亡率也很高。在中度损伤和重度损伤组（S2,S3），B细胞区已经消失，且观察到大部分区域的细胞凋亡程度较低。在轻度损伤组（S1）和有PMWS症状组的胸腺、脾脏、体表淋巴结和Peyer's结（扁桃体除外）中的细胞凋亡率较低。淋巴组织细胞的凋亡率与血液中的病毒载量和损伤程度成反比，在PMWS相关的淋巴损伤发展过程中细胞凋亡是不容忽视的。Chang等，研究PCV2和PRRSV对单层猪肺巨噬细胞（Porcine alveola macrophages, PAMs）的作用，检测细胞感染病毒数、病毒抗原分布、 α 干扰素（IFN- α ）、 α 肿瘤坏死因子（TNF- α ）以及细胞病理作用。试验分为4组：对照组，PCV2组（PCV2-A），PRRSV组（PRRSV-A），和PCV2和PRRSV混合感染组（PCV2和PRRSV）。PCV2-A组抗原量很高但没有细胞死亡，PRRSV-A组有明显的细胞死亡；但是在混合感染组中PRRSV产生的细胞感染率、死亡率都很低。PCV2组IFN- α 量很高，这在对照组和PRRSV组是没有出现的。PRRSV在MARC-145和PAMs上引起的细胞病变效应，可以明显地被PCV2感染的猪肺巨噬细胞上清液所降低，上清液可以是经过紫外线照射也可以是未经照射的。但是如果用IFN- α 的结合抗体处理感染PCV2的PAMs的上清液以后，对PRRSV引起的细胞病变效应的抑制作用明显降低。这些结果表明PAMs是PCV2的一个储存库；PCV2感染的PAMs可以减低PCV2和PRRSV混合感染组中PRRSV对PAMs的感染程度和PRRSV引起的细胞病变效应。这种效应是PAM感染PCV2后产生的IFN- α 所引起的。这种与PRRSV对猪肺巨噬细胞相关的细胞病变效应的降低和超量产生细胞因子有可能是造成混合感染猪肺脏严重的病理损伤原因(Chang et al.,2005)。

基于上述研究现状，PRRSV和PCV2混合感染能够复制出PMWS的病理模型；在发生PDNS的病变部位也分离到了病毒，但是确切的发病机理仍不清楚。究竟在猪只感染了病毒以后，病毒在猪体内是如何影响免疫系统的正常功能有待于深入研究。

1.4 诊断方法研究

对于混合感染疾病的诊断，首先要将流行病学、临床症状、病理变化以及实验室诊断相结合，这样才能较为客观、准确的诊断疾病。单凭一些临床症状很难判断，同时必须借助一些实验室诊断方法如：PCR/RT-PCR、IFA、原位核酸杂交试验(ISH)、电子显微镜观察、ELISA试验、免疫过氧化物单层培养法(IPMA)、免疫组化及病毒分离等。上述几种方法检测病毒方面各有侧重：ISH不易于区分PCV1和PCV2，具有整体特异性，主要用于检测某些病变病料及其病理分析；在区分PCV1和PCV2方面免疫组化有一定的优点，可以用特异性的单抗来实现病毒的区分；IFA主要用于细胞培养物中PCV的检测；PCR/RT-PCR技术可对病猪的组织、某些分泌物进行基因特异性扩增，再根据扩增产物的限制酶切图谱和特异性片段

大小，来判断是否感染。ELISA 则可用于检测血清中的病毒抗体。因此，我们应根据需要进行有选择性的操作，以达到其最佳效果。另外，我们也可以通过一些特征性的病理变化：病猪出现广泛性的病理损伤，特别是免疫系统和呼吸系统的一些器官，如淋巴结、脾脏，肺等病理变化也非常具有诊断意义。

Chung 等，已经建立了 PRRSV 和 PCV2 的实时荧光 PCR 方法，并分别对自然感染、攻毒猪的脏器进行了检测。该方法的建立对混合感染的研究无疑是十分有用的工具，它可以对感染病猪体内的病毒数精确到个位数，同时还可以动态的监测病原的产生、持续以及消失的时间（Chung et al., 2005）。

1.5 防制研究

由于 PRRS 与 PCV 混合感染发病机制尚不明确，两种病毒在国内外的混合感染现状又如此严重，目前尚未找到预防两种疫病感染的有效方法。所以应采取的措施是加强饲养管理，如推迟断奶时间、定期消毒，以及严格预防引起猪只混感的几种病原，如 PCV2、PRRSV 和 PPV 等。降低饲养密度，坚持全进全出制，减少应激因素的发生。没有发生疾病的养殖场应坚持自繁自养制度，引进种猪应慎重，从无此类疾病的养殖场引种。若发生了混合感染疾病，应考虑使用抗生素控制继发感染，对症治疗，以降低死亡率。此外，现地应建立并使用一种快速、灵敏、特异、简便的检测方法，对检出的患猪淘汰、捕杀，根除该类病原微生物，从而尽量降低 PMWS 对养猪业造成的损失。Potter 采用血清疗法预防和治疗此类疾病，采用来自痊愈期和健康肉猪或母猪血清，经 56℃ 热处理 1h，加入抗生素，于仔猪断奶前腹腔注射 5~10ml，可降低死亡率和减轻症状（Potter et al., 2002）。在管理相对较差的猪场，血清疗法在防治 PMWS 中起重要作用。但应注意实行此法的猪只，仅能用本场猪提供的血清。目前在德国、法国等一些养猪业较为发达的国家已经有商品化的 PCV2 灭活疫苗投入使用，但在我国对该病致病机理的研究还不是很明确，还没有正式的疫苗出现；针对 PRRS 国内外已经做了许多的研究和预防工作，国外已经有商品化的灭活和弱毒疫苗。我国由哈尔滨兽医研究所研制的 PRRS 灭活苗，已经通过有关部门的各项审核进入商品化阶段。但是面临现地如此严重的混感疫情，如何利用有效的疫苗进行免疫，这无疑又是有待于解决的一个难题。

1.6 研究目的

作为目前制约全世界养猪业健康发展的一个重要因素，PMWS、PRRS 等疾病引起了诸多研究者的高度重视。PCV2 至少从 1969 年以来就已存在，并且还很可能更早，因此它并不是一种新病毒。为什么它在以前那么长时间内不引人注目，而近 5 年左右的时间 PCV2 引起的疾病从散发变为流行，究其原因何在？目前大多数国家的猪都是 PCV2 血清阳性，而且混合感染又如此严重，但为什么有的国家

发生了严重的 PMWS 而有些国家却没有发生？PMWS 已见于大多数养猪国并成为一种非常麻烦的疾病，在衣阿华州大学兽医诊断试验室，已从大多 PMWS 病例猪组织中检测到 PRRSV 和 PCV2 抗原或其基因。由于 PCV2 和 PRRSV 混合感染已被证实与非典型 PRRS 和 PMWS 病例的肝炎有关，且上已述及目前我国猪场内存在较高的混合感染现状。然而 PCV2 在造成 PMWS 的过程中扮演了什么样的角色；PCV2 与 PRRSV、SIV 等病原体混合感染的关系以及不同的感染顺序在实地情况中的作用机理；感染 PCV2 是否会受到可能具有触发作用的因素影响，这都需要更深入的研究。最可能的情况是：诸如 PRRSV、PPV 或者免疫佐剂等，一些传染性或非传染性的触发因素在发生 PMWS 的地方使得猪只的免疫系统受到了影响，这个因素到底是什么？它们之间的关系又如何？本研究的目的是对用 PCV2 和 PRRSV 混合感染正常仔猪，通过观察临床症状、肉眼和组织病变、病毒抗原分布以及血清学反应等各项指标来对仔猪的致病性进行评估，从而进一步为现地的临床症断与防控此类疫病提供切实可靠的依据。另外鉴于 PCV2 增殖时没有细胞病变，且成本太高等诸多不利因素，依据 CAP 蛋白在宿主免疫反应中的作用，用原核表达系统对 PCV2 的 *cap* 基因部分片段进行了融合表达。希望获得具有抗原性的特异性蛋白，这样可以制备原核表达抗原，为进行现地的血清学监测提供技术支持。从而为疫苗开发和疫病防控奠定基础。

1.7 研究内容

本试验从现地疑似病料中分离到 PCV2 一株，经 PCR、间接免疫荧光法、病毒基因组的测序和标准毒株的比对确定。然后对其部分 *cap* 基因进行了原核表达，以期得到具有良好抗原性的抗原用于血清学的检测。同时我们用该毒株与本实验室 PRRSV 的 CH-1a 株病毒混合攻击 20 日龄健康仔猪，从而对二者混合感染对仔猪造成的病理损伤进行评估，为现地猪场实际诊断提供可靠的试验数据和判定标准。

第二章 PCV2 病毒株的分离鉴定

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

病料来源于辽宁省某猪场 40d 断奶仔猪以的腹股沟淋巴结，病猪呈现腹股沟淋巴结水肿、出血，肺部水肿、肉样变等病变特征。pMD-18T 载体购自大连宝生物公司，DH5a 由本研究室保存。MEM 培养基购自 GIBCO 公司，胎牛血清购至上海奉贤血清厂。D-氨基葡萄糖购自 OMIGA 公司。Proteinase K 购自德国 MERCK 公司。胰蛋白酶(1:250)、UNIQ25 柱离心式胶回收试剂盒、Taqplus DNA Polymerase 及 dNTP Mix 等分别购自上海生工生物工程技术有限公司。25cm² 和 75cm² 细胞培养瓶购自比利时 ORANGE SCIENTIFIC 公司。

2.1.2 PCV2 型病毒检测引物和全基因引物设计及合成

根据已发表的 PCV2 序列 (GenBank No. AF027217) 设计引物。
PCV2 型特异性检测引物:

PPU-125: 5'-ATGGA TCCTT CAACA CCCG-3'

PPL-645: 5'-TACAC GGATC TCGAG TTCCT GGTCG-3'

可扩增 CAP 蛋白 125~645 之间长为 520bp 的核苷酸片段。

全基因组扩增引物:

PP2-QU 5' -GAATT CAACC TTAAC CTTTC TTATT- 3' 25bp

PP2-QL 5' -TGAAT TCTGG CCCTG CTCCC CGATC -3' 25bp

可扩增全长为 1768bp PCV2 基因组,引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

2.1.3 病料 PCV2 的检测

称取 10g 病料，加入 500 μ l 组织裂解缓冲液(200mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L EDTA, 10% SDS, pH 8.0)进行匀浆，倒入一离心管中，3000g 离心 10min；取上清加入 50 μ l 蛋白酶 K(20mg 蛋白酶 K 用 1mL TE 缓冲液溶解)，50 $^{\circ}$ C 裂解 3h；加入等体积的酚：氯仿，12000g 离心 10min；取上清加入两倍体积的无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 沉淀 40min；12000g 离心 10min，然后加入 1mL 70% 乙醇洗涤 1 次，12000g 离心 5min，弃上清，沉淀于室温干燥，加入适量的 TE 溶解沉淀。PCR 反应体系：组织总 DNA 3 μ l 为模板，加入 10 $\times$ PCR buffer (Mg²⁺ Free) 5 μ l、PPU-125 (12 μ mol/L) 1 μ l、PPL-645 (12 μ mol/L) 1 μ l、dNTP Mix (10mmol/L) 1 μ l、25mmol/L MgCl₂ 4 μ l、Taq 酶 0.5 μ l 和灭菌 ddH₂O 4.5 μ l。反应条件：94 $^{\circ}$ C 2min；94 $^{\circ}$ C 45s，51 $^{\circ}$ C 45s，72 $^{\circ}$ C 45s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2.1.4 病毒的分离

称取PCV2 检测为阳性的病料 2g , 加入MEM 生长液 10mL 进行研磨匀浆, 反复冻融 3 次后,经 0.22 μ m 的细菌滤器过滤除菌。将PK15 细胞悬液 27mL 与病毒滤液 3mL 混合后,加入一细胞培养瓶(75cm²) ,于 5 %CO₂ 和 37℃ 条件下培养 48h。弃去生长液,用 300mmol/L 的D-氨基葡萄糖于 37℃ 处理 20min。倾去D-氨基葡萄糖,用MEM 洗两次后,加入 30mL 生长液继续培养 48~72h。细胞反复冻融 3 次,收获病毒。抽取细胞的总DNA ,PCR检测病毒的分离及适应情况。

2.1.5 间接荧光方法鉴定 PCV2 分离株

将生长状态良好的 PK15 细胞在 24 孔培养板上传代,同时接入 1% 的病毒液,静置培养 60h 后,弃掉营养液。用 75% 预冷的乙醇在 4℃ 作用 3~5min。把 1:40 稀释好的阳性血清每孔 50 μ l。置于 37℃ 培育 45min,洗涤 3 次。加荧光二抗,37℃ 培育 45min,洗涤 3 次。最后加缓冲甘油(加入少量,然后吸出,尽量吸干净)。于荧光显微镜下观察。

2.1.6 分离毒株全基因组的克隆与序列分析

各自以 PCV2 检测阳性的病料组织和细胞抽提获得的 DNA 3 μ l 为模板,加入 PCV2 全基因组扩增引物 PP2-QU 和 PP2-QL ,按前述方法 2 构成 PCR 反应体系。反应体系: 94℃ 1min ;94℃ 45s , 49℃ 45s , 72℃ 2min ,35 个循环; 72℃ 10min。用 1 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。切胶回收目的条带,用 UNIQ25 柱进行 PCR 产物回收。纯化的 PCR 产物与 pMD-18T 载体连接,转化 DH5a。重组质粒经 PCR 和酶切鉴定阳性后,测定核苷酸序列。应用 DNASTar 软件进行序列分析。

2.2 结果

2.2.1 病料组织的 PCR 检测和病毒分离

从疑似病料中提取 DNA 模板,经 PCR 扩增和 1% 琼脂糖凝胶电泳后,均可观察到约为 520bp 的特异性核苷酸条带,与预期相符。将 PCV2 检测阳性的组织匀浆接种 PK15 细胞后进行连续传代。结果显示,接种后 1~3 代的细胞不能用 PCV2 型特异性引物扩增到 PCV2 特异性 520bp 核苷酸片段;从第 4 代开始,用 PCV2 型特异性引物可稳定的从接种细胞中扩增获得 PCV2 特异性 520bp 片段。(见图 1)

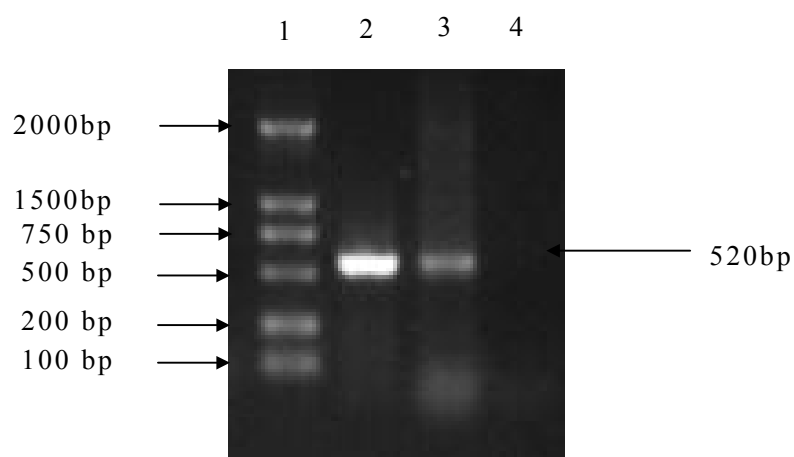


图1 PCV2的PCR鉴定

Fig.1 Identification of PCV2 by PCR

1. 分子量标准DL2000
2. 阳性质粒PCR对照
3. 样品PCR扩增产物
4. 水对照

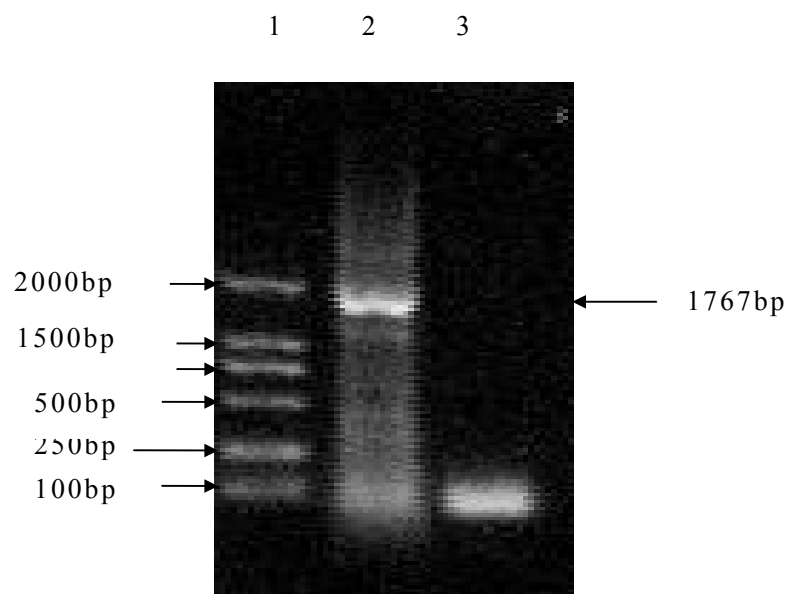


图2 PCR扩增PCV2的全基因组

Fig.2 Amplification gene of PCV2 by PCR

1. 分子量标准DL2000
2. 样品PCR扩增产物
3. 水对照

2.2.2 间接免疫荧光试验

用间接免疫荧光的试验方法，能够较为灵敏的鉴定出PK15细胞中增殖的PCV2病毒。在荧光显微镜下可以看到有大量的细胞感染了PCV2病毒。未接毒的阴性对照未见有特异性荧光。见图3。

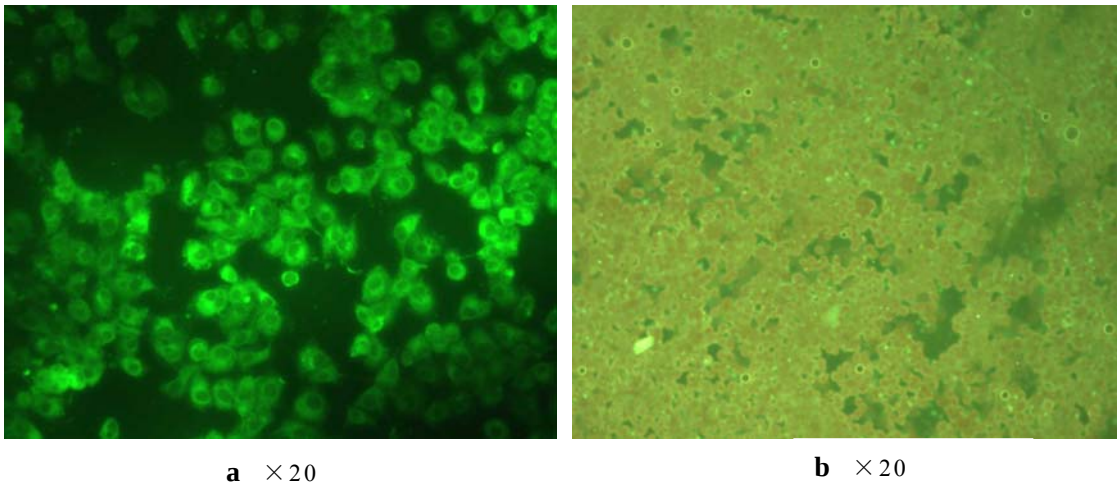


图 3：间接免疫荧光方法检测 PK15 细胞上增殖的 PCV2

Fig. Identification of PCV2 on PK15 cell by IFA

- a.接种盘锦株 PCV2 的 PK15 细胞
- b.未接种 PCV2 的 PK15 细胞

2.2.3 PCV2 分离毒株全基因组的克隆和序列测定

应用扩增 PCV2 全基因组的 PCR 引物,分别从病料组织和细胞适应毒中,扩增到 PCV2 毒株 1768bp 的核苷酸片段,与预期大小相符。纯化的 PCR 产物经克隆、鉴定和核苷酸序列测定后，发现 PCV2 分离毒株的全基因组由 1767bp 组成。（见图 2）

1	AATTCAACCTTAACCTTTCTTATTCTGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGCGGGGTTTGAG	60
61	CCCCCTCCTGGGGGAAGAAAGTCATTAATATTGAATCTCATCATGTCCACCGCCAGGAG	120
121	GGCGTTTTGACTGTGGTTCGCTTGAYAGTATATCCGAAGGTGCGGGAGAGGCGGGTGTG	180
181	AAGATGCCATTTTTCTTCTCCAGCGGTAACGGTGGCGGGGGTGGACGAGCCAGGGGCGG	240
241	CGGCGGAGGATCTGGCCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTC	300
301	CTTGATACGTCATATCTGAAAACGAAAGAAGTGCGCTGTAAGTATTACCAGCGCACTTC	360
361	GGCAGCGGCAGCACCTCGGCAGCACCTCAGCAGCAACATGCCAGCAAGAAGAATGGAAG	420
421	AAGCGGACCCCAACCCCATAAAAGGTGGGTGTTCACTCTGAATAATCCTTCCGAAGACGA	480
481	GCGCAAGAAAATACGGGATCTTCCAATATCCCTATTTGATTATTTTATTGTTGGCGAGGA	540
541	GGGTAATGAGGAAGGACGAACACCTCACCTCCAGGGGTTGCTAATTTTGTGAAGAAGCA	600

601	GACTTTTAATAAAGTGAAGTGGTATTTGGGTGCCGCTGCCACATCGAGAAAGCGAAAGG	660
661	AACAGATCAGCAGAATAAAGAATACTGCAGTAAAGAAGGCAACTTACTGATGGAGTGTGG	720
721	AGCTCCTAGATCTCAGGGACAACGGAGTGACCTGTCTACTGCTGTGAGTACCTTGTGGA	780
781	GAGCGGGAGTCTGGTGACCGTTGCAGAGCAGCACCTGTAACGTTTGTGAGAAATTTCCG	840
841	CGGGCTGGCTGAACTTTTAAAAGTGAGCGGGAAAATGCAGAAGCGTGATTGGAAGACTAA	900
901	TGTACACGTCATTGTGGGGGCCACCTGGGTGTGGTAAAAGCAAATGGGCTGCTAATTTTG	960
961	CAGACCCGGAACCACATACTGGAAACCACCTAGAAACAAGTGGTGGGATGGTTACCATG	1020
1021	GTGAAGAAGTGGTTGTTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGCCCTGGGATGATCTACTGA	1080
1081	GACTGTGTGATCGATATCCATTGACTGTAGAGACTAAAGGTGGAAGTGTACCTTTTTTG	1140
1141	CCCGCAGTATTCTGATTACCAGCAATCAGACCCCGTTGGAATGGTACTCCTCAACTGCTG	1200
1201	TCCCAGCTGTAGAAGCTCTTTATCGGAGGATTACTTCCTTGGTATTTTGAAGAATGCTA	1260
1261	CAGAACAATCCACGGAGGAAGGGGGCCTGTTTCGTACCCTTTCCCCCCCATGCCCTGAAT	1320
1321	TTCCATATGAAATAAATTACTGAGTCTTTTTTATCACTTCGTAATGGTTTTTATTATTCA	1380
1381	TTAAGGGTTAAGTGGGGGGTCTTTAAGATTAAATTCTCTGAATTGTACATACATGGTTAC	1440
1441	ACGGATATTGTATTCTTGGTCGTATATACTGTTTTCGAACGCAGTGCCGAGGCCTACGTG	1500
1501	GTCTACATTTCCAGCAGTTTGTAGTCTCAGCCACAGCTGATTTCTTTTGTGTTTGGTTG	1560
1561	GAAGTAATCAATAGTGAATCTAGGACAGTTTGGGGGTAAAGTAGCGGGAGTGGTAGGA	1620
1621	GAAGGGCTGGGTTATGGTATGGCGGGAGGAGTAGTTTACATAGGGGTCATAGGTGAGGGC	1680
1681	TGTGGCCTTTGTTACAAAAGTTATCATCTAGAATAACAGCACTGGAGCCCACTCCCCTGTC	1740
1741	ACCCTGGGTGATCGGGGAGCAGGGGCA	1767

2.2.5 分离毒株的同源性和进化

分离株病毒盘锦株基因组全长均为 1767bp, 与资料报道相一致。将所测序列与 GenBank 中的其它已知参考毒株进行比较。我们选择来自美洲、欧洲及中国的几个代表毒株(天津、浙江、河南 3 株 PCV2)。应用 DNASTar 分析软件对这些序列进行同源性分析发现。所有 PCV2 毒株之间核苷酸序列同源性均很高(表 2)。本试验所分离毒株与法国株(AF055493)同源性为 99.4% ; 与我国另外三个分离株的同源性分别为 77.6%和 80%。所选的 6 株 PCV2 毒株 AF055394,AY181946,AY188355,AY264039,AF201897,AY969004 之间同源性较高。为了更好地了解 PCV2 毒株的遗传学特性及相互的亲缘关系。我们在分析所有毒株同源性的基础上绘制了系统发生进化树(图 4)。从中可以看出.PCV2 分成两个分支的基因型。7 株 PCV2 密切相关, 其中 5 株组成一分支; 另外 2 株组成另一分支。其中本试验的毒株与法国的 AF055394 亲缘关系较近。在一个分支内我们的分离株(盘锦株) 与 5 株 PCV2 (荷兰、法国、浙江、天津和河南株) 组成一簇, 亲缘关系较近, 另一分支德国毒株。

表 1 PCV2 毒株全基因组序列比较

Table 1Comparison of the complete genomic sequences of PCV2

Percent Identity								
	1	2	3	4	5	6	7	
1		55.5	96.8	99.8	99.8	79.9	80.3	1
2	96.0		55.3	55.5	55.4	73.1	73.5	2
3	3.2	97.4		96.6	96.7	77.3	77.9	3
4	0.2	97.0	3.4		99.8	79.8	80.2	4
5	0.2	97.0	3.3	0.2		79.7	80.3	5
6	0.2	96.9	3.4	0.3	0.4		99.4	6
7	0.1	96.5	3.1	0.1	0.1	0.2		7
	1	2	3	4	5	6	7	

AF201897 HOLLAN.seq

AF264039 GER.seq

AY181946 TIANJIN.seq

AY188355 ZHEJIANG.seq

AY969004 HENAN.seq

Panjing.seq

AF055394 FRANCE.seq

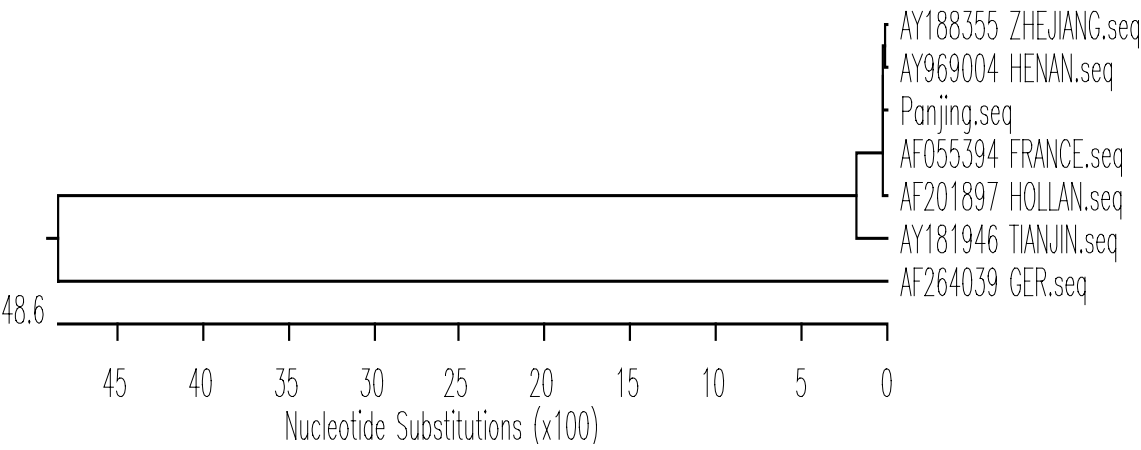


图 4 PCV2 毒株的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of PCV2 genomes

2.3 讨论

本试验将疑似 PMWS 的病料接种 PK15 细胞,盲传 4 代。分离时用 D-氨基葡萄糖处理 PK15 细胞,有利于病毒对细胞的适应,这可能与 D-氨基葡萄糖诱导细胞进入 S 期,促进病毒的增殖有关(Atsushi O, et al. 1999)。用 PCR 方法扩增出 PCV2 特异性片段。用 PK15 细胞做荧光试验表明所分离到的病毒为 PCV2,且生长良好。利用 PCR 技术克隆测定了该株 PCV2 全基因组序列,并将所测序列与国内外毒株进行了同源性比较及亲缘关系分析。结果发现本试验的毒株与法国的 AF055394 亲缘关系较近。在一个分支内我们的分离株(盘锦株)与 4 株 PCV2(荷兰、法国、浙江和河南株)组成一簇,亲缘关系较近;另一分支中国天津分离株与德国毒株亲缘关系较近,组成一小分支。就国内的 PCV2 分离株而言,基因组核苷酸的一致性也存在一定差异,可能由于 PCV2 在不同外界环境条件下存在一些变异,或者国内 PCV2 分离株来源可能较广泛而造成的。有的病毒可能从美国、加拿大等国传入,有的则可能源自欧洲等国。这一点还需通过分析更多的 PCV2 分离株来证实。但鉴于我国巨大的养猪规模。疫病的防控水平及与欧美国家的种猪和养猪相关产品的交流情况看,在我国猪群中出现不同地区来源的 PCV2 感染是有可能的。对这种情况我们应提高警惕,加强引种时的检疫工作,断绝 PCV 的进一步传入。同时应加紧 PCV 的研究工作,尽快建立各种敏感特异的检测方法。进行广泛的流行病学调查,掌握 PCV 流行规律,制定有效的免疫防制措施。

第三章 PCV2 的 *cap* 部分基因原核表达及抗原性的研究

3.1 材料方法

3.1.1 质粒和菌株

pMD18-T 克隆载体购于宝生物工程（大连）有限公司；原核表达载体 pET32a 为 Invitrogen 公司产品；大肠杆菌 DH5 α 和 BL21（DE3）。*Bam*HI、*Xho*I 等工具酶均购自宝生物工程（大连）有限公司；DNA 凝胶纯化试剂盒为上海华舜公司产品；Wizard Purefectin Plasmid DNA Purification System 购自 Promega 公司；T4DNA ligase 为 MBI 公司产品。

3.1.2 PCV2 结构蛋白的分析

CAP 蛋白为病毒的主要结构蛋白，构成病毒的核衣壳，由病毒基因组中 ORF2 编码（Nawagitgul et al., 2000），病毒感染细胞后在宿主各种酶的参与下产生。PCV1 与 PCV2 的 CAP 蛋白均由 233aa 组成，氨基酸同源性仅为 64%。2 种病毒的 CAP 蛋白都只有单一的糖基化位点，分别位于 PCV2 Cap 的 143~145aa 及 PCV1 的 102~104aa（Hamel et al., 1998）。多肽扫描（PEPSCAN）显示，PCV1 与 PCV2 的 CAP 蛋白上存在共同的抗原决定簇，但血清学试验显示，两种血清学的 CAP 蛋白没有抗原交叉性，既 PCV2 的 CAP 蛋白抗体（或抗原）不能与 PCV1 CAP 蛋白（或抗体）发生反应，可能是因为这个共同抗原位点被整个 CAP 蛋白掩盖了。通过多肽扫描还发现，PCV2 CAP 蛋白上存在 3 个特有的抗原位点（65~87aa、113~139aa 及 193~207aa）（Mahe et al., 2000）。这为建立特异检测 PCV2 的血清学方法奠定了基础。软件分析该蛋白分子量为 278Ku，然而试验报道的分子量则差异很大，从 28~36Ku 不等（Cheung et al., 2002；Pogranichny et al., 2000）。CAP 蛋白 N 端富含碱性氨基酸（如精氨酸），与蛋白的核内定位有关。Liu 等（2001）对 PCV2 ORF2 基因（即 *cap* 基因）进行一系列突变表明，CAP 蛋白的核内定位与其 N 端的 41 个氨基酸密切相关，进一步研究发现，位于 12~18 位及 34~41 位的氨基酸对 CAP 蛋白的核内定位起着决定性作用。Nawagitgul 等（2000）将 ORF2 基因克隆后于昆虫细胞中表达，电镜观察发现表达产物能自动组装成病毒核衣壳样颗粒，从而进一步证实 ORF2 基因编码病毒的和衣壳蛋白。*cap* 基因的启动子（ P_{cap} ）位于 *cap* 内部的 nt1328~1252，与 SV40 晚期启动子相比， P_{cap} 活性相对很低（Mankertz et al., 2002）。

3.1.3 引物的设计与合成

利用 DNASTAR 蛋白质分析软件分析基因疏水结构图谱，推测 CAP 蛋白可能有免疫原性和反应原性的主要区段，根据文献报道片段的序列（含有 *cap* 基因），利用 Primer5.0 设计一对特异性引物，以 *cap* 基因为模板扩增产物为长度 520bp 的片

段（位于 *cap* 基因的 nt125~645），命名为 CAP520。在扩增片段的上游和下游分别引入 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点。

PPU-125: 5'-ATGGA TCCTT CAACA CCCG-3'

PPL-645: 5'-TACAC GGATC TCGAG TTCCT GGTCG-3'

扩增 *cap* 基因 47~200 位氨基酸，加下划线部分表示酶切位点。

3.1.4 *cap* 部分基因的 PCR 扩增及克隆

在 50μl 反应体系中加 5μl 10×Ex Taq Buffer（含 Mg^{2+} ）、2U Ex Taq DNA 聚合酶（TaKaRa）、0.4μmol/L 引物、200μmol/L dNTPs、1μl 模板。同时设立无 DNA 水对照。PCR 反应条件为：95℃ 5 min；94℃ 50s，55℃ 1min，72℃ 1min，35 个循环；72℃ 延伸 8min。反应结束后，取 5μl 扩增产物 0.8% 琼脂糖电泳检查结果。

3.1.5 重组质粒的构建

取纯化的 PCR 产物 CAP520 和原核表达载体 pET32a，分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切，T4DNA 连接酶 16℃ 连接过夜。取 10μl 连接产物加入 50μl 感受态细胞 DH5α 中，轻轻混匀后冰浴 30min，42℃ 热休克 90s 后立即置于冰浴中 5min，然后加入 800μl LB 液体培养基，于 37℃ 振荡培养 45min。取 200μl 培养物分别涂布于含有氨苄青霉素的 LB 琼脂板上，37℃ 培养过夜，得到重组表达质粒。

3.1.6 表达载体的鉴定

重组质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切鉴定，电泳分析酶切结果，以 DNA 分子量 Marker15000、Marker 2000 作为参照，判断各片段的大小。将鉴定为阳性的重组质粒命名为 pET32a-CAP520。

3.1.7 *cap* 基因部分片段的诱导表达

取 100μl 已经鉴定含有阳性重组质粒 pET32a-CAP520 的菌液，接种到 10ml LB（含终浓度为 30μg/mL 氨苄霉素）中，37℃ 振荡培养 3.5h，当 OD₆₀₀ 值约为 0.6 时，取出 1ml 未诱导的菌液作对照，剩余菌液加 IPTG 至终浓度为 0.6mmol/L，37℃ 诱导 4~5h。将诱导菌液置于冰上冰浴 5min，然后 10000rpm 离心 5min 收获细菌。用 2.5ml（0.25 倍培养基体积）冷的 20mmol/L Tris-HCl（pH8.0）悬浮。10000rpm 离心 1min，尽量去除上清液。细胞沉淀用 100μl PBS 重悬，取 10μl 处理样品进行 SDS-PAGE 检测。加等体积的 2 倍上样缓冲液混匀，于水浴中煮沸 5min，取样进行 SDS-PAGE 分析。考马斯亮蓝染色过夜，次日沸水煮 15min，观察结果。

3.1.8 重组蛋白的 Western Blot 分析

表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜（NC 膜）上，用含有 5%（w/v）

脱脂奶粉的 PBS (pH 7.4) 于 37℃ 温育 2h 封闭 NC 膜; PBST 洗涤膜 3 次后, 加入含 1%PCV2 病毒多克隆阳性血清的 PBS 37℃ 温育 2 h; PBST 洗涤膜 3 次后用二抗稀释液 (150mmol/L NaCl、50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 洗涤一次, 然后加入用 Tris-HCl 缓冲液 1/5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 37℃ 温育 1h; 用二抗稀释液洗涤 3 次, 加入含 6mg 二氨基联苯胺、10μl 30% H₂O₂ 的 Tris-HCl, pH 7.6) 显色 15~30min, 观察出现明显的条带时, 水漂洗终止显色。

3.2 结果

3.2.1 片段的 PCR 扩增及克隆的鉴定

用 PCR 扩增了包含有 CAP 蛋白可能存在的免疫反应表位, 位置在 *cap* 基因核苷酸的 125 位至 645 位, 共 520 个碱基。以 PCV2 的 DNA 为模板, 利用引物 PPU-125、PPL-645 扩增出约为 520bp 的 PCR 产物 *cap*125-645, 与预期大小相符, (图 5)。

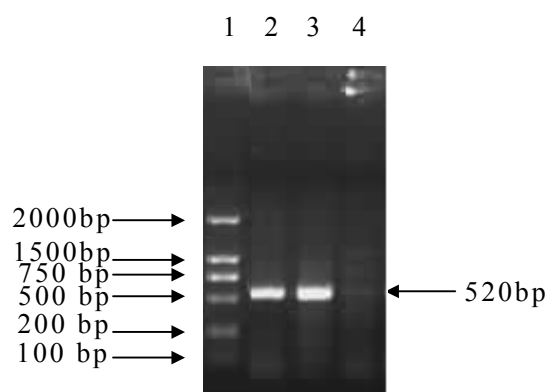


图 5 PCV2 的 *cap* 基因 PCR 扩增

Fig. 5 Amplification of *cap* gene by PCR

1. 分子量标准 DL2000
2. 阳性质粒 PCR 对照
3. 样品 PCR 产物
4. 水对照

3.2.2 CAP 蛋白功能区分析

结合相关报道，利用生物学软件 DNASTar 对 PCV2 病毒的 *cap* 基因的蛋白序列进行亲水性和抗原性分析（图 6）表明，在 CAP 蛋白的氨基酸位置的 125 位至 645 位左右，亲水性较好，且抗原性较强，选择该段作为目的片段插入原核表达载体 pET32a。

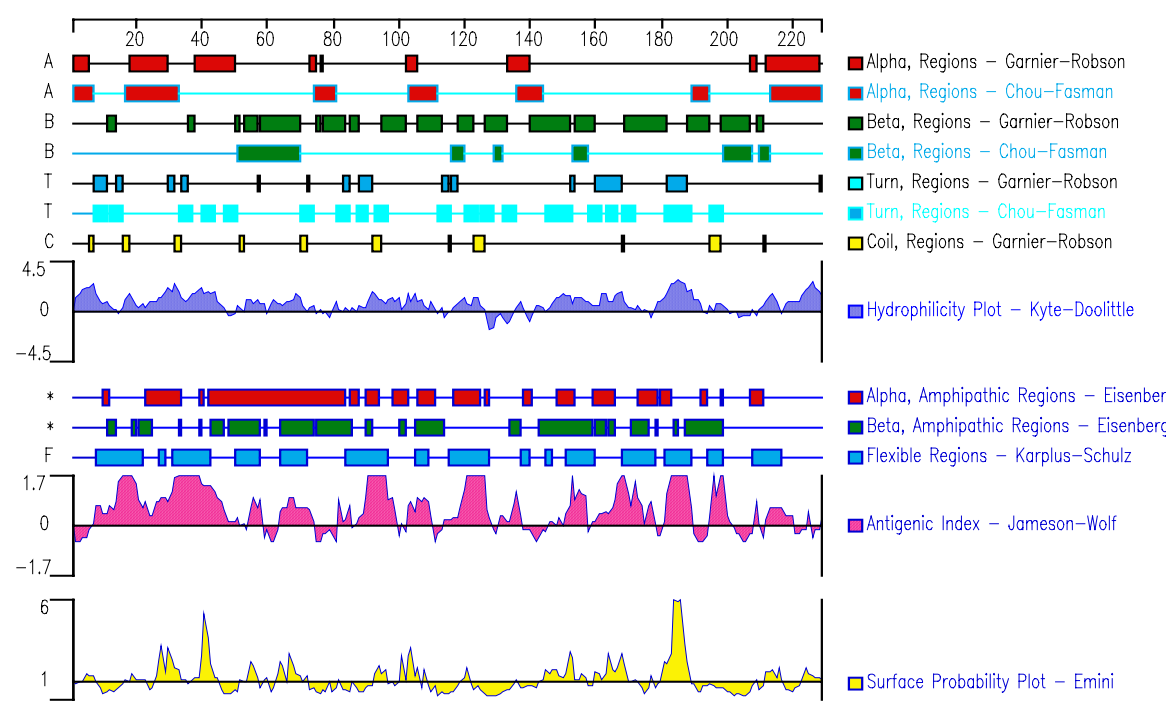


图 6 CAP 蛋白功能区分析图
Fig.6 Analysis of functional fragments of protein CAP

3.2.3 重组原核表达载体的构建

将该 PCR 产物插入原核表达载体 pET32a 后，得到的重组质粒 pET32a-CAP520，BamHI、XhoI 双酶切约 5.4kb 左右以及 0.5kb 左右两条片段（图 7），与预期大小相符，测序序列与设计对应序列一致。

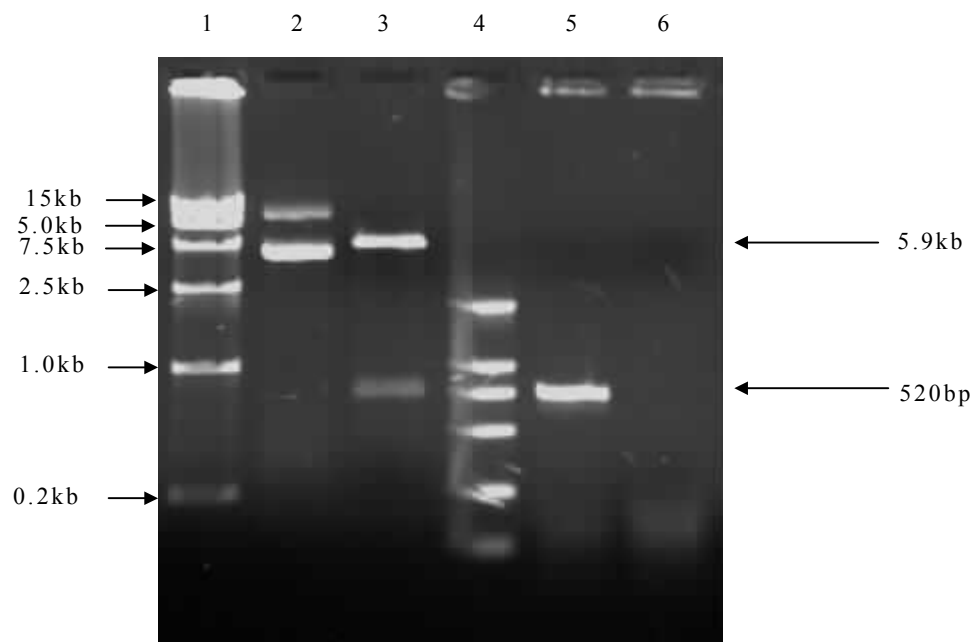
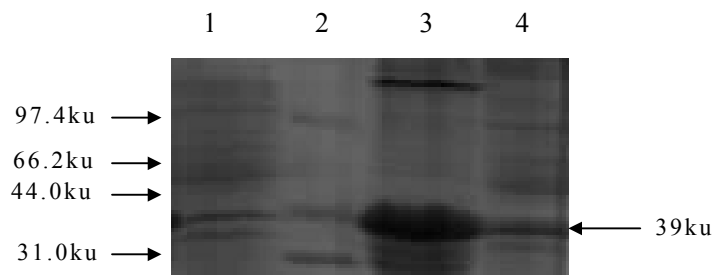


图 7 pET32a—CAP520 的酶切鉴定
Fig.7 Identification of pET32a—CAP520 by
restricted endonuclease digestion
1. 分子量 DL 15 000,
2. pET32a—CAP520
3. pET32a—CAP520 (*Bam*HI、*Xho*I) 5.9kb+0.52kb
4. 分子量标准 DL2000
5. 样品 PCR 产物
6. 水对照

3.2.4 SDS-PAGE 检测重组蛋白

SDS-PAGE 分析(图 8)表明,重组质粒 pET32a—CAP520 在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达 (泳道 3), 重组蛋白分子量大小约为 39ku, 与预测的分子量大小相一致。



3.2.5 重组蛋白的 Western Blot 检测结果

重组蛋白作为靶抗原，PCV2 多克隆阳性血清作为一抗，Western Blot 检测重组蛋白的反应活性（图 9），重组蛋白（泳道 1、2）在显色后出现明显特异条带，位置在 39ku 左右，与 SDS-PAGE 位置一致，而空载体在相同位置则未出现条带。

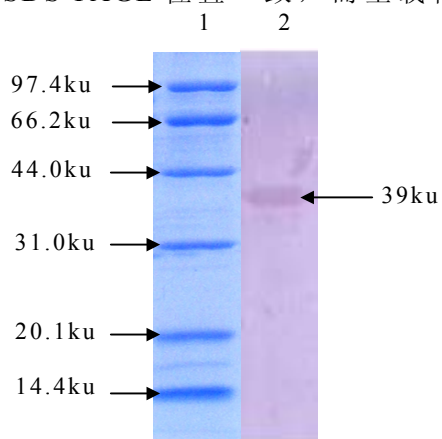


图 9 组氨酸－CAP520 Western-blot 检测结果

Fig.9 Western Blot analys of His－CAP520

1. 蛋白 Marker,
2. 阳性 pET32a－CAP520 菌株诱导表达蛋白

3.3 讨论

本试验成功表达了 PCV2 的 *cap* 部分基因,于不同条件下对目的片段进行诱导,均获得融合蛋白组氨酸-CAP520 的包涵体蛋白。用原核表达外源基因,尤其是以大肠杆菌为宿主菌高效表达外源基因时,表达的蛋白往往在细胞内聚集,形成所谓的包涵体。一般降低诱导剂浓度,低温诱导培养可获得可溶性蛋白。蛋白的形成形式还与蛋白本身的特性有关。但是包涵体的形成有利于防止重组蛋白的降解,从而有利于重组蛋白的纯化,它的主要成分是非活性的重组蛋白,还含有一些质粒的 DNA, RNA, RNA 聚合酶其它的菌体蛋白。应用 pET32a 载体表达目的蛋白是组氨酸标签基因融合蛋白的形式,可以很容易地利用镍柱从菌体裂解液中纯化目的蛋白。也可以用溶菌酶、冻融、匀浆、超声等酶学或物理学方法破菌,由于包涵体的密度较大,经菌体破碎和离心分离即可达到初步的分离菌体蛋白。本试验利用冰浴超声的方法反复破碎菌体和包涵体,然后利用 8M 尿素溶解洗涤后的包涵体,最后经过依次降低尿素浓度的方法分步透析使重组蛋白复性,复性后的蛋白经 Western Blot 试验以及初步的 ELISA 试验表明该蛋白具有较好的免疫原性。这样纯化的重组蛋白纯度大大提高,可以用作诊断抗原,这样就省去了 Ni 阳离子亲和试剂,降低了生产成本,并且纯化工艺简单,适于大规模的制备与生产。

本研究利用 pET32a 原核表达系统融合表达了部分 ORF2 蛋白,用该重组蛋白作为抗原取得良好的效果,初步建立了检测 PCV2 抗体的血清学诊断方法。对 ELISA 反应条件只进行了初步的摸索,后续优化最适重组抗原包被浓度、血清稀释倍数、最佳封闭液的确定、最佳包被条件的工作仍在进行中。

第四章 PCV2 和 PRRSV 对仔猪混合感染试验

4.1 材料与方法

4.1.1 毒株和细胞

PRRSV CH-1a 株由哈尔滨兽医研究所保存, PCV2 病毒株分离于辽宁省盘锦市, 经测序与标准序列对比同源性的 99%。Marc-145 和 PK-15 细胞均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存。

4.1.2 主要仪器

BECKMAN 高速离心机 J21-M、GS-15R 台式离心机、PTC-100TM Programmable Thermal Controller PCR 仪、倒置荧光显微镜 (Lieca 公司)、分光光度计 (Eppendorf AG, Germany)、SDS-PAGE 垂直电泳仪 (BIO-RAD)、Nikon 倒置显微镜、JEM-1200EX 型透射电子显微镜、HZQ-C 空气浴摇床 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、恒温水浴箱 DK-8D (上海精密试验设备有限公司)、低温冰箱 (SANYO 公司)、超声波裂解仪 (Cole-Parmer)、酶标仪 (Model 680, BIO-RAD) 等, 均由哈尔滨兽医研究所提供。

4.1.3 试剂及其他材料

Ex Taq DNA 聚合酶、DMEM 购自 Invitrogen 公司; 辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 购自美国 Sigma 公司; 小牛血清购自上海奉贤生物有限公司; 6 孔微量培养板、96 孔微量培养板购自 Orange 公司; PRRSV、PCV2 多克隆阳性血清由美国依阿华州大学 Yong 博士惠赠; 其他试剂为国产或进口分析纯试剂。

4.1.4 试验设计

选择 PCV2, PRRSV, PRV 血清阴性的临产母猪, 选其产下的 15 日龄仔猪进行检测, 选用上述 3 种病毒血清阴性的仔猪 12 头, 随机分为 3 组作为试验动物。对照组 3 头; PRRSV 组 3 头; PCV2 和 PRRSV 混合感染组 6 头。3 周龄时, 以 PRRSV 强毒 ($3 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$) 和 PCV2 病毒分离株 ($3 \times 10^{4.0} \text{TCID}_{50}$) 滴鼻方式攻击, 两种病毒均为 3ml/头。PRRSV 试验组 PRRSV 强毒 ($3 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$) 3ml/头, 对照试验组 PBS 滴鼻 3ml/头。观察记录呼吸道疾病指标和直肠温度, 每周采集血清冻存备用。分别于接 4, 7, 14, 21, 28 和 48d 及濒死期进行剖检, 记录肝脏及淋巴结的病变。

4.1.5 PCV2 病毒的增殖、DNA 的提取及 PCR 检测

按 Tischer 报道的方法进行细胞传代用 10% 的血清配 MEM 液, 然后将病毒接

入细胞培养瓶中，于 37℃ 温箱培养，另设阴性对照组。待 12h 后，用 2~3ml 的 D-葡萄糖胺 37℃ 培育 30min。弃掉液体之后，用 PBS 洗涤 3 次，换上 10% 的营养液，待 72h 后收毒。反复冻融 3 次，使细胞破裂，取 1.5ml 液加入离心管中 12000rpm 离心 6min。用 PBS 洗涤，混匀重复操作 3 次。用 PBS 液洗涤 3 次以后，留沉淀，加裂解液（见附录）混匀，置于 50℃ 温箱中作用 2h。以同体积的 TE 饱和酚抽提一次（12000rpm 离心 5min）取上清。用氯仿:异戊醇（24:1）抽提（12000rpm 离心 5min）取上清。加入 2 倍体积的预冷乙醇-20℃ 过夜沉淀。离心回收沉淀，70% 乙醇洗 1 次，放置于超净工作台中吹干。以无菌 TE（pH8.0）重悬 DNA，紫外分光光度计定量。

PCR 反应

模板 DNA	2.0μl
dNTPs	2.0μl
10×Buffer	2.5μl
上游引物	1.0μl
下游引物	1.0μl
Taq 酶	0.5μl
ddH ₂ O	16μl

反应参数：

95℃ 预变性 5min；94℃ 1min；55℃ 退火 1min；72℃ 延伸 1min；35 个循环。最后 72℃ 延伸 10min。

4.1.6 PRRSV 病毒增殖及 RT-PCR

Marc-145 细胞生长至单层后，弃去营养液，用灭菌的 PBS 洗涤培养瓶内细胞 3 次。然后取 1ml 病毒原液接种于 20cm² 的单层细胞上，于 37℃ 吸附 1h。然后，加入含 3% 犊牛血清、1% 双抗的 DMEM 的细胞培养液。在 37℃ 下培养 3~4 天后，出现 80% 明显的病变后，将细胞培养物反复冻融 3 次，收获病毒培养物于 -20℃ 保存备用。

取病毒培养物，按 TRIzol：细胞悬液为 2：1（600μl：300μl）加入 TRIzol 试剂，用力振荡离心管数次，静置 2min，应加入等体积的氯仿分装到 2 个小管（约 450μl），振荡数次，作用 3~5min，12000rpm 离心 5min，再用等体积异丙醇，-20℃ 作用 5~10min 沉淀 RNA，12000rpm，4℃ 离心 15min，倒掉异丙醇凉干，-20℃ 保存备用。

RT-PCR 反应的 cDNA 合成体系：

MgCl ₂	2.0μl
10×Reverse Transcripase Buffer	1.0μl
dNTP(10mM each)	1.0μl
RNA inhibitor 20 单位	0.25μl
oligo dT Primer 50pmol	0.5μl
AMVReverse Transcriptase	0.5μl
DEPC 水	4.75μl

30℃作用 10min, 42℃水浴 2h, 99℃煮沸 5min, 5℃作用 5min。

PCR反应

模板DNA	2.0μl
dNTPs	2.0μl
10×Buffer	2.5μl
上游引物	1.0μl
下游引物	1.0μl
Taq酶	0.5μl
ddH ₂ O	16μl

反应参数：

95℃预变性 5min; 94℃1min; 55℃退火 1min; 72℃延伸 1min, 共进行 35 个循环, 最后 72℃延伸 10min。将上述 PCR 产物用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳观察结果。

4.1.7 组织病理学检查

收集不同组织、器官(心、肝、脾、肺、肾和淋巴结)做石蜡包埋切片进行组织学检查。采取病变明显的组织进行 10%的福尔马林固定, 至少 24 小时以上。固定后的组织块取出后, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 透蜡, 包埋, 切片, 苏木素-伊红(H-E)染色.镜下观察, 记录镜下形态学变化。

4.1.8 间接免疫荧光试验

将剖解得到的组织材料在载玻片上制作成冰冻切片, 然后用 75%预冷的乙醇在 4℃作用 3~5min。把 1:40 稀释好的阳性血清滴在切片上, 均匀覆盖住样品。置于 37℃培育 45min, 洗涤 3 次。加荧光二抗, 37℃培育 45min, 洗涤 3 次。最后加缓冲甘油(加入少量, 然后吸出, 尽量吸干净)。于荧光显微镜下观察。

4.1.9 用 ELISA 方法分别检测血清中抗 PCV2 和 PRRSV 抗体

本实验室建立的 ELISA 试验方法。将融合表达的蛋白用碳酸盐包被缓冲液(0.05mol/L CBS, pH9.6)做适当稀释包被聚苯乙烯微量反应板, 4℃过夜, 用洗液 PBST(含有 0.05%Tween20 的 0.01mol/L, pH7.4PBS)洗涤 3 次, 每次 3~5 min, 吸水纸上拍干。然后用封闭液(含有 5%的脱脂乳 PBS)每孔 150μl 封闭 1.5h, 洗涤同前。干燥后置 4℃冰箱保存备用。

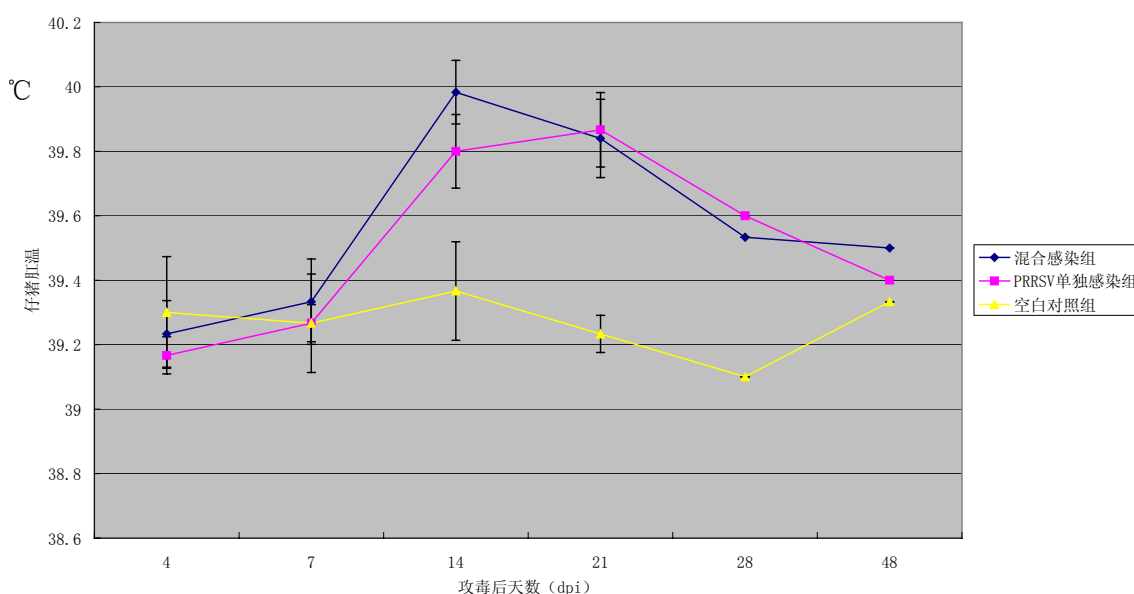
将待检血清用稀释液(含 1%牛血清白蛋白的 PBST)做适当的稀释后, 每孔 100μl, 37℃湿盒内作用一定时间后, 洗涤同上。

将兔抗猪的酶标二抗用稀释液做 1:10000 稀释后, 每孔 100μl, 37℃湿盒内作用 1h 后, 洗涤同上。

每孔加入 100 μ l 用磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH5.0)配制的邻苯二胺底物溶液(OPD 4mg/10ml 含 2 μ l 30%的过氧化氢)。室温避光反应一定时间,用 2mol/L 硫酸溶液每孔 50 μ l 终止反应。自动酶标仪波长 490nm 处用空白孔调零,测定每孔的光密度吸收值(OD 值),每个样品平行做 2~4 孔取平均值。

4.2 结果

4.2.1 临床症状



除按设计剖杀外,对照组猪没有死亡。PCV2 和 PRRSV 混合感染组猪呼吸道症状明显与 PRRSV 组猪相似。混合感染组体温升高早于 PRRSV 单独感染组,且维持时间较单独 PRRSV 感染组长,两组实验猪体温高于对照组。被毛粗乱、消瘦、皮肤苍白和腹泻,且混合感染组猪皮肤出现红色小斑点。5 头中 3 头出现呼吸困难,其中 1 头死亡 4 头被剖杀。

图 10 试验猪肛温变化曲线

Fig.10 The rectal temperature of piglets

4.2.2 肉眼病变

对照组除轻微渗出性皮炎外,未出现肉眼病变。PCV2 和 PRRSV 混合感染组猪肺部病变与 PRRSV 组相似,腹股沟淋巴结和肠系膜淋巴结肿大 2~3 倍,切面多汁;整个肺颜色变浅,有点状出血,有些地方出现肉变或胰变按压无弹性;肾脏质地变脆,表面有针尖大小出血点,甚至块状出血斑;脾脏表面有少数出血点,边缘有少量梗死灶;严重的增生性间质性肺炎和特别明显的肝病变。肝脏肿大,并见暗红褐色斑块,胆囊和胆管浆膜出现水肿和黄疸,2 头猪的食道和胃交界处有出血性溃疡。3 头猪出现结肠系膜淋巴结水肿。

4.2.3 组织病理学变化

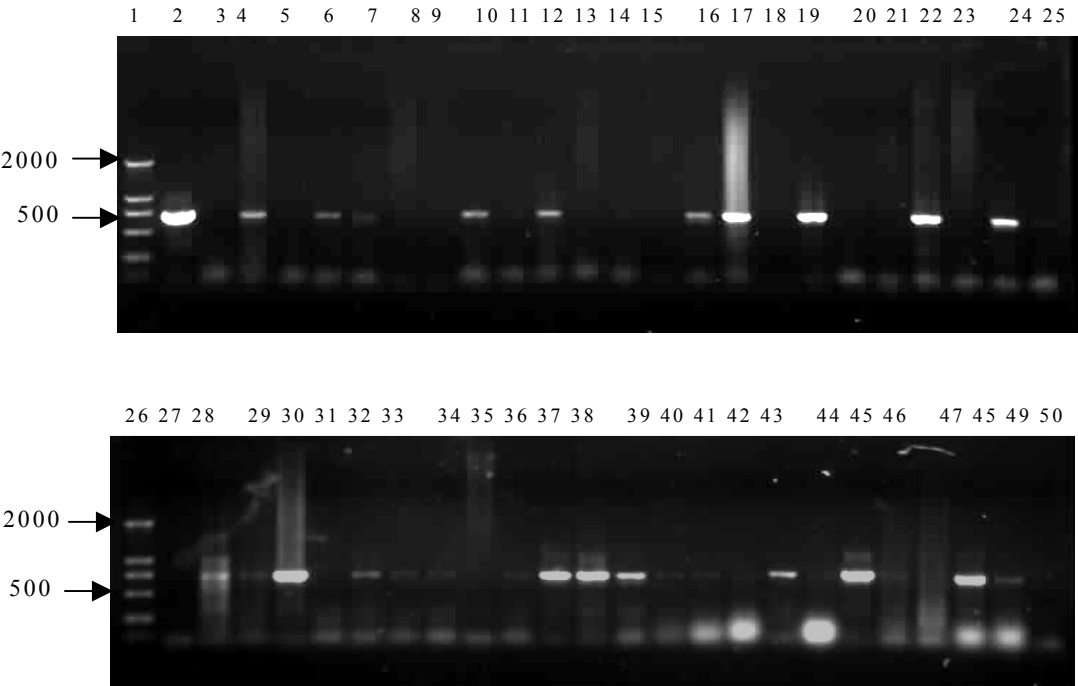
对照组未见明显组织病变，PRRSV组猪出现与以前PRRSV人工攻毒猪相似的间质性肺炎。肺脏：间质性肺炎肺泡隔宽，间质增宽水肿，气管黏膜下淋巴样细胞增厚。细支气管周围有淋巴细胞增生灶。脾脏滤泡肿大，破碎，与周围界限不清。鞘动脉内外皮细胞肿大，动脉内外皮细胞水肿，红髓区增生。淋巴结：出血滤泡肿大，中心区淋巴细胞核浓缩，核崩解细胞数减少。肝细胞胞浆糖原丢失，呈球样。窦内红细胞肿大，有少量的淋巴样浸润。肝细胞胞浆颗粒变性，肝细胞呈灶状，凝固性坏死。肝窦淤血，增宽有少量的淋巴样细胞。有2头猪出现心肌纤维颗粒变性。心肌纤维颗粒变性。混合感染组有1头猪肾脏肾小球血管内皮细胞肿大，肾小管上皮坏死，在28dpi时，1头猪的脑组织血管周围水肿，PCV2和PRRSV组猪的间质性肺炎与PRRSV组猪相似，但更广泛和严重（见图附录一）。

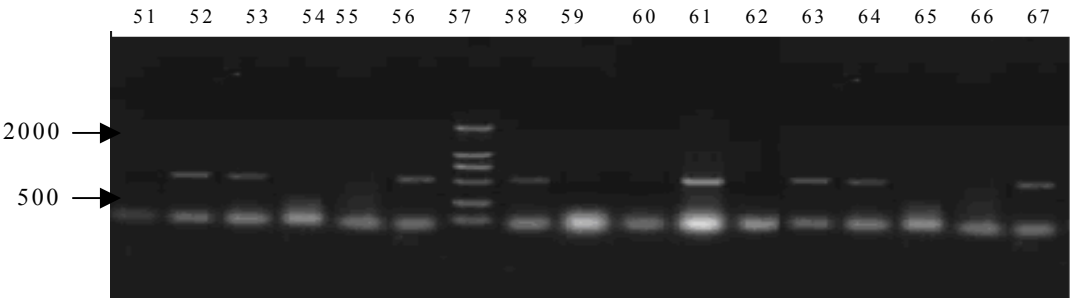
4.2.4 抗原的免疫荧光试验

对照组未检测到PCV2抗原。PCV2和PRRSV组猪在肺中有大量的PCV2阳性细胞；PRRSV组猪肺部特别是肺泡内含有PRRSV阳性细胞，肝脏中含有少量的PRRSV阳性枯否氏细胞。PCV2和PRRSV组猪在整个试验期肺内都有大量的PRRSV阳性细胞，发生严重肝炎的肝脏中偶见PRRSV阳性细胞（见附录二）。

4.2.5 PCV2 的 PCR 检测

对照组PCR检测阴性，而混合感染组猪检测结果见图11和表2、3。





lane1、26、57是Marker DL2000, lane65和66是水对照。

图 11 混合感染试验组PCV2的PCR电泳图
Fig.11 The PCR of PCV2 in coinfection group in serum

表 2 混合感染试验组血清PCV2的PCR统计表
Table. 2 The statistics results of PCR for PCV2

分组	猪号	攻毒后天数（dpi）					
		1dpi	4dpi	7dpi	14dpi	21dpi	32dpi
混合感染组（coinfection group）	1号（No. 1）	—	+	+	剖杀	剖杀	剖杀
	2号（No. 2）	lane3	lane2	lane4			
		—	—	—	+	剖杀	剖杀
	3号（No. 3）	lane5	lane15	lane8	lane19		
		—	+	+	—	+	剖杀
	4号（No. 4）	lane7	lane6	lane16	lane23	lane24	
PRRS组（PRRS group）	5号（No. 5）	—	—	—	+	+	+
	6号（No. 6）	lane11	lane18	lane20	lane22	lane29	lane10
		—	+	—	+	猝死	猝死
	7, 8, 9号（No. 7, 8, 9）	lane13	lane17	lane21	lane28		
		—	—	—	—	+	+
		lane14	lane25	lane27	lane9	lane12	lane30
对照组（control group）	10, 11, 12号（No. 10, 11, 12）	—	—	—	—	—	—

表3 混合感染试验组组织中PCV2的PCR统计表
Table. 3 The statistics results of PCR for PRRSV in tissues

分组	猪号	攻毒后天数 (dpi)						淋巴结 lymph node	脾脏 spleen	肺巨噬细胞 PAMs	肝脏 liver	肾脏 kidney	心脏 heart
混合感染组 (coinfection group)	1号 (No)	+	+	+	—	+	+	lane36	lane37	lane34	lane31	lane33	lane32
	2号 (No)	+	+	+	+	+	+	lane39	lane40	lane41	lane38	lane43	无
	3号 (No)	+	—	+	—	+	—	lane48	lane42	lane45	lane35	lane44	无
	4号 (No)	+	+	+	+	+	+	lane53	lane49	lane52	lane58	lane46	无
	5号 (No)	+	—	+	—	+	—	lane56	lane47	lane64	lane50	lane59	lane67
	6号 (No)	+	—	+	—	+	—	lane61	lane51	lane63	lane54	lane55	无
PRRS组 (PRRS group)	7, 8, 9号 (No. 7, 8, 9)	—	—	—	—	—	—						
对照组 (control group)	10, 11, 12号 (No. 10, 11, 12)	—	—	—	—	—	—						

分组	猪号	攻毒后天数 (dpi)							实验猪脏器				
		1	4	7	14	21	32	48	肺	脾	肝	淋巴结	肾
混合感染组	1~6	0/6	3/6	2/5	3/4	2/2	1/1	1/1	6/6	5/6	6/6	5/6	1/6
PRRSV单独感染组	7~9	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/1	0/1	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
空白对照组	10~12	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/1	0/1	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

从上述PCR统计图表可以看出，试验猪在PCV2攻击后第4天（4dpi），可以检测到有病毒的出现。直到试验结束时仍能检出病毒。在对组织中病毒的检测发现，淋巴结和脾脏是病毒检出率较高的器官，其次是脾和肝，在肾脏和心脏检出率较低，脑内一般很少检出。

4.2.6 PRRSV 的 RT-PCR 检测

对照组 RT-PCR 检测阴性，而混合感染组猪检测结果见图 12 和表 4。

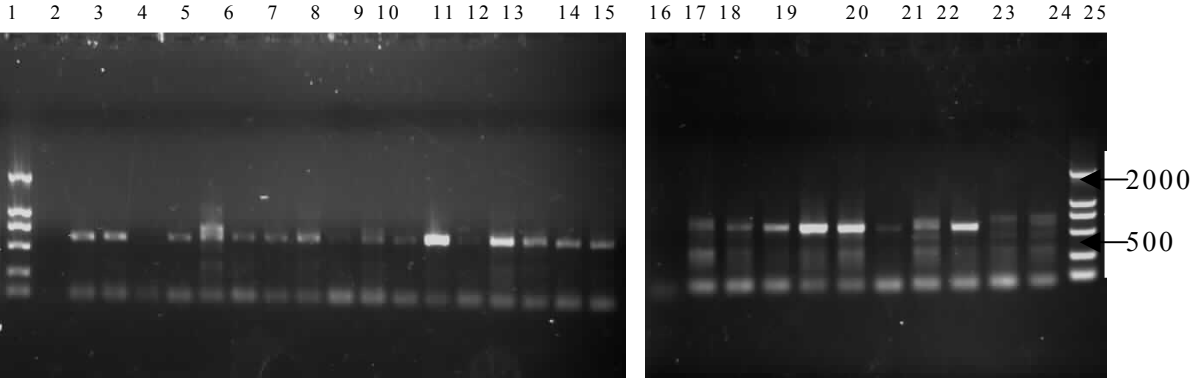


图 12 混合感染试验组 PRRSV 的 PCR 电泳图
Fig.12 The PCR of PRRSV in coinfection group

表 4 混合感染试验组血清 PRRSV 的 PCR 统计表
Table. 4 The statistics results of PCR for PRRSV in serum

分组	猪号	攻毒后天数（dpi）					
		1dpi	4dpi	7dpi	14dpi	21dpi	32dpi
混合感染组 (coinfection group)	1号 (No. 1)	—	—	剖杀	剖杀	剖杀	剖杀
		lane2	lane29				
	2号 (No. 2)	—	+	+	剖杀	剖杀	剖杀
		lane5	lane3	lane9			
	3号 (No. 3)	—	+	+	+	剖杀	剖杀
		lane11	lane4	lane10	lane17		
PRRS组 (PRRS group)	4号 (No. 4)	—	—	+	+	+	剖杀
		lane13	lane30	lane12	lane18	lane23	
	5号 (No. 5)	—	+	+	+	猝死	猝死
		lane15	lane6	lane13	lane19		
	6号 (No. 6)	—	+	+	+	+	+
		lane20	lane7	lane14	lane21	lane24	lane27
对照组 (control group)		—	+	+	+	+	+
		lane29	lane8	lane16	lane22	lane25	lane28
对照组 (control group)		—	—	—	—	—	—

分组	猪号	攻毒后天数（dpi）						
		1	4	7	14	21	32	48
混合感染组	1~6	0/6	4/6	5/5	4/4	2/2	1/1	1/1
PRRSV 单独感染组	7~9	0/3	3/3	3/3	3/3	2/2	1/1	1/1
空白对照组	10~12	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	0/1	0/1

从上述图表可以看出，试验猪在 PRRSV 攻击后第 4 天（4dpi），可以检查到有病毒的出现，直到试验结束时仍能检出病毒。

4.2.7 用 ELISA 检测 PRRSV 抗体

血清中 PRRSV 的抗体水平与 PRRSV 试验组相同，于 14dpi 开始上升，32dpi 到达平台期，至试验结束时仍然保持高的水平，稍有回落趋势（检测结果见图 13）。

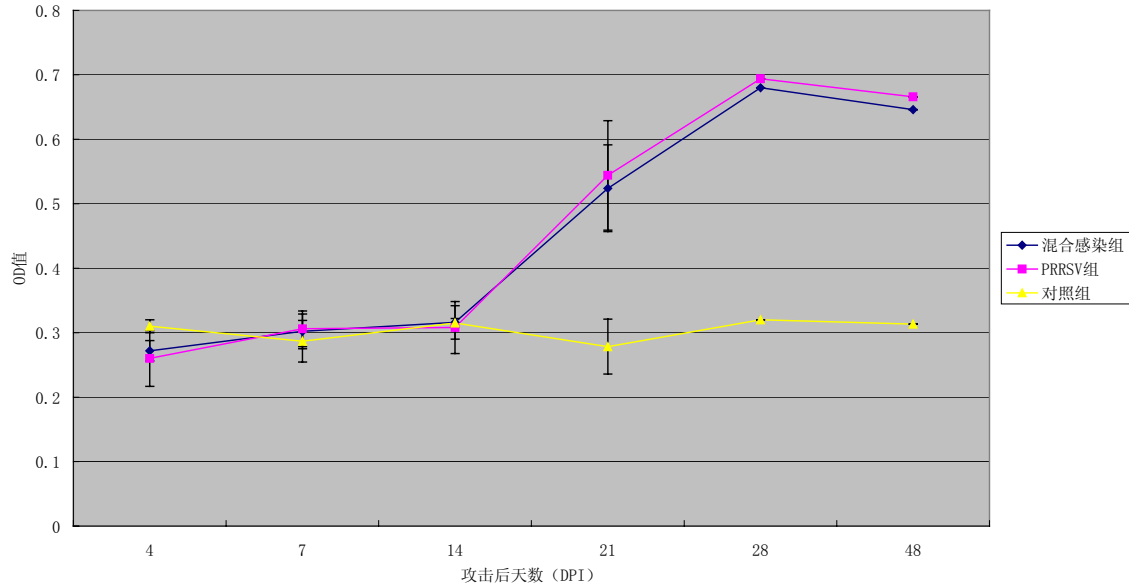


图 13 混合感染试验组血清 PRRSV 抗体折线图

Fig.13 The statistics results of ELISA for PCV2

4.2.8 用 ELISA 检测 PCV2 抗体

血清中 PCV2 的抗体水平于 7dpi 上升，21dpi 到达平台期，至 48dpi 回落到 7dpi 的水平（检测结果见图 14）。

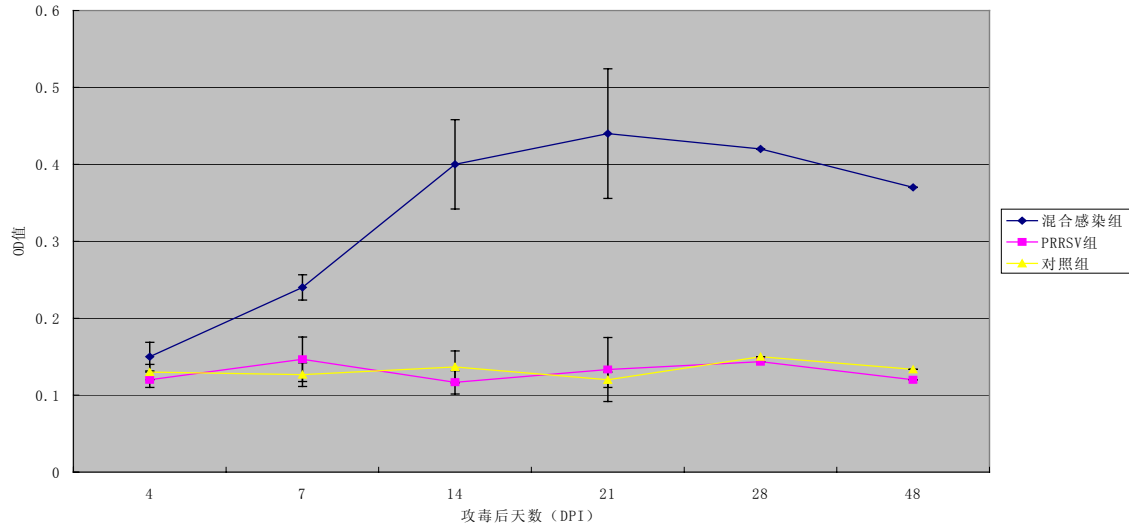


图 14 混合感染试验组血清PCV2抗体折线图

Fig.14 The statistics results of ELISA for PCV2

PCV2 和 PRRSV 组猪直至最后一次剖检(48dpi), 仍呈 PCV2 抗体阳性。PRRSV 组猪和 PCV2 和 PRRSV 组猪 ELISA 检测皆呈 PRRSV 血清学阳性。整个研究期间, 对照组呈 PCV2 和 PRRSV 血清阴性。说明 PRRSV 与 PCV2 混合感染不会对仔猪在 PRRS 体液免疫方面产生干扰。

4.3 讨论

PCV2 和 PRRSV 混合感染能引起严重的临床症状以及与 PMWS 一致的病变, 包括严重的间质性肺炎和淋巴组织出血肿大。与 PRRSV 组相比, PCV2 和 PRRSV 模式最显著和最一致的病变是间质性肺炎, 这种间质性肺炎与现地所见的 PMWS 病例的病变基本相一致。

PCV2 和 PRRSV 混合感染引起伴有淋巴细胞增生性支气管炎的间质性肺炎和不同程度的肝炎, 这种共同作用在 PRRSV 组中没有见到。PCV2 和 PRRSV 组猪有淋巴结界限明显的出血, PRRSV 组猪则见淋巴结增大。

病毒主要在肺脏(肺泡巨噬细胞)、肝脏和脾脏中分布; 在肾脏中也存在; 个别病例在心和脑中也可检出病毒的存在。PCR 和 RT-PCR 发现血清中病毒在 4dpi 时出现, 到试验结束时仍可检出, 可见病毒血症的维持时间较长。

PCV2 抗体于 7dpi 时开始上升, 14dpi 时抗体水平达到最高, 后逐渐下降。PRRSV 抗体与 PRRSV 强毒攻击组相同, 于 14dpi 时开始上升, 21dpi 时达到顶峰, 开始下降。说明 PRRSV 与 PCV2 混合感染不会对仔猪在 PRRS 体液免疫方面产生干扰。

我们筛选没有抗 PCV2 的母源抗体的仔猪在 20 日龄时感染 PCV2 和 PRRSV, 在随后的 2~3 周内试验组 PMWS 的发展与大多现地 PMWS 病例相一致。PRRSV 感染猪亦出现了中等程度的间质性肺炎, 轻微淋巴细胞性心肌炎以及其他与以前人工接种研究一致的病变, 而且未发生 PCV2 血清转阳性。说明混合感染组中出现的严重间质性肺炎需有 PRRSV 混合感染。混合感染试验组发生淋巴细胞增生性支气管炎, 因此推测许多与 PRRSV 有关的病变可能是由于 PCV2 混合感染造成的。

在 PCV2 和 PRRSV 组猪中有不同程度的肝炎, 这在对照组和 PRRSV 组猪肝病变不明显。有研究表明在有 PRRS 相关肝炎的母猪肝脏中同时存在 PCV2 和 PRRSV, 因此我们推断患非典型 PRRS 母猪的肝炎可能是由于共同感染了 PCV2 引起的。另有研究证明肝炎与 PMWS 和 PCV2 感染有关, 而且爆发性肝炎和黄疸是临床 PMWS 的偶见症状。

PCV2/PRRSV 引起伴有淋巴细胞增生性支气管炎, 这种共同作用在 PRRSV 组中不曾见到。有报道 PCV2 感染猪中亦出现坏死性支气管炎, 猪流感毒(SIV)作为北美猪的一种非常普遍的病原很容易地引起坏死性支气管炎和慢性支气管炎。由于对临床病例很难排除 SIV 早先感染, 因此, PMWS 相关的慢性呼吸道病变中 SIV 的潜在影响亦无法排除。

第五章 结 论

- 5.1 本试验成功的分离到一株 PCV2（盘锦株），该毒株与法国 PCV2（GenBank:AF055394）亲缘关系较近。并利用原核表达系统，高效表达了该病毒部分 CAP 蛋白，获得了重组蛋白 His-CAP520；该重组蛋白具有较好的抗原活性，可作为监测猪群中 PCV2 抗体。
- 5.2 本试验证明 PCV2 和 PRRSV 是造成 PMWS 的主要病原；二者混合感染引起伴有淋巴细胞增生性支气管炎的间质性肺炎和不同程度的肝炎，淋巴结多呈界限明显的块状出血，可能是具有诊断意义的病理变化。PCV2 和 PRRSV 混合感染能加重对仔猪造成的病理损伤；血清学试验证实 PRRSV 与 PCV2 混合感染不会对仔猪在 PRRS 体液免疫方面产生干扰。

参考文献

1. 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第二版,北京:科学出版社,1997.
2. 蔡雪晖,柴文君,翁长江等.猪繁殖与呼吸综合症及其在我国的现状与对策.中国预防兽医学报 2000,22 (增刊):202~205.
3. 陈博文,孙颖杰,罗长保等.猪繁殖和呼吸综合症的血清学检测及病毒的分离和鉴定.中国兽医杂志,1996,22(5):6~8.
4. 郭宝清,陈章水,刘文兴等.从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究.中国畜禽传染病,1996,2:1~4.
5. 姜平,陈溥言,蔡宝祥等.我国猪生殖和呼吸综合症病毒基因型鉴定.中国兽医学报,1999,19(2):121~123
6. 蒋小红,黄伟坚,连慧香等.猪繁殖与呼吸综合症病毒和猪圆环病毒 II 型混合感染的诊断.广西畜牧兽医,2003,19 (3):106~108.
7. 郎洪武,张广川,吴发权等.断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测.中国兽医科技,2000,30(3):3~5.
8. 李玉峰,王先炜,姜平等.上海地区出现猪繁殖与呼吸综合症和猪圆环病毒 II 型混合感染.中国兽医学报,2003,23(5):442~444.
9. 芦银华,许立华,华修国等.猪圆环病毒 2 型及猪繁殖与呼吸综合症病毒的快速检测.中国病毒学,2003,18(2):184~186.
10. 裴建武,甘孟侯.猪流行性流产和呼吸系统综合症.中国兽医杂志,1992,18(7):42~43.
11. 卫秀余,余红梅,宋文秀等.48 个发生 PRDC 的猪群中病原体的检测结果.今日养猪业,2004,3:44.
12. 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第 2 版,北京:科学出版社,1997.
13. 赵耘,刘尚高,陈博文等.猪生殖和呼吸综合症中国分离株 ORF7 基因的克隆及鉴定.中国兽医杂志,1998,24(10):3~6.
14. 赵得明.猪病学.第八版.中国农业大学出版社,1999
15. 周俐兵,樊银珍.猪圆环病毒和 PRRSV 在断乳仔猪群中并发感染. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2003, 135(19):34~35.
16. 周继勇,陈庆新,叶菊秀,等.猪圆环病毒 2 型感染的血清学分析.中国兽医学报,2004,24(1):1~3.
17. Atsushi O, Keiichi A, Katsuhiko T, et al. Detection of porcine circovirus form lesions of a pig with wasting disease in Japan[J]. J Vet Med Sci, 1999, 61:1119~1123.
18. Allan G, Meehan B, Todd D. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes[J]. Veterinary Record, 1998, 142(17):467~468.
19. Allan GM, Mackie DP, McNair J, et al. Production, preliminary characterizations and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus. Vet Immunol Immunopathol 1994, 43(4):357~371.

20. Allan GM, McNeilly F, Ellis J, et al. Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Archiv virol*[J]. 2000, 145: 2421~2429.
21. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, et al. PCV2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990 Porcine dermatitis and nephropathy syndrome[J]. *Vet Rec*. 2000, 146: 711~712.
22. Allan GM, McNeilly F, Meehan B, et al. Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV2[J]. *Vet Rec*. 2002, 150: 255~256.
23. Ana R, Resendes, Natàlia Majó, et al. Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2[J]. *J Gen Virol*. 2004; 85: 2837~2844.
24. Cavanaugh D. A new order comprising coronaviridae and arteriviridae. *Arch virol*, 1997, 65: 629~633.
25. Chang HW, Jeng CR, Liu JJ, et al. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon- α [J]. *Vet Microbiol*. 2005, 108(3~4): 167~177.
26. Cheung AK and Bohn SR. Kinetics of porcine circovirus type 2 replication. *Arch Virol*, 2002, 147: 43~58.
27. Cheung A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2. *Virology*, 2003, 305(1): 168~180.
28. Chianini F, Majo N, Segales J, et al. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associated lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)[J]. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003, 94(1-2): 63~75.
29. Choi C, Chae C. Colocalization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2 in Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome by Double-Labeling Technique[J]. *Vet Pathol*. 2001, 38: 436~441.
30. Chung WB, Chan WH, Chaung HC, et al. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs[J]. *J Virol Methods*. 2005, 124(1-2): 11~19.
31. Circovirus 2 in Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome by Double-Labeling Technique[J]. *Vet Pathol*. 2001, 38: 436~441.
32. Collins J E, Benfield D A, Goyal S M, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus in North American and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest*, 1992, 4: 117~126.
33. Den Boon J A, Snijder E J, Chirnside E D. et al. Equine arteritis virus is not a togavirus but belongs to the coronavirus superfamily. *J. Virol*, 1991, 65: 2910~2920.
34. Fenaux M, Halbur PK, Gill M, et al. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential

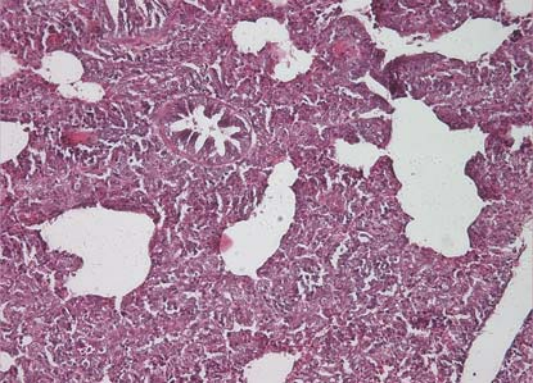
- PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV1 and PCV2. *J Clin Microbiol*, 2000,2494~2503.
35. Hamel AL, Lin LL, and Nayar GP. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol*, 1998,72:5262~5267.
36. Harding R M, Burns T M, Hafner G, et al. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J Gen Virol*, 1993,74:323~328.
37. Harms PA, Sorden SD, Halbur PG, et al. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vet Pathol*. 2001,38(5): 528~539.
38. Hooper C L, Van Alstine W G, Stevenson G W, et al. Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. *J Vet. Diagn. Invest*, 1994,6:13~15.
39. Ivelson E A, Christopher-Ikenning J, Drew T, et al. Differentiation of U.S. and European isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiology*, 1993,334:3184~3189.
40. KwangSoo Lyoo, YongHo Park, and BongKyun Park. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea[J]. *J Vet Sci*. 2001,2(3):201~207.
41. Liu Q, Tiskoo S, and BablFrance LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*, 2001,285:91~99.
42. Mankertz A and Hillenbrand B. Analysis of transcription of porcine circovirus type 1. *J Gen Virol*, 2002,83:2743~2751.
43. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndrome in pigs. *J Gen Virol*, 1998,79:2171~2179.
44. Meng X J, Paul P S, Halbur P G, et al. Phylogenetic analysis of the putative M(ORF6) and N(ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the US and European. *Arch Virol*, 1995,140:745~755.
45. Molnar T, Glavits R, Szeredi L, et al. Occurrence of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Hungary. *Acta Vet Hung*, 2002,50(1):5~16.
46. Murtaugh M P, Elam M R, Kakach L T, et al. Comparison of the structural protein coding sequence of the VR-2332 and Ielystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol*, 1995,140:1451~1460.
47. Nawagitgul P, Morozov I, Sirinarumit T, et al. Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization. *Vet Microbiol*, 2000,75(1):83~89.
48. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S, et al. Open reading frame 2 of porcine

- circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*,2000,81:2281~2287.
49. Pallares FJ, Halbur PG, Opriessnig T. Porcine circovirus type 2 coinfections in U.S field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.2002,14:515~519.
50. Pesch S, Johannsen U, Strijkstra G. Screening for pathogens in PCV2 associated disease [A].*Proceedings of the 4th Congress of the International Pig Veterinary Society*[C].Rome:Palazzo dei Congressi.2003:205~206.
51. Pogranichny RM, Yoon Kyoung-Jin, Harms PA,et al. Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection. *Viral Immunol*, 2000,13:143~153.
52. Potter R. 'Serum therapy' in pigs as a treatment for PMWS/PDNS[J]. *Vet Rec*,2002, 150(7):222~223.
53. Raye W, Muhling J, Warfe L, et al.The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd[J]. *Aust Vet J*.2005,83(5):300~304.
54. Segales J, Domingo M, Chianini F,et al. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs[J]. *Vet Microbiol*.2004,98(2): 151~158.
55. Segales J,Sitjar M, Domingo M. First report of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in spains[J].*Veterinary Record*,1997,14(23):600~601.
56. Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, et al.Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome[J].*Am J Vet Res*.2004,65(1):88~92.
57. Tischer I, Peters D, Rasch R, et al. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol*, 1987,96(1-2):39~57.
58. Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, Boersma WJ,et al.The presence of co-infections in pigs with clinical signs of PMWS in The Netherlands: a case-control study[J]. *Res Vet Sci*.2004,77(2):177~184.
59. Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M A, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: isolation of Lelystad virus. *Vet Q*,1991,3:121~130.
60. Yoon I J, Joo H S, Christianson W T, et al. An indirect fluorescent antibodies test for the detection of antibodies to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine serum. *J.Vet.Diagn.Invest*,1992,4:144~147.

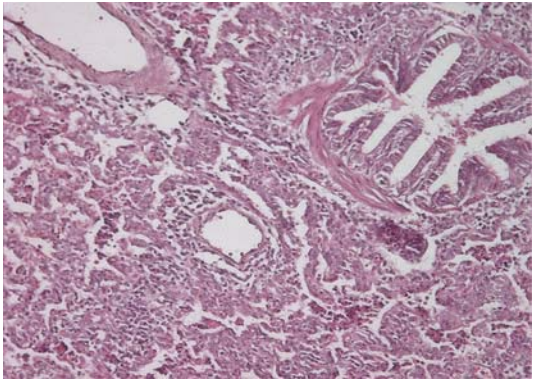
附 录

一、病理图片

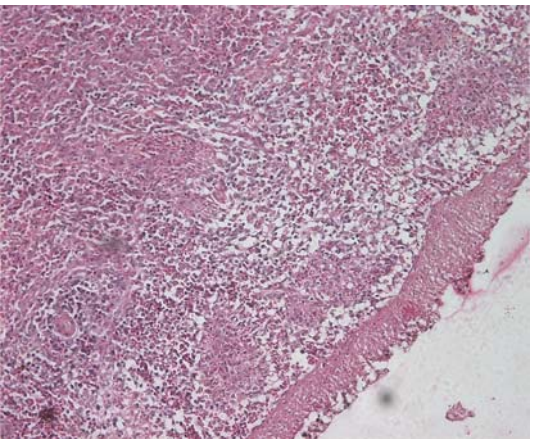
混合感染组猪病理切片：



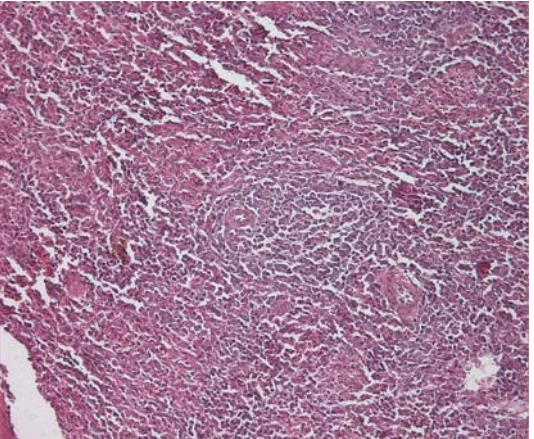
附图1 肺病变×20（肺泡隔增宽）



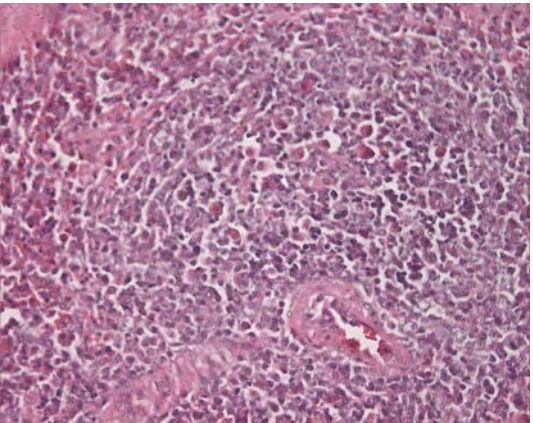
附图2 肺脏病变×20（动脉炎气管炎）



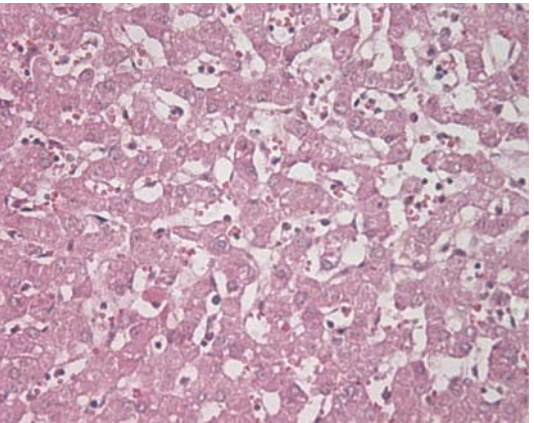
附图3 脾脏病变×20（被膜增厚）



附图4脾脏病变×20（中心淋巴结核浓缩）

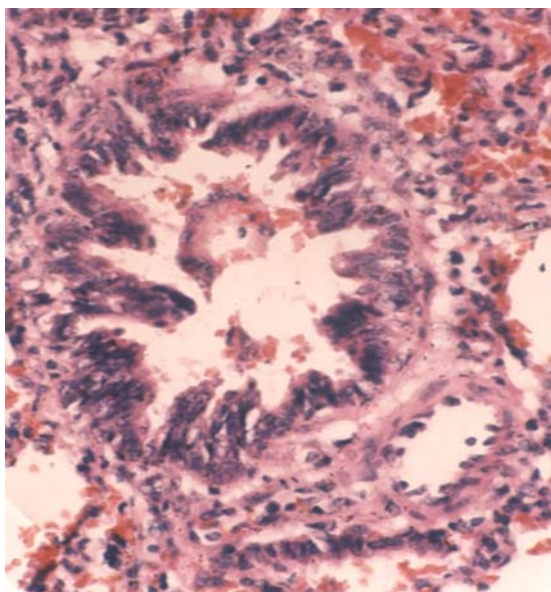


附图5 脾脏病变×20（滤泡肿大破碎，界限不清）

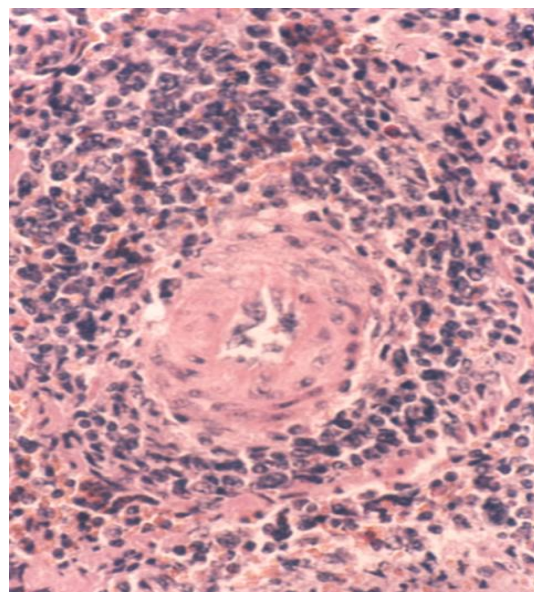


附图6 肝病变×40（肝窦增宽淤血）

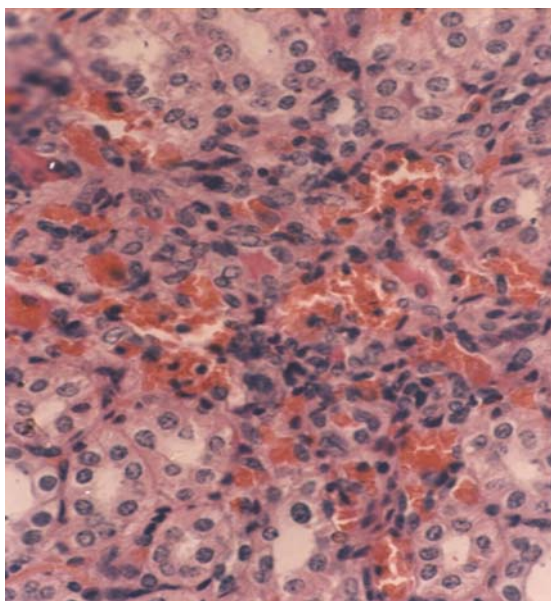
PRRSV组猪病理切片：



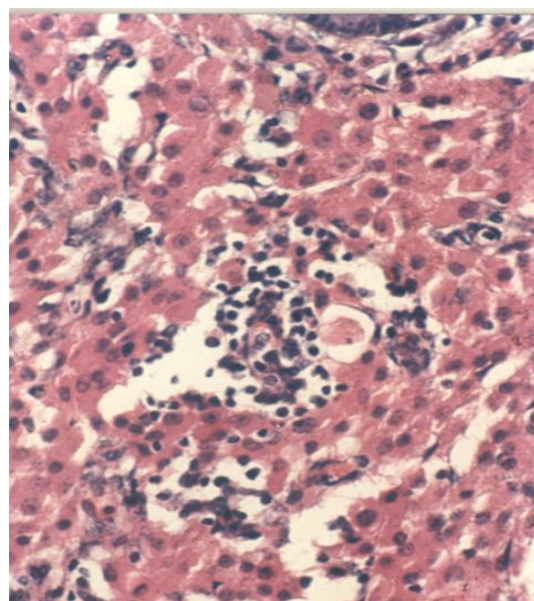
附图 7 肺病变×20（肺泡隔增厚）



附图 8 脾病变×20（滤泡较小、生发中心不明显）

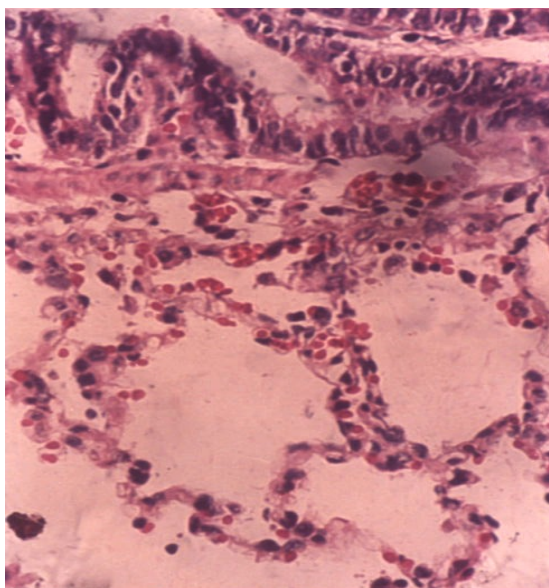


附图 9 肾病变×20（淋巴细胞浸润）

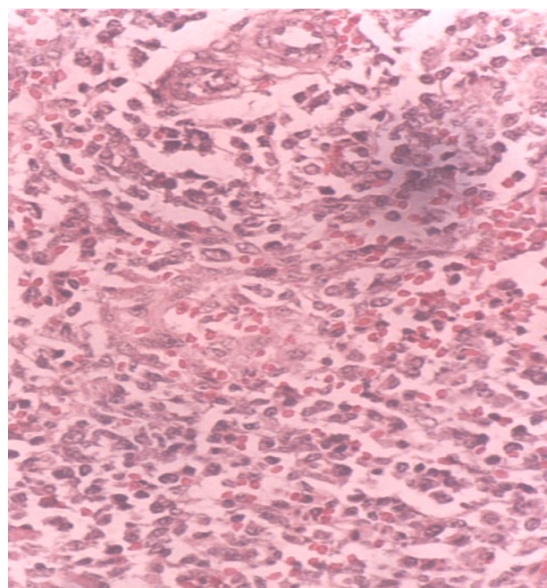


附图 10 肝病变×20（肝细胞颗粒变性）

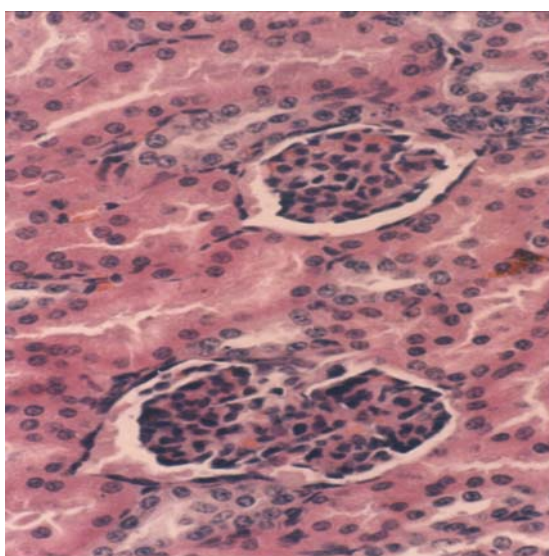
空白对照组猪病理切片：



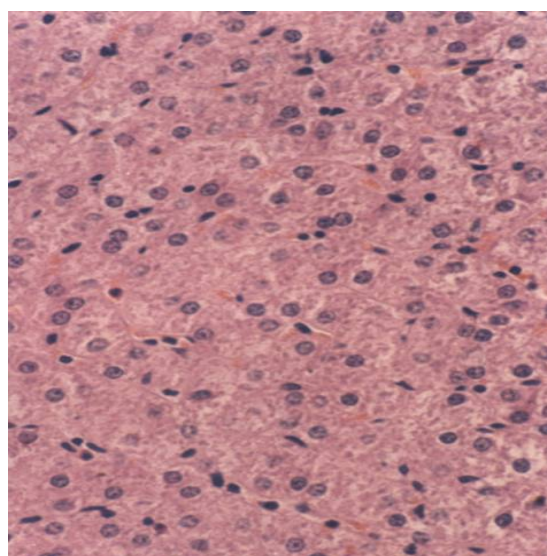
附图 11 肺正常切片×20



附图 12 脾正常切片×20



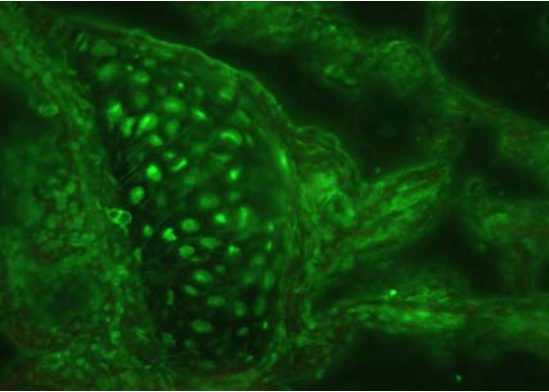
附图 13 肾正常切片×20



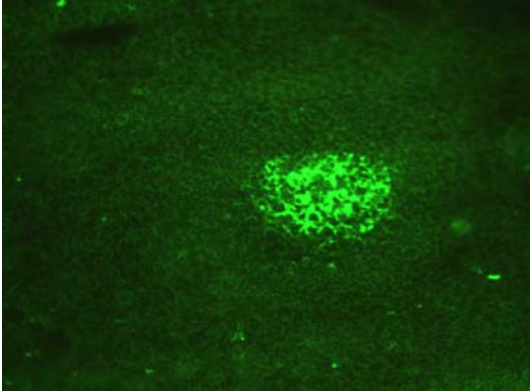
附图 14 肝正常切片×20

二、组织间接荧光试验结果

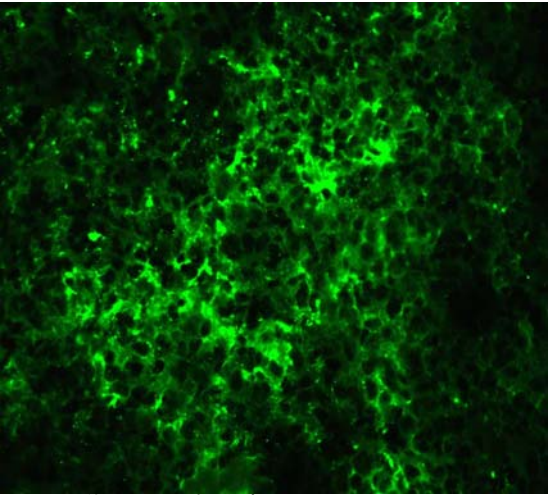
混合感染试验组猪



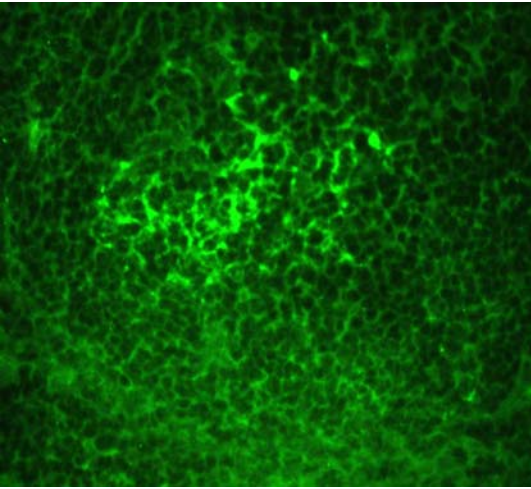
附图 15 肺脏中PCV2 ×40



附图 16 淋巴中心区中PRRSV ×20

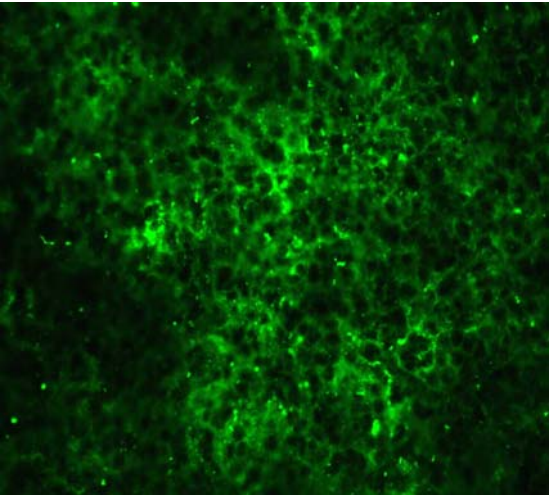


附图 17 肺脏中PRRSV ×20

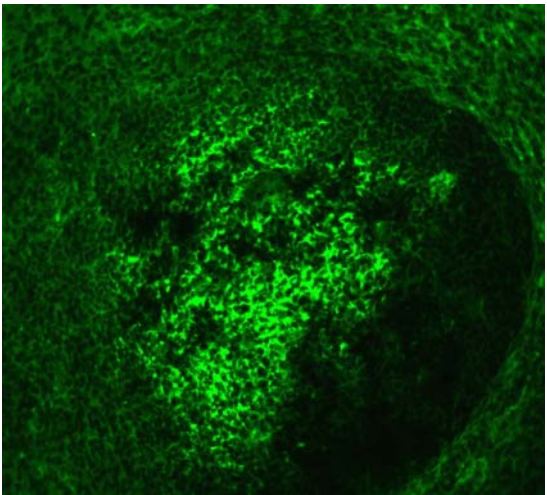


附图 18 淋巴中心区的PCV2 ×20

PRRSV单独组猪

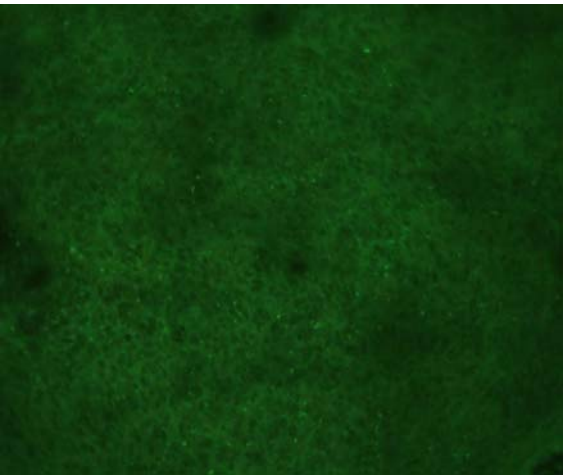


附图 19 肺脏细胞荧光×20

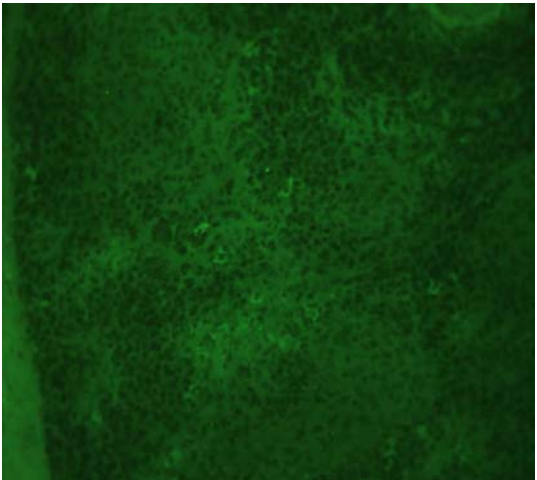


附图 20 淋巴滤泡中心区荧光×20

空白对照组猪



附图 21 对照组肺泡隔荧光阴性×20



附图 22 淋巴滤泡周边区×20

三、常用溶液的配制

1 LB 培养基

胰化蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g

调 pH 值至 7.0 加水至 1000ml

2 溶液 I 的配制 (pH8.0)

50mmol/L	葡萄糖
25mmol/L	Tris-HCl
10mmol/L	EDTA

高压灭菌 15min, 4℃ 贮存

3 溶液 II 的配制

0.2mol/L NaOH	(10mol/L 贮存液现用现稀释)
1% SDS	(10% 贮存液现用现稀释)

4 溶液 III 的配制

5mol/L 乙酸钾	60ml
冰乙酸	11.5ml
水	28.5ml

5 PBS 缓冲液的配制 (1×PBS)

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.44g
KH ₂ PO ₄	0.24g

调 pH 至 7.4, 加去离子水至 1000ml

6 200mg/ml IPTG 的配制

IPTG 2g
加 8ml 水定容至 10ml
0.22um 滤器过滤分装-20℃保存

7 30% 丙烯酰胺的配制

丙烯酰胺 29g
N, N'-亚甲双丙烯酰胺 1g
加 60ml 水 37℃溶解 定容 100ml (pH 不大于 7)
0.45um 滤器过滤棕色瓶室温保存

8 1.0 mol/L Tris (pH 6.8)

Tris 碱 12.114g

将 12.114g Tris 碱溶于少量双蒸水中, 用 1mol/L HCl 将 pH 值调至 6.8, 再定容至 100ml, 于 4℃冰箱保存。

9 1.5 mol/L Tris (pH 8.8)

Tris 碱 18.17g

将 18.17g Tris 碱溶于少量双蒸水中, 用 1mol/L HCl 将 pH 值调至 8.8, 再定容至 100ml, 于 4℃冰箱保存。

10 Tris-甘氨酸电泳缓冲液 5×贮存液

Tris 碱 15.1g
甘氨酸 94g
10%SDS 50ml
加去离子水至 1000ml

11 10%过硫酸铵

过硫酸铵 1.0g
双蒸水 10.0ml
用前配置, 4℃保存不超过一周。

12 2×SDS 凝胶加样缓冲液

100mmol/L Tris-HCl (pH6.8)
200mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)
4% SDS (电泳级)
0.2% 溴酚蓝
20% 甘油

13 染色液

甲醇	90ml
水	90ml
冰乙酸	10ml
考马斯亮蓝（R250）	0.25g
溶解后滤纸过滤除去颗粒状物质。	

14 脱色液

甲醇	90ml
水	90ml
冰乙酸	10ml

15 转移缓冲液

甘氨酸	2.9g
Tris 碱	5.8g
SDS	0.37g
甲醇	200ml
加水至	1000ml

16 5mol/L NaOH

NaOH	20g
双蒸水	100ml

17 封闭液

脱脂乳	5g
10mmol/L PBS	100ml

18 Hank's 液

NaCl	8.00g
KCl	0.40g
NaHPO ₄ ·12H ₂ O	0.134g
NaHCO ₃	0.35g
1%酚红	2ml

加去离子水至 1000ml，10 磅高压灭菌 20min，4℃ 储存备用。

19 0.25%胰酶

NaCl	8g
KCl	0.4g

柠檬酸钠 ($5\text{H}_2\text{O}$)	1.12g
磷酸二氢钠 ($2\text{H}_2\text{O}$)	0.056g
NaHCO_3	1g
葡萄糖	1g
胰酶	2.5g

加去离子水至 1000ml 用滤器过滤除菌，分装后置 -20°C 备用。

20 洗液 (PBS-T)

NaCl	8g
KCL	0.2g
Na_2HPO_4	1.44g
KH_2PO_4	0.24g
Tween-20	0.05%
调 pH 至 7.4，加去离子水至 1000ml。	

21 裂解液：

	0.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	2.0 ml
蛋白酶(20mg/ml)	5 μl	10 μl	15 μl	20 μl
SDS (10%[w/v])	25 μl	50 μl	75 μl	100 μl
NaCl (5mol/v)	10 μl	20 μl	30 μl	40 μl
TE (PH=8.0)	460 μl	920 μl	1380 μl	2300 μl

22 细胞培养液配方记录：

在 500ml 的转瓶 MEM 培养液中加入：

SP :	0.25 %	【 2.5ml/瓶 】
血清：	6 %	【 30ml/瓶 】

一般换液时用 2~3 % 的血清，传代就用 6 % 的血清。

23 待检样品缓冲液 PBS

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.85 g	【 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.42 g 】
KH_2PO_4	0.20 g	
NaCl	8.50 g	

加无离子水至 1000ml 【一般配成 10 倍浓度的原液，用时稀释】

24 荧光抗体稀释液：

伊文思兰	15 μl	【 衬染液 】
荧光二抗	125 μl	
PBS	6ml	

于96孔板中加入50 μ l /孔

25 缓冲甘油配制：

碳酸钠 8.0 ml

碳酸氢钠 8.5ml

致 谢

值此论文完成之际，首先向尊敬的导师——中国农业科学院哈尔滨兽医研究所蔡雪辉副研究员致以崇高的敬意和由衷的感谢。导师渊博的知识，无私忘我的工作作风，严谨治学的态度，严于律己、宽以待人、虚怀若谷的情怀，实事求是、一丝不苟、热情育人和克己奉公的精神将永远铭记在我心中，我将终生受益。三年来，导师在学术上给予的精心指导、生活和工作方面给予无微不至的关怀，使我顺利完成了学业。在此，谨向导师表示由衷的感谢和敬意。

衷心感谢所在猪病室生殖课题组成员刘永刚老师、李艳华老师、王淑杰老师及师兄姜成刚博士、师弟吴国军、刘荻荻和石文达硕士在试验中给予的配合和大力帮助。同时也特别感谢本试验室的刘成杰女士在我试验中所做的大量准备工作，使我有一个良好的试验环境。

特别感谢维科公司蓝耳病生产组王洪峰老师、李桂枝、许淑芳、刘全贵、李娟等各位长辈在生活 and 试验上的热情帮助。特别向尊敬的王洪峰老师致以崇高的敬意，正是您在生活上无微不至的关怀，试验上严格的要求使我逐渐成长起来。

同样的谢意献给同学樊树芳博士、孙东波博士、童铁钢博士、郭设平硕士、侯强硕士、李兆利硕士、于茂荣硕士、周玉长硕士、杨春富硕士、张庆霞硕士、温志远硕士、秦立庭硕士。

感谢病理试验室尹训南副研究员和韩凌霞副研究员在试验中的帮助和支持，同样感谢仇华吉研究员在我论文撰写当中提出的中肯意见。

借此机会，向培养我、支持我的父母及弟弟致以最诚挚的敬意和深情的谢意，是他们的殷切期望和无私奉献使我顺利完成学业。

真挚地向所有关心和帮助我的亲友、同学表示衷心的感谢！

作者简历

温永俊，男，1979年出生，内蒙古自治区呼和浩特市人。2003年7月毕业于内蒙古农业大学，获得农学学士学位，同年考入中国农业科学院攻读硕士学位，2004年7月回哈尔滨兽医研究所疫病室从事论文研究，师承蔡雪辉副研究员。在第一学年里作为志愿者参加了第15届国际植物保护大会，获得了“优秀志愿者”荣誉称号，硕士期间在国家核心期刊发表论文2篇。

论文发表情况：

1. 温永俊,蔡雪辉.PCV2 和 PRRSV 混合感染研究进展.中国预防兽医学报,待发表。
2. 王洪峰,蔡雪辉*刘永刚,李艳华,柴文君,温永俊,尹训南,褚桂芳.猪繁殖与呼吸综合征活疫苗对仔猪的安全性研究.中国预防兽医学报 2006 ,28: (增刊) 341~343.