

从陕甘地区猪场检测出PCV3流行毒株感染

朱小甫, 吴旭锦, 张文娟, 熊忙利

(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 712046)

摘要:【目的】为了调查陕甘地区猪场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, 设计并合成了一对引物, 从96个猪场样本中进行PCV3检测, 将阳性样品进行序列测定分析, 同时对PCV3阳性样本进行6种常见猪群病毒病检测。【结果】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种常见猪群病毒病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%之间, 与不同地域参考毒株同源性在97.6%~100%之间。【结论】结果显示, 陕甘地区2015年样本中即存在PCV3感染, 不同地区的PCV3基因同源性高, PCV3遗传稳定, 基因进化树显示不同地域PCV3毒株交叉分布, 没有显著的地域特征。

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: S852.651

文献标识码: A

文章编号: 94047-(2018)03-07

猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)是单股环状DNA病毒, 直径为17nm, 是迄今发现最小动物病毒^[1-3]。PCV分为3个基因型, PCV1是在污染的PK-15细胞中发现, 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Palinski等^[9]从患病母猪及流产胎儿体内鉴定出一种新病毒, 其基因组长2.0kb, 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是一种新的病原。

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]对我国江苏、湖南与湖北疑似猪皮炎肾病综合征的病猪组织样品进行PCV3巢式PCR检测, 结果首次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]采用PCR对广西某猪场腹泻死亡仔猪的病料样品进行PCV3检测, 结果检测到PCV3阳性, 序列分析发现13株国内PCV3毒株和5株美国PCV3毒株的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]10个省区106份样品进行PCR检测并测序分析, 结果表明, 安徽、江西、山东、福建、河南与广西存在阳性猪场, 106个样品中检测PCV3阳性的样品为19例, 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, 检出阳性样本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, 本课题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, 以期对防控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或由猪场送检, 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, 共来自96个猪场, 每个猪场的组织病料按照脏器种类研磨处理, 13000g离心10min, 收集上清液-70℃保存备用。

收稿日期: 2018-06-11

基金项目: 陕西省科技计划项目“陕西省猪圆环病毒3型流行病学调查研究”(2017NY-097)

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

1.1.2 试剂与仪器 DNAiso Reagent、RNAiso plus、rTaq酶、dNTP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, 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), 经过综合分析对比, 设计了2条引物, 其序列如下, PCV3-F: 5'-TTGAACGGTGGGGTCATATGTGT-3' (1445-1467), PCV3-R: 5'-AGATGAAAGTTACTACTCAGCCC-3' (1734-1713), 预期PCV3毒株扩增出290bp条带。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 工作浓度为20 μmol/L。

1.2.2 其他常见6种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性疾病的混合感染, 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, 对PCV3阳性样品进行这6种病原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 μL置于无菌1.5 mL离心管, 加入DNAiso Reagent 700 μL, 颠倒混匀后静置裂解10 min, 加入600 μL -20 °C保存的无水乙醇, 混匀后沉淀10 min。4 °C、13000 g离心10 min, 弃去上清, 加入1 mL -20 °C保存的70%乙醇, 轻轻颠倒数次, 弃去清洗的乙醇, 13000 g离心1 min, 用移液器吸取残留在管底的乙醇弃去, 离心管倒置在无菌滤纸上干燥2 min, 用40 μL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检测 用提取的病料或血清DNA溶液做为模板, 进行PCV3目的基因扩增。25.0 μL反应体系中, DNA模板 2.0 μL, 10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTP 2.0 μL, PCV3-F、PCV3-R、rTaq DNA聚合

酶各0.5 μL, 超纯水17.0 μL, 混合均匀。PCR条件为95 °C预变性5 min, 进入循环后94 °C 40 s变性, 58 °C退火45 s, 72 °C延伸45 s, 共进行35个循环, 循环结束后72 °C延伸10 min。反应完成后取5.0 μL 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种常见猪病毒病检测 直接用PCV3阳性样品DNA模板进行PCV2和PRV检测, 条件见参考文献[15,18]。CSFV、PRRSV、PEDV和TGEV4种RNA病毒检测, 首先进行RNA的提取与第一链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 μL, 混合750 μL RNAiso plus裂解10 min, 加200 μL氯仿后剧烈振荡乳化, 静置10 min后于4 °C、13 000 g离心10 min; 吸取600 μL上清液置入另一离心管中, 加入750 μL异丙醇混匀后在-20 °C沉淀20 min; 4 °C、13000 g离心10 min, 弃去上清液, 加入1 mL 75%酒精洗涤1次, 弃去酒精, 倒置离心管自然干燥即得总RNA。用CSFV、PRRSV、PEDV和TGEV的检测方法反转录反应液分别溶解核酸, 置37 °C水浴反转录90 min, 即得相应病毒的cDNA模板, 按照参考文献[14,16,18]的体系与条件进行检测。

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 °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。获得的序列用DNASTAR软件进行核苷酸同源性比较分析, 并绘制系统发生树。

2 结果与分析

2.1 样品中PCV3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份样品出现290bp的目的条带, 即有8份阳性结果(见图1), PCV3阳性率为8.33%。

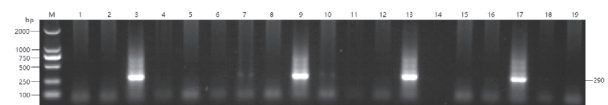


图1 部分样品PCV3检测电泳结果
M: DNA分子质量标准; 3,9,13,17: 样品中PCV3阳性结果;
1,2,4,5,6,7,8,10,11,12,14,15,16,18,19: 样品中PCV3阴性结果
Fig.1 The result of detection PCV3 from some samples
M: DNA Marker; 3,9,13,17: positive results of PCV3;
1,2,4,5,6,7,8,10,11,12,14,15,16,18,19: negative results of PCV3

8份阳性样品来源与分布见表1。从表1可见, 存在PCV3阳性样品, 样品来源多样, 小肠及内容物、流产胎儿、肺脏、肝脏、脾脏以及血清中均可检出PCV3。

表1 PCV3阳性样品来源与分布情况

Table 1 Sources and distribution of PCV3 positive samples

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

2.2 PCV3阳性样品中6种常见猪病毒病检测结果 PCV2、PRV、CSFV、PRRSV、PEDV和TGEV检测应用PCR/RT-PCR技术对8份阳性样品进行检测, 检测结果见表2。

表2 PCV3阳性样品其他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	PCV3	PCV2	PRV	CSFV	PRRSV	PEDV	TGEV
12	+	-	-	-	-	+	-
20	+	+	-	-	-	-	-
25	+	+	+	-	+	-	-
35	+	-	-	-	-	+	+
40	+	-	-	-	-	+	-
58	+	-	-	-	-	-	-
59	+	-	+	-	-	-	-
86	+	+	-	-	+	-	-

注: “+”表示病原检测阳性, “-”表示病原检测阴性。

Note: "+" indicates positive pathogen detection, and "-" indicates negative pathogen detection.

从检测结果可以看出, 在检测的7种病原中, PCV3单一感染的仅1份(58号), 其他均为混合感染, 混合感染率为87.5%(7/8)。25号病原最为复杂, 存在PCV3、PCV2、PRV和PRRSV四重混合感染。与PCV3混合感染最多的病种是PCV2与PEDV, 均为37.5%(3/8)。

2.3 PCV3基因片段序列分析比对结果

PCV3阳性PCR产物纯化回收后连接载体测序分析, 获得了8株PCV3流行毒株290bp基因片段。从GenBank上下载我国不同地区、美国、韩国、意大利和巴西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DNASar软件进行序列比对分析, 核苷酸同源性见表3, 构建的基因进化树见图2。

表3 8株PCV3流行毒株与20株参考毒株核苷酸序列的同源性

Table 3 Nucleotide homology of 8 PCV3 epidemic strains 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	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	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	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	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	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		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	100	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	100	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	100	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	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

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	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	100	100	98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
13	100	100	100	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	100	98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
16	100		100	98.6	99.7	98.6	99.0	99.3	99.7	99.7	98.3	99.7	99.0	98.6
17	100	100		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	98.3	100	99.0	98.6
24	99.0	99.0	99.0	95.8	96.9	99.0	96.9	97.9	100		98.3	100	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	100	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 RS 8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. 1-28 represents the strains 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 RS 8、PCV3-CHN CC2016、PCV3-CHN GD2016、PCV3-IT MN2017、PCV3-US MN2016、PCV3-US Mo2015.

从表3数据可见，28株PCV3基因片段核苷酸同源性在97.6%~100%之间，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%之间，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%。

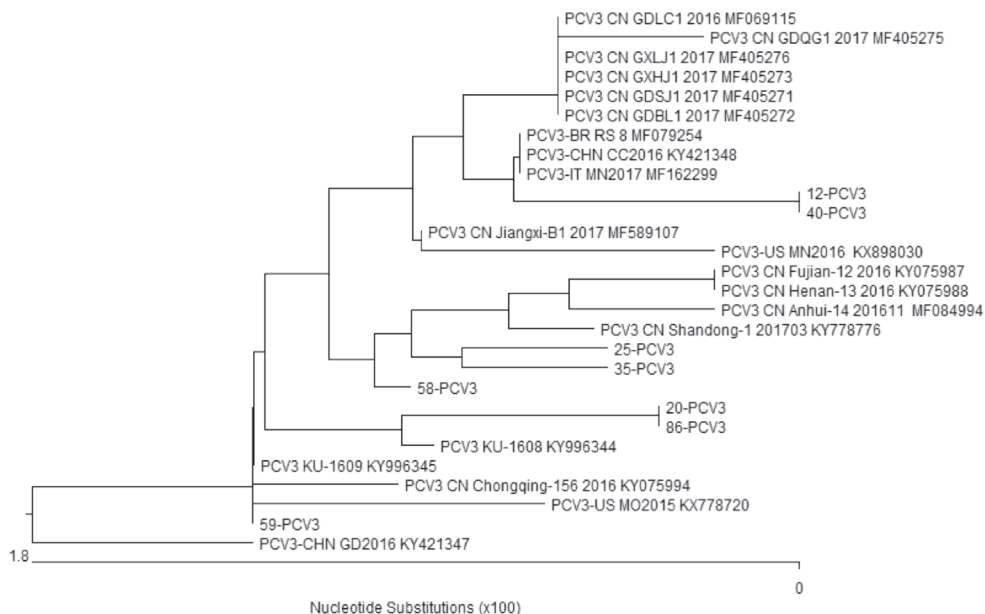


图2 PCV3基因进化树 Fig. 2 Evolution tree of PCV3 gene

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。

3 讨论

由于PCV3是2016年才首次鉴定的新病毒, 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, 设计了一对引物, 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%, 研究首次证实了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年连续检出PCV3阳性样品。国内有学者亦通过公开的PCV3序列设计引物进行盲检, 同样发现猪场感染PCV3, 结果基本一致^[10-14,24]。从样品来源来看, 小肠及内容物、流产胎儿、肺脏、肝脏、脾脏以及血清中均检测到PCV3阳性, 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%之间, 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. 2007. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 230(2): 244-250.
- [3]Shang S B, JinYL, Jiang X, et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2[J].Molecular Immunology,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 chainreaction, 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 JL, Hansard E, Clark J, et al. Isolation of circovirns from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. CanVet 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]. Virology, 2016, 91(1): doi: 10.1128/JVI01879-16.
- [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 D, 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 mufti-systemic inflammation[J]. *Virology*, 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.

[责任编辑: 王军利]

(下转第61页)