

猪库布病毒 RT-PCR 检测方法的建立 及湖北省流行病学初步调查

胡军勇¹ 汤细彪² 胡睿铭² 刘望宏¹ 倪德斌¹ 吴 斌^{2,3}

1. 华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学动物传染病诊断中心, 武汉 430070;
3. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 根据猪库布病毒的 3D 基因设计 1 对引物, 建立了两步法 RT-PCR 检测方法, 使用该方法分别对 CSFV、PRRSV、JEV、SIV、PEDV、TGEV、GARV 阳性模板及包含猪肠道病毒 3D 基因和口蹄疫病毒 3D 基因的重组质粒进行 PCR 检测, 结果从以上 9 种常见猪病病原的阳性模板中均不能扩增出 323 bp 大小的 PCR 产物, 说明该检测方法的特异性很好, 能够用作临床样品的检测。敏感性试验显示, 本试验建立的检测方法能够检测到的模板最低质量浓度为 180 fg/mL。应用该方法对湖北省各大猪场进行了临床病料检测, 在采集的 165 份病料中有 118 份样品检测为猪库布病毒阳性。在 4 个发生腹泻疫情的规模化猪场进行了分群抽样调查, 结果显示, 猪库布病毒在猪群中集中分布在发生腹泻疫情的猪群, 说明猪库布病毒和现阶段的腹泻疫情有紧密的联系。

关键词 猪库布病毒; RT-PCR; 检测方法; 腹泻; 流行病学调查

中图分类号 S 852.65⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)04-0485-05

猪库布病毒是一种单股正链 RNA 病毒, 具有 30 nm 直径的球形衣壳, 无囊膜, 基因组大小在 8 000 bp 左右。猪库布病毒 (porcine kobuvirus) 和人的嗜病毒 (aichi virus)、牛库布病毒 (bovine kobuvirus) 同属于库布病毒属, 微小 RNA 病毒科^[1-3]。

库布病毒是由日本科学家首先在 HeLa 细胞中发现的^[4]。在 2008 年, 匈牙利科学家最先在猪的粪便中分离到库布病毒^[5], 随后世界多国均报道了猪库布病毒的存在^[3,6]。现在已经证实嗜病毒可以导致婴幼儿的急性腹泻^[2]。猪库布病毒和牛库布病毒, 以及嗜病毒高度同源, 均定殖于肠道, 因此人们推测这 2 种病毒也能导致家畜, 特别是幼畜的腹泻。2009 年, 我国科学家也在腹泻猪的粪便中发现了猪库布病毒^[7]。根据 Wang 等^[8]在上海周边做的流行病学调查, 猪库布病毒的阳性率为 32.4%~46.7%。目前对猪库布病毒的致病机制、感染周期, 流行规律等方面了解非常有限, 非常有必要对其深入研究。

从 2010 年底开始, 我国大范围暴发了猪腹泻的疫情, 以新生仔猪最为严重, 症状表现为呕吐、水样

腹泻、体质量下降及严重脱水。1 周龄以下的仔猪最为易感。此病的发病率和死亡率较高, 很多猪场的腹泻发病率达 100%, 死亡率接近 100%。腹泻疫情从 2010 年延续至今, 一直没有好转, 给我国的养猪业造成沉重的打击。根据最新文献报道, 在目前的腹泻疫情中, 猪流行性腹泻病毒的感染率最高, 达 82.0%^[9-10]。因此推测, 猪流行性腹泻病毒在这次腹泻疫情中扮演着非常重要的角色。但不能排除存在其他病毒混合感染、协同感染的可能性。近年来, 多种和腹泻相关的新病毒被发现, 其中猪库布病毒的感染率尤其高, 引起了全世界范围的广泛关注。但是国内尚没有公开发表的猪库布病毒的检测方法。本研究成功地建立了一种能快速、准确、敏感地检测猪库布病毒的 RT-PCR 检测方法, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 RT-PCR 引物

根据 GenBank 中猪库布病毒的 3D 基因序列设计 1 对引物。上游引物: 5'-CCTGTGCCTTCCG-

收稿日期: 2012-03-23

基金项目: 湖北省研究与开发计划项目 (2010BBB008)

胡军勇, 兽医师。研究方向: 动物疫病和种猪检测。E-mail: hjy0804@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 吴 斌, 教授。研究方向: 预防兽医学。E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

CATTGTT-3'; 下游引物: 5'-TGTACCTGTCGTA-AAACTCC-3'。此引物扩增的目的片段大小为 323 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 主要试剂

Trizol, Primescript RT-PCR kit, ExTaq 酶, dNTP, DL2000 marker, dNTP 购自宝生物(大连)有限公司。

1.3 标准阳性对照质粒的构建

标准阳性对照为华中农业大学动物传染病诊断中心构建的克隆有 3D 基因全长的质粒(pMD18T-kobu-3D)。

1.4 检测用腹泻样品

腹泻样品由华中农业大学动物传染病诊断中心收集, 馈赠。

1.5 粪便及肠道样品的处理

取肠道样品 200 mg 放入 2 mL 离心管中, 剪碎, 然后加入 1 mL 生理盐水, 混匀并且匀浆处理 5 min。匀浆后将样品离心, 6 000 r/min 离心 5 min, 4 °C 保存待用。如果是水样粪便样品, 取粪便样品 200 μ L 放入 2 mL 离心管中, 直接 12 000 r/min 离心 5 min, 4 °C 保存待用。

1.6 RNA 提取

取匀浆好的样品 200 μ L, 参照宝生物(大连)有限公司 Trizol 操作说明提取样品总 RNA。

1.7 两步法 RT-PCR 方法的优化

1) cDNA 合成。参照 Primescript RT-PCR kit 的说明书配制反转录体系, 合成 cDNA。

2) PCR 拟反应方法的建立。cDNA 模板 4 μ L,

ExTaq 1 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, dNTP 1 μ L, 加水至 50 μ L, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

3) 退火温度的优化。按本文“1.7”中 2) 拟定的反应体系加入各种成分, 设置退火温度为 52 ~ 62 °C, 对阳性样品进行 RT-PCR 扩增。

4) 引物用量的优化。上、下游引物剂量范围设在 0.2 ~ 2.2 μ L, 以 0.4 μ L 递增, 在筛选出的合适退火温度下进行目的基因的 RT-PCR 扩增。每个引物用量重复试验 2 次。

1.8 特异性试验

应用建立的检测方法分别对 CSFV、PRRSV、JEV、SIV、PEDV、TGEV、GARV 阳性样品, 及包含猪肠道病毒(PEV)3D 基因和口蹄疫病毒(FMDV)3D 基因的重组质粒(pMD18T-PEV3D, pMD18T-FMDV3D)进行检测, 以验证该方法的特异性。

1.9 敏感性试验

使用重组质粒 pMD18T-kobu-3D 作为标准阳性对照测试 PCR 方法的敏感性。通过紫外分光光度计检测, 重组质粒的质量浓度为 0.18 mg/mL, 将其分别稀释为 10^{-1} ~ 10^{-9} 作为模板, 按照已建立的方法进行 PCR 扩增。

1.10 临床病料检测

从湖北省 54 个规模化猪场采集的 165 份仔猪腹泻样品, 按照本文“1.5”描述的方法处理样品, 按照本文“1.6”描述的方法提取样品总 RNA。采用优化好的 RT-PCR 检测方法进行扩增, RT-PCR 产物

表 1 4 个规模化猪场采样分布和发病情况

Table 1 Samples distribution and corresponding clinical symptoms in four large-scale pig farms

采样群体 Sampling group	猪场 A Pig farm A		猪场 B Pig farm B		猪场 C Pig farm C		猪场 D Pig farm D	
	数量 Amount	症状 Symptom	数量 Amount	症状 Symptom	数量 Amount	症状 Symptom	数量 Amount	症状 Symptom
经产母猪 Sow	5	腹泻 Diarrhea	6	腹泻 Diarrhea	6	不腹泻 Non-diarrhea	6	不腹泻 Non-diarrhea
哺乳仔猪 Suckling piglet	10	腹泻 Diarrhea	15	腹泻 Diarrhea	15	腹泻 Diarrhea	12	腹泻 Diarrhea
保育仔猪 Nursery piglet	10	不腹泻 Non-diarrhea	15	腹泻 Diarrhea	10	腹泻 Diarrhea	15	不腹泻 Non-diarrhea
育肥猪 Fattening pig	5	不腹泻 Non-diarrhea	6	腹泻 Diarrhea	6	不腹泻 Non-diarrhea	5	不腹泻 Non-diarrhea
后备母猪 Gilt	5	腹泻 Diarrhea	6	腹泻 Diarrhea	6	腹泻 Diarrhea	5	腹泻 Diarrhea
种公猪 Boar	5	不腹泻 Non-diarrhea	3	不腹泻 Non-diarrhea	4	不腹泻 Non-diarrhea	3	不腹泻 Non-diarrhea
采样总数 Sum	40		51		51		46	

以 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

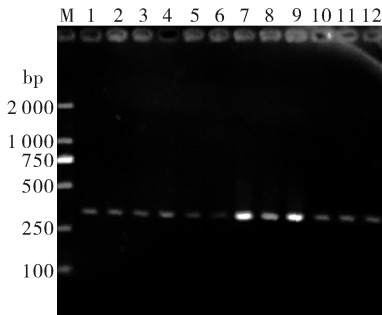
1.11 猪库布病毒在不同猪群中的分布调查

从 4 家规模化猪场按照不同年龄阶段采样, 采样方案及样品对应猪的疫情记录见表 1。应用 PCR 方法调查不同年龄段猪群中猪库布病毒的分布, 分析猪库布病毒和临床症状的关联。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 反应优化结果

1) 退火温度优化结果。由图 1 可知在 58.6 °C 时, 条带最亮, 最清晰, 扩增效率最高, 所以选择 58 °C 作为最适宜退火温度。

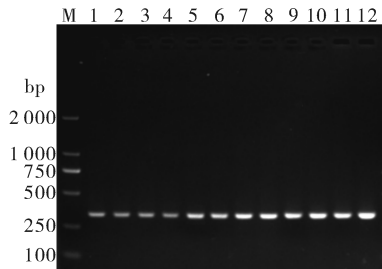


M: DL 2 000 DNA marker; 1: 52.5 °C; 2: 53.7 °C; 3: 54.3 °C; 4: 55.6 °C; 5: 56.5 °C; 6: 57.6 °C; 7: 58.6 °C; 8: 59.2 °C; 9: 59.8 °C; 10: 60.6 °C; 11: 61.7 °C; 12: 62.5 °C

图 1 退火温度优化结果

Fig.1 The result of annealing temperature optimization

2) 引物浓度优化结果。由图 2 可知引物用量在 1.0~2.2 μL 时均扩增出较亮的条带, 在保证扩增效率的前提下, 为了保证反应的特异性, 最后选择 1.0 μL 作为最佳引物用量。



M: DL 2 000 DNA marker; 1, 2: 0.2 μL; 3, 4: 0.6 μL; 5, 6: 1.0 μL; 7, 8: 1.4 μL; 9, 10: 1.8 μL; 11, 12: 2.2 μL.

图 2 引物用量优化结果

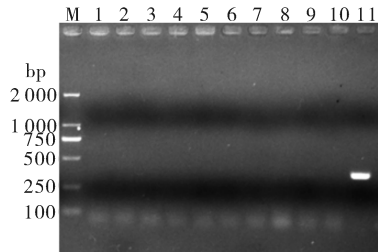
Fig.2 Result of primer concentration optimization

3) PCR 反应最终体系。cDNA 模板 4 μL, ExTaq 1 μL, 10×PCR buffer 5 μL, 上下游引物各 1 μL, dNTP 1 μL, 加水至 50 μL。反应条件为:

94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

2.2 特异性试验结果

应用所建立的检测方法分别对 CSFV、PRRSV、JEV、SIV、PEDV、TGEV、GARV 阳性样品, 以及 FMDV、猪肠病毒阳性质粒 pMD18T-PEV3D 和 pMD18T-FMDV3D 进行检测。结果只能从猪库布病毒阳性样品中扩增出相应大小的片段, 其他病毒阳性模板均不能扩增出任何条带 (图 3)。



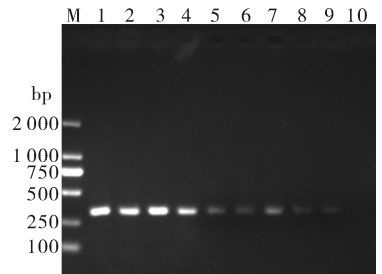
M: DL 2 000 DNA marker; 1: CSFV; 2: PRRSV; 3: JEV; 4: SIV; 5: PEDV; 6: TGEV; 7: GARV; 8: pMD18T-PEV3D; 9: pMD18T-FMDV3D; 10: 阴性对照 Negative control; 11: 阳性对照 Positive control.

图 3 特异性试验结果

Fig.3 Result of specific test

2.3 敏感性试验结果

将重组质粒分别进行 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 稀释并作为模板, 均能够扩增出目的条带, 但亮度随着稀释倍数增加而递减, 并且能够检出模板 DNA 的最低质量浓度为 180 fg/mL (图 4)。



M: DL 2 000 DNA marker; 1: 10^{-1} ; 2: 10^{-2} ; 3: 10^{-3} ; 4: 10^{-4} ; 5: 10^{-5} ; 6: 10^{-6} ; 7: 10^{-7} ; 8: 10^{-8} ; 9: 10^{-9} ; 10: 阴性对照 Negative control.

图 4 敏感性试验结果

Fig.4 Result of sensitivity test

2.4 临床腹泻样品检测结果

对湖北省 54 个规模化猪场采集的 165 份仔猪腹泻样品, 应用 PCR 方法检测猪库布病毒, 结果 118 份样品为阳性, 阳性率为 75.64%。

2.5 猪库布病毒在不同猪群中的分布调查

从 4 个规模化猪场按照不同年龄阶段采样,应用 PCR 方法调查不同年龄段猪群中猪库布病毒的分布,结果见表 2。共采集到 188 份样品,其中有腹泻症状的猪 120 头。检测结果显示猪库布病毒阳性的样品有 108 份。在这 108 份阳性样品中,共有 99

份样品对应的猪发生腹泻。因此,所有样品的猪库布病毒阳性率为 57.45%(108/188),其中腹泻猪的猪库布病毒阳性率为 99/120(82.5%),非腹泻猪的猪库布病毒阳性率为 9/68(13.23%)。根据表 2 结果,可以发现,猪库布病毒和猪场的腹泻症状有非常一致的对应关系。

表 2 4 个规模化猪场猪库布病毒检测结果及腹泻发病情况

Table 2 Porcine kobuvirus detection result and its corresponding symptoms

采样群体 Sampling group	猪场 A Pig farm A		猪场 B Pig farm B		猪场 C Pig farm C		猪场 D Pig farm D	
	阳性率 Positive rate	症状 Symptom	阳性率 Positive rate	症状 Symptom	阳性率 Positive rate	症状 Symptom	阳性率 Positive rate	症状 Symptom
经产母猪 Sow	5/5	腹泻 Diarrhea	5/6	腹泻 Diarrhea	0/6	不腹泻 Non-diarrhea	1/6	不腹泻 Non-diarrhea
哺乳仔猪 Suckling piglet	9/10	腹泻 Diarrhea	15/15	腹泻 Diarrhea	14/15	腹泻 Diarrhea	12/12	腹泻 Diarrhea
保育仔猪 Nursery piglet	2/10	不腹泻 Non-diarrhea	13/15	腹泻 Diarrhea	7/10	腹泻 Diarrhea	4/15	不腹泻 Non-diarrhea
育肥猪 Fattening pig	1/5	不腹泻 Non-diarrhea	3/6	腹泻 Diarrhea	1/6	不腹泻 Non-diarrhea	0/5	不腹泻 Non-diarrhea
后备母猪 Gilt	3/5	腹泻 Diarrhea	4/6	腹泻 Diarrhea	5/6	腹泻 Diarrhea	3/5	腹泻 Diarrhea
种公猪 Boar	0/5	不腹泻 Non-diarrhea	0/3	不腹泻 Non-diarrhea	1/4	不腹泻 Non-diarrhea	0/3	不腹泻 Non-diarrhea

3 讨论

和所有微小 RNA 病毒科的成员一样,猪库布病毒的基因序列变异频率高,毒株之间差异性较大。根据已有文献报道,猪库布病毒基因组序列中的 3D 基因最为保守,因此笔者选择 3D 基因作为 PCR 检测方法的扩增目的片段^[11-12]。通过优化反应条件和反应程序,该 PCR 检测方法能够达到 180 fg/ μ L 的灵敏度,且特异性良好,不会和其他病毒模板发生非特异扩增。在所扩增的 165 份临床样品中也没有发现非目的片段大小的杂带出现,充分说明我们建立的 RT-PCR 检测方法具有良好的稳定性、可靠性、敏感性,非常适用于临床样品的检测。这可为临床诊断和病原学调查提供有力的支持。

当下我国流行的腹泻疫情从 2010 年底开始,持续至今,猪场一旦发病,往往整个猪场所有群体均出现腹泻,产房仔猪的发病率、死亡率均接近 100%,而且疫情在很多猪场一直循环往复。针对当前常见的猪腹泻类病毒在我国腹泻疫情中的阳性率高达 82.0%,而其他常见腹泻类病毒,如猪传染性胃肠炎、猪轮状病毒的阳性率要低很多^[9-10]的报道结果,推测猪流行性腹泻病毒很可能在这次腹泻疫情中扮演了非常重要的角色。但是,这次疫情的持续时间

之长、感染群体之广、死亡率之高,均超出往年许多,因此不能排除其他病原混合感染、协同感染的可能。如果其他病原的感染是发病的必要条件,则应该在绝大部分发病猪的粪便样品中能够检测到这种病原。根据本研究的流行病学调查,猪库布病毒在发病样品中的阳性率为 75.64%,足以引起人们的高度重视。在此基础上,我们又深入调查了猪库布病毒在猪群中的分布。根据在 4 个发生腹泻的规模化猪场的抽样调查结果,我们发现猪库布病毒在仔猪中的阳性率要高于育肥猪和种猪中的阳性率,而且在发病猪中猪库布病毒的阳性非常高,达 82.5%,而在非腹泻猪中猪库布病毒的阳性率只有 13.23%。因此可以推断猪库布病毒和目前的腹泻疫情有很大的关联。但是,目前还没有充足的证据证明猪库布病毒是导致腹泻的原发性病原或者协同感染病原。要证明这一点,还需要进行病毒分离和病例复制,目前这项工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] REUTER G, KECSKEMETI S, PANKOVICS P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(4): 696-698.
- [2] REUTER G, BOROS A, PANKOVICS P. Kobuviruses - a compre-

- hensive review [J]. *Rev Med Virol*, 2011, 21(1):32-41.
- [3] REUTER G, BOROS A. Bovine kobuvirus in Europe [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(5):822-823.
- [4] YAMASHITA T, ITO M, KABASHIMA Y, et al. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84(11):3069-3077.
- [5] KHAMRIN P, MANEEKARN N, PEERAKOME S, et al. Bovine kobuviruses from cattle with diarrhea [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(6):985-986.
- [6] BARRY A F, RIBEIRO J, ALFIER A F, et al. First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(7):1811-1814.
- [7] YU J M, JIN M, ZHANG Q, et al. Candidate porcine kobuvirus, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(5):823-825.
- [8] WANG C, LAN D, HUA X. Porcine kobuvirus from pig stool specimens in Shanghai, China [J]. *Virus Genes*, 2011, 43(3):350-352.
- [9] CHEN J, LIU X, SHI D, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus variant [J]. *J Virol*, 2012, 86(6):3408.
- [10] SUN R Q, CAI R G, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(1):161-163.
- [11] PARK S J, KIM H K, MOON H J, et al. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea [J]. *Arch Virol*, 2010, 155(11):1803-1811.
- [12] PARK S J, KIM H K, SONG D S, et al. Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses in fecal samples collected from diarrheic cattle in Korea [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(5):1178-1182.

Porcine kobuvirus RT-PCR detection assay establishment and application in primary epidemiology investigation in Hubei Province

HU Jun-yong¹ TANG Xi-biao² HU Rui-ming² LIU Wang-hong¹ NI De-bin¹ WU Bin^{2,3}

1. *College of Animal Sciences & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
2. *Diagnostic Center for Animal Diseases of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*
3. *State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract One pair of primers was designed based on the 3D gene sequences of porcine kobuvirus, and the two-step RT-PCR assay was established in this study. The positive templates of CSFV, PRRSV, JEV, SIV, PEDV, TGEV, GARV and recombinant plasmids (pMD18T-PEV3D, pMD18T-FMDV3D) which contain either FMDV's or PEV's 3D gene were used to test the specificity of the porcine kobuvirus RT-PCR assay we established and the assay showed excellent specificity. Sensitivity test showed that the minimal concentration of positive template the assay can detect is 180 fg/mL. The epidemiology of porcine kobuvirus in Hubei Province was then investigated by applying this assay. Among 165 samples of pigs with diarrhea, 118 samples were kobuvirus positive. To investigate the distribution of porcine kobuvirus in different age groups in pig farm with diarrhea, the samples of different age groups from 4 different pig farms were collected. The results clearly indicated that porcine kobuvirus were centralized distributed in the pig group with diarrhea, which suggested that positive relationship exists between diarrhea disease outbreak and porcine kobuvirus.

Key words porcine kobuvirus; RT-PCR; detection assay; diarrhea; epidemic investigation