

# 1 株犬细小病毒的分离鉴定及其生物学特性研究

卜 宾<sup>1</sup>,李生涛<sup>2</sup>,毛倩倩<sup>1</sup>,唐青海<sup>1\*</sup>,唐存多<sup>1</sup>,焦铸锦<sup>1</sup>,姚伦广<sup>1</sup>,阚云超<sup>1\*</sup>

(1. 南阳师范学院 南阳市兽医生物工程技术研究中心/河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室/  
昆虫生物反应器河南省工程实验室,河南 南阳 473061; 2. 南阳农业职业学院,河南 南阳 473061)

**摘要:**采集一疑似犬细小病毒(CPV)患犬的粪便,采用胶体金试纸条和PCR方法对病料进行CPV检测,并应用猫肾细胞F81进行病毒分离培养,分别采用免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IPMA)和PCR检测病毒在F81细胞中的增殖动态,采用无血清培养和有血清培养2种方法进行体外培养,IPMA测定病毒滴度。利用PCR扩增分离病毒的VP2基因,经序列测定后采用DNAStar 7.0和MEGA 5.0软件进行生物信息学分析。结果表明,胶体金试纸条检测为CPV抗原阴性,PCR检测结果为CPV核酸阳性,病料接种到F81细胞培养后出现明显细胞病变(CPE),血清学鉴定为CPV抗原阳性,将分离得到的病毒命名为CPV-NY130615。IPMA可从感染后6 h的F81细胞中检出病毒,PCR能从感染后6 h培养上清中检出CPV核酸。血清同步接种培养法培养和无血清单层接种培养法培养的第15代病毒滴度分别为 $1 \times 10^{8.06}$  TCID<sub>50</sub>/mL和 $1 \times 10^{7.65}$  TCID<sub>50</sub>/mL。序列测定分析表明,该毒株VP2基因开放阅读框(ORF)为1 755 bp,编码584 aa。进化分析显示,该毒株属于CPV-2a型。

**关键词:**犬细小病毒;分离;免疫过氧化物酶单层细胞染色法;生物学特性

**中图分类号:**S855.3   **文献标志码:**A   **文章编号:**1004-3268(2015)08-0121-08

## Isolation and Identification of Canine Parvovirus Strain NY130615 and Its Biologic Characterization

BU Bin<sup>1</sup>, LI Shengtao<sup>2</sup>, MAO Qianqian<sup>1</sup>, TANG Qinghai<sup>1\*</sup>,  
TANG Cunduo<sup>1</sup>, JIAO Zhujin<sup>1</sup>, YAO Lunguang<sup>1</sup>, KAN Yunchao<sup>1\*</sup>

(1. Center for Nanyang Veterinary Biological Engineering Technology/Henan Provincial Engineering Laboratory of Insect Bio-reactor/Henan Key Laboratory of Insect Biology in Funiu Moutain, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China; 2. Nanyang Vocational College of Agriculture, Nanyang 473061, China)

**Abstract:** The faeces samples were collected from a dog suspected infected by canine parvovirus(CPV), CPV in the samples was detected by colloidal gold test strip and polymerase chain reaction(PCR), then the samples were inoculated into F81 cells to isolate CPV, propagation dynamics characterization of CPV in F81 cells were determined by immunoperoxidase monolayer assay(IPMA) and PCR, samples that cultured with or without serum were titrated by IPMA. VP2 gene of this virus strain was amplified by PCR and sequenced then analyzed by software DNAStar 7.0 and MEGA 5.0. Results of colloidal gold test strip test showed CPV Ag negative in the samples, however, PCR detection results showed positive. The sample inoculated into F81 cells showed significant cytopathic effect(CPE). Serologic test results showed that the

收稿日期:2015-03-19

基金项目:国家自然基金青年基金项目(31101837);河南省重点科技攻关项目(1421021101);南阳师范学院引进人才专项(70640);南阳师范学院研究生创新基金项目(20141101,2014103)

作者简介:卜宾(1989-),男,河南南阳人,在读硕士研究生,研究方向:生物制药与疫苗工程。

E-mail:15303777128@163.com

\* 通讯作者:唐青海(1982-),男,湖南祁阳人,助理研究员,主要从事病毒分子生物学研究。

E-mail:qinghaitang109@126.com

阚云超(1974-),男,河南南阳人,教授,主要从事生物制药与疫苗工程研究。E-mail:kanyunchao@163.com

culture samples were CPV Ag positive, the isolated virus strain was named CPV-NY130615. CPV Ag in the F81 cells 6 hours post infected(hpi) with CPV-NY130615 strain was successfully detected by IPMA, as well as the culture supernatant was CPV nucleotid positive detected by PCR. The fifteenth passages virus titers of two different culture method, synchronization inoculated culture with serum and monolayer inoculated culture without serum were  $1 \times 10^{8.06}$  TCID<sub>50</sub>/mL and  $1 \times 10^{7.65}$  TCID<sub>50</sub>/mL respectively. Nucleotid sequences showed that the open reading frame of VP2 gene was 1 755 bp encoding 584 aa. Phylogenetic analysis showed that CPV-NY130615 strain belonged to the genotype CPV-2a.

**Key words:** canine parvovirus; isolation; immunoperoxidase monolayer assay; biological characteristics

犬细小病毒病以出血性肠炎、剧烈呕吐及心肌炎为主要特征<sup>[1]</sup>,该病传染性强、发病率高、死亡率高,是危害犬和猫的重要传染病之一<sup>[2]</sup>。该病主要病原为犬细小病毒(canine parvovirus,CPV),该病毒属于细小病毒科(Pavoviridae)细小病毒属(*Pavovirus*)。病毒基因组为单链、负义、线形DNA,全长5 323 bp,编码3个结构蛋白——VP1、VP2和VP3,其中,VP2基因全长1 755 bp,编码584 aa<sup>[3-5]</sup>。作为CPV衣壳的主要亚单位组分,VP2蛋白已被证明具有良好的免疫原性,是制备CPV基因工程疫苗的候选保护性抗原<sup>[6]</sup>。CPV毒株间的差异主要是由VP2蛋白氨基酸序列中某些位点的改变造成的<sup>[7-8]</sup>。在免疫压力和自然因素的综合影响下,该病毒由原始的基因1型进化为基因2型,继而又分化成2a和2b型,近年来又出现了2c型,每次变异都引起病毒在致病性和宿主嗜性方面的变化<sup>[9-10]</sup>。2010年,国内首次报道检测到CPV-2c型毒株<sup>[11]</sup>。目前,我国流行毒株还是以2a和2b型为主<sup>[12]</sup>。

关于南阳地区CPV分离鉴定的研究报道较少,本研究从南阳地区采集1份疑似CPV感染粪样进行病毒分离,并进行该毒株的核酸和血清学鉴定,研究其体外培养特性,采用一种新的CPV病毒定量方法进行病毒滴度检测,利用生物信息学软件分析了该毒株的进化特征,为进一步开展更广泛的流行病学调查、建立新的血清学诊断方法和开发新型疫苗提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、质粒及主要试剂

TOP10感受态细胞、组织DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;MEM培养基购自北京清大天一科技有限公司;Prime STAR GXL DNA Polymerase、Premix Ex Taq、Hind III 和 EcoR I、pMD18-T等均为宝生物工程(大连)有限公司产品;鼠抗CPV单克隆抗体(CPV-mAb)购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司;辣根过氧化物酶-

葡萄球菌蛋白A(HRP-SPA)购自武汉三鹰生物技术有限公司;胶体金试纸条为韩国BIOINDIST公司产品。

### 1.2 发病犬症状与现场诊断

2013年6月15日,临床发现1只6月龄左右犬表现精神沉郁、不思饮食、严重腹泻伴有呕吐,粪便带红色血块,有肠黏膜脱落。取现场拉稀粪便,样品编号NY130615,采用韩国BIOINDIST公司胶体金试纸条检测CPV抗原。

### 1.3 病料的采集和处理

收集200 μL左右粪便于灭菌的1.5 mL EP管中,加入1 mL PBS,混匀,于-20℃和37℃反复冻融3次,振荡15 s,3 000 r/min离心2 min,取上清于-20℃保存备用。

### 1.4 病料的PCR检测

取步骤1.3中上清200 μL,采用天根生化科技(北京)有限公司的组织DNA提取试剂盒提取总DNA作为PCR扩增的模板。根据GenBank上公布的VP2核酸序列(参考序列登录号:JN403045)保守区设计1对特异性引物F1和R1(表1),扩增片段大小为682 bp,PCR反应体系25 μL,包含模板DNA4 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL,Premix Ex Taq 12.5 μL,6.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR反应程序:94℃预变性5 min;98℃ 10 s,45℃ 30 s,72℃ 40 s,35个循环;72℃ 10 min,4℃保存。反应结束后,取5 μL PCR产物,进行1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。

表1 PCR引物寡核苷酸序列设计及反应条件

引物名称	序列	退火温度/℃	片段长度/bp
F1	GAAGAGTGGTTG-	45	682
R1	TAAATAATT CCTATATAACCA-		
CPV-VP2-F2748	AAGTTAGTAC GCCGGTGCAGGA-	55	2 071
CPV-VP2-R4818	CAAGTA CAACCCACACCCA- TAACAACA		

## 1.5 病毒的分离培养

猫肾细胞 F81 由南阳市兽医生物工程技术研究中心传代保存,使用含 5% 胎牛血清的 MEM 培养基(含青霉素钠和硫酸链霉素各 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 培养箱中培养传代, 待细胞生长至 80% 汇合度时, 用 PBS 洗涤 1 次后更换为无血清培养基。将 1.3 中上清用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器无菌过滤, 滤过液按照 1:10 的体积比例接种细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养。设正常细胞为对照。每 24 h 观察细胞病变(cytopathic effect, CPE), 80% 以上细胞病变时, 反复冻融 3 次, 收获病毒, 按照上述方法将病毒连续传代培养。

## 1.6 病毒在 F81 细胞中的增殖动态检测

1.6.1 病毒感染上清 PCR 检测 将细胞以适当密度接种 8 个 35 mm 培养皿中, 到 24 h 长满 80% 为宜; 将分离到的病毒 F<sub>4</sub> 代按  $4 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/皿的剂量接种, 留 1 皿作为未接种病毒对照。将培养皿中的培养基弃掉, 留 0.5 mL, 取 20  $\mu\text{L}$  病毒液加入到培养基中, 充分摇匀, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下吸附 1 h; 补充培养基至 2 mL/皿, 单层接毒后 4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 收集样品。每皿取上清 200  $\mu\text{L}$  提取 DNA 以用于 PCR 检测, 检测方法按 1.4 所述步骤进行, 设不接毒细胞为阴性对照。

1.6.2 免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IPMA)检测细胞中病毒动态 参考文献[13-14]的方法调整后进行, 每皿细胞用 2 mL PBS 洗涤 3 次, 真空干燥, 加入 1.5 mL 33% 丙酮-PBS, 室温固定 30 min, 真空干燥, 加入 CPV 单克隆抗体(1:200 倍稀释)1.5 mL, 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次。加入酶标二抗(HRP-SPA, 1:3 000 倍稀释)1.5 mL, 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 加入 1.5 mL AEC 底物显色液, 37 °C 孵育 15 min。弃掉反应液, 蒸馏水冲洗 2 次, 显微镜观察结果。

## 1.7 不同培养方法培养病毒生长曲线测定

1.7.1 含血清同步接种培养 F81 细胞消化传代, 按照 1:4 比例传代, 每个 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中加入含 5% 胎牛血清的 MEM 培养基和 50  $\mu\text{L}$  病毒(盲传第 3 代病毒液), 混匀, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 培养箱培养 5 d, 反复冻融 3 次, 收获病毒。按照这种方法, 连续培养 15 代。

1.7.2 无血清单层接种培养 F81 细胞消化传代, 按照 1:4 比例传代, 每个 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中加入含 5% 胎牛血清的 MEM 培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 培养 24 h, 细胞密度达到 70% 左右, 更换无血清 MEM 培养基, 同时接种 50  $\mu\text{L}$  病毒(盲传第 3 代病毒液),

轻轻混匀, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 4 d, 反复冻融 3 次, 收获病毒。按照这种方法, 连续培养 15 代。

分别取上述 2 种方法培养病毒的第 1、3、5、7、9、11、13、15 代病毒 1 mL, 3 000 r/min, 离心 5 min, 取上清测定病毒滴度。每个代次做 3 个重复, 采用 IPMA 方法测定<sup>[15]</sup>。基本操作为: 将病毒按 10 倍梯度稀释, 按照 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$  接种铺满单层细胞的 96 孔板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 36 h, PBS 洗涤 3 次, 真空干燥, 然后按照 1.6.2 中方法进行固定、抗体孵育和染色等步骤。观察染色结果, 找出能引起半数细胞孔染色阳性的病毒稀释倍数, 按照 Reed-Muench 法计算病毒滴度。

## 1.8 CPV-NY130615 株病毒 VP2 基因的克隆及序列分析

根据 GenBank 参考序列(GenBank 登录号: JN403045), 设计 1 对引物 CPV-VP2-F2748 和 CPV-VP2-R4818(表 1), 扩增片段大小为 2 071 bp。提取分离培养病毒 F<sub>3</sub> 代 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: DNA 模板 4  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , Prime STAR GXL DNA Polymerase 1  $\mu\text{L}$ , 5 × Buffer 10  $\mu\text{L}$ , dNTP mixture 4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 29  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 2.5 min, 35 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。反应结束后, 取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物采用 Axygen 公司 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 纯化后的产物按 1:1 与 Premix Ex Taq 混合, 95 °C 5 min、72 °C 20 min 作用后用 Axygen 公司 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。将产物与 pMD18-T 载体连接转化 TOP10 感受态细胞, 筛选阳性克隆后提取质粒进行酶切和序列测定, 得到的重组载体命名为 pMD18-T-CPV-VP2。应用 DNASTar 7.0 软件将测得的序列与 GenBank 公布的 CPV Uy-24310 毒株(登录号: JF906788)等 31 株国内外分离株的 VP2 全基因序列进行比对分析, 运用 MEGA 5.0 软件重点最大值法、最大节约法和邻接法, 通过比较分析, 构建系统发育树, 分析该毒株的进化地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶体金试纸条检测结果

由图 1 可见, 阳性对照病料试纸条 C 线和 T 线均可见红色条带, 而 NY130615 样品仅在质控线 C 线处有特异性条带, 检测线 T 线处无任何条带。检测说明 NY130615 样品 CPV 抗原呈阴性。

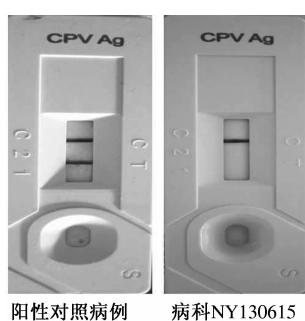
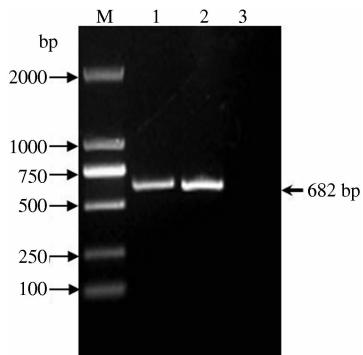


图 1 CPV 抗原的胶体金试纸条检测

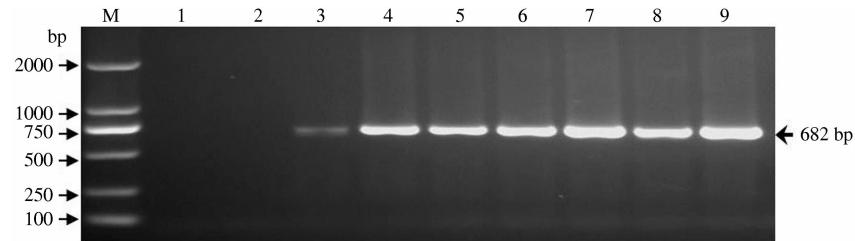
## 2.2 病料的 PCR 检测

由于该犬临床症状与 CPV 感染十分相似,因此对病料进行了 CPV 核酸的 PCR 检测。从图 2 可以看出,样品 NY130615 和阳性对照均扩增出 682 bp 条带,与预期片段长度一致,而阴性对照无条带。这一结果表明,样品 NY130615 为 CPV 核酸阳性。



M: DNA 分子质量标准;1:样品 NY130615;2:阳性对照;3:阴性对照

图 2 样品 NY130615 中 CPV 的 PCR 检测



M: DNA 分子质量标准;1:阴性对照;2—8 依次为感染后 4、6、8、12、24、36、48 h 细胞培养上清;9:阳性对照

图 4 CPV 感染细胞上清的核酸 PCR 检测

**2.4.2 免疫过氧化物酶单层细胞染色法(IPMA)检测细胞中病毒动态** 如图 5 所示,经 IPMA 鉴定后,4 hpi 细胞中未见到阳性细胞,6 hpi 和 8 hpi 细胞中可见少量特异性染色阳性细胞,阳性细胞在细胞核周围呈棕红色染色;感染后 12 h 检出大量阳性细胞,随着时间的延长,感染范围越来越大,阳性细胞越来越多,可观察到成片区域感染病毒的细胞,而未接毒的细胞在培养 48 h 后生长状态良好,无任何着色。

## 2.3 病毒的分离培养

鉴于病料 NY130615 中 CPV 核酸阳性,将处理过的病料按同步接毒的方式接种 F81 细胞,培养至 72 h,未接种病毒对照细胞生长正常(图 3A),接种病料出现典型的 CPV 细胞病变——细胞变圆、脱落、拉网(图 3B)。连续接种培养 3 代,均表现出很好的 CPE,将分离培养的病毒命名为 CPV - NY130615 毒株。

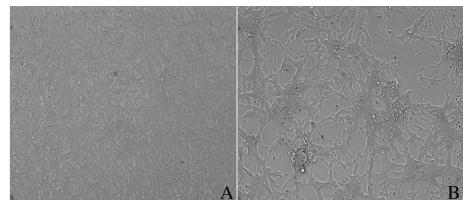


图 3 CPV - NY130615 毒株的分离培养

## 2.4 CPV - NY130615 毒株在 F81 细胞中的增殖动态检测

**2.4.1 病毒感染上清 PCR 检测** 设正常 F81 细胞培养物上清作为阴性对照,设吉林五星疫苗毒为阳性对照,进行 PCR 检测。从图 4 可以看出,CPV - NY130615 毒株感染后 4 h(4 hpi),细胞培养上清中 CPV 核酸阴性,6 hpi 刚刚能够检出,之后随着感染时间的延长,所有样品都出现 682 bp 条带,亮度逐渐增强,说明随着培养时间的延长,培养上清中的病毒越来越多。

## 2.5 不同培养方法培养病毒增殖特性测定

分别采用有血清培养基和无血清培养进行 CPV - NY130615 毒株培养,然后采用 IPMA 法测定这 2 种培养方法所培养的病毒的增殖规律。如图 6 所示,含血清同步接种培养法培养第 1、3、5、7、9、11、13、15 代病毒滴度( $\lg\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ )依次为 4.45、5.32、5.68、6.64、7.87、7.91、8.16、8.06;无血清单层接种培养法培养第 1、3、5、7、9、11、13、15 代病毒滴度依次为 3.65、4.41、5.12、6.04、7.25、7.55、7.56、7.65。

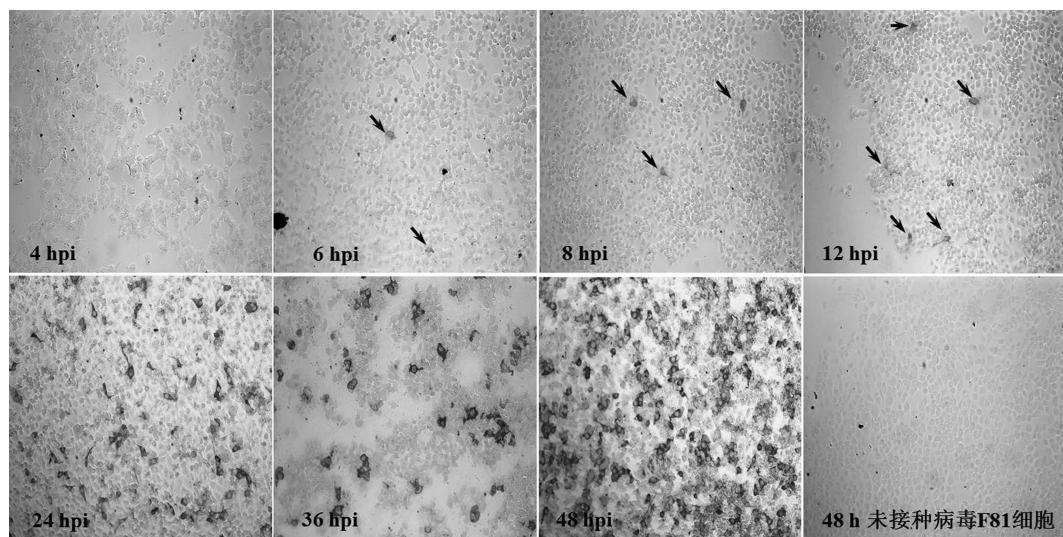


图5 IPMA检测CPV-NY130615在F81中的增殖(100×)

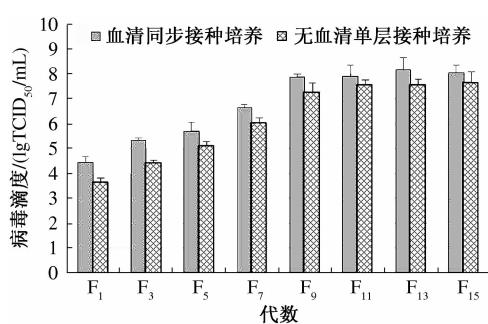


图6 不同培养方法培养病毒增殖滴度的IPMA测定

## 2.6 CPV - NY130615 VP2 基因的克隆及序列分析

用引物 CPV - VP2 - F2748 和 CPV - VP2 - R4818 对分离的细小病毒株进行扩增,结果显示,扩增到特异性条带,大小为 2 071 bp,与预期大小相符(图 7)。表明扩增到了 CPV - NY130615 毒株的 VP2 基因。将基因纯化克隆至 T 载体,筛选得到的重组载体命名为 pMD18 - T - CPV - NY130615 - VP2,重组载体经 *Hind* III 和 *EcoR* I 酶切鉴定得到相应大小的目的条带(图 8),表明重组载体构建成功。序列测定结果表明,该基因为 CPV 的 VP2 基因,其开放阅读框(ORF)全长为 1 755 bp,共编码 584 aa。

从系统发育树(图 9)可以看出,犬细小病毒在树中分成了 3 个主要分支——CPV - 2a 基因型、CPV - 2b 基因型和 CPV - 2c 基因型。本试验所分离的 CPV - NY130615 毒株属于 CPV - 2a 基因型,与我国的 BJ/2010(HQ883271)毒株亲缘关系最近,我国分离的 CPV - GZ (JX120178)、Shanaxi (JN403045)、SH - 1/2011 (JX121625)、06 - 11 - NJ

(FJ432716)、BJ - 2/2011 (JX121624) 和 08 - 5 - WH (FJ432717) 均属于 CPV - 2a 基因型;CPV - 2b 与最新在国外流行的 CPV - 2c 样病毒出现在另外一个大的分支,说明它们有共同的祖先——CPV - 2a,而 CPV - 2c 则是在 CPV - 2b 的基础上进化而来。

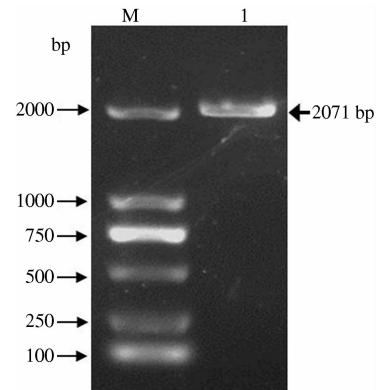


图7 CPV - NY130615 VP2 基因的PCR扩增

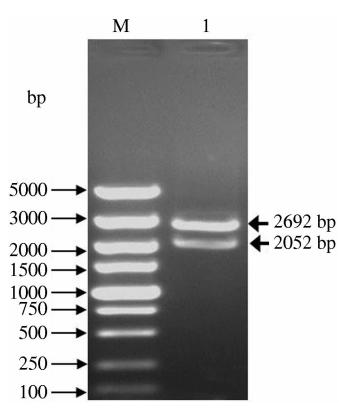


图8 重组质粒 pMD18 - T - CPV - VP2 的酶切鉴定

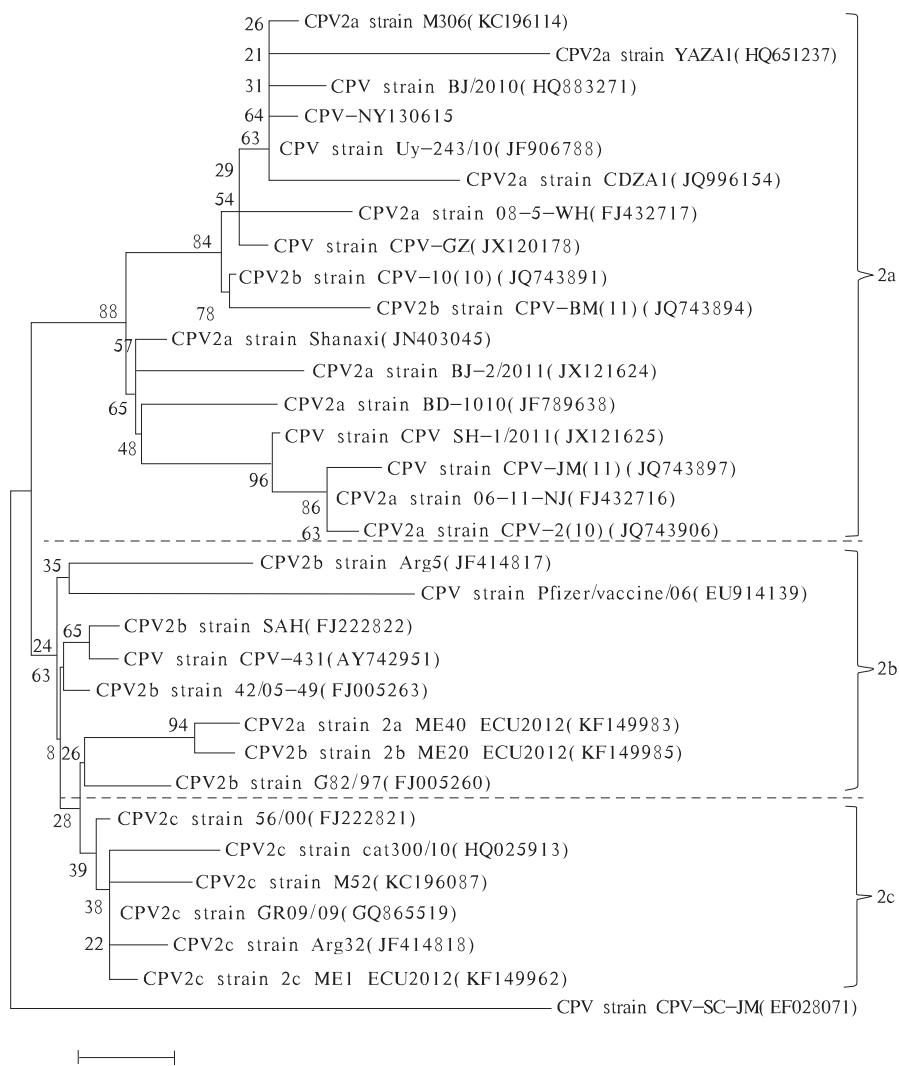


图 9 CPV 毒株 VP2 基因进化树

### 3 结论与讨论

犬细小病毒病是一种高度接触性传染病,其病原CPV容易发生变异。本研究在临床发现1例疑似CPV感染症状的幼犬,现场经胶体金试纸条检测结果为CPV抗原阴性,鉴于其具有CPV感染特征性的症状,进一步采用PCR检测和病毒分离。结果表明,PCR检测CPV核酸阳性,病料接种F81细胞培养72 h出现典型的CPV感染CPE,后续血清学鉴定该病毒为CPV。现场经胶体金试纸条检测结果呈阴性,推测有可能是病毒含量低或者是病毒抗原与试纸条所包被的单克隆抗体反应结合性不佳等因素有关。该犬临床使用CPV高免血清配合益生菌治疗十分有效,这一案例提示,采用胶体金试纸条检测的同时结合特征性的临床表现对于CPV感染临床诊治具有重要价值。

为了研究CPV-NY130615毒株的体外感染增

殖特性,采用IPMA法检测了病毒在F81细胞中感染的早期增殖动态。结果显示,病毒接种后4 h,PCR检测培养上清为CPV核酸阴性,相应的细胞IPMA染色也为阴性;病毒接种后6 h,PCR检测培养上清为CPV核酸弱阳性,相应的细胞IPMA染色也为弱阳性;感染后6~12 h这个阶段病毒的增殖相对较慢。IPMA结果显示,病毒感染24 h后,CPV感染阳性细胞显著增多,而且染色相对早期感染要更深,说明每个细胞的病毒抗原含量在增加;感染48 h,90%以上的细胞均为CPV抗原阳性,说明36~48 h为CPV在F81细胞中的指数增殖阶段。渠川玲等<sup>[16]</sup>曾报道,鉴于血凝试验存在敏感性、质控问题等,他们用生物素-亲和素酶间接染色法进行病毒的检测,发现CPV感染细胞14 h后细胞核能被特异性染色,72 h在细胞质中通过特异性染色检出CPV抗原。本试验采用IPMA法在感染6 h后就能在细胞质和细胞核中检出抗原。本试验采用2种培

养方法对分离的病毒进行培养,采用IPMA法检测每个代次的病毒滴度。结果显示, $F_1$ 代至 $F_9$ 代之间病毒滴度逐代升高, $F_9$ 代至 $F_{13}$ 代之间病毒滴度升高的幅度较小, $F_{13}$ 代至 $F_{15}$ 代,含血清同步接种培养法培养病毒滴度基本维持在 $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL左右,无血清单层接种培养病毒滴度在 $1 \times 10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL左右。目前用于测定CPV病毒滴度方法有CPE观察法、血凝试验、间接免疫荧光等方法<sup>[10]</sup>。CPE观察法需要时间较长,而且人为因素影响较大;血凝试验需要采集新鲜的红细胞,材料来源不稳定,质控困难,批间差异大、灵敏度较差;间接免疫荧光要在荧光显微镜下观察,对设备要求高、操作复杂、成本相对较高。IPMA等已经用于多种病毒如猪流感病毒<sup>[17]</sup>、戊型肝炎病毒<sup>[18]</sup>、猪圆环病毒<sup>[15]</sup>、猪蓝耳病病毒<sup>[19]</sup>等及其相应抗体的检测。基于前述CPV-NY130615毒株在F81细胞中的增殖特性数据,本试验采用IPMA法检测CPV滴度时,把病毒感染的时间设在病毒感染后36 h,这比CPE观察法更加节约时间。病毒最高稀释度中只要有1个细胞感染,就能检出,这比CPE观察法和血凝试验更加灵敏。而且该方法采用的是CPV单克隆抗体,特异性更好。鉴于本试验没有将IPMA法和血凝试验进行平行试验,因此,该方法要用于临床疫苗效价评估还需要进一步研究。

为了确定CPV-NY130615毒株的基因型,测定了VP2基因序列,该基因全长1 755 bp,共编码584 aa。进化分析表明,该毒株与我国大部分分离毒株均属于CPV-2a型,它们之间的核苷酸相似性在99.5%~99.8%,与CPV-SC-JM(GenBank登录号:EF028071)进化距离较远(两者核酸相似性达99.3%,氨基酸相似性只有96.4%),CPV-NY130615毒株与BJ/2010毒株(GenBank登录号:HQ883271)亲缘关系最近,两者核苷酸和氨基酸的相似性均为99.8%。与06-11-NJ毒株(GenBank登录号:FJ432716)核苷酸相似性相对较低(99.3%),但氨基酸的相似性却很高(99.7%)。根据文献报道,我国大部分地区流行的毒株仍然以CPV-2a基因型为主,但CPV-2b基因型也普遍存在<sup>[5,12]</sup>。2010年,国内首次报道检测到CPV-2c型毒株<sup>[19]</sup>,在免疫压力下病毒的每一次进化其毒力都在增强,鉴于病毒这种变化,辉瑞公司的研究人员对疫苗毒株(CPV-2a基因型)的保护性进行了重新评估,结果表明,其疫苗毒株对现在流行的CPV-2b和新出现的CPV-2c均具有较好的保护效果<sup>[20]</sup>。尽管如此,仍需对该病毒的流行变异情况进行监测。

本试验成功分离鉴定了1株CPV-2a基因型毒株,研究了其体外培养特性,为进一步开展该病毒的诊断和疫苗研究提供了基础材料。

#### 参考文献:

- [1] Pere R, Mbianchi P, Calleros L, et al. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a(CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155(2/3/4): 214-219.
- [2] Miranda C, Parrish C R, Thompson G, et al. Canine parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2014, 26(3): 462-464.
- [3] Decaro N, Desario C, Parisi A, et al. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c[J]. *Virology*, 2009, 385(1): 5-10.
- [4] Jeoung S Y, Ahn S J, Kim D, et al. Genetic analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Korea[J]. *J Vet Med Sci*, 2008, 70(7): 719-722.
- [5] Ju C, Cheng Y, Ji Y, et al. Genome sequence of canine parvovirus strain SC02/2011, isolated from a puppy with severe diarrhea in south China [J]. *J Virol*, 2012, 86(24): 13805.
- [6] Feng H, Hu G Q, Wang H L, et al. Canine parvovirus VP2 protein expressed in silkworm pupae self-assembles into virus-like particles with high immunogenicity [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e79575.
- [7] Maya L, Calleros L, Francia L, et al. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: Evidence of two successive invasions by different variants [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(6): 1133-1141.
- [8] Perez R, Calleros L, Marandino A, et al. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111779.
- [9] Sutton D, Vinberg C, Gustafsson A, et al. Canine parvovirus type 2c identified from an outbreak of severe gastroenteritis in a litter in Sweden [J]. *Acta Vet Scand*, 2013, 55:64-68.
- [10] Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 155(1): 1-12.
- [11] 张仁舟,杨松涛,冯昊,等.中国国内首次检测到犬细小病毒CPV-2c[J].中国病原生物学杂志,2010,5(4):246-249,275.
- [12] Zhong Z, Liang L, Zhao J, et al. First isolation of new canine parvovirus 2a from Tibetan mastiff and global analysis of the full-length VP2 gene of canine parvoviruses 2 in China[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 12166-12187.

(下转第140页)

能。这些中草药能促进机体对营养物质的消化吸收,从而提高白羽肉鸡的生长,提高屠宰率、全净膛率、腿肌率和胸肌率,而且还能降低腹脂率。谷氨酸和肌苷酸是对肉类及其制品鲜味贡献最大的 2 种物质。从本试验结果来看,中草药能提高白羽肉鸡肌肉中肌苷酸和谷氨酸含量,这与孙震等<sup>[16]</sup>研究结果一致。其原因可能是小茴香和肉桂含有的挥发性成分可明显改善白羽鸡的风味特征<sup>[17]</sup>。目前中草药作为饲料添加剂的药理作用大多是借鉴中医药历史资料和积累的临床经验。

综上所述,在日粮中添加艾叶、大蒜、桑叶、山楂、麦芽、黄芪、薄荷、甘草、小茴香和肉桂 10 味中草药组成的中草药添加剂,可提高白羽肉鸡成活率、生产性能、屠宰性能和肉品风味。综合评价最佳剂量为 1.0%。本试验研究的是中药配伍和配伍后的应用效果,而对具体起作用的化学成分及中草药如何在动物体内转化没有进行研究。今后应从免疫学、药理学和微生态学等各方面研究其作用机制,为中草药饲料添加剂新组方的开发及合理使用提供科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 李群道,单安山,马得莹.女贞子、五味子与寡糖配伍对肉鸡生产性能和免疫功能的影响[J].畜牧兽医学报,2005,36(4):343-347.
  - [2] 张琨.中草药不同添加量对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响[J].河南农业科学,2014,43(11):147-150.
  - [3] 朱秀乾,张精海.甘露寡糖、中草药对肉仔鸡生产性能的影响[J].试验研究,2011,32(10):1-3.
  - [4] 白子金,宋良敏,高林.复合微生态制剂对产蛋鸡生产性能和蛋品质的影响[J].安徽农业科学,2013,41(8):3424-3425,3518.
  - [5] 王强,童海兵,邹剑敏,等.中草药添加剂对高邮鸭产蛋性能及蛋品质的影响[J].河南农业科学,2012,41(1):142-145.
  - [6] 王福传,韩一超,张玉换,等.兽用中草药高效免疫增强剂研究初报[J].山西农业科学,2001,29(2):74-80.
  - [7] 郭巧萍.抗生素替代物对畜禽生产的影响研究进展[J].山西农业科学,2012,40(5):553-554,558.
  - [8] 郑成江,吕世玺,张连洪,等.中草药饲料添加剂的研究进展与展望[J].天津农业科学,2010(5):51-54.
  - [9] 金花,贾玉山,刘兴波,等.中草药饲料添加剂对奶牛产奶量及牛奶品质影响初探[J].华北农学报,2007,22(专辑):37-40.
  - [10] 李绍戊,王荻,苏岭,等.中草药方剂对鲫鱼热应激蛋白 HSP70 表达的影响[J].华北农学报,2012,27(增刊):401-405.
  - [11] 贾仁勇.中草药作为绿色饲料添加剂的研究与应用新进展[J].畜牧业,2004(1):28-32.
  - [12] 任艳.中草药饲料添加剂在肉鸡生产中的应用研究[J].安徽农业科学,2009,37(22):10505-10506,10510.
  - [13] 郎洪权.中草药饲料添加剂饲喂贵州黄羽肉鸡效果试验[J].贵州畜牧兽医,2009,33(6):8-10.
  - [14] 田刚,余冰.肌肉肉质风味研究现状及其影响因素(三)[J].四川畜牧兽医,2001,28(2):55.
  - [15] 赵亮,赵瑞萍,李向阳,等.中草药饲料添加剂在畜禽上应用研究进展[J].山西农业科学,2014,42(2):206-208.
  - [16] 孙震,边连全,赵中华,等.中草药饲料添加剂对肉仔鸡生产性能、血液生化指标及肉质改善机理研究[J].现代畜牧兽医,2006(7):8-11.
  - [17] 陆钢,许剑琴,刘钟杰,等.中药饲料添加剂“香苓粉”对肉鸡生产性能的影响[J].饲料与畜牧,1996(3):25-26.
- (上接第 127 页)
- [13] Gerber P F, Matos A C, Guedes M I, et al. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay for total anti-Vaccinia virus antibody titration [J]. J Vet Diagn Invest, 2012, 24(2):355-358.
  - [14] Hornyak A, Denes B, Szeredi L, et al. Diagnostic application of immunoperoxidase monolayer assay using monoclonal antibodies produced against equine arteritis virus 14-kDa nucleocapsid protein [J]. Hybridoma and Biandomics, 2004, 23(6):368-372.
  - [15] Liu C, Wei Y, Zhang C, et al. Construction and characterization of porcine circovirus type 2 carrying a genetic marker strain [J]. Virus Res, 2007, 127(1):95-99.
  - [16] 渠川玲,徐在海,彭传贵,等.犬细小病毒在乳猫肾细胞中的增殖动态[J].中国畜禽传染病,1994(5):5-7.
  - [17] Direksin K, Joo H, Goyal S M, et al. An immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against swine influenza virus [J]. J Vet Diagn Invest, 2002, 14(2):169-171.
  - [18] Liang H, Wang H, Zhang L, et al. Development of a novel immunoperoxidase monolayer assay for detection of swine Hepatitis E virus antibodies based on stable cell lines expressing the ORF3 protein [J]. Acta Vet Hung, 2014, 62(2):243-256.
  - [19] Houben S, Callebaut P, Pensaert M B, et al. Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs [J]. J Virol Methods, 1995, 51(1):125-128.
  - [20] Spibey N, Greenwood N M, Sutton D, et al. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus [J]. Vet Microbiol, 2008, 128(1/2):48-55.