

猪伪狂犬病毒的分离与鉴定

潘 霄¹, 刘明阳², 李学伍^{3*}, 郭成留³, 邓瑞广³, 张改平³

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001;
3. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 从河南某发病猪场大批死亡仔猪的脾、肾及脑组织中分离到 1 株猪伪狂犬病毒(PRV)毒株, 该毒株经细胞连续传代培养后, 接种 PK-15 细胞能够产生明显的细胞病变(CPE), 且能被 PRV 阳性血清中和。病毒对氯仿、乙醚敏感, 56 ℃ 水浴 30 min 能使其灭活。将所分离的病毒接种家兔和小鼠, 均出现明显的伪狂犬临床症状。PCR 鉴定结果表明, 用 *g*p50 基因序列引物能够从该毒株上扩增出目的条带, 将测序结果与 GenBank 中的 5 株 PRV 毒株进行比对分析, 同源性达 99%。证实所分离病毒为猪伪狂犬病毒。

关键词: 猪伪狂犬病毒; 分离; 鉴定

中图分类号: S852.65⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)07-0134-04

Identification of a Swine Pseudorabies Virus Field Isolate

PAN Xiao¹, LIU Ming-yang², LI Xue-wu^{3*}, GUO Cheng-liu³, DENG Rui-guang³, ZHANG Gai-ping³

(1. College of Animal Science and Technology, Henan Science and Technology University, Luoyang 471003, China;
2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
3. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: An isolate of pseudorabies virus (PRV) was obtained from the tissues of dead piglets from a farm with PRV-like disease in Henan province. This isolate of PRV could induce typical cytopathogenic effects after several passages on PK-15 cells and be neutralized by PRV positive serum in microneutralization test. This isolate was sensitive to chloroform and ether, and could be inactivated in 56 ℃ water bath after 30 min. After inoculation, both rabbits and mice showed typical clinical symptoms of pseudorabies. The cloning and sequencing of *g*p50 gene showed that the nucleotide homology of this isolate with other 5 PRV isolates previously published in GenBank was 99%, indicating that this isolate is PRV.

Key words: porcine pseudorabies virus; isolation; identification

伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV) 引起的能够使多种家畜和野生动物感染的高度接触性传染病^[1]。PRV 属于疱疹病毒科, 甲型疱疹病毒亚科, 猪是 PRV 的主要贮存宿主及疫源动物。猪伪狂犬病通常引起妊娠母猪繁殖功能障碍和初生仔猪神经症状, 仔猪感染率和死亡

率高达 100%。近年来, 已有 40 多个国家相继报道了该病的发生, 有分析表明该病的流行在全球呈上升趋势^[2]。目前, 我国也有多个省份的猪场发生了该病, 对我国的养猪业造成了巨大的经济损失^[3-7]。2012 年 5 月, 河南某猪场的哺乳仔猪出现发热、倒地抽搐及神经症状, 最终大批死亡。本研究通过对该猪场死亡

收稿日期: 2013-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172348)

作者简介: 潘 霄 (1988-), 男, 河南洛阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物重大疫病的快速检测。

E-mail: panxiao19882006@163.com

* 通讯作者: 李学伍 (1964-), 男, 河南通许人, 研究员, 博士, 主要从事动物病毒生物学研究。E-mail: lixuewu2002@126.com

仔猪的脾、肾及脑组织采集取样,从中分离得到一株病毒,并应用血清学、生物学等方法进行鉴定,为进一步开展该病毒的流行病学、致病机制研究提供了重要材料,也为我国 PR 的鉴定、诊断和防治提供了参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病料及细胞 无菌条件下采集河南某发病猪场大批死亡仔猪的脾、肾与脑组织;PK-15 细胞由河南省动物免疫学重点实验室提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司;DNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒、pMD19-T 载体及 Premix Ex Taq 酶均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 供试动物 昆明小白鼠、试验兔由河南省动物免疫学重点实验室提供。

1.1.4 PCR 引物 依据基因文库 PRV 糖蛋白编码序列,在其高度保守编码区域设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列 P1:5'-CACGGAGGAGGAGCTGGGGCT-3'; P2: 5'-GTCCACGCCCCGCTTGAAGCT-3'。目的片段长度为 217 bp。

1.2 方法

1.2.1 病料处理 将病死仔猪的脑、脾、肾等组织放入无菌研钵,剪碎后,按 1:5 的比例加入无菌 PBS 液,将上述混合物放入匀浆机中充分匀浆,置于-20℃冰箱中反复冻融 3 次。然后 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,无菌条件下用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,加入青霉素、链霉素至 1 000 U/mL,置-40℃冰箱中保存备用。

1.2.2 病毒的培养 将上述处理的病料 1 mL 接种于长满单层的 PK-15 细胞瓶内,阴性对照接种 PBS 液 1 mL,37℃孵育 1 h,加入 DMEM 细胞维持液(含 2%胎牛血清)10 mL,继续培养 48 h,并观察记录。连续传代培养,当细胞出现细胞病变(CPE)的时间稳定时,终止传代培养^[8],于-40℃冰箱中保存病毒培养物。

1.2.3 病毒 TCID₅₀ 测定 取 96 孔微量培养板,每孔加 100 μL 含有 PK-15 细胞的培养液,培养至细胞完全贴壁。取 100 μL 病毒液,用无血清 DMEM 培养液进行 10 倍梯度稀释(10^{-1} — 10^{-10}),同时设立阴性对照。TCID₅₀ 计算按 Reed-Muench 法

进行^[9]。

1.2.4 动物接种试验 将分离毒株的细胞培养物接种试验兔,观察记录其临床发病情况及特征性临床症状,同时对 1~4 周龄小鼠进行病毒感染试验,观察记录其临床发病和死亡情况。

1.2.5 病毒的理化特性检验 依据文献^[1]测定分离毒株对乙醚、氯仿敏感性及对热的耐受性。

1.2.6 微量中和试验 采用固定病毒稀释血清法,将伪狂犬病毒标准阳性血清、猪瘟阳性血清和 PRV 阴性血清分别进行 10 倍梯度稀释(10^{-1} — 10^{-10}),与 200 个 TCID₅₀ 的病毒液混匀,置 37℃下作用 1.5 h,接种 96 孔细胞板,每个稀释度 8 孔,每孔 100 μL,并设有阳性血清处理的对照和正常细胞对照^[10]。连续观察 5 d,按 Reed-Muench 法,计算血清中和效价。

1.2.7 病毒 DNA 的 PCR 扩增 取病毒的细胞培养物,利用 DNA 抽提试剂盒提取制备病毒 DNA,以病毒 DNA 为模板,采用 20 μL 的 PCR 反应体系:Premix Ex Taq 酶 10 μL,上、下游引物各 1 μL,模板 DNA 1 μL,ddH₂O 7 μL。反应程序:95℃ 5 min;94℃ 40 s,65℃ 30 s,72℃ 45 s,共进行 35 个循环;72℃ 5 min。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统拍照记录结果。

1.2.8 PCR 产物的克隆与序列分析 回收纯化 PCR 扩增产物并与 pMD19-T 载体进行连接,将连接产物转化 DH5α 工程菌,涂于含氨苄青霉素的 LB 平板培养基,37℃培养 10~16 h,随即从平板上挑取单菌落接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37℃下振荡培养 10~12 h,取菌液 1 μL 进行 PCR 检测^[11-12]。方法同 1.2.7。将阳性克隆进行序列测定和分析。

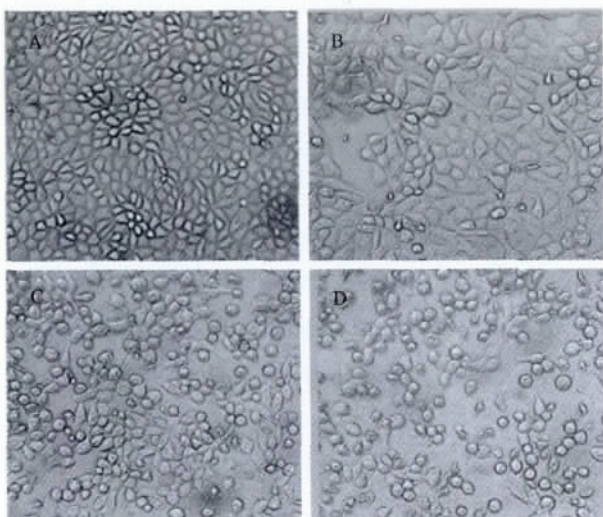
2 结果与分析

2.1 病毒的细胞培养结果

由图 1 可见,分离病毒接种 PK-15 细胞连续传代培养后,能够使 PK-15 细胞出现明显的 CPE。细胞主要表现为:收缩变圆、变小,出现拉丝现象,接毒后期细胞脱落明显。

2.2 病毒 TCID₅₀ 测定

利用 Reed-Muench 法对所分离毒株的半数细胞感染量进行测定^[13],各稀释度病毒 CPE 结果见表 1。经计算得出:TCID₅₀= $10^{-5.3}$ /0.1 mL。



A. 阴性对照; B. 接毒 24 h; C. 接毒 48 h; D. 接毒 72 h

图 1 分离毒株对 PK-15 细胞生长的影响

表 1 病毒毒价测定结果

病毒液 稀释度	CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计		CPE 孔的百分比
			CPE 孔数	无 CPE 孔数	
10^{-1}	8	0	29	0	100(29/29)
10^{-2}	8	0	21	0	100(21/21)
10^{-3}	6	2	13	2	86.7(13/15)
10^{-4}	4	4	7	6	53.8(7/13)
10^{-5}	2	6	3	12	20.0(3/15)
10^{-6}	1	7	1	19	5.0(1/20)
10^{-7}	0	8	0	27	0(0/27)

2.3 动物感染试验结果

经背部皮下注射病毒细胞培养物 24 h 后, 试验组兔表现为兴奋异常、食欲减退; 48 h 后有舌头舔舐、嘴啃注射部位的现象, 接种部位被毛脱落有出血; 72~96 h 试验组兔死亡, 对照组兔正常。试验组小鼠接种分离毒 24 h 后, 表现为烦躁不安、兴奋异常; 48 h 后开始啃咬注射部位并有 1 只小鼠死亡, 另 2 只小鼠接种部位出现被毛脱落现象; 72 h 后另 2 只小鼠死亡, 对照组小鼠表现正常。

2.4 理化特性检验结果

分离毒株经体积分数为 20% 的乙醚和 4.8% 的氯仿处理, 接种 PK-15 细胞无 CPE; 经 56 °C 水浴 30 min, 接种 PK-15 细胞也无 CPE。结果表明, 所分离的病毒对氯仿、乙醚敏感, 对热耐受性低。

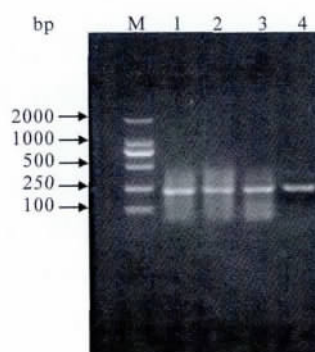
2.5 微量中和试验结果

将 PRV 标准阳性血清和猪瘟阳性血清依 10^{-1} — 10^{-10} 梯度进行倍比稀释, 分别与 200 个 TCID₅₀ 的分离病毒悬液混匀, 接种于 96 孔细胞培养板。结果显示, PRV 标准阳性血清可明显抑制细胞出现 CPE, 且能够特异中和所分离病毒; 而猪瘟阳性血清对照孔均出现 CPE。以上结果表明, 所分

离病毒为猪伪狂犬病毒。

2.6 病毒 PCR 鉴定结果

以所分离病毒 DNA 为模板, PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯光下观察, 并用凝胶成像系统拍照。由图 2 可见, 所分离病毒扩增结果与预期结果相符。

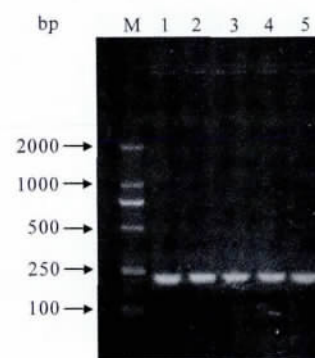


M. DNA Maker DL2000; 1—3. 所分离病毒; 4. 阳性对照

图 2 PRV 分离毒株 gp50 基因 PCR 鉴定

2.7 病毒 DNA 片段的克隆与序列分析

参照文献[14]方法, 挑取阳性克隆, 培养 6~8 h, 收集菌体并裂解, PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察, 结果见图 3。1—4 号样 PCR 扩增出的片段大小约为 217 bp, 同阳性对照组的结果一致, 与预期结果相符。将测序结果与 GenBank 中的 JF797219、FJ477296、EF645827、AY196984 及 M14001 5 株典型 PRV 毒株序列进行比对分析, 其同源性均达到 99%, 表明所分离病毒为猪伪狂犬病毒



M. DNA Maker DL2000; 1—4. 阳性克隆; 5. PRV 对照

图 3 病毒 DNA 片段阳性克隆 PCR 扩增结果

3 讨论

在病料采集过程中, 发现猪场周围饲养的狐狸和犬也出现疑似伪狂犬症状, 并且发病狐狸和犬有多例死亡, 依据临床症状和病理剖检情况, 疑似为猪伪狂犬病超强毒株感染。此状况与有关文献上所描

述的 PRV 能使多种动物感染情况相吻合^[15]。将分离病毒液进行 10 倍稀释后取 1 mL 皮下接种家兔及小白鼠,出现明显伪狂犬症状,后期均死亡。综合分析以上情况,认为所分离毒株为超强毒株。但目前关于毒力基因序列及与其他基因序列的相关性尚待进一步研究,且对超强毒力的测定有待动物回归试验的进一步验证。

分离毒株能被 PRV 标准阳性血清中和,表明分离毒株与标准毒株同属 1 个血清型,与有关文献上所描述的 PRV 仅有 1 个血清型相符^[16]。超强毒力的变异很可能在于分子水平和生态环境的改变,此方面的研究有待深入进行。

本研究选择细胞培养分离病毒。研究表明^[17-18],分离毒株经细胞培养 1~2 代后出现明显 CPE 的通常为疫苗毒株,并非 PRV 导致仔猪发病死亡,死亡原因可能是其他因素所致,此时可以终止对 PRV 病毒的分离鉴定。而 PRV 野生株或新型毒株,对传代细胞需要有适应过程,但毒力并不迅速降低。目前,猪病的发生多呈混合感染,仅凭借伪狂犬病的临床症状及病理变化与其他猪病很难区分,在确诊时难度很大,因此,PRV 细胞培养的生物学特性对于正确分离野毒株和确诊具有重要的指导意义。

根据对猪场 PRV 调查和检测的结果发现,在河南省很多猪场均存在 PRV 潜伏感染现象,且一些猪场的仔猪不断发病和死亡,对养猪业的发展造成了巨大危害,因此应早期预防并采取 PRV 的净化措施,以减少养猪业损失。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:北京科学出版社,1985:705.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2001:472.
- [3] 孔德江,何晓玲,易栋,等. 规模化猪场猪伪狂犬病的筛查与防控[J]. 中国兽医学报,2009,10(5):75-77.
- [4] 籍永录,李祥伦,王增勤,等. 猪伪狂犬病的发生与防控[J]. 现代农业科技,2011(24):343.
- [5] 杨庆芳,宁官保,李俊达,等. 猪场猪伪狂犬病毒的分离与鉴定[J]. 山西农业科学,2011,39(8):886-889.
- [6] 韩伟,丁伯良,王英珍,等. 猪伪狂犬病病毒的分离鉴定[J]. 天津农业科学,2009,15(3):4-6.
- [7] 樊振华,姚敬明,孟帆,等. 山西部分种猪场猪伪狂犬病分子流行病学调研[J]. 山西农业科学,2012,40(9):989-992.
- [8] 马凤龙,王文成,李尚波,等. 伪狂犬病病毒弱毒株 LY 株的分离鉴定[J]. 中国兽医学报,2003,23(3):252-254.
- [9] 熊毅,朱伟,刘棋,等. 广西猪伪狂犬病毒 GXA 株的分离鉴定[J]. 广西农业科学,2005,36(2):156-157.
- [10] 陈焕春,方六荣,何启盖,等. 猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的分离鉴定[J]. 畜牧兽医学报,1998,29(2):156-161.
- [11] 陈焕春,周复春,方六荣,等. 伪狂犬病病毒鄂 A 株 TK-gG/LacZ 突变株的构建[J]. 病毒学报,2001,17(1):69-74.
- [12] 胡涛,崔保安,王岩,等. 伪狂犬病病毒 Min-A 株 TK 基因的克隆与序列测定[J]. 中国兽医科技,2003,33(8):15-18.
- [13] 王大伟,李学伍,王丽,等. 猪伪狂犬病病毒的增殖、纯化和鉴定[J]. 河南农业科学,2010,11(3):125-127.
- [14] Kofler R M, Hoenninger V M, Thumer C, *et al.* Functional analysis of the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences between mosquito-borne and tick-borne flaviviruses[J]. Journal of Virology, 2006, 8(8):4099-4113.
- [15] Muller T, Klupp B, Zellmer R, *et al.* Characterisation of pseudorabies virus isolated from wild boar[J]. Vet Rec, 1998, 143(12):337-340.
- [16] 姜焕贤,孙序新,陈润清. 猪伪狂犬病毒京 A 株的分离与鉴定[J]. 中国兽医学报,1993,19(4):6-7.
- [17] 吴博,贺实伟. 一例猪伪狂犬病毒的分离与鉴定[J]. 吉林畜牧兽医,2009,30(12):5-9.
- [18] 董瑜,黎建雄,黄辉. 猪伪狂犬灭活疫苗及弱毒疫苗对商品仔猪免疫效果比较试验[J]. 现代农业科技,2008(9):169-170.