

陈赛赛,郑亚婷,郭容利,等. 几株伪狂犬病病毒的增殖特性与保存条件[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):148-152.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.030

几株伪狂犬病病毒的增殖特性与保存条件

陈赛赛^{1,2,3}, 郑亚婷^{1,2,3}, 郭容利^{2,3,4}, 王志胜^{1,2,3}, 许梦微^{1,2,3,4},
刘娅梅^{1,2,3}, 张传健^{1,2,3}, 王彩楠^{1,2,3}, 王继春^{1,2,3}

(1. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014;

3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009; 4. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014)

摘要:高滴度的抗原是制备优质疫苗的首要条件。对 6 株伪狂犬病病毒在仓鼠肾(baby hamster kidney, 简称 BHK)细胞和猪睾丸细胞(swine testicular, 简称 ST)细胞上的增殖效率进行了比较,同时测定不同保存温度和冻融条件对病毒滴度的影响。结果表明,几株伪狂犬病病毒在 BHK 细胞和 ST 细胞上增殖效率均很高,可达到生产要求。相较于 ST 细胞,各毒株在 BHK 细胞上出现病变时间更早。然而,所有毒株在 ST 细胞上的病毒滴度都高于同期在 BHK 细胞上的滴度。强毒株 AH02LA 株在 2 种细胞上滴度可达 $10^{8.0}$ TCID₅₀/0.1 mL 以上,表现为发生病变早,病毒增殖快,峰值到来早的特性。通过强毒株 AH02LA 株获得的基因缺失株 LA-A 株和自然传代缺失致弱株 LA2017 株峰值均达 $10^{8.0}$ TCID₅₀/0.1 mL,展现出优良疫苗株的潜质。保存条件试验表明,PRV 在 -70 ℃ 保存 30 d 和 4 ℃ 保存 12 d 内滴度相对稳定,而 -20 ℃ 保存的病毒滴度下降明显。多次冻融后,滴度有所下降,相较于 -70 ℃, -20 ℃ 条件下冻融病毒滴度下降更为显著,建议避免多次冻融。本试验结果可为 PRV 疫苗抗原在实际生产中制备与保存提供科学依据。

关键词:伪狂犬病病毒;猪睾丸细胞;仓鼠肾细胞;生长特性;冻融;保存

中图分类号: S852.65+5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0148-05

伪狂犬病是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, 简称 PRV)引起的以家畜发热、奇痒(猪除外)和脑脊髓炎为主要特征的烈性传染病,又称 Aujeszky 病^[1]。该病毒可感染不同日龄的猪,妊娠母猪感染后引起流产、产木乃伊胎或死胎,初生仔猪感染死亡率可达 100%,成年猪一般为隐性感染,不表现临床症状,但长期带毒和排毒。在我国该病已涉及包括香港、台湾在内几乎所有地区^[2]。美洲和欧洲许多国家通过应用基因缺失弱毒苗免疫,配合鉴别诊断等综合防控措施,成功将该病从家养猪场根除^[3],我国许多猪场也应用类似方法有效控制了该病。但自 2011 年以来,在我国一些 Bartha 株疫苗免疫的猪场又有该病的发生^[4-6],其特征为母猪产弱仔、死胎,流产,仔猪出现神经症状等临床症状,且死亡率较高,其地域包括黑龙江省、吉林省、天津市、河北省、湖北省、四川省、江苏省、广东省等,给我国养猪业造成极大的经济损失^[4-6],分析表明疫情由 PRV 变异株所引起。

疫苗接种是控制猪伪狂犬病最重要的措施,而免疫效果很大程度取决于抗原滴度。目前市场上所售的猪伪狂犬病疫苗在制备抗原时所用的细胞主要是鸡胚成纤维细胞,仓鼠肾(baby hamster kidney, BHK)细胞和猪睾丸细胞(swine testicular, 简称 ST)细胞,后 2 种细胞便于利用微载体培养和悬浮培养提高抗原滴度,是制备猪伪狂犬病疫苗的首选。

本试验将 6 株 PRV 在 BHK 和 ST 细胞上的增殖效率进行了比较,并且对不同保存条件下 PRV 的滴度变化进行了初步研究,以期为筛选疫苗候选株提供依据,同时为猪伪狂犬病疫苗生产工艺的研究提供基础。

本试验将 6 株 PRV 在 BHK 和 ST 细胞上的增殖效率进行了比较,并且对不同保存条件下 PRV 的滴度变化进行了初步研究,以期为筛选疫苗候选株提供依据,同时为猪伪狂犬病疫苗生产工艺的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和主要试剂

病毒:Bartha K61 株,购自西班牙海博莱生物大药厂,产品批次为 66HP^[7];AH02LA 株为笔者所在实验室分离的 PRV 变异株^[6],保藏号码为:CGMCC

收稿日期:2020-04-23

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(18)3020];江苏省自然科学基金(编号:BK20181243)。

作者简介:陈赛赛(1993—),男,山西长治人,研究实习生,主要从事猪伪狂犬病疫苗及其防控技术的研究。E-mail:1304652436@qq.com。

通信作者:王继春,男,江苏南京人,博士,研究员,主要从事活载体疫苗和基因工程疫苗研究。E-mail:jewang@263.net。

No. 10891; B - gD & gC^S 株是以 Bartha K61 株为母本, 将其 *gD* 和 *gC* 基因替换为流行变异株 AH02LA 株的 *gD* 和 *gC* 基因的重组病毒株^[8]; LA2017 株是以 AH02LA 株为母本经连续传代获得的致弱疫苗株, 该毒株缺失了从 *gI* 基因第 118 位核苷酸至 28K 基因第 251 位核苷酸的共 3 686 碱基, 包括 *gI* 部分基因、*gE* 全部基因、11K 全部基因和 28K 部分基因, 保藏号码为: CGMCC No. 18170; LA1206 株, 是以 AH02LA 株为母本, 人工缺失 *gE* 和 *TK* 基因, 再经连续传代 80 代获得的弱毒疫苗株, 保藏号码为: CGMCC No. 14329^[9]; LA - A 株, 是以 AH02LA 株为母本, 人工缺失 *gE* 而得, 用作 PRV 基因缺失灭活疫苗的种毒^[10]。

细胞: BHK 细胞和 ST 细胞, 由笔者所在单位细胞工程组提供。

主要试剂: 新生牛血清 (newborn bovine serum, 简称 NBS) 和 DMEM 培养基为 Gibco 公司产品。

1.2 病毒的培养与收获

取 PRV 各毒株, 按 0.01 感染复数 (multiplicity of infection, 简称 MOI) 接种长满单层的 BHK 或 ST 细胞, 吸附 1 h 后, 吸去病毒液, 应用无菌 PBS 液洗涤 3 次, 加 2% NBS 的 DMEM 培养液 37 °C 培养, 待细胞病变达 80% 后, 将上清与细胞混合物收集, 在 -70 °C 和 37 °C 冻融, 经 8 000 r/min 离心, 取上清分装置 -70 °C 保存。

1.3 病毒含量的测定

BHK 和 ST 细胞传至 96 孔板长满单层, 将 PRV 各毒株倍比稀释至 $10^{-1} \sim 10^{-9}$, 每一稀释度接种 8 孔, 每孔 100 μ L, 对照组加 100 μ L 细胞营养液,

37 °C 孵育 1 h 后加入 2% NBS 的 DMEM 培养液 100 μ L, 每日观察细胞病变, 观察 5 d, 记录细胞病变情况, 按 Reed - Muench 法计算细胞半数感染量 (median tissue culture infectious dose, 简称 TCID₅₀)。

1.4 病毒蚀斑形成特性

BHK 和 ST 细胞传至六孔板长满单层, 接种病毒稀释液, 每孔 100 μ L, 含 50 ~ 100 TCID₅₀, 对照组加 100 μ L 细胞营养液, 37 °C 孵育 1 h 后加入 2% NBS 的 DMEM 培养液 100 μ L, 每隔 3 ~ 5 h 观察细胞病变情况。

1.5 生长曲线测定

将 PRV 各病毒株分别以 0.01 MOI 接种长满单层的 6 孔板上的 BHK 或 ST 细胞, 37 °C 孵育 1 h, 吸去上清, PBS 洗涤 3 次, 添加含 2% NBS 的 DMEM 培养液, 每孔 2 mL, 37 °C 培养, 分别于接种后 6、12、24、36、48、72 h 测定培养物中病毒含量, 统计所有时间点的病毒滴度, 绘制生长曲线。

1.6 不同温度和多次冻融对病毒滴度的影响

将相同滴度的 Bartha K61 株和 AH02LA 株分别放置在 37、4、-20、-70 °C 一段时间后, 检测其病毒的滴度, 如“1.3”节所述。并且在 -20 °C 和 -70 °C 条件下, 短时间内 (72 h 完成 7 次冻融) 反复冻融, 检测其病毒的滴度, 如“1.3”节所述。

2 结果与分析

2.1 病毒含量

从表 1 可以看出, 各毒株在 ST 和 BHK 细胞上适应性良好, 滴度达 $10^{6.57}$ TCID₅₀/0.1 mL 以上, 可满足生产需要。

表 1 PRV 各毒株在 ST 和 BHK 细胞上的病毒滴度

细胞类型	lg 病毒滴度 [lg (TCID ₅₀ /0.1 mL)]					
	Bartha K61	B - gD & gC ^S	LA2017	LA1206	LA - A	AH02LA
ST 细胞	8.20	7.50	6.66	7.50	7.50	7.66
BHK 细胞	7.80	6.80	6.57	7.50	7.20	7.40

2.2 病毒蚀斑特性

6 种 PRV 毒株在 ST 和 BHK 细胞上病变明显。接种相同剂量的病毒, 病变发生的进度不完全一致, Bartha K61 和 B - gD & gC^S 在 ST 细胞上的病变时间明显滞后于其他毒株, 且病变形态表现为细胞堆积, 颗粒增多。AH02LA 强毒株以及由 AH02LA 株衍生出来的 LA2017 株、LA1206 株和 LA - A 株,

在 ST 细胞上产生病变的形态基本一致, 空斑明显, 出现多数大小不一的融合细胞, AH02LA 强毒株病变进展最快, 大小空斑连成一片, 融合细胞多且大。AH02LA 强毒株在 BHK 细胞上也出现明显的融合细胞, 而其他毒株在 BHK 上的融合细胞不明显, 主要出现空斑和细胞变圆等现象 (图 1)。相对于 ST 细胞, 所有 PRV 在 BHK 细胞上出现病变的时间更早。

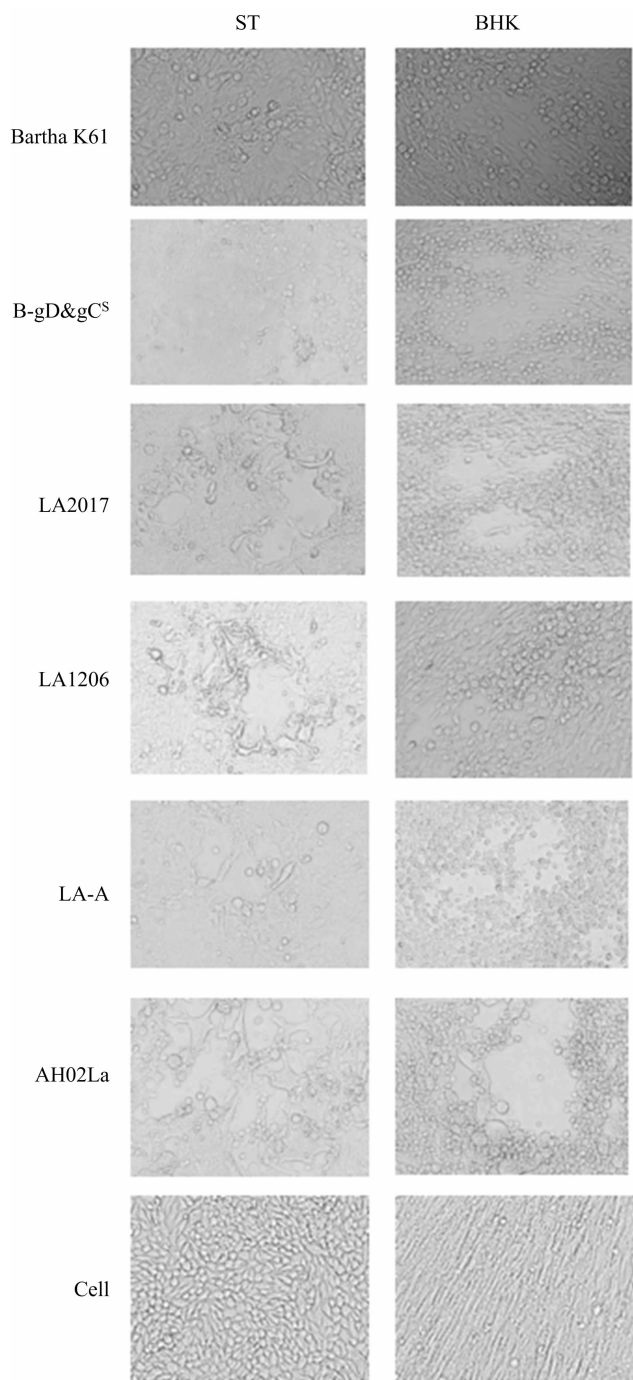


图1 6 种 PRV 毒株在 ST 细胞和 BHK 细胞上的蚀斑形态

2.3 生长动力学测定

从图 2、图 3 可以看出,各毒株滴度峰值出现在 36 ~ 48 h 之间。对于 BHK 细胞,大多数毒株的峰值出现在 36 h。而在 ST 细胞上,除 AH02LA 毒株的峰值出现在 36 h 外,其余毒株的峰值都出现在 48 h。Bartha K61 株、基因缺失株 LA - A 以及由强毒株 AH02LA 自然传代致弱的 LA2017 株其滴度峰值都能达到 $10^{8.0}$ TCID₅₀/0.1 mL,这十分有利于疫苗

的研发。综上所述,强毒株在 2 种细胞上增殖滴度均能达到 $10^{8.0}$ TCID₅₀/0.1 mL 以上,表现为发生病变早,病毒增殖快,峰值到来早。各毒株在 ST 细胞上的滴度峰值均大于同期在 BHK 细胞上的值。

2.4 不同保存温度对病毒滴度的影响

将相同滴度 ($10^{6.0}$ TCID₅₀/0.1 mL) 的 Bartha K61 株和 AH02LA 株样品分别放置在 37、4、- 20、

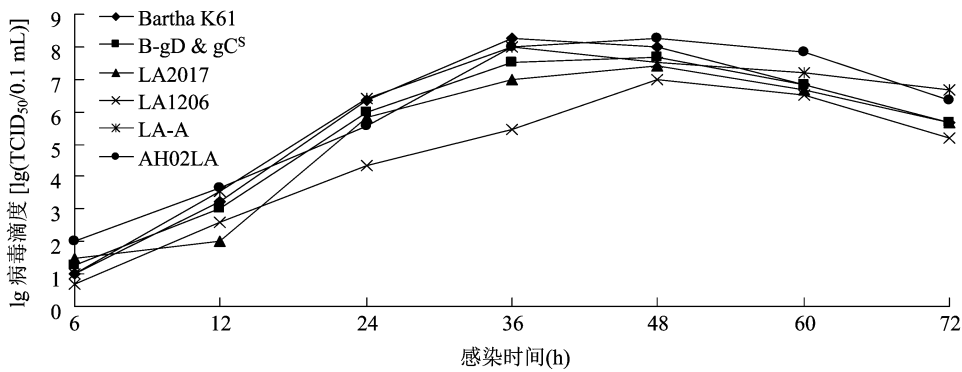


图2 PRV 各毒株在 BHK 细胞上的生长特性

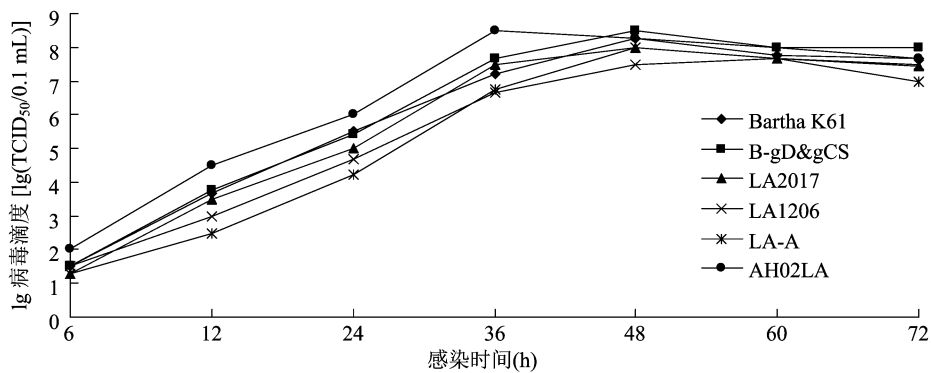


图3 PRV 各毒株在 ST 细胞上的生长特性

-70℃,一段时间后检测病毒滴度。结果发现病毒液在37℃保存3~12 d,其滴度下降趋势十分明显。
-70℃保存30 d,滴度变化不大;4℃保存3~12 d,

滴度基本无变化;而-20℃保存7 d,病毒滴度下降非常明显(表2)。说明 Bartha K61 株和 AH02LA 株在-70℃和4℃保存12 d内稳定性较好。

表2 不同保存温度对 Bartha K61 株和 AH02LA 株滴度的影响

保存温度 (℃)	菌株	lg 病毒滴度[lg(TCID ₅₀ /0.1 mL)]					
		30 d	3 d	4 d	5 d	7 d	12 d
-70	Bartha K61	6.00	5.88	6.00	5.71	5.66	5.88
	AH02LA	6.00	6.00	6.00	5.88	6.00	5.88
-20	Bartha K61	5.71	5.50	5.50	5.33	4.29	4.20
	AH02LA	5.88	5.61	5.50	5.50	4.71	4.40
4	Bartha K61	5.66	5.88	5.80	5.71	5.50	5.00
	AH02LA	5.88	5.66	5.71	5.88	5.66	5.20
37	Bartha K61	5.20	4.88	4.12	3.33	2.40	0.66
	AH02LA	5.40	5.00	4.50	3.88	2.71	0.50

2.5 多次冻融对病毒滴度的影响

将相同滴度的 Bartha K61 株和 AH02LA 株样品分别放置在-20、-70℃,短时间内(72 h 完成7次)反复冻融,检测滴度变化。结果表明,Bartha K61 株与 AH02LA 株-20、-70℃冻融多次后滴度有降低趋势。-20℃冻融7次后滴度下降接近90%, -70℃条件下,3次冻融滴度下降较低。多

次冻融后,效价有所下降,-20℃条件下冻融比-70℃条件下冻融滴度下降趋势明显(表3)。

3 讨论与结论

PRV 可在多种细胞上增殖,如猪肾细胞、非洲绿猴肾细胞、ST 细胞、BHK 细胞、牛肾细胞和鸡成纤维细胞^[11-15]。基于对 PRV 的敏感性和增殖效率

表 3 多次冻融对 Bartha K61 株和 AH02LA 株滴度的影响

冻融次数	lg 病毒滴度 [lg(TCID ₅₀ /0.1 mL)]			
	Bartha K61		AH02LA	
	-20 ℃	-70 ℃	-20 ℃	-70 ℃
1	5.88	6.00	6.00	6.00
2	5.61	5.88	5.88	5.88
3	5.40	5.88	5.57	5.88
4	5.50	5.80	5.57	6.00
5	5.40	5.71	5.40	5.71
6	5.40	5.71	5.40	5.66
7	5.00	5.50	5.20	5.66

以及规模化生产等因素,通常选取 BHK 细胞与 ST 细胞作为最终的生产用细胞。本试验将 6 株 PRV 在 BHK 和 ST 细胞上的增殖效率进行了比较。试验中所有毒株均能在 BHK 和 ST 细胞上产生明显病变,强弱毒株病变的形态存在明显差异,强毒株表现出巨融合细胞的出现以及病变时间超前等特性,本结论与程晓霞等报道的结果^[13]一致。观察体外生长特性发现病毒增殖的整个过程经历增殖期和高峰期,而后出现下滑期。对于 BHK 细胞,多数毒株的峰值出现在 36 h,而在 ST 细胞上峰值出现在 48 h(强毒株 AH02LA 除外),说明 PRV 在 BHK 细胞上增殖速度较快。此外,研究发现基因缺失株 LA-A 株、由强毒株 AH02LA 自然传代致弱的 LA2017 株和经典的弱毒株 Bartha K61 株在 BHK 和 ST 细胞上的滴度峰值都能达到 10^{8.0} TCID₅₀/0.1 mL 以上,这十分有利于 PRV 疫苗抗原的制备。在实际的生产中,ST 细胞可用于活疫苗与灭活疫苗的生产,本研究发现 PRV 在 BHK 细胞上出现病变的时间较早,病毒含量较高,在节省时间的同时,又能获得较高的抗原浓度,因此,BHK 细胞也可作为 PRV 增殖的理想细胞,考虑到其致癌性的隐患,一般用于灭活疫苗抗原的制备。

此外,在 PRV 抗原实际的生产中,在抗原收获后需要进行短时间保存,并且需要冻融离心去除细胞碎片,因此,本试验研究了抗原在 -70、-20、4、37 ℃ 温度条件下短期保存对病毒滴度的影响。结果表明,病毒不宜 -20 ℃ 保存,-70 ℃ 是理想的保存温度,但是实际生产中抗原产量较大,-70 ℃ 保存需要消耗大量能源,因此可选择 4 ℃ 短期保存(不超过 12 d)。病毒冻融试验结果显示,PRV 抗原 -20、-70 ℃ 条件下冻融多次后滴度均有所下降,为维持抗原稳定,应避免多次冻融,必要时可选择

-70 ℃ 条件下冻融 3 次以内。

综上所述,本研究从实际生产出发,开展的 PRV 生长特性以及不同保存温度和反复冻融对病毒滴度的影响,其目的是提高抗原滴度,保护抗原活力,为疫苗的生产提供科学依据。

参考文献:

[1]殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1997:700-713.

[2]邓仕伟,汪勇,薛春芳. 我国伪狂犬病流行现状及新特点[J]. 动物医学进展,2006,27(9):105-107.

[3]Ketusing N,Reeves A,Portacci K,et al. Evaluation of strategies for the eradication of pseudorabies virus (Aujeszky's disease) in commercial swine farms in Chiang - Mai and Lampoon provinces, Thailand, using a simulation disease spread model [J]. Transboundary and Emerging Diseases,2014,61(2):169-176.

[4]彭金美,安同庆,赵鸿远,等. 猪伪狂犬病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. 中国预防兽医学报,2013,35(1):1-4.

[5]An T Q,Peng J M,Tian Z J,et al. Pseudorabies virus variant in Bartha - K61 - vaccinated pigs, China, 2012 [J]. Emerging Infectious Diseases,2013,19(11):1749-1755.

[6]乔永峰,顾一奇,柳畅,等. 猪伪狂犬病毒 AH02LA 株的分离鉴定及其对仔猪致病性研究[J]. 畜牧与兽医,2016,48(12):36-41.

[7]王继春,曾容愚,Torrents D,等. 猪伪狂犬病活疫苗(Bartha K61 株)对变异株的保护效力[J]. 畜牧与兽医,2015,47(12):1-4.

[8]Zhang C J,Liu Y M,Chen S,et al. A gD & gC - substituted pseudorabies virus vaccine strain provides complete clinical protection and is helpful to prevent virus shedding against challenge by a Chinese pseudorabies variant[J]. BMC Veterinary Research,2019,15:2.

[9]刘娅梅,乔永峰,顾一奇,等. 猪源伪狂犬病病毒变异株 AH02LA 株细菌人工染色体的构建与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2018,40(10):880-885.

[10]Wang J C,Guo R L,Qiao Y F,et al. An inactivated gE - deleted pseudorabies vaccine provides complete clinical protection and reduces virus shedding against challenge by a Chinese pseudorabies variant[J]. BMC Veterinary Research,2016,12:277.

[11]李小静,唐满华. 猪伪狂犬病病毒在不同细胞上的增殖研究[J]. 吉林畜牧兽医,2015,36(6):14-16.

[12]王岩,杨明凡,崔保安,等. PK15、Vero、BHK-21、CEF 细胞增殖猪伪狂犬病病毒的比较[J]. 安徽农业科学,2007,35(18):5432-5445.

[13]程晓霞,陈少莺,胡奇林,等. 猪伪狂犬病病毒在几种细胞中增殖情况的比较[J]. 福建畜牧兽医,2006,28(6):37-38.

[14]王树成,赵祥平,董志珍,等. 用 PK15、VERO 和 MDBK 三种细胞增殖猪伪狂犬病病毒的比较[J]. 畜牧与兽医,1996,28(2):80.

[15]彭丽英,倪建平,张婉华,等. 猪伪狂犬病病毒在不同细胞中增殖的研究[J]. 上海农业学报,2011,27(4):67-69.