

郭广富,曹军平,朱爱萍,等.猪伪狂犬病病毒泰州株的分离鉴定[J].江苏农业科学,2015,43(3):200-202.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.065

猪伪狂犬病病毒泰州株的分离鉴定

郭广富,曹军平,朱爱萍,金彩莲,戴丽红

(江苏农牧科技职业学院动物医学院,江苏泰州 225300)

摘要:从泰州市姜堰区某猪场发生的疑似伪狂犬病病猪中采集病料,接种 PK15 细胞,收取细胞病毒液并提取 DNA,经 PCR 检测及间接免疫荧光鉴定,结果表明该分离株为猪伪狂犬病毒,命名为 TAIZ130417。分离的病毒在 PK15 细胞上的生长滴度可以达到 $10^{8.12}$ TCID₅₀/mL。将该病毒接种家兔,家兔很快出现奇痒并最终死亡等伪狂犬症状。

关键词:猪伪狂犬病毒;分离;鉴定

中图分类号: S858.285.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0200-03

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起多种家畜和野生动物以发热、奇痒(猪除外)和脑脊髓炎为主要症状的急性传染病^[1]。以猪的感染最为普遍,该病毒能引起母猪的繁殖障碍,主要表现为流产、死胎、木乃伊胎等;新生仔猪发生感染时,死亡率可高达 100%;此外,育肥猪感染往往致使其生长缓慢,种公猪感染则导致精液品质下降甚至丧失种用价值^[2]。伪狂犬病最早在美国发现,我国于 20 世纪 40 年代末在猫中首次发现了该病

毒,60 年代初在猪群中也出现了该病毒流行。目前,该病在我国广泛流行,严重威胁着猪群的健康,并造成了养猪业严重的经济损失^[3-4]。本研究对泰州市某猪场疑似伪狂犬病患猪采集肝、肾及脾等组织病料,进行 PRV 的分离、鉴定,以期为今后深入研究和科学地防控该病提供参考依据。

1 材料与与方法

1.1 病料

疑似伪狂犬病病猪的肝、肾及脾等组织,于 2013 年 4 月 17 日取自泰州市姜堰区某猪场。将采集的病料研碎,按 1 g : 5 mL 加入无菌含双抗的 PBS 溶液,混匀,反复冻融 3 次,离心取上清,用孔径 0.22 μm 滤器过滤后, -20 °C 保存备用。

1.2 试剂、细胞、阳性血清及家兔

基因组 DNA 快速抽提试剂盒(动物)、Taq DNA 聚合酶、dNTP Mix、25 mmol/L MgCl₂ 及 10 × PCR buffer 均为上海生工

收稿日期:2014-04-20

基金项目:江苏农牧科技职业学院青年基金(编号:NSFQN1304);江苏农牧科技职业学院重点课题(编号:ZD201104)。

作者简介:郭广富(1979—),男,安徽蒙城人,硕士,讲师,从事动物医学类教学及科研工作。E-mail:ggf66@sina.com。

通信作者:曹军平,博士,副教授,从事动物医学类教学及科研工作。E-mail:cccc62@163.com。

结核分枝杆菌中,由此可见,被检的患病犬、猫极有可能受到非结核分枝杆菌的广泛感染。

布鲁氏菌血清学检测结果显示,泰州地区犬布鲁氏病的阳性率为 2.01%,阳性犬感染的病原体主要是粗糙型。各年龄段的犬均存在布鲁氏菌感染,主要由于幼犬在 3 月龄左右,体质较差且是交易的高峰期,传染源主要来源于母犬、养殖场和交易中心等,12 月龄左右是犬发情期,配种感染的可能性较大,12~24 月龄和 24~36 月龄也是犬繁殖盛期,带菌配种交叉感染、垂直感染的风险较大。

针对江苏省泰州地区宠物人兽共患病的流行现状,应加强防控措施研究,进一步建立和健全宠物管理的法律法规与标准体系^[7],逐步实施系统性管理措施如宠物电子户口、强制定点免疫、流浪宠物收容、定期科普教育等;应积极开展宠物细菌病病原生态学、流行病学、新型疫苗及其他生物防治制品等研究;此外,还应开展宠物病原细菌耐药性监测工作,规范使用抗生素,积极开展抗生素替代品研究与应用。总的来说,完善宠物细菌病的报告、监测与溯源体系,可以更加有效地预防和控制人类疾病^[8]。

参考文献:

- [1] Huang J L, Xu H Y, Bao G Y, et al. Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhoea patients [J]. *Epidemiology and Infection*, 2009, 137(8): 1111-1120.
- [2] 崔丽瑾,王兴龙,王英超,等.野生动物布鲁氏菌病[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(3): 283-288.
- [3] GB 4789.4—2010 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2010.
- [4] 何晓青. 卫生防疫细菌检验[M]. 南昌:新华出版社, 1989.
- [5] 何蕊,黄金林,许海燕,等.弯曲菌多重 PCR 检测方法的建立及其初步应用[J]. *扬州大学学报:农业与生命科学版*, 2007, 28(1): 5-8.
- [6] 王伟,刘佩红,陈鸿军,等.犬猫感染分枝杆菌的分子流行病学调查[J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(10): 73-76.
- [7] 耿庆华,林颖,付海滨,等.伴侣宠物管理机制的初探[J]. *中国动物检疫*, 2009, 26(4): 19.
- [8] 李金元,程抱林,王远清,等.宠物疫病防控的隐患与对策[J]. *养殖与饲料*, 2009, 4(1): 102-104.

生物工程有限公司产品,100 bp DNA Ladder 和 $6 \times$ DNA 凝胶载入染料 (Loading Dye) 购自 Fermentas 公司。PK15 细胞由江苏省动物流行病学研究中心保存。猪源抗 PRV 阳性血清,购自 VMRD 公司,羊抗猪 IgG - FITC,购自 SANTN CRUZ 公司。胰酶细胞消化液,购自上海碧云天生物技术有限公司;新生牛血清和 DMEM 培养基购自上海生工生物工程有限公司。健康的家兔 4 只,购自江苏农牧科技职业学院农场。

1.3 引物的设计与合成

根据文献[5]方法,合成 1 对 PRV 引物,片段针对 PRV *gH* 基因中的一段序列,扩增片段长 355 bp。引物序列为:上游引物 5' - GCGTGTACTGCGACTGCGTGTT - 3';下游引物 5' - CGACCTGGCGTTTATTAACCGAGA - 3',由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 病毒核酸的提取及 PCR

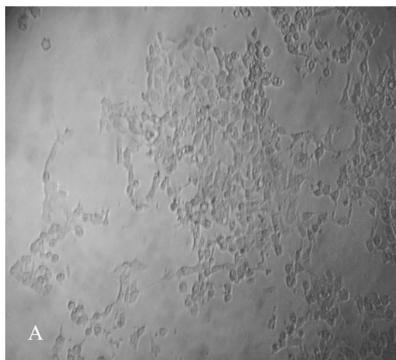
用基因组 DNA 快速抽提试剂盒,按说明书上的操作方法提取组织病料 DNA。以提取的组织病料 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 采用 50 μ L 反应体系:5 μ L 10 \times buffer,3 μ L 25 mmol/L MgCl₂,1 μ L 10 mmol/L dNTPs,20 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L,用灭菌超纯水补足 50 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,54 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察电泳图谱,拍照记录结果。

1.5 病毒的分离

将上述“1.1”节处理的经 PCR 检测呈 PRV 阳性的病料悬液接种于 PK15 单层细胞上,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后弃接种液,加入含 2% 新生牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 培养箱,每日观察,盲传至细胞病变稳定、病变率达 80% 时收毒,对收获的病毒液 PCR 检测 PRV。

1.6 病毒的 IFA 鉴定

将分离毒接种至长满单层的 PK15 细胞,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后,吸取病毒液,PBS 洗涤 2 次,加入维持液于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h;同时以未接种病毒的 PK15 细胞作为阴性对照。待检细胞使用 PBS 洗涤 3 次,冰甲醇 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min;PBS 洗涤 3 次,加入猪源抗 PRV 阳性血清,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,再加入 FITC 标记的羊抗猪抗体,37 $^{\circ}$ C 孵



育 1 h,PBS 洗涤 3 次后,置于 Olympus 倒置荧光显微镜下观察。

1.7 病毒滴度测定

将病毒液稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-10}$,分别接种到 96 孔培养板中长成融合单层的 PK15 细胞上,每个稀释度接种 8 孔,培养板最后 2 列孔接种稀释液作对照,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,96 h 后观察细胞病变,按照 Reed - Muench 法计算病毒的 TCID₅₀。

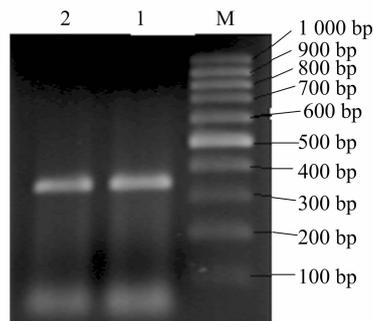
1.8 家兔接种试验

用 PRV 分离毒株腹侧皮下接种 2 只家兔,2 mL/只;另取 2 只作为阴性对照组,分别注射细胞维持液,2 mL/只。试验组和对照组隔离饲养,每日观察记录家兔的临床表现。

2 结果与分析

2.1 病料的 PCR 检测

对疑似 PRV 感染猪组织病料提取 DNA,然后进行 PCR 检测,扩增出片段大小为 355 bp 的目的条带,与预期结果相符(图 1)。

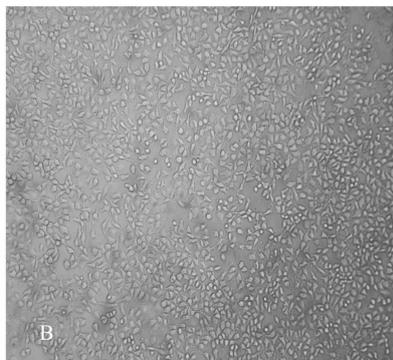


M—100 bp DNA Ladder; 1—病料中 PRV PCR 扩增产物;
2—细胞中 PRV PCR 扩增产物

图1 病料及细胞分离中 PRV PCR 检测

2.2 病毒的分离

将 PRV 阳性病料组织研磨液经 0.22 μ m 细菌滤器过滤后,接种至单层 PK15 细胞,24 h 后观察到了典型的细胞病变,细胞聚集、变圆、脱落,有拉网现象(图 2)。提取 DNA 做 PCR 检测,扩增出特异性目的片段(图 1)。



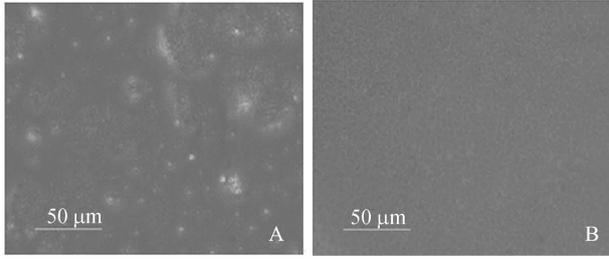
A—病料上清感染的PK15细胞; B—对照PK15细胞

图2 病料组织匀浆上清液感染 PK15 细胞引起的细胞病变

2.3 IFA 鉴定

分离毒感染 PK15 后,用猪源抗 PRV 阳性血清和 FITC 标记的羊抗猪抗体做 IFA 检测。如图 3 所示,观察到了典型的

特异性绿色荧光,而未接种 PRV 的 PK15 细胞没有观察到任何特异性荧光。结果表明该分离株为 PRV,将其命名为 TAIZ130417。



A—接毒的 PK15 细胞; B—未接毒的 PK15 细胞

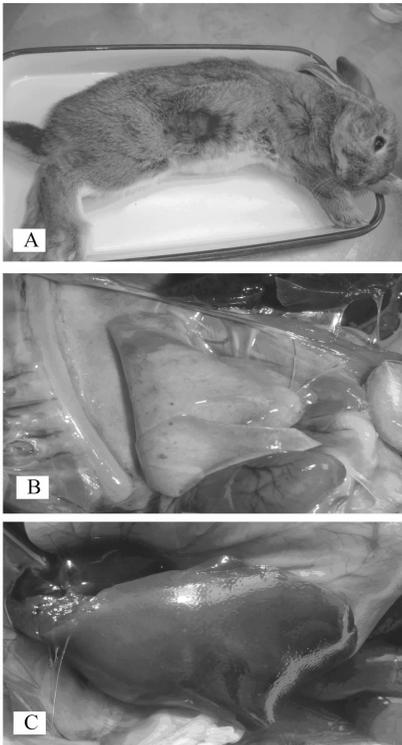
图3 病毒的间接免疫荧光检测结果

2.4 病毒滴度

统计不同稀释度的分离毒在 96 孔细胞板上 PK15 细胞中出现的致细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 按 Reed - Muench 法测得分离毒滴度可达 $10^{8.12}$ TCID₅₀/mL。

2.5 家兔感染试验

2 只试验组家兔在接种细胞病毒液后约 48 h 表现奇痒症状, 不断啃咬腹侧注射部位, 掉毛出血; 接种后 62 h 时出现角弓反张而死亡。注射细胞维持液的对照组家兔观察 7 d 后均无异常表现。死亡兔剖检可见脑膜充血、肺瘀血, 并有大小不等的出血斑点, 气管环充、出血, 肝瘀血肿大、有坏死灶等(图 4)。



A—注射部位被啃咬、脱毛及出血; B—肺有大小不等的出血斑点; C—肝瘀血肿大、有坏死灶

图4 接种 PRV 致死的家兔

3 结论与讨论

PR 是危害养猪业的重要传染病^[6], 我国是一个养猪大国, 因而对该病原的深入研究具有非常重要的意义。

PCR 技术是从分子水平对病毒进行诊断的一种方法, 能检出痕量病毒。PCR 具有快速、敏感、特异性强等优点, 不仅可以检测细胞培养的 PRV, 而且可以直接检测临床样品^[7]。

本试验先对临床 PR 可疑病猪采集病料进行 PCR 检测, 检测阳性后才接种到细胞, 提高了细胞分离的成功率。

PRV 具有泛嗜性, 能在许多细胞中增殖。猪的 PK-15、SK6、PS 细胞, 仓鼠的 BHK-21, 猴的 Vero 细胞、GMK 细胞和兔的 EP 细胞等都能用于增殖该细胞, 其中 PRV 对猪肾细胞和兔肾细胞最为敏感, 生产上常使用猪细胞系 PK-15 或 SK-16 细胞进行 PRV 的培养。本试验选用 PK-15 细胞分离培养, 除了 PRV 对其具有较强的敏感性外, 该细胞还具有易培养、增殖速度快等特点^[8]。

IFA 是我国目前用于 PR 快速诊断的一种较好方法, 该方法具有特异性高, 不与细小病毒、腺病毒、血凝性脑炎病毒及肠道病毒发生交叉反应, 以及敏感性较高等特点^[9]。对本次细胞病毒的鉴定采用了 IFA 方法, 发现分离病毒感染 PK15 后呈现明显的特异性绿色荧光, 而未接种 PRV 的 PK15 细胞没有观察到任何特异性荧光。

动物接种试验是 PR 常用的检测方法。将病料或分离的病毒上清液皮下接种到家兔或小鼠, 根据家兔或小鼠的临床症状做出判定。若接种液中含有 PRV, 家兔会不停啃咬接种部位, 随即四肢麻痹, 卧地不起, 最后抽搐死亡; 小鼠接种含有 PRV 的病料, 也会出现神经症状, 最后死亡。本试验使用学校牧场饲养的健康家兔, 接种细胞毒后 3 d 内发病死亡, 观察到典型的神经症状, 且解剖见到明显的内脏病理变化。

本试验将 PCR 检测后 PRV 阳性的病料接种 PK15 细胞, 经 IFA 鉴定、病毒滴度测定及家兔接种试验, 结果成功分离出一泰州株 PRV。该毒株的获得, 为今后深入研究该病毒的分子生物学特性及开发有效的免疫制剂提供了科学的参考依据。

参考文献:

- [1] 斯特劳 B E. 猪病学[M]. 8 版. 赵德明, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000; 239 - 253.
- [2] 初小辉. 吉林省猪伪狂犬病流行病学调查与防控措施的研究及应用[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [3] Tamba M, Calabrese R, Finelli E, et al. Risk factors for Aujeszky's disease seropositivity of swine herds of a region of northern Italy[J]. Preventive Veterinary Medicine, 2002, 54(3): 203 - 212.
- [4] 童武, 张青占, 郑浩, 等. 免疫后发病仔猪中伪狂犬病毒的分离和鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(3): 1 - 7.
- [5] 胡慧, 贾艳艳, 杨春华, 等. 多重 PCR 检测猪伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型的研究[J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(4): 421 - 424.
- [6] 彭金美, 安同庆, 赵鸿远, 等. 猪伪狂犬病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.
- [7] Echeverría M G, Pecoraro M R, Pereyra N B, et al. Rapid diagnosis of pseudorabies virus infection in swine tissues using the polymerase chain reaction(PCR)[J]. Revista Argentina de Microbiología, 2000, 32(3): 109 - 115.
- [8] 吴云飞, 朱玲, 徐志文, 等. 伪狂犬病病毒四川株的分离鉴定及增殖特性[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(6): 557 - 564.
- [9] 倪娇, 周绪斌, 张馨玉, 等. 近期部分规模化猪场猪伪狂犬病野毒抗体监测情况调查[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(9): 102 - 104.