

吴 双,朱善元,郭长明,等. 肠炎型犬细小病毒的分离鉴定及病毒滴度测定[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):173-175.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.044

# 肠炎型犬细小病毒的分离鉴定及病毒滴度测定

吴 双,朱善元,郭长明,秦 枫,左伟勇,王永娟,洪伟鸣,王安平

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

**摘要:**为获得肠炎型犬细小病毒分离株,采集犬细小病毒胶体金初检阳性的 3 份粪便,采用同步接毒法分别接种猫肾细胞(F81)和犬肾细胞(MDCK)进行分离培养,F81 盲传至第 2 代出现细胞病变,MDCK 盲传至第 3 代出现细胞病变,2 种细胞均仅从病料 3 中分离出 1 株病毒。采用 PCR 方法鉴定该分离株为犬细小病毒并命名为 CPV3。根据 VP2 基因核苷酸序列绘制的系统进化树及其推导氨基酸序列的分析,确定 CPV3 属于 CPV-2a 亚型。测定 CPV3 在 MDCK 中 72 h 时的组织细胞半数感染量(TCID<sub>50</sub>),第 5 代次(CPV-M-5)和第 10 代次(CPV-M-10)的 TCID<sub>50</sub> 数值分别为  $10^{-4.83}/0.1$  mL 和  $10^{-5.50}/0.1$  mL,这为后续测定重组犬干扰素活性试验提供了材料。

**关键词:**犬细小病毒;细胞病变;CPV-2a 亚型;组织细胞半数感染量

**中图分类号:**S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0173-03

犬细小病毒(CPV)感染是以呕吐和腹泻并伴有胃肠道出血等为主要病征的急性传染性疾病,加拿大、美国和澳大利亚同年报道从患肠炎的病犬粪便中分离到 CPV,该病很快在全世界范围内传播。各年龄段犬均可发病,以 6 月龄以下幼犬发病和死亡较多<sup>[1]</sup>。作为细小病毒中最易变异的病毒<sup>[2]</sup>,1980 年报道,1978—2000 年从最初的 CPV-2 型演变出现了 CPV-2a,与 CPV-2 相比潜伏期更短、肠炎症状更严重、粪便中病毒含量低;1984 年报道了 CPV-2b,2000 年报道了 CPV-2c,2010 年在国内首次被鉴定,致病性更强,3 种抗原变异株。近 10 年来,世界各地出现了 New CPV-2a、New CPV-2b 和 New CPV-2c 优势抗原变异株,其中 New CPV-2a/b 主要在中国、韩国和日本等亚洲国家流行。New CPV-2a/b 与 CPV-2a/b 区别在于 VP2 蛋白上 297 位氨基酸发生了突变,改变了与宿主细胞受体的亲和力<sup>[3-4]</sup>。CPV-2 的变

异主要是通过 VP2 基因定向漂移产生新抗原变异株<sup>[5]</sup>,只是在 VP2 蛋白上 5~8 个关键氨基酸位点发生了变化,但却导致抗原性、致病性和宿主谱发生改变<sup>[6]</sup>。CPV-2 是一种无囊膜、单股负链的易变异 DNA 病毒,基因组约为 5 200 个核苷酸,编码的结构蛋白包括 VP1 和 VP2,其中 VP2 是病毒结构蛋白,含有 CPV 的主要抗原决定簇,约占病毒衣壳蛋白 90% 的比重。VP2 蛋白在决定病毒的宿主范围、结合及进入细胞过程中均起到了重要作用<sup>[7-8]</sup>。由于 CPV-2 的复制和组装须要借助宿主细胞中的多种 DNA 复制酶,因此只能在分裂间期细胞中复制,所以采用同步接毒法来分离病毒<sup>[9]</sup>。本试验采用同步接毒法利用 F81 和 MDCK 细胞分离到 1 株 CPV,该病毒属于 CPV-2a 亚型,为了满足后续测定重组犬干扰素活性试验的需要,测定了该分离株的病毒滴度。

## 1 材料与方法

### 1.1 疑似犬细小病毒病病料的采集

江苏省泰州某宠物医院收治了 3 例疑似犬细小病毒病的病犬,病犬均出现典型的腹泻症状、呕吐、消瘦、鼻镜干燥等临床症状,采集病犬的新鲜粪便,先按照韩国安捷公司生产的 CPV 胶体金快速诊断试纸说明书进行检测,后采集检测为阳性犬的新鲜粪便,将其置于含 3% 胎牛血清、10% 双抗的 RPMI-1640,于 -80 ℃ 下备用。

### 1.2 细胞、常用试剂

F81 和 MDCK 购自武汉博士德生物工程有限公司;胎牛

收稿日期:2017-08-11

基金项目:江苏省青蓝工程项目(编号:00000216047);江苏省六大人才高峰项目(编号:NY-009);江苏省兽用生物制药高技术重点实验室开放课题(编号:JSKL 开放 402);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1055]。

作者简介:吴 双(1983—),女,江苏徐州人,博士,副教授,主要从事动物传染病防控和兽用基因工程疫苗研究。E-mail:jswushuang@sina.cn。

联系作者:王安平,博士,副教授,主要从事兽用生物制药研究。E-mail:wap4017@163.com。

[10]邵 永,戈一峰,赵晓峰,等. 精液留取后不同时间分析对精子运动参数的影响[J]. 中华男科学杂志,2010,16(7):631-634.

[11]潘 锋,徐志鹏,石 亮,等. 精液常规参数初检合格后不同时间点再分析结果及其与精子 DNA 损伤的关系[J]. 中华男科学杂志,2013,19(1):63-67.

[12]蒲江波,高 建,唐雪莲. 少、弱、畸形精子症患者体外精子的 PR、PR+NP 以及顶体酶活性在不同时间段的下降速率比较[J]. 中华男科学杂志,2015,21(8):733-736.

[13]Sharma R, Hogg J, Bromham D R. Is spermatozoan acrosin a predictor of fertilization and embryo quality in the human? [J]. Fertility and Sterility, 1993, 60(5):881-887.

[14]马金霞,钱立新,蒋田华,等. 正常供精者精液检测时间与精子活力的关系研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2003(1):43.

[15]陈 碧,张 维,马天仲,等. 取精后至冷冻前的间隔时间对精子冷冻复苏效果的影响[J]. 中国医学创新,2016,13(11):1-4.

血清、DMEM 培养基、胰酶、青链双抗,购自 GIBCO 公司;安捷快速检测 CPV 抗体试剂盒、MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0、PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA 聚合酶、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  Competent Cells、Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR<sup>®</sup> 试剂盒、DNA marker、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 胶回收试剂盒等,均购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.3 犬细小病料处理

病料反复冻融 3 次后挤净棉签,5 000 r/min  $\times$  10 min 离心后的上清经 0.22  $\mu$ m 过滤至灭菌冻存管中。在 F81 细胞消化传代的同时将代接种的病料上清按照 1:10 接种细胞培养液比例采用同步接毒法传代,于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,再换 2% DMEM 维持液继续培养,同时设正常细胞对照。若有 80% 细胞出现细胞病变(CPE)时,收获病毒;按照 1:30 比例进行传代。如果没有出现 CPE 则于 4~5 d 收取上清,细胞传代至第 3 代仍无 CPE,则判断为阴性。同时,利用 MDCK 细胞按照上述方法进行病毒分离。

### 1.4 DNA 的提取、VP2 基因片段测序及分析

参考 GenBank 发布的 CPV 基因,设计 1 对引物[CPV-VP2-U,5'-AGAGACAATCTTGCACCAAT-3';CPV-VP2-D1755,5'-TATAATTTTCTAGGTGCTAGTTG-3']引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成]。

按照 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 5.0 试剂使用说明书流程提取阳性病料中病毒基因组 DNA,将 DNA 模板置于 -80  $^{\circ}$ C 备用。运用高保真酶 PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA 聚合酶扩增 VP2 基因,PCR 反应条件为:98  $^{\circ}$ C 10 s;60  $^{\circ}$ C 15 s,72  $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环。利用 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR<sup>®</sup> 试剂盒连接胶回收目的片段,转化后挑取白色菌落,将菌落 PCR 方法鉴定为阳性的菌液送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,至少送 3 个阳性克隆测序。应用 Lasergene 软件对 VP2 基因核苷酸序列进行同源性分析,应用 MEGA5.03 采用 Maximum Likelihood 法(最大似然法)构建系统进化树进行分析。

### 1.5 病毒滴度的测定

将培养的病毒液反复冻融 3 次后,用 2% DMEM 维持液做 10 倍比稀释,取 10<sup>-1</sup>~10<sup>-7</sup> 稀释度接种 MDCK 细胞。将 MDCK 细胞消化稀释为 2  $\times$  10<sup>5</sup> 个/mL 后铺布于 96 孔细胞板,每孔加 100  $\mu$ L 细胞悬液,再将稀释好的病毒液接种于孔中,每孔 100  $\mu$ L,每个稀释度重复 10 孔。每个稀释度做 2 个阴性对照孔,每孔加入 100  $\mu$ L 维持液,37  $^{\circ}$ C 培养 72 h,镜检,观察细胞形态并记录病变孔的数目,通过组织细胞半数感染量(TCID<sub>50</sub>)计算病毒滴度,按 Reed-Muench 法计算结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 CPV 细胞分离结果

按同步接毒法接种 F81 细胞,仅病料 3 从第 2 代次开始出现细胞病变(CPE),细胞发生变圆、拉网状、脱落、崩解等形态变化,将分离到的病毒命名为 CPV-F。细胞在接毒 72 h 出现明显的细胞病变(图 1-A),对照组细胞生长正常(图 1-B);其他 2 份病料传至第 3 代仍无 CPE,判断为阴性。

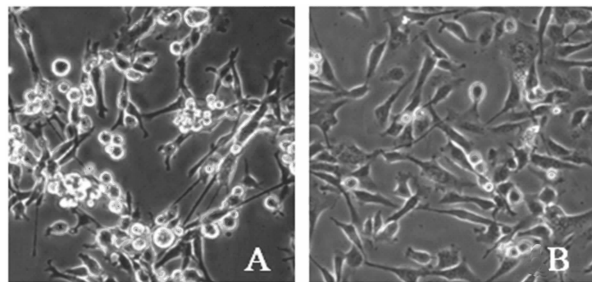


图1 F81的细胞病变(200 $\times$ )

采用上述的同步接毒法接种 MDCK 细胞后仅病料 3 从第 3 代次出现 CPE,命名为 CPV-M。从图 2 可以看出,在 MDCK 细胞培养 72 h 时出现的细胞病变。

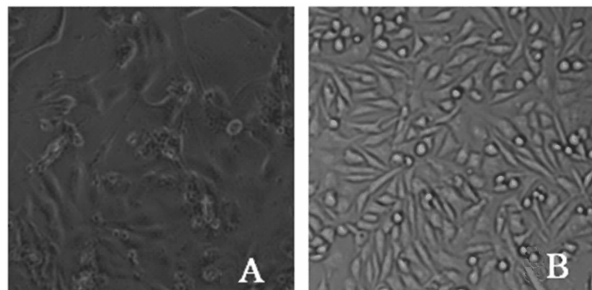
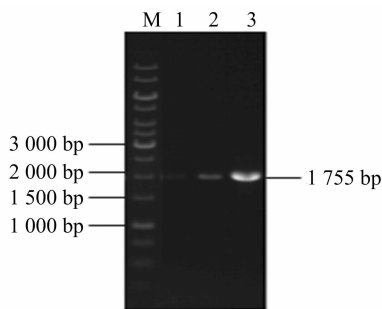


图2 MDCK的细胞病变(200 $\times$ )

### 2.2 PCR 扩增及其序列分析

通过 PCR 方法扩增得到的片段与预期片段大小一致,3 份病料均扩增到目的片段,1、2、3 泳道依次命名为 CPV1、CPV2、CPV3。从图 3 可以看出,3 份病料中病毒含量差异明显。



M—DNA 分子质量标准;1—病料 1;2—病料 2;3—病料 3

图3 病料的 PCR 鉴定

经切胶回收 TA 克隆后仅 CPV3 测序成功。根据 VP2 基因核苷酸序列的测序结果绘制系统进化树,CPV3 位于 2a 分支中,基因核苷酸序列系统发生树见图 4。

将测序获得的 CPV VP2 基因及推导氨基酸序列进行分析,该分离株的 426 位为天冬酰胺,符合 CPV-2a 亚型的特征。与上述引用的 21 株 VP2 基因的同源性为 99.2%~99.9%,氨基酸同源性亦为 99.2%~99.9%。系统发生树表明 CPV3 与上海分离株 CPV/CN/SH1/2013(KR002792)亲缘关系最近。

### 2.3 病毒滴度的测定结果

在加入病毒 72 h 时通过记录 MDCK 病变孔的数目,运用 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub> 数值,其中 CPV-M-5 的 TCID<sub>50</sub> 数值为 10<sup>-4.83</sup>/0.1 mL,CPV-M-10 的 TCID<sub>50</sub> 数值为 10<sup>-5.50</sup>/0.1 mL。

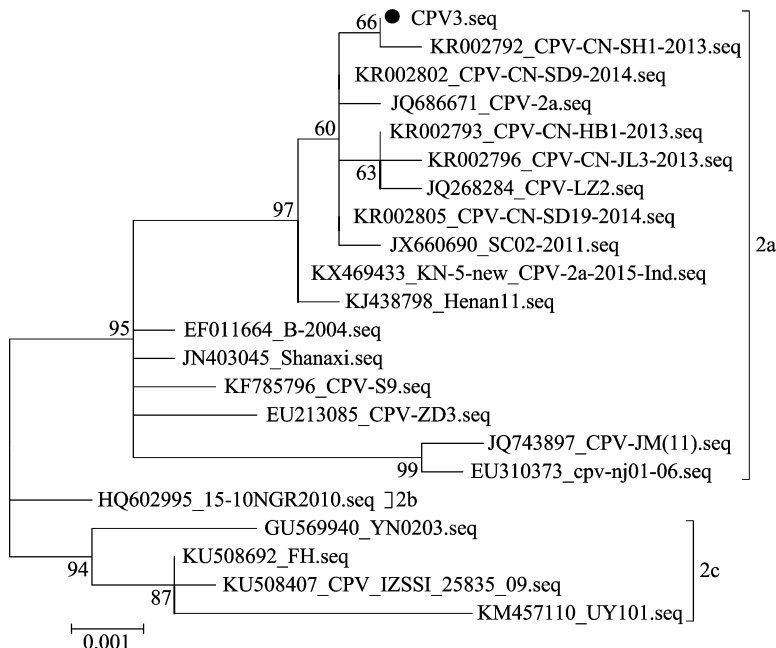


图4 基于Maximum likelihood 法构建 VP2 基因核苷酸序列系统发生树

### 3 讨论与结论

本试验从疑似感染犬细小病毒病的粪便中分离到 1 株病毒,经 2 种细胞培养和分子生物学的鉴定获得 CPV3,该病毒属于 CPV-2a 亚型,测定了 2 个代次的病毒滴度,为后续测定重组犬干扰素活性提供了基础材料。

CPV 由于自身所带基因限制,其复制增殖病毒前期所需的酶均要宿主细胞提供,要求宿主细胞必须处于对数生长期,故细小病毒培养分离多采用同步接种方法<sup>[10]</sup>。相关文献报道,分离 CPV 常用细胞有 F81 和 MDCK,由于 F81 细胞出现 CPE 更加明显,所以成为分离 CPV 最常用的培养细胞。本试验中 CPV 感染的 F81 和 MDCK 细胞均出现 CPE,虽然 F81 出现 CPE 时间更早、症状更明显,但是 MDCK 中 CPE 症状也是很容易观察到,这些细胞病变情况与相关报道较一致。

本试验中应用胶体金试纸条和 PCR 检测技术结果相一致,3 份病料均检测到含有 CPV,但在细胞分离病毒的过程中,只有病料 3 分离到 CPV。结果表明,胶体金试纸条和 PCR 检测灵敏度远高于病毒分离,而分离到病毒的难度要高于检测到病毒。本研究中扩增的 VP2 基因全长为 1 755 个核苷酸,共编码 584 个氨基酸。该病毒与 CPV-2 的 VP2 基因推导的氨基酸相比,共有 Met87Leu、Ile101Thr、Ala300Gly、Asp305Tyr、Val555Ile 5 个氨基酸序列发生了突变,据此判定 CPV3 属于 CPV-2a 亚型。分析 VP2 基因序列发现,CPV3 位于遗传进化树的 2a 分支中,且与国内分离株的亲缘关系普遍较近,该遗传进化树一定程度上表明国内分离的 CPV 没有明显的地域差异。

为了后续试验的需要,对分离 CPV-M 进行传代增殖并测定 TCID<sub>50</sub> 数值,CPV-M-5 的 TCID<sub>50</sub> 数值略低于 CPV-M-10 的 TCID<sub>50</sub> 数值,表明毒株的毒力在传代中逐渐增强。传代导致毒力增强的原因还有待于进一步研究阐明。

### 参考文献:

- [1] 耿志贤,时彦胜,郑亚平,等. 犬细小病毒病的流行现状调查[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(11):135-137.
- [2] Miranda C, Thompson G. Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants[J]. Journal of General Virology, 2016,97(9):2043-2057.
- [3] Zhang R, Yang S, Zhang W, et al. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China[J]. Virus Genes, 2010,40(3):397-402.
- [4] 赵建军,闫喜军,吴威. 犬细小病毒:从起源到进化[J]. 微生物学报,2011,51(7):869-875.
- [5] Hoelzer K, Shackelton L A, Parrish C R, et al. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses[J]. The Journal of General Virology, 2008, 89(9):2280-2289.
- [6] Hoelzer K, Parrish C R. The emergence of parvoviruses of carnivores[J]. Veterinary Research, 2010,41(6):39.
- [7] Hueffer K, Parker J S, Weichert W S, et al. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor[J]. Journal of Virology, 2003,77(3):1718-1726.
- [8] Clegg S R, Coyne K P, Parker J, et al. Molecular epidemiology and phylogeny reveal complex spatial dynamics in areas where canine parvovirus is endemic[J]. Journal of Virology, 2011, 85(15):7892-7899.
- [9] Parker J S, Murphy W J, Wang D, et al. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells[J]. Journal of Virology, 2001,75(8):3896-3902.
- [10] Harbison C E, Chiorini J A, Parrish C R. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus[J]. Trends in Microbiology, 2008,16(5):208-214.