

犬细小病毒的分离与鉴定^{*}

孔庆波¹, 张彦明²

(1 公安部警犬技术学校, 辽宁 沈阳 110034; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 从临床表现体温升高、呕吐、血样腹泻、脱水等疑似细小病毒(Canine Parvovirus, CPV)感染的病犬中, 采取粪样8份。应用狗肾传代细胞(MDCK)增毒, 其中6号病料(CPV6)在MDCK细胞上产生脱落、变形、游离等细胞病变, 且细胞感染性试验发现, CPV6对MDCK的感染性强于对猫肾传代细胞(CRFK)的感染性; 核酸型试验证明, CPV6毒株的代谢可被5-溴脱氧尿核苷(FUDR)所抑制, 其核酸属于DNA型; 所分离的病毒培养物能凝集猪、猴、马、猫的红细胞, 凝集效价达 $2^6 \sim 2^8$, 并能被已知犬细小病毒阳性血清所抑制, 但不能凝集牛、犬、绵羊、兔、小鼠和鸡的红细胞; 电镜观察病毒粒子外观呈圆形或六边形, 直径约20~23 nm; 该病毒耐酸、耐热、耐乙醚; 动物致病性试验表明, 经口服1 mL, 试验组幼犬第7天发病, 采集病犬粪样做HA试验为阳性反应, 其凝集猪红细胞的特性能被犬细小病毒阳性血清所抑制。

[关键词] 犬细小病毒; 分离; 鉴定

[中图分类号] S852.65⁺.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0054-05

犬细小病毒(CPV)感染是犬的一种急性出血性肠炎或以急性心肌炎为主要表现的传染病^[1]。1977年, 美国人Eugster从1条患出血性肠炎的病犬粪便中首先发现了犬细小病毒颗粒, 当时美国许多地方的犬暴发了急性腹泻。随后, 该病毒在加拿大、澳大利亚及欧洲某些国家被证实^[2~4]。1979年以来, 在我国北京、南京、上海、哈尔滨、长春、南昌、昆明等地的军、警犬场和实验动物场犬群中也不断流行一种以出血性腹泻为特征的传染病, 幼犬发病率高达90%以上, 致死率达30%~100%, 造成巨大损失, 给我国军警犬业及民间的养犬业带来严重威胁。1982年10月, 我国报道在暴发传染性出血性腹泻的病犬粪便提取物中发现细小病毒颗粒, 其大小和形态结构具有典型的细小病毒特征, 从而首次证实该病在我国的存在^[5,6]。随后, 在我国各地陆续有本病发生的报道。

该病在全国的流行对养犬业造成极大危害, 已成为犬的一种重要的传染病。因此, 该病的防治亦成为我国养犬业所面临的一个严重问题。实用、准确而迅速的病原分离鉴定已成为预防和治疗该病的重要措施。在世界范围内, 迄今人们已建立了多种用于犬细小病毒分离鉴定的方法, 但在我国, 由于最近几年

该病才在各省频繁发生, 故对该病的病原分离鉴定的方法研究还不多, 虽也建立了某些快速、敏感和特异的检测方法, 但还不适合兽医临床应用和推广^[7~9]。本文通过试验证明了辽宁某地区犬细小病毒的存在和流行, 以期兽医临床工作者提供判断依据, 建立一种简便、经济、实用而可靠的病原分离鉴定方法。现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

被检病料 从沈阳某犬场临床表现有体温升高、呕吐、血样腹泻、脱水等症状的疑似犬细小病毒的病例中, 采集粪样8份。

材料 CPV阳性血清(血凝抑制效价为 2^{12})、CPV弱毒苗(定名为A-CPV)、狗肾传代细胞(MDCK)和猫肾传代细胞(CRFK)由长春解放军农牧大学犬病研究中心提供。

红细胞 分别采集猪、马、猴、猫、牛、绵羊、兔、犬、小鼠和鸡抗凝的血液, 洗涤后配成0.5%红细胞悬液备用。

试验动物 从某养犬场购回6只1.5月龄同窝、未免疫幼犬, CPV HI抗体均小于 2^1 , 观察饲养4

* [收稿日期] 2003-01-15

[基金项目] 公安部警犬疾病项目(GA 1996003)

[作者简介] 孔庆波(1969-), 男, 辽宁本溪人, 讲师, 在读博士, 主要从事犬病研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事预防兽医学研究。

d, 每天测体温 2 次, 无任何异常, 供本试验用。

仪器 96 孔 V 型微量血凝板由上海实验仪器一厂生产。

细胞培养液 MEM 生长液先用 MEM 粉(美国 Gibco 公司产品)按说明配成基础培养液, 使用时按需要量配制, 每 100 mL 基础培养液中加入 150 mL/L 犊牛血清(自制)10 mL, 30 g/L 谷氨酰胺 1 mL, 各 10 000 IU/mL 青霉素、链霉素混合液 1 mL, 用 70 g/L 碳酸氢钠溶液调 pH 至 7.2。MEM 维持液加 20 mL/L 犊牛血清 10 mL, 其余成分同生长液。

含毒细胞培养物 在 MDCK 细胞上增毒 3~5 d, 冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液。

稀释液 浓度为 15 mmol/mL, pH 值分别为 6.4, 7.0, 7.2 的 PBS 液购自 Sigma 公司。

消化液 2.5 g/L 胰酶 Hank's 液(胰酶 2.5 g, Hank's 液 1 000 mL, 将胰酶溶于 Hank's 液中, 过滤除菌, 分装于瓶中, -20℃ 冰箱中保存备用)。

1.2 病毒分离

1.2.1 病料处理 将采集的病料放入含组织培养液的试管内, 迅速带回实验室, 将 Earle 氏液稀释 10 倍, 加青霉素、链霉素各 1 000 IU/mL, 以 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清液置 -40℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 细胞培养和增毒 用含 150 mL/L 犊牛血清的 MEM 生长液培养 MDCK 细胞, 待长满单层后遗弃生长液, 消化、传代, 同步接种已处理的病料样品, 分离培养物 0.2~0.3 mL/瓶, 加入 5~10 mL 生长液, 置于 37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 第 2 天换液, 待细胞长满单层后换成含 20 mL/L 犊牛血清的 MEM 维持液, 继续培养 3~4 d, 观察细胞病变, 待细胞病变(脱落、变形、游离等)达 80% 以上时冻融 3 次, 以 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清毒液, 置 -40℃ 冰箱保存, 同时取样进行 HA 和 HI 试验, 检测有无病毒增殖。

1.2.3 分离物判定 用 5 mL/L 的醛化猪红细胞微量血凝抑制试验测定培养物的血凝效价和血凝抑制效价, 以 HA 效价大于 2⁴ 且可被标准的 CPV 阳性血清抑制者判为分离阳性; 反之, 如果接毒后连续 3 次传代培养, 其培养物 HA 效价仍为阴性者判为分离阴性。

1.2.4 细胞感染性试验 分别用犬肾传代细胞和猫肾传代细胞测定病料样品的半数细胞感染量(TC₅₀), 同时, 以 A-CPV 作对照测定分离毒株对

上述 2 种细胞株的感染性。

1.3 病毒鉴定

1.3.1 血凝试验(HA) 参考文献[1, 10]的方法进行。

1.3.2 血凝抑制试验(HI) 参考文献[1, 10]的方法进行。

1.3.3 红细胞凝集对比试验 采用微量法, 分别用 pH 6.4 和 7.2 的 PBS 液, 在 4℃ 条件下测定分离毒(CPV 6)对猪、猴、猫、马、犬和鸡红细胞的 HA 效价, 同时以 A-CPV 作对照。

1.3.4 电镜观察 (1)粪样电镜观察。将 CPV 6 粪样经氯仿处理后进行低速离心, 取其上层液, 用 40 g/L 磷钨酸负染后于电镜下放大 60 000 倍观察, 并与犬瘟热病毒、犬腺病毒、犬冠状病毒形态进行比较。(2)分离病毒细胞培养物电镜观察。将 CPV 6 分离病毒细胞培养物冻融 3 次, 离心, 取其上清液, 用 40 g/L 磷钨酸负染, 电镜下放大 60 000 倍, 观察病毒粒子形态。

1.3.5 核酸型鉴定试验 用加 5-溴脱氧尿核苷(FUDR)至 100 mg/L 的培养液, 测定 CPV 6 对犬肾传代细胞的半数细胞感染量(TC₅₀), 同时以不加 FUDR 的培养液作对照, 利用 FUDR 对 CPV 6 的生长抑制作用鉴定该病毒的核酸类型。

1.3.6 对乙醚、酸、热的抵抗力试验 将 CPV 6 细胞培养物按以下 3 种方法处理: (1)用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 至 3.0, 37℃ 作用 2 h, 再用 100 g/L 的 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2; (2)加乙醚至 200 mL/L, 4℃ 作用 24 h, 充分挥发, 除去乙醚; (3)56℃ 水浴作用 1 h。然后分别用犬肾传代细胞测定经上述 3 种方法处理后的培养物的 TC₅₀, 同时以未作任何处理的原病毒细胞培养物作对照, 检测该病毒对酸、热和乙醚的抵抗力。

1.3.7 动物感染试验 将供试幼犬分成 3 组, 每组 2 只, 试验组动物各口服分离细胞培养病毒 1 mL; 对照 1 组动物各口服细胞培养液 1 mL; 对照 2 组动物各口服分离细胞培养病毒 1 mL 后, 于第 2 天各肌肉注射阳性血清 10 mL。在感染后分开饲养, 每天观察临床表现, 每天测体温 2 次。

2 结果与分析

2.1 病毒分离结果

6 号病料(CPV 6)接种于 MDCK 上, 5 d 后可见特征病变: 细胞脱落、游离、变形、皱缩。用该培养物作血凝试验, 其血凝效价为 2⁶~2⁸, 再做血凝抑制试

验,其凝集动物红细胞的作用可被 CPV 阳性血清所抑制。故初步认为 6 号病料中含有 CPV。

2.2 细胞感染性试验结果

CPV 6 对 MDCK 和 CRFK 细胞株的感染性 ($TCID_{50}/0.1\text{ mL}$) 分别为 $10^{-4.1}$ 和 $10^{-3.7}$, 与 A-CPV 对 2 种细胞株的感染性 (分别为 $10^{-4.2}$ 和 $10^{-3.8}$) 一致; CPV 6 和 A-CPV 对 MDCK 的感染性均比对 CRFK 的感染性强。

2.3 病毒鉴定结果

2.3.1 分离物血凝试验 有资料表明^[10], CPV 可凝集猪、猴、马、猫等动物的红细胞。本试验进行了 CPV 对牛、绵羊、兔、犬、小鼠和鸡的红细胞凝集试验。试验结果表明, CPV 6 培养物能较好地凝集猪、猴、马和猫的红细胞, 血凝效价分别为 2^{256} , 2^{256} , 2^{32} 和 2^{32} , 并且凝集猪、猴红细胞的效果比凝集马、猫红细胞的效果好, 而不能凝集牛、犬、绵羊、兔、小鼠和鸡的红细胞。

2.3.2 CPV 6 血凝抑制试验 CPV 6 培养物能凝集猪、猴、马和猫的红细胞, 用已知 CPV 阳性血清可抑制其血凝作用, 其 HI 效价分别为 $2^5 \times 10$, $2^5 \times 10$, $2^4 \times 10$ 和 $2^4 \times 10$ 。结果表明, CPV 6 培养物不但能凝

集猪、猴、马和猫的红细胞, 而且能被 CPV 阳性血清规律性抑制。

2.3.3 红细胞凝集对比试验 由分离物血凝试验结果 (表 1) 可见, CPV 6 株的血凝性与 A-CPV 一致, 在 4 条件下可凝集猪、猴、猫、马的红细胞, 对 pH 的要求也不严格。

表 1 血凝对比试验结果

Table 1 Results of HA contrast test

红细胞种类 Red blood cell	CPV 6		A-CPV	
	pH 6.4	pH 7.2	pH 6.4	pH 7.2
猪 Swine	2^{256}	2^{256}	2^{256}	2^{256}
猴 Monkey	2^{256}	2^{256}	2^{256}	2^{256}
猫 Cat	2^{32}	2^{32}	2^{32}	2^{32}
马 Horse	2^{32}	2^{32}	2^{32}	2^{32}
狗 Dog	0	0	0	0
鸡 Chick	0	0	0	0

2.3.4 电镜观察结果 在电镜下可见粪样中的病毒粒子外观呈圆形或六边形, 直径为 23 nm, 多数为实心, 少数为空心, 表面无囊膜, 有子粒, 病毒粒子呈聚集状态; 分离病毒细胞培养物在电镜下可见大小均一、呈散在状态的病毒粒子 (形态同上)。CPV 与其他几种病毒的形态比较见图 1。

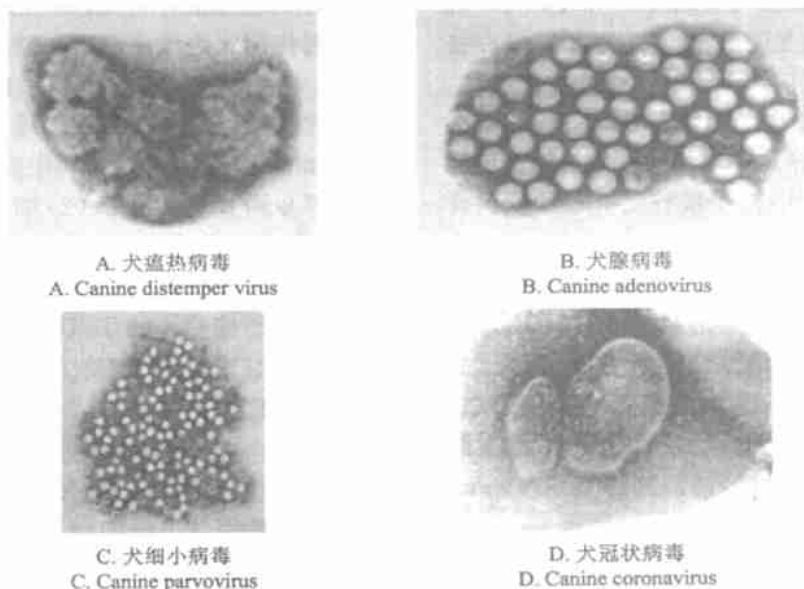


图 1 4 种犬病毒的电镜形态比较 ($\times 60\ 000$)

Fig. 1 Comparison of 4 kinds of viruses in shape by TEM ($\times 60\ 000$)

2.3.5 核酸型鉴定结果 加 FUDR 后 CPV 6 对 MDCK 的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-1.5}$, 较不加 FUDR 的 ($10^{-4.5}$) 低 3 个对数, 说明 CPV 6 的代谢可被 FUDR 所抑制, 故其核酸类型属于 DNA 型。

2.3.6 对乙醚、酸、热的抵抗力试验 CPV 6 细胞

培养物经乙醚、酸、热处理后, 对犬肾传代细胞的 $TCID_{50}$ 分别为 $10^{-4.0}$, $10^{-3.9}$ 和 $10^{-3.8}$, 与处理前 ($10^{-4.1}$) 的差数均小于 1 个对数, 说明该病毒耐酸、耐热、耐乙醚, 与 CPV 的特性一致。

2.3.7 动物感染试验结果 用细胞分离病毒感染

健康犬6d后,试验组2只幼犬先后发病。第7天试验组1只幼犬开始发病,临床表现为精神不振、食欲减退、呕吐、发热,次日发病幼犬精神高度沉郁,食欲废绝,剧烈呕吐、腹泻,排出暗红色、有强烈腥臭味的粪便,严重脱水,体温稍高,第9天死亡。剖检病死幼犬发现:肠道粘膜出血、脱落,心脏肿大、发炎,其他器官无特征性变化。另1只试验幼犬第8天发病,第11天死亡,临床表现及解剖所见同前只试验幼犬。2组对照幼犬临床上无任何异常。采集病犬粪样做HA试验为阳性反应,HA效价为 2^6 ;做HI试验,其凝集猪红细胞的作用被抑制,HI效价为 $2^5 \times 10$ 。

3 讨论

随着分子病毒学的发展,核酸探针和PCR技术已开始试用于CPV的分离鉴定和科研^[1,3,11]。与实验室分离鉴定CPV感染的常规方法相比,核酸探针和PCR鉴定技术更迅速、更敏感,但由于其技术要求高,仪器、试剂昂贵等因素,目前还难以在兽医临床及基层单位推广使用。免疫电泳在鉴定CPV上虽不失为敏感和可靠的方法^[12],但在日常应用中是不实际的^[8]。因此,血凝和血凝抑制试验便在犬细小病毒鉴定的临床应用上显示出独特的价值,因其主要优点是经济、简便、可靠,速度也较快,故适用于基层对CPV分离鉴定和流行病学调查。

正常犬粪便CPV HA阴性,含有犬瘟热病毒、犬腺病毒、犬轮状病毒或冠状病毒的粪样也无特异性CPV HA活性,但粪便中的其他微生物、细胞病变物质或非特异性凝集素会干扰血凝试验^[10,13,14]。因而需要同时进行血凝抑制试验才会排除假阳性结果。

测定CPV 6毒株对MDCK和CRFK敏感性的结果显示,应用CRFK进行的CPV分离试验不及应用MDCK进行的CPV分离试验敏感。这与前人的研究结果^[13],即对CPV老抗原型增殖来说,猫肾细胞比犬肾细胞更敏感不相符。其原因需作进一步的研究。

电镜下观察处理的粪样,在该病的初期常可见大小均一、呈散在状态的病毒粒子,而在该病的末

期,病毒粒子呈聚集状态。这可能与病毒粒子的感染力有关。

在动物感染试验中,本试验设计了2组对照,其中的1组是在口服CPV 6细胞培养物后注射CPV阳性血清。目的是了解犬体内CPV阳性血清对CPV 6的中和能力,并为今后临床制备高免血清用于本病的特异性治疗提供依据。

本研究发现,CPV凝集猪等红细胞的HA滴度受pH值影响,但在pH 6.4~7.2影响不大,pH 6.8时红细胞凝集最好。对CPV能凝集的几种动物红细胞来说,同种动物不同个体的红细胞也影响HA试验结果^[15]。实践证明,并非同种动物不同个体的红细胞均有CPV的血凝受体。红细胞能与CPV发生凝集反应的动物中,猪红细胞易发生自凝现象,根据有关资料^[1,3],对猪红细胞经醛化处理后能很好地解决这个问题。

4 结论

1)分离到的地方毒株能在特定的细胞上引起细胞致病作用,其细胞培养物能凝集猪、猴、马、猫的红细胞,且这种凝集作用能被特异血清所抑制。同时进行电镜观察,可看到粪样和细胞培养物中病毒颗粒形态。

2)动物感染试验表明,分离的犬细小病毒为强致病力毒株,通过口腔感染途径,成功地复制出了犬细小病毒感染的急性病例,与国内外报道的犬细小病毒的特性相一致,从而首次证明沈阳地区流行的以血样腹泻、呕吐、发热、脱水等为特征的犬病是由犬细小病毒感染引起的。

3)血凝和血凝抑制试验是诊断犬细小病毒病和犬细小病毒鉴定的一种经济、简便、快速、可靠的方法,本试验首次为该方法在军、警犬饲养的基层单位推广使用提供了可靠的资料。

4)感染了细小病毒的犬在出现临床症状前3~4d开始排毒,根据这一特点,可以用HA和HI试验对犬进行CPV病情监测和早期诊断,为及早预防和治疗CPV感染提供依据。

[参考文献]

- [1] 夏咸柱. 养犬大全[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1993: 561- 654
- [2] [美]里根W A. 家畜传染病[M]. 第7版. 北京: 农业出版社, 1988: 516- 518
- [3] 丁 壮. 犬细小病毒[J]. 国外兽医学——家畜传染病, 1995, 15(3): 3- 6

- [4] 吴健敏, 闵下沛. 犬抗细小病毒抗体的调查[J]. 中国养犬杂志, 1995, 6(4): 9- 10
- [5] 郑星道, 刘永同, 金相文. 犬细小病毒病的调查及防治[J]. 中国养犬杂志, 1998, 9(2): 13- 14
- [6] 叶俊华, 马长书, 徐玉生. 犬细小病毒病血清学调查[J]. 中国养犬杂志, 1997, 8(1): 7- 9
- [7] 范志强, 夏咸柱, 武银莲. 检测犬冠状病毒的中和抗体的方法与应用[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(6): 357- 360
- [8] Kusi I. A survey of canine parvovirus-2 in Albania[J]. J Aus Vet, 1997, 104(11): 478- 480
- [9] Meerarani S, Ramadass P. Polymerase chain reaction assay for early detection of canine parvovirus[J]. Vet J, 1996, 73(10): 1013- 1016
- [10] 蔡宝祥, 殷震. 动物传染病诊断学[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1993. 418- 422
- [11] 殷震. 核酸探针在病毒诊断中的应用[J]. 国外兽医学——畜禽传染病, 1986, 6(1): 5- 8
- [12] 张树成. 核酸探针在兽医传染病中的应用[J]. 国外兽医学——畜禽传染病, 1991, 11(2): 7- 9
- [13] 丁壮. PCR 与 V L H I 相比较检测粪便样本中的 CPV [J]. 中国养犬杂志, 1997, 8(3): 89
- [14] Raw M E. A fresh look at a 20-year-old disease [canine parvovirus][J]. Vet Times, 1997, 27(9): 31
- [15] Johnson B J, Castro A E. Isolation of canine parvovirus from a dog brain with severe necrotizing vasculitis and encephalomalacia[J]. J Am Vet Med Assoc, 1984, 184(11): 1398- 1399

Isolation and identification of canine parvovirus

KONG Qing-bo¹, ZHANG Yan-ming²

(1 The Police Dog Training School of the Ministry of Public Security, Shenyang, Liaoning 110034, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Eight feces specimens of dogs which have seemingly been infected by canine parvovirus (CPV) according to the clinical signs such as fever, vomiting, bloody diarrhea and dehydration etc were collected and proliferated by using MDCK. It was found that the No. 6 specimen (CPV 6) caused MDCK to have given some pathological changes of desquamation, metamorphism and dissociation etc. The infection ability of CPV 6 to MDCK was stronger than that of CPV 6 to CRFK by cellular infection test. The metabolism of CPV 6 can be inhibited by FUDR and it was a kind of DNA virus. It was also found that CPV 6 culturing medium can agglutinate the red blood cells of pigs, monkeys, horses and cats. The diluter of HA is in the range of 2^6 to 2^8 . And the red blood cells of bovines, canines, sheep, rabbits, mice and chicks cannot be agglutinated by the CPV 6 culturing medium. The appearance of CPV is rotundity or hexagon under transmission electron microscope (TEM) and its diameter is about 20- 23 nm. It can withstand acid, heat and ether. The pups in the test group embodied CPV infection on the 7th day after they have taken 1 mL of CPV 6 culturing medium in the test of onco-geneticity. The feces specimen of those sick pups was positive in the test of HA, and their agglutinating pig red blood cells can be inhibited in the test of HI.

Key words: canine parvovirus; isolation; identification