

陕西省猪伪狂犬病流行病学调查 和W G 株的分离鉴定^{*}

姜艳芬¹, 杨增岐¹, 祝卫国¹, 王旭荣¹, 田小艳¹, 王清爱²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 镇巴畜牧兽医站, 陕西 镇巴 723600)

[摘 要] 应用gE-ELISA法对陕西省部分地区6个集约化猪场的187份猪血清进行了伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)野毒感染检测,并对疑似伪狂犬病发病仔猪的内脏及脑组织进行了病毒分离鉴定。结果显示,陕西省猪PRV野毒抗体平均阳性率为28.76%,最高为48.98%,最低为0;分离毒株可致PK-15细胞出现典型的圆缩、集聚、脱落等细胞病变,连续传代后,CPE出现的时间稳定在20 h左右;细胞培养物和病料混悬液接种家兔均出现典型奇痒症状,PCR反应扩增出PRV gE基因中长度为612 bp的特异性片段。表明本试验分离的病毒为PRV,并将其命名为PRV W G株。

[关键词] 伪狂犬病病毒;分离和鉴定;流行病学

[中图分类号] S852.65+9.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)09-0031-05

伪狂犬病(Pseudorabies, PR)又名奥叶兹基氏病(Aujeszky, s Disease, AD),是由伪狂犬病病毒(Pesuderabies virus, PRV)引起的家畜和野生动物的一种危害严重的败血性传染病^[1]。伪狂犬病的临床症状为发热、奇痒、呼吸和神经系统障碍,但猪常无明显的瘙痒症状,成年猪多呈隐性经过,很少死亡,是PRV最主要的贮存宿主和传染源。母猪感染后,可发生流产、木乃伊胎、死胎等一系列繁殖障碍症状;新生仔猪感染后,除发热、精神萎顿、运动不协调和痉挛外,还可见呕吐、腹泻,病死率高达80%~100%。本病一年四季均可发生,但以冬春两季和产仔旺季多发,往往在分娩高峰时的母猪舍先发病,而且几乎每窝都发病,发病率可达100%,发病和死亡有1个高峰,以后逐渐减少。1960年以前,猪被感染后症状比较温和,病例也比较少见,其后由于强毒株的出现,猪场爆发PR的数量显著增加,症状明显加剧,现在已有40多个国家报道40多种动物感染该病^[2],在我国已有24个省市报道发生此病^[3]。该病是典型的自然疫源性疾,猪是其主要宿主和传染源,给养猪业造成的经济损失仅次于猪瘟^[4]。近年来,我国许多大型养猪场均有本病暴发,给养猪业发展造成了巨大的经济损失,陕西省已有本病发生^[5]。

为了进一步掌握PRV野毒在陕西省养猪场的感染比例,了解PRV野毒对养猪业的危害,为PR的防治提供依据,本研究应用gE-ELISA鉴别方法对陕西省部分地区规模化养猪场的猪伪狂犬病毒感染情况进行了血清学调查,对地方野毒株进行了分离鉴定,初步建立了区分免疫接种和野毒感染的PCR鉴别诊断方法,以为陕西省PRV的流行病学研究及PR的诊断和防治提供基础资料与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、毒株和病料 PK-15细胞由西北农林科技大学动物科技学院禽病研究室保存;PRV Bartha-k61(gE基因缺失疫苗株)株和PRV Min-A株,均购自中国兽药监察所;病料为采自陕西省户县、杨陵区、榆林市、兴平市、宝鸡市和合阳县等地区6个集约化猪场的187份猪血清样品和21份可疑伪狂犬病死猪的脑、心、肝、脾、肺、肾等,置-20℃冰箱内保存备用。

1.1.2 试剂和仪器 酶标检测仪,BAORAD公司产品;基因扩增仪,Eppendorf公司产品;猪伪狂犬野毒抗体gE-ELISA诊断试剂盒(批号:22/03/05),

* [收稿日期] 2006-03-06

[基金项目] 畜禽可控制疫病防治技术研究(2004K02-G3-01);陕西省科技研究发展(攻关)计划项目

[作者简介] 姜艳芬(1972-),女,陕西米脂人,助理研究员,硕士,主要从事预防兽医学研究。

[通讯作者] 杨增岐(1963-),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病教学和研究。

为美国 DEXX 公司产品, 包括已包被好抗原的 96 孔酶联反应板, 标准阴、阳性血清, 辣根过氧化物酶 (HRPO), TMB 底物溶液, 终止液, 稀释液, 洗涤液等; $2 \times \text{PCR TaqM ix}$ 和 100 bp DNA Ladder Marker 购自广州东盛生物科技有限公司; 蛋白酶 K 和十二烷基磺酸钠 (SDS) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 细胞培养基 DM EM 和小牛血清均为 GBCO 公司产品, 购自西安沃尔森生物技术有限公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 已公布的 PRV 病毒核酸序列 (登录号: BK001744), 设计 1 对引物, 上游引物 P1: 5'-AAT ATG CGG CCC TTT CTG CTG-3'; 下游引物 P2: 5'-AAT CAC AAA GAA CAC GGC CC-3'; 预期扩增片段长度为 612 bp, 位于 123 502~124 113 bp, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.4 实验动物 家兔购自西北农林科技大学实验动物中心, 共 6 只, 经伪狂犬 gE-ELISA 诊断试剂盒检验均为 gE 抗体阴性。

1.2 陕西省 PR 的流行病学调查

按照 gE-ELISA 诊断试剂盒的说明对采集的 187 份待检血清进行检测, 通过计算 S/N (样品 OD_{650} 值/阴性对照平均 OD_{650} 值) 来确定伪狂犬野毒抗体的有无。结果判定标准为: $S/N \leq 0.6$, 判为阳性; $S/N > 0.7$, 判为阴性; $0.6 < S/N \leq 0.7$, 判为可疑。

1.3 PRV WG 株的分离

1.3.1 病料处理 将采集的心、肝、脾、肺、肾、脑等组织混合在灭菌的乳钵内剪碎, 充分研磨, 用含 2 000 IU/mL 青霉素和 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 Hank's 液稀释成 5 倍混悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中感作 4 h 后, -70°C 反复冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 进行无菌检验, -70°C 保存作为接种材料。

1.3.2 病料接种与培养 取 2 瓶生长状态相同的已长成 80% 以上单层的 PK-15 细胞, 弃去培养基, 其中一瓶接种 2 mL 上述接种材料, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱吸附 1 h, 其间每隔 10~15 min 摇动一次, 使其与细胞充分作用, 然后弃去接种液, 加入含体积分数 2% 小牛血清和 100 IU/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DM EM 维持液 8 mL; 另外 1 瓶细胞同时加入 8 mL DM EM 维持液作为对照, 置于含体积分数 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱培养观察。待 80% 左右的细胞出现病变 (CPE) 时收毒。连续盲传 5 代后, 继续传代至 CPE 出现的时间稳定为止, 观察并记录结果。

1.4 病毒的鉴定

1.4.1 动物接种试验 取 6 只家兔, 其中 2 只腹侧皮下注射病毒细胞培养液 2 mL/只; 2 只腹侧皮下注射病料混悬液 2 mL/只; 另外 2 只注射 Hank's 液 2 mL/只作为对照, 分开饲养, 观察并记录结果。

1.4.2 PCR 鉴定 (1) 病毒 DNA 的提取 按常规方法^[6]并稍作改动, 分别取阳性病料、对照细胞、细胞培养物, PRV Bartha-K61 株和 PRV Min-A 株反复冻融 3 次后, 2 000 r/min 离心 30 min, 取上清液以 12 000 r/min 离心 20 min, 将沉淀重新悬浮于 400 μL TE 缓冲液中, 加蛋白酶 K 至终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 加 SDS 至终浓度为 10 g/L, 置 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 1 h, 然后以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入等量的 Tris-饱和酚抽提 1 次, 然后用等量的 $V(\text{酚})$

$V(\text{氯仿}) : V(\text{异戊醇}) = 25 : 24 : 1$ 的混合物再抽提 1 次, 最后用等量的 $V(\text{氯仿}) : V(\text{异戊醇}) = 24 : 1$ 的混合物抽提 1 次, 用等量的异丙醇沉淀 DNA, 并用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的体积分数 75% 乙醇洗 2 次, 干燥后各加 20 μL 的去离子水溶解, 作为模板进行 PCR 反应, 或 -20°C 保存备用。

(2) PCR 扩增 按文献^[7]的方法并稍作改动进行 PCR 反应。PCR 反应体系为: 10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 P1, P2 各 1 μL , DNA 模板 5 μL , $TaqM ix$ 12.5 μL , 去离子水 5.5 μL 。PCR 反应程序为: 96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保护, 结束反应。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

(3) PCR 产物克隆、鉴定及序列测定 PCR 扩增产物回收纯化后, 与 pMD18-T Vector 进行连接。取 5 μL 连接产物转化至制备好的基因工程菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12~16 h。随机从平板上挑取单菌落接种 4.5 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 10~12 h, 用碱裂解法抽提质粒。质粒经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切及 PCR 扩增后进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 筛选、鉴定出阳性重组质粒。将含阳性重组质粒的 DH5 α 工程菌菌液送上海英骏生物工程有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 陕西部分地区猪伪狂犬病流行病学调查结果

由表 1 可知, 陕西省部分地区 PRV 野毒感染阳性率为 0~48.98%, 平均为 28.76%, 其中兴平市阳

性率最高, 榆林市最低; 平均可疑率为1.15%。表明率有所差异, 但总的说来应引起足够的重视。PRV 野毒在陕西省猪场普遍存在, 虽然各猪场感染

表1 各猪场血清样品的gE-ELISA 检测结果

Table 1 gE-ELISA examination result of serum sample from different pig fam s

猪场 Pig fam	血清数 Number of detection	阳性数 Positive number	阳性率/% Positive rate	可疑数 Doubtful num ber	可疑率/% Doubtful rate
户县某猪场 A pig fam in huxian county	23	9	39.13	-	-
杨陵区某猪场 A pig fam in yangling city	34	7	20.59	-	-
榆林市某猪场 A pig fam in yulin city	35	0	0	-	-
兴平市某猪场 A pig fam in xingping city	49	24	48.98	-	-
宝鸡市某猪场 A pig fam in baoji city	13	2	15.38	-	-
合阳县某猪场 A pig fam in heyang county	33	16	48.48	2	6.89
总计 Total	187	58	-	2	-
平均值 Value of average	-	-	28.76	-	1.15

2.2 细胞CPE 观察

将病料上清接种PK-15 细胞, 连续盲传5 代, 在第1 代就可观察到CPE, 接种细胞后48 h, 感染细胞变性圆缩, 相邻感染细胞迅速聚集, 融合成“葡萄状”; 形成分散的轮廓不清晰的合胞体病灶。细胞裂解少见, 早期可见细胞膨大。有的细胞圆缩、集聚, 脱

落, 细胞层形成大小不等的空洞状病变, 有的呈拉网状(图1A、B)。对照细胞界限明显, 大小均一, 呈均匀致密的单层(图1C)。随着病毒传代次数的增加, CPE 出现时间缩短。经PK-15 连传10 代后, 则于接种后约18~ 24 h 即可见细胞病变, 80%的CPE 稳定在20 h。

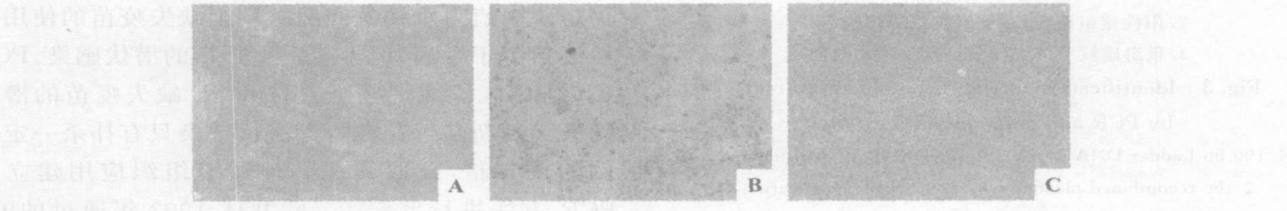


图1 PRV 在PK-15 细胞病变观察结果(100 ×)

A、B. 细胞圆缩、集聚、脱落, 细胞层形成大小不等的空洞状病变, 有的细胞呈拉网状, 出现典型的细胞病变;C. 对照PK-15 细胞

Fig. 1 Cell cytopathic effect (CPE) results of PK-15 by PRV (100 ×)

A、B. Infected PK-15 cell line shrunken, aggregated, and detached from the culture system by PRV and the typical pathology were observed;

C. The control PK-15 cell

2.3 动物试验

注射细胞培养物24 h 后, 试验兔开始表现兴奋不安, 食欲下降; 48 h 后不断低头用舌舔、啃啮或用爪抓接种部位, 明显出现瘙痒症状, 接种部位被毛脱落、皮肤潮红、出血; 72~ 96 h 后实验组全部死亡。注射病料混悬液的试验兔出现症状较晚, 大约36~ 48 h 后开始表现不安, 临床症状与注射细胞培养物组相同。对照组无任何症状。

2.4 PCR 扩增及重组质粒鉴定结果

2.4.1 PCR 扩增结果 由图2 可知, 细胞培养物、伪狂犬阳性病料与PRV M in-A 株均扩增出特异性片段, 长度为612 bp, 与预期扩增片段长度一致; 对照未接毒的细胞培养物和PRV Bartha-K61 株未扩增出任何片段。

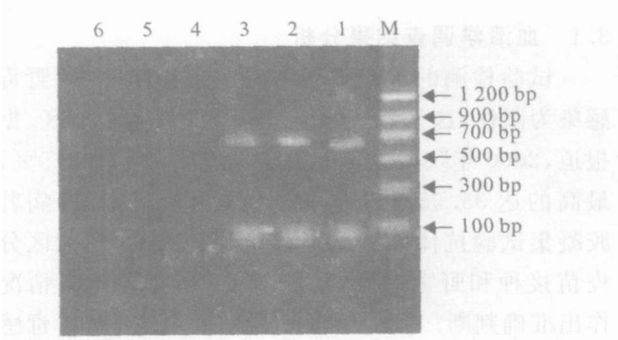


图2 分离病毒的PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

M. DNA marker; 1. 细胞培养产物; 2. 阳性病料; 3. M in-A 株;

4. 细胞对照; 5. Bartha-K61 疫苗株; 6. ddH₂O 对照

Fig. 2 A grose gel electrophoresis of PCR products of PRV

M. DNA marker; 1. Cell culture; 2. Positive material; 3. M in-A strain; 4. Cell control; 5. Bartha-K61 strain; 6. ddH₂O control

2.4.2 重组质粒鉴定结果 由图3可知,重组质粒经 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切释放出长度约为 612 bp 和 2.7 kb 的片段,同时PCR也扩增出612 bp 的目的片段,证明目的片段与pMD 18-T vector 正确重组。

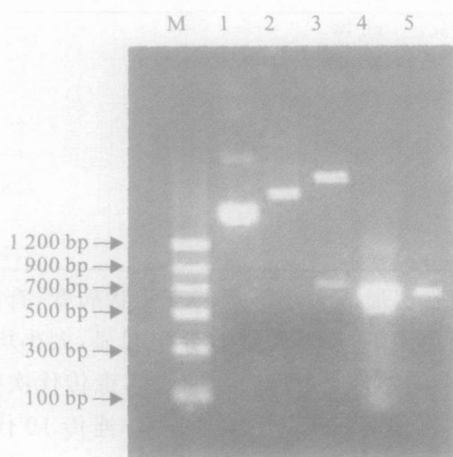


图3 重组质粒的酶切和PCR 鉴定结果

M. DNA 分子质量标准; 1. pMD 18-T 空载体质粒;
2. 阳性重组质粒; 3. 重组质粒酶切鉴定;
4. 重组质粒PCR 鉴定; 5. PCR 产物对照

Fig 3 Identification of the recombined plasmids by PCR and restriction digestion

M. 100 bp L ladder DNA Marker; 1. pMD 18-T Vector plasmids;
2. the recombined plasmids; 3. restriction identification of the recombined plasmids; 4. PCR of the recombined plasmids; 5. PCR products of PRV

以上病毒分离鉴定结果表明,本试验分离的病毒为PRV,将其命名为PRV WG 株。

3 讨论

3.1 血清学调查结果分析

试验检测的6个猪场中有5个猪场PRV 野毒感染为阳性,这5个猪场均位于陕西省关中地区。据报道,2000年陕西省PR 的血清阳性率为18.69%,最高的达35.55%^[5],但该结果是应用伪狂犬病乳胶凝集试验抗体检测试剂盒检测得来的,不能区分疫苗接种和野毒感染,不能对PRV 野毒感染情况作出准确判断。本试验结果显示,陕西省PR 野毒感染平均阳性率为28.76%,有50%的猪场野毒感染阳性率达到或超过40%。说明近年在陕西省PRV 野毒感染情况有明显上升的趋势,这可能与隐性感染猪和带毒猪造成PRV 在猪群内长期存在,引种失误又缺乏有效的隔离检疫制度,猪只的频繁流通等因素有关。结果表明,近年来随着集约化养猪业的发展,PR 已经成为严重危害陕西省养猪业的一种重要传染病,应

引起有关部门的高度重视。

3.2 病毒的分离鉴定

本试验对分离到的病毒进行了敏感动物接种实验、PK-15 细胞接种、PCR 扩增试验、酶切鉴定及基因序列测定。结果表明,该分离株为PRV 强毒株,并将其命名为PRV WG 株。PRV WG 株接种PK-15单层细胞后,一般可在18~24 h 出现细胞病变,细胞病变最明显的时期为接种后32~48 h。开始呈散在的灶状,随后逐渐扩展,直至全部细胞圆缩脱落,与以往文献报道^[8]相比可知,该毒株具有强的致细胞病变作用。本试验分离鉴定的PRV WG 毒株,为进一步对其进行分子生物学研究,了解其遗传变异情况,以及陕西省PRV 的诊断和防制提供了基础资料与科学依据。

3.3 PRV 野毒潜伏感染PCR 鉴别诊断初步探索

本试验分离的病毒来自刚出生2日龄的发病仔猪。该猪场母猪已经注射过伪狂犬基因缺失苗,但仔猪却发生伪狂犬病野毒感染,说明伪狂犬病的防制仍是一个值得重视的问题。基因缺失疫苗的使用虽然使猪免于发病,但不能阻止野毒的潜伏感染。PCR 扩增gE 区段能区别野毒株和gE 缺失疫苗的潜伏感染。判断是否存在野毒潜伏感染只有扑杀一定比例的成年猪,采取其三叉神经节组织应用建立的PCR 方法进行鉴定^[9]。欧共体1993年通过的93/24/EEC 贸易法规定,生猪贸易中,PRV 流行国家出口的繁殖猪必须是12个月内没有接种疫苗或只接种了gE-苗的gE-ELISA 检测阴性的猪;进口的猪必须接种gE 缺失苗,检疫方法只有gE-ELISA 法。因此,在我国应用gE-ELISA 和PCR 鉴别诊断方法,对猪群进行检测是十分必要的。

gE 基因PCR 检测方法的建立,为PRV 弱毒疫苗株与野毒株的鉴别诊断提供了方法与思路。根据目前我国大部分地区使用的PR 基因缺失疫苗多为缺失了gE 基因序列的现状,本试验参考GeneBank 公开发表的4株PRV gE 基因序列设计了1对引物,初步建立了能够快速区分PRV 野毒株与gE 基因缺失疫苗株的PCR 方法。该方法可以检测到野毒株,不能检测到缺失gE 基因的Bartha-K61疫苗株,支持了周斌等^[7]的观点。gE 可作为标志基因,用于区分野毒感染动物和疫苗接种动物,对剔除野毒感染动物而根除本病具有重要作用。国外已建立gE-ELISA 鉴别诊断方法^[10],但由于敏感性低,常常有感染野毒的猪“漏网”。PRV 感染猪后,猪各种组织如扁桃体、脑组织、三叉神经节、嗅球、肝、脾、肾、血

液等均含有病毒, 因此不论是来自流产死胎的病料, 还是发病或潜伏感染猪各器官的病料, 或活猪鼻拭子病料, 都可以作为被检样品。本试验应用建立的PCR方法仅对脑组织、肝、脾、肾、血液进行了单独检测, 结果脑组织检出率最高。试验中曾对已用gE-

ELISA试剂盒检测为阳性的血清进行PCR检测, 发现检出率很低, 证明在血清中抗体水平存在而抗原水平却很低。所以在PCR检测中, 不宜用血清样品, 否则可能造成漏检。

[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.
- [2] 白文彬, 等. 动物传染病诊断学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [3] 陈平洁. 广东省猪伪狂犬病流行病学调查和防控措施[D]. 江苏: 南京, 2005: 14-16.
- [4] 王勤. 猪伪狂犬病病毒基因研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(10): 42-44.
- [5] 高巨星, 贾文孝, 赵永华, 等. 陕西省猪伪狂犬病血清学调查[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(4): 17-18.
- [6] 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.
- [7] 周斌, 苏鑫铭, 张素芳, 等. PCR快速检测伪狂犬病病毒野毒感染[J]. 中国病毒学, 2004, 19(6): 612-615.
- [8] 马凤龙, 王文成. 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): 253-254.
- [9] Laszlo zsak, Federico zuckemann, Nancy Sugg, et al. Glycoprotein gI of Pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell to cell transmission[J]. J Virol, 1992, 6: 2316-2325.
- [10] David K, Sabrina L S, Lie-Ling W, et al. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection[J]. Vet Micro, 1997, 55: 99-106.

Isolation of pseudorabies virus ShaanxiWG strain and epidemiology investigation

JIANG Yan-fen¹, YANG Zeng-qi¹, ZHU Wei-guo¹,
WANG Xu-rong¹, TIAN Xiao-yan¹, WANG Qing-ai²

(1 College of Animal Science and Technology, Northw estern A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Zhenba Animal Husbandry and Veterinary Station, Zhenba, Shaanxi 723600, China)

Abstract: About 187 serum samples from 6 pig farms in some regions of Shaanxi province were detected with the gE-ELISA Kit which can distinguish the vaccination from wild-type virus infection, and porcine pseudorabies virus was isolated from the purtenance and brain of a 2-day-old pig and then the virus was identified microbiologically. The results showed that the average positive rate was 28.76%, the highest gE-antibody of wild-type PRV was 48.98% and the lowest was 0; It infected PK-15 cell line and caused it to shrink, aggregate, and detach from the culture system in 20 h approximately, and the inoculated rabbits showed classical clinical signs when challenged with the culture and positive material. Then the specific 612 bp bands by PCR of the isolated virus were obtained. These data indicate that the isolated virus was PRV and referred to as WG strain in this report.

Key words: pseudorabies virus; isolation and identification; epidemiology