

牛传染性鼻气管炎病毒 XA 株的分离与鉴定

李河林^{1,2}, 王晶钰¹, 刘红彦¹, 张三东¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 杨凌绿方生物工程有限公司, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】利用 MDBK 细胞进行牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV) XA 株的分离与鉴定。【方法】用 MDBK 细胞从陕西发病奶牛鼻拭子中分离 IBRV; 使用 IBR 标准阳性血清对该病毒分离物进行中和试验; 根据 GenBank 公布的 IBRV 基因组序列, 利用 gB 保守序列设计 1 对引物, 对分离病毒进行 PCR 扩增并测序。【结果】分离病毒在 MDBK 细胞上产生了明显的特征性细胞病变(CPE); 细胞圆缩, 聚集成葡萄串样群落, 在单层细胞上形成空洞, 偶见含有几个细胞核的巨大细胞; 用标准抗 IBRV 特异性抗血清能完全中和分离株; 用 IBRV gB 特异性引物进行 PCR, 可扩增出 1 182 bp 的特异性条带, 目的序列与已发表的 IBRV 基因组序列一致。【结论】该分离株为牛传染性鼻气管炎病毒, 将其命名为 IBRV XA 株。

[关键词] IBRV; 分离鉴定; 中和试验; PCR

[中图分类号] S852.65⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)06-0019-04

Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus

LI He-lin^{1,2}, WANG Jing-yu¹, LIU Hong-yan¹, ZHANG San-dong¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Yangling Lüfang Bio-engineering Co. LTD, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study was to isolate and identify infectious bovine rhinotracheitis(IBR) virus with Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells. 【Method】An infectious bovine rhinotracheitis(IBR) virus was isolated from a sick cow nasal swabs with (MDCK) cells, and the neutralizing antibody against the isolated virus was detected by the standard IBRV specific serum. A specific pair of primers were designed according to the gene sequence of IBRV gB gene published in GenBank. The gB gene of the IBRV strain was amplified by PCR method, and the sequences was analyzed. 【Result】Obvious characteristics of the cytopathic effect(CPE) generated in MDCK, such as grape-like clusters of rounded cells gathered around a hole in the monolayer; sometimes giant cells with several nuclei may be observed; The virus can be neutralized completely by the standard IBRV specific serum. Specific band can be amplicified by PCR with IBRV gB specific primers and the sequencing result showed that the sequence of the isolated virus coincided with the published IBRV gB sequences. 【Conclusion】The result indicated that the isolate virus was IBRV, and was named IBRV XA.

Key words: Infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV); isolation and identification; neutralization test; PCR

传染性牛鼻气管炎病(Infectious bovine rhino- tracheitis, IBR) 是由牛疱疹病毒 1 型(BHV1) 引起

* [收稿日期] 2009-12-04

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2008ZDKG-05)

[作者简介] 李河林(1978—), 男, 内蒙古巴彦淖尔盟人, 兽医师, 在读硕士, 主要从事兽用生物制品的研发、疫病监测与防治研究。
E-mail: lihelin1026@yahoo. com. cn

[通信作者] 王晶钰(1964—), 男, 陕西乾县人, 副教授, 主要从事动物疫病防治及兽医公共卫生研究。
E-mail: wjingyu2004@126. com

的牛急性接触性传染病,以高热、呼吸困难、鼻炎和上呼吸道炎症为发病特征。BHV1 具有典型的泛嗜性,能侵袭多种器官和组织,引起多种多样的临床症状^[1]。IBR 最早于 1955 年在美国科罗拉多州的育肥肉牛中被发现,随后相继在洛杉矶和加利福尼亚州等地发现该病,之后随着牛的输出而蔓延至全球各大洲,通过血清抗体检查可知,几乎所有国家的牛群都不同程度地检出了 IBR 抗体,目前除丹麦和瑞典已消灭 IBR 外,该病已遍布世界其余国家和地区。IBR 的主要危害在于延缓肥育牛的成长和体质量增加,使奶牛产乳量减少或流产,给养牛业造成巨大损失^[2]。因此,国际兽疫局(OIE)将该病列为 B 类疾病^[3],我国也将其作为进境动物的必检疾病之一。

20 世纪 80 年代初,我国周泰冲等^[4]在进口种牛中分离和鉴定了该病毒,随后经流行病学调查发现,北京、广东、广西、河南、河北、新疆、山东、四川、内蒙古、青海、贵州等地均存在牛传染性鼻气管炎病毒感染牛群,但感染率高低不同,同时亦有病毒的分离报道,但从陕西省牛群中分离 IBRV 尚未见报道。本研究从陕西某奶牛场发病奶牛鼻拭子中分离到 1 株传染性牛鼻气管炎病毒,现将详细情况报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料和细胞 从陕西省西安市某奶牛场用拭子采集发病奶牛鼻腔粘液,于灭菌生理盐水中冻存,低温运输至实验室备用;MDBK 细胞,购自中国兽医药品监察所。

1.1.2 毒种与血清 牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)标准毒株 Bartha Nu/67 株、标准阳性血清和标准阴性血清,均购自中国兽医药品监察所。

1.1.3 主要试剂 MEM,GBICO 公司产品;胰酶(进口分装),购自华美生物;新生牛血清,购自上海洛神;Taq 酶,大连 TaKaRa 公司产品;病毒基因组 DNA 提取试剂盒,购自 BioTeke 公司;高纯度质粒小量提取试剂盒,购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司;pMD18-T vector,TaKaRa 公司产品;DH5 α 由西北农林科技大学畜禽重大疫病防治和畜产品生物安全实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 病料的处理 将病料解冻,反复冻融 3 次后,3 000 r/min 离心 15 min,取上清,用孔径 0.22 μm 筛网除菌过滤,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.2.2 病毒的分离 取上述上清液 1 mL 接种于长满单层 MDBK 细胞的细胞瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1.5 h,倾去液体,加入含体积分数 2% 新生牛血清的 MEM 维持液(含青霉素 200 IU/mL、链霉素 200 IU/mL),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养,每天观察细胞病变(CPE),待 70%~80% 细胞出现 CPE 时收毒;如果细胞不出现 CPE,7 d 后盲传,分离物传至第 3 代,若仍未出现 CPE,则视样品为阴性,弃去。

1.2.3 分离毒株毒价的检测 将出现细胞病变的细胞反复冻融 2 次,然后用不含血清的 MEM 培养基进行 10 倍系列稀释至最低稀释度 10^{-10} ,每个稀释度的病毒接种 4 孔单层细胞,100 μL /孔,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 2 h。取出孔中液体,用 Hank's 液洗涤 3 次,加入含体积分数 2% 新生牛血清的 MEM 维持液,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,逐日观察记录 CPE。观察 3 d 判定结果。同时设阳性对照(IBR 标准毒株)和阴性对照(维持液),按 Reed-Muench 法计算半数组织培养感染剂量(TCID_{50})。

1.2.4 病毒中和试验 将 IBR 阳性血清用无血清的 MEM 培养基稀释 10 倍后,与等体积稀释 1 000 倍的分离毒株细胞毒振荡混匀并置 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1.5 h,然后取此混合反应液加入到长满单层 MDBK 细胞的 96 孔细胞板中,100 μL /孔,然后加含体积分数 2% 新生牛血清的 MEM 维持液 100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 3 d,同时设阳性对照(IBR 标准毒株)和阴性对照(维持液),每天观察细胞生长情况。3 d 后判定结果。

1.2.5 PCR 检测 应用 Primer 5.0 软件,根据 GenBank 公布的 IBRV 基因组序列(GenBank 登录号:NC001847),利用 gB 保守序列设计 1 对引物:

Upper: 5'-GTG ACT ACC GTG AGC TCG GCC-3';

Down: 5'-GTG CCC CCC CGA CGT CGG CCA-3'。

引物由北京三博远志生物技术有限公司合成,预期片段长度为 1 182 bp。

按病毒基因组 DNA 提取试剂盒说明,从分离毒株的细胞培养液和 IBRV Bartha Nu/67 株细胞培养物中提取病毒 DNA。PCR 反应体系为: Premix EX Taq 10 μL ,上、下游引物各 1 μL ,DNA 2 μL ,加水至 20 μL 。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,45 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,32 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 10 g/L 琼脂糖凝胶

电泳检测扩增结果。

1.2.6 目的基因的克隆与鉴定 回收 PCR 产物,用 T₄ DNA 连接酶与 T 载体于 4℃ 连接过夜,然后转化感受态菌 DH5 α 。挑取单个的转化菌落,加 LB 液培养后按质粒提取试剂盒说明抽提质粒 DNA,进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系和反应条件同 1.2.5 中。将转化产物送交南京金斯瑞生物科技公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 IBRV 的分离

IBRV 在 MDBK 细胞上传至第 2 代即出现明显的 CPE,主要表现为细胞圆缩,聚集成葡萄串样群落,在单层细胞上形成空洞,有时会发现含有几个细胞核的巨大细胞,20 h 细胞病变达 80% 左右,24 h 后大部分脱落。

2.2 IBRV 滴度的测定

经测定,含毒细胞培养液的 TCID₅₀ 为 10^{-8.6} / mL。

2.3 IBRV 的中和试验

以 1 000 倍稀释的分离毒株细胞毒,可被 10 倍稀释的标准 IBR 阳性血清所中和。

2.4 IBRV 的 PCR 鉴定

用设计的特异性引物,对分离培养物及 IBR 病毒标准株进行 PCR 扩增,发现分离培养物和 IBR 病毒标准株均能扩增出 1 182 bp 的片段,与目的基因片段长度一致,扩增结果清晰,无杂带(图 1)。

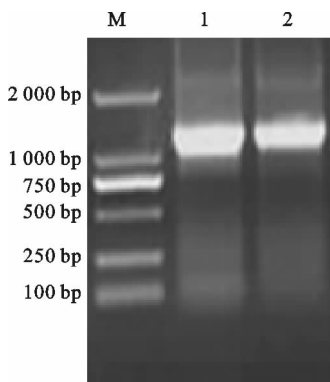


图 1 IBRV 的 PCR 鉴定

M. DL2000 Marker; 1. IBRV 分离株的 PCR 产物;

2. IBRV Bartha Nu/67 株的 PCR 产物

Fig. 1 Identification of IBRV by PCR

M. DL2000 marker; 1. Amplification of IBRV isolation strain;

2. Amplification of IBRV Bartha Nu/67 strain

2.5 目的基因的克隆与鉴定

PCR 产物与 T 载体连接后,转化感受态菌

DH5 α , 37℃ 培养 12~16 h,即形成单个菌落。挑取单个菌落培养后进行质粒提取。质粒 PCR 亦能扩增出与目的基因长度一致的特异性条带。

2.6 目的基因的测序

将所测的目的基因序列与 GenBank 中已发表的 IBRV 基因组序列进行同源性比对,结果同源性为 100%,将其命名为 IBRV XA 株。

3 讨论

本研究用 MDBK 细胞,成功地从发病奶牛鼻拭子中分离出 1 株 BHV,该病毒在 MDBK 细胞上可产生明显的特征性 CPE,之后连续传代数次,病变规律。用抗 IBRV 的特异性抗血清能中和分离株,并且用 IBRV gB 特异性引物进行 PCR,可扩增出特异性条带,且目的条带测序后亦与已发表的 IBRV 基因组序列一致,说明该分离株确为牛传染性鼻气管炎病毒。

此 IBRV 分离株是从有临床表现的病牛体上分离而来,病牛临床表现为体温升高,精神不振,鼻黏膜充血,散发灰黄色小豆粒大小的脓疱,流出大量黏液性脓性鼻液,经综合治疗后很快康复。但整个牛群中未见其他奶牛表现类似的临床症状,对于病牛发病的原因以及整个牛场牛传染性鼻气管炎感染的情况,还需进一步进行流行病学调查。同时,IBRV 分离株的致病力,特别是与标准 IBRV 的差异,包括基因序列及致病性的差异,也有待于进一步研究。

牛传染性鼻气管炎通常表现为潜伏感染,机体长期带毒排毒,疫苗免疫既不能阻止野毒感染,也不能阻止潜伏病毒的感染,而只能起到预防临床发病的效果。流行病学调查发现,我国大部分地区牛群均有 IBRV 感染。以往病毒分离大多来自各口岸进出口检疫以及牛精液^[5-9]中,而现在随着各地引种的传播,感染范围进一步扩大,程度进一步加重,笔者在陕西省分离到 IBRV 也说明了这一点。因此,内地的养殖场也必须将 IBRV 的监测纳入牛群的日常检疫中,如发现血清阳性牛,应立即淘汰或实行严格的隔离饲养措施。

目前,IBRV 检测方法中最成熟且应用最广泛的有病毒分离、病毒中和试验、ELISA^[10]、PCR^[11-15]等,尤其是基于分子生物学技术的 PCR 技术,更具快捷、准确的特点。本研究即是在病毒分离的基础上,采用 PCR 方法进行了病毒的鉴定,不仅缩短了鉴定时间,而且极大地提高了 IBRV 的鉴定效率和准确性。

[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, 1997:988-1029.
Yin Z, Liu J H. Animal virology [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997:988-1029. (in Chinese)

[2] 李继昌,于少军,刘忠贵. 牛传染性鼻气管炎病的研究进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2002(4):50-51.
Li J C, Yu S J, Liu Z G. Progress on bovine infectious rhinotracheitis [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2002(4):50-51. (in Chinese)

[3] 国际兽疫局. 哺乳动物、禽和蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册 [M]. 3 版. 北京:农业部畜牧兽医局, 1996:231-238.
Office International Des Epizooties. List A and B diseases of mammals, birds and bees manual of standards for diagnostic tests and vaccines [M]. 3rd ed. Beijing: Animal Husbandry and Veterinary Bureau of Agriculture Ministry, 1996:231-238. (in Chinese)

[4] 周泰冲,叶章明,黎少权,等. 从新西兰进口奶牛中分离传染性鼻气管炎病毒 [J]. 兽医科技杂志, 1981(1):6-9.
Zhou T C, Ye Z M, Li S Q, et al. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from New Zealand imported cows [J]. Journal of Veterinary Sci-Tech, 1981(1):6-9. (in Chinese)

[5] 唐泰山,王凯民,邓碧华,等. 1 株牛传染性鼻气管炎病毒的分离鉴定 [J]. 动物医学进展, 2006, 27(6):69-71.
Tang T S, Wang K M, Deng B H, et al. Isolation and identification of an infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(6):69-71. (in Chinese)

[6] 罗琼,李力施,陈茹,等. 从进口种用奶牛中分离出传染性牛鼻气管炎病毒 [J]. 中国兽医杂志, 2005, 41(9):45-46.
Luo Q, Li L S, Chen R, et al. Isolation of Infectious bovine rhinotracheitis virus from imported cows [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2005, 41(9):45-46. (in Chinese)

[7] 李琳琳,谢怀根. 从进口种用奶牛中分离传染性牛鼻气管炎病毒 [J]. 中国草食动物, 2008, 28(4):57-59.
Li L L, Xie H G. Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from imported cows [J]. China Herbivores, 2008, 28(4):57-59. (in Chinese)

[8] 王延涛,李国军,周玉龙,等. 牛传染性鼻气管炎病毒分离鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(5):30-31.
Wang Y T, Li G J, Zhou Y L, et al. Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2007, 43(5):30-31. (in Chinese)

[9] Weiblen R, Kreutz L C, Canabarro T F, et al. Isolation of bovine herpesvirus 1 from preputial swabs and semen of bulls with balanoposthitis [J]. J Vet Diagn Invest, 1992, 4:341-343.

[10] Payment P, Assaf R, Trudel M, et al. Enzyme-Linked immunosorbent assay for serology of infectious bovine rhinotracheitis virus infections [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1979, 11:633-636.

[11] Gee A L W, Wagter L H A, Hage J J. The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis [J]. Veterinary Microbiology, 1996, 53:163-168.

[12] Claus M P, Alfieri A F, Folgueras-Flatschart A V, et al. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2005, 128:183-188.

[13] 张桂红,童光志,王柳,等. 牛传染性支气管炎病毒 PCR 诊断方法的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000(4):1-2.
Zhang G H, Tong G Z, Wang L, et al. Study on a PCR method for diagnosis of bovine infectious rhinotracheitis virus [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2000(4):1-2. (in Chinese)

[14] Rocha M A, Barbosa E F, Guedes R M C, et al. Detection of BHV-1 in a naturally infected bovine fetus by a nested PCR assay [J]. Veterinary Research Communications, 1998, 23:133-141.

[15] Rocha M A, Barbosa E F, Guimaraes S E F, et al. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls [J]. Veterinary Microbiology, 1998, 63:1-11.