

猪伪狂犬病病毒粤 A 株的分离与鉴定

刘镇明, 蓝天, 罗满林, 袁少华, 石迎新

(华南农业大学动物医学系, 广东 广州 510642)

摘要: 从广东番禺某猪场病死仔猪中分离到一株疑为猪伪狂犬病病毒(PRV)毒株, 通过对其理化特性的鉴定、中和试验、实验动物回归试验、电镜观察、PCR 扩增及感染力测定, 发现其对氯仿、乙醚均敏感; 能中和 Pr 闽 A 株标准阳性血清; 实验兔接种该病毒后, 发生瘙痒并麻痹致死; 电镜观察可见病毒粒子呈不规则圆形并带有囊膜和纤突; PCR 体外扩增可见其与闽 A 株在同一水平位置上有相同的电泳带; 用 Marc₁₄₅ 细胞测定其毒价为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL。根据此分离病毒株的上述特性, 鉴定其为猪伪狂犬病病毒。

关键词: 猪伪狂犬病病毒; 中和试验; PCR 检测

中图分类号: S 851.347.101

文献标识码: A

猪伪狂犬病(PR)是由疱疹病毒科甲亚科伪狂犬病毒(PRV, 亦称猪疱疹病毒 I 型)引起的一种急性传染病^[1]。在成年猪通常表现为隐性感染, 主要引起妊娠母猪流产、死产和产木乃伊胎^[2]。新生仔猪感染可引起急性死亡, 发病率、死亡率均可达 100%。3 周龄以内的仔猪主要表现神经症状、腹泻、呕吐和呼吸道症状, 通常给养猪业造成巨大的经济损失^[3~5]。

广东番禺某猪场存栏母猪约 200 头, 1998 年 1~3 月间连续有 41 头妊娠母猪发生流产、死产。仔猪的发病率和死亡率达 80%, 而其成年猪均不表现任何临床症状。笔者从病死仔猪的脑、肺、肝、脾等组织病料中分离出一株疑似 PRV, 并对其进行系统地鉴定。现将其分离过程与鉴定结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

Marc₁₄₅ (非洲绿猴肾细胞)、BHK (仓鼠肾细胞)等由华南农业大学动物医学系传染病教研室保存, PRV 闽 A 株购自中国兽药监察所。

1.2 试验对照血清

阳性、阴性标准血清购自中国兽药监察所。

1.3 病毒的分离

无菌采集病死仔猪的脑、肺、肝、脾等组织制成 $1:10$ 悬浮液离心, 并经除菌处理后分别接种于长满单层的 BHK、Marc₁₄₅ 细胞, 连续观察, 待 80% 左右的细胞单层出现病变 (CPE) 时收毒, 连续传 3 代, 作种毒保存, 称作粤 A 分离株。

1.4 电镜观察

将粤 A 分离株细胞培养物经超速离心后取沉淀

物涂网, 以 20 g/L 磷钨酸负染, 进行电镜观察。

1.5 TCID₅₀ 滴定、理化特性检验

粤 A 分离株, TCID₅₀ 滴定方法及对氯仿、乙醚、热、酸的敏感试验方法均参照文 [1] 进行。

1.6 中和试验

采用固定病毒稀释血清法, 将粤 A 分离株稀释成 200 个 TCID₅₀ 的浓度, 然后分别与 2 倍稀释的伪狂犬病毒闽 A 株阳性血清的 5 个稀释度 ($1:2^2$ 、 $1:2^4$ 、 $1:2^6$ 、 $1:2^8$ 、 $1:2^{10}$) 混合, 置 37 °C 作用 1.5 h, 接种 96 孔细胞板, 每个稀释度 5 孔, 每孔 100 μ L, 连续观察 5 d, 并设有阳性血清处理的对照和正常细胞对照。记录结果, 同时计算中和指数。

1.7 实验动物接种试验

将粤 A 分离株第 3 代培养物作 $1:100$ 稀释, 按 1 mL/只皮下接种 1.5~2 kg 的健康家兔 2 只, 接种后每天测体温 2 次, 并作空白对照, 观察并纪录结果。

1.8 PCR 鉴定

分别将 PRV 闽 A 株和粤 A 分离株细胞培养物, 冻融 3 次, 用 12 000 r/min 离心 5 min, 沉淀物用 TEN 洗 1 次, 往沉淀中加入 1 mL 细胞消化液 (其中含 $1\times$ TEN, 0.1 mg/mL 蛋白酶 K, $\varphi=0.5\%$ SDS), 55 °C 水浴消化 2 h, 再放沸水中煮沸 10 min, 立即置冰浴中待用, 作为 PCR 的模板。

PCR 反应在 50 μ L 反应体系中进行, 依次加入以下成分: H₂O 29 μ L, 10 倍 PCR 缓冲液 5 μ L, 2 mmol/L dNTP 5 μ L, 正反方向引物各 2.5 μ L ($100\mu\text{mol/L}$), Taq 酶, 短暂离心后置 PCR 仪中进行反应。反应程序为: 94 °C 55 s, 58 °C 1.5 min, 72 °C 3 min, 2 个循环模板 1 mL, DMSO 5 μ L, 在沸水中煮沸 5 min, 加入 2.5 U

后,再 94 ℃ 50 s, 58 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min 进行 33 个循环, 末次循环时 72 ℃ 延伸 10 min, 转入 4 ℃ 存放. 用 $\varphi=1\%$ 琼脂糖凝胶电泳, 观察 PCR 扩增结果.

2 结果

2.1 细胞病变观察

病料接种 Marc₁₄₅ 细胞 36 h 后, 接种 BHK 细胞, 48 h 后, 细胞开始收缩、变圆, 细胞层形成空洞状病变, 至 72 h 可见成片脱落. 经 Marc₁₄₅ 细胞连传 3 代, 则于接种后 8~10 h, 即可出现细胞病变 (见图 1, 2).

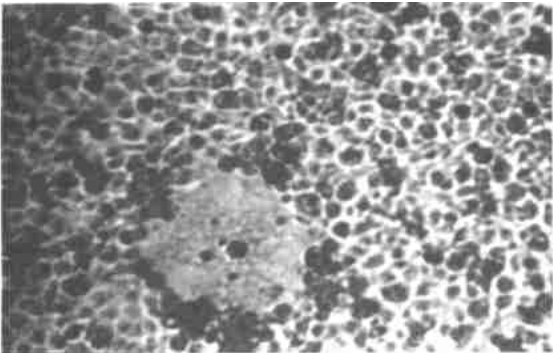


图 1 病变 Marc₁₄₅ 细胞

Fig. 1 Marc₁₄₅ cells infected with Yue A isolate

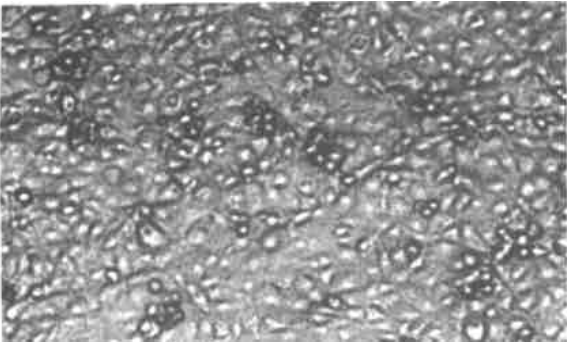


图 2 正常 Marc₁₄₅ 细胞

Fig. 2 Nomnal Marc₁₄₅ cells

2.2 电镜观察

可见直径约 100 nm 不规则圆形带囊膜的病毒子, 病毒子外层有突起的纤突 (见图 3).

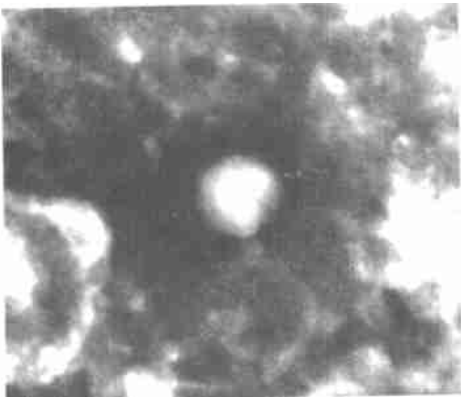


图 3 粤 A 株病毒电镜照片 (90 000×)

Fig. 3 Electronograph of Yue A isolate (90 000×)

2.3 TCID₅₀ 滴定结果 (见表 1)

根据 Reed-Muench 法计算^[1], 分离病毒粤 A 株的 TCID₅₀ 效价为 10^{7.5}/mL.

表 1 粤 A 分离株的 TCID₅₀ 滴定结果

Tab. 1 TCID₅₀ titration of Yue A isolation

病毒稀 释度 virus dilution	细胞观 察结果 results of CPE		累计细 胞管数 CPE wells in total		细胞管 CPE 阳性率 总数 CPE positive wells in rate / %	
	CPE ⁺	CPE ⁻	CPE ⁺	CPE ⁻	total CPE	
10 ⁻³	8	0	32	0	32	100
10 ⁻⁴	8	0	24	0	24	100
10 ⁻⁵	8	0	16	0	16	100
10 ⁻⁶	6	2	8	2	10	80
10 ⁻⁷	2	6	2	8	10	20
10 ⁻⁸	0	8	0	16	16	0

2.4 主要理化特性测定

粤 A 分离株分别经终浓度 $\varphi=4.8\%$ 氯仿和终浓度 $\varphi=20\%$ 的乙醚处理后失活; 经 56 ℃ 水浴 30 min 或经在 pH 3 的液体中作用 2 h 后, 病毒完全失活, 结果表明, 该病毒对氯仿、乙醚、酸、热敏感.

2.5 中和实验 (见表 2)

根据 Reed-Muench 法计算^[1], 粤 A 分离株的 200 TCID₅₀ 能被闽 A 株阳性血清 (1:100) 所中和. 结果表明, 粤 A 株与闽 A 株间有共同的抗原性.

表 2 粤 A 株与闽 A 株阳性血清中和试验

Tab. 2 The neutralization assay result of Yue A strain with positive serum against Min A strain

血清稀 释度(病 毒固定量) serum dilution (fix virus)	累计和 accumulation						
	CPE/ %CPE ⁺ CPE ⁻			保护率			
	CPE ⁺	CPE ⁻	CPE/ %	protection rate / %			
1:4	0/5	0	5	0	14	0/19	100
1:16	0/5	0	5	0	9	0/14	100
1:64	2/5	2	3	2	4	2/6	67
1:256	4/5	4	1	6	1	6/7	14
1:1 024	5/5	5	0	11	0	6/6	0

2.6 实验动物回归试验

将粤 A 分离株接种健康家兔, 60 h 左右, 实验兔开始不断低头舔咬接种部位, 明显出现瘙痒症状, 接种部位皮肤潮红、出血, 体温没有明显变化, 至 72 h 左右实验组全部死亡. 对照组无任何症状. 死亡兔体剖检结果: 肺呈肉色肝变, 肝淤血, 脑膜充血. 取部分肝、脾、脑处理后接种 Marc₁₄₅ 细胞, 可分离到同样理化特性的病毒.

2.7 PCR 鉴定

用 PRV 闽 A 株和粤 A 分离株病毒基因组 DNA 作模板,经体外扩增后电泳,在同一水平位置出现预定大小的一条带(1 100 bp)(见图 4)。

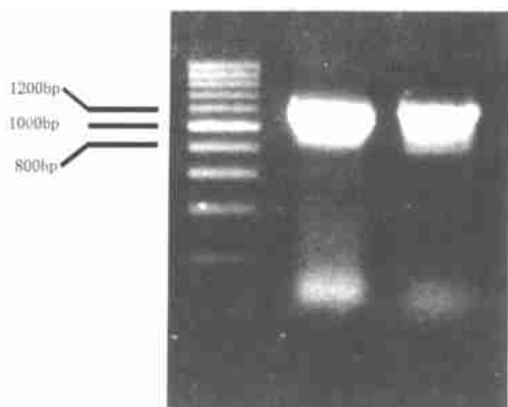


图 4 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig 4 Electrophoregram of PCR amplified fragments

3 结论与讨论

3.1 经实验室病原分离、鉴定证实:该猪场母猪流产及仔猪高死亡率是由猪伪狂犬病病毒引起的。1998 年春季以来,在广东珠江三角洲地区多个猪场爆发类似的疾病,使养猪生产蒙受巨大的经济损失。笔者已从其中的几个猪场分离到多株伪狂犬病病毒,这表明猪伪狂犬病对广东的养猪业仍然是一大隐患,尤其在冬春两季,发病率、死亡率均较高,因此加强早期预防是很有必要的。

3.2 该猪场在初步诊断为猪伪狂犬病后,立即对全场种猪及哺乳仔猪进行伪狂犬病弱疫苗紧急接种,1 个月后,哺乳仔猪死亡得到有效控制。母猪仍

有个别死产,至接种后 3 个月疫情得到全面控制。猪场生产成绩大大提高,这也表明,在发病猪场用弱疫苗控制该病是行之有效的。

3.3 由于感染伪狂犬病病毒的妊娠猪出现流产、死胎与木乃伊等症状,这与感染细小病毒、猪瘟病毒、PRRS 病毒等引起的症状相似,单靠临床症状往往难以鉴别。有条件的猪场可将病料处理后直接接种家兔,伪狂犬病病毒可使接种部位出现奇痒,而细小病毒、猪瘟病毒和 PRRS 病毒均不能致家兔接种部位奇痒,这也可作为它们之间的鉴别诊断。

3.4 实验室几种病原鉴定方法比较表明:PCR 检测猪伪狂犬病病毒较其它方法要快且特异性高,是较理想的检测方法之一。

3.5 在 PRV 的分离过程中,似乎 Marc145 细胞株比 BHK 细胞株对 PRV 更敏感。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科技出版社, 1997. 329~340; 998~1 002.
- [2] 许伟琦,朱璇,孙泉云. 猪伪狂犬病病毒的分离鉴定[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(3): 23~24.
- [3] 姜高明,韩文瑜,张玉静. 猪伪狂犬病病毒 JL 株分离与鉴定[J]. 中国动物检疫, 1998, 15(2): 14~16.
- [4] MULLER T, KLUPP B, ZEILMER R, et al. Characterisation of pseudorabies virus isolated from wild boar (*Sus scrofa*)[J]. Vet Rec, 1998, 143(12): 337~340.
- [5] SCHERBA G, WEIGEL R M, JIN L, et al. Sensitivity of the standardized pseudorabies virus neutralization test varies with the test strain used[J]. Vet Diagn Invest, 1991, 3(4): 306~312.

Isolation and Identification of Yue A Strain of Pseudorabies Virus

LIU Zhen-ming, LAN Tian, LUO Man-lin, YUAN Shao-hua, SHI Ying-xin

(Dept. of Animal Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: An isolate suspected to be pseudorabies virus was recovered from dead piglets on a pig farm in Panyu Guangdong. It was characterized by its physicochemical properties, virus neutralization test, animal inoculation, electron microscopy, PCR amplification and in vitro infectivity test. The isolate was found to be sensitive both to chloroform and ether, could be neutralized by the standard pseudorabies Fujian A strain virus antibodies, rabbits inoculated with the isolate developed localized itch and then paralysis before death, electron microscope revealed irregularly round virus particles with envelope and peplomers, PCR amplification of the virus genome yielded a fragment which co-migrated with similarly amplified fragment of the Fujian A standard PRV. When titrated in Marc145 cell culture, the virus titre attained $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL. The isolate was identified as a pseudorabies virus on the strength of the above findings.

Key words: Pseudorabies virus (PRV); neutralization test; PCR