

1 例猪伪狂犬病病毒的分离与鉴定

颜友荣 方向红 王琳琳

江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300

摘要 江苏某猪场发生一起伪狂犬病疑似病例, 为了解猪场是否存在伪狂犬病感染, 从该猪场采集疑似感染伪狂犬病的病料进行病毒提取分离、PCR 扩增、间接免疫荧光检测, 选择易感动物家兔, 给 3 只家兔后颈部皮下分别注射分离的病毒培养液对照用的伪狂犬-SD 株培养液及生理盐水各 2 mL, 在荧光显微镜下观察到注射分离的病毒培养液与对照用的伪狂犬-SD 株培养液有同样的结果, 注射生理盐水的家兔不表现临床症状。实验结果表明, 该疑似病例感染的是伪狂犬病病毒。

关键词 猪; 伪狂犬病毒; 分离; 鉴定

伪狂犬病是由伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 引起的一种重要传染病, 以发热、奇痒 (猪除外) 及脑脊髓炎为主要症状的一种重要传染病^[1]。近年来, 我国许多省份的养猪场都出现了伪狂犬病, 给我国养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。为了了解伪狂犬病的感染情况, 笔者从江苏省某猪场采集疑似病料, 并对其进行了病毒分离与鉴定, 从而判断是否为伪狂犬病, 以期为猪场控制伪狂犬病提供一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 病料与实验动物。从江苏某猪场采集疑似感染伪狂犬病的病料, 如脑、肺脏、脾脏、肝脏、淋巴结等, -20 °C 保存备用; 实验动物为家兔, 购自江苏农牧科技职业学院实验动物饲养中心; 3 只健康家兔。

2) 主要试剂。LA Taq DNA 聚合酶, dNTP mix, 2×GC Buffer I, DL 5000 DNA Marker 等, 购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 伪狂犬-SD 株由江苏农牧科技职业学院微生物实验室保存; 其他各种实验试剂均为分析纯试剂。

1.2 方法

1) 病料处理。将无菌采集的病料组织研磨, 用 0.01 mol/L、pH7.4 PBS 按照体积比制成 1:5 组织悬液, 加入适量青霉素、链霉素处理后, 反复冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 置于 -20 °C 冰箱中保存备用。

2) 病毒提取与 PCR 扩增。取经处理过的病料上清液与对照伪狂犬-SD 株, 按照 TaKaRa 试剂盒说明书操作方法进行病毒提取, 提取液 -20 °C 贮存备用。PCR 扩增以提取液作为模板进行扩增。上游引物 (P1): 5' -CCATGCGGCCCTTTCTGCTGC-3', 下游引物 (P2): 5' -CGGGGCGGGACATCAACAGGC-3', 扩增片段大小为 1 737 bp, 引物由上海英骏生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系 (50 μL): DNA 模板 5 μL, 5 U/μL LA Taq 酶 0.5 μL, 2×GC Buffer I 25 μL, 100 μmol/L dNTP 8 μL, PRV-P1 1 μL, PRV-P2 1 μL, 2 mmol/L MgCl₂ 6 μL, ddH₂O 3.5 μL。

PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 预变性 1 min, 64 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环, 最后 4 °C 保存。PCR 产物, 溴化乙锭染色, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳 25 min, 紫外灯光下观察扩增结果。

3) 间接免疫荧光法。为了方便验证实验结果,

此实验设阳性对照与阴性对照,病毒液接种细胞选用的是 BHK-21 细胞即乳仓鼠肾细胞,具体实验操作步骤如下^[3]。

预先制备好含有生长良好的单层 BHK-21 细胞腔式载玻片,分别加入疑似伪狂犬病毒液和伪狂犬-SD 株病毒液各 1 mL,标注记号,37 °C 温箱作用 1 h 后,吸掉病毒液,加入细胞维持液继续培养 24 h;弃掉维持液,用 PBS 洗 3 次,固定载玻片上的细胞培养物,用 PBS 洗涤 3 次,加入 500 μL 1:100 稀释的猪伪狂犬阳性血清,37 °C 孵育 1 h;用 PBS 洗涤 3 次后,加入 500 μL 1:2 000 稀释的山羊抗豚鼠-FITC,37 °C 孵育 30 min;最后用 PBS 洗涤 3 次,再用 0.2 μg/mL DAPI 染色液染色后,置于荧光显微镜下观察。同时设置细胞培养物作阴性对照。

4) 动物接种试验。本次试验选择易感动物家兔,接种试验前先取 3 只大小、体重相似的健康家兔饲养 2 d,观察家兔是否有异常。若无异常,给 3 只家兔后颈部皮下分别注射分离的病毒培养液、对照用的伪狂犬-SD 株培养液及生理盐水各 2 mL,观察家兔接种后的临床症状。实验结束后,对家兔饲养场地进行严格消毒,对发病死亡的家兔进行无害化处理。

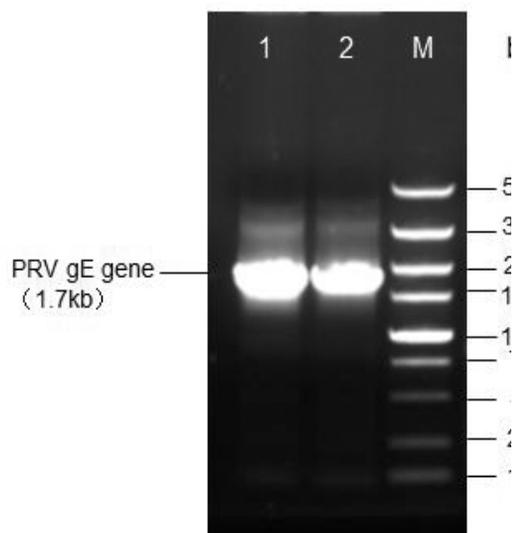
2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1 所示,疑似伪狂犬病毒分离株与对照伪狂犬-SD 株都有特异性片段,长度约为 1 700 bp,与实验预测结果相同。

2.2 间接免疫荧光检测结果

实验结束后在荧光显微镜下观察结果如图 2 所示。图 2 中 A 为疑似伪狂犬分离株,B 为伪狂犬-SD 株,二者均能观察到明亮的黄绿色荧光;C



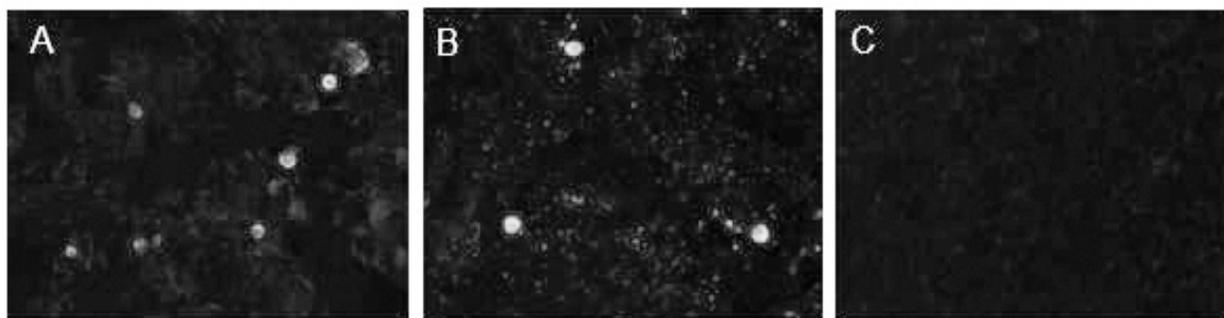
1. 疑似伪狂犬病毒分离株;2. 伪狂犬-SD 株;M. DL5000 分子质量标准

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

为细胞对照,没有观察到黄绿色荧光。A 为疑似伪狂犬分离株,能与伪狂犬病毒阳性血清结合,与山羊抗豚鼠-FITC 发生特异性结合,在荧光显微镜下能与阳性对照 B 观察到同样的结果。结果表明,分离到的疑似伪狂犬分离株就是猪伪狂犬病毒。

2.3 动物接种试验结果

接种分离的病毒培养液及对照用的伪狂犬-SD 株培养液,24 h 后家兔出现兴奋不安、食欲下降;40 h 后出现舌舔、嘴啃、抓挠等明显的瘙痒症状,随后家兔出现呼吸急促,体温升高,接种部位被毛脱落、出血、皮肤潮红,肌肉暴露;48 h 左右四肢出现麻痹、角弓反张、抽搐直至死亡,如图 3 所示。注射生理盐水的家兔不表现临床症状。试验结果说明分离毒株对家兔有明显的致病性,表现出类似的伪狂



A. 疑似病毒分离株;B. 伪狂犬-SD 株;C. 细胞对照

图 2 病毒分离株与阳性血清间接免疫荧光检测

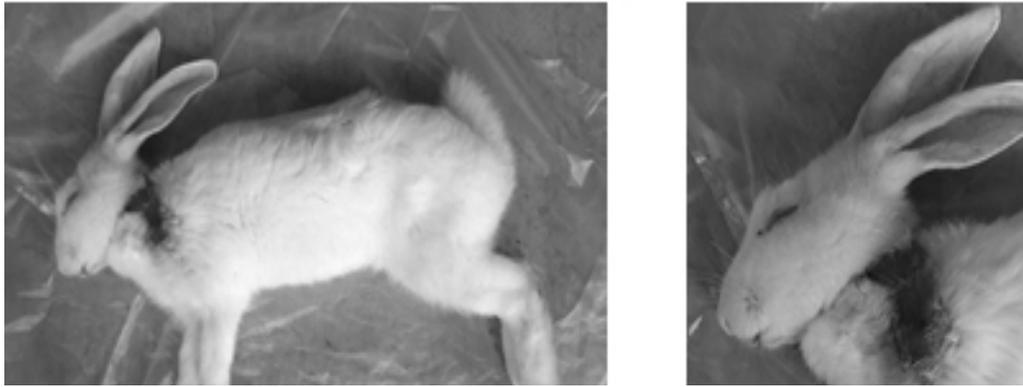


图 3 试验组家兔

犬病症状。

3 讨 论

1) 本研究通过从江苏某猪场一疑似病例分离出一株病毒,经 PCR 扩增试验、易感动物接种实验、间接免疫荧光鉴定及血清中和试验等证明分离株是伪狂犬毒株,说明该猪场母猪流产、仔猪死亡等很可能是猪伪狂犬病病毒感染造成的^[4]。

2) 伪狂犬病在我国大部分接种 Bartha-K61 疫苗免疫的猪场中散发或广泛流行,而且动物一旦感染,可终身带毒、难以根除,说明传统疫苗保护效率低,疫病难以防控,给养猪业造成严重的经济损失,已引起广大养殖户的高度重视^[5]。

犬病病原学调查与病毒分离鉴定[J]. 中国动物检疫, 2019,36(4):9-13.

- [2] 朱和超,梁婉,范桂芳,等.利用杆状病毒表达系统表达 PRV/gE 蛋白及间接免疫荧光抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医学报,2019,39(8):1428-1434.
- [3] 沈强,卫秀余,金爱华,等.伪狂犬病弱毒株的分离鉴定及生物学特性的研究[J]. 中国兽医杂志,2000,26(9): 5-8.
- [4] 王一鹏,王亚文,徐瑞涛,等.一株分离自免疫猪场的伪狂犬病病毒的鉴定与变异分析[J]. 畜牧兽医学报, 2019,50(10):2070-2078.
- [5] LIU Y, CHEN Q, RAO X, et al. An economic assessment of pseudorabies elimination on hog farms in China [J]. Preventive veterinary medicine, 2019, 163:24-30.

参 考 文 献

【责任编辑:胡 敏】

[1] 鞠厚斌,杨德全,葛菲菲,等.上海市定点监测猪群伪狂