

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.06.03

猪伪狂犬病病毒 HP – SY2022 株的分离鉴定

李 敏, 向 军, 孔雪英, 徐 静, 曾红梅, 龚文波, 邢 刚

(华派生物工程集团有限公司, 成都 641423)

[收稿日期] 2022-11-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 06-0017-06 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为了解猪伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 野毒株的特点, 对沈阳一养殖场疑似感染 PRV 的组织病料进行 PCR 鉴定、病毒分离和纯化、*gD* 和 *gE* 基因序列测定及分析、动物回归实验。结果显示: 分离株能在 ST 细胞中产生典型的细胞病变, 且 PCR 显示为 PRV 阳性; 通过 *gD*、*gE* 基因进行序列分析发现, 分离株与 2011 年后分离的 PRV 变异株位于同一进化分支; 氨基酸位点分析发现分离株与 PRV 变异株具有相同的变异模式。感染仔猪出现典型的伪狂犬病症状, 且在试验期内仔猪全部发病 (5/5), 其中 4 头死亡 (4/5)。本研究成功分离到一株 PRV 变异株, 命名为 HP – SY2022, 为丰富我国 PRV 分子流行病学及后续的免疫防控提供了参考。

[关键词] 伪狂犬病毒; 变异株; 分离鉴定; 遗传序列分析

Isolation and Identification of Porcine Pseudorabies Virus HP – SY2022 Strain

LI Min, XIANG Jun, KONG Xue – ying, XU Jing*, ZENG Hong – mei, GONG Wen – bo, XING Gang

(Huapai Biological Group Co., Ltd, Chengdu 641423, China)

Corresponding author: XU Jing, E – mail: 461732744@qq.com

Abstract: To understand the characteristics of wild strains of porcine pseudorabies virus (PRV), this study conducted PCR identification, virus isolation and purification, *gD* & *gE* gene sequencing and analysis, and animal regression experiment on tissue samples suspected of PRV infection from a breeding farm in Shenyang. The results showed that the isolated strain could produce typical cytopathic effect in ST cells, and the PCR showed that it was PRV positive; Through sequence analysis of *gD* and *gE* genes, it was found that the isolates were located in the same evolutionary branch as PRV mutants isolated after 2011; Amino acid site analysis showed that the isolates and PRV mutants had the same variation pattern. The infected piglets showed typical PR symptoms. During the test period, all piglets became ill (5/5), of which 4 died (4/5). In conclusion, a PRV mutant was successfully isolated and named HP – SY2022. This study provides a reference for enriching the molecular epidemiology of PRV and the subsequent immune prevention and control in China.

Key words: Pseudorabies virus; mutant strain; isolation and identification; genetic sequence analysis

作者简介: 李 敏, 硕士, 从事兽用病毒类生物制品相关研究工作。

通讯作者: 徐 静。E – mail: 461732744@qq.com

猪伪狂犬病是由伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 引起的一种急性传染病,猪是该病的主要宿主^[1-3]。感染 PRV 后可引起新生仔猪发生脑脊髓炎,死亡率高达 100%,其主要表现为神经症状和呼吸困难;还会导致母猪的繁殖障碍,表现为流产、死胎和木乃伊胎;感染 PRV 后的成年猪和育肥猪会长长期带毒或排毒^[4-5]。该病给世界生猪养殖业造成了严重损失。

2011 年以前,对于伪狂犬病的防治方法主要依赖于接种 Bartha - K61 灭活疫苗,但是从 2011 年开始,伪狂犬病新型变异株在我国开始出现,传统的 Bartha - K61 灭活疫苗已不能提供足够的保护力^[6]。为了解沈阳一猪场是否感染了 PRV 变异株,本试验对该猪场病料进行了病毒分离、PCR 鉴定及序列分析、动物回归试验,以期能掌握 PRV 毒株的流行情况及趋势。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、细胞与试验动物 ST 细胞由华派生物工程集团有限公司保存;DL - 2000、2 × GC - Rich PCR Master Mix、DNA 提取试剂盒均购自天根生物科技(北京)有限公司;DMEM 高糖培养基、低熔点琼脂糖、MEM 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco;新生牛血清购自内蒙古奥普赛生物科技有限公司;细胞培养板及 T25 培养瓶购自 Corning 公司;21 日龄仔猪购自四川成都某规模化养猪场。

1.2 病料的采集与处理 辽宁省沈阳市某养殖场部分猪只出现精神沉郁、呼吸困难、站立不稳等症状。采集发病猪只的肝脏、肾脏、肺、淋巴结及脑等组织样品,一部分加入适量 PBS 混合后研磨成浆置于 - 70 ℃ 保存,用于后续进行 PCR 鉴定及病毒分离。

1.3 引物设计及扩增 参照 GenBank 已公布的 TJ 株(登录号: KJ789182)的全基因设计 PRV *gD* 和 *gE* 基因的扩增引物,并送至英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物相关信息详见表 1。

表 1 PRV *gD* 和 *gE* 基因的扩增引物

Tab 1 Amplified primers of PRV *gD*, *gE* genes

引物名称	引物方向	片段大小/bp	退火温度/℃
gD F1	CGCTGGTGGCGGTCTTTGGC	1477	63
gD R1	GGACGCGGGGCCACGAC		
gE F1	CGTGTACGAGCCCTGCATCTACCA	1752	55
gE R1	CCCATTTCGTCACTTCCGGTTTCT		

1.4 病料组织的 PCR 鉴定 将研磨后病料组织冻融 3 次,使用天根 DNA 试剂盒按照说明书提取组织 DNA,以提取的 DNA 作为模板进行 PRV 的 PCR 鉴定。

1.5 病毒分离与纯化 将保存于 - 70 ℃ 的样品取出,冻融 3 次,8000 r/min 离心 5 min,取上清液,经 0.22 μm 过滤器过滤后,吸取 500 μL 接种至长满单层的 ST 细胞中,放于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每日观察细胞病变(CPE)。盲传 3 代后若无 CPE 则弃去培养物,当出现 CPE,当其病变达到 80% 左右时收毒,经 PCR 鉴定后保存至 - 70 ℃ 备用。

取分离株病毒液做连续 10 倍稀释,选择 10⁻³ ~ 10⁻⁶ 稀释倍数,分别接种至长满单层 ST 细胞的 6 孔板中,孵育 1 h 后弃去病毒液,将含有 4% 血清的 2 × DMEM 与低熔点琼脂糖按 1:1 的比例进行混合后加入细胞板中,待其凝固后放入 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每日观察细胞病变情况,待出现 CPE 后,用枪头挑取单一蚀斑,放入 1 mL 无血清 DMEM 中,冻融后用相同方法再次进行蚀斑纯化,将 3 轮纯化后鉴定为 PRV 阳性的病毒液扩大培养,分装保存至 - 70 ℃,记为 F1 代 PRV 毒种。

1.6 分离株病毒滴度测定 用 MEM 按 10⁻¹ ~ 10⁻⁸ 进行连续 10 倍稀释病毒液,按 100 μL/孔接种于 96 孔板内生长良好的单层 ST 细胞上,每个稀释度做 8 个重复,使用 MEM 溶液作为阴性对照,接种 4 d 后观察细胞病变结果,按照 Reed - Muench 法计算病毒滴度。

1.7 动物回归试验 选取 21 日龄 PRV gB 抗体阴性的健康仔猪 10 头,随机分为 2 组(攻毒组和对照组),每组 5 头。其中攻毒组通过滴鼻接种分离株病毒液 1 mL($10^{6.0}$ TCID₅₀/mL),对照组滴鼻接种 1 mL 的 MEM。同等条件下隔离饲养,每日定时测量仔猪体温,观察临床症状及死亡情况。

1.8 分离株 gD、gE 基因的序列测定及分析 将蚀斑纯化后的分离株病毒液提取核酸作为 PCR 反应模板,PCR 反应体系为:2 × GC - rich PCR Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL,ddH₂O 9.5 μL,样品 DNA 1 μL,PCR 总反应体积为 25 μL。PCR 反应程序为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 45 s,63/55 ℃ 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,进行 30 个循环,15 ℃ 保持 15 min。PCR 扩增产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,观察并保存结果。将鉴定为阳性的 PCR 产物送至生工生物进行测序。使用 MEGA6.0、BioEdit 软件对分离株序列进行处理并于 GenBank 中收录的国内外参考株(表 2)进行比较分析。

2 结 果

2.1 病料组织中 PRV 的 PCR 鉴定 以提取的病料组织 DNA 作为模板,使用 PRV - gE 引物进行扩增,鉴定结果显示有一条约 1752 bp 左右的特异性条带,将样品送至生工生物进行测序,将测得序列在线进行 BLAST 分析表明为 PRV 的部分基因。

2.2 病毒分离与纯化 经过无菌处理的组织上清接种单层 ST 细胞,培养 36 h 可出现典型病

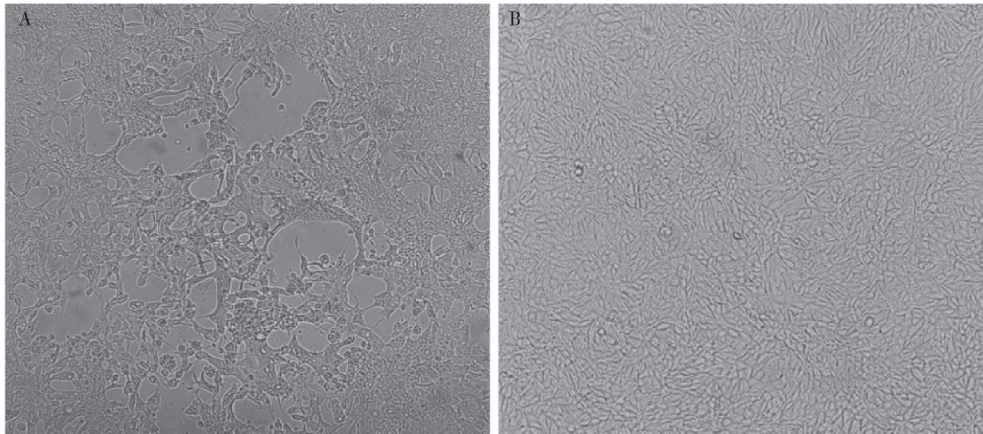
表 2 PRV 参考株序列

Tab 2 PRV reference sequences

毒株	登录号	分离地	分离年份	基因型
Ea	KU315430	中国	1990	经典株
Fa	KM189913	中国	2012	经典株
SC	KT809429	中国	1986	经典株
HNX	KM189912	中国	2012	变异株
HNB	KM189914	中国	2012	变异株
HN1201	KP722022	中国	2012	变异株
HeN1	KP098534	中国	2012	变异株
JS - 2012	KP257591	中国	2012	变异株
ZJ01	KM061380	中国	2012	变异株
TJ	KJ789182	中国	2012	变异株
HLJ8	KT824771	中国	2012	变异株
DL14/08	KU360259	中国	2014	变异株
BJ/YT	KC981239	中国	2012	变异株
BeckKer	JF797219	美国	1970	欧美株
Bartha	JF797217	匈牙利	NA	欧美株
Kaplan	JF797218	匈牙利	1971	欧美株
Kolchis	KT983811	希腊	2010	欧美株
NIA3	KU900059	英国	1959	欧美株

变,主要表现为细胞圆缩、折光性增强、出现空洞(图 1A)。待传至第 2 代时,细胞病变趋于稳定,且病变时间提前至 24 h。同期对照组细胞呈梭形,边缘整齐,形态清晰(图 1B)。

将第 3 代病毒液进行 10 倍系列稀释后进行蚀斑纯化,经 3 次纯化后获得 PRV 纯化毒株,将其命名为 HP - SY2022。



A: 接种组织上清的 ST 细胞(100 ×); B: 正常细胞对照(100 ×)

图 1 分离病毒细胞病变观察

Fig 1 CPE observation for virus isolation

2.3 分离株 PCR 鉴定 提取第 3 代病毒液进行 PCR 鉴定,电泳结果显示 *gD* 基因和 *gE* 基因的扩增片段分别在 1477 bp 和 1752 bp 左右有特异性目的条带(图 2A、图 2B)。将 PCR 阳性样品送至生工生物进行测序,测得序列与 PRV 参考株进行比对分析。

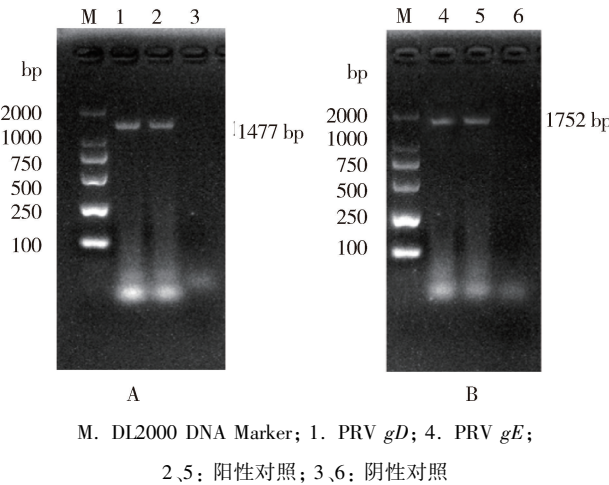


图 2 PRV 分离株 PCR 鉴定结果

Fig 2 PCR test result for identification of PRV isolate

2.4 分离株病毒滴度 将纯化后的病毒液进行 10 倍连续稀释,按 100 μ L/孔接种至已长满单层 ST 细胞的 96 孔板中,每个梯度做 8 个重复,放入细

胞培养箱中,4 d 后观察结果发现 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释度全部出现病变, 10^{-7} 稀释度有 5 孔病变。采用 Reed - Muench 法计算测得分离株的抗原含量为 $10^{8.2}$ TCID₅₀/mL。

2.5 动物试验结果 接种分离株 HP - SY2022 的 5 头仔猪在攻毒后第 1 天都有不同程度的体温升高,第 2 天开始出现食欲不振、精神沉郁、流涎和转圈的临床症状,第 3 天逐渐站立不稳,倒地后出现划水动作,试验期内攻毒组 5 头仔猪全部发病,其中 4 头仔猪死亡,对照组在试验期内没有出现体温升高及其他临床症状。

2.6 PRV *gD* 和 *gE* 基因序列分析 使用 MEGA6 软件对分离株 HP - SY2022 的 *gD*、*gE* 基因分别进行序列分析及绘制遗传进化树(图 3A、图 3B)。根据 PRV 毒株来源的不同,可将其分为 2 种基因型,即 Genotype I 型和 Genotype II 型,欧美毒株均属于 Genotype I 型,国内 PRV 毒株属于 Genotype II 型; Genotype II 型中又可分为经典株(Ea 株、Fa 株和 SC 株)和变异株。本试验分离株 HP - SY2022 的 *gD*、*gE* 基因位于 Genotype II 型,且与 2011 年后的分离株位于同一小分支,表明 HP - SY2022 与 2011 年后的分离株亲缘关系更近。

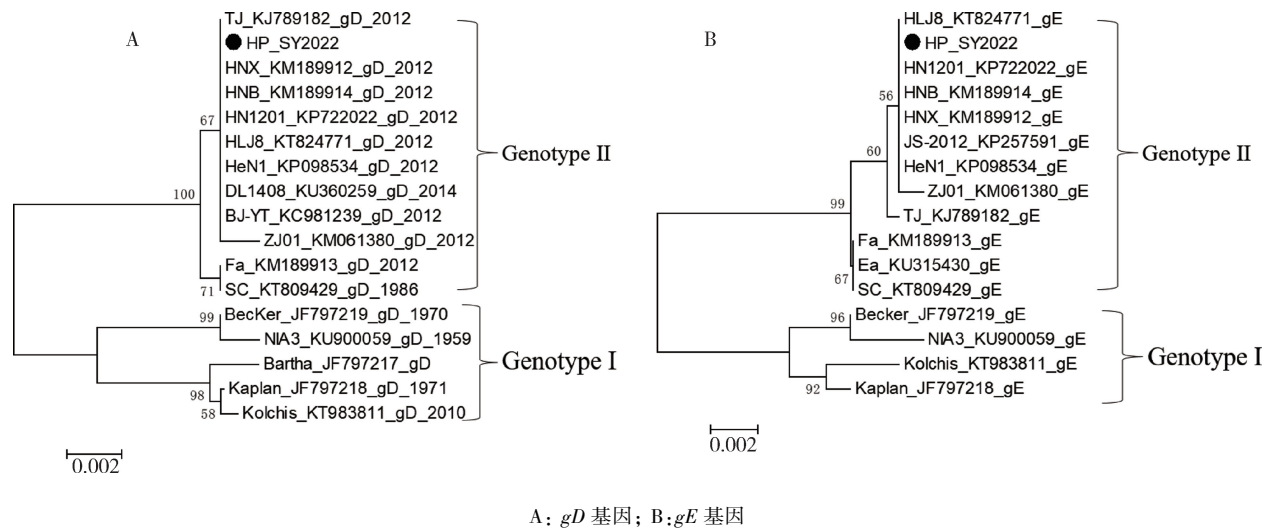


图 3 PRV *gD*、*gE* 基因遗传进化树

Fig 3 Phylogenetic tree of PRV *gD* and *gE* genes

3 讨论

PRV 在世界范围内广泛流行,给全球养猪业造成巨大经济损失。部分欧美国家通过免疫基因标记疫苗及区分疫苗毒和野毒的诊断方法,并结合生物安全措施,现已宣布在家猪中净化该病^[1-2]。我国也积极开展对伪狂犬病的净化工作,但由于我国地域辽阔、养殖情况复杂,该病在我国仍有暴发^[7]。近年来有研究报道,部分养殖场为节省成本而接种不同种类的 PRV 疫苗,导致了疫苗毒株间发生重组毒力返强,这可能是造成伪狂犬病爆发的原因之一^[8]。

PRV 的基因组大小约为 150 kb,属于双链 DNA 病毒,其中 *gD* 基因在不同 PRV 毒株中的核苷酸及氨基酸序列的同源性较高,表明其具有高度保守性^[9]。*gE* 基因是 PRV 主要的毒力基因之一,但 *gE* 基因又不是病毒复制所必须的基因,因此可通过敲除 *gE* 基因来降低 PRV 毒力来构建 PRV 基因缺失疫苗^[10-11],接种 *gE* 缺失苗的动物将不会产生针对 *gE* 基因的抗体,这可作为鉴定是否为 PRV 野毒感染的依据^[7]。本研究的组织样品来自于已免疫 Bartha-K61 灭活疫苗的养殖场,通过对分离株 HP-SY2022 *gD*、*gE* 基因的遗传进化树分析发现,本研究分离株 HP-SY2022 与 2011 年后分离的 PRV 变异株位于同一小分支。氨基酸序列分析发现,分离株 HP-SY2022 的 *gD* 基因在第 344 位和 348 位的氨基酸发生了替换,即 Q344P、P348T。*gE* 基因与国内变异株具有高度一致的突变,其氨基酸序列中的第 48 位和 496 位均有一个天冬氨酸的插入,这也与 2011 年后分离的 PRV 变异株突变位置相同^[12],符合 PRV 变异株的变异模式^[13]。试验证明了该养殖场的猪只感染了 PRV 变异株,表明传统疫苗已不能对 PRV 流行株提供完全的保护。

根据 Reed-Muench 法测得 HP-SY2022 的抗原含量为 $10^{8.2}$ TCID₅₀/mL。通过对仔猪进行攻毒试验发现 HP-SY2022 株可引起 21 日龄仔猪全部发病(5/5),4 头仔猪死亡(4/5),表明分离株 HP-SY2022 具有高致病性。随着近年来流行株毒力的增强,原有疫苗已不能为猪群提供足够的保护,为

减少 PRV 感染所带来的经济损失,应根据流行株的分子特征进行新型疫苗的研发,并且更加注重生物安全管理工作,避免外来输入。

本研究分离到的 HP-SY2022 株可为我国 PRV 分子流行病学、病原诊断及疫苗株筛选提供一定的参考。

参考文献:

- [1] Szpara M L, Tafuri Y R, Parsons L, *et al.* A wide extent of inter-strain diversity in virulent and vaccine strains of alphaherpesviruses[J]. PLoS Pathog, 2011, 7(10): e1002282.
- [2] Brittle E E, Reynolds A E, Enquist L W. Two modes of pseudorabies virus neuroinvasion and lethality in mice[J]. J Virol, 2004, 78(23): 12951-12963.
- [3] 傅宏庆,姚志兰,刘轶秋,等.猪伪狂犬病毒 YZ 株的分离鉴定及遗传进化分析[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2020,41(5):36-41.
Fu H Q, Yao Z L, Liu Y Q, *et al.* Isolation and genetic evolution analysis of pseudorabies virus YZ strain[J]. Journal of Yangzhou University(Agricultural and Life Science Edition), 2020, 41(5):36-41.
- [4] Sun M, Hou L, Tang Y D, *et al.* Pseudorabies virus infection inhibits autophagy in permissive cells *in vitro*[J]. Sci Rep, 2017, 7: 39964.
- [5] 黄二素,咸文,张爱琼,等.猪伪狂犬病病毒 GZYY2015 变异株的分离鉴定[J].中国畜牧兽医,2021,48(5):1832-1840.
Huang E S, Xian W, Zhang A Q, *et al.* Isolation and identification of porcine pseudorabies virus GZYY2015 Mutant strain[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(5):1832-1840.
- [6] Zhang C, Guo L, Jia X, *et al.* Construction of a triple gene-deleted Chinese pseudorabies virus variant and its efficacy study as a vaccine candidate on suckling piglets[J]. Vaccine, 2015, 33(21):2432-2437.
- [7] 李岩.猪伪狂犬病病毒流行株的分离鉴定及免疫原性分析[D].东北农业大学,2020.
Li Y. Isolation and identification of porcine pseudorabies virus epidemic strain and its immunogenicity analysis[D]. Northeast Agricultural University, 2020.
- [8] 孟帆,樊振华,吴忻,等.猪伪狂犬病病毒山西分离株 *gE* 全基因的遗传变异多样性及流行特点分析[J].中国兽医学报,2020,40(5):873-881.

- Meng F, Fan Z H, Wu X, *et al.* Epidemic characteristic and analysis of genetic variation diversity of pseudorabies virus isolated from Shanxi area [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(5): 873 – 881.
- [9] 张玲玲, 时建立, 彭 喆, 等. 猪伪狂犬病病毒山东分离株 gE 和 gD 基因的克隆及序列分析[J]. 中国兽医学报, 2017, 37 (11): 2048 – 2055.
- Zhang L L, Shi J L, Peng Z, *et al.* Cloning and sequence analysis of gE and gD gene of pseudorabies virus Shandong strain [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2017, 37 (11): 2048 – 2055.
- [10] 孙雅鑫, 韩剑锋, 荣先锋. 猪伪狂犬病病毒 JSSQ2013 株的分离鉴定及重要功能基因序列分析[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(4): 1 – 10.
- Sun Y X, Han J F, Rong X F, Isolation and identification of porcine pseudorabies virus strain JSSQ2013 and sequence analysis of important function genes [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(4): 1 – 10.
- [11] Wang X, Wu C X, Song X R, *et al.* Comparison of pseudorabies virus China reference strain with emerging variants reveals independent virus evolution within specific geographic regions [J]. Virology, 2017, 506: 92 – 98.
- [12] 赵鸿远, 彭金美, 安同庆, 等. 猪伪狂犬病病毒变异株的分离鉴定及其 gE 基因的分子特征[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(7): 506 – 509.
- Zhao H Y, Peng J M, An T Q, *et al.* Identification of glycoprotein E characteristic in pseudorabies virus variants from swine [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36(7): 506 – 509.
- [13] 韦冠东, 马 萍, 汤德元, 等. 猪伪狂犬病病毒主要基因变异及与 gE/gB 基因有关的净化方法研究[J]. 猪业科学, 2016, 33(1): 56 – 59.
- Wei G D, Ma P, Tang D Y, *et al.* Study on major gene variation of porcine pseudorabies virus and purification methods related to gE/gB gene [J]. Swine Industry Science, 2016, 33 (1): 56 – 59.

(编 辑:李文平)