

# 猪伪狂犬病病毒 ZY - 2014 株的分离与鉴定

潘文<sup>1,2</sup>, 马良<sup>1,2</sup>, 张贺楠<sup>1,2</sup>, 邵葳<sup>1,2</sup>, 李晓冉<sup>1,2</sup>, 黄书林<sup>1,2\*</sup>

(1. 中牧实业股份有限公司, 北京 100070; 2. 农业部兽用生物制品与化学药品重点实验室, 北京 100095)

[收稿日期] 2016-01-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 05-0001-06 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 从河南省某规模化猪场的死亡仔猪中分离到 1 株疑似猪伪狂犬病病毒, 命名为 ZY-2014 株, 并对其进行了 PCR 鉴定、gE 基因序列分析、动物感染试验等鉴定。病毒经 vero 细胞培养可产生典型细胞病变, 用 Reed-Muench 法测定病毒的滴度为  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L。分离病毒基因组 DNA 经过 gD、gE、gG、三对特异性检测引物扩增后, 均出现伪狂犬病病毒特异性目的条带, 分别为 217 bp、636 bp、1440 bp。测序结果与预期结果相符。将 ZY-2014 毒株 gE 基因测序结果与 10 个新分离毒株、14 个经典毒株进行同源性比对分析, 其核苷酸及推导的氨基酸序列与国内 2012 年以来新分离毒株的同源性分别为 99.6% ~ 100% 和 99.1% ~ 100%, 与 2012 年以前分离毒株核苷酸及推导的氨基酸序列的同源性分别为 97.7% ~ 99.6% 和 95.7% ~ 99.3%。遗传进化树结果显示, 所分离的 ZY-2014 毒株与 2012 年以来新分离毒株同属一支, 与经典毒株分属不同进化分支。动物攻毒试验中, 家兔和小鼠均出现明显的伪狂犬病临床症状。鉴定试验表明, 分离株 ZY-2014 是一株猪伪狂犬变异毒株。

**[关键词]** 猪伪狂犬病病毒; 分离; 鉴定

## Isolation and Identification of Variant Strain ZY - 2014 of Pseudorabies Virus

PAN Wen<sup>1,2</sup>, MA Liang<sup>1,2</sup>, ZHANG He-nan<sup>1,2</sup>, SHAO Wei<sup>1,2</sup>, LI Xiao-ran<sup>1,2</sup>, HUANG Shu-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. China Animal Husbandry Industry Co. Ltd, Beijing 100070, China;

2. Key Laboratory of Biological Products and Chemical Drugs for Animals, Ministry of Agriculture, Beijing 100095, China)

**Abstract:** A suspected pseudorabies virus variant, named ZY-2014, was isolated from dead piglets in a large-scale pig farms of Henan province and determined by PCR identification, gE gene sequence analysis and animal infection tests. The virus grown on vero cell culture can produced typical cytopathic effect. The virus titer was  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L confirmed by the Reed-Muench methods. Three specific pseudorabies virus target bands of 217 bp, 636 bp, 1440 bp were detected using gD, gE, gG specific PCR respectively. Sequencing results were consistent with the expected results. The homologies of gE nucleotide and amino acid sequence were analyzed with other reference strains, including 10 viral strain that had been isolated since 2012 and 14 classical strains. The gE gene of ZY-2014 strain shared 99.6% to 100% nucleotide homology and 99.1% to 100% amino acid homology with newly isolated PRV strains respectively, and shared 97.7% to 99.6% homologies in nucleotide sequence

作者简介: 潘文, 硕士, 中级兽医师, 从事动物疫苗研发工作。

通讯作者: 黄书林。E-mail: Hslcau@163.com

and 95.7% to 99.3% in amino acid sequence with classical PRV strain respectively. Based on the phylogenetic analysis, ZY-2014 strain was clustered to a relatively independent branch together with newly isolated strain in recent three year, and far from the classical strains. The typical pseudorabies clinical symptoms were presented in rabbits and mice inoculated with ZY-2014 strain. These results demonstrated that a new wild pseudorabies virus had been isolated.

**Key words:** pseudorabies virus; isolation; identification

伪狂犬病(Pseudorabies, PR)是由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的一种急性传染病,国际动物卫生组织(OIE)将其列为B类传染病<sup>[1]</sup>。猪是伪狂犬病的最主要宿主,猪感染PRV后的临床症状随着年龄不同差异很大。新生仔猪及15日龄以内的仔猪表现明显的神经症状,死亡率达100%。育肥猪常呈隐形感染,成年猪感染后多耐过,但长期排毒,表现为流产、死胎、木乃伊胎等<sup>[2]</sup>。在规模化猪场,一般采用PRV基因缺失疫苗对猪伪狂犬病进行免疫预防<sup>[3]</sup>。虽然偶尔有病毒分离的报道,但总体而言该病得到了有效的控制<sup>[4]</sup>。2011年猪伪狂犬病疫情率先在华北暴发以来,许多使用基因缺失活疫苗免疫的规模化猪场出现了疑似伪狂犬病流行<sup>[5]</sup>,各科研单位从不同地区发病死亡的仔猪组织中分离到多株伪狂犬病毒变异株<sup>[6-8]</sup>。2014年河南省某规模化猪场在已免疫过PRV gE基因缺失疫苗(Bartha-K61株)的情况下,仔猪出现疑似PR典型症状并死亡,本实验室从死亡仔猪的脑组织、肺脏、肾脏中分离到1株疑似猪伪狂犬病毒,命名为ZY-2014株,并对其进行了鉴定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 DMEM培养基、胎牛清血、2×MEM培养基为Gibco公司产品。病毒基因组DNA提取试剂盒为QIAGEN公司产品。质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒为琼脂糖为Omega公司产品。DH5α感受态细胞为天根生化科技(北京)有限公司产品;T载体、DNA marker DL2000、TaKaRa LA Taq® with GC buffer为宝生物工程(大连)有限公司产品;细胞培养板Corning为康宁公司产品;低熔点琼脂为PROMEGA公司产品;中性红为sigma

公司产品。

1.1.2 病料及血清 病料来自于2头出现猪伪狂犬典型症状死亡仔猪的脑组织、肺脏、肾脏。

1.1.3 实验动物 SPF级BALB/C小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司;普通级大耳白兔购自北京芳元缘养殖场。

### 1.2 方 法

1.2.1 病料处理 取病料进行研磨,用DMEM培养液制成1:5乳剂,反复冻融三次,3000 r/min离心30 min后,取上清液经0.22 μm滤膜过滤,加入青霉素溶液至最终浓度为300 IU/mL、链霉素为100 μg/mL。

#### 1.2.2 病毒分离及鉴定

1.2.2.1 细胞接种试验 接种0.5 mL病毒滤液于长成单层的Vero细胞,连续观察细胞生长状态,接种后36~72 h,细胞应出现典型的细胞病变(CPE),表现为细胞变圆,拉网、脱落。如第一次接种不出现细胞病变,应将细胞培养物冻融后盲传三代。

1.2.2.2 PRV蚀斑克隆纯化用DMEM 将PRV病毒液做10倍系列稀释,将 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 稀释病毒液接种于长满Vero细胞单层的6孔板中,每孔接0.5 mL,同时设一未添加该病毒的阴性对照孔。37℃吸附1.5 h后吸去病毒液,等比例加入57℃预温的2%琼脂糖和37℃预温的2×MEM养液2.0 mL,在37℃的5%CO<sub>2</sub>培养箱中倒置培养。48 h后添加1.0 mL含有0.01%中性红染液的营养琼脂,第二层琼脂加入后观察蚀斑的大小、形态和出现时间。将挑取的蚀斑放入500 μL DMEM的离心管中,经冻融后以3000 r/min离心10 min,取上清按上述方法重复克隆2次后,进行扩大培养,测定克隆毒株的病毒含量。

1.2.2.3 病毒滴度的测定 将纯化收集的病毒原液用细胞维持液进行连续 10 倍倍比稀释 ( $10^{-3} \sim 10^{-9}$ ) 后,按 100  $\mu\text{L}$ /孔接种长满单层 vero 细胞的 96 孔板,每个稀释度做 8 孔,加入等量的维持液作为阴性对照,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  的 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,接种 12 h 后开始观察记录 CPE,观察 96 h 后统计 CPE 结果,用 Reed - Muench 法计算病毒的  $\text{TCID}_{50}$ 。

### 1.2.3 病毒的 PCR 检测及 gE 基因序列分析

1.2.3.1 引物设计 参考“国标 GB/T 18641 - 2002 伪狂犬病诊断技术”扩增伪狂犬病毒 gD 基因中 434 ~ 651 bp 之间 217 bp 基因片段,序列为:上游引物 P1:5' - CAGGAGGACGAGCTGGGGCT - 3', 下游引物 P2:5' - GTCCACGCCCCGCTTGAAGCT - 3'。设计合成针对猪伪狂犬病病毒 gE 基因特异性引物,上游引物 P3:5' - ATGAATTCGAGGCCGACGAC - GATGACC - 3', 下游引物 P4:5' - TAAAGCTTCGTGCGGTAAAGTTCTCA - 3', 目的片段大小为 636 bp。设计合成针对猪伪狂犬病病毒 gG 基因特异性引物上游引物 P5:5' - ATGAATTCAGAGAGGCCCTC - GGGG - 3', 下游引物 P6:5' - TAAAGCTTTCAGGCG - GAGGCCACGT - 3', 目的片段大小为 1440 bp。同时设计扩增 PRV gE 全基因的特异性引物。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.3.2 目的基因的扩增与克隆 取 200  $\mu\text{L}$  病毒液,按照病毒基因组提取试剂盒说明书提取 PRV 基因组。用所设计的特异性引物进行 PCR 扩增,扩增体系为 50  $\mu\text{L}$ ,其中 2  $\times$  GC buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10 pmol/mL) 各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 4  $\mu\text{L}$ , LA Taq 酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 补充无菌去离子水至终体积 50  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min 预变性;95  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 35 个循环后;72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。取 PCR 产物 10  $\mu\text{L}$ , 置于浓度为 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳。

1.2.3.3 gE 基因序列分析 将扩增的 PRV gE 全长 PCR 产物与 pMD18 - T 载体连接,阳性重组质粒送由宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定。利用基因分析软件 DNA Star 中的 MegAlign 对

ZY - 2014 毒株 gE 测序结果与 GenBank 中登陆的 10 个新分离毒株、14 个经典毒株进行同源性比对分析,并使用 Mega 4.0 软件构建遗传进化树。

### 1.2.4 动物感染试验

1.2.4.1 病毒感染小鼠试验 取 10 只 BALB/C 小鼠,分为三组。第 1 组和第 2 组各 4 只小鼠,分别在其背部皮下多点接种 100  $\mu\text{L}$   $10^{6.0}$   $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $10^{5.0}$   $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$  两个不同浓度的病毒稀释液,第三组接种细胞培养液作为对照,隔离观察。

1.2.4.2 病毒感染家兔试验 取 4 只健康且体况相似的成年雄兔,分为 2 组,分别在其后肢大腿肌肉接种 0.4 mL  $10^{8.0}$   $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $10^{6.0}$   $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$  两个不同浓度病毒稀释液,每个浓度各两只。观察其发病情况。

## 2 结果

2.1 病毒的分离鉴定 病料组织接种 vero 细胞后,24 h 出现明显的 CPE,可见细胞圆缩,出现空泡,随后细胞聚集成合胞体,48 h 后细胞开始溶解,出现大面积脱落(图 1)。

2.2 PRV 蚀斑克隆纯化 将分离到的 ZY - 2014 毒株进行蚀斑纯化,蚀斑形态较为均一,大小为  $(0.5 \pm 0.01)$  mm,蚀斑形态见图 2,蚀斑中心为不着色的死亡细胞,周围正常细胞被中性红染成红色。病毒经过两次蚀斑纯化,病毒滴度为  $10^{7.4}$   $\text{TCID}_{50}/100 \mu\text{L}$ 。

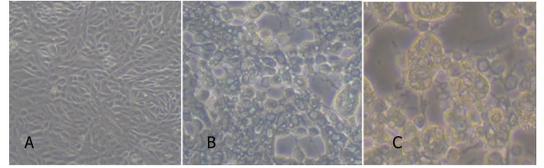
2.3 病毒的 PCR 检测 将分离到的 ZY - 2014 毒株基因组 DNA 经过 gD、gE、gG 三对特异性检测引物扩增后,均出现 gD、gE、gG 部分基因的特异性目的条带,条带大小(图 3)与测序结果均与预期结果相符。

2.4 gE 基因序列分析 重组质粒测序结果表明 ZY - 2014 毒株 gE 基因完整的阅读框全长 1740 bp,编码 579 个氨基酸。ZY - 2014 毒株 gE 基因核苷酸及推导的氨基酸序列与国内 2012 年以来新分离毒株的同源性分别为 99.6% ~ 100% 和 99.1% ~ 100%。与 2012 年以前分离毒株核苷酸及推导的氨基酸序列的同源性分别为 97.7% ~ 99.6% 和 95.7% ~ 99.3%。其中 ZY - 2014 毒株 gE 基因核苷酸的同源性 with JS - 2012 株、HNXX - 2012 株、

ZM-2012株为100%,与GDSH-1999株、Ea-1998株的核苷酸同源性分别为99.6%和99.5%,与韩国Yangsang-2003株、马来西亚P-PrV-2008的同源性分别为99.5%和99.4%,而与美国Becker株、匈牙利Kaplan株、爱尔兰Nia-1株、西班牙NiA-3株的同源性较低为97.7%~97.9%。

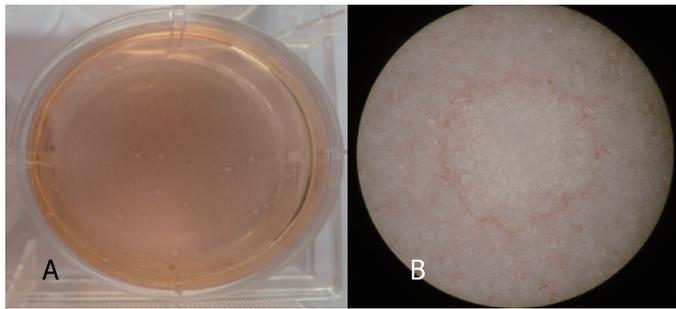
通过对gE基因构建遗传进化树(图4),结果表明遗传进化树出现两个较大的分支,分别为亚洲毒株和欧美毒株。其中所分离的ZY-2014毒株与2012年以来新分离毒株同属一个大分支,与2012

年前经典毒株EA株、GDSH株、FA株、MinA株、LA株等分属不同进化分支,亲缘关系较近,与经典毒株Becker株、Kaplan株、Nia-1株、NiA-3的亲缘关系较远。



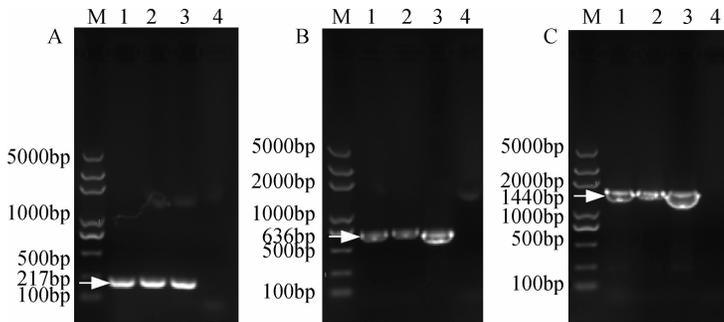
A. 正常的 vero 细胞; B. 感染病毒后 24 h 的 vero 细胞; C. 感染病毒后 48 h 的 vero 细胞

图1 PRV ZY-2014 毒株在 vero 细胞病变情况



A. PRV 在 vero 细胞上形成蚀斑; B. 单个 PRV 蚀斑在显微镜下的形态

图2 PRV ZY-2014 毒株在 vero 细胞上的蚀斑形态



A: 猪伪狂犬病毒 gD 片段(217bp); 1~2: 病毒 F1、F2 代 vero 细胞培养物提取的基因组; 3: 猪伪狂犬病毒 HB98 株提取的基因组; 4: 阴性对照  
 B: 猪伪狂犬病毒 gE 片段(636bp); 1~2: 病毒 F1、F2 代 vero 细胞培养物提取的基因组; 3: 阳性对照质粒 pET32a-E; 4: 阴性对照  
 C: 猪伪狂犬病毒 gG 片段(1440bp); 1~2: 病毒 F1、F2 代 vero 细胞培养物提取的基因组; 3: 阳性对照质粒 pET32a-G; 4: 阴性对照

图3 PRV ZY-2014 毒株 PCR 鉴定结果

2.5 小鼠感染试验结果 BALB/C 小鼠攻毒 48 h 后,陆续出现伪狂犬典型的症状,全身奇痒,不断啃咬接种部位导致皮肤出血,攻毒小鼠 96 h 后陆续

出现死亡,5 d 后第 1 组小鼠全部死亡,第 2 组存活 1 只小鼠。对照组小鼠无异常表现,见图 5。

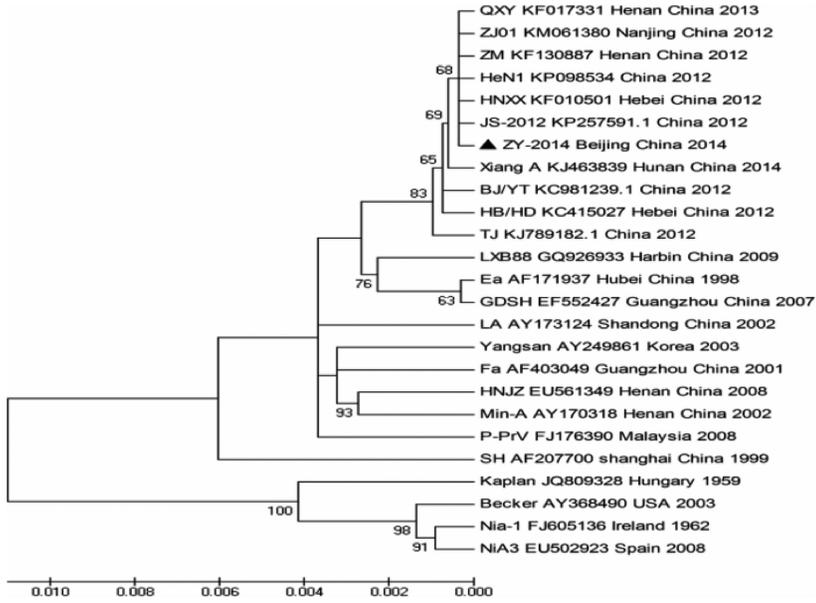
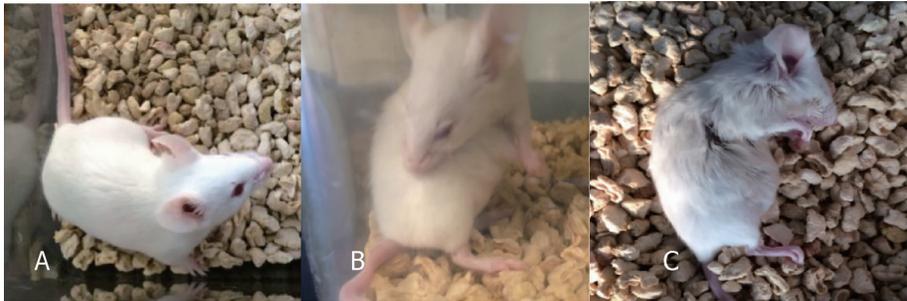


图4 不同 PRV 毒株 gE 基因的遗传进化树

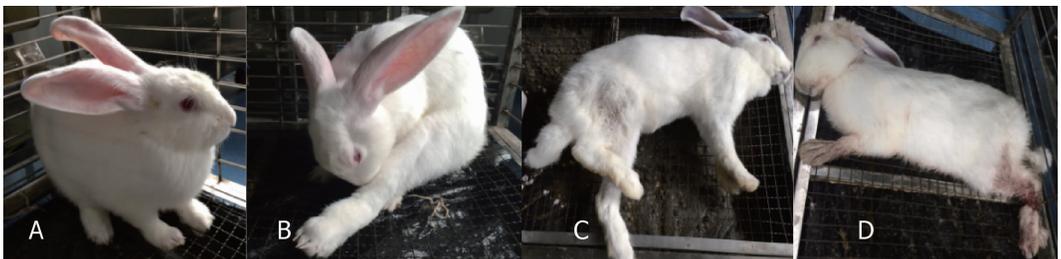


A. 正常小鼠;B. 攻毒小鼠啃咬注射部位;C. 攻毒小鼠死亡

图5 PRV ZY-2014 毒株小鼠感染试验

2.6 家兔感染试验结果家兔接毒后 24~36 h, 表现精神亢奋, 食欲减退, 啃咬接种部位, 接毒 40 h 后高剂量组的两只家兔出现典型角弓反张肌肉颤

抖等神经症状后相继死亡。低剂量组的两只家兔啃咬接种部位至皮肤出血, 60 h 后出现神经症状后相继出现死亡, 见图 6。



A. 正常家兔;B. 接毒后家兔啃咬注射部位;C.  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub> 攻毒剂量家兔死亡;D.  $10^{5.4}$  TCID<sub>50</sub> 攻毒剂量家兔死亡

图6 PRV ZY-2014 毒株家兔感染试验

### 3 讨论与小结

2011年以来,各科研单位从我国相继暴发猪伪狂犬病的猪场中分离到多株伪狂犬病毒,中国农业科学院上海兽医研究所童光志研究员团队分离到了 HeN1 株<sup>[6]</sup>、JS-2012 株<sup>[9]</sup>,哈尔滨兽医研究所仇化吉研究员团队分离的 TJ 株<sup>[7]</sup>,南京农业大学姜平教授的团队分离的 ZJ01 株<sup>[8]</sup>等。序列分析表明伪狂犬新分离毒株存在变异,变异株致病性较之前的伪狂犬病毒有所增强,而且由于抗原性发生变异,现有的 gE 基因缺失疫苗不能针对新的流行毒提供完全的临床保护。流行毒株 gE 基因序列与以往发表的相关序列比对显示,这些分离株均属于一个相对独立的分支<sup>[10]</sup>。

本研究从已免疫过 PRV gE 基因缺失疫苗 (Bartha-K61 株) 的死亡仔猪中分离到 1 株猪伪狂犬病病毒,经蚀斑纯化,PCR 鉴定、动物感染试验等方法鉴定为猪伪狂犬病毒,命名为 ZY-2014 株。重组质粒测序结果表明 ZY-2014 毒株 gE 基因完整的阅读框全长 1740 bp,编码 579 个氨基酸。ZY-2014 毒株 gE 基因核苷酸及推导的氨基酸序列与国内 2012 年以来新分离毒株的同源性分别为 99.6%~100% 和 99.1%~100%,与 2012 年以前分离毒株核苷酸及推导的氨基酸序列的同源性分别为 97.7%~99.6% 和 95.7%~99.3%。遗传进化树结果表明所分离的 ZY-2014 毒株与 2012 年以来新分离毒株,如 HeN1 株、JS-2012 株、ZJ01 株同属一个大分支,与 2012 年前经典毒株 EA 株、GDSH 株、FA 株、MinA 株、LA 株等分属不同进化分支,亲缘关系较近,与经典毒株 Becker 株、Kaplan 株、Nia-1 株、NiA-3 的亲缘关系较远。此外赵鸿远<sup>[10]</sup>、张青占<sup>[11]</sup>、陈秋勇<sup>[12]</sup>等报道新分离毒株具有相同的分子特征,即在 gE 基因第 48 位和第 492~496 位各有 1 个天冬氨酸的插入,而 2012 年前分离到的毒株只有个别位置插入一个氨基酸,绝大部分没有插入。ZY-2014 株在 48aa 处 492aa 处各插入一个天冬氨酸,与报道相符,进一步证明 ZY-2014 株属于新流行毒株。

本研究分离到的 ZY-2014 株与国内 2012 年

以来流行的变异株具有很高的同源性,为新的伪狂犬变异毒株,这将为伪狂犬病防控提供流行病学依据并为伪狂犬新型疫苗的研制奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 人与动物共患病[M]. 田克恭. 北京:中国农业出版社,2013: 81-85.
- [2] Jeffrey JZ, Locke A K, Alejandro R. 猪病学[M]. 赵德明,张仲秋,周向梅,等,译. 第十版. 北京:中国农业大学出版社,2014:438-445.
- [3] 吕素芳,郭广君,魏凤,等. 猪伪狂犬病病毒 gE- /gI- /TK- /多基因缺失活疫苗对猪的安全性及免疫效力研究[J]. 动物医学进展,2014,35(4):1-5.
- [4] 彭金美,安同庆,童光志,等. 猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. 中国预防兽医学报 2013,35(1):1-4.
- [5] 胡睿铭,汤细彪,刘峰,等. 2011-2013 猪伪狂犬病在我国部分地区的流行病学调查与分析[C]. 第十四届全国规模化猪场主要疫病监控与净化专题研讨会论文集,2014:83-88.
- [6] Ye C, Zhang Q Z, Tong G Z, *et al.* Genomic characterization of emergent pseudorabies virus in China reveals marked sequence divergence: evidence for the existence of two major genotypes[J]. Virology,2015,483:32-43.
- [7] Wang C H, Yuan J, Qin H Y, *et al.* A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. Vaccine, 2014, 32(27):3379-3385.
- [8] Gu Z, Hou C, Jiang P, *et al.* Emergence of highly virulent pseudorabies virus in southern China[J]. Can J Vet Res,2015, 79(3):221-228.
- [9] 童武,郑浩,童光志,等. 伪狂犬病毒变异株(JS-2012)对仔猪的致病性研究[J]. 中国动物传染病学 2014,22(5): 10-14.
- [10] 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.
- [11] 张青占. 变异猪伪狂犬病毒的分离鉴定及生物学特性分析[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [12] 陈秋勇,吴学敏,修金生,等. 猪伪狂犬病病毒 FZ-2012 株的分离鉴定及其 gE 基因的遗传演化分析[J]. 畜牧与兽医, 2015,47(7):17-20.