

育肥猪血清中猪细小病毒 16WS 株的分离与鉴定

吴海超, 胡呈才, 刘崇灵, 李润成, 余兴龙*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 从一育肥猪早、中期生产状况差的猪场收集猪血清 214 份, 采用猪细小病毒(PPV)特异性检测引物进行 PCR 检测, 选取 1 份阳性血清接种猪睾丸细胞(ST)进行 PPV 分离、部分生物学特性研究, 以及 PPV 部分基因序列分析。结果表明: 在 15、16、17、18、22 周龄猪血清中均检测到 PPV, 检测阳性率分别为 10%、40%、20%、15.4%、9%, 而从 2~14 及 24 周龄的猪血清中没有检测到 PPV; 病毒分离和部分生物学特性研究结果表明, 从血清中分离的 PPV 在 ST 细胞上传到第 5 代能够出现较稳定的细胞病变(CPE), 病毒血凝效价为 2^8 ; PPV 部分基因序列与 GenBank 收录的 PPV 毒株序列同源性在 98%以上, 其中与 2012 年西北农林科技大学时乐^[1]分离的 YL 毒株同源性高达 99.1%。以上结果证实本研究分离到 PPV, 且说明 PPV 在采样猪场的保育后期和育肥前、中期猪血清中具有较高的阳性率。

关键词: 育肥猪; 猪细小病毒; 血清; 分离; 鉴定

中图分类号: S852.65+9.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)05-0525-05

Isolation and identification of porcine parvovirus strain 16WS in serum of fattening pigs

WU Hai-chao, HU Cheng-cai, LIU Chong-ling, LI Run-cheng, YU Xing-long*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

Abstract: We collected 214 sera samples from a farm which its growing-finishing pigs with poor health conditions and detected porcine parvovirus (PPV) by PCR. A sample contained PPV identified by PCR was inoculated into ST cells to isolate PPV and the isolate was sequenced and we described partial of its biological characteristics. We found that there were no sera contain PPV detected by PCR from pigs aged from 2 to 14 weeks and 24 week, however, PPV can be detected from serum of pigs aged from 15 to 18 and 22 weeks with positive rate 10%, 40%, 20%, 15.4% and 9%, respectively. The isolate was serially passaged in ST cells and the ST showed stable cytopathic effects when the isolate passaged to the fifth generation. Hemagglutination titer of the isolate was 2^8 by the hemagglutination assay. We also found that the partial genome of the isolate share more than 98% identity with PPV genomes found in GenBank, especially as high as 99.1% with the strain YL which was isolated by Shi^[1] in 2012. Therefore, we demonstrated that the isolate is PPV and nursing pigs in late stage as well as fattening pigs in early stage have a high PPV rate in this farm.

Key words: fattening pigs; porcine parvovirus(PPV); serum; isolation; identification

猪细小病毒为细小病毒科细小病毒属成员, 是一种自主型复制病毒, 主要经消化道和呼吸道传播, 广泛存在于猪场。猪细小病毒能够引起怀孕母猪流产、产死胎、木乃伊胎、返情等, 其中初产母猪症状最明显^[2]; 还能够引起哺乳仔猪非化脓性心

肌炎^[3]、仔猪皮炎^[4-5]、肥育猪间质性肾炎^[6]等疾病, 并能与猪圆环病毒(porcine circovirus, PCV)、猪伪狂犬病(porcine pseudorabies, PRV)、猪细小病毒(Torque torque sus virus, TTSuV)^[7]等多种病毒共同感染, 其中与猪圆环病毒感染能够加重仔猪多系统

衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)^[8]。

1966 年, Mayr^[9]首次于猪瘟组织中分离到 PPV 病毒, Cartwright^[10]等从猪流产胎儿中分离到该病毒并首次证明其致病作用。1982 年, 中国药监所分离到该病毒, 此后在上海、黑龙江、吉林、四川、浙江等地分离到该病毒^[11-12]。湖南农业大学动物微生物与免疫实验室从湖南一肥育早、中期生产成绩持续较差的猪场采集了不同周龄段的小猪血清 214 份, 进行了猪细小病毒检测, 并从 1 份血清样品中分离到 1 株猪细小病毒, 对其进行了部分生物学特性研究以及部分基因序列的测序分析, 具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料及细胞

从湖南某猪场收集的 214 份血清, 其中 2 周龄仔猪血清 11 份; 4 周龄血清 10 份; 6、8、9、12 周龄血清各 15 份; 10 周龄血清 17 份; 14 周龄血清 25 份; 15 周龄血清 10 份; 16 周龄血清 25 份; 17 周龄血清 10 份; 18 周龄血清 13 份; 20 周龄血清 12 份; 22 周龄血清 11 份; 24 周龄血清 10 份。猪睾丸细胞系(ST)由湖南农业大学动物微生物与免疫实验室保存。

1.1.2 主要试剂

DNA_{OUT} 提取试剂盒、PCR MIX 3.0 为北京天恩泽基因科技有限公司产品; DMEM(high glucose) 培养基、0.25 % Trypsin-EDTA 均为 HyClone 公司产品; 新生犊牛血清为 Gibco 公司产品; 配制双抗用青霉素钠(80 万单位)为哈药集团制药总厂产品; 配制双抗用硫酸链霉素(100 万单位)为瑞阳制药有限公司产品; DM2000 Plus DNA marker 为康为世纪生物科技有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 病原检测

从 GenBank 下载多条具有代表性的猪细小病毒全基因序列, 用 DNASTar 软件对全基因序列进行同源性分析, 在其保守区域设计检测引物, 上游引物用 PPVfp1, 序列为 5'-AGCGAGCCAACAACAC

CAACTTT-3'; 下游引物用 PPVrp1, 序列为 5'-TCTCGGCGATCTTCTTACCTCTG-3', 退火温度为 63 ℃。用 DNA_{OUT} 提取试剂盒提取血清中病毒基因组, 以提取的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 20 μL 扩增体系如下: PCR MIX 9 μL, 10 pmol/L PPVfp1 和 PPVrp1 各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, 加水补至 20 μL, 同时设置无模板的阴性对照。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 5 min, 63 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 用 0.8 % 的琼脂糖对 PCR 产物进行电泳检测。

1.2.2 病毒分离

将其中 1 份 PPV 阳性血清用不含犊牛血清 DMEM 培养基进行稀释, 稀释总体积为 1 mL, 稀释梯度依次为 1/20、1/30、1/40、1/50、1/60。稀释前在 DMEM 培养基中加入 1 万单位的青霉素钠和 1 万单位的硫酸链霉素, 将稀释好的样品于 4 ℃ 放置 24 h, 使青霉素和链霉素充分发挥作用。将生长良好的 ST 细胞传代至细胞培养板中, 待生长密度为 50% 时, 弃培养板中的培养基, 用 0.1 mol/L PBS 洗涤 2 遍后, 将稀释好的 1 mL 血清样品加入至培养板中, 设未加血清样品的 ST 细胞为阴性对照, 置 37 ℃、含 5% CO₂ 恒温箱中孵育 1 h 后, 每孔加入 20 μL 犊牛血清, 使每孔培养液犊牛血清终浓度为 2%, 置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温箱中培养。对以上细胞冻融传 3 代, 取第 3 代细胞上清液提取 DNA, 并进行 PCR 检测, 如能检测到 PPV 则继续进行传代并观察细胞病变情况。

1.2.3 病毒血凝效价的测定

取病变稳定后病毒液置于 20 ℃ 反复冻融 3 次, 3 000 r/min, 离心 4 min, 取 50 μL, 参照吴宇阳^[13]介绍的方法, 加入 96 孔“V”型反应板(孔中预先加入 50 μL 0.1 mol/L PBS), 加 50 μL 0.5% 豚鼠红细胞悬液至每孔, 在微量振荡器上摇匀 10 s, 室温(25 ℃)下放置 2 h, 以出现 50 % 红细胞凝集的最大病毒稀释倍数视为该病毒的血凝效价。

1.2.4 PPV 分离株部分基因序列的测定及同源性分析

从 GenBank 上下载多条猪细小病毒全基因序列, 利用 DNASTar 软件对部分基因序列进行同源性分析, 在其保守区域分段设计引物, 引物信息见表 1。

表 1 猪细小病毒基因组扩增引物

Table 1 Sequencing primers for PPV				
引物名称	引物序列(5'—3')	位置	退火温度/℃	片段大小/bp
PPV-F1	ACTCTCAGCTACTGCAGCAT	273~775 bp	55	502
PPV-R1	TGCATTATTAACCATCTACTCCAT			
PPV-F2	GTGGAAAAGGCTTACAACAA	692~1 337 bp	55	645
PPV-R2	GGTTTTGCCTTTTCAAGTATTA			
PPV-F3	TAGAAATGATGGCTCAAACC	1 220~2 544 bp	55	1 324
PPV-R3	GCTGCTGAGAAGTAGAAGTA			
PPV-F4	AAAAGAGCAAGAGGTAAGGG	2 302~3 139 bp	55	837
PPV-R4	TGACCAAGGTGTTACCATT			
PPV-F5	CGCATCAAGACTCATACATC	3 004~4 336 bp	55	1 332
PPV-R5	GTCAGCATTGAAATCATCTGTTAG			
PPV-F6	ACAGCACTAAACAATACTGCACCT	4 161~4 538 bp	59	377
PPV-R6	CTTGGTATAAGTTGTGAATATTCTG			

采用曹果清^[14]介绍的饱和苯酚-氯仿抽提法对第 5 代病毒液提取 DNA ,分别用表 1 中引物对其进行 PCR 扩增,50 μL PCR 扩增体系如下:PCR MIX 和超纯水各 23.5 μL ,上下游引物各加 1 μL ,DNA 模板 1 μL。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min 95 ℃变性 5 min ,55 ℃/59 ℃退火 30 s ,72 ℃延伸 30 s ,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。用 0.8 %琼脂糖对 PCR 产物进行电泳检测。将鉴定为阳性的 PCR 产物送往博尚生物有限公司进行测序,将测序结果拼接后,与 GenBank 中已知序列进行比对分析,选择的序列信息见表 2。

表 2 毒株信息

Table 2 Information of isolates			
毒株名称	基因登录号	分离地	毒力
NADL-2	NCOO1718	美国	弱毒株
Kresse	U44978	美国	皮炎型强毒株
Challenge	AY684866	英国	强毒株
27a	AY684871	德国	强毒株
BQ	EU790641	中国	未知
ZJ	EU790642	中国	强毒株
China	AY583318	中国	未知
N	EF212027	中国	自然弱毒株
PPV2010	JN872448	中国	弱毒株
YL	JN860197	中国	弱毒株

2 结 果

2.1 病原检测结果

收集了湖南某猪场 214 份血清,对各周龄猪血

清进行 PCR 病原检测,其中 2~14 周龄、24 周龄的猪血清中未检测到 PPV,15、16、17、18、22 周龄的 PPV 阳性检出率分别为 10%、40%、20%、15.4%、9%。

2.2 病毒分离结果

2.2.1 细胞病变观察

将处理好的血清接种于生长状态良好的 ST 细胞,冻融传到第 5 代,接毒细胞出现圆缩、脱落、拉网等细胞病变,而未接毒细胞形态正常,没有出现细胞病变(图 1)。

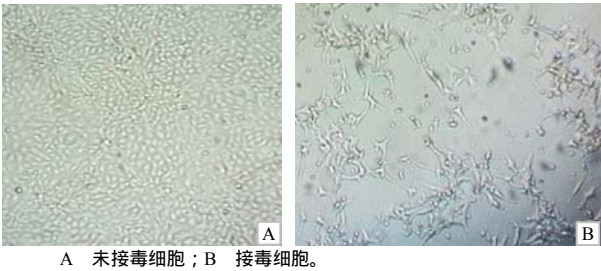
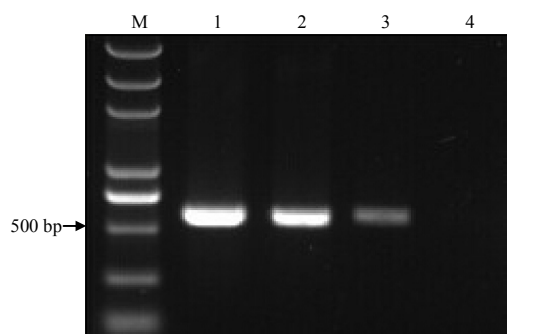


图 1 分离株感染 ST 细胞产生细胞病变

Fig1 Cytopathogenic effect induced by isolate in ST cell

2.2.2 分离病毒的 PCR 鉴定

用特异性的检测引物对本实验 PPV 分离株第 5 代细胞病毒液稀释度为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 的样品进行 PCR 检测,结果(图 2)表明,扩增条带与目的条带相符,确定分离到的病毒为 PPV,并将分离病毒命名为 16WS。



M 为 DM2000 Plus DNA marker; 1~3 为第 5 代细胞培养物的检测结果; 4 阴性对照。

图 2 接种细胞的 PCR 检测结果

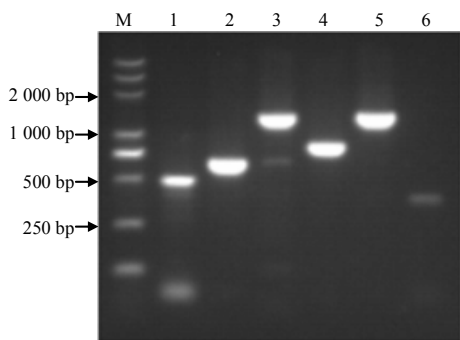
Fig 2 Cells inoculated with ppv detected by PCR

2.3 分离病毒对豚鼠红细胞的血凝效价测定

取 PPV 阳性血清冻融传代至第 5 代的出现稳定病变的细胞样品(经 PCR 检测为细小病毒阳性), 进行病毒凝集豚鼠红细胞的特性的检测, 结果测出分离病毒血凝效价为 2^8 。

2.4 分离病毒的基因组序列的扩增

用猪细小病毒基因组扩增引物对第 5 代细胞病毒液基因组进行 PCR 扩增, PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果见图 3。由图 3 可见, 各引物均扩增出了与预期片段大小相符的特异性条带。



M 为 DM2000 Plus DNA marker; 1~6 分别为引物对 PPV-F1 和 PPV-R1、PPV-F2 和 PPV-R2、PPV-F3 和 PPV-R3、PPV-F4 和 PPV-R4、PPV-F5 和 PPV-R5、PPV-F6 和 PPV-R6 的扩增产物。

图 3 测序引物 PCR 结果

Fig 3 Amplification of PPV by sequencing primers

2.5 分离病毒的基因组测序分析

将 PCR 产物送往博尚生物有限公司进行序列测定。对序列进行拼接, 序列长 4 320 bp, 利用 DNASTar 序列分析软件与 GenBank 中 10 株(毒株信息见表 2) PPV 毒株进行同源性分析, 结果表明分离的 PPV 的基因序列与其他研究较多的猪细小

病毒基因序列同源性在 98 % 以上, 其中, 与时乐^[1]分离的 YL 毒株同源性最高, 同源性高达 99.1%。

3 讨论

本实验从一育肥猪早、中期生产水平较差的猪场收集了 214 份血清, 采用猪细小病毒特异性检测引物进行病毒检测, 并在检测完毕后, 选取 1 份阳性血清接种 ST 细胞进行病毒分离, 通过 PCR 检测、血凝实验、细胞病变观察、全基因序列测定及同源性分析等成功分离到 1 株猪细小病毒。大部分的 PPV 毒株都是从流产胎儿的肝脏、肾脏、肠系膜淋巴结、肺脏等实质性器官分离, 很少有人从育肥猪血清中进行分离。本实验从育肥猪血清分离到 1 株猪细小病毒, 说明猪产生病毒血症后, 可以尝试从血清中分离病毒, 为采样及分离病毒提供一种较为简便的方法。

猪细小病毒一般在感染后的 1~6 d 内产生病毒血症^[15], 通过从血清中分离本病毒还可以确定该病毒是否在感染初期还是感染后期。对湖南某规模化猪场的 214 份猪血清进行猪细小病毒病原检测, 结果发现 15、16、17、18、22 周龄均检测到该病毒, 检测阳性率依次为 10%、40%、20%、15.4%、9%, 2~14 周龄及 24 周龄未检测到本病毒。针对于目前健康水平较差的猪场, 猪蓝耳病毒、猪伪狂犬病毒、猪细小病毒在患有呼吸道疾病及繁殖障碍性疾病的猪群中感染非常普遍, 特别是猪感染猪蓝耳病毒、猪伪狂犬病毒后, 免疫功能被抑制, 抵抗力降低, 导致其他病毒乘虚而入。由于育肥猪猪细小病毒母源抗体的消失, 又没有免疫猪细小病毒疫苗, 而猪场中往往又有该病毒的存在^[16], 导致育肥猪前、中期容易引起猪细小病毒的感染。由于本实验只针对于一个育肥阶段生产较差的猪场进行了检测, 其他生产水平较差的猪场是否也存在这种情况还需进一步研究。

将 PPV 分离株与 GenBank 登录的 10 株 PPV 毒株进行同源性分析, 发现 PPV 分离株与其他 PPV 毒株的同源性均在 98% 以上, 其中与 2012 年西北农林科技大学时乐^[1]分离的 YL 株同源性达到 99.1%, 且该分离株与德国强毒株 27a、BQ 株、YL 株亲缘关系较近, 其他的生物学特征还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 时乐, 黄勇, 许信刚, 等. 猪细小病毒 YL 株序列分析及其 VP2 基因原核表达[J]. 西北农业学报, 2012, 21(6): 6-12.
- [2] 韦平, 秦爱建. 重要动物病毒分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [3] Bolt D M, Hani H, Muller E, et al. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection[J]. J Comp Pathol, 1997, 117(2): 107-118.
- [4] 张超范, 崔尚金, 戚亭, 等. 猪细小病毒细胞适应株的培育及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(5): 362-366.
- [5] Choi C S, Molitor T W, Joo H S, et al. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses[J]. Vet Microbiol, 1987, 15(1/2): 19-29.
- [6] Drolet R, D'Allaire S, Larochelle R, et al. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter[J]. The Veterinary Record, 2002, 150(5): 139-143.
- [7] Nieto D, Aramouni M, Grau-Roma L, et al. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 152(3/4): 284-290.
- [8] Choi C, Chae C. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization[J]. Journal of Comparative Pathology, 2000, 123(4): 302-305.
- [9] Mayr A, Bachmann P A, Siegl G, et al. Characterization of a small porcine DNA virus[J]. Archiv fr die gesamte Virusforschung, 1968, 25(1): 38-51.
- [10] 斯特劳. 猪病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [11] 李英霞, 李长宏, 朱琪, 等. 黑龙江省猪细小病毒感染的流行病学调查[J]. 中国兽医杂志, 2001, 37(1): 22.
- [12] 杨待建, 金升藻, 荣俊, 等. 湖北省猪细小病毒病流行的调查[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(5): 67-70.
- [13] 吴宇阳, 陈龙彪, 崔保安, 等. 猪细小病毒河南地方株 HP104 的分离与生物学特性鉴定[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(10): 1498-1503.
- [14] 曹果清, 莫清珊, 陈凤仙. 酚/氯仿抽提法提取绵羊凝血块中基因组 DNA[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(34): 16771-16772.
- [15] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [16] 王娟萍, 姚敬明, 丁馥香, 等. 猪蓝耳病, 猪细小病毒病和猪伪狂犬病混合感染的多重 PCR 诊断与防制[J]. 养猪, 2008(5): 70-72.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维