



研究报告

2018–2019 年四川省伪狂犬病毒的流行病学调查及 *gC*、*gE*、*TK* 基因遗传进化分析

殷鑫欢 鲁令华 王进疆 谢勇 朱玲 周莉媛 陈弟诗 徐志文*

四川农业大学动物医学院动物生物技术中心 四川 成都 611130

摘要:【背景】伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)是养猪生产中的一类重要病原,自 2011 年以来,我国接种了 Bartha-K61 疫苗的养殖场暴发了大规模的伪狂犬病疫情。【目的】调查目前四川省 PRV 的流行病学以及毒株的遗传进化,对 2018–2019 年从 86 个猪场收集的 384 份疑似 PRV 感染样本进行病原学检测。【方法】根据 PRV-*gE* 基因检测引物对采集的 384 份样品进行 PCR 扩增,并对不同季节、不同地区的 PRV 阳性率进行统计,将 PRV 感染与临床症状的相关性进行统计学分析。选择部分 PRV 阳性样本在 BHK-21 细胞上进行病毒的分离,随后进行分离毒株的 *gC*、*gE*、*TK* 基因的遗传进化分析。【结果】PRV 阳性猪只的比率为 9.9% (38/384); 阳性猪场比率为 16.3% (14/86); 流产母猪的 PRV 阳性率为 32.1% (27/84); 种公猪阳性率为 2.0% (4/198); 神经症状猪的 PRV 阳性率为 11.4% (4/35); 呼吸症状猪的 PRV 阳性率为 4.5% (3/67)。统计学分析表明,PRV 感染与母猪和公猪繁殖障碍症状相关($P < 0.01$)。其中,冬季(12 月、1 月、2 月)PRV 阳性率最高,约为 33.0% (31/94); 春季(3 月、4 月、5 月)的阳性率为 9.1% (3/33); 夏季和秋季的阳性率分别约为 1.5% (2/130)和 1.6% (2/127)。在 2018–2019 年共分离出 3 株 PRV 毒株,分别命名为 PRV-SN、PRV-DJY、PRV-CD。PRV-XJ 为本实验室 2016 年在四川省分离的一株毒株,为了了解毒株的遗传进化信息,先后扩增了这 4 个毒株的 *gC*、*gE*、*TK* 基因。序列比对表明四川分离株与国内株相似,存在额外的零星性突变和缺失。【结论】养殖场仍应加强对种猪群中伪狂犬病的净化。

关键词: 伪狂犬病毒, 基因分析, 流行病学调查

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500802, 2018YFD051102); Sichuan Veterinary Medicine and Drug Innovation Group of China Agricultural Research System (CARS-SVDIP); Applied Basic Research Project of Sichuan Science and Technology Department (2019YJ0560)

*Corresponding author: E-mail: abtcxzw@126.com

Received: 30-12-2019; Accepted: 18-02-2020; Published online: 24-03-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500802, 2018YFD051102); 国家农业产业技术体系四川兽药创新团队专项(CARS-SVDIP); 四川省科技厅应用基础研究项目(2019YJ0560)

*通信作者: E-mail: abtcxzw@126.com

收稿日期: 2019-12-30; 接受日期: 2020-02-18; 网络首发日期: 2020-03-24

Epidemiological investigation and *gC*, *gE*, *TK* genetic characteristics of pseudorabies virus in Sichuan province of China between 2018–2019

YIN Xin-Huan LU Ling-Hua WANG Jin-Jiang XIE Yong ZHU Ling
ZHOU Li-Yuan CHEN Di-Shi XU Zhi-Wen*

Animal Biotechnology Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: [Background] Pseudorabies virus (PRV) is an important pathogen to pig industry, a large-scale of pseudorabies (PR) has swept many Bartha-K61-vaccinated farms in China since 2011. [Objective] In order to investigate the epidemiological characteristics of PRV strains prevalent in Sichuan province, China, 384 suspected PRV infected samples were collected from 86 pig farms in 2018–2019. [Methods] According to the amplification of PRV-*gE* gene, 384 samples were detected by PCR. The positive rates of PRV in different seasons and regions were counted, and the correlation between PRV infections and clinical symptoms was statistically analyzed. We selected some PRV positive samples for virus isolation through BHK-21 cells, followed by *gC*, *gE* and *TK* genetic informatic analysis of isolated strains. [Results] The individual positive rate of PRV was 9.9% (38/384); the group positive rate of PRV was 16.3% (14/86); the positive rate in aborted fetuses was 32.1% (27/84); the positive rate in semen of breeding boars was 2.0% (4/198); the positive rate in nervous symptoms pig was 11.4% (4/35); the positive rate in respiratory symptoms pig was 4.5% (3/67). Statistical analysis indicated that PRV infection was associated with pig reproductive failure ($P < 0.01$). The highest PRV infection rate was detected in winter (December, January, February), with a positive rate of 33.0% (31/94); Spring (April, March, May) ranked the second highest positive rate of 9.1% (3/33); Summer and autumn was about 1.5% (2/130) and 1.6% (2/127) respectively. Totally, we isolated 3 PRV strains between 2018–2019, named PRV-SN, PRV-DJY, PRV-CD respectively. PRV-XJ, a strain isolated by our laboratory in 2016 in Sichuan province was also included, these strains were used for *gC*, *gE*, *TK* gene sequencing. Sequence alignment shows that Sichuan isolates were similar to those Chinese isolates, except for sporadic mutations and deletions. [Conclusion] Farms should strengthen the purification of pseudorabies in breeding herds.

Keywords: Pseudorabies virus, Genetic analysis, Epidemiological investigation

伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)是伪狂犬病(pseudorabies, PR)的病原, 是疱疹病毒(Herpeviridae) α 疱疹病毒科(Alpha Herpesvirinae)的成员^[1]。PRV 基因组约为 143 kb, 包含至少 72 个编码蛋白的基因, 这些蛋白参与了病毒衣壳、间质和包膜的形成^[2-3]。其中胸苷激酶基因 *TK* 和糖蛋白 E 基因 *gE* 是 PRV 主要的毒力基因^[4]。*gE/TK* 基因缺失的毒株常被用于疫苗研发^[5-8]。此外, *TK* 和 *gE* 基因常被用于监测野毒株的遗传进化^[1,9-10]。糖蛋白 C 基因 *gC* 位于病毒包膜内, 主要参与诱导机体细胞和体液免疫应答^[11]。据报道, *gC* 基因遗传进化分析可以将 PRV 毒株分为两种基因型, 从而将中国毒株

与国外毒株区分开^[12]。

PRV 可以感染多种动物, 包括牛、啮齿动物、貂、狗等^[13-15], 2018–2019 年间曾有报道关于从事畜牧行业的人员感染 PRV 后引起脑炎和眼炎的案例^[16-17], 但猪是该病毒的自然宿主^[18-19]。感染了 PRV 的猪在外周神经系统中终生携带病毒, 不同生长阶段的猪只感染 PRV 表现出不同的症状^[20]。新生仔猪主要表现为神经症状和致死性脑炎; 育肥猪只感染后以呼吸系统障碍为特征; 而该病毒常常导致怀孕母猪流产, 产木乃伊胎等^[21]。中国首例 PRV 感染病例可以追溯到 20 世纪 50 年代, 20 世纪 70 年代中国从匈牙利引

进了 Bartha-K61 疫苗,直到 80 年代 Bartha-K61 疫苗才在中国得到广泛应用,为疾病控制提供了有利条件^[22]。然而 2011 年底,在部分 Bartha-K61 免疫的猪场暴发了以神经症状和新生仔猪高死亡率为特征的 PR,并分离到多株流行毒株,包括 HNX、ZJ01、HeN1、SMX、TJ、JS、JS-2012 和 HN1201 等^[21,23-24]。遗传进化显示这些毒株与传统毒株相比存在变异。

PRV 在四川省内的流行情况较少报道,为了了解四川省 PRV 流行毒株的流行特征,本研究对四川省 2018 年 1 月至 2019 年 8 月的 PR 流行病学进行了调查,共分离到 3 株 PRV 毒株,并对这些毒株的 *gC*、*gE* 和 *TK* 基因序列进行扩增和测序,构建遗传进化树。以本实验室保存的 2016 年 PRV 分离株(PR-VXJ 株)为参考毒株,分析近年来四川省 PRV 毒株的流行变异情况。

1 材料

1.1 样品采集及处理

2018–2019 年本实验室收集了四川省 12 个地区 86 个养猪场 384 头以流产、神经系统疾病、呼吸系统疾病为特征的猪只组织样本。其中,春、夏、秋、冬收集的疑似阳性样品数目分别是 33、130、127、94 份;与呼吸系统、神经系统、母猪流产及死胎、公猪生殖系统感染相关的病例分别有 67、35、84、198 份。死胎及神经症状猪只采集其小脑,流产胎儿采集胎衣,呼吸系统障碍猪只采集其肺脏,种公猪通过采集精液处理样品中的蛋白。

1.2 主要试剂和仪器

2×GC buffer、*LA Taq*[®] Hot Start Version、DL2000 DNA Marker、反转录试剂盒(PrimeScript[™] RT Reagent Kit), TaKaRa 公司;病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(TIANamp Virus DNA/RNA Kit), 天根生化科技(北京)有限公司;SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;胎牛血清、DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle Medium)、营养液, Gibco 公司;BHK-21 (Baby Hamster Kidney Cell-21)细胞,本实验室保存。PCR 仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 PRV 的检测

对 384 头患病猪只的小脑、肺脏、胎衣等组织研磨,液氮反复冻融 3 次后 12 000 r/min 离心 5 min 收集上清;公猪精液首先通过破乳去除过多的蛋白然后 12 000 r/min 离心 5 min 收集上清。根据传统的酚-氯仿法抽提组织中的 DNA,参照国家 PRV-*gE* 基因的检测引物 *gE1-F/R* (表 1)对抽提的 DNA 样品进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(10 μL): 2×GC buffer 5 μL, ddH₂O 2 μL, 正、反向引物 (100 μmol/L)各 0.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.1 μL, DNA 模板 0.9 μL。PCR 反应条件: 95 °C min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。同时按照 Trizol 法抽提组织中的 RNA,用 PrimeScript[™] RT Reagent Kit 合成 cDNA。同时利用 PCR 和 RT-PCR 技术对常见的猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)、猪繁殖与呼吸障碍病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪细小病毒(porcine parvovirus, PPV)、猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV2)、猪圆环病毒 3 型(porcine circovirus 3, PCV3)病原进行检测,引物见表 1。PCR 反应结束后,取 5 μL 产物进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,最终若 PRV-*gE* 的产物条带约 534 bp,则证明是 PRV 阳性感染猪只。

2.2 PRV 的分离

取 1 mL 的组织研磨液上清加入青链霉素 (100 μg/mL)和左氧氟沙星(100 μg/mL) 4 °C 过夜,将 BHK-21 细胞传代至 T25 细胞瓶,当细胞密集程度达到 90%时将上清接种单层细胞。37 °C 吸附 1 h 后加入含 2% FBS 的 DMEM 维持液,置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱中培养 3–4 d,观察细胞病

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

序号 No.	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	片段长度 Fragments (bp)	功能 Effects
1	PCV2-F	CGGATATTGTAGTCCTGGTTCG	481	样品检测 Sample detection
	PCV2-R	ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA		
2	PCV3-F	TACCGGGCAGTGGATGATGAAG	639	样品检测 Sample detection
	PCV3-R	CGCAACCTGGAGGACCAATAAA		
3	CSFV-F	GACACTAGYGCAGGCAAYAG	449	样品检测 Sample detection
	CSFV-R	AGTGGGTCCAGGARTACAT		
4	PRRSV-F	AATTCGCCGACCTCGCGGAACTGT	260	样品检测 Sample detection
	PRRSV-R	ATGTCCGAGATTTCACTCAGG		
5	PPV-F	AACACACTTCATACACACCAGCAG	380	样品检测 Sample detection
	PPV-R	CTAGTATAATTTTCTTGG		
6	<i>gE</i> 1-F	ATCTGGACGTTCTCTGCC	534	样品检测 Sample detection (GB/T 18641-2002)
	<i>gE</i> 1-R	GTAGATGCAGGGCTCGTACA		
7	<i>gE</i> 2-F	CCTGGGCACCCCGCGAGTCTCGCA	896	扩增 N 端 Amplifying the N-terminal of <i>gE</i>
	<i>gE</i> 2-R	TGCAGGGCTCGTACACGTAGTACA		
8	<i>gE</i> 3-F	CCGCCACGCTGGACTGGTACTACGC	1 001	扩增 C 端 Amplifying the C-terminal of <i>gE</i>
	<i>gE</i> 3-R	GCCGGGCATGTCCGGAATGCGGGCG		
9	<i>gC</i> 1-F	CACTAGCATTAAATCCGTTTCTGA	952	扩增 N 端 Amplifying the N-terminal of <i>gC</i>
	<i>gC</i> 2-R	GTCCACCGGGTGTCTCGTCCGCGAA		
10	<i>gC</i> 2-F	GTGTGCGTCTGTCGCGACTACTAC	739	扩增 C 端 Amplifying the C-terminal of <i>gC</i>
	<i>gC</i> 2-R	ACCGGACGCGATGGCTCGGTTCA		
11	<i>TK</i> -F	CGGCGACCCGAGGTTGACTTCAA	1 278	扩增全基因 Amplifying the whole <i>TK</i> gene
	<i>TK</i> -R	CACGGACGACGCGGGCATGGTGAC		

变(cytopathic effect, CPE)。当细胞达到 80% CPE 时, 置于-80 °C 反复冻融 3 次, 5 000 r/min 离心 10 min 收集病毒液。

2.3 *gC*、*gE*、*TK* 基因的扩增和序列分析

根据病毒 DNA/RNA 抽提试剂盒提取 PRV 基因 DNA, 利用 NCBI 的 Primerblast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 功能区设计针对 *gC*、*gE*、*TK* 基因的引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。参照 2.1 的反应体系扩增病毒 *gC*、*gE*、*TK* 基因的编码区(coding sequence, CDS), 将 PCR 产物通过 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收, 并送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。利用 DNASTar 7.1 软件拼接病毒 *gC*、

gE、*TK* 基因核苷酸序列并上传至 GenBank 获得相应的登录号(表 2)。从 GenBank 数据库下载已公布的 PRV 毒株序列作为参考序列(表 2), 最后通过 MEGAX 软件, 建立针对 *gC*、*gE*、*TK* 基因的遗传进化树。

2.4 数据分析

使用 GraphPad Prism 8.0 和 IBM SPSS Statistics, V22.0 软件对数据进行统计学分析。利用 DNASTar 7.1 和 MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>) 软件进行序列及遗传进化分析。PRV 感染与猪只临床症状的相关性采用卡方测试($\chi^2 = \sum[(\text{实际观测数} - \text{理论频数})^2 / \text{理论频数}]$), 所有分析的显著性水平为 5%, 置信区间设置为 95%。

表 2 NCBI 中的 PRV 毒株信息

Table 2 Information of PRV isolates from NCBI

分离株	上传年份	国家	登录号
Isolates	Submission year to NCBI	Country	GenBank accession No.
Becker	—	USA	JF797219.1 (complete genome)
Kaplan	—	Hungary	JF797218.1 (complete genome)
Bartha	—	Hungary	JF797217.1 (complete genome)
NIA3	—	United Kingdom	KU900059.1 (complete genome)
SC	1986	China	KT809429.1 (complete genome)
Ea	1993	China/Hubei	KX423960.1 (complete genome)
LA	1997	China	KU552118.1 (complete genome)
Kolchis	2010	Greece	KT983811.1 (complete genome)
Fa	2012	China/Hubei	KM189913.1 (complete genome)
JS-2012	2012	China/Jiangsu	KP257591.1 (complete genome)
HeN1	2012	China/Henan	KP098534.1 (complete genome)
ZJ01	2012	China/Zhejiang	KM061380.1 (complete genome)
TJ	2012	China/Tianjin	KJ789182.1 (complete genome)
HNX	2012	China/Henan	KM189912.1 (complete genome)
HNB	2012	China/Henan	KM189914.3 (complete genome)
HN1201	2012	China/Henan	KP722022.1 (complete genome)
Xiang A	2012	China/Hunan	KF711991.1 (TK); KJ463839.1 (gE)
GX-GL	2013	China/Guangxi	KU323910.1 (gC); KT936471.1 (gE)
LN10-13	2013	China/Liaoning	KY398785.1 (gE); KY398814.1 (TK)
BJ/RD	2013	China/Beijing	KF017273.1 (gC); KF017275.1 (gE)
DL/1408	2014	China/Jilin	KU360259.1 (complete genome)
YY	2014	China/Hunan	KF997101.1 (gC); KF130885.1 (gE); KP259815.1 (TK)
FJN5-14	2014	China/Fujian	KY398743.1 (gC); KY398773.1 (gE); KY398807.1 (TK)
XJ-14	2014	China/Shandong	KY398767.1 (gC); KY398801.1 (gE); KY398830.1 (TK)
HLJ8	2015	China/Heilongjiang	KT824771.1 (complete genome)
RC1	2016	Japan	LC342744.1 (complete genome)
XJ	2016	China/Sichuan	KY498321 (gC); KY498323 (gE); MN255325 (TK)
JL1	2017	China/Jilin	MG733280.1 (gE); MG733282.1 (TK)
SD HZ01	2018	China/Shandong	MH521042.1 (gE)
DJY	2018	China/Sichuan	MN240561 (gC); MN240564 (gE); MN255324 (TK)
SN	2018	China/Sichuan	MN240562 (gC); MN240565 (gE); MN262476 (TK)
CD	2019	China/Sichuan	MN240560 (gC); MN240563 (gE); MN240566 (TK)

注：—：时间不详。

Note: —: The date is not definite.

3 结果与分析

3.1 2018–2019 PRV 的流行病学调查

对 2018–2019 年四川省 12 个地区 86 个猪场 198 头种猪、84 头流产胎儿、67 头呼吸系统病猪、35 头神经系统病猪样品进行了 PCR 检测，具体的临床症状及病理观察见图 1。最终 PRV 个体阳性率为 9.9% (38/384)；阳性猪场比率为 16.3% (14/86)；

流产胎儿中 PRV 的阳性率为 32.1% (27/84)；种公猪的阳性率为 2.0% (4/198)；神经系统感染阳性率为 11.4% (4/35)；呼吸系统感染阳性率为 4.5% (3/67) (图 2A)。所有的阳性病例中有一例流产是由 PRRSV 和 PRV 混合感染引起的，其余阳性病例均为 PRV 单一感染。经统计学分析，PRV 感染与母猪和公猪生殖系统相关 ($P < 0.01$)，而呼吸系统和神

经系统感染与 PRV 无明显相关性($P>0.05$) (表 3)。

PRV 感染率最高的季节是冬季(12 月、1 月、2 月), 阳性率为 33.0% (31/94), 其次是春季(3 月、4 月、5 月), 阳性率为 9.1% (3/33)。夏季(6 月、7 月、8 月)和秋季(9 月、10 月、11 月)感染较低,

分别为 1.5% (2/130)和 1.6% (2/127) (图 2B)。

3.2 PRV 的分离和鉴定

对照组的 BHK-21 细胞没有出现 CPE (图 3A), 而病毒感染 BHK-21 细胞 24 h 后, CPE 明显, 视野中大多数细胞变圆(图 3B)。抽提病毒液的基因组

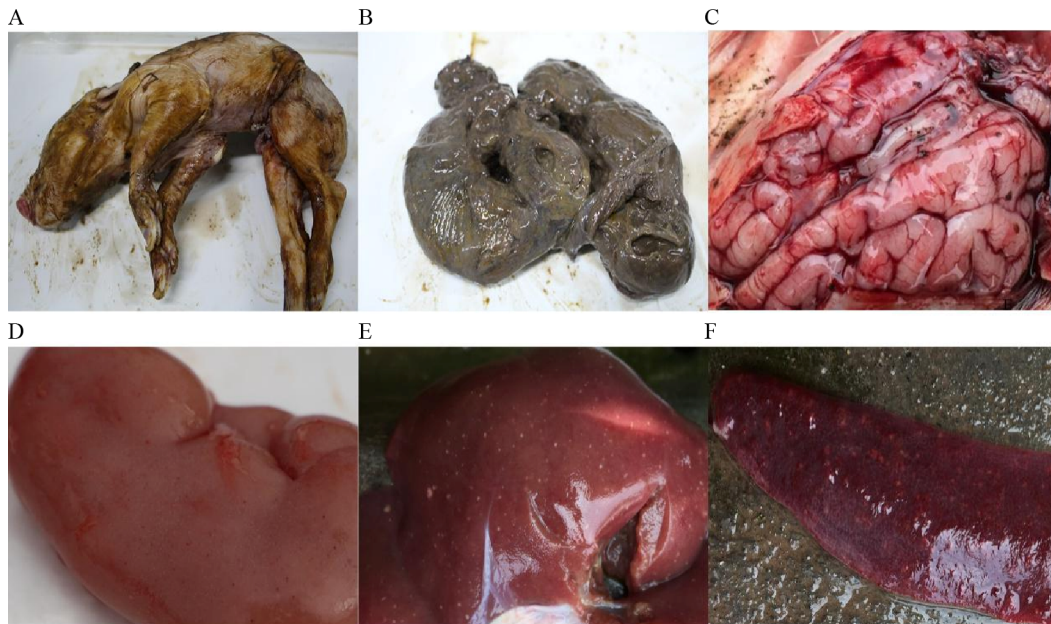


图 1 变异 PRV 毒株感染猪只后的临床症状及病理观察

Figure 1 Clinical signs and pathological observation in pigs infected by variant PRV

注: A: 流产胎儿; B: 木乃伊胎; C: 神经症状的仔猪大脑; D: 肾脏表面出血点; E/F: 肝脏和脾脏表面局灶性坏死。

Note: A: Stillborn foetus; B: Mummified fetus; C: Cerebral hemorrhage; D: Hemorrhagic spots on renal surface; E/F: Small white focal areas of necrosis on liver and spleen.

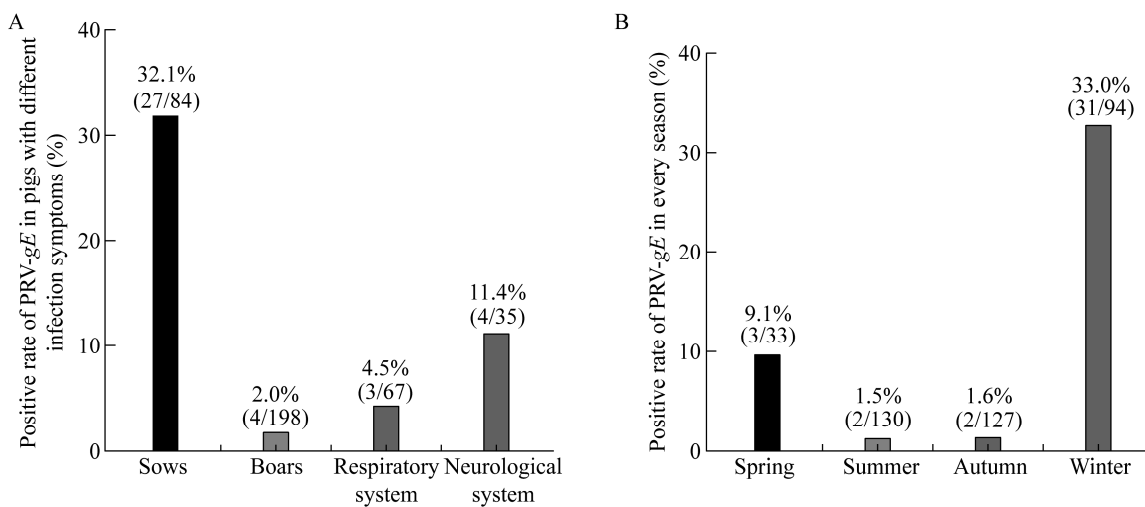


图 2 不同感染症状猪只(A)及不同季节(B)的 PRV 阳性率

Figure 2 PRV positive rates in pigs with different infection symptoms (A) and different seasons (B)

表 3 PRV 与特定系统感染的相关性

Table 3 The correlation of PRV with the specific system infection

Variables		PRV (n=384)		P value	OR	95% CI
		Positive (n=38)	Negative (n=346)			
Reproductive system of sows	RSS	27	57	0.000	12.445	5.841-26.516
	NRSS	11	289			
Reproductive system of boars	RSB	4	194	0.000	0.092	0.032-0.265
	NRSB	34	152			
Respiratory system	RS	3	64	0.103	0.378	0.113-1.266
	NRS	35	282			
Neurological system	RES	4	31	0.750	1.195	0.398-3.590
	NRES	34	315			

注: OR: 比值比; CI: 置信区间; RSS: 母猪生殖系统; RSB: 公猪生殖系统; RS: 呼吸系统; NES: 神经系统.

Note: OR: Odds ratio; CI: Confidence interval; RSS: Reproductive system of sows; RSB: Reproductive system of boars; RS: Respiratory system; NES: Neurological system.

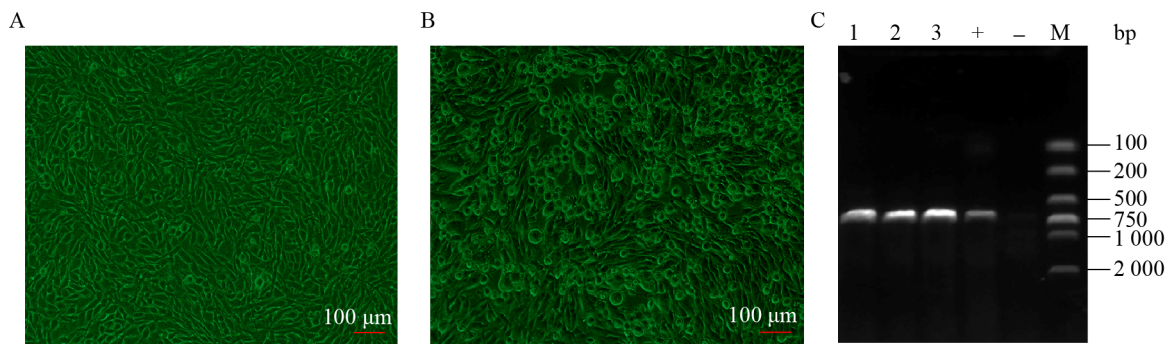


图 3 BHK-21 细胞中 PRV 的分离

Figure 3 Isolation of PRV in BHK-21 cells

注: A: BHK-21 细胞对照组; B: PRV 接种 BHK-21 细胞 24 h 后的 CPE; C: PRV-gE 的 PCR 鉴定; M: DL2000 DNA Marker; 1、2、3: 分离的毒株; +: 阳性对照; -: 阴性对照.

Note: A: No CPE appeared in control BHK-21 cells; B: Obvious CPE appeared in BHK-21 cells 24 h post inoculation; C: PCR identification of PRV-gE gene; M: DL2000 DNA Marker; 1, 2, 3: Isolated viruses; +: Positive control; -: Negative control.

DNA, 利用 PRV-gE 的检测引物 gE1-F/R (表 1) 进行 PCR 扩增, 结果显示阳性样品均可扩增到长度约为 534 bp (图 3C) 的条带。随后使用 gE 的全基因引物 gE2-F/R 和 gE3-F/R (表 1) 进行 PCR 扩增并测序, 将序列上传至 NCBI 数据库进行核苷酸 BLAST, 结果显示与 PRV 基因组相似性为 100%, 证实分离的病毒是 PRV。2018-2019 年共分离到 3 株 PRV 毒株, 分别命名为 PRV-SN、PRV-CD、PRV-DJY。

3.3 序列分析

测序结果表明 gC、gE、TK 基因的 CDS 全长分别为 1 464、1 740 和 963 bp, 将分离的病毒核苷

酸序列分别上传至 GenBank 并获得相应的登录号 (表 2)。gC 基因核苷酸序列分析发现 PRV-SN、PRV-DJY、PRV-CD 和国内分离株亲缘性很近, 并无额外的缺失或突变位点 (图 4)。gE 基因核苷酸序列分析显示 PRV-SN 株全长为 1 737 bp, 其在第 489 位点存在一个氨基酸 (amino acid, aa) 的缺失 (Y→-)。PRV-XJ 是本实验室 2016 年在四川地区分离到的一株变异毒株, 除特定位点的突变外, PRV-XJ 在第 252 (D→H)、282 (E→K)、496 (D→V) 位点均存在 aa 的替换。此外, PRV-XJ 与 ZJ01 和 HeN1 毒株在 572-576 aa 处都存在一个连续的缺失 (图 5)。从 TK 基因的序列比对结果可以看出, 中国

毒株与国外毒株相比出现了一些点突变, 如 215 (T→V)、284 (A→V) (图 6)。总体上, *TK* 基因相对于 *gC* 和 *gE* 基因更加保守。

gC、*gE*、*TK* 等基因的遗传进化分析显示, 四川地区的 PRV 毒株处于同一分支上(图 7), 与国外分离株有明显区别。研究表明, *gC* 基因序列分析可以将 PRV 毒株分为两个基因型, 中国毒株属于

基因 II 型, 而国外毒株 Bartha、Becker、NIA3、Kaplan、Kolchis 等属于基因 I 型^[10]。本研究中四川的 4 个毒株均属于基因 II 型(图 7A)。与此同时, *gE* 基因(图 7B)和 *TK* 基因(图 7C)的遗传进化分析结果类似。然而基于 *TK* 基因建立的进化树, Bartha、Becker、Kaplan 与中国毒株属于同一分支, NIA3 与 Kolchis 属于单独的分支。

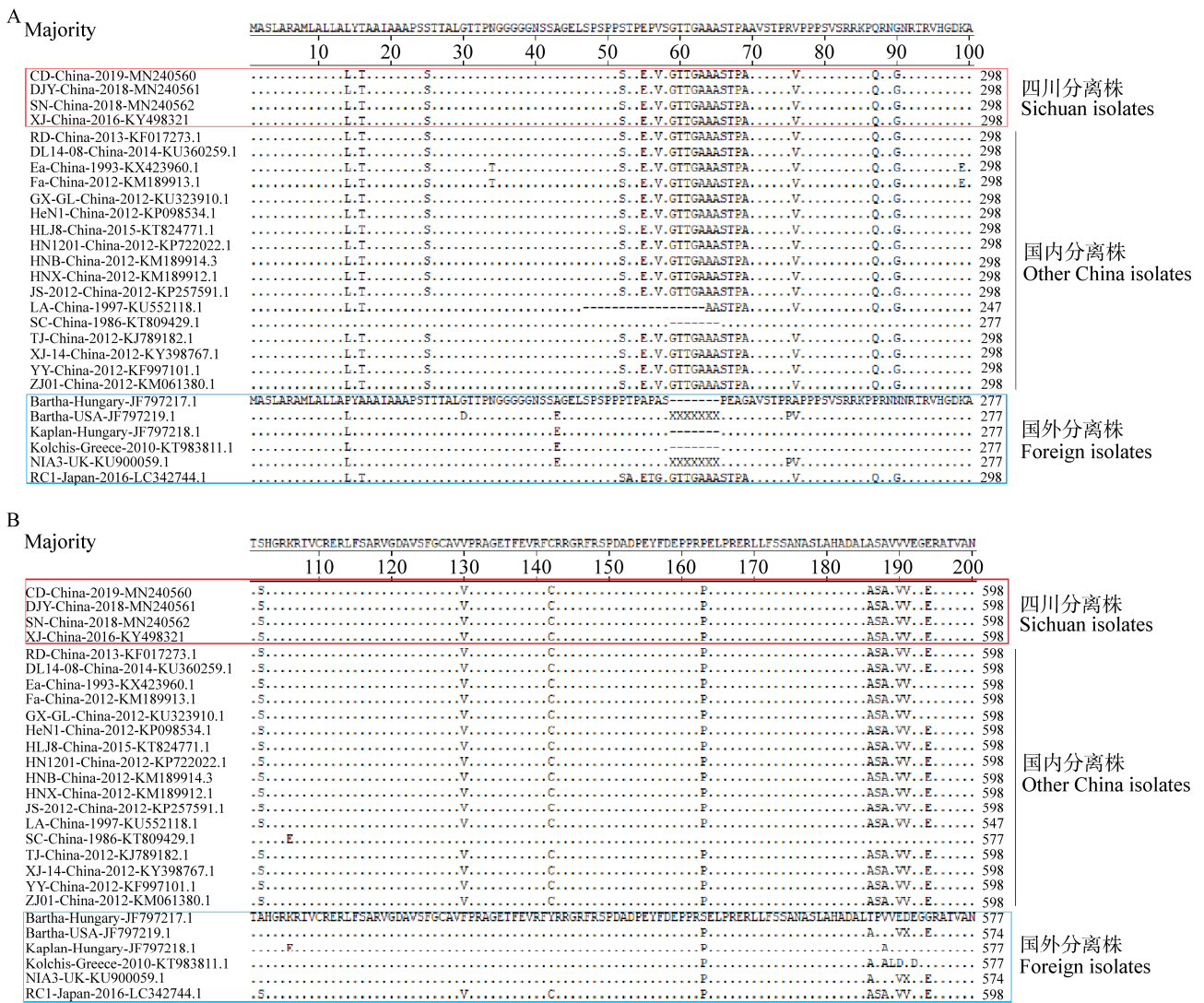


图 4 四川毒株与 GenBank 数据库中其他 PRV 毒株 *gC* 氨基酸序列的比对

Figure 4 Comparison of PRV *gC* amino acid sequence with other PRV strains available in the GenBank database

注: L: 亮氨酸; T: 苏氨酸; S: 丝氨酸; R: 精氨酸; H: 组氨酸; A: 丙氨酸; V: 缬氨酸; Q: 谷氨酰胺; G: 甘氨酸; C: 半胱氨酸; E: 谷氨酸; P: 脯氨酸; I: 异亮氨酸; M: 甲硫氨酸; D: 天冬氨酸。

Note: L: Leucine; T: Threonine; S: Serine; R: Arginine; H: Histidine; A: Alanine; V: Valine; Q: Glutamine; G: Glycine; C: Cysteine; E: Glutamic acid; P: Proline; I: Isoleucine; M: Methionine; D: Aspartic acid.

Majority

	TSLPETHEDVYDGGDDDDDEEAGVIRRRFPASPGGDSGVEGYASLDPEDEFFSDEDDGLVYRPEEA PRSGFDVWFRDFPKPEVTNGPMYGVGTANRLIMSRPA-----											
	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580		
CD-China-2019-MN240563	D	VI	A	A	P					N	MS	四川分离株 Sichuan isolates
DJY-China-2018-MN240564	D	VI	A	A	P					N	MS	
SN-China-2018-MN240565	D	VI	A	A	P					N	MS	
XJ-China-2016-KY498323	VD	VI	A	A	P				GFP	SG		
BJ-RD-China-2013-KF017275.1	D	VI	A	A	P					N	MS	国内分离株 Other China isolates
DL1408-China-2014-KU360259.1	D	VI	A	A	P					N	MS	
Fa-China-2012-KM189913.1	VI	A	S	A	P					N	MS	
FJN5-14-China-2012-KY398773.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
GX-GL-China-2013-KT936471.1	D	VI	A	S	A	P	G			N	MS	
HeN1-China-2012-KP098534.1	D	VI	A	S	A	P				N	LNARPA	
HLJ8-China-2015-KT824771.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
HN1201-China-2012-KP722022.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
HNB-China-2012-KM189914.3	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
HNX-China-2012-KM189912.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
JL1-China-2017-MG733280.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
JS-2012-China-2012-KP257591.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
LA-China-1997-KU552118.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
LN10-13-China-2013-KY398785.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
SC-China-1986-KT809429.1	VI	A	S	A	P					N	MS	
SDHZ01-China-2018-MH521042.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
TJ-China-2012-KJ789182.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
XiangA-China-2012-KJ463839.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
XJ-14-China-2014-KY398801.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
YY-China-2014-KF130885.1	D	VI	A	S	A	P				N	MS	
ZJ01-China-2012-KM061380.1	D	VI	A	S	A	P				N	LLVPPR	
Bartha-USA-JF797219.1	TSLPETHEDVYDGGDDDDDEEAGVIRRRFPASPGGDSGVEGYASLDPEDEFFSDEDDGLVYRPEEA PRSGFDVWFRDFPKPEVTNGPMYGVGTASRLINARPA-----										国外分离株 Foreign isolates	
Kaplan-Hungary-JF797218.1	VI	A	S	A	P					N		MS
Kolchis-Greece-2010-KT983811.1	SV									N		
NIA3-UK-KU900059.1	VI	A	S	A	P					N		MS
RC1-Japan-2016-LC342744.1	VI	A	S	A	P					N		MS

图 5 四川毒株与 GenBank 数据库中其他 PRV 毒株 gE 氨基酸序列的比对

Figure 5 Comparison of PRV gE amino acid sequence with other PRV strains available in the GenBank database

注: L: 亮氨酸; T: 苏氨酸; S: 丝氨酸; R: 精氨酸; H: 组氨酸; A: 丙氨酸; V: 缬氨酸; Q: 谷氨酰胺; N: 天冬酰胺; P: 脯氨酸; I: 异亮氨酸; M: 甲硫氨酸; D: 天冬氨酸.

Note: L: Leucine; T: Threonine; S: Serine; R: Arginine; H: Histidine; A: Alanine; V: Valine; Q: Glutamine; N: Asparagine; P: Proline; I: Isoleucine; M: Methionine; D: Aspartic acid.

Majority

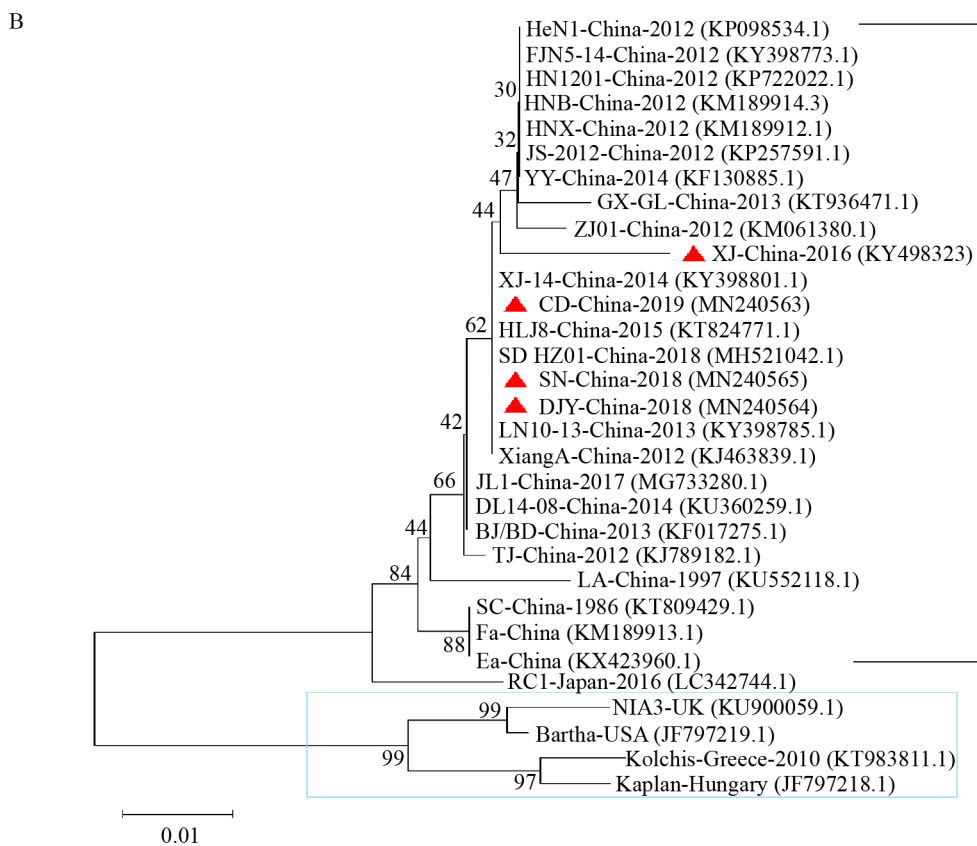
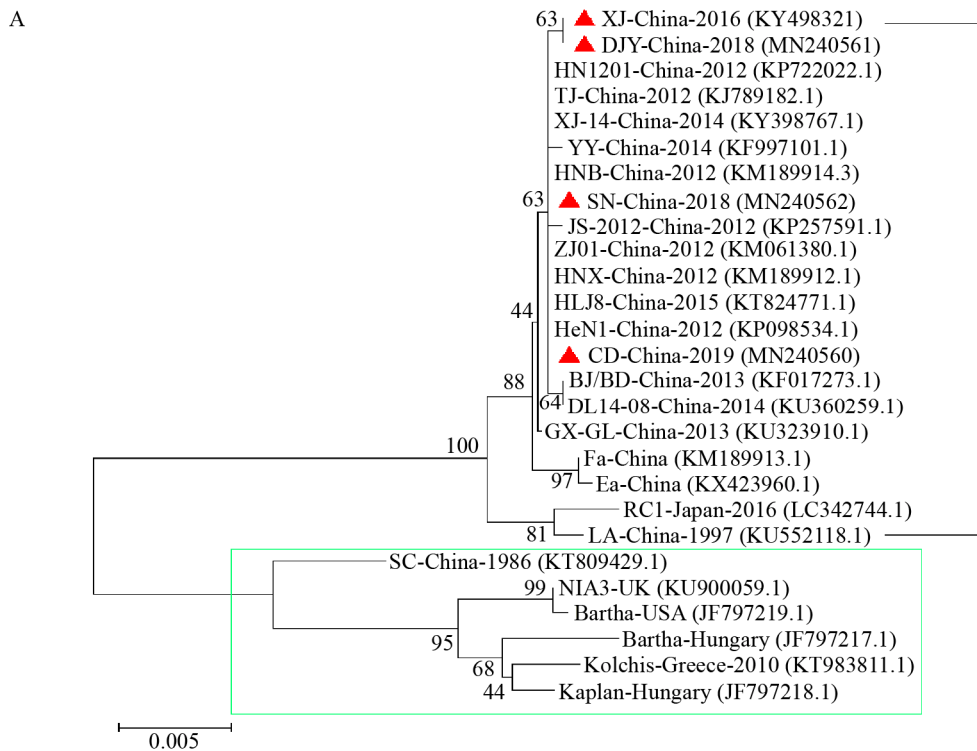
	WRDDWGRAPRFDTVRDCLALNELCRPRDDPELQDTLFGAYKAPELCDRRGRPLEVHAWAMDALVAKLLPLRVSTVDLGPSPRCAAAVAQAQARGMEVTE												
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300			
CD-China-2019-MN240566	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898	四川分离株 Sichuan isolates	
DJY-China-2018-MN255324	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
SN-China-2018-MN262476	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
XJ-China-2016-MN255325	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
DL1408-China-2014-KU360259.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898	国内分离株 Other China isolates	
Ea-China-1993-KX423960.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
Fa-China-2012-KM189913.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
FJN5-14-China-2012-KY398807.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
HeN1-China-2012-KP098534.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
HLJ8-China-2015-KT824771.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
HN1201-China-2012-KP722022.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
HNB-China-2012-KM189914.3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
HNX-China-2012-KM189912.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
JL1-China-2017-MG733282.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
JS-2012-China-2012-KP257591.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
LA-China-1997-KU552118.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
LN10-13-China-2013-KY398814.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
SC-China-1986-KT809429.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
TJ-China-2012-KJ789182.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
XiangA-China-2012-KF711991.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
XJ-14-China-2012-KY398830.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
YY-China-2014-KP259815.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
ZJ01-China-2012-KM061380.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
Bartha-Hungary-JF797217.1	WRDDWGRAPRFDTVRDCLALNELCRPRDDPELQDTLFGAYKAPELCDRRGRPLEVHAWAMDALVAKLLPLRVSTVDLGPSPRCAAAVAQAQARGMEVTE										898		国外分离株 Foreign isolates
Bartha-USA-JF797219.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
Kaplan-Hungary-JF797218.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		
Kolchis-Greece-2010-KT983811.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	T	898		
NIA3-UK-KU900059.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	T	898		
RC1-Japan-2016-LC342744.1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	898		

图 6 四川毒株与 GenBank 数据库中其他 PRV 毒株 TK 氨基酸序列的比对

Figure 6 Comparison of PRV TK amino acid sequence with other PRV strains available in the GenBank database

注: A: 丙氨酸; T: 苏氨酸; V: 缬氨酸.

Note: A: Alanine; T: Threonine; V: Valine.



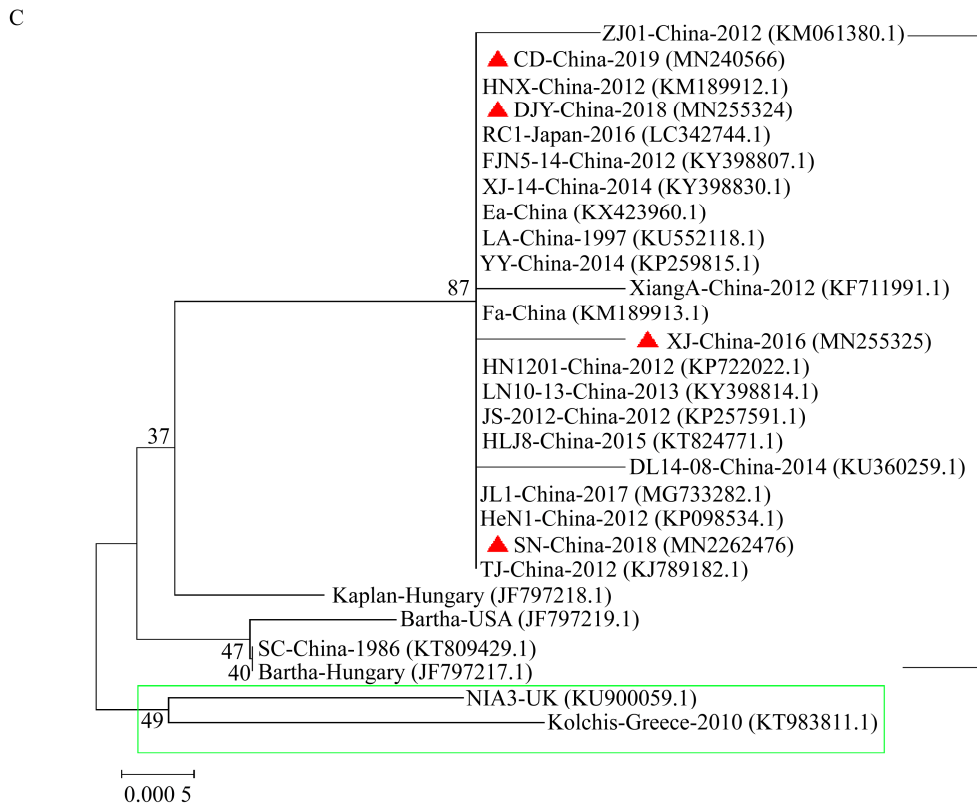


图 7 基于 *gC* (A)、*gE* (B)和 *TK* (C)的 PRV 分离株遗传进化分析

Figure 7 Phylogenetic analysis of PRV isolates based on *gC* (A), *gE* (B) and *TK* (C)

注：图中对分离的毒株进行了标记，且对其进行分区。

Note: The isolated strains are labeled and artificially partitioned.

4 讨论与结论

PRV 是危害养猪生产的重要病原，传统认为 Bartha-K61 对该病的防控是必不可少的^[25]。2011 年以来，病毒的遗传进化和变异降低了疫苗的保护效率^[26-28]。然而，Zhou 等^[22]将 Bartha-K61 免疫育肥阶段的猪后，利用分离的 PRV-XJ5 变异毒株进行攻毒试验，发现 Bartha-K61 可以刺激育肥猪只产生足够的免疫保护，从而抵抗变异毒株的感染。2018 年 Sun 等调查了 2012–2017 年期间中国 27 个省份的 PRV 分布，发现全国 PRV 的阳性率平均为 8.27%^[10]，而在我们的研究中，四川省 PRV 的阳性率略高于他们。本研究针对 PRV 的 *gE* 基因设计引物，对成都、绵阳、德阳、广元、南充、巴中、遂宁、雅安、乐山、宜宾、眉山、内江等

12 个地区 86 个大型养殖场的 384 份组织样本进行了检测，阳性率约为 9.9% (38/384)。在所有地区中，成都地区阳性样本最多，阳性率为 12.3% (15/122)，其中 PRV-XJ、PRV-DJY、PRV-CD 均在成都分离。我们发现 PRV 在春季、冬季更容易暴发，其中冬春季节检出的阳性大都是因母猪产木乃伊胎、死胎以及新生仔猪脑膜炎引起的。在检测的所有流产性案例中，有 32.1% (27/84)都是由 PRV 感染引起的，仅有一例是 PRV 和 PRRSV 混合感染。统计学分析显示种猪生殖障碍与 PRV 感染之间存在着相关性($P < 0.01$)，因此养殖场应该定期监测妊娠母猪和种公猪体内 *gB*、*gE* 抗体水平，适当地加强免疫并及时淘汰阳性猪只进而净化猪群。表现为神经症状的猪只随着生长日龄的增加，PRV

阳性的概率逐渐降低, 在我们检测的 35 份病料中仅有 4 例是 PRV 阳性, 且都是 1 周龄以内的仔猪, 而其余的保育猪、育肥猪大都是由链球菌、金黄色葡萄球菌单一或混合感染引起的, 因此养殖场应该加强猪群环境的消毒。由于 2019 年非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)传入中国, 可采集的猪只组织样本量较少, 并且 PRV 的检出率较低, 本实验室 2019 年仅仅分离到 PRV-CD 这一株 PRV 毒株。

基于 *gC*、*gE*、*TK* 等基因的遗传进化分析发现, 四川株与近几年国内的分离株相似, 但与国外毒株亲缘性较远。*gC* 蛋白是 PRV 的重要中和抗原, 在病毒进入细胞的过程中起重要作用^[29]。与其他国内毒株一样, 四川株 *gC* 蛋白在 63–69 aa 位点存在一个 VSGTTGA 的插入^[10]。这个区域正是 *gC* 的 B 细胞抗原线性表位, 2019 年 Zhang 等^[30]鉴定了 134–138 aa、143–153 aa 也都是 *gC* 重要的 B 细胞抗原表位。*gE* 是 PRV 的主要毒力基因, 但对病毒复制不是必需的, *gE* 蛋白的抗原表位区位于 52–238 aa^[23]。与国外毒株相比, 中国株在该区域有 13 个氨基酸突变, 而 PRV-SN 株在第 489 位点处还存在一个额外的 aa 缺失。ZJ01 毒株具有高致病性, 可引起 14 日龄仔猪和 80 日龄猪只多脏器病变, 死亡率为 100%^[7]。考虑到 PRV-XJ 和 PRV-ZJ01 的相似性, 我们正在尝试构建基于 PRV-XJ 的候选疫苗^[31]。*TK* 蛋白是一种酶, 参与病毒在中枢神经系统中的复制和传播^[32]。序列分析发现 *TK* 蛋白的氨基酸突变较少, 说明 *TK* 基因在一定程度上比较保守。综上, 四川流行的 PRV 仍属于变异毒株, 因此筛选具有代表性的变异毒株并在此基础上研发新的基因缺失疫苗十分必要。

REFERENCES

- [1] Zhou MM, Wu XJ, Jiang DD, et al. Characterization of a moderately pathogenic pseudorabies virus variant isolated in China, 2014[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 68: 161-171
- [2] Nauwynck H, Glorieux S, Favoreel H, et al. Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract[J]. *Veterinary Research*, 2007, 38(2): 229-241
- [3] Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(3): 462-500
- [4] Wang JC, Song ZC, Ge AM, et al. Safety and immunogenicity of an attenuated Chinese pseudorabies variant by dual deletion of *TK&gE* genes[J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14: 287
- [5] Zhang CL, Guo LH, Jia XR, 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
- [6] Cong X, Lei JL, Xia SL, et al. Pathogenicity and immunogenicity of a *gE/gI/TK* gene-deleted pseudorabies virus variant in susceptible animals[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 182: 170-177
- [7] Dong J, Bai J, Sun T, et al. Comparative pathogenicity and immunogenicity of triple and double gene-deletion pseudorabies virus vaccine candidates[J]. *Research in Veterinary Science*, 2017, 115: 17-23
- [8] Hu RM, Zhou Q, Song WB, et al. Novel pseudorabies virus variant with defects in *TK*, *gE* and *gI* protects growing pigs against lethal challenge[J]. *Vaccine*, 2015, 33(43): 5733-5740
- [9] Sozzi E, Moreno A, Lelli D, et al. Genomic characterization of pseudorabies virus strains isolated in Italy[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2014, 61(4): 334-340
- [10] Sun Y, Liang W, Liu QY, et al. Epidemiological and genetic characteristics of swine pseudorabies virus in mainland China between 2012 and 2017[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5785
- [11] Ober BT, Teufel B, Wiesmuller KH, et al. The porcine humoral immune response against pseudorabies virus specifically targets attachment sites on glycoprotein *gC*[J]. *Journal of Virology*, 2000, 74(4): 1752-1760
- [12] Ye C, Zhang QZ, Tian ZJ, 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
- [13] Cheng ZL, Kong ZJ, Liu P, et al. Natural infection of a variant pseudorabies virus leads to bovine death in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019. DOI: 10.1111/tbed.13427
- [14] Wang GS, Du YJ, Wu JQ, et al. Vaccine resistant pseudorabies virus causes mink infection in China[J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 20
- [15] Laval K, Vernejoul JB, van Cleemput J, et al. Virulent pseudorabies virus infection induces a specific and lethal systemic inflammatory response in mice[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(24): e01614-18
- [16] Wang YW, Nian H, Li ZW, et al. Human encephalitis

- complicated with bilateral acute retinal necrosis associated with pseudorabies virus infection: a case report[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2019, 89: 51-54
- [17] Yang HN, Han H, Wang H, et al. A case of human viral encephalitis caused by pseudorabies virus infection in China[J]. *Frontiers in Neurology*, 2019, 10: 534
- [18] Klupp BG, Lomniczi B, Visser N, et al. Mutations affecting the UL21 gene contribute to avirulence of pseudorabies virus vaccine strain Bartha[J]. *Virology*, 1995, 212(2): 466-473
- [19] Müller T, Hahn EC, Tottewitz F, et al. Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective[J]. *Archives of Virology*, 2011, 156(10): 1691-1705
- [20] Tong W, Liu F, Zheng H, et al. Emergence of a pseudorabies virus variant with increased virulence to piglets[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 181(3/4): 236-240
- [21] Gu J, Hu D, Peng T, et al. Epidemiological investigation of pseudorabies in Shandong province from 2013 to 2016[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(3): 890-898
- [22] Zhou JZ, Li S, Wang XB, et al. Bartha-K61 vaccine protects growing pigs against challenge with an emerging variant pseudorabies virus[J]. *Vaccine*, 2017, 35(8): 1161-1166
- [23] Wang YB, Qiao SL, Li XW, et al. Molecular epidemiology of outbreak-associated pseudorabies virus (PRV) strains in central China[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(3): 401-409
- [24] Yu ZQ, Tong W, Zheng H, et al. Variations in glycoprotein B contribute to immunogenic difference between PRV variant JS-2012 and Bartha-K61[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 208: 97-105
- [25] An TQ, Peng JM, Tian ZJ, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(11): 1749-1755
- [26] Luo YZ, Li N, Cong X, et al. Pathogenicity and genomic characterization of a pseudorabies virus variant isolated from Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(1/2): 107-115
- [27] Wu R, Bai CY, Sun JZ, et al. Emergence of virulent pseudorabies virus infection in northern China[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2013, 14(3): 363-365
- [28] Yu XL, Zhou Z, Hu DM, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(1): 102-104
- [29] Karger A, Schmidt J, Mettenleiter TC. Infectivity of a pseudorabies virus mutant lacking attachment glycoproteins C and D[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(9): 7341-7348
- [30] Zhang PP, Lv L, Sun HF, et al. Identification of linear B cell epitope on gB, gC, and gE proteins of porcine pseudorabies virus using monoclonal antibodies[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 234: 83-91
- [31] Mao XY, Zhou XK, Yin XH, et al. Construction of recombinant pseudorabies virus strain expressing PEDV S and PoRV VP7 protein[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(12): 3345-3354 (in Chinese)
毛汐语, 周雪珂, 殷鑫欢, 等. 表达 PEDV S 和 PoRV VP7 蛋白的重组伪狂犬毒株构建[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3345-3354
- [32] Ferrari M, Gualandi GL, Corradi A, et al. Experimental infection of pigs with a thymidine kinase negative strain of pseudorabies virus[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 1998, 21(4): 291-303