

猪伪狂犬病病毒流行株 HLJ-01 的分离鉴定及致病性分析

陈铭泽¹, 王彩虹¹, 张松松¹, 耿旭¹, 吴畏¹, 姜艳平¹, 丁国杰^{*2}, 乔薪媛^{*1}

1 东北农业大学动物医学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

2 哈尔滨威科赛斯生物科技有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150030

陈铭泽, 王彩虹, 张松松, 耿旭, 吴畏, 姜艳平, 丁国杰, 乔薪媛. 猪伪狂犬病病毒流行株 HLJ-01 的分离鉴定及致病性分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5022-5033

Chen Mingze, Wang Caihong, Zhang Songsong, Geng Xu, Wu Wei, Jiang Yanping, Ding Guojie, Qiao Xinyuan. Isolation and pathogenicity of a pseudorabies virus variant HLJ-01[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5022-5033

摘要: 【背景】自 2011 年以来, 猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)发生变异, 经典的疫苗株已不能完全抵抗 PRV 变异株的感染, 国内多个猪场出现伪狂犬病的暴发, PRV 变异毒株开始在我国大规模流行。【目的】通过分离 PRV 流行变异毒株, 并对其进行遗传进化和致病性分析, 为 PRV 流行病学调查及疫苗研制提供实验数据。【方法】采集黑龙江某猪场感染 PRV 的脑组织病料, 根据 GenBank PRV *gE* 和 *gB* 保守序列设计引物, 进行 PCR 鉴定。通过对 *gE* 和 *gC* 基因进行序列测定和遗传进化分析。利用 BHK-21 细胞分离病毒, 采用噬斑纯化方法对病毒进行纯化。通过电镜、间接免疫荧光对病毒进行鉴定, 测定病毒生长曲线并进行致病性研究。【结果】经 PCR 和测序鉴定分离株为 PRV 流行株, 将其命名为 HLJ-01。遗传进化分析结果显示, 该分离毒株与我国近几年分离的流行变异株位于同一分支; 氨基酸序列分析结果显示, *gE* 和 *gC* 存在国内流行变异株的特征序列, 表明该分离毒株为流行变异株。生长曲线显示, 分离株 HLJ-01 在感染 48 h 时滴度最高($10^{8.5}$ TCID₅₀/mL)。电镜观察结果显示, 病毒颗粒直径约 150 nm, 呈球形, 有囊膜, 囊膜外有放射状纤突, 呈现典型 PRV 病毒特征。动物感染实验结果显示, $10^{7.0}$ TCID₅₀ 剂量感染组死亡率为 100%; $10^{6.0}$ TCID₅₀ 剂量感染组死亡率为 80%; $10^{5.0}$ TCID₅₀ 剂量感染组死亡率为 60%。仔猪在接种病毒后均出现 PRV 感染的典型症状和病理变化, 证实分离毒株对仔猪有较强致病力。【结论】分离获得一株猪伪狂犬病毒, 经鉴定该分离株为流行变异株, 而且具有较强的致病力, 这为 PRV 流行病学分析及疫苗候选株的筛选奠定了基础。

基金项目: 黑龙江省重点研发计划(GA21B004)

Supported by: Key Research and Development Program of Heilongjiang Province (GA21B004)

*Corresponding authors: E-mail: DING Guojie: dingguojie1974@126.com; QIAO Xinyuan: qiaoxinyuan@126.com

Received: 2022-07-19; Accepted: 2022-09-07; Published online: 2022-10-24

关键词: 猪伪狂犬病毒; 流行变异株; 分离鉴定; 致病性

Isolation and pathogenicity of a pseudorabies virus variant HLJ-01

CHEN Mingze¹, WANG Caihong¹, ZHANG Songsong¹, GENG Xu¹, WU Wei¹,
JIANG Yanping¹, DING Guojie^{*2}, QIAO Xinyuan^{*1}

1 College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

2 Harbin Weikesaisi Biological Technology, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] Pseudorabies virus (PRV) has been mutating since 2011 and the classical vaccine strain can no longer completely resist the infections of PRV variants. There have been outbreaks of pseudorabies in many domestic pig farms and the PRV variants have become prevalent in China. [Objective] To isolate a PRV variant, analyze its genetic evolution and pathogenicity, and provide experimental data for the epidemiological investigation and vaccine development of PRV. [Methods] The brain tissue samples infected with PRV were collected from a pig farm in Heilongjiang province. The primers were designed according to *gE* and *gB* conserved sequences of PRV in GenBank for PCR identification. The *gE* and *gC* genes were sequenced for phylogenetic analysis. The virus was isolated from BHK-21 cells by plaque purification method and further identified by electron microscopy and indirect immunofluorescence. The growth curve was established and the pathogenicity was studied. [Results] The isolate was identified as a PRV epidemic strain by PCR and sequencing and named HLJ-01. The phylogenetic tree showed that the isolate was in the same clade with the epidemic variants isolated in recent years in China. The results of amino acid sequence analysis showed that *gE* and *gC* of the isolate had the characteristic sequences of domestic epidemic variants, indicating that the isolate was an epidemic variant. The growth curve showed that the titer of HLJ-01 was the highest ($10^{8.5}$ TCID₅₀/mL) 48 h after infection. The virus particle of HLJ-01 had the diameter of about 150 nm, and it was a sphere with envelope and radial spikes outside, presenting typical characteristics of PRV. The animal infection experiments showed that the mortality rates of $10^{7.0}$, $10^{6.0}$, and $10^{5.0}$ TCID₅₀ infection groups were 100%, 80%, and 60%, respectively. After inoculation of HLJ-01, all the piglets showed typical symptoms and pathological changes of PRV infection, which confirmed that HLJ-01 had strong pathogenicity to piglets. [Conclusion] An epidemic variant of PRV with strong pathogenicity was isolated and identified, which laid a foundation for the epidemiological analysis of PRV and the screening of candidate vaccine strains.

Keywords: porcine pseudorabies virus; variant; isolation and characterization; pathogenicity

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是一种能够感染多种动物的高度传染性疾病,能引起动物发热、瘙痒和神经症状,是一种在中国和许多发展中国家广泛流行的猪病毒性疾病;猪是该病的自然宿主,各品种均可感染;不同日龄猪的

感染症状不同,新生仔猪主要感染中枢神经系统,感染后出现共济失调、转圈等神经症状,对仔猪具有较高的致死率,成年猪主要表现为呼吸系统和消化系统症状^[1-3]。妊娠母猪感染后临床主要表现为流产、死胎和木乃伊胎^[2]。该病

的突出特征为病毒在被感染猪的外周和中枢神经系统潜伏,损伤神经,当外界环境发生变化时,潜伏的病毒被激活,再次引起伪狂犬病的发生。

自 2011 年来,国内多个猪场出现伪狂犬病毒的暴发并迅速蔓延,感染猪的发病率和死亡率明显上升,随后国内多名学者相继分离出 ZJ01、HeN1、JS、TJ 和 HN1201 等 PRV 变异毒株,据报道这些分离毒株对小鼠和仔猪具有更强的致病能力。Yang 等^[4]比较了 PRV 变异毒株 HN1201 和经典毒株 Fa,发现 HN1201 可导致广泛的组织损伤和仔猪 100%死亡,但 Fa 株仅引起较弱的呼吸道症状。PRV 在系统发育树上分为 2 种基因型:基因型 I 包含来自欧洲和美洲的分离株(Kapla、Becker),而基因型 II 包含主要来自中国和其他亚洲国家的分离株;国内经典毒株(Ea、Fa 和 SC)和新的变异毒株(HNX、ZJ01、HeN1、JS、TJ 和 HN1201)都属于基因型 II^[5-6]。很多研究发现,国内分离到的 PRV 流行变异株存在毒力增强、抗原变异。因此,从发病猪场分离和鉴定 PRV 流行毒株,进行相应疫苗的研发,是控制猪伪狂犬病流行的重要手段。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2020 年,从黑龙江暴发疑似伪狂犬病某猪场送检的 4 头病死仔猪分别采取脑组织,进行 PRV 感染鉴定和病毒分离。

1.2 细胞及实验动物

BHK-21 细胞由本实验室保存;56 日龄仔猪购于黑龙江某 PRV 阴性猪场,动物实验遵守相关实验动物福利规定,并获得东北农业大学动物实验伦理委员会批准(协议代码:NEAU2018024)。

1.3 主要试剂

TaKaRa *LA Taq* 酶及 PCR 反应液均购自宝

生物工程(大连)有限公司;FastPure[®] Viral DNA/RNA Mini Kit 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司;DMEM 培养基购自上海源培生物公司;PRV 特异性阳性血清为本实验室自制并鉴定;PRV gE 单克隆抗体由实验室自制;FITC 标记羊抗鼠二抗、小鼠 IgG、DAPI 细胞核染色剂购自上海碧云天生物技术公司。

1.4 方法

1.4.1 病料处理

取发病猪脑组织剪碎,加入适量 DMEM 培养液,研磨成组织悬液。反复冻融 3 次,5 000 r/min 离心 5 min,取上清用 0.22 μm 滤器过滤,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.2 引物设计

参照 GenBank 中 PRV 基因组序列(登录号为 KJ789182),分别设计针对 *gB* 基因和 *gE* 基因内部序列的两对引物。同时,根据基因编码序列外两侧碱基,分别设计扩增 *gC* 和 *gE* 全长基因的引物。引物由吉林库美生物科技有限公司合成。引物序列见表 1。

1.4.3 PCR 鉴定

将脑组织病料匀浆,根据 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取病毒核酸,以 *gB* 基因和 *gE* 基因保守序列的特异性引物对 *gB*-F1/R1 和 *gE*-F1/R1 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: TaKaRa *LA Taq* (5 U/ μL) 0.25 μL , 2 \times GC Buffer I 12.5 μL , dNTPs Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1.0 μL , DNA 模板 1.0 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、退火(温度参考表 1) 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4.4 病毒的系统发育分析

以提取的病毒基因组 DNA 为模板,以 *gC*-F1/*gC*-1R 和 *gE*-F2/*gE*-R2 两对引物,PCR

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer references information

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物片段大小 Fragment length (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>gB</i> -F1	GCCTTGTGCTCCTGCTGCT	551	58
<i>gB</i> -R1	ACCCTGAACCTGACGCTGCT		
<i>gE</i> -F1	GCGCCCCCGGCCCATCTGGGTG	605	63
<i>gE</i> -R1	CTCGTACACGTAGTACAGCAGG		
<i>gC</i> -F1	TTCCTGATTACGCCCCACG	1 783	62
<i>gC</i> -R1	CTGTTCCCCGACGACCAAT		
<i>gE</i> -F2	CCACCATCGCAGAAGAACAA	2 069	62
<i>gE</i> -R2	GTCTCGTTGTCGCTCTCGCT		

扩增完整的 *gC* 和 *gE* 基因编码区。将 PCR 产物送测序公司测序, 并用 MEGA 7.0 软件对核酸序列进行比对分析, 分别以 *gC* 和 *gE* 基因序列建立系统发育树。

1.4.5 病毒的分离和纯化

取过滤后的脑组织匀浆上清液 0.5 mL 接种 BHK-21 细胞。37 °C、5% CO₂ 孵育 1 h 后, 弃液, 加入含 2% FBS 的 DMEM 培养液, 继续培养并观察细胞病变。待 70% 细胞发生病变时收获病毒液。经 3 次空斑纯化后, 在 BHK-21 细胞上传代至稳定出现细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 时收获病毒液。

1.4.6 电镜观察

收集 PRV 的细胞培养液, 20 000 r/min 离心 2 h, 将沉淀的病毒用少量 PBS 悬浮, 滴加到铜网, 待干燥后用磷钨酸负染, 进行电镜观察。

1.4.7 间接免疫荧光鉴定

将病毒液进行 10⁻⁵ 稀释, 接种 BHK-21 细胞, 37 °C 培养 24 h 后, 弃去上清液, 用预冷无水乙醇固定细胞, PBS 洗 3 次。接毒孔和对照孔均分别加入 1:200 稀释的 *gE* 单克隆抗体 50 μL 和 1:500 稀释的小鼠 IgG 对照 50 μL。室温孵育 2 h 后, PBS 洗 3 次, 加入 50 μL 1:500 稀释的 FITC 标记羊抗鼠 IgG, 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗 3 次, 用 50 μL DAPI (0.2 μg/mL) 染色 5 min。然后 PBS 洗 3 次, 通过荧光显微镜观察。

1.4.8 分离毒株的一步生长曲线测定

将原液感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.1 的分离毒株接种于 BHK-21 细胞上, 37 °C 孵育 2 h 后, 弃上清, PBS 洗 3 次, 补充含 2% FBS 的培养基继续培养。分别在感染 6、12、18、24、30、36、42、48 和 54 h 后收集细胞培养物。按照 Reed-Muench 法计算不同时间病毒的 TCID₅₀, 并绘出病毒的生长曲线。

1.4.9 对仔猪的致病性分析

将分离毒株用生理盐水稀释至 10^{7.0}、10^{6.0}、10^{5.0} 和 10^{4.0} TCID₅₀ 这 4 个稀释度, 分别经鼻腔接种 56 日龄 PRV 抗原和抗体阴性的健康仔猪各 5 头, 每头 2 mL; 同时设 5 头健康猪接种 PBS 为对照; 分别隔离饲养 14 d。攻毒后每日定时测量体温, 并观察采食、粪便及精神状态等。感染第 14 天后处死并剖检所有猪, 观察各组织脏器的病理变化, 并采集心、肝、脾、肺、肾、脑和淋巴结等组织进行病理组织学检查和病毒载量测定。

2 结果与分析

2.1 PCR 鉴定结果

提取病料 DNA 进行 PCR 检测。结果如图 1 所示, 从脑组织病料中扩增出与阳性对照大小一致的片段 (551 bp 和 605 bp), 经测序鉴定为 PRV 的 *gB* 和 *gE* 基因。由于该猪场使用的疫苗

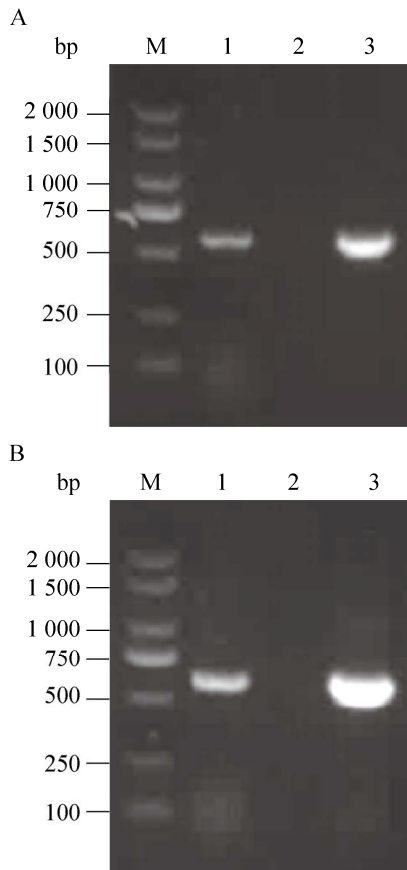


图 1 PCR 鉴定结果 A: *gB* 基因电泳图; M: DNA 分子量标准; 1: PRV *gB* 基因片段; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照。B: *gE* 基因电泳图; M: DNA 分子量标准; 1: PRV *gE* 基因片段; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照

Figure 1 PCR identification results. A: *gB* gene electropherogram; M: DNA molecular weight standard; 1: PRV *gB* gene fragment; 2: Negative control; 3: Positive control. B: *gE* gene electropherogram; M: DNA molecular weight standard; 1: PRV *gE* gene fragment; 2: Negative control; 3: Positive control.

株缺失 *gE* 基因, *gE* 基因 PCR 检测阳性则表明感染的 PRV 为野毒株。

2.2 *gC* 和 *gE* 基因的扩增及其进化分析

以 *gC*-F1/*gC*-R1 和 *gE*-F2/*gE*-R2 两对引物分别扩增了包含完整 *gC* 基因序列的 1 783 bp 片段和包含完整 *gE* 基因序列的 2 069 bp 片段

(图 2)。测序分析显示, HLJ-01 株 *gC* 基因全长为 1 464 bp, *gE* 基因全长为 1 740 bp。将其核苷酸序列与参考毒株序列进行比对, 结果发现 HLJ-01 株和 2016 年前后国内新分离的变异毒株位于遗传进化树的一个相对独立分支中, 而且亲缘关系较近(图 3)。

同源性分析结果显示, HLJ-01 株与参考毒株的 *gC* 基因相似性为 94.3%–100.0%, 与参考毒株的 *gE* 基因的同源性为 97.1%–100.0%。HLJ-01 株与其他已发表的变异株和经典株 *gE* 和 *gC* 氨基酸序列分别进行了比对分析, 结果表明, 其 *gE* 和 *gC* 氨基酸序列与之前报道的多株变异株相似。*gE* 蛋白具有典型流行株的分子特征, 即在第 48 位和第 496 位同时各有 1 个天冬氨酸的插入; *gC* 氨基酸序列 63–69 位插入 7 个氨基酸(AAASTPA), 而且在 180–200 位氨基酸有多个置换突变(图 4)。上述结果表明所分离的 HLJ-01 株属于 PRV 变异株。

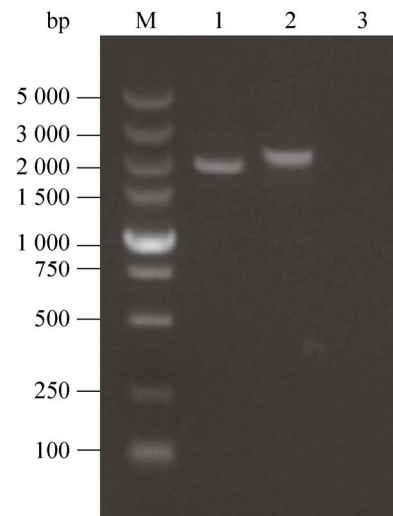


图 2 *gC* 和 *gE* 基因的 PCR 扩增结果 M: DNA 分子量标准; 1: PRV *gC* 基因片段; 2: PRV *gE* 基因片段; 3: 阴性对照

Figure 2 PCR amplification results of *gC* and *gE* genes. M: DNA molecular weight standard; 1: PRV *gC* gene target fragment; 2: PRV *gE* gene target segment; 3: Negative control.

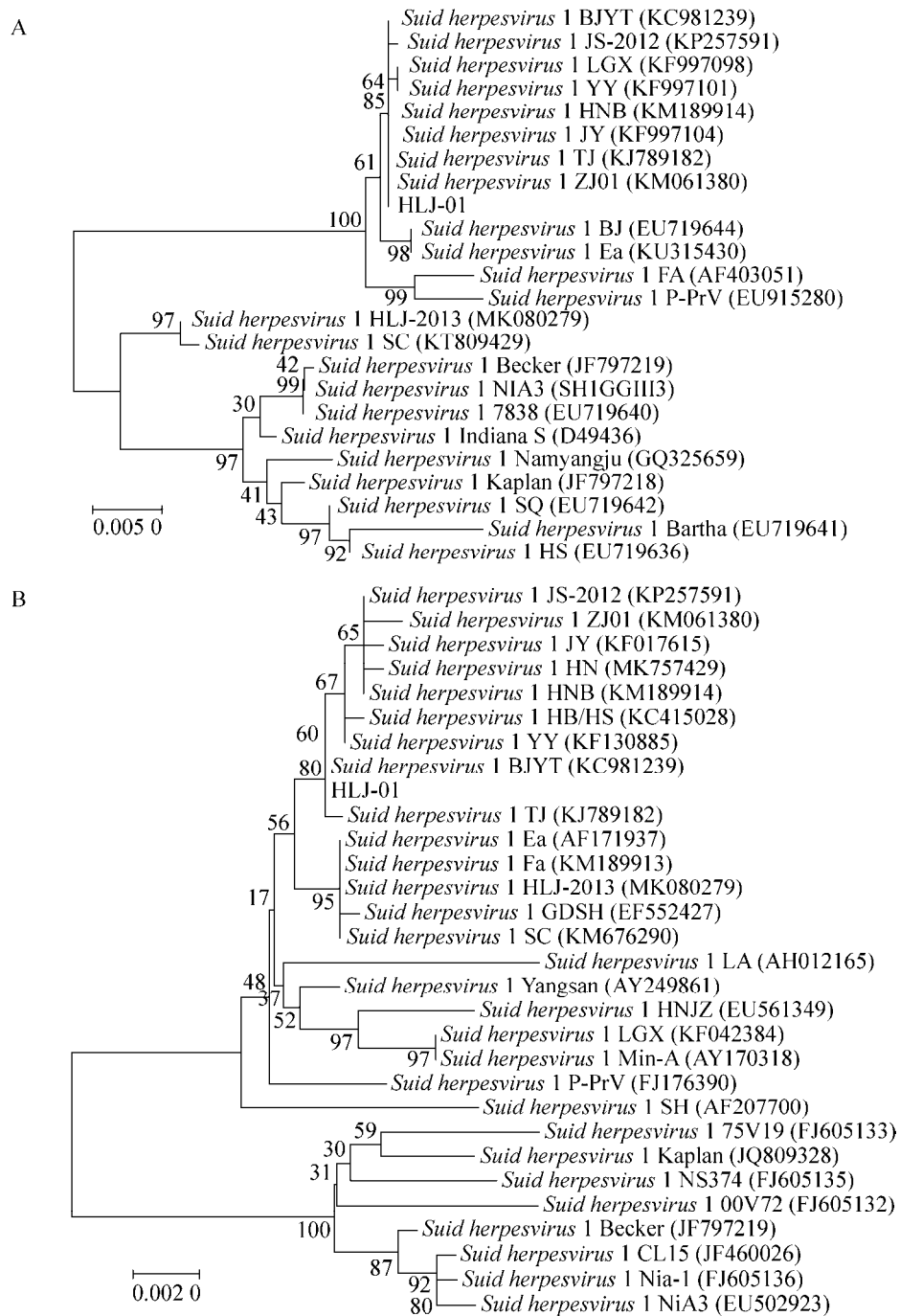


图3 分离株与经典株 *gC* 和 *gE* 基因遗传发育分析 A: 基于 *gC* 基因的遗传发育树; B: 基于 *gE* 基因的遗传发育树。括号中的序号是相关菌株的登录号; 分支点上的数字是 bootstrap 值; 左下角的标尺表示序列的进化差异

Figure 3 Phylogenetic analysis of *gC* and *gE* genes of new isolate strains and classical strains. A: Phylogenetic tree of *gC* gene; B: Phylogenetic tree of *gE* gene. Numbers in parentheses are the accession numbers of related strains; The number on the branch point represented the bootstrap value; The scale in the lower left corner represented evolution difference.

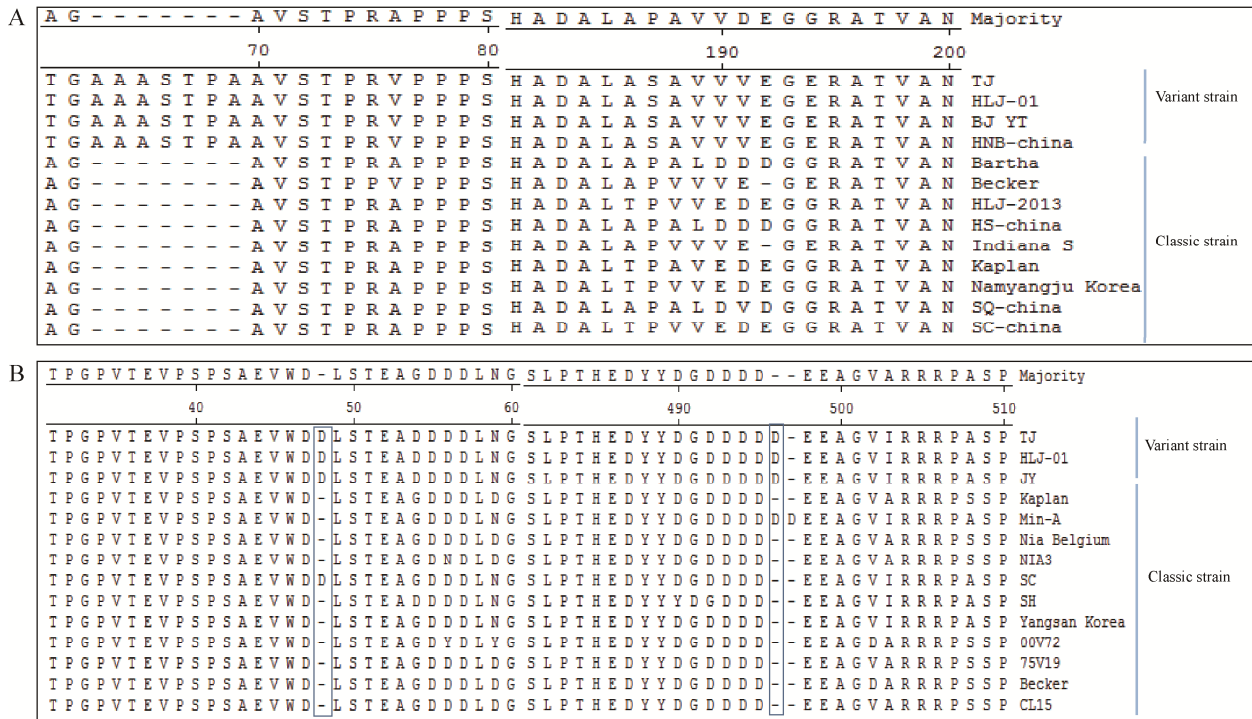


图4 分离株(HLJ-01)与经典株gC(A)和gE(B)基因编码氨基酸序列分析 A: PRV gC基因的氨基酸序列分析; B: PRV gE基因的氨基酸序列分析

Figure 4 Analysis of deduced amino acid sequences of HLJ-01 and reference strains. A: Amino acid sequence analysis based on PRV gC gene; B: Amino acid sequence analysis based on PRV gE gene.

2.3 病毒的分离与纯化

将PRV阳性病料的脑组织研磨液经滤器过滤后接种至BHK-21细胞,60h后观察到典型的细胞病变,即细胞聚集、变圆、脱落并有合

胞体形成(图5)。用0.02%中性红对细胞进行染色后,挑取空斑并对其中的病毒进行PCR扩增gB和gE基因(图6),经测序证明为PRV野生型毒株。

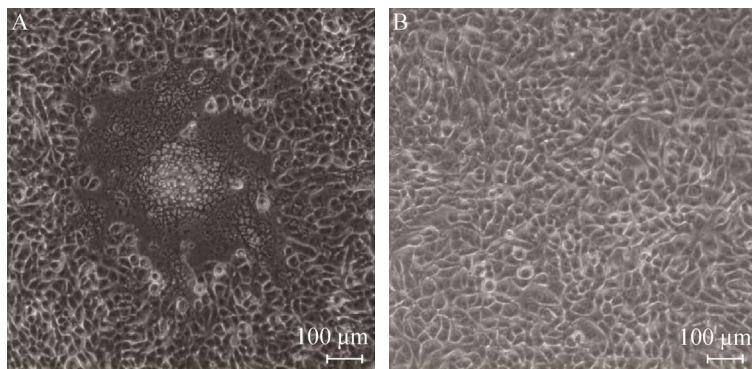


图5 病料脑组织匀浆上清液感染BHK-21细胞引起的细胞病变 A: 病料上清感染的细胞(100×); B: 对照细胞(100×)

Figure 5 Cytopathic effect (CPE) of the infected brain homogenate on BHK-21 cells. A: Cells infected with the supernatant of the diseased material (100×); B: Control (100×).

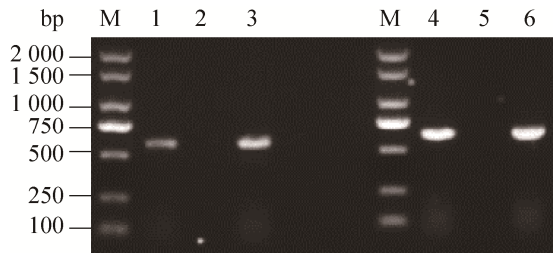


图 6 空斑纯化后病毒液 PCR 鉴定 M: DNA 分子量标准; 1: 伪狂犬病毒 *gB* 基因片段; 2: 阴性对照; 3: *gB* 基因阳性对照; 4: 伪狂犬病毒 *gE* 基因片段; 5: 阴性对照; 6: *gE* 基因阳性对照
 Figure 6 Confirmation of the viral strain selected by plaque purification. M: DNA molecular weight standard; 1: Pseudorabies virus *gB* gene fragment; 2: Negative control; 3: *gB* gene positive control; 4: Pseudorabies virus *gE* gene fragment; 5: Negative control; 6: *gE* gene positive control.

2.4 病毒粒子电镜观察结果

将培养的病毒液超速离心并负染, 通过电镜观察, 结果如图 7 所示。病毒粒子呈球形, 直径约 150 nm, 具有囊膜结构, 囊膜外有放射

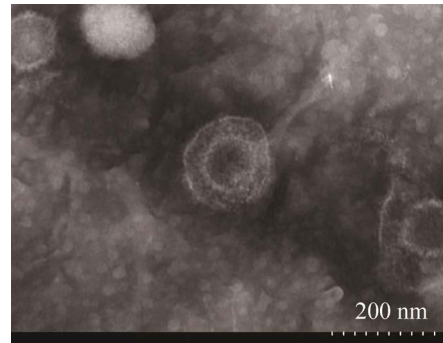


图 7 病毒粒子的电镜观察
 Figure 7 Electron microscope image of viral particles.

状纤突, 具有典型的 PRV 形态特征。

2.5 间接免疫荧光鉴定结果

将纯化后的分离株感染 BHK-21 细胞后, 用 PRV *gE* 单克隆抗体进行间接免疫荧光检测。病毒感染使细胞产生圆缩、聚集、形成合胞体等典型细胞病变。PRV *gE* 单克隆抗体能与病变细胞的病毒结合, 呈现特异性荧光, 对照组无特异性荧光(图 8)。

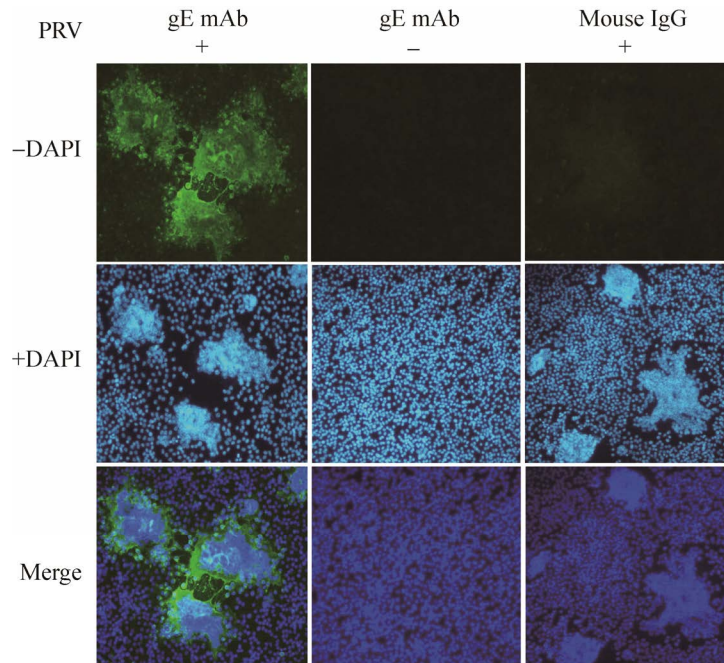


图 8 病毒的间接免疫荧光检测(100×)
 Figure 8 Indirect immunofluorescence detection of virus (100×).

2.6 PRV 分离株生长曲线

PRV 分离株接种 BHK-21 细胞后, 分别测定 6、12、18、24、30、36、42、48 和 54 h 各时间点的病毒 $TCID_{50}$ 。绘制的生长曲线见图 9, 病毒滴度在 48 h 达到最高, 为 $10^{8.5} TCID_{50}/mL$ 。

2.7 致病性分析结果

将分离纯化的 HJL-01 株以不同稀释度分

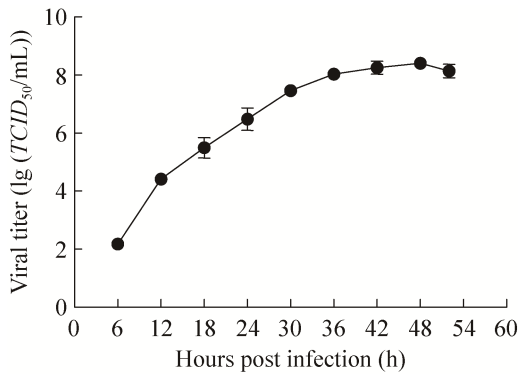


图 9 病毒生长曲线

Figure 9 Growth curve of virus.

别接种 56 日龄仔猪。感染 1 d 后, $10^{7.0} TCID_{50}$ 剂量组有 1 头仔猪发烧($41^{\circ}C$ 以上)。2–3 d 后各攻毒组均出现 3–5 d 的稽留热($41^{\circ}C$ 以上), 最高达到 $41.9^{\circ}C$, 而且出现厌食、精神沉郁、呼吸困难, 个别猪伴有腹泻、神经症状。 $10^{7.0} TCID_{50}$ 剂量组感染 3 d 后出现死亡, 5 d 后全部(5/5)死亡; $10^{6.0} TCID_{50}$ 剂量组感染 5 d 后出现死亡, 14 d 时 4/5 死亡; $10^{5.0} TCID_{50}$ 剂量组攻毒 6 d 后出现死亡, 14 d 时 3/5 死亡; $10^{4.0} TCID_{50}$ 剂量组感染 8 d 后出现死亡, 14 d 时 1/5 死亡, 表明分离的流行变异株对猪有较强的致病性。

剖检死亡猪, 部分脾脏边缘有坏死, 肝脏部分有白色坏死结节, 淋巴结肿大出血, 部分肺脏有少许实变, 心脏和肾脏无明显变化, 所有攻毒猪最典型剖检特征为脑部充血(图 10)。

病理组织切片观察死亡猪的器官组织, 结果如图 11 所示, 肺炎性细胞浸润, 大量浆液性

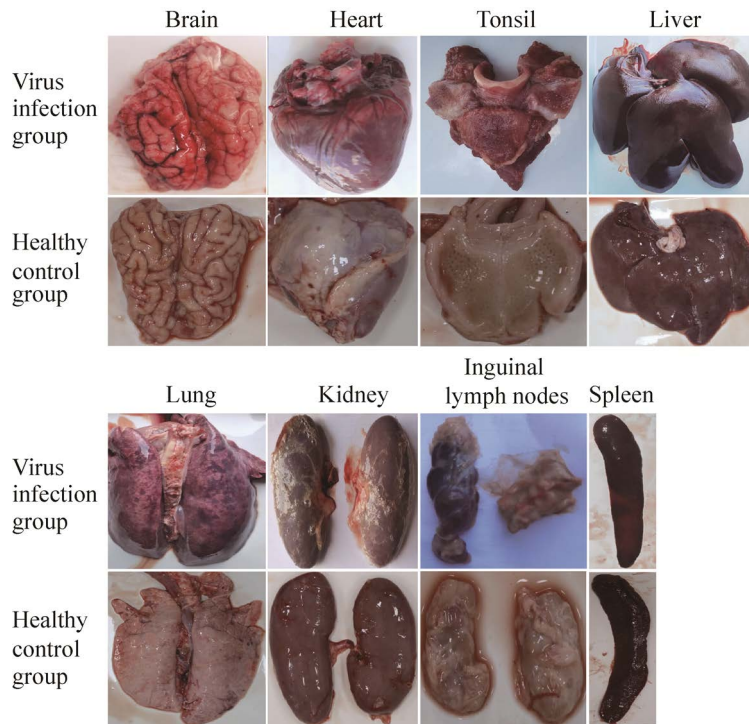


图 10 PRV 攻毒后仔猪的各个脏器病理变化

Figure 10 Pathologic changes of organs from piglets challenged with PRV.

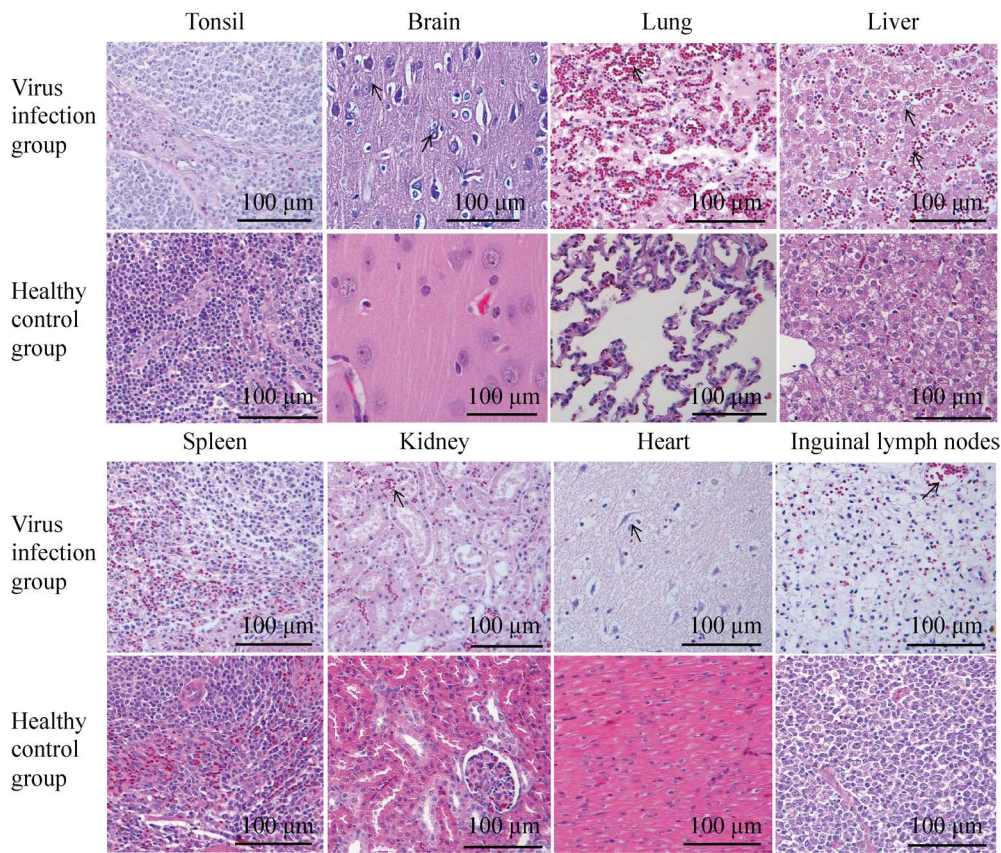


图 11 各个组织器官病理组织学观察

Figure 11 Histological sections from tissues of piglets challenged with PRV.

渗出；扁桃体结缔组织增生，淋巴细胞减少；脑胶质细胞轻度增生，神经元细胞大量变性；肝细胞广泛轻度变性，细胞萎缩，窦状间隙扩大，轻度瘀血，结缔组织增生；脾广泛性淋巴细胞减少；肾上皮细胞大量变性；心肌细胞萎缩，间质水肿，结缔组织增生；腹股沟淋巴结可见髓质出血，含铁血黄素沉积，淋巴细胞大量减少。对照组采食、饮水、体温等均正常，各器官和组织无病理变化。

对 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 剂量组的死亡猪进行取样，检测脑、肝脏、肺脏，脾脏、淋巴结和扁桃体的病毒载量，结果如图 12 所示，死亡猪的各组织器官病毒载量均在 $10^{6.0}$ copies/g 以上，其中以脑和肺的病毒载量最高，PBS 对照组中各组织器官中无病毒载量。

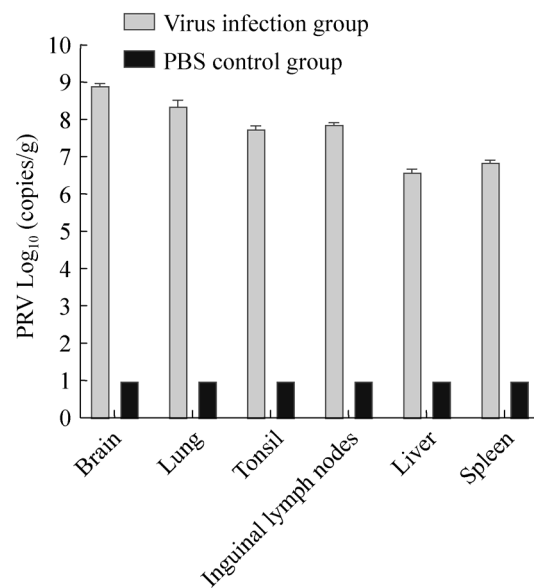


图 12 攻毒后不同组织样品中的病毒载量

Figure 12 Viral loads in different tissue samples after challenge.

3 讨论与结论

自 2011 年,我国开始出现了 PRV 变异毒株,国内多个省份规模化猪场出现大范围流行的 PRV 感染,多为突然发病且蔓延迅速,给我国家养猪业造成了严重的经济损失^[7]。有研究对流行变异毒株进行了致病性分析,发现流行变异毒株比经典毒株具有更强的致病力。Luo 等^[8]对 2014 年分离的 PRV-TJ 株与经典强毒 SC 株进行了致病力分析,结果表明, TJ 株 $10^{2.0} TCID_{50}$ 剂量组可使小鼠发病,而 SC 株则需要 $10^{3.0} TCID_{50}$;以 $10^{6.0} TCID_{50}$ 的 TJ 株和 SC 株分别接种 6 周龄仔猪, TJ 株发病时间更早,致死率达 80%,显著高于 SC 株,而且仔猪感染 TJ 株后表现出大脑和淋巴结出血等严重的病理变化。Gu 等^[9]对分离的变异毒株 ZJ01 株进行了致病力分析, $10^{6.0} TCID_{50}$ 可使 80 日龄仔猪 100% 死亡,并且脑有严重的水肿和出血,而传统强毒株 LA 株 $10^{6.0} TCID_{50}$ 不能导致 80 日龄仔猪死亡。在本研究中,致病性结果显示, $10^{7.0} TCID_{50}$ 剂量感染组 100% 死亡; $10^{6.0} TCID_{50}$ 剂量感染组 80% 死亡; $10^{5.0} TCID_{50}$ 剂量感染组 60% 死亡,表明分离的流行变异株对动物具有很强的致病性。

近年来,我国多名学者相继分离了 PRV 变异流行毒株并进行了相关研究。Zheng 等^[10]分析了 2012–2018 年间在华中地区分离到的 16 株病毒,并对这 16 株病毒的 *gE*、*gC*、*gB* 和 *gD* 基因进行测序,分析这 4 个基因序列的遗传进化情况;根据 *gE*、*gC*、*gB* 和 *gD* 基因的遗传进化树分析,这 16 株病毒均与国内流行毒株同属一个分支,从氨基酸水平上分析发现,16 株病毒的 *gE* 氨基酸序列中在 48 位和 496 位均有一个天冬氨酸的插入,在 *gC* 蛋白水平上发现在 63–69 位有 7 个氨基酸的插入;此外,发现有 8 个分离株在第 280 位(F 到 L)有 1 个额外的氨基酸取代,首次证明中国变异毒株的 *gC* 蛋白存在特征性

的氨基酸替换(第 280 位)。这些氨基酸序列的改变是区分经典株与变异株的一个重要特征。

gE 基因作为伪狂犬病毒的主要毒力基因,可以作为标志基因区别疫苗接种和野毒感染。*gE* 蛋白不参与病毒的复制,属于非必需蛋白,但 *gE* 蛋白对病毒在细胞间的扩散和病毒侵袭神经系统发挥着重要的作用,*gE* 基因序列的改变影响病毒毒力及中和抗体的产生^[11]。本研究将 HLJ-01 株 *gE* 基因与国内外经典毒株和变异毒株进行遗传进化分析和同源性分析,结果发现, *gE* 基因与国内外经典毒株的相似性为 97.1%–100%,其中与 TJ 株的相似性为 100%。遗传进化树结果显示,该分离毒株与我国近几年分离的流行变异株位于同一分支,而与国内外经典毒株分处不同分支。氨基酸序列对比结果显示,HLJ-01 株 *gE* 在 48 位和 496 位各有 1 个天冬氨酸的插入,符合变异毒株的特点。由于 *gE* 蛋白表面存在多个抗原表位,HLJ-01 株与经典株相比,抗原表位区域的第 48、54 和 496 位氨基酸均有突变,这些氨基酸位点的改变是否会导致 PRV 抗原性的改变,还有待进一步研究。

gC 基因是 PRV 基因序列中变异相对活跃的基因,该基因的变异可导致 PRV 生物学特性、致病力和毒力的改变,并促使 PRV 逃避感染宿主的免疫防御^[10,12]。有研究发现,PRV *gC* 蛋白表面 65–79 位氨基酸(STPPVPPPSVSRK)、80–94 位氨基酸(PRNNRTRVHGDKAT)和 85–99 位氨基酸(RTRVHGDKATA HGRK)为抗原表位区^[12]。本研究中发现,HLJ-01 株与国内外经典毒株相比,*gC* 蛋白的 63–69 位共插入 7 个氨基酸(AAASTPA),并且在 180–200 氨基酸位置有多个置换突变,影响了 *gC* 蛋白的抗原表位。Ren 等^[13]研究发现,流行毒株的 *gC* 蛋白是抗 Bartha-K61 血清对 HB1201 无效中和的主要原因,这导致 Bartha-K61 等经典疫苗株无法对我国

当前流行的伪狂犬病毒提供有效保护。本研究通过对 HLJ-01 株的 *gC* 基因同源性和遗传进化树分析, 进一步证明了 HLJ-01 株为变异毒株, 而且与 2011 年后国内流行的变异毒株亲缘关系较近。

综上所述, 本研究从黑龙江分离得到一株 PRV 流行变异株, 对其进行了系统发育分析, 并对其主要生物学特性进行了鉴定, 可为 PRV 的遗传进化及流行病学分析提供实验数据。

REFERENCES

- [1] 李尚波, 马凤龙, 马振宇, 王文成, 尹广东, 孙洪丽, 卫广森, 王铁东, 宣华. 猪伪狂犬病病毒 LA 株的分离鉴定[J]. 辽宁畜牧兽医, 2003(3): 6-8
Li SB, Ma FL, Ma ZY, Wang WC, Yin GD, Sun HL, Wei GS, Wang TD, Xuan H. Isolation and identification of porcine pseudorabies virus LA strain[J]. Liaoning Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2003(3): 6-8 (in Chinese)
- [2] 任卫科, 张莉, 路超, 池晶晶, 李秀丽, 田向学, 孙元, 李富强, 仇华吉, 鄢明华. 猪伪狂犬病病毒变异株 R13028 株生物学特性及致病性的研究[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(3): 314-321
Ren WK, Zhang L, Lu C, Chi JJ, Li XL, Tian XX, Sun Y, Li FQ, Qiu HJ, Yan MH. Biological characteristics and pathogenicity of pseudorabies variant virus R13028 strain[J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(3): 314-321 (in Chinese)
- [3] 王凤求. 猪伪狂犬病毒 GDHD-1 株的分离鉴定与致病性研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2015
Wang FQ. The isolation, identification, and pathogenicity research on pseudorabies virus strain GDHD-1[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [4] Yang QY, Sun Z, Tan FF, Guo LH, Wang YZ, Wang J, Wang ZY, Wang LL, Li XD, Xiao Y, et al. Pathogenicity of a currently circulating Chinese variant pseudorabies virus in pigs[J]. World Journal of Virology, 2016, 5(1): 23-30
- [5] Zhou QQ, Zhang LF, Liu HY, Ye GQ, Huang L, Weng CJ. Isolation and characterization of two pseudorabies virus and evaluation of their effects on host natural immune responses and pathogenicity[J]. Viruses, 2022, 14(4): 712
- [6] Liu HM, Shi ZB, Liu CG, Wang PF, Wang M, Wang SD, Liu ZS, Wei LL, Sun ZZ, He XJ, et al. Implication of the identification of an earlier pseudorabies virus (PRV) strain HLJ-2013 to the evolution of Chinese PRVs[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 612474
- [7] 罗展. 当前猪伪狂犬病的流行特点及防控措施[J]. 当代畜禽养殖业, 2018(1): 46-47
Luo Z. Current epidemic characteristics and control measures of pseudorabies in pigs[J]. Modern Animal Husbandry, 2018(1): 46-47 (in Chinese)
- [8] Luo YZ, Li N, Cong X, Wang CH, Du M, Li L, Zhao BB, Yuan J, Liu DD, Li S, 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
- [9] Gu ZQ, Hou CC, Sun HF, Yang WP, Dong J, Bai J, Jiang P. Emergence of highly virulent pseudorabies virus in southern China[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2015, 79(3): 221-228
- [10] Zheng HH, Bai YL, Xu T, Zheng LL, Li XS, Chen HY, Wang ZY. Isolation and phylogenetic analysis of reemerging pseudorabies virus within pig populations in central China during 2012 to 2019[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 764982
- [11] 赵鸿远, 彭金美, 安同庆, 李琳, 冷超粮, 陈家程, 王倩, 常丹, 张秋月, 蔡雪辉, 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 HY, Peng JM, An TQ, Li L, Leng CL, Chen JZ, Wang Q, Chang D, Zhang QY, Cai XH, 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 (in Chinese)
- [12] 夏德利, 黄立平, 危艳武, 王一平, 杜文娟, 谢永兴, 吴洪丽, 冯力, 刘长明. 猪伪狂犬病病毒流行毒株 *gC* 基因的分子特征及其对小鼠的毒力试验[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(6): 713-720
Xia DL, Huang LP, Wei YW, Wang YP, Du WJ, Xie YX, Wu HL, Feng L, Liu CM. Molecular characterization of *gC* gene of pseudorabies virus epidemic isolates and their virulence test in mice[J]. Chinese Veterinary Science, 2017, 47(6): 713-720 (in Chinese)
- [13] Ren JL, Wang HB, Zhou L, Ge XN, Guo X, Han J, Yang HC. Glycoproteins C and D of PRV strain HB1201 contribute individually to the escape from bartha-K61 vaccine-induced immunity[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 323