

母猪猪痘的诊断及病毒分离

邓舜洲¹ 蒋新华¹ 冷 闯¹ 余根莲² 段 俊² 张文波^{1*}

(1. 江西农业大学 动物科技学院, 江西 南昌 330045; 2. 南昌金牧动物保健服务有限公司, 江西 南昌 330013)

摘要:为确定江西某猪场部分母猪陆续发生皮肤痘斑的病原,根据猪痘病毒(AF410153.1)基因序列设计1对引物,采用PCR方法从发病母猪皮肤痘痂中扩增到猪痘病毒P35基因,与猪痘病毒参考毒株(AF410153.1)P35基因的核苷酸同源率为98%,说明该场母猪皮肤出现的痘斑是由猪痘病毒引起。利用PK15细胞从皮肤痘痂中分离到1株猪痘病毒,该毒株能在PK15细胞中连续传代,不产生严重的细胞病变(CPE)。采用间接ELISA方法对该场的10头母猪和8头肥猪血样进行猪痘病毒抗体检测,母猪和肥猪血清中猪痘病毒抗体阳性数分别为5头和4头,阳性率为50%。

关键词:母猪;猪痘病毒;诊断;病毒分离

中图分类号:S858.28 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2012)05-0993-04

Diagnosis and Virus Isolation of Sow's Swine pox

DENG Shun-zhou¹, JIANG Xin-hua¹, LENG Chuang¹,
YU Gen-lian², DUAN Jun², ZHANG Wen-bo^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
2. Nanchang Jingmu Animal Health Co., Ltd., Nanchang 330013, China)

Abstract: In order to identify the etiologic agents of eruptive dermatitis (papulae, crusts, et al) in sows in Jiangxi Province, a pair of primers were designed according to the swinepox virus (SWPV) genome (AF410153.1). Crusts collected from skin of sows were used for DNA extraction, followed by PCR detection of SWPV P35 gene. The amplified Nucleotide Sequence shared 98% identity with the reported SWPV P35 gene (AF410153.1). The results indicated that the etiologic agent of eruptive dermatitis is Swinepox virus. A strain of Swinepox virus was isolated by PK15 cell culture. The SWPV could be replicated in PK15 cells without severe cytopathogenic effects (CPE). The antibodies against SWPV P35 protein in 18 sera of sows and finishing pigs collected from the farm were detected by the indirect ELISA, and the results showed that 50% samples were positive, including 8 sows and 4 finishing pigs.

Key words: sow; swinepox virus; diagnosis; virus isolation

猪痘(swinepox, SWP)是由猪痘病毒(swinepox virus, SWPV)引起猪的一种温和或急性传染病,以皮肤发生特殊的红斑、丘疹、脓疱和结痂为特征。猪痘主要发生于3月龄以内的猪,猪痘可通过猪虱等的叮咬机械传播,与猪的饲养卫生条件差相关^[1]。猪痘呈世界性分布,Medaglia等^[2]报道SWP在巴西爆发,但也有关于SWPV胎盘感染导致母猪流产、死胎或初生仔猪发病的报道^[3]。我国也有猪痘的临床病例报道,但未见猪痘病毒的病原、血清学的相关研究^[4]。

收稿日期:2012-04-05 修回日期:2012-07-19

基金项目:国家自然科学基金项目(31160498)

作者简介:邓舜洲(1968—)男,副教授,博士,主要从事动物传染病与免疫学研究, E-mail: shzhdeng@163.com; *

通讯作者:张文波,博士, E-mail: zwb_197210@163.com。

除猪痘病毒外,痘苗病毒(vaccinia virus, VACV)感染猪、牛后也可导致皮肤上出现类似猪痘的症状,且临床上难以区分^[5-6],但猪痘病毒与痘苗病毒在血清学上基本无交叉反应^[7]。因此,可从病原学和血清学确定引起猪皮肤痘斑的病原。2009 年以来,江西省某猪场(经产母猪 200 头)的母猪群中常年存在 3~7 头经产母猪背部、肩胛部有数量不等的痘斑(图 1),痘斑直径为 0.5~2 cm,部分痘斑出现严重溃烂,大部分发病母猪的病情维持 2 个月以上,但发病母猪的精神、采食量、产仔情况均正常。

为确定引起该场母猪皮肤痘斑的病原,根据已发表的猪痘病毒基因组序列设计引物,对皮肤痘斑进行 PCR 扩增;在此基础上,利用 PK15 细胞进行了猪痘病毒的分离;以猪痘病毒 P35 重组蛋白为检测抗原对该场猪群中猪痘病毒的抗体进行检测。从病原学和血清学角度确定猪痘在江西地区猪群中的存在,同时为今后进行猪痘病毒的流行病学、猪痘病毒为载体的重组疫苗等的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

猪痘病料: 用镊子剖取病母猪背部皮肤上的痘斑结痂, -20 °C 保存备用。**猪痘病毒引物:** 根据 GenBank 登录的 SWPV(AF410153.1) 基因序列,采用 Primer5.0 设计 1 对引物扩增猪痘病毒 P35 基因(上游引物 5' - CCGGAAT-TCATGACGACGCCTCAAAAAGAAATCG - 3', 下游引物 5' - CCCTCGAGTTATACAATAT-ACGTGAATCCTATTCC - 3'),由上海生工合成(Afonso C L 等, 2002)。**PK15 细胞:** 本实验室保存。**猪痘病毒 P35 基因的原核表达 GST - P35 重组蛋白:** 本实验室表达纯化。**谷胱甘肽 S 转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗猪 IgG 抗体**均购自 Sigma. 公司。

1.2 方法

1.2.1 痘斑中猪痘病毒 P35 基因的 PCR 扩增

取病母猪皮肤痘痂 0.5 g 剪碎,加入 800 μL 的生理盐水进行匀浆,10 000 r/min 离心 10 min,取上清 600 μL 提取 DNA。以病料中提取的基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 45 s,54 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物经核酸琼脂糖凝胶电泳,回收扩增产物,送 Invitrogen(上海)有限公司测序,测序结果在 NCBI 上与 SWPV 基因序列进行同源性比较。

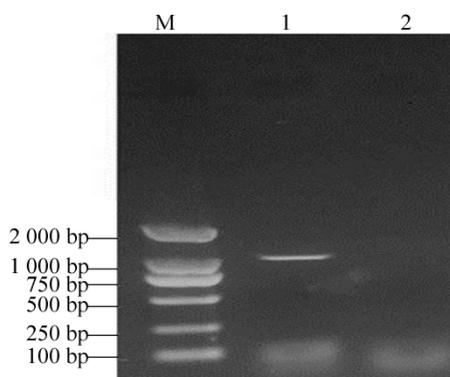
1.2.2 病毒分离 取皮肤痘痂 0.5 g,加入 2 mL 不含血清的高糖 DMEM 培养液,匀浆器匀浆,反复冻融 3 次,10 000 r/min 4 °C 离心 10 min,取上清 0.22 μm 细菌滤器滤过, -20 °C 保存备用。取生长良好的 PK15 细胞,弃去培养液,加入 0.5 mL 上述处理过的病毒液,37 °C 吸附 1 h,另设不接毒的 PK15 细胞作对照;弃去病毒液,加入 5% 新生牛血清的 DMEM 培养液,37 °C,5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2.3 细胞病变观察及猪痘病毒 PCR 检测 每天观察细胞生长情况,如无明显细胞病变(CPE),则于接毒后 72~96 h 盲传,并取细胞培养液,按 1.2.1 方法进行猪痘病毒的 PCR 检测,对 PCR 扩增产物进行纯化、回收目的片段,送 Invitrogen(上海)公司测序。

1.2.4 母猪血清猪痘病毒抗体的检测 以猪痘病毒 P35 基因的原核表达 GST - P35 重组蛋白包被 96 孔酶标板(10 μg/mL,100 μL/孔),同时以 GST 蛋白作为对照(4 μg/mL,100 μL/孔),以消除 GST 蛋白



图 1 母猪背部皮肤的痘斑
Fig.1 The skin lesions of sows



M: DNA 分子质量标准; 1: 皮肤痘斑; 2: 正常猪皮肤。
M: Trans2K DNA marker; 1: skin crusts; 2: Normal pig skin.

图 2 母猪皮肤痘痂的 PCR 扩增结果
Fig.2 The result of amplified by PCR

本底,被检测猪血样 1:80 稀释,兔抗猪 IgG 酶标二抗为 1:4 000 稀释。以本实验室已建立的间接 ELISA 方法分别对该场的 10 头母猪和 8 头肥猪血清进行猪痘病毒抗体的检测。

2 结果

2.1 猪病料 PCR 检测结果

采用猪痘病毒 P35 基因特异性引物对母猪皮肤上的痘痂进行 PCR 检测,电泳结果出现与预期大小(975 bp)一致的扩增条带(图 2)。测序结果表明扩增片段为猪痘病毒特异性基因序列,大小为 975 bp,与猪痘病毒参考株(AF410153.1) P35 基因的核苷酸同源率为 98%。

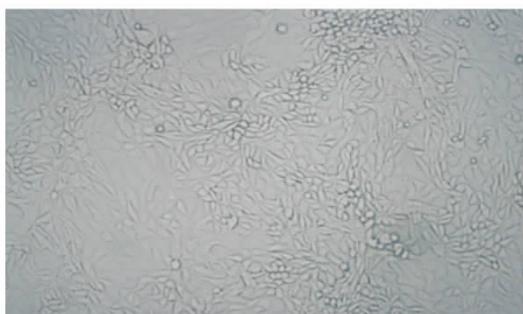


图 3 正常 PK15 细胞对照

Fig. 3 The uninfected 1 PK15 cells

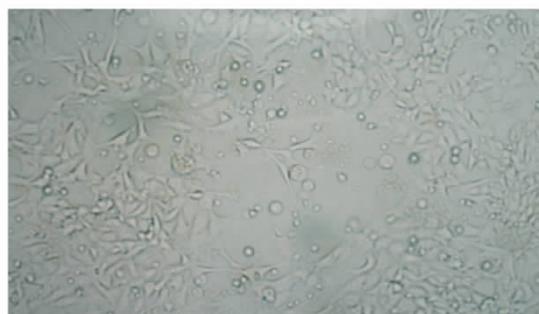


图 4 接毒 PK15 细胞产生大量死细胞

Fig. 4 The PK15 cells infected by SWPV

2.2 猪痘病毒分离培养

PK15 细胞接种母猪皮肤痘痂病料滤液后,第 1 代细胞出现大量漂浮的死细胞;盲传的第 2~5 代也出现比正常 PK15 细胞(图 3)多的死细胞,同时可见少量细胞变长、变细,表出现拉丝、网状(图 4),且传代时胰酶消化时间比正常 PK15 细胞明显缩短,但可连续盲传。第 6 代后与正常 PK15 细胞无明显差异,但传代时胰酶消化时间比正常 PK15 细胞明显缩短(是正常 PK15 细胞的 1/4)。

2.3 细胞培养液中猪痘病毒 P35 基因的 PCR 检测

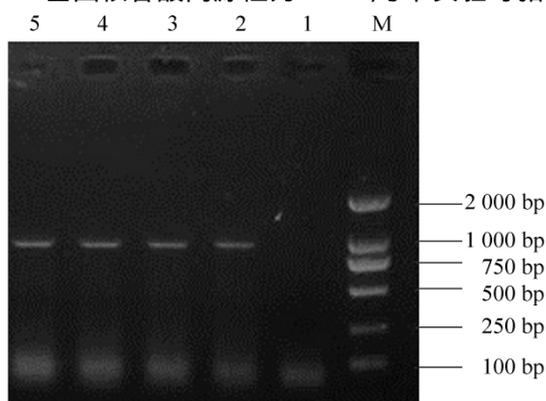
分别收集接毒 PK15 细胞的第 2、3、5、10 代 72~96 h 细胞培养液进行猪痘病毒 P35 基因的 PCR 检测,从第 2 代开始,细胞培养液均能扩增出与猪痘病毒 P35 基因大小(975 bp)一致的核酸片段(图 5),测序结果显示与猪痘病毒参考毒株(AF410153.1) P35 基因核苷酸同源率为 98%,与本实验母猪痘痂中扩增的 P35 基因同源率为 100%。

2.4 母猪血清猪痘病毒抗体的检测

应用本实验室已建立的间接 ELISA 方法对该猪场的 18 份母猪和肥猪的血清样品进行猪痘病毒的抗体检测,共检出阳性血清 9 份,总阳性率为 50%。其中母猪血样 10 份,5 份为阳性;8 份肥猪血样中有 4 份为阳性。

3 讨论

通过对该场母猪皮肤痘痂进行 PCR 扩增,扩增产物序列与已发表的猪痘病毒 P35 基因序列(AF410153.1)的同源率为 98%,结果表明该场母猪皮肤的痘痂是由猪痘病毒引起。母猪和肥猪血清中猪痘病毒抗体检测,10 头母猪血清中有 5 头为猪痘病毒抗体阳性,8 头肥猪血清中有 4 头为猪痘病毒抗体阳性,抗体检测结果也表



M: Trans2K DNA 分子质量标准; 1: 未接毒 PK15 细胞; 2: 第二代; 3: 第三代; 4: 第 5 代; 5: 第 10 代。

M: Trans 2K DNA Ladder; 1: uninfected K15 cells; 2: the 2nd blind passage PK15 cells; 3: the 3rd blind passage PK15 cells; 4: the 5th blind passage PK15 cells; 5: the 10th blind passage PK15 cells.

图 5 接毒后不同代次 PK15 细胞培养液 PCR 扩增结果

Fig. 5 The results of SWPV PCR detection of different passages

PK15 cell infected by SWPV isolate

明该场猪群中的部分母猪和肥猪存在猪痘病毒的感染。虽然国内也有猪痘的临床病例报道,但均未通过病毒分离鉴定、分子生物学等实验室手段进行确诊^[4]。

猪痘是由猪痘病毒引起猪的一种温和或急性皮肤损伤的传染病。猪痘呈世界性分布,猪痘的发病率可能较高,但死亡率通常极低。猪是目前已知的唯一宿主,临床上猪痘常发生于幼龄猪,且临床病症仅限于皮肤出现数量不等的痘斑,且能自行康复,给养猪业导致的损失很低^[8]。Olufemi 等^[9]曾报道母猪发生猪痘(乳头皮肤出现痘斑)。也有猪痘病毒胎盘感染的报道,临床上表现为流产、死胎^[10]或初生仔猪就发生猪痘,并出现死亡,但这些发生痘病毒胎盘感染的母猪均未表现猪痘的症状^[3]。本文报道的该场母猪群中常年存在数头母猪表现典型猪痘症状,回顾性调查该场哺乳仔猪却未发现典型猪痘病例,其原因可能是由于大部分母猪存在较高水平的猪痘病毒抗体。P35 蛋白(痘病毒属胞内成熟病毒粒子(IMV)囊膜蛋白)是诱导产生抗体的主要蛋白之一,特别是在产生第二次免疫应答时具有重要作用,并且参与病毒吸附宿主细胞,在结合、装配成熟病毒粒子、病毒毒力和免疫原性等方面其主要作用^[11],能对小鼠、绵羊、兔子和人类产生较强的免疫应答^[12]。

在通过 PCR 确定皮肤痘痂中存在猪痘病毒的基础上,本实验通过 PK15 细胞培养,从母猪皮肤痘痂中分离到一株猪痘病毒(命名为 SWPV-JX13)。猪痘病毒具有严格的宿主特异性,猪是其自然界唯一的感染宿主和贮藏宿主。猪痘病毒仅能实验感染兔,但不能在兔体内进行连续传代,只产生非复制性的痘病^[13]。虽然猪痘病毒不能在禽类、猴、仓鼠体内感染和复制,但是能在人类、猴子、仓鼠细胞内存活^[14]。Bárcena 将表达 β -半乳糖苷酶的重组猪痘病毒感染一系列细胞系后发现:该病毒能在 PK15 和 ESK-4 猪源细胞系中增殖,也能在 CV-1、BHK-21、BSC-1 和 HeLa 非猪源细胞系中细胞系增殖,而且能在这些细胞系中传代,但形成的蓝斑数少^[15]。因此,在进行猪痘病毒分离时常用猪源 PK15 细胞,Kasza 等^[16]最先利用 PK15 细胞分离到一株猪痘病毒。

参考文献:

- [1] Barbara E Straw, Jeffery J Zimmerman, Sylvie D'Allaire, et al. Diseases of swine [M]. 9 ed. Blackwell Publishing 2006: 483 - 487.
- [2] Medaglia M L, Pereira Ade C, Freitas T R, et al. Swinepox virus outbreak, Brazil, 2011 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(10): 1976 - 1978.
- [3] Thibault S, Drolet R, Alain R, et al. Congenital swine pox: A sporadic skin disorder in nursing piglets [J]. Swine Health and Production, 1998, 6(6): 276 - 278.
- [4] 孙坤林, 张俊, 魏居正. 猪痘临床调查 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(9): 30.
- [5] 金宇一, 武德丽. 痘苗病毒在猪体上的驯化 [J]. 中国兽医学报, 1987, 7(3): 345 - 347.
- [6] De Boer G F. Swinepox virus isolation, Experimental infections and the differentiation from vaccinia virus infections [J]. Archives of Virology, 1975, 49(2): 141 - 150.
- [7] Massung R F, Moyer R W. The molecular biology of swinepox virus (II): The infectious cycle [J]. Virology, 1991, 180(1): 355 - 364.
- [8] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, et al. The genome of swinepox virus [J]. Journal of Virology, 2002, 76(2): 783 - 790.
- [9] Olufemi B E, Ayoade G O, Ikede B O, et al. Swine pox in Nigeria [J]. The Veterinary Record, 1981, 109(13): 278 - 280.
- [10] Moorkamp L, Beineke A, Kaim U, et al. Swinepox-skin disease with sporadic occurrence [J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2008, 115(4): 162 - 166.
- [11] Davies D H, McCausland M M, Valdez C, et al. Vaccinia virus H3L envelope protein is a major target of neutralizing antibodies in humans and elicits protection against lethal challenge in mice [J]. Journal of Virology, 2005, 79(18): 11724 - 11733.
- [12] Wilton S, Gordon J, Dales S. Identification of antigenic determinants by polyclonal and hybridoma antibodies during the course of infection by vaccinia virus [J]. Virology, 1986, 148(1): 84 - 96.
- [13] Datt N S. Comparative studies of pigpox and vaccinia viruses (I): Hostrange pathogenicity [J]. J Comp Pathol, 1964, 74: 62 - 69.
- [14] Winslow B J, Cochran M D, Holzenburg A, et al. Replication and expression of a swinepox virus vector delivering feline leukemia virus Gag and Env to cell lines of swine and feline origin [J]. Virus Research, 2003, 98(1): 1 - 15.
- [15] Bárcena J, Blasco R. Recombinant swinepox virus expressing beta-galactosidase: Investigation of viral host range and gene expression levels in cell culture [J]. Virology, 1998, 243(2): 396 - 405.
- [16] Kasza L, Bohl E H, Jones D O. Isolation and cultivation of swine pox virus in primary cell cultures of swine origin [J]. Am J Vet Res, 1960, 21: 269 - 273.