

# 河南省及周边省份猪群中大面积感染猪伪狂犬病毒的病因分析

常洪涛<sup>1</sup>, 刘慧敏<sup>1,2</sup>, 郭占达<sup>1</sup>, 杜季梅<sup>1</sup>, 赵军<sup>1</sup>,  
陈陆<sup>1</sup>, 杨霞<sup>1</sup>, 王新卫<sup>1</sup>, 姚惠霞<sup>1</sup>, 王川庆<sup>1\*</sup>

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 郑州 450002; 2. 中国科学院 动物研究所, 北京 100101)

**摘要:**2011年初开始,猪伪狂犬病(pseudorabies, PR)在河南省及周边省份再次突然出现严重暴发。为查明原因,应用PRV gE抗体ELISA检测试剂盒对2011年1月至2013年5月送检的16 800份猪血清、905份猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)“返饲”病料和56份PR基因缺失活疫苗分别进行野毒感染检测,通过PCR方法对11株PRV新流行毒株的TK、gE基因进行序列测定与分子特征分析,同时对这些毒株的毒价测定、免疫攻毒保护试验以及疫苗效价测定等开展研究。结果显示,PRV野毒感染阳性猪场检出率高达68.06%,血清总阳性率为38.47%,种母猪、种公猪、后备猪和商品猪的阳性率分别为40.12%、30.88%、54.67%和26.52%;新流行毒株聚在同一进化分支,均属于强毒株,但毒力较经典毒株变化不大,gE基因长度均为1 787bp,TK基因长度均为963bp,与不同年代中国参考毒株的核苷酸、氨基酸序列同源性分别为98.2%~99.8%、97.1%~99.8%和98.9%~99.6%和97.5%~99.4%;商品疫苗对新流行毒株的保护率为100%;疫苗和“返饲”病料中,PRV野毒阳性检出率分别为0%和40.44%。研究结果证实,2011年后河南省及周边省份猪群中,PRV野毒感染率大幅攀升;PRV新流行毒株的主要毒力基因并未发生明显变异;疫苗中未存在PRV野毒污染,而且可完全抵抗新流行毒株的攻击;种公猪、后备猪普遍带毒和PEDV“返饲”病料中严重污染野毒是造成2011~2013年间河南省及周边省份猪群中PRV大面积感染和疫情暴发的主要因素。

**关键词:**河南省及周边省份;猪伪狂犬病;野毒;病因

中图分类号:S852.65 文献标识码:A 文章编号:1000-8721(2014)04-0441-09

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002530

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的一种急性传染病,临床上以发热、奇痒及脑脊髓炎为特征<sup>[1-2]</sup>。多种家畜和野生动物均可感染<sup>[3]</sup>,以猪发病后危害最为严重,可致使妊娠母猪流产、产死胎及木乃伊胎,并造成返情比例增高,公猪则表现为睾丸炎,种用性能降低或丧失<sup>[4]</sup>。PRV属于疱疹病毒科(Herpesviridae) $\alpha$ -疱疹病毒亚科,基因组为线状双股DNA,毒力由几种基因协同控制,其中胸腺激酶(TK)和糖蛋白gE对毒力表达具有决定性的作用<sup>[5]</sup>。TK基因与病毒在机体中的潜伏感染和在神经组织中的增殖有关,一旦失活,病毒毒力将丧失或明显降低<sup>[6-7]</sup>。gE基因则决定PRV从细胞上释放和细胞间传播,并促进其进入中枢神经系统和在其中转运扩散,这

对PRV的毒力至关重要<sup>[8]</sup>。多年来,中国坚持应用基因缺失活疫苗配合野毒感染监测技术来防治该病,取得了卓越成效,危害一度曾被养猪业忽视。2011年初至今,PRV又在中国猪场中出现大面积感染现象,一些常年监测为阴性的猪场,短短数月内猪群突然间转为阳性,其中母猪群阳性率可达到30%~40%,中大猪几乎100%阳转,疫情并有日趋扩大和加重之势。河南省及其周边省份是中国养猪集聚区,年出栏量多年稳居全国前列,也是此次疫情发生和流行最为严重的区域之一,损失惨重。究竟是何种原因引起猪群中PRV突然大面积感染和疫情快速反弹,是当前兽医界和养猪业迫切需要解决的一个重大问题。本研究旨在通过PRV野毒感染监测和新流行毒株主要毒力基因的分子特征开展研究,以期对病因进行探索,为该病针对性防治措施的制定提供参考。

## 材料与方法

**1 样品来源** 待检样品为2011年1月至2013年5月间河南省及周边省份(山西省、山东省和安徽省)的886个猪场送检的血清,共计16 800份。其

收稿日期:2013-10-10;修回日期:2014-04-28

基金项目:国家自然科学基金委(31272567)资助

常洪涛和刘慧敏同为第一作者

作者简介:常洪涛(1978-),男,商丘人,博士研究生,讲师,主要从事动物传染病免疫防治研究, Tel:13140081018, E-mail: ndcht@163.com; 刘慧敏(1984-),女,博士研究生,主要从事野生动物疫病研究, Tel:15911180140, E-mail: lhmin01@126.com

\*通讯作者:王川庆(1954-),博士,教授, Tel:13653710063, E-mail:wchuanq@163.com

中规模化猪场血清共 14 005 份,包括经产母猪血清 6 582 份,成年公猪血清 1 190 份,后备猪(包括公、母猪)血清 2 705 份,商品猪 3 528 份;中小型猪场血清共 2 795 份,包括经产母猪血清 1 764 份,成年公猪血清 170 份,后备猪(包括公、母猪)血清 185 份,商品猪 676 份。待检病料采集自 127 个猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)监测呈阳性的猪场送检的 905 份发病仔猪的小肠组织,冻存待用。

**2 检测试剂盒和主要试剂** PRV gE 抗体 ELISA 检测试剂盒购自美国 IDEXX 生物科技有限公司,PRV ELISA 抗体检测试剂盒购自武汉科前动物生物制品有限责任公司。DNA 提取试剂盒由北京百泰克公司提供;ExTaq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体和 DL2000 Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司;PR 基因工程缺失活疫苗购自某生物制品厂,每头份中 Bartha-K61 株病毒含量  $\geq 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>。

**3 野毒感染检测** 应用 PRV gE 抗体 ELISA 检测试剂盒对送检血样进行 PRV 野毒感染检测。

**4 新流行毒株毒价测定及免疫攻毒保护试验** 2011~2013 年从河南省及周边省份发病猪场送检的疑似病料中分离到 11 株 PRV 新流行毒株,分别在 PK15 细胞上连传 5~8 代,出现典型细胞病变后备用。各毒株的毒价测定按参考文献<sup>[9]</sup>进行。选取毒力最强的 2 株 PRV 新流行毒株(NYXY 株和 PYQF2013 株)进行免疫攻毒保护试验,即将 20 头试验猪只分为 5 组,每组 4 头,其中 1、2 组为试验组,第 3、4、5 组为对照组。第 1、2 组分别颈部肌肉注射所购商品疫苗 1 头份/头,第 3、4 组为攻毒对照组(不免疫只攻毒),第 5 组为正常对照组(不免疫不攻毒)。免疫 4 周后采血并分离血清,应用 PRV ELISA 抗体检测试剂盒检测抗体,记录检测结果。免疫 4 周后进行攻毒,攻毒剂量为每头仔猪肌肉注射 3 ml,同时滴鼻 3 ml。每头仔猪于攻毒当日称重,3 周后再称重,逐日观察 3 周,记录各组猪只临床反应情况,根据仔猪发病判定标准计算保护率<sup>[10]</sup>。

**5 引物设计** 根据 GenBank 收录的 PRV gE、TK 基因序列,应用 Primer Premier 5.0 软件分别设计引物,由上海生工生物工程公司合成。

gE 基因扩增引物为 P1:5-gag acc atg cga ccc ttt-3, P2: 5-gtg ggg atg tgc gaa tgc-3, 预计扩增片段长度约为 1 787bp, 包括一个从 ATG 到 TAA 的

完整 gE 阅读框。

TK 基因扩增引物为 P3:5-atg cgc atc ctc cgg atc tac ctc-3, P4: 5-tca cac ccc cat ctc cga cgt g-3, 预计扩增片段长度约为 963bp。

gE 基因检测用引物为 P5:5-ttg gat ccc ttt ccg ccg aga cga ccc-3, P6:5 - cgg aag ctt cgc ggg tgg tag atg cag-3, 预计扩增片段长度约为 808bp。

**6 gE、TK 基因的 PCR 扩增及测序分析** 取 11 株 PRV 新流行毒株培养液,按照 DNA 提取试剂盒说明书操作,分别提取总 DNA,并按照以下参数进行 gE、TK 基因的 PCR 扩增:

gE 基因的 PCR 反应总体积为 50 $\mu$ l, 其中 ddH<sub>2</sub>O 13 $\mu$ l, 2 $\times$ GC buffer 25 $\mu$ l, 模板 2  $\mu$ l, dNTP 混合物 7 $\mu$ l, P1 和 P2 各 1 $\mu$ l, ExTaq DNA 聚合酶 1  $\mu$ l。反应条件为 96 $^{\circ}$ C 5min, 95 $^{\circ}$ C 50s, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。

TK 基因的 PCR 反应总体积为 50 $\mu$ l, 其中 ddH<sub>2</sub>O 15 $\mu$ l, 2 $\times$ GC buffer 25 $\mu$ l, 模板 3 $\mu$ l, dNTP 混合物 4 $\mu$ l, P3 和 P4 各 1 $\mu$ l, ExTaq DNA 聚合酶 1 $\mu$ l。反应条件为 98 $^{\circ}$ C 5min;96 $^{\circ}$ C 30s, 56  $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。

上述各 PCR 产物胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5a,提取阳性质粒送至上海生工生物工程公司测序,每个样本测序两次。并运用 DNA Star 软件包中的 MegAlign 程序,将测定的各序列与不同年代的 PRV 中国参考毒株进行同源性比较,并应用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树。

**7 返饲病料中 PRV 野毒感染检测** 对送检的 905 份用于“返饲”的肠道组织分别用 PBS 缓冲液 5 倍稀释,去除筋腱等结缔组织,使用组织捣碎仪将其制成匀浆,反复冻融 3~4 次,以 4 $^{\circ}$ C 8 000r/min 离心 5min 取上清,提取病料总 DNA,按以下参数进行 gE 基因检测:反应总体积为 50 $\mu$ l, 其中 ddH<sub>2</sub>O 12.5 $\mu$ l, 2 $\times$ GC buffer 25 $\mu$ l, 模板 8 $\mu$ l, dNTP 混合物 1 $\mu$ l, P5 和 P6 各 1.25 $\mu$ l, ExTaq DNA 聚合酶 1 $\mu$ l。反应条件为 97 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。各 PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测并记录结果。

**8 疫苗效价测定及 PRV 野毒污染检测** 选取养猪生产中广泛应用的 10 个国内外兽医生物制品厂家不同批次的 56 份 PR 基因缺失活疫苗,按参考文献<sup>[9]</sup>测定效价。分别用 PBS 缓冲液 10 倍稀释上述疫苗,提取总 DNA,按照以下参数进行 gE 基因检

测:ddH<sub>2</sub>O 18.5 $\mu$ l, 2 $\times$ GC buffer 25 $\mu$ l, 模板 2 $\mu$ l, dNTP 混合物 1 $\mu$ l, P5 和 P6 各 1.25 $\mu$ l, ExTaq DNA 聚合酶 1 $\mu$ l。反应条件为 97 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。各 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并记录结果。

## 结 果

### 1 PRV 野毒感染检测结果

对 4 省份 886 个猪场送检的 16 800 份猪血清进行 PRV 野毒感染检测(表 1), 其中阳性检出场为 603 个(68.06%), 阳性血清数为 6 463 份(38.47%),

以河南省阳性场检出率和血清总阳性率最高, 分别为 70.16% 和 40.08%, 其他 3 省份分别为 61.27%~69.17% 和 32.46%~39.01%。种母猪、种公猪、后备猪和商品猪的血清总阳性率分别为 40.12%、30.88%、54.67% 和 26.52%(表 2)。其中规模化猪场总阳性率为 40.20%, 种母猪、种公猪、后备猪和商品猪的阳性率分别为 42.11%、32.35%、56.19% 和 27.01%; 中小型猪场总阳性率为 29.80%, 种母猪、种公猪、后备猪和商品猪的阳性率分别为 32.65%、20.59%、32.43% 和 23.96%。调查结果表明, 河南省及周边省份不同规模、不同阶段猪群中均存在着严重的 PRV 野毒感染。

表 1 不同省份猪群中 PRV 野毒检测结果

Table 1 The results of PRV field infection among pigs in different Provinces

Provinces	Pig farms	Positive pig farms	Positive rate(%)	Serum number	Positive number	Positive rate(%)
Henan Province	506	355	70.16	10120	4056	40.08
Shanxi Province	142	87	61.27	2556	997	39.01
Shandong Province	105	69	65.71	1995	719	36.04
Anhui Province	133	92	69.17	2129	691	32.46
Total	886	603	68.06	16800	6463	38.47

表 2 不同规模猪群 PRV 野毒检测结果

Table 2 The results of PRV field infection in pig farms of different sizes

Pig farms	Sows	Boars	Reserve Swine	Commerical pigs	Total	
Large-scale pig farms	Serum number	6 582	1 190	2 705	3 528	14 005
	Positive number	2 772	385	1 520	953	5 630
	Positive rate(%)	42.11	32.35	56.19	27.01	40.20
Small and medium-sized pig farms	Serum number	1 764	170	185	676	2 795
	Positive number	576	35	60	162	833
	Positive rate(%)	32.65	20.59	32.43	23.96	29.80
Total	Serum number	8 346	1 360	2 890	4 204	16 800
	Positive number	3348	420	1 580	1 115	6 463
	Positive rate(%)	40.12	30.88	54.67	26.52	38.47

2 毒价测定及免疫攻毒保护试验结果 根据 Reed-Muench 方法计算, 11 株 PRV 新流行毒株的毒价为  $10^{-6.21} \sim 10^{-7.85}$  TCID<sub>50</sub>, 均属于强毒株, 但细胞毒力较经典毒株变化不大(表 3)。2 个试验组应用疫苗免疫猪 4 周后检测 PR 抗体, S/N 比值为 0.176~0.225(抗体阳性标准为 S/N 比值  $\leq 0.6$ ), 攻毒后在观察期内均未发病, 无任何不良反应。2 组攻毒对照组的仔猪在攻毒后 3 d 均出现体温反应(40.8 $^{\circ}$ C~41.8 $^{\circ}$ C), 且持续 6~7 d, 并伴有食欲减退或废绝现象, 发病率为 100%(8/8), 正常对照组无任何不良临床反应。研究结果证明现有疫苗可完全抵

抗 PRV 新流行毒株的攻击, 保护率为 100%(表 4)。

3 gE、TK 基因序列及分析 将所测定的 11 株 PRV 新流行毒株的 gE、TK 基因分别提交至 GenBank(表 3)。其中 8 株 PRV 的 gE 基因长度均为 1787bp, 彼此间核苷酸和氨基酸的同源性分别为 99.3%~99.9% 和 98.8%~100%, 与参考毒株分别为 98.2%~99.8% 和 97.1~99.8%(图 1), 可见其核苷酸同源性很高, 推导的氨基酸序列也都仅在个别位点发生变异, 例如与 HN1JZ 株比较, 33 位 G $\rightarrow$ D(HNPY 株), 89 位 S $\rightarrow$ P、309 位 R $\rightarrow$ G 和 471 位 T $\rightarrow$ A(AHBZ2012 株、HBCX2013 株和

SDHZ2012 株), 110 位 T→M(ZMD-1 株), 214 位 A→P(AHBZ2012 株), 271 位 P→A(AHBZ2012 株、HBCX2013 株、SDHZ2012 株和 ZMD-1 株), 346 位 T→A(HNPY 株、SDHZ2012 株、NYXY 株、SXJC2011 株和 XCCG 株), 497 位 E→G 和 542 位 K→E(NYXY 株)。6 株 PRV 的 TK 基因长度均为 963bp, 彼此间核苷酸和氨基酸的同源性均为 99.4%~100%, 与参考毒株分别为 98.9%~99.6%和 97.5%~99.4%(图 2), 并且都具有所有疱疹病毒 TK 催化结构域中的亚结构域: ATP 结合结构域(A, 位于 10~16 位)和核苷酸结合结构域

(C, 位于 108~110 位), 即共同的保守序列-G \* \* G \* GK-和-DRH(图 3)。研究结果证明, 2011 年以后 PRV 新流行毒株的主要毒力基因 gE 和 TK 均未发生明显变异。基于 gE 基因绘制的系统发育进化树显示, 8 株 PRV 新流行毒株聚在同一进化分支, 与 GDSH 株亲缘关系最近, 其中 ZMD-1 株与河南参考毒株 HNJZ 株高度同源(图 4); 基于 TK 基因绘制的系统发育进化树显示, 6 株 PRV 新流行毒株聚在同一进化分支, 与 PRV-FZ 株亲缘关系最近, 其中 HBCX2013 株与四川参考毒株 SL 株高度同源(图 5)。

表 3 PRV 新流行毒株和参考毒株信息

Table 3 The information on new epidemic isolates and reference isolates of PRV used for sequence alignment

Isolate name	Date isolated	Origin isolated	Accession numbers		TCID <sub>50</sub> /0.1 mL
			gE gene	TK gene	
HNPY	2011	Puyang, Henan province	KF311112		10 <sup>-7.3</sup>
ZMD-1	2012	Zhumadian, Henan province	KF360834	KF381398	10 <sup>-6.21</sup>
NYXY	2012	Xinye, Henan province	KF360835		10 <sup>-7.85</sup>
XCCG	2013	Changge, Henan province	KF360836		10 <sup>-7.25</sup>
SXJC2011	2011	Jincheng, Shanxi province	KF360832		10 <sup>-6.88</sup>
AHBZ2012	2012	Bozhou, Anhui province	KF360829	KF381393	10 <sup>-6.67</sup>
HBCX2013	2013	Cixian, Hebei province	KF360830	KF381394	10 <sup>-7.08</sup>
SDHZ2012	2012	Heze, Shandong province	KF360831		10 <sup>-7.12</sup>
LYYY2011	2011	Yiyang, Henan province		KF381395	10 <sup>-6.95</sup>
PYQF2013	2013	Yiyang, Henan province		KF381396	10 <sup>-7.32</sup>
SDCX2011	2011	Caodian, Shandong province		KF381397	10 <sup>-6.88</sup>
PRV-SH	1999	Shanghai Municipality	AF207700		10 <sup>-6.68</sup>
GDSH	2007	Guangdong province	EF552427		10 <sup>-8.0</sup>
HNJZ	2008	Henan province	EU561349		
Guizhou-DY	2012	Guizhou province	JX417716		
Ea	1998	Hubei province		AF080571	
LA	2002	Shandong province		AY173125	10 <sup>-8.62</sup>
Min-A	2003	Henan province		AY171242	10 <sup>-7.0</sup>
PRV-FZ	2008	Fujian province		FJ477295	10 <sup>-6.60</sup>
SL	2011	Sichuan province		HQ229001	

表 4 仔猪免疫攻毒保护试验结果

Table 4 The results of protective test against PRV in young pigs

Group	Protective number/ Pig number	Protective rate	Incidence
NYXY strain infection	4/4	100%	All no clinical response
PYQF2013 strain infection	4/4	100%	All no clinical response
Infection control	0/8	0%	All sick
Normal control	4/4	100%	All no clinical response

4 PEDV“返饲”病料和疫苗中 PRV 野毒污染检测结果

在送检的 905 份肠道组织中, 共检测出 PRV 野毒阳性样品 366 份, 阳性检出率高达 40.44%,

说明存在着严重的 PRV 污染(表 5)。56 份疫苗样品中, 检测出 PRV 野毒阳性样品 0 份, 说明当前市售 PR 基因缺失活疫苗中并不存在 PRV 野毒污染(表 5)。

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Divergence	1	■	99.9	99.6	99.3	99.8	99.4	99.6	99.4	98.4	98.2	98.3	99.4	1	AHBZ2012
	2	0.0	■	99.6	99.4	99.8	99.5	99.6	99.4	98.5	98.3	98.4	99.5	2	HBCX2013
	3	0.4	0.4	■	99.6	99.7	99.7	99.8	99.6	98.6	98.2	98.4	99.8	3	HNPY
	4	0.7	0.6	0.4	■	99.4	99.7	99.7	99.6	98.8	98.4	98.6	99.8	4	NYXY
	5	0.2	0.2	0.3	0.6	■	99.4	99.6	99.6	98.4	98.2	98.3	99.7	5	SDHZ2012
	6	0.6	0.5	0.3	0.3	0.6	■	99.9	99.6	98.6	98.2	98.4	99.8	6	SXJC2011
	7	0.4	0.4	0.2	0.3	0.4	0.1	■	99.6	98.6	98.2	98.6	99.8	7	XCCG
	8	0.6	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	■	98.5	98.2	98.3	99.8	8	ZMD-1
	9	1.3	1.2	1.2	0.9	1.3	1.2	1.2	1.2	■	98.9	99.0	98.7	9	Guizhou-DY
	10	1.6	1.5	1.6	1.3	1.6	1.6	1.6	1.6	1.1	■	98.6	98.3	10	PRV-SH
	11	0.9	0.9	0.8	0.7	0.9	0.8	0.7	1.0	0.7	1.1	■	98.4	11	GDSH
	12	0.6	0.5	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	1.0	1.5	0.8	■	12	HNJZ
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

图1 PRV 新流行毒株 gE 基因与参考毒株的核苷酸同源性比较

Figure 1 Nucleotide homology between the gE gene of new epidemic PRV isolates and PRV reference isolates

		Percent Identity												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Divergence	1	■	99.6	99.5	99.5	99.4	99.8	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	1	ZMD-1
	2	0.4	■	99.7	99.7	99.6	99.8	99.2	98.9	99.0	99.6	99.2	2	AHBZ2012
	3	0.5	0.3	■	100.0	99.7	99.7	99.3	99.0	99.3	99.5	99.3	3	SDCX2011
	4	0.5	0.3	0.0	■	99.7	99.7	99.3	99.0	99.3	99.5	99.3	4	LYYY2011
	5	0.6	0.4	0.3	0.3	■	99.6	99.4	98.9	99.1	99.6	99.2	5	HBCX2013
	6	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	■	99.4	99.1	99.2	99.6	99.4	6	PYQF2013
	7	0.6	0.8	0.7	0.7	0.6	0.6	■	99.1	99.6	99.2	99.4	7	LA
	8	0.9	1.2	1.1	1.1	1.2	0.9	0.9	■	98.9	98.9	99.1	8	Min-A
	9	0.6	1.0	0.7	0.7	0.9	0.8	0.4	1.1	■	99.0	99.3	9	PRV-FZ
	10	0.6	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4	0.8	1.2	1.0	■	99.2	10	SL
	11	0.6	0.8	0.7	0.7	0.8	0.6	0.6	0.9	0.7	0.8	■	11	Ea
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

图2 PRV 新流行毒株 TK 基因与参考毒株的核苷酸同源性比较

Figure 2 Nucleotide homology between the TK gene of new epidemic PRV isolates and PRV reference isolates

	1		10		16														
LYYY2011	M	R	I	L	R	I	Y	L	D	G	A	Y	G	T	G	K	S	T	
SDCX2011	M	R	I	L	R	I	Y	L	D	G	A	Y	G	T	G	K	S	T	
AHBZ2012	M	R	I	L	R	I	Y	L	D	G	A	Y	G	T	G	K	S	T	
ZMD-1	M	R	I	L	R	I	Y	L	D	G	A	Y	G	T	G	K	S	T	
PYQF2013	M	R	I	L	R	I	Y	L	D	G	A	Y	G	T	G	K	S	T	
HBCX2013	M	R	I	L	R	I	Y	L	D	G	A	Y	G	T	G	K	S	T	
	100		108																
LYYY2011	P	P	E	M	T	V	V	F	D	R	H	P	V	A	A	T	V	C	F
SDCX2011	P	P	E	M	T	V	V	F	D	R	H	P	V	A	A	T	V	C	F
AHBZ2012	P	P	E	M	T	V	V	F	D	R	H	P	V	A	A	T	V	C	F
ZMD-1	P	P	E	M	T	V	V	F	D	R	H	P	V	A	A	T	V	C	F
PYQF2013	P	P	E	M	T	V	V	F	D	R	H	P	V	A	A	T	V	C	F
HBCX2013	P	P	E	M	T	V	V	F	D	R	H	P	V	A	A	T	V	C	F

图3 TK 基因氨基酸序列比较

Figure 3 Comparison of amino acid sequences of TK gene

5 疫苗效价测定结果 56 份 PR 基因缺失活疫苗中,每头份的病毒含量均  $\geq 10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>, 远高于规程标准的 5 000 TCID<sub>50</sub>, 说明当前市售疫苗的效价普遍很高,依然有效。

## 讨 论

PR 是危害养猪业最重要的传染病之一,曾在本世纪初于中国大面积暴发疫情,自 2003 年起,以 Bartha K-61 株和 HB-98 株为代表的基因工程缺失疫苗广泛投入使用,同时结合野毒感染监测技术,使得 PRV 的感染率和危害在随后很长时间内显著降低。周绪斌等(2007 年)对全国 11 个省市规模化猪场进行 PRV 野毒感染监测,总阳性率仅为

14.8%，种猪群阳性率为 18.2%，其中河南省阳性率为 16.0%<sup>[2]</sup>；程晶等(2009 年)对 2006~2008 年间我国部分地区规模化猪场开展 PRV 野毒感染监测，总阳性率为 23.40%，其中河南省仅为 8%<sup>[11]</sup>；庄金山等(2010 年)对河南省规模化猪场 PRV 野毒感染监测结果表明，种猪阳性率仅为 8.42%，仔猪

和生长猪阳性率分别为 11.54%和 8.97%<sup>[12]</sup>。本研究中，河南省及周边省份 PRV 野毒感染阳性猪场检出率高达 68.06%，血清总阳性率为 38.47%，种母猪、种公猪、后备猪和商品猪的阳性率分别上升至 40.12%、30.88%、54.67%和 26.52%，表明 2011 年后该区域猪群中的 PRV 野毒感染率大幅攀升。

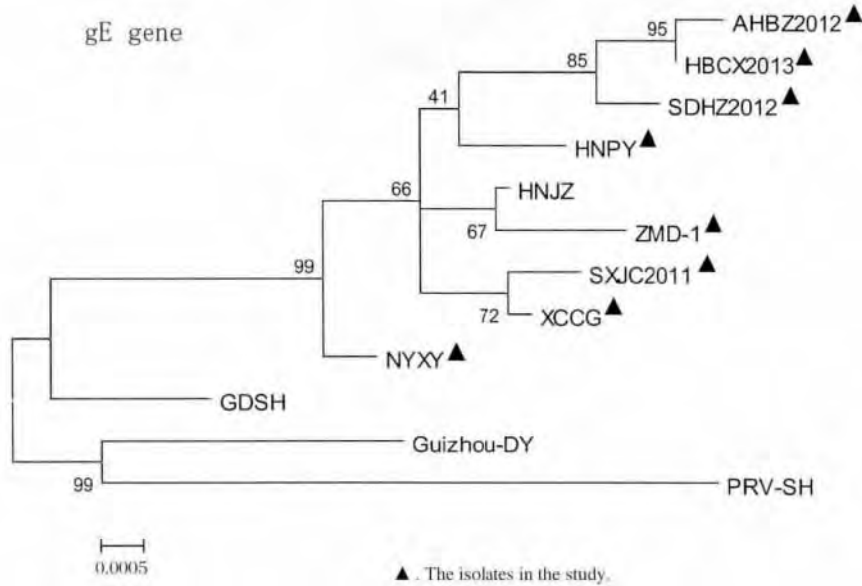


图 4 基于 PRV gE 基因序列的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on PRV gE gene sequences

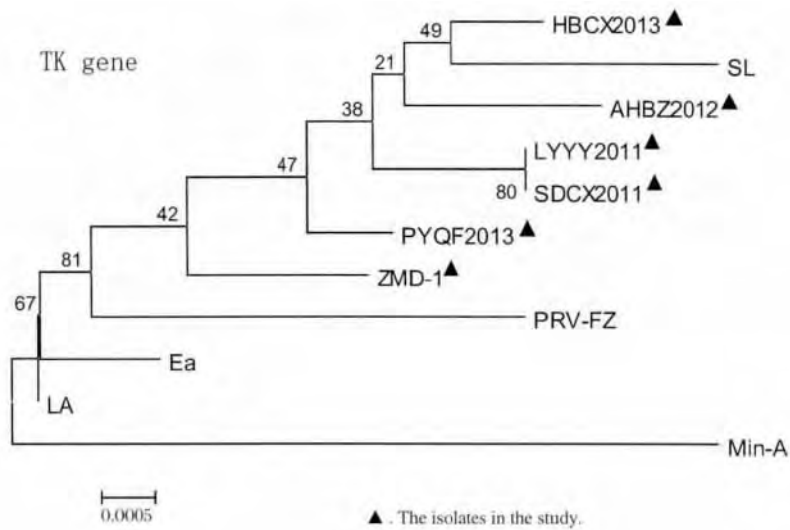


图 5 基于 PRV TK 基因序列的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree based on PRV TK gene sequences

表 5 PEDV 返饲病料和 PR 基因缺失活疫苗中 PRV 野毒污染检测结果

Table 5 The results of PRV field pollution from PEDV back-feeding tissues and PR gene deleted live vaccines

PRV field pollution from PEDV back-feeding tissues			PRV field pollution from PR gene deleted live vaccines		
Tissue number	Positive number	Positive rate(%)	Vaccine number	Positive number	Positive rate(%)
905	366	40.44	56	0	0

PRV 野毒感染率大幅上升时,首先要考虑病毒的主要毒力基因是否发生变异或疫苗中是否普遍污染强毒。将 6 株 PRV 新流行毒株的 TK 基因与不同年代的中国参考毒株进行比较分析,核苷酸和氨基酸的同源性分别高达 98.9% 和 97.5% 以上,这些毒株都具有疱疹病毒 TK 家族的两个活性中心,ATP 结合结构域由 3 个氨基酸残基形成一个疏水的袋状构象,这 3 个氨基酸序列对疱疹病毒的毒力有很大影响,若其中 3 个甘氨酸残基(G)中有一个发生突变,就会影响 TK 蛋白的构象及其与 ATP 的结合,进而导致 TK 蛋白活性丧失<sup>[13]</sup>。核苷酸结合结构域在所有疱疹病毒中最为保守,其中的天冬氨酸残基是结合 Mg-NTP 的前体,其前有一疏水的 B-折叠片,天冬氨酸残基对 TK 蛋白的催化活性极其重要<sup>[14]</sup>。gE 基因第 125 位(半胱氨酸)、126 位(缬氨酸)的氨基酸缺失,可打断 gE/gI 复合体的结构,以致灭活 gI 和 gE 复合体的功能,它们的突变或缺失与整个 gE 基因缺失一样可降低毒力<sup>[15]</sup>。8 株 PRV 新流行毒株的 gE 基因与参考毒株的核苷酸同源性很高,推导的氨基酸序列仅在个别位点发生变异,但上述 2 位氨基酸都没有发生异常改变,表明其毒力未出现明显变异,可推定这些当前流行的新毒株均属于强毒,毒价测定结果证实它们的毒力较经典毒株变化不大。gE 蛋白 N 端的第 33~100 位氨基酸区段具有高度的抗原性和免疫原性<sup>[16]</sup>,新流行毒株和参考毒株的氨基酸在该区都非常保守,因此突变位点的氨基酸对抗原性影响并不显著,提示当前的疫苗应能有效抵御这些强毒株的攻击,免疫攻毒保护试验的结果也有力的支持了这一观点。但 PRV 的毒力由多种基因协同控制,因此针对其他毒力基因的研究仍需进一步开展。鉴于疫苗中必须缺失 gE 基因,因此在疫苗或疑似病料组织中检测到 gE 基因阳性即可判定为污染 PRV 强毒。56 份疫苗样品中,PRV 野毒检出率为 0%,证明现用疫苗中并未普遍存在野毒污染。因此,病毒变异和疫苗污染野毒可能不是造成 2011 年后该区域 PRV 野毒大面积感染猪群的主要原因。

笔者长期从事猪病临床诊断与实验室研究工作,发现在养猪实际生产中,一般只对生产母猪和商品猪进行监测,种公猪的野毒感染检测几乎为空白。实际上只要部分种公猪感染 PRV 野毒,便可通过精液在母猪群中迅速扩散。因此,我们建议疫情严重的猪场送检种公猪血清进行检测,发现总阳性率高达 30.88%,其中规模化猪场为 32.35%,中小型

猪场为 20.59%,部分猪场甚至 100% 带毒。这一研究结果与以往中小型猪场的 PRV 野毒感染率多高于规模化猪场的传统观点相反,其原因应是规模化猪场采用人工授精技术,种公猪使用年限较长,感染野毒机会相对较多,加之多数种公猪富有攻击性,难以接近,使得规模化猪场的技术人员责任心不如以家庭式养殖为模式的中小型猪场畜主强,疫苗接种的确切性难以落实到位。后备猪群中阳性率高达 54.67%,规模化猪场带毒率明显高于中小型猪场,表明存在着极为严重的 PRV 野毒感染。后备猪在引入或留种时,应 100% 进行 PRV 野毒检测,但实际上该工作在生产实践中形同虚设,加之猪场多把后备猪与育肥猪混养,更进一步增加了野毒感染机率。由于 PRV 为疱疹病毒,感染后备猪后可长期甚至终身带毒,通过水平或垂直传播方式使得猪群总感染率快速上升。

自 2010 年冬季至今,以 PEDV 为主要致病因素的新生仔猪急性腹泻疫情在国内广泛流行,已成为猪场常发传染病之一,是当前造成仔猪高死亡率的最主要原因。由于当前 PEDV 流行毒株极难分离,主要免疫原性基因相比于疫苗毒株 CV777,也已发生较大变异<sup>[17]</sup>,使得现有商品疫苗并不能产生确切的免疫效果。因此,近两年来绝大多数猪场在发生疫情时,均通过使用病死仔猪的肠内容物饲喂母猪进行“强毒返饲”,使之产生高水平母源抗体以通过天然被动免疫的方式来保护初生仔猪,短期内取得了良好效果。但随之而来的问题是,妊娠母猪接种 PR 疫苗可有效阻止感染后出现临床表现,但仍有可能被野毒感染形成潜伏,而潜伏感染的病毒一旦被激活即可引起散播,这种“潜伏-激活”循环机理决定了 PRV 在种猪群中持续存在,并可通过垂直传播使病毒侵入胎儿,造成新生仔猪长期的严重带毒,使其消化道和免疫器官功能不健全,当各类消化系统致病因子侵入消化道时,便会出现共同症状为腹泻,使疫情更为严重和复杂化。本研究证实用于“返饲”的新生仔猪肠道组织中,PRV 野毒阳性检出率高达 44.09%,污染极为严重,而猪自然感染本病的传播途径主要是口腔与鼻道,因此这应是该区域猪群中 PRV 野毒感染率大幅升高的另一个重要原因。

根据以上研究结果,笔者认为种公猪、后备猪普遍带毒和 PEDV“返饲”病料中严重污染 PRV 野毒,是造成当前河南及周边省份猪群中 PRV 大面积感染和疫情快速反弹的主要原因。因此建议各猪场应

广泛开展种公猪和后备猪 PRV 带毒状况监测预警工作,完全掌握其健康状况,一旦发现阳性病例,立即淘汰,从源头上加强防控;同时开展 PEDV“返饲”病料中 PRV 野毒的检测,若结果呈阳性,应立即进行灭活或停止使用。

#### 参考文献:

- [1] 周斌,苏鑫铭,张素芳,等. PCR 快速检测伪狂犬病病毒野毒感染[J]. 中国病毒学,2004,19(6):6-7.
- [2] 周绪斌,秦云,丹尼,等. 2007 年规模化猪场伪狂犬病野毒血清流行病学系统监测与分析[J]. 猪业科学,2008,25(10):84-90.
- [3] 白挨泉,王晓清,甄劲松,等. 广东部分集约化猪场猪伪狂犬病病毒野毒感染的血清学调查[J]. 中国畜牧兽医,2005,32(3):55-27.
- [4] 斯特劳等,猪病学[M]. 北京:中国农业出版社,2008:465-480.
- [5] 王勤. 猪伪狂犬病病毒 gE 基因的研究进展[J]. 畜牧与兽医,2002,34(10):42-44.
- [6] 仇华吉,周彦君,孔令达,等. 伪狂犬病病毒 Bartha. K61 株 TK 基因的分离鉴定[J]. 中国兽医科技,2000,30(3):6-7.
- [7] Schang L M, OSorio F A. Quantitative of latency established by attenuated strains of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus[J]. J virol Methods, 1994, 50(1-3): 269-280.
- [8] 陈弟诗. 猪乙型脑炎病毒-细小病毒-伪狂犬病毒活载体疫苗的研究[D]. 四川农业大学,2011.
- [9] 王小玉,李小欢,郭万柱,等. 猪伪狂犬病病毒四川株的分离鉴定及 UL43 基因序列分析[J]. 畜牧与兽医,2010,42(10):10-14.
- [10] 舒银辉,黄文辉,饶清宜,等. 猪伪狂犬病灭活疫苗(HB-J 株)对兔与猪免疫攻毒保护平行关系研究[J]. 中国兽药杂志,2012,46(10):5-8.
- [11] 程晶,陈艳红,荫硕焱,等. 2006~2008 年我国部分地区规模化猪场 PRV 血清流行病学调查[J]. 中国动物传染病学报,2009,17(1):67-71.
- [12] 庄金山,刘红军,郭丽霞,等. 2010 年河南省部分规模化猪场伪狂犬病野毒株感染的血清学调查[J]. 河南畜牧兽医,2011,32(4):24-26.
- [13] 黄艺珠,张渊魁,魏建超,等. 猪伪狂犬病毒 SD 株的分离鉴定及 TK 基因序列分析[J]. 畜牧与兽医,2013,45(4):62-67.
- [14] 刘文波,周斌,黄兵,等. 传染性喉气管炎病毒烟台株 TK 基因序列测定及 TK 蛋白功能初步分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(10):75-79.
- [15] 白丽丽,王旭荣,刘建营,等. 伪狂犬病毒 GDSH 株的分离鉴定及 gE 基因的序列分析[J]. 中国动物检疫,2008,25(1):23-26.
- [16] Fuehs W H, Rziha J, Lukaes N, et al Pseudorabies virus glycoprotein gI: in vitro and in vivo analysis of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 1990, 71: 1141-1151.
- [17] 郑逢梅,霍金耀,赵军,等. 2010~2012 年华中地区猪流行性腹泻病毒分子特征和遗传进化分析[J]. 病毒学报,2013,29(2):797-204.



## Investigation of Etiology of Massive Infection with Porcine Pseudorabies Virus in Henan and Neighboring Provinces

CHANG Hong-tao<sup>1</sup>, LIU Hui-min<sup>1,2</sup>, GUO Zhan-da<sup>1</sup>, DU Ji-mei<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>1</sup>,  
CHEN Lu<sup>1</sup>, YANG Xia<sup>1</sup>, WANG Xin-wei<sup>1</sup>, YAO Hui-xia<sup>1</sup>, WANG Chuan-qing<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** In early 2011, the serious outbreak of porcine pseudorabies virus (PRV) infection suddenly re-occurred in Henan and neighboring Provinces. To investigate the etiology of massive infection with PRV, 16 800 serum samples, 905 porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) back-feeding tissues, and 56 PR gene deleted live vaccines were collected from January 2011 to May 2013 to detect PRV field infection using a PRV gE antibody test kit. The gE and TK genes of 11 new epidemic PRV strains were sequenced by PCR, and their molecular characteristics were analyzed. Moreover, virus titer determination, protective test against PRV, and vaccine potency testing were performed. The results showed that the detection rate of PRV field infection-positive pig farms was 68.06%, and the overall positive rate of PRV field infection in serum was 38.47%; the positive rates in breeding sows, breeding boars, reserve pigs, and commercial pigs were 40.12%, 30.88%, 54.67%, and 26.52%, respectively. The new epidemic strains were in the same evolutionary branch and belonged to the virulent strain group. Compared with the classical PRV strain, the virulence of new epidemic strains changed a little. The length of gE gene was 1 787 bp, and the length of TK gene was 963 bp. The nucleotide homologies of gE and TK genes to Chinese reference strains were 98.2%-99.8% and 98.9%-99.6%, respectively, and the amino acid homologies were 97.1%-99.8% and 97.5%-99.4%, respectively. Commercial vaccine had a 100% protective effect against the new epidemic strains. The positive rate of PRV field infection was 0% in vaccine and 40.44% in back-feeding tissues. The results confirmed that PRV field infection rates were rising sharply among pigs in Henan and neighboring Provinces after 2011. The main virulence genes of new epidemic PRV strains did not change significantly over the years. PR gene deleted live vaccines had no PRV field infection and could completely resist the attack of new strains. The virus carriage of breeding boars and reserve pigs and the serious PRV field infection in PEDV back-feeding tissues were the main causative factors for massive infection with PRV and epidemic outbreak in Henan and neighboring Provinces from 2011 to 2013.

**Key words:** Henan and neighboring Provinces; Porcine pseudorabies virus; Field virus; Etiology

\* Corresponding author: WANG Chuan-qing, E-mail: wchuanq@163.com