

伪狂犬病病毒上海株 gE⁻/gI⁻/GFP⁺ 缺失株的生物学特性初步研究*

姜焱**, 周斌, 陈溥言

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏南京 210095)

Primary Study of the Biological Characteristics of Pseudorabies Virus
Gene-Deleted Vaccine Strain

JIANG Yan**, ZHOU Bin, CHEN Pu-yan

(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic & Immunology of Agricultural Ministry, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: On the basis of construction the transfer vector pgEI-GFP of Pseudorabies virus SH strain BHK-21, which was infected with PRV-SH for 1-2h, were transfected with the complex of pgEI-GFP and DOTAPA deletion mutant was selected and purified 3-4 times in BHK-21 cell through GFP. In the research here, we investigated the gE⁻/gI⁻/GFP⁺ PRV vaccine strain growth properties in cultured cells, its safety for rabbits, its LD50 for mice, its safety and immunity for postweaning piglets, and its biological properties. The results suggested that gE and gI genes deletion may not affect PRV's propagation in cultured cells, nor the typical PRV plaque forming. The investigated results demonstrated that the virulence of gE⁻/gI⁻/GFP⁺ was reduced when compared with that of PRV-SH. The inoculation of gE⁻/gI⁻/GFP⁺ couldn't harm the post-weaning pigs, couldn't induce the viral spread in surroundings. The period of fever and the number of days of existing virus in treated group pigs were less than that in the control group after big dose of RPV-SH were used to equally attack the treated and control group pigs through ear veins 5 weeks later. gE⁻/gI⁻/GFP⁺ could always induce the high titer PRV neutralizing antibodies throughout the experiment.

Key words: gE⁻/gI⁻/GFP⁺ gene-deleted vaccine strain; Biological characteristics; Anti-PRV antibody

摘要: 在构建了伪狂犬病病毒上海株的缺失载体 pgEI-GFP 基础上, 将 pgEI-GFP 转染感染了 PRV-SH 株的 BHK-21 细胞, 待出现 80% 以上的细胞病变时收获病毒, 并以绿色荧光蛋白为标志, 通过蚀斑法得到纯化重组病毒 gE⁻/gI⁻/GFP⁺ 缺失株。研究了该缺失株的安全性、在细胞上的生长特性以及对断奶仔猪的安全性、免疫原性等生物学特性。试验结果显示, 缺失了 gE 和 gI 后, 不影响其在 RK 细胞上的生长状况和病毒的滴度。该疫苗株对小鼠的半数致死量比亲本毒低且对家兔的致死性的时间延长了, 这表明该疫苗的毒力比亲本毒有所下降。该缺失株对断奶仔猪安全, 无不良接种反应, 接种断奶仔猪能抵御高剂量 PRV-SH 株强毒的感染, 攻毒后试验猪的发热期、散毒天数均低于对照组。该缺失株接种仔猪后在试验期间一直维持较高水平的中和抗体。

关键词: gE⁻/gI⁻/GFP⁺ 缺失株; 生物学特性; 中和抗体滴度

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0607-05

伪狂犬病(Pseudorabies, PR)是由疱疹病毒科, α-疱疹病毒亚科的伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus,

PRV)引起的多种家畜和野生动物的以发热、奇痒及脑脊髓炎为主要症状的一种急性传染病^[1]。猪是本

收稿日期: 2004-05-28, 修回日期: 2004-07-20

* 基金项目: 上海市农委重点攻关课题 (98-05-7)

** 通讯作者: 姜焱 (1972-), 女, 博士。现工作单位: 江苏出入境检验检疫局动检实验室 (南京 中华路 99 号, 210001)。

Corresponding author. E-mail: jiangyan1029@yahoo.com.cn

病的原发感染宿主, 又是病毒的长期储存和排毒者。目前, 该病在世界上分布广泛, 并有不断蔓延扩大的趋势。据专家估计, 其已成为仅次于口蹄疫和猪瘟的危害养猪业的重要疫病。疫苗接种是防制伪狂犬病的重要手段之一。常规疫苗在接种后虽然能预防临床症状的出现, 但不能防止强毒在被感染动物体内复制、排出。利用基因缺失疫苗免疫并结合 gE-ELISA 检测抗 gE 抗体来区分接种血清阳性猪和野毒感染血清阳性猪。这种接种 gE 基因缺失疫苗结合鉴别性诊断能力现在已成为在美国和各欧共体成员国及中国台湾地区推广的规章化的伪狂犬病消除计划的理论基础。

本试验拟通过对自行构建的伪狂犬病上海株 gE/gI/GFP⁺ 基因缺失疫苗株的某些生物学特性的研究并通过与常规疫苗 Bartha 株进行比较, 确定其免疫原性, 评估其作为疫苗应用的前景, 以及为进一步研究 PRV 在宿主体内的感染机制提供理论依据, 以加速伪狂犬病基因缺失疫苗在我国用于防制和根除伪狂犬病的进程。

1 材料和方法

1.1 病毒和细胞

PRV-SH 株和 RK 细胞、BHK-21 细胞由南京农业大学传染病组保存, gE/gI/GFP⁺ 缺失株的构建见参考文献^[2]。

1.2 试验动物

6 周龄断奶仔猪, 为长白×约克×太湖三元杂交猪, 由南京象山种猪场提供。ICR 小鼠和家兔由南京军区总医院实验动物房提供。所有动物在试验前均采用乳胶凝集试验检测结果为伪狂犬病病毒血清学阴性。试验在严格隔离条件下进行。

1.3 重组病毒的构建及筛选

按 DOTAP 的说明书将 pgEI-GFP 转染感染了 PRV-SH 株的 BHK-21 单层细胞, 待出现 80% 以上的病变时收获病毒, 冻融三次离心去细胞碎片, 将病毒液作 1:10 稀释, 取 5 μL-10 μL 接种培养于直径为 60mm 平皿内的次代 BHK-21 细胞, 待出现单个分散的病毒时, 在荧光显微镜下观察, 找出含荧光的蚀斑, 用吸管将其吸出, 置于 0.5 μl 细胞培养维持液中, 冻融三次, 于 96 孔板稀释纯化带荧光的病毒 3~4 次, 即可得到稳定和纯化的重组病毒。

1.4 gE/gI/GFP⁺ 缺失株在 RK 细胞上的生长特性

以 10³ TCID₅₀ 的 PRV gE/gI/GFP⁺ 缺失株与 PRV-SH 株分别接种已长满方瓶的 RK 细胞, 分别在接种后培养 4h、8h、12h、24h、36h 和 42h 取出

方瓶收获病毒, -20℃~37℃冻融 3 次, 测定所收获病毒的 TCID₅₀。

1.5 gE/gI/GFP⁺ 缺失株在 RK 细胞上致病变效应的观察

选已长成致密单层的 RK 细胞的方瓶, 弃营养液后, 加入 0.01ml PRV gE/gI/GFP⁺ 缺失株 (100 TCID₅₀), 37℃感作 1h 后, 再加入含 2% 犊牛血清的 MEM 营养液, 37℃下置于含 5% CO₂ 培养箱继续培养。观察细胞病变的形成及发展变化过程。

1.6 小鼠半数致死量的测定(LD₅₀)

小鼠 LD₅₀ 的测定方法按参考文献^[3]进行测定。将 50 只小鼠随机分成 10 组, PRV-SH 株接种 5 组, 接种的稀释度分别为 PRV10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸; gE/gI/GFP⁺ 株接种 5 组, 稀释度分别为: 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶。

1.7 gE/gI/GFP⁺ 缺失株对家兔的安全性

以 10⁶ TCID₅₀ 的剂量的 PRV-SH 和 gE/gI/GFP⁺ 缺失株接种家兔的后腿内测的肌肉, 观察其临床症状及其死亡时间。

1.8 gE/gI/GFP⁺ 缺失株灭活疫苗按参考文献^[4]自己制备。

1.9 gE/gI/GFP⁺ 缺失株免疫效力测定试验

1.9.1 试验动物分组情况: 取 20 头 6 周龄的断奶仔猪, 随机分成 4 组。gE/gI/GFP⁺ 缺失株活苗组: 5 头, 颈部肌肉注射 1 头份。gE/gI/GFP⁺ 缺失株灭活苗组, 5 头, 颈部肌肉注射 1 头份。Bartha 株灭活苗组: 5 头, 按使用说明接种。对照组: 5 头, 颈部肌肉注射 MEM 营养液 3mL。

接种后临床症状的观察指标:

(1) 精神状态观察: 每天观察 2 次, 早晚各一次, 主要是观察其精神状态是否沉郁及其采食量的变化, 连续观察 2 周;

(2) 体温变化的测量: 每天测量 2 次, 早晚各一次 (直肠温度), 连续测量 2 周;

免疫接种后第 5 周, 用 3×10⁶ TCID₅₀ 的 PRV-SH 株进行耳静脉攻毒各组试验猪。在攻毒后的一周内, 每日观察一次猪只的反应, 测一次肠温。

1.9.2 鼻分泌液的收集、处理和病毒的分离: 分别在接种和攻毒的前 1d 和后 7d, 用灭菌棉签插入试验猪鼻腔内, 轻轻拭擦, 将棉拭子迅速浸入含有 2-5mL pH 中性的 Hanks 平衡盐溶液的小青瓶中, 加入 0.5% 的牛血清白蛋白, 同时加入双抗。充分挤压、涮洗棉拭子, 将小青瓶置入预冷至 -20℃ 的酒精中迅速冰冻, 然后迅速移至 37℃ 水浴锅中融化, 反复冻融 3 次, 收集液体部分, 以 2000r/min 离心 15min,

吸取上清液作接种用。

1.10 试验猪接种后抗体消长曲线的测定

各试验猪在接种前经耳静脉采血测定其母源抗体, 然后在免疫接种后和攻毒后, 每周采血一次, 分离血清, 按参考文献[1] 采用固定病毒稀释血清法测定中和抗体效价。以时间为横坐标, 中和抗体效价为纵坐标。绘制抗体消长曲线。

2 结果

2.1 重组病毒筛选

按 DOTAP 的说明书将 pgEI-GFP 转染感染了 PRV-SH 株的 BHK-21 单层细胞, 待出现 80% 以上的病变时收获病毒。将收获的病毒稀释后接种 BHK-21 细胞, 以绿色荧光蛋白为标志, 利用荧光显微镜通过蚀斑法得到纯化重组病毒 (如图 1)。

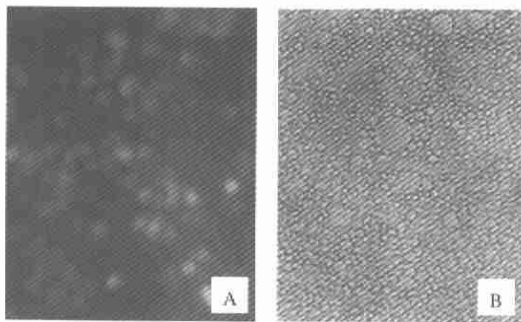


图 1 PRV gE/gI 缺失重组病毒在 BHK-21 细胞上的荧光
Fig1 The result of screening the recombinant PRV gE/gI by fluorescence on BHK-21 cell

A: Fluorescence of PRV gE/gI strain on BHK-21; B: CPE infected by PRV gE/gI strain on BHK-21.

2.2 gE/gI/GFP⁺ 缺失株在 RK 细胞上的生长特性

gE/gI/GFP⁺ 缺失株和 PRV-SH 在 RK 细胞上两者都具有较好的增殖能力, 它们的 TCID₅₀ 最终滴度均可达 10^{6.0}/0.1mL。PRV-SH 株为 10^{6.1}/0.1mL, gE/gI/GFP⁺ 缺失株为 10^{5.9}/0.1mL, 说明 gE/gI 缺失后并不影响病毒在细胞上的增殖, 这与 gE/gI 基因为 PRV 增殖的非必需基因的结论是一致的 (图 2)。同时对缺失株和野毒株在 RK 细胞上形成的空斑大小进行了比较, 结果发现两者无明显差别。

2.3 gE/gI/GFP⁺ 缺失株在 RK 细胞上致病变效应过程

rmPRV 缺失株在接种 RK 细胞后第 12 小时, 引起细胞变圆变亮, 集聚成团; 第 18h, 可见局部细胞萎缩, 细胞界限消失; 第 24h 有少量细胞脱落, 形成小的蚀斑 (图 3A); 第 26h, 蚀斑进一步扩大;

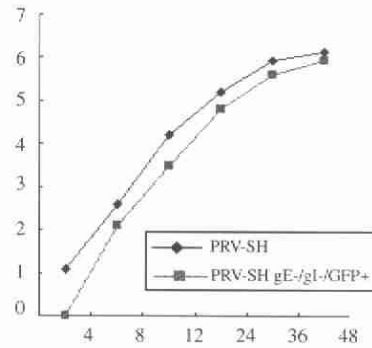


图 2 PRV-SH 株和 PRV-SH gE/gI/GFP⁺ 在 RK 细胞上的生长曲线

Fig.2 One-step growth kinetics of PRV-SH gE/gI/GFP⁺ and PRV-SH in normal RK

第 30h, 约有 50% 的区域, 形成中等大小的蚀斑, 蚀斑边缘的细胞面向下凹陷, 形成特征性的“空洞” (图 3B); 第 36h, 相邻的蚀斑相互融合形成较大的蚀斑。第 40h 形成的蚀斑面积可占总面积的 90%。合胞体形成减少。

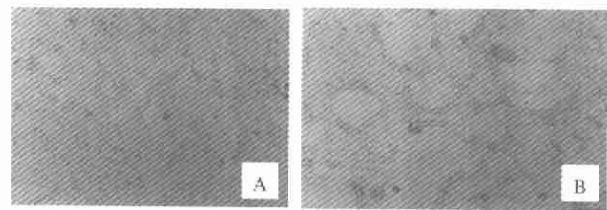


图 3 PRV gE/gI/GFP⁺ 接种 RK 细胞后的病变

Fig.3 CPE of PRV gE/gI/GFP⁺ on RK cells

A, 24hpi; B, 30hpi

2.4 小鼠半数致死量的测定

重组病毒和 PRV-SH 细胞培养物经过 10 倍的连续稀释后, 以 0.2mL 腹部皮下注射小鼠, 同时设一对照组。连续观察了 15d, 在第 4 天, PRV-SH 组的一些小鼠出现啃咬症状, 然后死亡, 而缺失株的试验组直到第 7 天才有啃咬的临床症状, 对照组一切正常。各组的死亡情况统计如表 1。

表 1 小鼠接种病毒后死亡情况

| Dilute of inoculation | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ |
|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| PRV-SH(Number of Death) | 5 | 3 | 2 | 0 | 0 |
| Dilute of inoculation | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
| RPRV-SH(Number of Death) | 5 | 4 | 2 | 0 | 0 |

按参考文献^[1] 计算出重组病毒和 PRV-SH 对小鼠半数致死量。PRV-SH 株和 gE/gI/GFP⁺ 缺失株的 LD₅₀ 分别为 5.5 和 3.68。

2.5 gE/gI/GFP⁺ 缺失株对家兔的安全性

以 10^6 TCID₅₀ 的剂量的 PRV-SH 和 gE/gI/GFP⁺ 缺失株接种兔子的后腿内测的肌肉, PRV-SH 株在接种后 12h 即出现啃咬症状, 精神状况沉郁, 采食量明显降低, 后腿内测被啃咬后出血, 接种后 36h 即死亡。而重组毒接种后精神状况比较好, 食欲正常, 直到接种后 6d 才出现啃咬症状, 到第 8 天死亡。

2.6 试验猪在接种后反应

所有试验猪接种后, 体温正常, 未见其他如食欲降低、接种部位发生炎症反应等接种副反应。

2.7 试验猪在攻毒后的反应

2.7.1 临床症状: gE/gI/GFP⁺ 缺失株活苗接种猪在攻毒后第 3 天出现发热, 而另两组灭活苗接种猪在攻毒后第 2 天出现发热, 所有疫苗接种猪都出现了轻微的精神沉郁、食欲降低等症状, 且在攻毒后第 5 天时均恢复正常。

然而, 未接种疫苗的对照猪在攻毒后, 24h 内即出现发热、精神沉郁、厌食, 继而发展为口鼻分泌液增多、眼睛发炎、拉稀等症状, 攻毒后第 7 天均恢复正常。

2.7.2 体温变化: 攻毒后, gE/gI/GFP⁺ 缺失株活苗组、gE/gI/GFP⁺ 缺失株灭活组、Bartha 株油苗接种组和未接种对照组各试验猪的平均发热期分别为 4d, 6d 和 5d (图 4)。

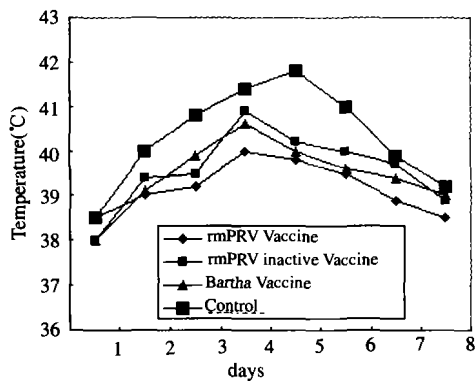


图 4 攻毒后试验猪平均体温变化曲线

Fig.4 The average of temperture of pigs infected by virulent PRV-SH strains

2.8 鼻分泌液中病毒的分离

应用 gE/gI/GFP⁺ 缺失株接种后, 未能从接种猪的鼻拭子样品中分离出病毒。攻毒后的第 2 天起, 均能从各攻毒试验猪鼻拭子样品中分离出病毒。gE/gI/GFP⁺ 缺失株活苗接种猪散播病毒的天数 (平均为 6d) 略少于 gE/gI/GFP⁺ 缺失株油苗 (平均为 8d) 和 Bartha 株油苗接种猪 (平均为 8d)。与

对照组 (平均为 14d) 相比, 接种疫苗的猪散播病毒的天数远远低于对照组。

2.9 血清中和抗体效价测定的结果

接种疫苗和攻毒之前的猪经耳静脉采血, 分离血清, 以后每周采一次血, 直到试验结束。采用固定病毒稀释血清法测定中和抗体效价, 绘制抗体消长曲线 (图 5)。

结果表明: 疫苗接种猪在第 1 周即产生抗体, 随后抗体水平急剧上升, 直至实验结束时仍维持较高的中和抗体水平。

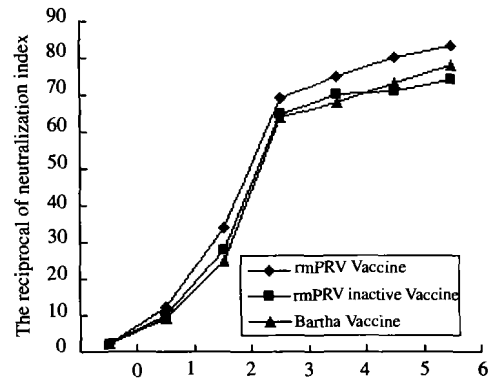


图 5 各组试验猪中和抗体消长曲线
Fig.5 The average anti-PRV antibody

3 讨论

灭活病毒液的检查结果表明病毒悬液经最终浓度为 0.1% 的甲醛处理后, 接种细胞连续传代 2 次, 细胞未出现 CPE, 病毒对细胞的感染力完全丧失。

微量中和试验是检测猪伪狂犬病病毒抗体的可靠方法, 美国和其它许多国家将其列为法定的检测方法。伪狂犬病病毒属于疱疹病毒科, 中和抗体效价不高, 在其判定上, 有不少学者以血清 1:2 的稀释度是否出现 CPE 作为标准, 同时也有许多学者认为动物体的中和抗体效价小于 1:2 时, 也不能说明动物就一定是阴性, 没有感染伪狂犬病病毒。此外, 伪狂犬病的免疫机理也很复杂, 既有体液免疫, 又有细胞的参与。有的学者通过试验得出: 某些动物经注射疫苗后, 中和抗体水平没有阳转, 但通过攻毒试验, 同样具有保护性。该病毒的这些特性, 给伪狂犬病的临床诊断和疫苗效果的判断标准带来了复杂性。目前, 一般将疫苗效果的界限定为中和效价为 $\geq 1:2$ 或中和抗体指数 $\geq 10^{2.5}$ (指数幂为 316) 时为血清抗体阳性。

在攻毒试验中, 免疫组只出现了轻微的临床症状, 而对照组虽然出现了较重的临床症状, 但 7d 以后都恢复了正常, 而没有出现死亡情况。这可能

是因为猪对伪狂犬病病毒的抵抗力与其年龄有依赖关系。本试验中免疫接种的猪为 6 周龄断奶仔猪, 免疫后 5 周才进行攻毒, 此时猪已有 11 周龄, 本身对伪狂犬病病毒的敏感性降低了, 所以对照组的猪均耐过。这个结果与 Lazenburg 等报道的结果是一致的, 他用 PRV 783 株免疫后用 NIA-3 株攻毒, 对照组的试验猪均耐过了攻毒感染^[5]。对于伪狂犬病基因缺失苗免疫结果是受多方面的影响, 如接种程序、接种途径及接种剂量等, 这些问题都有待进一步探讨。

在试验过程中, 每周都对试验猪的抗体水平进行了检测, 接种疫苗猪在第 2 周就产生了中和抗体, 在整个试验过程中一直保持较高的水平, 所测结果与四川农大所构建的 SA215 株接种猪后产生抗体水平相当^[6], 而部分值高于 PRV 783 株接种猪后产生的抗体水平^[7]。一般认为, 抗体效价与保护作用之间无明显相关性, 但 SN 效价在 1: 10 以上的动物通常可得到保护。

参考文献

- [1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 姜 焱, 侯玉峰, 陈溥言. 伪狂犬病病毒上海株(PRV-SH)gE-/gI-/GFP+缺失株的构建[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 15-20.
- [3] 曹澍泽, 郭玉璞, 董国雄, 等. 兽医微生物学及免疫学技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社.
- [4] 王明俊, 冀锡霖, 胡嘉骥, 等. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [5] Nauwynck H J, Pensaert M B. Abortion induced by cell-associated pseudorabies virus in vaccinated sows[J]. Am J Vet Res. 1992, 53(4): 489-493.
- [6] 陈 陆, 郭万柱, 徐志文, 等. 伪狂犬病基因缺失株(SA215)某些生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22: 153-156.
- [7] van Oirschot J T, Daus F, Kimman T G, *et al.* Antibody response to glycoprotein I in maternally immune pigs exposed to a mildly virulent strain of pseudorabies virus[J]. Am J Vet Res. 1991, 52(11): 1788-1793.