

马传染性贫血病毒美洲流行株与我国弱毒疫苗株 鉴别诊断方法的研究

耿庆华, 王晓钧, 赵立平, 吕晓玲, 沈荣显, 相文华**

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨, 150001)

The Study on the Differentiation between the EIAV American prevalent strain and Attenuated Vaccine strain

GENG Qing-hua, WANG Xiao-lun, ZHAO Li-ping, LV Xiao-ling, SHEN Rong-xian, XIANG Wen-hua**
(Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China)

Abstract: In order to develop an assay to distinguish the infection of *Equine infectious anemia virus* (EIAV) American strains from Donkey-leukocyte attenuated virus (DLV) strain, eight primers were designed based on the comparison of complete sequences of four EIAV American strains and DLV. Corresponding viral genome fragments were amplified and analyzed from donkey leucocytes by PCR using these eight primers. Four primers from *gag* gene were selected to detect the differences between EIAV American strains and DLV. Six horses were inoculated with DLV and two with EIAV American strains, the Wyoming strain and the Argentina strain, respectively. Two fragments, 675bp and 400bp, were amplified from DLV-infected cells, while only one segment of 675bp was obtained from cells inoculated with American strains. Our results indicate that this nest multiplex PCR can be used to distinguish EIAV American strains from the donkey leucocyte-attenuated vaccine strain of EIAV.

Key words: *Equine infectious anemia virus*; Nest multiplex PCR; Differentiate diagnosis

关键词: 马传染性贫血病毒; 巢式多重 PCR; 鉴别诊断

中国分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0081-03

马传染性贫血病毒 (*Equine infectious anemia virus*, EIAV) 是反转录病毒科慢病毒属的成员, 是马传染性贫血病的病原。二十世纪七十年代我国就研制出马传染性贫血驴白细胞弱毒疫苗, 成为世界第一个成功地应用该疫苗控制了我国的马传贫的发生^[1]。而且我国的马传贫弱毒疫苗对异源的美国、古巴和阿根廷等毒株也有很高的保护率^[2]。因此将我国的马传贫驴细胞弱毒疫苗推向国际市场成为可能。然而目前制约该苗出口的技术问题是现行的 OIE 推荐的琼脂扩散实验和 ELISA 等血清学方法不能鉴别自然感染马与我国弱毒疫苗免疫马, 针对这

个关键问题, 本试验采用 PCR 方法初步建立了一种能够鉴别美洲 (美国和阿根廷) 流行毒株感染马和我国弱毒疫苗免疫马的实验室检测方法, 为我国疫苗能在世界范围内应用提供了配套技术。

1 材料与方法

1.1 毒株和试剂

马传贫病毒阿根廷流行毒株 (Argentina-EIAV), 美国代表毒株 (Wyoming-EIAV) 和我国弱毒疫苗株 (Donkey-leukocyte attenuated virus, DLV) 由本实验室保存。rTaq 酶、PCR 反应缓冲液、dNTP 等购

收稿日期: 2005-08-09, 修回日期: 2005-11-09

作者简介: 耿庆华 (1977-), 女, 辽宁本溪籍, 博士生, 动物病毒分子生物学

** 通讯作者: 相文华 (1953-), 男, 博士, 研究员。Corresponding author. Tel: 0451-85935072, E-mail: genghua77@163.com

自大连宝生物工程公司, DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司。

1.2 引物的设计与合成

根据 Genbank 上发表的美国毒株序列及本试验测定的 Argentina-EIAV 序列和我国弱毒疫苗株的序列而设计了八条引物, 由上海生物工程技术服务有限公司合成。其中六条为上游引物, 二条为下游引物, 引物序列为:

g1:5'-CAGAACACAGGAGGACAGGTAAG-3'

c1:5'-GCGCTCAAGAAGTTAGAGA-3'

c2:5'-TGCAAAAACAACATTTTCTAT-3'

af2:5'-AGGCATCATTCCAGCTC3'

c3:5'-CCTAATGAACCTTGCTGTCA-3'

d1:5'-AACAAATGTAGAAATGCTCCA-3'

d2:5'-GAGAAACAGCAAGGGACC-3'

d3:5'-ATCTCGCCCCAAAATAGTAA-3'

1.3 病毒培养、马外周血单核细胞的制备及前病毒 DNA 提取

从驴颈静脉处无菌采适量抗凝血, 按常规方法分离驴白细胞^[3]。取实验室保存的美国和阿根廷毒株感染马发热期血清各 1 mL 接种细胞, 取疫苗株 10^{-6} TCID₅₀ 接种细胞, 5 d 后收获细胞。4000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将细胞-80 保存备用。采集阿根廷流行毒株和美国代表毒株攻毒马和我国疫苗免疫马不同时间段的抗凝血以提取 DNA 前病毒。抗凝血首先在室温放置 30~40 min, 收集中间淡黄色的白细胞层, 每管分装 500 μ L, 4000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清, 细胞沉淀-80 保存备用。病毒接种白细胞及马外周单核细胞 (Peripheral blood mononuclear, PBMC) 按照 Qiagen Genomic DNA Kit (M13433, midi) 说明书提供的方法提取细胞基因组 DNA, 提取的核酸-80 保存备用。

1.4 病毒培养物 PCR 检测条件的摸索及试验马样品检测条件的优化

分别用我国疫苗株、美国代表毒株和阿根廷代表毒株接种驴白细胞前病毒 DNA 进行 PCR 检测。同时对巢式 PCR 反应的 DNA 模板量、退火温度、引物浓度、反应时间进行确定, 筛选鉴别诊断的特异性引物及 PCR 最佳反应模式。通过对一系列引物进行筛选, 初步确定选用 gag 区设计的 4 条引物 g1, c1, c2 和 c3 进行鉴别诊断。通过对美洲流行毒株接种马和我国疫苗免疫马的样品进行检测, 并对 PCR 反应体系进行进一步的优化。

1.5 敏感性试验及重复性试验

分别提取接种美洲流行毒株马和疫苗免疫马

PBMC 前病毒 DNA, 分别测定含量, 然后进行 10 倍稀释, 各取 2 μ l, 其它条件不变, 进行巢式多重 PCR 扩增, 以出现反应条带的模板用量的最高稀释倍数推算可检出的最低病毒含量, 以检测其敏感性。用建立的巢式多重 PCR 方法对接种病毒马和疫苗免疫马外周血单核细胞每个样品进行三次重复检测, 以验证检测结果的可靠性。

2 结果

2.1 病毒接种细胞培养物 PCR 检测

病毒接种细胞培养物 PCR 检测条件的优化反应的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1。我国弱毒疫苗可以扩增 675bp 和 400bp 的两条片段, 而美洲流行毒株 (Wyoming-EIAV 和 Argentina-EIAV) 可以扩增一条 675bp 的片段, 与预期结果相符。

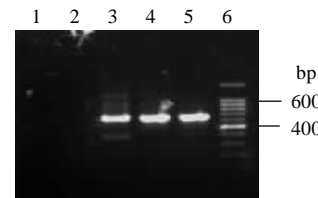


图 1 病毒接种细胞的检测结果

Fig.1 detection of cells infected EIAV

1, water negative control; 2, healthy cell; 3, cell infected Div; 4, cells infected Agen-EIAV; 5, cells infected Wyoming-EIAV; 6, DNA Marker

2.2 接种病毒马和疫苗免疫马样品检测

对实验马采集样品的检测反应 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2。我国弱毒疫苗可以扩增 675bp 和 400bp 的两条片段, 而美洲毒株可以扩增一条 675bp 的片段, 与预期结果相符。

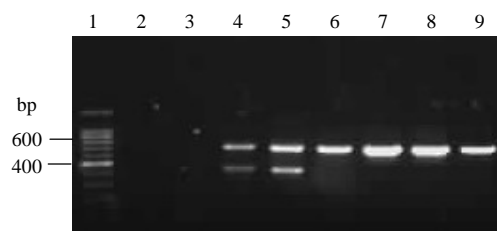


图 2 病毒接种马外周血 DNA 样品检测结果

Fig.2 detection of horse infected EIAV

1, DNA Marker; 2, negative control; 3, healthy horse PBMC DNA; 4/5, Div infected horse PBMC DNA; 6/7, Agen-EIAV infected horse PBMC DNA; 8/9, Wyoming-EIAV infected horse PBMC DNA

2.3 PCR 检测的敏感性及重复性检测

分别采取美洲流行毒株接种马和我国疫苗免

疫马的外周血, 分离白细胞并提取 DNA, 测 DNA 含量, 其它条件不变的情况下, 模板按 10 倍稀释, 进行巢式 PCR 检测, PCR 产物经电泳溴化乙锭染色检查表明, 我国疫苗免疫马最低检出量为 14.79ng, 阿根廷代表毒株为 21.45ng, 美国代表毒株为 23.55ng。对分别接种我国疫苗株、阿根廷代表毒株和美国代表毒株的马外周血每次采取的样本进行三次重复检测, 结果均一致。

3 讨论

马传染性贫血病是马传染性贫血病毒引起的一种马属动物的烈性传染病。目前常规的马传贫诊断方法是用琼脂扩散实验(AGID)或酶联免疫吸附试验(ELISA)等血清学方法, 虽然这些方法已经比较成熟, 但是却存在着一定的缺陷, 感染初期的马匹在病毒的免疫应答还没有建立之前, 用此方法检测可能出现假阴性^[4]。另外用这种血清学的方法不能区分自然感染马和弱毒疫苗免疫马。本试验首次初步建立了一种巢式多重 PCR 检测马传贫病毒的方法, 这种方法具有特异性强, 敏感性高, 重复性好等特点。初步试验表明本方法对于试验马的检测要早于琼脂扩散试验(数据未显示), 另外结合多重 PCR 的方法可以提高检测的效率, 使用一管 PCR 就可以检测出是马传贫的野毒感染还是疫苗免疫, 具有很好的应用前景。

由于马传贫病毒属于逆转录病毒科成员, 在体内有着高度变异的特性, 因而在选择引物时, 应该选择马传贫病毒相对保守的基因。本实验通过对一系列引物的筛选, 最后确定选用 gag 区的四条引物用于马传贫病毒的鉴别诊断, 通过对现有样品的检测和检测条件的优化, 已经初步确定该四条引物适合的最佳反应体系, 对于试验马不同时间采取的样

品的检测, 也显示该系统有很好的稳定性。马传贫病毒感染马后经过急性期和慢性期之后, 进入一个无症状隐性期, 在这个漫长的时期里, 病毒在体内的复制水平很低, 因此检测马传贫病毒的方法应该具备有很高的敏感性, 才能适合马传贫病毒这种感染的特点, 避免漏检。基于这种原因本实验用模拟马传贫病毒自然感染的病毒剂量接种健康马匹, 在不同时间内采血检测, 因马匹的个体差异, 分别可在接毒后的最早 29~40 d 检出。从第一次检出后到目前为止 4 个月都一直可以检出。下一步将对这些马匹进行长期的观察检测, 并不断的摸索优化检测条件, 以期建立一种能够鉴别我国疫苗株免疫马和美洲流行毒株自然感染马的方法, 为我国马传贫疫苗在世界更多的国家推广应用奠定诊断基础。

References

- [1] Shen R X, Xu Z H D, He Y S H, (沈荣显, 徐振东, 何云生) *et al.* The study of immunity of equine infectious anemia[J]. China Agricul Sci (中国农业科学), 1979, 4: 1-15
- [2] Shen R X(沈荣显).The cross-immunity of EIA donkey leucocyte-attenuated vaccine to American Wyoming virus strain [A]. International equine infectious anemia immunology science colloquium corpus (国际马传染性贫血病免疫学术讨论会文集) [C], Haerbin, 1983, 21-23.
- [3] Wang X J (王晓钧). Dissertation Development and Characterization of a Pathogenic Molecular Clone of Chinese Equine Infectious Anemia Virus Donkey-adapted Strain[D]. Harbin: Harbin Veterinary Research Institute of CAAS (中国农业科学院哈尔滨兽医研究所), 2003.
- [4] Issel C J, Cook R F. A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia. [J]. Vet Diagn Invest, 1993, 5: 137-141.