

犬瘟热病毒 XJ 株的分离鉴定

乔 军¹ 孟庆龄¹ 夏威柱² 何宏彬³ 范泉水⁴

(塔里木农垦大学动物科技学院 阿拉尔 843300)¹ (解放军军需大学军事兽医研究所 长春 130062)²

(东北农业大学生命科学院 哈尔滨 150030)³ (成都军区军事医学研究所 昆明 650031)⁴

摘要: 应用犬肺原代巨噬细胞, 从新疆阿克苏送检的一只病死犬肺脏中分离出 1 株犬瘟热病毒, 并对其进行了形态学、理化学、血清学、动物感染试验、分子生物学鉴定。结果证明所分离的 XJ 株为 1 株 CDV 的强毒株。

关键词: 犬瘟热病毒, XJ 株, 分离鉴定

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0056-04

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF XJ STRAIN OF CANINE DISTEMPER VIRUS

QIAO Jun¹ MENG Qing-Ling¹ XIA Xian-Zhu² HE Hong-Bin³ FAN Quan-Shui⁴

(*Animal science and technology institute, Tarim Agricultural University, Alar 843300*)¹

(*Military veterinary institute, University of Agricultural and Animal Science, Changchun 130062*)²

(*Department of Biological science, Northeastern Agricultural University, Harbin 150030*)³

(*Military medical institute of Chengdu Military Area, Kunming 650031*)⁴

Abstract: A canine distemper virus strain was isolated from the lung of dog coming from Aksu in Xing Jiang using lung primary MΦ cell during the CDV molecular epidemiological study. It was demonstrated to be a virulent strain of CDV by a series of systematic identification such as morphology, serology neutralization test, canine infection test, and molecular virology test.

Key words: Canine distemper virus, X J strain, Isolation and identification

犬瘟热病毒 (Canine Distemper Virus, CDV), 是负链单股不分节的 RNA 病毒, 属于副粘病毒科麻疹病毒属成员, 是当前对我国养犬业、毛皮动物养殖业和野生动物保护业危害最大的犬瘟热 (Canine Distemper, CD) 的病原^[1,2]; 经常引起大批犬、貂、狐等动物发病, 病死率 30% ~ 80%, 雪貂高达 100%^[3], 经济损失惨重。虽然我国有一些专家学者对 CD 及 CDV 的研究倾注了大量的心血, 使国内 CD 的研究在近年来有很大

进展,但其总体水平相对落后。一方面原因是国家在这一领域投入的人、财、物力非常有限,并且开展该项研究起步较晚,另一方面原因是CDV对光和热敏感,半衰期短^[4],分离培养比较困难,致使国内分离到的CDV株很少。我们在进行新疆境内CDV分子流行病学调查时,分离了一株CDV(暂定名XJ株),现报告如下。

1 材料与方法

1.1 病毒分离

1.1.1 样品与处理:材料来自新疆阿克苏一只患肠炎而病死的人,采集犬肺脏经充分研磨后,用Hank氏液制成1:10的乳剂,经5000r/min离心10min取上清,置-20℃冰柜待分离。

1.1.2 犬原代巨噬细胞制备与培养:取健康犬肺脏,用含抗生素的Hank's液洗3次,剪碎,再用Hank's液洗3次,加适量MEM细胞营养液,在25℃震荡约1h,使肺脏巨噬细胞游走到液体中。吸取液体,以3000r/min离心20min,弃上清。沉淀用10%~15%犊牛血清的MEM营养液稀释至合适的浓度,分装在小培养瓶中,37℃静置培养过夜。待巨噬细胞贴壁后换液。所用Vero细胞从中国兽药监察所引进,按常规消化传代,37℃静置培养。

1.1.3 病毒分离:待犬原代巨噬细胞长成单层后,弃生长液,按培养液量体积的1/10接入待分离的样品,37℃吸附30min后,加维持液继续于37℃静置培养4~5d,每天观察是否出现多核巨细胞。当出现上述CPE时,再在单层犬原代巨噬细胞上传4代,收毒,然后在Vero细胞上同步接毒(1/10量)传代,观察有无细胞出现融合、拉网、脱落等CPE。

1.2 常规病毒学鉴定

1.2.1 参考病毒:参考病毒为CDV LP₉(LP株的第9代Vero细胞培养物)。

1.2.2 形态学观察:用XJ株的犬肺原代巨噬细胞第5代培养物,经反复冻融3次,以5000r/min离心10min,取上清以0.5%磷钨酸负染作电镜观察。

1.2.3 病毒理化特性试验:取XJ株的犬肺原代巨噬细胞第5代培养物5mL分成5瓶,按常规方法分别进行耐热性、耐酸性、耐碱性、乙醚敏感性及病毒核酸型鉴定试验。

1.2.4 红细胞凝集性试验:采用微量血凝法测定XJ株对0.5%的鸡、猪、豚鼠、兔红细胞的凝集性。

1.2.5 CDV 荧光抗体染色试验:用本室自制的效价为1:128 CDV 荧光抗体,将其作32倍稀释后,加在用冷丙酮固定15min的触片上,37℃,孵育30min,用0.01mol/L pH 7.2 PBS缓冲液冲洗3次,三馏水冲洗3次后置于荧光显微镜下检查有无特异性的荧光。

1.2.6 易感犬感染试验:选取CDV SN抗体小于1:2的2~3月龄健康易感幼犬6只,分为2组,第1组每犬滴鼻 2×10^6 TCID₅₀,肌肉注射 8×10^6 TCID₅₀,共 1×10^7 TCID₅₀,第2组3只犬不接种作为健康对照,各组隔离饲养。每天观察犬的精神、食欲、体温与粪便性状,并各于接毒的第7d扑杀其中的两只,作病理解剖学检查检测,并观察至21d。

1.3 分子病毒学鉴定

根据Genbank中已发表的CDV mRNA序列,选择H基因保守区域,利用Goldkey软件设计了一对引物,用于RT-PCR扩增。上游引物:5'CCTTGTGTGTAGAAGAGAGC

3' (901-920), 下游引物: 5'AACTCTGGCGTCCGGATTGTG 3' (1661-1642), 预计扩增片段大小为 761bp。PCR 扩增条件参考文献 [5] 进行。

2 试验结果

2.1 病毒分离结果

应用犬肺原代巨噬细胞, 先后对多份犬病料进行了分离, 结果仅分离获得 1 株 CDV, 并对此株进行了系统鉴定。所分离的 XJ 株在犬肺原代巨噬细胞上出现多核巨细胞。在经过犬肺原代巨噬细胞 5 次传代和 Vero 细胞上的 2 次同步接毒后, 适应了单层 Vero 细胞, 能引起有规律的融合、拉网、脱落等犬瘟热病毒细胞病变 (见图 1 和图 2)。

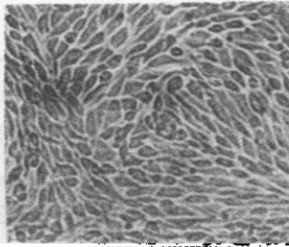


图 1 正常的 Vero 细胞

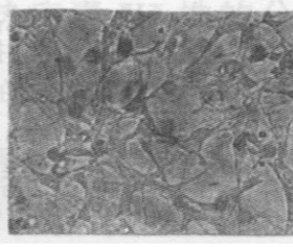


图 2 接毒后的 Vero 细胞



图 3 电镜负染观察结果 (x40000)

2.2 普通病毒学鉴定结果

2.2.1 形态学观察结果: 用 XJ 株的犬肺原代巨噬细胞培养物上清作电镜负染观察, 有较典型的副粘病毒样粒子 (见图 3)。

2.2.2 理化特性试验结果: XJ 株经 50℃、20% 乙醚、酸 (pH3.0) 和 5-IUDR 处理后, 对 Vero 的 TCID₅₀ 分别为 10^{-4.9}/0.1mL、10^{-2.1}/0.1mL、10^{-3.6}/0.1mL 和 10^{-5.1}/0.1mL, 与未作任何处理的正常对照 XJ 株的 TCID₅₀ 10^{-6.0}/0.1mL 相比, 用 5-IUDR 处理降低 0.9 个对数, 差异不显著, 其余均大于 2 个对数, 差异显著, 说明该毒株对乙醚、酸 (pH3)、热 (50℃) 敏感, 但不能被 DNA 合成抑制剂 5-IUDR 所抑制, 符合 CDV 核酸型为 RNA 的犬瘟热病毒特点。

2.2.3 红细胞血凝性试验结果: 测定了 XJ 株对鸡、猪、豚鼠、兔、红细胞的血凝性, 结果均不凝集, 符合 CDV 的特性。

2.2.4 CDV 直接荧光抗体染色法结果: 病死犬肺脏触片经荧光抗体染色后, 在荧光显微镜下检查发现有特异性的荧光。

2.2.5 易感犬感染试验结果: 试验接种的 3 只犬分别经 4d、5d、6d 的潜伏期之后, 体温出现升高, 接着出现咳嗽、流粘液性鼻涕, 呼吸困难、食欲减退、腹泻等症状, 试验接种犬扑杀后呈现咽炎, 肺局灶性出血及部分肺实变。小肠呈现卡它性肠炎等病变, 取肺作病理组织学检查可见肺泡间隔明显增厚, 局部达正常肺泡间隔的几倍, 而对照犬正常。

2.3 分子病毒学鉴定结果

应用 CDV 特异性引物, 对 XJ 株的 RNA 进行 RT-PCR 扩增, 结果仅出现 1 条与 CDV 参考病毒分子量 761bp 相同的核酸电泳带, 与设计理论值大小相符, 证明 XJ 株为 1 株 CDV 病毒 (见图 4)。

3 结果与讨论

通过病毒的形态结构、理化学、血清学与分子生物学特

性来看, 我们所分离的 X J 株毒株为一株 CDV, 通过对易感犬的人工感染试验又证明 X J 株为 1 株 CDV 强毒。

CDV 对环境的抵抗力非常弱, 所以病毒的分离成功率很低。病料采样的部位、时间、样品处理、病程类型、发病动物的抗病毒抗体水平等因素对病毒分离成功与否都有一定的影响, 但最主要的是分离病毒的载体是否敏感和有效。Vantsis (1959) 在分离病毒所用感染动物的肺巨噬细胞直接培养, 可以频繁地分离出病毒^[6]。在用传代细胞单层分离病毒时, 细胞形成单层的时间不宜过长, 否则影响对病毒的敏感性。

现在对 CDV 宿主保护性抗原 F 和 H 蛋白基因的研究是 CD 防治研究中的热点。到目前为止, 虽未发现 CDV 有第二个血清型, 但时有免疫接种犬发生 CD 感染的报道^[7-9]。本毒株就是从一条用犬五联苗免疫过两次的犬上分离到的, 是否是由于新疆境内 CDV 流行株和疫苗株抗原存在较大差异而致病, 尚需对 X J 株 F 基因和 H 基因做进一步的研究。

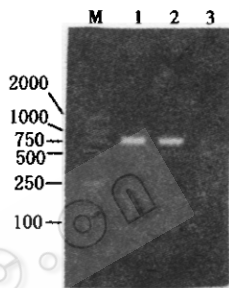


图 4 RT-PCR 扩增试验结果
M DNA marker (D,L-2000),
1 CDV LPs, 2 XJ 株第 5 代 Vero
培养物, 3 阴性对照

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学 (第 2 版). 北京: 科学出版社, 1997, 756~762.
- [2] 夏威柱主编. 养犬大全. 长春: 吉林人民出版社, 1993, 549~553.
- [3] Löffler S, Lottspeich F, Lanza F, *et al.* J Vir, 01 1997, Jan, 71 (1): 42~49.
- [4] Ho C K, Babiuk L A. Can J Microbiol, 1979, Jun, 25 (6): 680~685.
- [5] 李金中, 何洪彬, 夏威柱, 等. 病毒学报, 1999, 15 (2): 180~184.
- [6] Wright N G, Cornwell H J C. Vet Rec 1974, 94: 86~92.
- [7] Mori T, Shin Y S, Okita M, *et al.* J Gen Virol, 1994, Sep, 75 (9): 2403~2408.
- [8] Blixenkron M M, Svansson V, Have P, *et al.* Vet Microbiol 1993, Oct, 37 (1~2): 163~173.
- [9] Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, *et al.* J C