

华利忠, 刘剑锋, 冯志新, 等. 猪伪狂犬病病毒新流行变异毒株的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 476-480.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.037

猪伪狂犬病病毒新流行变异毒株的研究进展

华利忠¹, 刘剑锋², 冯志新¹, 杨若松¹, 邵国青¹

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学, 江苏 南京 210014)

摘要: 近 30 年内, 猪伪狂犬活疫苗的应用对中国猪伪狂犬病的防控贡献巨大。2011 年以来, 中国许多免疫猪场相继暴发猪伪狂犬疫情, 给养猪业造成了巨大的损失。研究显示最新流行的 PRV 毒株为变异株, 部分商品化活疫苗不能对其提供完全的保护。本文详细介绍了 2011 年以来中国猪伪狂犬病的发病情况及其分子流行病学调查结果, 分析了猪伪狂犬新变异株的分子生物学特性及其变异株来源, 同时论述了针对 PRV 突变株新型疫苗的研究进展, 最后对深入开展中国猪伪狂犬病控制与净化研究进行了展望。

关键词: 猪伪狂犬病毒; 变异株; 分子生物学; 疫苗

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0476-05

Progress in novel pseudorabies virus variants prevalent in China

HUA Li-zhong¹, LIU Jian-feng², FENG Zhi-xin¹, YANG Ruo-song¹, SHAO Guo-qing¹

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China)

Abstract: Attenuated live PRV vaccines have contributed effectively to the control of pseudorabies virus (PRV) during the past 30 years in China. However, at the end of 2011, a severe PRV outbreak took place in many PRV vaccinated pig farms and spread quickly in the pig herds in China and caused great economic losses to the swine industry. In this paper, the epidemiological characteristics of swine pseudorabies and the molecular epidemiology of the disease were introduced since 2011 in China. The molecular characteristics of novel PRV variants were analyzed and the research progress of new vaccine against the novel PRV variants was reviewed. The researches on the control and purification of swine pseudorabies was discussed in China.

Key words: pseudorabies virus; variant strain; molecular biology; vaccine

2011 年以来, 猪伪狂犬病病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 变异株在中国广泛流行, 造成了严重的经济损失。免疫猪群发病是本次猪伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 疫情的主要特征, 这使中国对该病的防

控面临新的挑战。而对中国 PRV 新流行毒株的研究有助于对猪伪狂犬病有效的防控, 最终达到净化的目的。本文就 2011 年以来 PR 疫情的流行病学, 新流行毒株的毒力变化、免疫原性变化、分子生物学特性以及新型疫苗的研发做了综述。

1 2011 年以来猪伪狂犬病的流行概况

2011 年以来, PR 在中国部分地区暴发流

收稿日期: 2016-01-22

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(15)1006]

作者简介: 华利忠 (1982-), 男, 江苏无锡人, 博士, 副研究员, 主要从事猪传染病防控技术研究。

通讯作者: 邵国青, (Tel) 025-84391973; (E-mail) gqshaonj@163.com。

行^[1-2]。感染 PRV 后,哺乳仔猪出生后第 3 d 发病,表现为精神沉郁、不食、呕吐、腹泻、鸣叫、兴奋、昏睡、四肢痉挛、呼吸衰竭而死亡,发病率为 100.0%,死亡率高达 95.0% 左右;断奶仔猪表现为呼吸困难、咳嗽、流涕、腹泻、呕吐,神经症状等,发病率为 20.0%~40.0%,死亡率可达 30.0% 左右;成年猪出现呕吐、腹泻、咳嗽,并伴有死亡;生产母猪表现为不育、返情率高、屡配不孕;妊娠母猪大批流产,产死胎或木乃伊胎^[3]。根据农业部兽医诊断中心^[2]、哈尔滨兽医研究所、上海兽医研究所^[4-5]、南京农业大学^[6]、河南农业大学^[7]等单位的相关报道,本文将近年来的 PR 流行区域绘制成图(图 1),根据图 1 显示,近年来中国 PR 流行区域主要集中在东北、华中、华北及华东地区,涉及沿海地区或近沿海地区 17 个省份(直辖市),且多数为养猪密集地区。由于疫情涉及到很多已常规免疫 PRV 活疫苗的规模化猪场,因此人们推测流行毒株可能已经发生变异,导致部分疫苗株缺乏对 PRV 变异毒株的保护力。

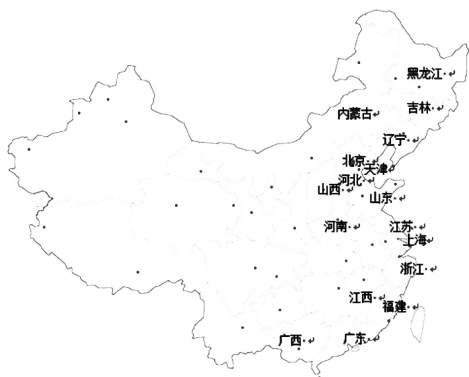


图 1 2011 年以来中国新型猪伪狂犬病发病分布图

Fig.1 The distribution of novel pseudorabies outbreak since 2011 in China

流行病学调查显示,2011 年以来,中国 PRV 野毒阳性率呈逐年上升的趋势。解伟涛等^[8]统计了从 2006 年到 2014 年猪伪狂犬野毒 gE 抗体的阳性率,发现从 2006 年到 2011 年间,gE 阳性率呈逐年下降趋势,从 24.8% 降至 6.8%,2011 年后,gE 抗体阳性率急剧上升,其中 2014 年血清阳性率达 39.6%。叶晶等^[9]对 2010 年到 2014 年国内 5 省份 1 250 份种猪血清进行了 PRV gE 抗体检测,发现 gE

阳性率从 2012 年的 11.3% 上升到 2014 年的 62.3%,其中山东和河南最高,分别达到 61.3% 和 65.2%。此外,血清学和病原学调查还显示各地区 PRV 野毒的阳性率呈现出一定的地域差异。邹敏等^[10]及张显浩等^[11]都采用了 PCR 和 ELISA 的方法检测了 2012~2013 年不同省份的病料及血清,均发现华东地区的 PRV 野毒阳性率最高,且 2013 年 PRV 感染率普遍比 2012 年高。上述流行病学调查结果均表明,2011 年以来,中国 PRV 野毒感染日益严重。

2 针对 PRV 新流行毒株的学术观点

很多证据均表明 PRV 新流行毒株已发生变异,导致近几年 PR 爆发。中国关于 PRV 新流行毒株变异主要存有 3 种观点:毒力增强说、抗原变异说以及毒力增强兼抗原变异说。由于上述 3 种观点的研究对象不是同一个 PRV 变异株,所以这些不同变异株之间的差异是否由于分离株所在的地区不同而表现出的不同变异形式,还有待于进一步研究。

2.1 毒力增强说

Yu 等^[2]通过猪体免疫保护试验,发现试验猪在免疫 21 d 后,以新分离毒株 NVDC-PRV-SD 进行攻毒,结果免疫试验猪出现明显临床症状。据此他们认为,现有疫苗缺乏有效免疫保护效力的原因是新分离株毒力明显增强。Luo 等^[4]持有相同的观点,他们采用绵羊攻毒保护试验模型,发现 Bartha-K61 疫苗对中国新流行毒株 PRVTJ 提供不完全保护,且与传统毒株 PRV-SC 相比,新分离毒株 PRVTJ 对小鼠和猪具有更强的致病性。

2.2 抗原变异说

An 等^[1]采用绵羊攻毒保护试验模型,比较了 Bartha-K61 弱毒疫苗对中国传统毒株 PRV-SC 与中国新流行毒株 PRV-HeN1 (2012 分离株)的免疫保护效力。结果发现 Bartha-K61 对 PRV-SC 的攻击提供 100% 免疫保护,而对 PRV-HeN1 的攻击仅提供 50% 免疫保护,认为现有的 Bartha-K61 疫苗株的免疫原性没有发生改变,且仍然符合质量标准,但变异株与传统毒株相比发生了免疫原性的变化,所以 Bartha-K61 疫苗株对其的保护相对减弱。彭金美等^[12]采用中和试验也得出了同样的结论,他们发现 PRV Bartha k61 活疫苗免疫猪仅能诱导对 HeN1 分

离株低水平的中和抗体,而 HeN1 分离株能够诱导较高水平的中和抗体,并具有更强的交叉中和能力,推测近年来猪场流行的 PRV 可能存在一定的抗原变异。

2.3 毒力增强兼抗原变异说

Gu 等^[6]比较新流行毒株 PRV-ZJ01 和传统毒株 LA 对 80~85 日龄试验猪致病性差异,发现 ZJ01 有明显致死性,相比 LA, ZJ01 毒力明显增强,为超强毒力(Highly virulence)分离株。之后利用 4 种商品化 PRV 疫苗免疫 30 日龄 PRV 阴性仔猪进行病毒-血清交叉中和试验,发现新毒株 PRV-ZJ01 与疫苗株间相关系数为 0.378~0.455,进一步证明 PRV-ZJ01 毒株抗原性出现明显变异。杨文萍等^[13]从 3 个规模猪场 3 种 PRV 商品疫苗免疫的健康猪群中采集 30 份 PRVgB 抗体阳性、gE 抗体阴性血清进行同样的中和试验,发现 3 个毒株活疫苗免疫血清与 ZJ01 株中和抗体效价明显低于其与 LA 株中和抗体效价,同时, ZJ01 株抗血清与 ZJ01 株和 LA 株的中和抗体效价相似,其相关系数为 0.279~0.413,因此, PRV-ZJ01 被定义为超强毒力抗原变异株(Highly virulence with antigenic variants)。

3 PRV 新流行毒株分子生物学特性

无论是毒力增强,抗原变异还是兼而有之,大家对新流行 PRV 毒株发生变异形成共识。那么突变株变异的分子特征在哪儿,哪些变化是区别 PRV 变异株与经典株的依据? 这些问题成为研究热点。

Gu^[6]等分析了从东南部 4 省份分离的 5 株 PRV 流行毒株(ZJ01、ZJ02、GD01、GX01 和 JX01)的

gE 和 *gC* 基因序列,发现这些新分离株均位于相对独立的分支,与亚洲分离株亲缘关系较近。*gE* 和 *gC* 基因序列推导的氨基酸序列分析结果显示,新流行毒株与先前分离毒株相比分别有 2 个与 7 个氨基酸的插入。赵鸿远等^[14]对比了近 3 年来 GenBank 登录的国内 32 个 PRV 毒株及 17 个经典 PRV 毒株的 *gE* 基因,并以 *gE* 氨基酸序列建立进化树分析,发现所有新变异株有一个共同的特性,即在 48 位和 492 位各有 1 个天冬氨酸的插入,且这些变异株相互之间同源性(97.1%~99.5%)较高,与经典 PRV 毒株亲缘关系相对较远(96.6%~99.1%),形成了 1 个相对独立的分枝。

上述报道均显示目前流行的 PRV 变异株已形成一个相对独立的分枝,那么,它们是从何突变而来? Wang 等^[7]对 12 株新毒株(2012~2014 年分离株)的 *gB*、*gE* 和 *gC* 基因序列进行进化树分析,发现新毒株都处于同一个相对独立的分支上,且与中国传统毒株(如 Ea, SC, Fa 与 Min-A 等)的起源相同,推测新毒株由国内传统毒株变异而来。Ye 等^[5]采用高通量测序的方法获得新流行毒株 PRV-HeN1 株与 PRV-JS 株的全基因组序列,然后与 4 株 PRV 分离株(Kaplan、Becker、Bartha 和 TJ 株)以及 729 个 PRV 基因片段进行进化树分析比对,首次表明 PRV 分离株可分为 2 个基因型,中国新流行毒株属于基因 II 型,其他 PRV 毒株(如欧美分离株)属于基因 I 型(图 2)。这一发现也解释了为什么 Bartha-K61 疫苗(I 型)对中国新流行毒株(II 型)缺乏有效保护。

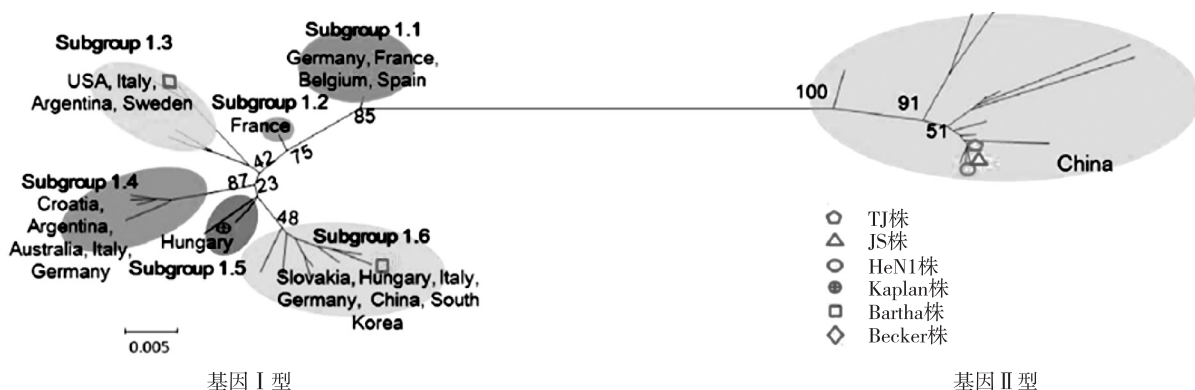


图 2 基于 PRV *gC* 基因的系统发育及分子分型

Fig.2 Phylogenetic and molecular subtyping of the PRV genome based on *gC* gene sequences

4 PRV 新型疫苗的研发

由于 PRV 新毒株的流行,控制与净化 PRV 尤为重要。疫苗免疫是控制 PRV 的重要环节,研究结果显示虽然原有的 Bartha-K61 对新流行毒株的保护力有所下降,但并不是无效的。解伟涛等^[15]研究了不同免疫策略对 PR 防控效果的差异,发现传统疫苗增加免疫剂量和免疫次数,仍然可以有效防控新流行的 PRV 野毒。

针对 PRV 流行毒株新型疫苗的研发也有了突破性进展。Zhang 等^[16]敲除了新流行 PRV 毒株 HN1201 的 *TK*、*gE* 和 *gI* 基因,然后用 *TK/gE/gI* 三基因缺失株免疫 9 日龄仔猪,发现它对 HN1201 的攻击提供完全保护,提示这一基因缺失株可用于预防 PRV 新流行变异毒株。Wang 等^[17]敲除了新分离株 PRVTJ 株的 *gE* 基因制成 *gE* 缺失病毒 rPRVTJ-del*gE*,免疫效力试验发现其对 PRVTJ 野毒株的攻击提供完全保护。

Gu 等^[18]将 PRV 超强毒株 ZJ01*gE/gI* 基因缺失病毒 vZJ01Δ*gE/gI* 制成油乳剂灭活疫苗,以 Bartha-K61 活疫苗作为对照组,PRV ZJ01 作为强毒进行仔猪免疫保护试验,结果显示 vZJ01Δ*gE/gI* 免疫组产生的 ZJ01 特异性中和抗体水平显著高于 Bartha-K61 活疫苗组。非免疫攻毒对照组在攻毒后 7 d 内全部死亡。vZJ01Δ*gE/gI* 灭活疫苗组攻毒后无明显临床症状,脑和肺组织 PRV 载量明显低于攻毒对照组,而 Bartha-K61 免疫组 40% 猪出现明显临床症状,脑和肺组织 PRV 病毒载量明显高于 vZJ01Δ*gE/gI* 灭活疫苗组和空白对照组。表明 PRV ZJ01 *gE/gI* 基因缺失株 vZJ01Δ*gE/gI* 灭活疫苗可以提供对 PRV 超强毒的免疫保护作用,其免疫效果优于 Bartha-K61 活疫苗。

5 猪伪狂犬病毒的净化

近几十年来,随着不断出现的各种控制措施和全国性消除计划的实施,PRV 已在很多国家的家猪中得到净化,如:欧洲的奥地利、德国、捷克、丹麦、芬兰、匈牙利、卢森堡、荷兰、瑞典、瑞士以及美洲的加拿大和美国等^[19]。中国在 2012 年 5 月,由国务院办公厅颁布了《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020 年)》,规划中提出中国重大动物疫病防治目标,要求到 2020 年全国 16 种重大动物疫病要达到规划设定

的考核标准,PRV 就是其中一个病原。在 PRV 净化过程中,基因缺失疫苗以及与 *gE* 基因缺失弱毒疫苗配套的 *gE*-ELISA 鉴别诊断技术是最重要的 2 种工具^[20]。最新研究结果显示,疫苗免疫并不是 PRV 净化影响最大的因素。Ketusing^[21]等利用北美动物疾病传播模型[The north american animal disease spread model (NAADSM)]的计算机仿真模型,对比了泰国两省实施不同策略(包括减群、限制感染猪群活动区域、疫苗免疫、检测等)的猪伪狂犬净化成效,结果发现减群对 PRV 净化的影响最大,限制感染猪群的活动区域对 PRV 净化的影响次之。最后评估结果是减群,联合限制活动区域,配合感染猪群周边 16 km 内的疫苗免疫是泰国两省份进行 PRV 净化的最有效手段。在 Allepuz 等^[20]对 PRV 的净化中,也发现空间因素并不是影响 PRV 净化最主要的因素,这一点与 Ketusing 的研究结果有相同之处。PRV 的区域性净化是一个综合性措施,以美国 PRV 根除计划为例,该计划包括监测猪伪狂犬病流行率,系统地对猪群进行鉴定,注射伪狂犬病疫苗,消除隐性感染源和建立阴性动物群等多项措施。在时间方面分两步走,第 1 阶段(1989-1998 年)为建立、实施根除 PRV 阶段,该阶段又分为准备期、控制期、畜群强制净化期、监测期以及无疫期。第 2 阶段(1999-2001 年)为加速根除 PRV 阶段,该阶段由政府买单,淘汰 PRV 阳性猪。用此方法,美国在根除和控制猪口蹄疫、猪瘟、猪和牛布氏杆菌病及牛结核病上,取得了较大的成功^[22]。

6 讨论

2011 年以来,中国华东、东北、华北及华中地区 17 个省份先后出现了 PRV 变异株,呈普遍流行,造成了重大损失。PRV 变异株的感染强度呈现一定的地区差异,其中华东地区感染率最高。中国 PRV 变异株间亲缘关系较近,与经典毒株较远,且均处于同一个独立分枝上,属于基因 II 型,这有别于欧美国家的 PRV 分离株及 Bartha-K61 疫苗株(基因 I 型)。这可能是传统 Bartha-K61 疫苗株在常规免疫背景下仅提供部分保护的原因。针对 PRV 新流行毒株新型疫苗的研发已经有了突破性进展,这将有助于中国对该病进行有效防控。但疫苗免疫仅仅是控制疫病的其中一个环节,只有通过诸如“筛查-扑杀,淘汰-持续监测-净化”及“免疫、检疫、消毒、隔离”等综合措施,并强调场内配套的管理和防疫措

施等综合性措施才能有效控制该病,逐步实施区域净化PRV,最终达到全国净化的目标。

参考文献:

- [1] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabiesvirus variant in Bartha-K61-Vaccinated pigs, China, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19(11): 1749-1755.
- [2] YU X L, ZHOU Z, HU D M, et al. Pathogenic pseudorabiesvirus, China, 2012[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(1): 102-104.
- [3] 万遂如. 关于养猪场伪狂犬病的净化问题[J]. *养猪*, 2014(2): 87-88.
- [4] LUO Y Z, LI N, CONG X, et al. Pathogenicity and genomic characterization of a pseudorabies virus variant isolated from Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(1-2): 107-115.
- [5] YE C, ZHANG Q Z, TIAN Z J, et al. Genomic characterization of emergent pseudorabies virus in China reveals marked sequence divergence: evidence for the existence of two major genotypes[J]. *Virology*, 2015, 483: 32-43.
- [6] GU Z, HOU C, SUN H, et al. Emergence of highly virulent pseudorabies virus in southern China[J]. *Can J Vet Res*, 2015, 79(3): 221-228.
- [7] WANG Y B, QIAO S L, LI X W, et al. Molecular epidemiology of outbreak-associated pseudorabiesvirus (PRV) strains in central China[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(3): 401-409.
- [8] 解伟涛, 郝慧芳, 梁跃, 等. 2014年上半年重要猪病检测结果[J]. *猪场保健*, 2014(8): 31-33.
- [9] 叶晶, 朱秀高, 侯博, 等. 2010—2014年中国5省份猪伪狂犬病野毒抗体检测分析[J]. *养猪*, 2014(5): 113.
- [10] 邹敏, 杨旭兵, 郑辉, 等. 2012—2013年我国部分地区猪伪狂犬病流行病学调查[J]. *中国动物检疫*, 2015, 32(4): 1-5.
- [11] 张显浩, 陈瑞爱, 李冰, 等. 2012—2013年我国集约化猪场猪伪狂犬病病毒感染情况的调查[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(3): 133-136.
- [12] 彭金美, 安同庆, 赵鸿远, 等. 猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(1): 1-4.
- [13] 杨文萍, 顾真庆, 孙海凤, 等. 伪狂犬病毒流行毒株的抗原性和血清中和特性分析[J]. *畜牧与兽医*, 2014(10): 11-14.
- [14] 赵鸿远, 彭金美, 安同庆, 等. 猪伪狂犬病病毒变异株的分离鉴定及其gE基因的分子特征[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(7): 506-509.
- [15] 解伟涛, 梁跃, 乔松林, 等. 不同免疫策略对猪伪狂犬病防控效果比较[J]. *猪业科学*, 2015(1): 102-103.
- [16] ZHANG C L, GUO L H, JIA X R, et al. Construction of a triple gene-deleted Chinese pseudorabiesvirus variant and its efficacy study as a vaccine candidate on suckling piglets[J]. *Vaccine*, 2015, 33(21): 2432-2437.
- [17] WANG C H, YUAN J, QIN H, et al. A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. *Vaccine*, 2014, 32(27): 3379-3385.
- [18] GU Z Q, DONG J, WANG J C, et al. A novel inactivated gE/gI deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant PRV challenge[J]. *Virus Research*, 2015, 195: 57-63.
- [19] JEFFREY J Z, LOCKE A K, KENT J S, et al. 10th disease of swine[M]. USA: John Wiley & Sons Inc, 2012: 1534-1625.
- [20] ALLEPUZ A, SAEZ M, SOLYMOSI N, et al. The role of spatial factors in the success of an Aujeszky's disease eradication programme in a high pig density area (Northeast Spain, 2003-2007)[J]. *Prev Vet Med*, 2009, 91(2-4): 153-160.
- [21] KETUSING N, REEVES A, PORTACCI K, et al. Evaluation of strategies for the eradication of pseudorabies virus (Aujeszky's disease) in commercial swine farms in Chiang-Mai and Lampoon provinces, Thailand, using a simulation disease spread model[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2014, 61(2): 169-176.
- [22] 刘芳. 我国动物疫病净化长效机制的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.

(责任编辑: 陈海霞)