

利用棉绳采集口腔液监测猪伪狂犬病方法的应用分析

Application analysis of the method of using cotton rope to collect oral fluid to monitor porcine pseudorabies

于学祥^{1, 2, 3}, 许 拓^{1, 2}, 何东贤^{1, 2}, 库旭钢^{1, 3}, 罗 锐^{1, 2}, 范盛先¹, 何启盖^{1, 2, 3*},
¹华中农业大学动物医学院; ²农业微生物学国家重点实验室; ³生猪健康养殖协同创新中心, 湖北

背景

伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 引起的猪的一种急性传染病。自 2011 年以来, PRV 变异毒株陆续在我国许多猪场出现, 造成重大的经济损失, 也加大了我国净化 PR 的难度[1]。在 20 世纪 80 年代中期, 研究人员利用口腔液检测到艾滋病 (HIV) 后, 口腔液作为样品的检测技术得到迅速发展[2]。PR 是一种猪的急性传染病, 该病可降低母猪生产性能, 还可继发细菌性疾病的感染[3], 并且有学者报道 PRV 可以跨物种传播给人类, 可导致感染者患有严重的神经系统后遗症 [4]。所以 PR 的净化尤为重要, 其中寻找 PR 的群体监测手段尤为重要。虽然目前利用棉绳采集口腔液监测 PR 已应用于临床中, 但使用棉绳采集口腔液的方法尚无综合测定。本研究旨在验证使用棉绳采集口腔液的科学性。

方法

本研究将 PRV HNX 株病毒液 (1×10^7 TCID₅₀/0.1mL) 用 DMEM 作 10 倍稀释至病毒浓度为 100 TCID₅₀/0.1mL。收集样品液, 检测不同浓度棉绳吸附液中 PRV 含量, 测定棉绳对 PRV 的释放能力。选取 12 头 35 日龄 PR 抗原、抗体双阴性仔猪, 分成 2 组, 每组 6 头。感染组肌肉注射 2mL PRV HNX 株 (1×10^7 TCID₅₀/0.1mL), 空白对照组肌肉注射 2mL DMEM。并分别采集 8 个不同规模猪场口腔液以及对应猪血清 148 份。猪场 PRV 感染状况分别为: 不免疫净化场 1 个, 免疫净化场 3 个, 野毒感染场 4 个。其中母猪样品 114 份, 采集口腔液和对应血清。

结果

通过定量 PCR 检测不同浓度病毒吸附液中的 PRV 含量, 结果显示, 棉绳吸附液中释放出的 PRV 含量显著低于吸附前 PRV 含量 ($P < 0.05$), 平均降低 50%, 但棉绳吸附液仍可检测到 1 个 TCID₅₀/0.1mL 的病毒含量。

动物感染试验第 8 天攻毒组死亡 2 头, 于第 13 天再次死亡 2 头。定量 PCR 结果显示, 感染后第 1 天即可在感染组口腔液和鼻拭子中检测到 PRV 核酸, 并可持续到第 28 天。除感染后第 5 天外, 口腔液中病原含量均高于鼻拭子中病原含量。感染后第 4 天时口腔液和鼻拭子中排毒量均达到最大值。表明使用棉绳采集口腔液检测 PRV 效果要优于鼻拭子。空白对照组口腔液和鼻拭子中均未检测到 PRV 核酸。

在感染后第 7 天, 有 66.67% 的猪 (4/6) 出现 PRV-gB 抗体转阳, 50% 的猪 (3/6) 出现 PRV-gE 抗体转阳。在感染后第 10 天采集的血液样品中, 感染组 PRV-gB 和 PRV-gE 抗体全部转阳, 转阳率为

100%。与口腔液样品中核酸检出时间相比，血清抗体阳转时间（7 天）晚于口腔液中 PRV 检出时间（1 天）。

PRV 不免疫净化场的 17 份口腔液和血清样品检测均为阴性。在 PRV 免疫净化场的 63 份口腔液中检测到 gD 核酸 28 份，而 gB 抗体检测均为阳性，gE 抗体均为阴性。野毒感染场的 68 份口腔液中检测到 gD 核酸 52 份，PRV-gB 和 PRV-gE 抗体均为阳性。可见 PRV 疫苗免疫后也可通过口腔液排出疫苗毒，并存在感染 PRV 野毒后稳定的猪只无法通过核酸检测鉴定感染的情况。

结论

本研究优化了口腔液采集方法，并测定了棉绳对口腔液的释放能力和感染后检出时间，结果显示口腔液可作为较好的监测猪群 PR 的手段。临床样品检测结果可见，口腔液监测方法需结合 gE 抗体检测，综合判断猪群是否是感染群体。

基金项目

湖北省技术创新专项（对外科技合作）（2018AHB011）、武汉市应用基础研究计划（2017020201010227）

参考文献

- 1) 周春陵. 猪伪狂犬病 gE 基因缺失灭活疫苗（HNX-2012 株）的交叉保护试验及保存期试验 [D]. 武汉：华中农业大学，2016.
- 2) Raux M, Finkielsztejn L, Salmon-Ceron D, et al. Comparison of the distribution of IgG and IgA antibodies in serum and various mucosal fluids of HIV type1-infected subjects[J]. AIDS Research and Human Retroviruses, 1999, 15: 1365-1376.
- 3) YU X, SUN Q, KU X, et al. The epidemiological investigation of co-infection of major respiratory bacteria with pseudorabies virus in intensive pig farms in China[J]. Veterinary Medicine and Science, 2020, 00:1-9.
- 4) LIU Q, WANG X, XIE C, et al. A novel human acute encephalitis caused by pseudorabies virus variant strain[J]. Clinical Infectious Diseases, 2020, 10.1093.