

仔猪副轮状病毒 (C群) 的检出

王正党 王林卿 张彦 彭克高 王嘉福

(新疆八一农学院, 乌鲁木齐)

姜善镇 汪登荣 张武备

(新疆农八师147团, 石河子)

摘 要

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 从某猪场的 20 份仔猪腹泻标本中检出具有副轮状病毒 (C群) RNA电泳图型者 11 份, 其检出率高达 55%。该病毒经口服接种未吮初乳的新生仔猪, 可致急性水样腹泻, 并排出大量病毒。经轮状病毒 (A群) ELISA 和副轮状病毒 (B群) 对流免疫电泳检测证明, 它与轮状病毒 (A群) 和副轮状病毒 (B群) 均无血清学交叉。

本文首次证实在我国猪群中存在有与国外报道的相同的猪副轮状病毒 (C群), 且可引起仔猪爆发流行, 是仔猪腹泻不可忽视的病原之一。

关键词: 副轮状病毒 (C群) 聚丙烯酰胺凝胶电泳
ELISA 仔猪

Saif 等^[1]1982年根据轮状病毒和副轮状病毒的特异性抗原和 RNA 电泳图式, 将所有轮状病毒区分为 A、B、C、D 四群。A 群包括婴幼儿和多种动物的普通轮状病毒, 其 RNA 电泳图式为 4:2:3:2; B 群包括仔猪^[2-5]、牛^[4]、绵羊^[6,7]、山羊^[7], 以及洪涛等^[8]发现的成人腹泻轮状病毒, 其 RNA 电泳图式为 4:2:2:3; C 群轮状病毒包括婴幼儿^[9-12]以及仔猪^[3,13]的副轮状病毒, 其 RNA 电泳图式为 4:3:2:2; D 群轮状病毒仅见于鸡和火鸡^[10]的副轮状病毒, 其 RNA 电泳图型模式为 5:2:2:2; 以上四群轮状病毒各具自己的群抗原, 群间无血清学交叉。

迄今为止, 在我国尚未见有动物副轮状病毒 (C群) 的报道。作者于 1988 年 3 月在新疆农八师 147 团一连猪场, 从 20 份仔猪腹泻粪样中检测出副轮状病毒 (C群) 的电泳图型 11 份, 检出率达 55%。经电镜检查、动物感染试验、典型轮状病毒 (A群) ELISA, 副轮状病毒 (B群) 对流免疫电泳检测, 初步认为副轮状病毒 (C群) 也是仔猪腹泻的病原之一。

材料和方法

一、仔猪腹泻粪样采集: 新疆农八师 147 团一连猪场, 其怀孕母猪均用仔猪黄痢四价疫苗 (菌

本文于 1988 年 6 月 26 日收到

* 本课题由新疆畜牧厅资助

承蒙黄和瓚、何国协二位教授指导, 特致谢意。

毛抗原 K₈₈、K₈₉、K_{887P}、F₄₁) 预防注射。但该场仔猪仍发生腹泻, 腹泻多发生于产后20—10日龄, 临床表现为厌食、精神沉郁, 腹泻黄色或白色水样便, 发病率在80%以上。采集腹泻粪样标本20份(P10—P29), 经细菌学检查未见肠毒性大肠杆菌。然后标本冰冻保存于-30℃待检。

二、病毒核酸提取和聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照Herring等^[16]及洪涛等^[16]方法加以改进。

1. 病毒核酸提取 取以pH7.2 0.01mol/L 磷酸缓冲盐溶液稀释的粪样悬液0.5ml, 加10% SDS 70μl 振摇10分钟; 加饱和重蒸酚0.5ml 和氯仿: 异戊醇(24:1)0.4ml, 充分振摇5分钟, 12000r/m离心5分钟, 吸取水相层。此步骤重复2—3次。最后一次水相层中加入2.5倍(V/V)冷乙醇, -30℃过夜; 12000r/m离心5分钟, 倾去乙醇, 沉淀真空干燥; 加入样品液(pH6.8 0.05mol/L Tris-HCl 7.5ml/甘油2.5ml/溴酚蓝10mg)溶解, 4℃存放以备电泳。

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 采用垂直板式电泳槽, 不连续电泳, 凝胶板规格20×14×0.1cm。浓缩胶为3%聚丙烯酰胺, 缓冲液为pH6.8 Tris-HCl, 分离胶为5%聚丙烯酰胺, 缓冲液为pH8.9 Tris-HCl; 电泳液为pH8.5 0.125mol/L Tris-0.192mol/L 甘氨酸; 恒电流30mA, 电泳3—4小时左右。

3. 染色: 凝胶板用蒸馏水漂洗, 置0.11mol/L 硝酸银溶液中染色30分钟, 在蒸馏水中漂洗3次后, 置0.75mol/L NaOH-0.1mol/L 甲醛液中显色至条带清晰, 以蒸馏水漂洗, 置5%醋酸液中固定。观察拍照后制干保存。

三、病毒抗原检测:

1. 典型轮状病毒(A群)群抗原检测: 用兰州生物制品研究所生产的轮状病毒ELISA试剂盒, 按说明操作。

2. 副轮状病毒(B群)群抗原检测: 用本室分离鉴定的羊副轮状病毒(B群)病料, 以差速离心和蔗糖垫层提取抗原, 免疫羔羊制备高免血清。被检粪样以pH7.2 0.01mol/L PBS 稀释后加等量氯仿充分振摇12000r/m离心5分钟, 吸取上层液为待检抗原。同时设阳性抗原对照和阴性血清对照, 按Middeton(17)和施惠达^[18]等对流免疫电泳, 但缓冲液改用0.03mol/L pH8.6 巴比妥缓冲液。

四、未吮初乳仔猪的实验感染: 选健康临产母猪, 守护待产, 产前阴部消毒, 取刚产仔猪4只, 用灭菌敷料拭干后, 置消毒箱中隔离饲喂消毒牛乳。取PAGE副轮状病毒(C群)电泳强阳性, 典型轮状病毒(A群)ELISA阴性, 副轮状病毒对流免疫电泳阴性的p11粪样, 以Hank's液1:10稀释, 3000r/m离心30分钟, 吸取上清液, 加入青霉素、链霉素、卡那霉素(2000单位, 毫克/ml)处理, 作为接种毒源。仔猪中2只接毒, 每只口服2ml, 2只对照。严格隔离饲喂逐时观察记录结果, 采集粪样进行PAGE检测。

五、电镜检查: 取P11粪样, 以PBS作1:5稀释, 加入等量氯仿充分振摇后, 8000r/m离心5分钟, 吸取上清, 常规制样、磷钨酸负染电镜检查。

六、参考毒株: 轮状病毒NCDV株(江苏农科院赠)、猴轮状病毒SA-11株(洪涛教授赠)羊副轮状病毒(B群)(本室分离)。

结 果

一、聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 用PAGE法对一连猪场20份腹泻标本进行检测, 检出具有副轮状病毒(C群)电泳图型的标本11份(p11、p13、p14、p15、p16、p17、p25、p26、p27、p28、p29); 检出具有副轮状病毒(B群)电泳图型的标本1份(p22); 未测出A群轮

状病毒电泳型或混合电泳型的标本。

二、病毒抗原检测结果 典型轮状病毒(A群)ELSA, 20份粪样标本除 p-20 阳性外, 其余19份均为阴性; 副轮状病毒(B群)对流免疫电泳检查, 除 p-22 (PAGE 亦为 B 群阳性) 为阳性外, 其余19份均为阴性。

三、未吮初乳仔猪感染实验 对照组仔猪两只单独隔离饲喂, 观察 3 日未见腹泻发生, 取 12、13、18、24、48 小时肛拭标本, 作 PAGE 检查, 均为阴性; 实验组仔猪两只, 在接毒后分别于 12 和 13 小时, 开始出现腹痛症状并排出黄色稀便, 随后排出大量水样黄色粪液。在接毒 18 小时后, 剖杀采集肠内容物。取 12 和 13 小时粪样及 18 小时肠内容物, PAGE 检查均与原接种毒有相同副轮状病毒(C群)电泳图型。

四、电镜检查 p-11 号粪样电镜下可见轮状病毒样病毒颗粒(见图 2)。



图 1 轮状病毒和副轮状病毒 RNA 电泳图型

- A. 猴轮状病毒(SA-11)
- B. 仔猪副轮状病毒(C群)-11号样品
- C. 仔猪副轮状病毒(C群)-11号与15号样品混合电泳
- D. 仔猪副轮状病毒(C群)-15号样品
- E. 实验感染仔猪回收毒

Fig. 1 The rotavirus and pararotavirus RNA profiles

- A. The monkey rotavirus (SA-11)
- B. The piglet pararotavirus (group C) - No. 11
- C. The piglet pararotavirus (group C) - No. 11 and No. 15 co-electrophoresis
- D. The piglet pararotavirus (group C) - No. 15
- E. The experimentally infected piglet virus

图 2 仔猪副轮状病毒(C群)电镜观察, 示单衣壳病毒颗粒

Fig. 2 The piglet pararotavirus (group C) electronmicroscopic observation, showing the single capsid viral particles,

讨 论

以 PAGE 法在 147 团猪场的 20 份仔猪腹泻粪样中检出具有 Saif 等⁽¹⁾分群中的 C 群轮状病毒的 4:3:2:2 核酸电泳图, 且与 Bohl 等检出的猪副轮状病毒 (C) 的电泳图极相似, 用典型轮状病毒 ELISA 试剂盒检测和用羔羊副轮状病毒 (B 群) 对流免疫电泳检测, 表明它不具有 A 群和 B 群轮状病毒的群特异抗原, 故初步认为是猪副轮状病毒 (C 群)。

国内外报道副轮状病毒 (C 群) 在婴幼儿^(11,14)和猪群^(8,18)中检出率都很低。但我们在 147 团一连猪场 20 份仔猪腹泻粪样中, 检出副轮状病毒 (C 群) 11 份, 其检出率高达 55% 呈爆发流行形式。表明该病毒株具有较强毒力。

一连猪场怀孕母猪经仔猪黄痢四价菌毛抗原疫苗注射, 细菌学检查未检出肠毒性大肠杆菌。PAGE 检测时, 检出 B 群轮状病毒 1 例, ELISA 检测, 检出 A 群轮状病毒 1 例。表明该猪场以次流行的仔猪腹泻主要是由猪副轮状病毒 (C 群) 感染所致, A 群 B 群轮状病毒也是病因之一。

参 考 文 献

- [1] Saif L J et al, 1985 *Infectious diarrhoea in young* Elsevier, the Netherlands p208
- [2] Bridger J C et al., 1982 *Infect and Immunol.*, 35: 1058
- [3] Bohl E H et al., 1982, *J Clin Microbiol.*, 15: 312
- [4] Chasey D et al., 1985, *Vet. Rec.*, 114: 16
- [5] Theil K W et al., 1985, *J. Clin. Microbiol.*, 21: 340
- [6] Chasey D et al., 1984, *Vet. Rec.*, 115: 326
- [7] 王正党等, 病毒学报 (待发表)
- [8] 洪涛等, 中华微生物学及免疫学杂志 4: 1
- [9] Nicolas J C et al., 1983, *Virol.*, 124: 181
- [10] Espejo R T et al., 1984, *Infect. and Immunol.*, 44: 112
- [11] Rodger S M et al., 1982, *J. Clin. Microbiol.*, 16: 726
- [12] Bridger J C et al., 1986, *J. Clin. Microbiol.*, 23: 780
- [13] Snodgrass D R et al., 1984, *J. Gen. Virol.*, 65: 909
- [14] 吴妙灵等, 1987, 病毒学报 3: 115
- [15] Menuelty M R et al., 1984, *Vet. Rec.*, 114: 29
- [16] Herriug A Z et al., 1982, *J. Clin. Microbiol.*, 16: 173
- [17] Middleton P J et al., 1976, *J. Clin. Path.*, 29: 191
- [18] 施惠达, 1985, 中华流行病学杂志 2: 85

Detection of Pararotavirus (Group C) in Piglets

Wang Zheng-dang * Wang Lin-qing * Zhang Yan * Peng Ke-gao *
Wang Jia-fu* Jing Shan-zhen ** Wan Deng-rong** Zhang Wu-bei**

20 diarrheal samples from piglets of a pig farm were examined with PAGE, and 11 of them manifested the pararotavirus (group C) RNA electrophoretic profile. An acute watery diarrhea occurred after inoculating newhorn colostrum-deprived piglets. Rotavirus (group A) ELISA and pararotavirus (group B) counter immunoelectrophoresis showed that the virus has no serologic relations with group A and B rotaviruses.

Key words, Pararotavirus (group C) PAGE ELISA Piglet

* August 1st Agricultural College, Urumqi, Xinjiang

** 147 Regiment Veterinary Station, Shihezi, Xinjiang