

# 猪伪狂犬病毒感染的临床诊断报告及防控措施建议

刘道金<sup>1</sup> 许涛<sup>2</sup> 卢光鲜<sup>3</sup> 王波<sup>4</sup> 张莉<sup>4\*</sup>

1 洒渔镇农业农村发展服务中心

2 云南农业大学

3 昭通市畜牧兽医技术推广站

4 昭阳区畜牧兽医技术推广服务中心

DOI:10.32629/as.v9i3.3826

**[摘要]** 猪伪狂犬病毒(Pseudorabies Virus, PRV)是危害全球养猪业的重要病原。为明确昭阳区某疑似感染PRV猪场的感染情况,本研究采集该猪场48头猪血清样本及2份流产仔猪组织样本(脑组织、脾脏、肺脏),采用血清学ELISA方法检测PRV-gE抗体,结合PCR技术(针对PRV特异性基因)进行病原核酸检测,同时对阳性PCR产物进行测序验证。结果显示:48份血清样本中7份PRV-gE抗体S/N值<0.70,阳性率14.58%;2份流产仔猪组织样本PCR检测均为阳性,测序结果与GenBank中多株PRV序列相似度达100%,确诊该猪场存在PRV野毒感染。本研究通过病原学与血清学联合检测技术,全面掌握了猪场PRV感染情况,为区域PRV防控提供了科学依据,并提出紧急管控、免疫优化、生物安全强化及常态化监测等针对性防控措施,为该场及区域的PRV净化提供了科学依据与实践指导。

**[关键词]** 猪伪狂犬病毒; 临床诊断; PCR检测; gE抗体ELISA检测; 防控措施

**中图分类号:** S852.65+5 **文献标识码:** A

## Clinical diagnosis report of porcine pseudorabies virus infection and suggestions on prevention and control measures

Daojin Liu<sup>1</sup> Tao Xu<sup>2</sup> Guangxian Lu<sup>3</sup> Bo Wang<sup>4</sup> Li Zhang<sup>4\*</sup>

1 Agricultural and rural development service center of Sayu town

2 Yunnan Agricultural University

3 Zhaotong animal husbandry and veterinary technology promotion station

4 Zhaoyang District Animal Husbandry and veterinary technology promotion service center

**[Abstract]** pseudorabies virus (PRV) is an important pathogen that endangers the global pig industry. In order to clarify the infection situation of a suspected PRV infected pig farm in Zhaoyang District, 48 serum samples and 2 tissue samples of aborted piglets (brain, spleen and lung) were collected from the pig farm. The PRV Ge antibody was detected by serological ELISA, and the pathogenic nucleic acid was detected by PCR technology (for PRV specific genes). At the same time, the positive PCR products were sequenced and verified. The results showed that the S/N value of PRV Ge antibody in 7 of 48 serum samples was less than 0.70, and the positive rate was 14.58%; PCR detection of two aborted piglet tissue samples was positive, and the sequencing results were 100% similar to the sequence of multiple PRV strains in GenBank. It was confirmed that there was PRV wild virus infection in the pig farm. Through the joint detection technology of etiology and serology, this study comprehensively mastered the PRV infection in pig farms, provided a scientific basis for regional PRV prevention and control, and proposed targeted prevention and control measures such as emergency control, immune optimization, biosafety enhancement and normalization monitoring, which provided a scientific basis and practical guidance for PRV purification in this farm and region.

**[Key words]** porcine pseudorabies virus; Clinical diagnosis; PCR detection; Ge antibody was detected by ELISA; Prevention and control measures

## 引言

猪伪狂犬病毒(Pseudorabies Virus PRV)也称猪甲型疱疹病毒1型,属于疱疹病毒科 $\alpha$ 疱疹病毒亚科<sup>[1]</sup>,是一种包膜双链DNA病毒,基因组约150kb,包含长独特区(UL)、短独特区(US)及重复序列<sup>[2]</sup>,编码约70~100种蛋白。PRV主要感染猪,尤其是新生仔猪死亡率高达100%,成年猪多呈隐性感染,可通过呼吸道、胎盘或血液传播,引发高热、神经症状及繁殖障碍。随着养猪规模化发展,发病率呈上升趋势<sup>[3]</sup>。中国农业科学院哈尔滨兽医研究所1979年引进了Bartha-K61弱毒株<sup>[4]</sup>,成功试制了伪狂犬弱毒冻干疫苗,通过Bartha-K61疫苗应用有效遏制了猪伪狂犬病疫情,为中国养猪业挽回了巨额经济损失<sup>[5]</sup>。

1902年,PRV被成功分离<sup>[6]</sup>。随着全球养猪业的发展,20世纪70~80年代,由伪狂犬病毒引发的伪狂犬病在世界各地首次爆发,并在随后数十年内广泛流行<sup>[7]</sup>。2011年底,变异PRV毒株引发疫情,部分省份至今仍维持较高水平<sup>[8]</sup>。PRV常与猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪瘟病毒(CSFV)等混合感染,这不仅加重了临床症状,也大幅增加了防控难度<sup>[9]</sup>。我国部分猪场通过采用“活疫苗+灭活疫苗”联合免疫的方式,定期开展抗体检测并淘汰阳性猪,逐步实现了野毒感染率的下降<sup>[5]</sup>。

猪伪狂犬病对生猪产业的危害具有多维性,不仅会影响种猪繁殖性能和母猪繁殖效率,还会导致仔猪存活率降低,提高养殖成本,由于Bartha-K61疫苗的引进,伪狂犬病毒引发的疫情得到了良好的控制,但自2011年起,我国多地区因病毒变异导致发病率回升。为了了解该猪场的PRV感染状况,此次诊断从血清学和病原学角度出发,通过PRV病毒病原PCR检测方法及ELISA检测PRV-gE抗体进行联合分析,确诊该猪场感染状况并给予防控意见与建议,为昭阳区猪伪狂犬病的防控检测提供参考依据,助力生猪产业稳产保供。

## 1 诊断材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病料来源

采集昭阳区疑似PRV感染猪场的48头猪血清样本,以及2头流产仔猪的脑组织、脾脏、肺脏组织样本。

#### 1.1.2 实验仪器

主要仪器包括:苏净集团BCM-1000A超净工作台、德国SiGma1-14K高速冷冻离心机、上海安亭TDL-40B低速离心机、上海博讯YXQ-LS-50SII立式压力蒸汽灭菌器、上海一恒HZQ-311C恒温振荡器、江苏金坛鸿科HH-2数显恒温水浴锅、北京百晶BG-power600电泳仪及BG-subMIDI水平电泳槽、BioRADT100ThermalCycler基因扩增仪、美国UVPGelDoc-1t@2310Imager凝胶成像系统、上海正光YP3002电子天平、HaierBD-226W型-20℃冰箱、美国Thermo991型-80℃冰箱、上海博讯GZX-9240MBE电热鼓风干燥箱、SCIOLOGEXMS-F旋涡混合器、德国Eppendorf各量程移液枪、美国BioTekEIX800酶标仪。

#### 1.1.3 主要试剂

实验试剂包括:南京诺唯赞2×TaqPlusMasterMix II (DyePlus)、

北京赛百盛核酸染料、兰杰柯PBS磷酸盐缓冲液(干粉)、北京全式金Tris碱、ddH<sub>2</sub>O及DL2000DNAMarker、SbaseBioNa<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O、艾科瑞ApexHFHSDNA聚合酶预混液(含染料)、上海索莱宝DEPC、IDEXXPRV/ADVgE抗体检测试剂盒、维诺赞FastPureViralDNA/RNA Mini Kit V2。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

以GenBank公布的PRV序列(登录号:OL639029.1、UJT42303.1)为参考,利用DNASar软件筛选保守区域,通过Primer5.0设计特异性PCR引物,由昆明擎科生物有限公司合成。上游引物PRV-F:5'-TTCGCGAGGAGGTGCACA-3',下游引物PRV-R:5'-TCCATTCGTCACTTCGGTTTCT-3',扩增产物长度343bp。

#### 1.2.2 PCR扩增体系与程序

PCR扩增体系总体积25 $\mu$ L,含9.5 $\mu$ LddH<sub>2</sub>O、12.5 $\mu$ L2×TaqPlusMasterMix II (DyePlus)、1 $\mu$ L上游引物PRV-F、1 $\mu$ L下游引物PRV-R及1 $\mu$ L DNA模板。扩增程序:95℃预变性3min;35个循环(95℃变性15s、60℃退火25s、72℃延伸60s);72℃终延伸10min;4℃保存产物。

#### 1.2.3 PCR产物鉴定

取5 $\mu$ L PCR产物,在1%琼脂糖凝胶与1×TAE电泳液中,120V电泳30min,通过凝胶成像系统观察结果。

#### 1.2.4 ELISA检测

(1)样品制备:被检样品用等体积样品稀释液稀释2倍(同步稀释阴、阳性对照),更换吸头避免交叉污染,记录样品板位并充分混合;

(2)洗涤液制备:浓缩洗涤液恢复室温后,用蒸馏水或去离子水10倍稀释(每块板需30mL浓缩液+270mL水);

(3)操作步骤:取出抗原包被板,A1-A3孔加100 $\mu$ L稀释阴性对照,A4-A5孔加100 $\mu$ L稀释阳性对照,其余孔加100 $\mu$ L稀释样品;室温孵育1h或2~8℃过夜(加盖封闭);每孔加300 $\mu$ L洗涤液洗涤3~5次,末次洗涤后拍干残留液;每孔加100 $\mu$ L辣根过氧化物酶标记抗PRVgE抗体,室温孵育20min;重复洗涤步骤;每孔加100 $\mu$ L TMB底物液,室温孵育15min;每孔加50 $\mu$ L终止液终止反应;分光光度计调零后,测定并记录A(650)值;

(4)结果判定:阴性对照A(650)平均值-阳性对照A(650)平均值 $\geq 0.3$ 时试验有效;S/N值 $\leq 0.60$ 判定为阳性,0.60 $< S/N$ 值 $\leq 0.70$ 需重测,S/N值 $> 0.70$ 判定为阴性。

#### 1.2.5 临床样品预处理与DNA提取

流产仔猪组织样本于-80℃反复冻融3次,取100mg加500 $\mu$ L PBS研磨至无明显组织块,短暂离心后取上清;采用FastPureViralDNA/RNAMiniKitV2提取病毒DNA,提取产物可直接用于检测,长期保存于-85~-65℃。

#### 1.2.6 测序验证

将阳性PCR产物送至上海生工生物工程股份有限公司昆明分公司测序,测序结果与NCBI、GenBank数据库进行BLAST比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 实验室样本检测结果

以实验室阳性样本为模板, 利用上述设计合成的引物进行PCR扩增, 扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳120V30min后, 目标条带为343bp, 与预期目的条带大小一致, 如图1所示。

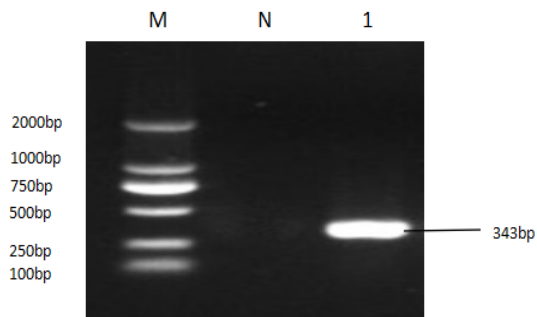


图1 实验室样本PCR检测结果

### 2.2 ELISA检测结果

检测结果如图2所示, 纵坐标为猪伪狂犬病病毒gE抗体S/N值, 横坐标为送检样品序号, 猪场48个样品中, 呈阳性的样品有7个, 阳性率为14.58%, 呈阴性的样品有41个, 阴性率为85.42%。

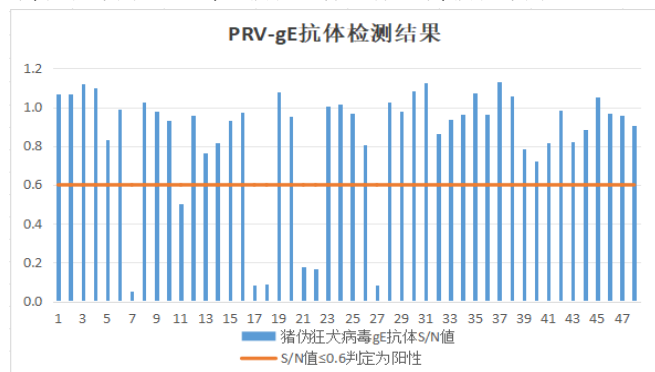


图2 PRV-gE抗体检测结果

### 2.3 猪场样本检测结果

使用上述建立的PCR方法, 对从猪场采集的2份流产仔猪组织样品进行PRV检测, 1、2号代表样品电泳结果显示在343bp位置出现特异性条带, 检测结果均为阳性, 确定该猪场为PRV感染。(见图3)

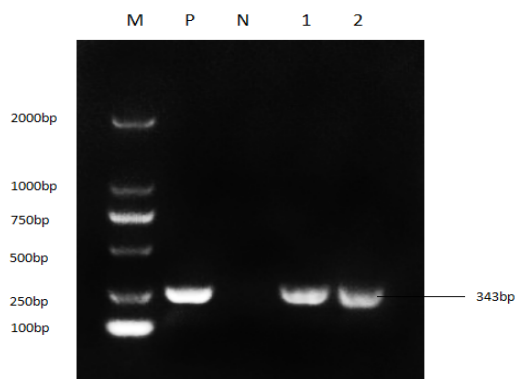


图3 猪场样本PCR检测结果

M: DL2000 DNA Marker; P: PRV阳性对照; N: PRV阴性对照; 1~2: PRV

### 2.4 测序结果

将检测出的阳性样本的PCR扩增产物送至上海生工生物工程股份有限公司昆明分公司测序, 得到一条长度为343bp序列, 在NCBI进行BLAST比对鉴定, 与多株已知PRV序列相似度为100%, 对比鉴定为PRV, 测序对比结果如图4:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Covr	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<i>Suid alphaherpesvirus 1 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	14344	KJ505617.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate LA complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	141428	KJ505211.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain 6611CHN2015 partial genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	12658	KM381718.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain 1903 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	142294	KM389112.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate JS-3-45 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	142783	CP272811.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate CH14H2022 partial genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	141955	CP252542.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate PRVCS2015/2023 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	129142	CP282711.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate PRVCS2015/2023 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	142629	PR292136.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain PRVJM complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	144174	CP238877.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain 191321 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	143174	CP225252.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate GD-393 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	146232	KM113397.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain FJ complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	143703	KM206328.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate CHGXPRV4062018 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	140130	KM215271.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain TH6CY2018 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	144795	KM166454.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate TH6CY2017 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	144795	KM166454.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate CH16-PRV2023 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	143219	CP282136.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate CH16-PRV2023 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	143219	CP282136.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain JX11 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	143689	KM115263.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 isolate DCD-1 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	144236	OL83629.1
<i>Suid herpesvirus 1 strain BLV1 genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	129534	KM361229.1
<i>Suid alphaherpesvirus 1 strain JS-2012156 complete genome</i>	<i>Suid alphaherpesvirus 1</i>	1735	1735	100%	0.0	100.00%	129232	KM561316.1

图4 猪场阳性样本测序结果

## 3 讨论

本研究联合应用PRV-gE抗体ELISA与PCR检测技术, 建立了优势互补的PRV诊断体系。其中, gE-ELISA凭借PRV野毒株与疫苗株的gE基因差异, 可精准区分野毒感染与疫苗免疫应答, 弥补了传统gD、gB抗体检测无法区分自然感染与疫苗免疫的缺陷, 是当前PRV野毒感染筛查的核心技术; PCR技术针对PRV保守基因区域设计引物, 具有灵敏度高、特异性强的优势, 可在感染早期检出病毒核酸, 适用于病原确诊与疫情溯源。两种技术联合应用, 既通过血清学明确了猪群感染范围, 又通过病原学证实了野毒存在, 显著提升了诊断结果的可靠性, 为防控策略制定提供了双重技术支持。

检测结果显示, 该猪场PRV-gE抗体阳性率14.58%, 流产仔猪组织样本PRV核酸阳性率100%, 表明猪场存在PRV野毒传播, 且繁殖母猪群可能为主要感染群体, 这与PRV易引发妊娠母猪流产的特性一致。阳性结果反映出该猪场在生物安全管理、免疫程序执行等方面存在漏洞, 如人员车辆管控不严、疫苗接种时机或剂量不当等。此外, 本研究未开展猪群年龄分层检测、免疫史追溯及混合感染排查, 无法明确新生仔猪、断奶仔猪等易感群体的感染风险, 也未能排除PRV与PRRSV、CSFV等病原混合感染的可能, 可能导致防控措施针对性不足。尽管本研究设计的PCR引物针对PRV保守区域, 但鉴于PRV变异特性, 仍需长期监测以规避病毒变异引发的漏检风险。

## 4 防控措施建议

### 4.1 紧急处置与疫情控制

立即对猪场实施分区分区管控, 将流产仔猪所在猪舍划定为疫区, 严格限制人员、车辆进出, 疫区与非疫区工具分开使用并每日消毒; 对gE抗体阳性猪只(尤其是繁殖母猪)进行隔离饲养,

评估临床症状与繁殖价值,对病情严重、无治疗意义的猪只进行无害化处理;选用过氧乙酸、氢氧化钠等高效消毒剂,对疫区猪舍、粪污、污水及周边环境进行每日1次、连续7天的全面消杀,切断传播途径。

#### 4.2 免疫程序优化

选用安全性与免疫原性良好的Bartha-K61弱毒疫苗,规范免疫程序:仔猪3~4周龄首免,8~9周龄加强免疫1次,确保易感期抗体水平;后备母猪配种前1个月完成基础免疫,产前1个月加强免疫;经产母猪采用跟胎免疫模式,产前1个月统一接种;免疫后每季度开展gE抗体ELISA检测(监测野毒感染)与gD抗体检测(评估免疫效果),根据抗体水平调整免疫剂量或频次。

#### 4.3 生物安全体系强化

建立全流程生物安全防控机制:工作人员进入生产区需更换专用工作服、鞋套,经消毒通道(紫外线+消毒液浸泡)消毒后方可进入;外来车辆禁止进入生产区,需在厂区门口进行清洗、消毒、烘干处理;猪舍保持通风干燥,控制饲养密度(每头猪占栏面积 $\geq 0.8\text{m}^2$ ),粪污采用“堆积发酵+无害化处理”模式;引种环节严格检疫,引进种猪隔离观察1个月,经PRV-gE抗体与核酸检测阴性后再合群饲养,严防新毒株传入。

#### 4.4 常态化监测与净化

建立PRV季度监测机制,采集血清样本(覆盖各年龄段猪群)与临床异常组织样本,采用ELISA与PCR联合检测,动态掌握感染情况;对监测发现的阳性猪只及时淘汰,逐步实现猪群净化;定期调研猪场周边PRV流行态势,关注病毒变异动态,及时调整检测引物与防控策略;同步开展PRRSV、CSFV等常见病原的筛查,避免混合感染加剧疫情。

### 5 结论

本研究通过血清学与病原学联合检测,确诊昭阳区某猪场存在PRV野毒感染,明确了猪群感染范围与病原特性。研究建立的PRV-gE抗体ELISA与PCR联合诊断方法,具有特异性强、可靠性

高的优势,可用于猪场PRV常规监测;结合诊断结果提出的“检测—处置—免疫—生物安全—监测”一体化综合防控措施,针对性及可操作性强,可为该场及类似猪场实施PRV防控与净化提供重要参考,对保障区域生猪产业稳定发展具有积极意义。

#### 【参考文献】

- [1]金升藻,熊符,陈焕春.伪狂犬病基因缺失疫苗研究进展[J].中国农业科学,2002(增刊):1-5.
- [2]童武,张青占,郑浩,等.免疫后发病仔猪中伪狂犬病毒的分离和鉴定[C]//中国畜牧兽医学会学术年会论文集.北京:中国农业出版社,2013:460.
- [3]覃萍萍.猪伪狂犬病的诊断与防控[J].今日畜牧兽医,2025,41(2):32-34.
- [4]邵金龙.对猪伪狂犬病的再认识及防控技术[J].福建畜牧兽医,2025,47(1):41-43.
- [5]向敏,夏瑜,王定发,等.猪伪狂犬病最新研究进展[J].湖北农业科学,2020,59(23):20-23+31.
- [6]郭生革.猪伪狂犬病流行病学调查及防治措施[J].当代畜牧,2015,(15):47-49.
- [7]贾丽萍,侯俊山.山西忻州猪场伪狂犬病毒抗体监测与流行态势[J].养殖与饲料,2019,(10):10-12.
- [8]薛国聪,费文涛,王士祥,等.国内规模化猪场猪伪狂犬病最新流行进展[J].猪业科学,2024,41(8):45-47.
- [9]李蛟.2017—2018年河南省猪瘟狂犬病流行病学调查[D].郑州:河南农业大学,2019.

#### 作者简介:

刘道金(1976--),男,汉族,云南昭通人,本科,高级畜牧师,研究方向:畜牧。

#### \*通讯作者:

张莉(1971--),女,汉族,云南昭通人,本科,高级兽医师,研究方向:兽医。