

猪流行性腹泻病毒 N 蛋白的真核表达及其亚细胞定位的初步分析

吕茂杰¹, 冯力^{1*}, 时洪艳¹, 陈建飞¹, 孙东波¹,

申识川^{1,2}, 崔小辰^{1,2}, 王承宝¹, 范秀萍^{1,2}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室猪传染病研究室, 哈尔滨 150001; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要: 以构建的含有编码猪流行性腹泻病毒 CV777 株核衣壳蛋白(N)基因的阳性质粒 pMDT-18-N 为模板, 用含有 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切位点的上、下游引物扩增获得 N 基因, 该 PCR 产物经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后定向克隆到经相同双酶切的真核表达载体 pcDNA3.1(+)-N 中, 经过酶切鉴定和测序鉴定, 将构建的重组质粒命名为 pcDNA3.1(+)-N, 且未发现碱基的缺失和插入。用脂质体法将 pcDNA3.1(+)-N 转染 Vero E6 细胞, 在 48 h 后, 以针对猪流行性腹泻病毒核衣壳蛋白的鼠源多抗血清进行 Western blot、免疫荧光检测, 并运用共聚焦显微镜分析 N 蛋白的亚细胞定位。结果表明 N 基因能在真核细胞 Vero E6 中正确表达, 共聚焦分析结果表明 N 蛋白在细胞质和细胞核中定位。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 核衣壳蛋白; 真核表达; 亚细胞定位

中图分类号: S852.659.6

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0691-06

Eukaryotic Expression and Subcellular Localization Preliminary Analysis of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Nucleocapsid Protein

LV Mao-jie¹, FENG Li^{1*}, SHI Hong-yan¹, CHEN Jian-fei¹, SUN Dong-bo¹,

SHEN Shi-chuan^{1,2}, CUI Xiao-chen^{1,2}, WANG Cheng-bao¹, FAN Xiu-ping^{1,2}

(1. Division of Swine Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;

2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Using positive plasmid pMDT-18-N which contained the gene encoding nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea virus strain CV777 as template, the N gene was amplified by the upper/lower primers each with the internal sites of *Kpn* I and *Xho* I, respectively. By digestion with restriction enzymes *Kpn* I and *Xho* I, the PCR product was then subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) that digested with the same enzymes. After restriction enzyme digestion and DNA sequencing identification, the constructed recombinant plasmid was named pcDNA3.1(+)-N, deletion and insertion were not found in its sequence. The pcDNA3.1(+)-N was transiently transfected into Vero E6 cells, and the expression of N gene was detected by Western blot and indirect immunofluorescence assay with mouse antiserum against N protein. N protein subcellular localization were analyzed by confocal microscopy. Results verified that N gene could be expressed successfully in Vero E6 cells, and the N protein localizes both in

收稿日期: 2008-05-23

基金项目: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所院长基金

作者简介: 吕茂杰, 男, 山西静乐县人, 硕士生, 主要从事病毒免疫及分子生物学研究

* 通讯作者: 冯力, 研究员, E-mail: fengli_h@163.com

the cytoplasm and the nucleus.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; nucleocapsid protein; eukaryotic expression; subcellular localization

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的以严重的肠炎、呕吐和水样腹泻为主要特征的猪的一种急性肠道传染病。各年龄段的猪均易感, 尤其对幼龄仔猪表现高的致死率^[1]。PED 首先报道于比利时和英国, 此后在中国、加拿大、匈牙利、德国、日本和韩国等国相继报道^[2], 是世界范围内发生的猪病之一, 给养猪业造成了重大的经济损失。

PEDV 属于尼多病毒目 (Nidovirales) 冠状病毒科 (Coronaviridae) 冠状病毒属 (Coronavirus) 抗原 I 群的成员^[3], 是有囊膜的不分节段的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 28 033 bp (CV777, AF353511), 5' 端有帽子结构 (cap), 3' 端有一个 Poly(A) 尾。主要结构蛋白包括纤突蛋白 (Spike, S)、膜蛋白 (Membrane, M)、核衣壳蛋白 (Nucleocapsid, N) 和小膜蛋白 (small Membrane, sM)。其中 N 蛋白除和基因组 RNA 缠绕形成核糖核蛋白 (Ribonucleoprotein, RNP) 复合体外, 还参与病毒的复制和转录^[4]。此外, 在对冠状病毒一些成员 N 蛋白亚细胞定位的研究中表明 N 蛋白在细胞核 (或核仁) 中定位的特征, 进而也阐明了 N 蛋白的一些功能: N 蛋白作为一个调节蛋白起作用, 能够干扰宿主细胞周期, 参与细胞通信, N 蛋白还可以抑制干扰素的产生, 诱导细胞凋亡^[5]。而对 PEDV N 蛋白亚细胞定位特征的研究还没有报道。

作者以 PEDV CV777 株的 N 蛋白基因为研究对象, 应用基因重组技术构建含有编码 PEDV CV777 N 基因的真核表达载体并进行真核表达, 并对该蛋白在细胞中的亚细胞定位特征进行了初步分析, 旨在为后续的 N 蛋白核定位信号的鉴定和在细胞中功能的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种和细胞株

真核表达载体 pcDNA3.1(+), 菌种 *E. coli* DH5 α 和 Vero E6 细胞由本实验室保存; 含有编码 PEDV CV777 株核衣壳蛋白基因的阳性重组质粒 pMDT-18-N 由本实验室构建并保存; 抗 PEDV 核衣

壳蛋白的鼠源多克隆抗血清由本实验室制备并保存; 感受态细菌的制备和质粒转化参照文献^[6]进行。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、OPTI-MEM I 培养基和胎牛血清均购自 GIBCO 公司; FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(H+L) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; IRDyeTM 700DX Conjugated Affinity Purified anti-Mouse IgG(H+L) 购自 ROCKLAND 公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I 购自 TaKaRa; T4 DNA 连接酶、Ex *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 均购自 Fermentas 公司; 质粒抽提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; LipotamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; 细胞培养板购自 Greiner bio-one 公司。

1.3 细胞培养

Vero E6 细胞生长在含有青霉素 (100 U · mL⁻¹) / 链霉素 (100 U · mL⁻¹) 的 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养。

1.4 真核表达载体的构建及鉴定

根据 PEDV CV777 株核衣壳蛋白基因的全序列设计引物 NU 和 NL。NU: 5'-AGAGGTAC-CATGGCTTCTGTCAGCTTTCAG-3' 含 *Kpn* I 酶切位点和起始密码子 ATG; NL: 5'-GCGCTCGAGTTAATTTCTGTATCGAAGAT-3', 含 *Xho* I 酶切位点和终止密码子。PCR 反应体系: 10 × Buffer 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol · L⁻¹) 2 μ L, NU 和 NL 引物各 1 μ L (各 10 pmol · L⁻¹), 模板重组质粒 pMDT-18-N 0.1 μ L, Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L, 加水至 25 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 60 s, 62 °C 60 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 再 72 °C 延伸 10 min。N 基因 PCR 产物与真核表达载体 pcDNA3.1(+) 分别用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后, 凝胶回收酶切产物, 按 3 : 1 的分子比于 16 °C 连接过夜, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂 Kan⁺ 抗性的 LB 平板, 37 °C 培养 12~16 h, 挑取单个菌落进行摇菌, 提取质粒 DNA, 而后进行酶切鉴定并选 3 个初步鉴定为阳性的质粒送上海英俊生物技术有限公司测序。

1.5 转染 Vero E6 细胞

在转染前一天, 用含无抗生素的 10% 胎牛血清

DMEM 培养基接种细胞于 6 孔细胞培养板中,在转染当天细胞达到 60% ~ 80% 时铺板;按 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA) 说明书操作步骤进行细胞转染。

1.6 间接免疫荧光试验

转染后 48 h,弃培养液,细胞用冰预冷的 50% 甲醇和 50% 丙酮的固定液室温固定 15 min,用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,自然干燥;用 0.2% Triton-X 100 透化处理细胞 5 min,再用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,自然干燥;然后在孔中加入 1 : 100 倍稀释的鼠源抗 N 蛋白多抗血清,于 37 °C 湿盒内作用 1 h,再用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,自然干燥;加入 1 : 100 倍稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗,于湿盒内 37 °C 作用 1 h;用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,自然干燥;最后在各孔中加入适量的灭菌水,于倒置荧光显微镜下观察。

1.7 Western blot 分析

转染后 48 h,收集 Vero E6 /pcDNA3.1(+)-N 和 Vero E6 /pcDNA3.1(+) 细胞,于 20 °C 反复冻融后,分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳,参考文献[6] 进行。在恒压 15 V 30 min 条件下将分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂乳在摇床上室温封闭 3 h,然后加入 1 : 100 稀释的鼠源抗 N 蛋白多克隆抗血清,4 °C 过夜,而后用 PBS 漂洗 3 次,加入 1 : 5 000 稀释的 IRDye™ 700DX Conjugated Affinity Purified anti-Mouse IgG 二抗,室温避光轻摇孵育 45 min,室温下用足量的 PBS 轻柔洗膜 4 次,每次 5 min,避光操作。利用近红外双色激光成像系统 Odyssey 进行扫描,分析 N 蛋白的反应活性。

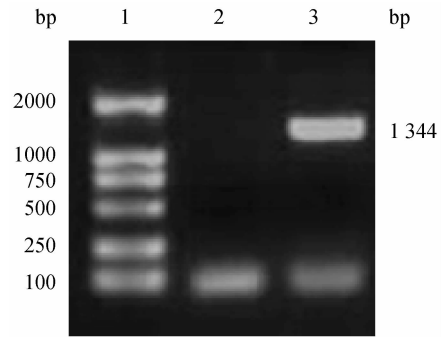
1.8 共聚焦显微镜分析

转染后 48 h,同 1.7 进行间接免疫荧光试验,而后加入碘化丙啶(PI, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),于 4 °C 避光染核 15 min, PBS 漂洗 3 次,利用 Leica laser scanning confocal microscopy (Germany) 来分析表达的 N 蛋白在细胞内的定位情况。

2 结 果

2.1 N 基因的获得

以 pMDT18-N 阳性质粒为模板和设计的特异引物扩增出预期大小的 N 基因片段(约为 1 344 bp) (图 1)。



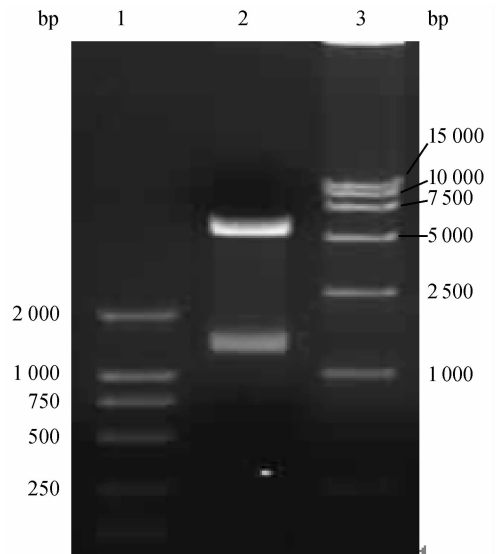
1. DL2000 marker; 2. 阴性对照; 3. PEDV N 基因
1. DL2000 marker; 2. Negative control; 3. PEDV N gene

图 1 N 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 N gene amplified by PCR

2.2 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-N 的构建

凝胶电泳显示, pcDNA3.1(+)-N 经双酶切后获得约 5 400 和 1 344 bp 的 2 个目的片段,证实 N 基因已插入质粒载体(图 2)。测序结果表明:构建在载体中的 N 基因的核苷酸序列在 726、996、1 242 位发生点突变(表 1),没有发生缺失和插入。用 Needle 软件(<http://www.ebi.ac.uk/service/tmp/needle>)对推导的 CV777N 和推导的 pcDNA-N 氨



1. DL2000 marker; 2. pcDNA3.1(+)-N 的 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切产物; 3. DL15000 marker

1. DL2000 marker; 2. pcDNA3.1(+)-N digested by *Kpn* I and *Xho* I; 3. DL15000 marker

图 2 重组质粒 pcDNA3.1(+)-N 的鉴定

Fig. 2 Enzyme identification of pcDNA3.1(+)-N

基酸序列进行比对,结果表明发生在 726、996、1 242 位的核苷酸点突变是同义突变,并不影响氨基酸的正确翻译(表 1)。

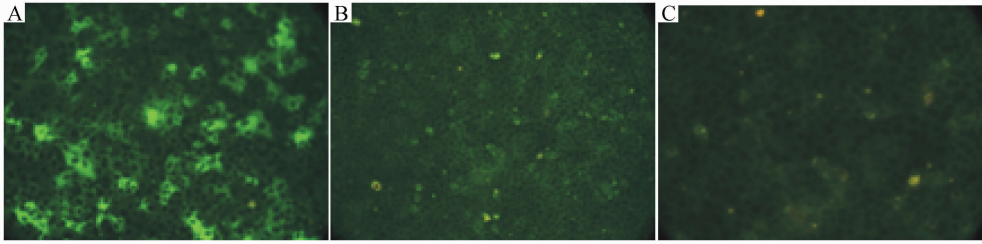
2.3 pcDNA3.1(+)-N 在 Vero E6 细胞中表达后的免疫活性分析

间接免疫荧光试验结果显示,转染有重组质粒 pcDNA3.1(+)-N 的细胞中检测到荧光,而在空载体对照和空细胞对照中没有观察到荧光(图 3),表明 N 蛋白获得表达。

表 1 测序结果与参考 CV777 株 N 基因核苷酸/氨基酸序列的变化比较

Table 1 Comparison of nucleotides/amino acids of N gene between CV777 N gene and our sequencing result

序列来源 Origion	变异位点(核苷酸/氨基酸)		
	Position(Nucleotide/Amino Acid)		
	726/262	996/332	1242/414
CV777	T/K	G/L	T/H
pcDNA3.1(+)-N	C/K	A/L	C/H

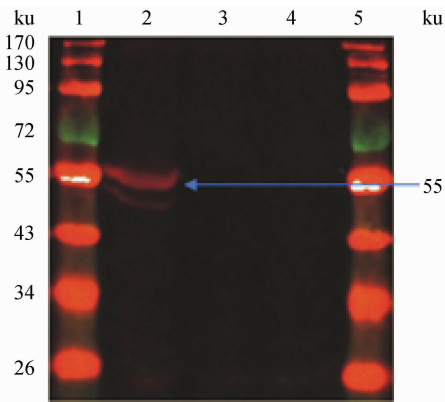


A. pcDNA3.1(+)-N 转染 Vero E6 细胞; B. 空载体 pcDNA3.1(+)-N 转染 Vero E6 细胞; C. 空细胞
A. Vero E6 cells transfected with pcDNA3.1(+)-N; B. Vero E6 cells transfected with pcDNA3.1(+); C. Vero E6 cells

图 3 pcDNA3.1(+)-N 和 pcDNA3.1(+)-N 转染 Vero E6 细胞后的间接免疫荧光试验结果(200×)

Fig. 3 Detection of pcDNA3.1(+)-N and pcDNA3.1(+)-N transfected Vero E6 cells by indirect immunofluorescence assay (200×)

Western blot 结果表明在 55 ku 处可见特异的条带,与预期的 N 蛋白大小相一致(图 4),表明 N



1、5. Protein maker; 2. pcDNA3.1(+)-N 转染后表达的 N 蛋白; 3. 空载体 pcDNA3.1(+)-N 转染对照; 4. 细胞对照

1、5. Protein maker; 2. N protein expression after pcDNA3.1(+)-N transfection; 3. Empty vector pcDNA3.1(+)-N as negative control; 4. Cells as negative control

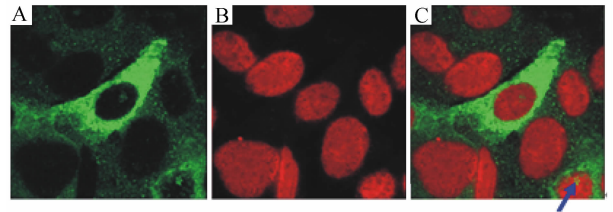
图 4 PEDV CV777 N 蛋白在 Vero E6 细胞中的表达鉴定

Fig. 4 Identification of PEDV CV777 N protein expressed in Vero E6

蛋白正确表达,且具有生物反应活性。

2.4 N 蛋白的细胞定位特征

PEDV N 蛋白主要在细胞质中分布,有部分 N 蛋白存在于细胞核中,如图 5。



A. PEDV N 蛋白表达的间接免疫荧光; B. 用 PI 染色的细胞核 DNA; C. A 和 B 数位重叠图,描述 N 蛋白的分布,箭头表明 N 蛋白在细胞核中存在

A. Expression of N protein in IFA; B. Nuclei were stained using PI; C. A and B were digitally superimposed to depict the distribution of PEDV N protein and nuclear DNA, arrow indicates the position of N protein in nuclear

图 5 共聚焦分析结果 (63×)

Fig. 5 The results of confocal microscope analysis (63×)

3 讨论

核衣壳蛋白(N protein)是冠状病毒的主要结

构蛋白之一,长度为 377~455 个氨基酸,是一种多功能的磷酸化蛋白质,表现为高的碱性和高的丝氨酸含量,是冠状病毒在感染细胞中产生最多的病毒蛋白质之一^[7-9],PEDV CV777 株的 N 蛋白含有 35 个赖氨酸残基和 37 个精氨酸残基,丰富的碱性残基反映出 N 蛋白具有较高的等电点,其理论等电点为 pI 9.9。有关研究表明:PEDV N 蛋白在碱性条件(pH9)下具有较高的溶解度^[3,10]。

对冠状病毒一些成员的 N 蛋白磷酸化的研究表明:磷酸化的传染性支气管炎病毒(IBV) N 蛋白比非磷酸化的 N 蛋白更容易区分病毒和非病毒的 RNA 底物^[11];磷酸化作用能诱导鼠肝炎病毒(MHV) N 蛋白的构象发生变化^[12];牛冠状病毒 N 蛋白的磷酸化作用与该病毒粒子的组装和成熟有关^[7];磷酸化还能够导致 N 蛋白和细胞内膜的缔合^[13]。N 蛋白的磷酸化会影响其二级结构,同时在碱性环境下引入负电荷,会影响 N 蛋白的 RNA 结合活性^[3]。这反映出磷酸化作用在 N 蛋白功能发挥中的重要性。

研究表明:PEDV 感染细胞中病毒粒子 N 蛋白是 58 ku^[13],重组杆状病毒表达的 N 蛋白的大小是 56 ku^[8];而且这 2 种形式的 N 蛋白都是磷酸化产物。本试验用 Vero E6 细胞表达的 PEDV CV777 株的 N 蛋白约为 55 ku,而且在其下面还有一条 53 ku 大小的带,与 PEDV 感染细胞和重组杆状病毒感染的 Sf9 细胞中 N 蛋白的大小稍有差异,这种差异可能是 N 蛋白在不同的哺乳动物细胞中表达后,各个糖基化位点和磷酸化位点修饰不完全所引起的。

作者的研究表明 N 蛋白在细胞核的存在,表明了 N 蛋白中存在引导蛋白质到细胞核定位的信号,N 蛋白借助这些信号与载体蛋白相互作用进入细胞核,而 N 蛋白富含精氨酸和赖氨酸,这些氨基酸又是核定位信号和核仁定位信号的主要组分。大量研究表明 N 蛋白借助核(或核仁)定位信号转移到细胞核(或核仁),参与核仁功能的调节,用来优化病毒复制。而核仁参与一些宿主细胞进程的调节,包括细胞周期、细胞凋亡和抗病毒反应的诱导等。因而推测 N 蛋白在核仁中的作用是通过与核仁蛋白、rRNA 或 rDNA 的相互作用来发挥的。Chen 等研究推断人呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV) N 蛋白与核仁蛋白、纤维蛋白的再分布有关,而且能够与核仁蛋白、核仁素相互作用来抑制细胞分裂^[14]。

Wurm 等推定 MHV 和传染性胃肠炎病毒(TGEV) N 蛋白可能延迟细胞周期来创造出病毒装配的适宜条件,创造一个有助于病毒 sgRNA 翻译的环境,尤其是病毒的生命周期长于细胞周期,通过在细胞周期后期阶段机会性的感染细胞来尽可能长地延长有丝分裂的起始,从而有益于病毒的增殖^[15-18]。

目前,对 TGEV、MHV、IBV 和 SARS-CoV N 蛋白定位特征的研究阐明了其在细胞质、细胞核和核仁之间定位的普遍特征,而且鉴定出一些功能性的核定位信号,核仁定位信号和核输出信号参与了这些转运途径,还重点研究了在核仁中定位蛋白质对细胞结构、功能和细胞周期的影响,确定了 N 蛋白的一些功能,进而推测了病毒的一些复制与致病机制。由于 3 个群的冠状病毒 N 蛋白保守性比较低,例如,IBV(Group III)、TGEV(Group I)和 BCoV(Group II) N 蛋白的同源性仅为 29%。在第 I 群的 TGEV 和 PEDV 的 N 蛋白之间的同源性也仅有 74%。目前,对 PEDV N 蛋白定位的研究还不清楚,本试验真核表达载体的构建和表达,以及亚细胞定位的初步分析,将为进一步的 PEDV N 蛋白定位信号的鉴定和功能分析奠定基础,为将来冠状病毒致病机制的阐明和基因疫苗的研制提供新依据,同时有希望利用该理论来设计新的抗病毒感染策略。

参考文献:

- [1] PENSART M B. Disease of Swine[M]. Straw B E, D'Aallaire S, Mengeling W L, et al. Ames, IA: The Iowa University Press, 1999: 179-185.
- [2] PENSART M B, DEBOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Arch Virol*, 1978, 58: 243-247.
- [3] MASTER P S. The molecular biology of coronaviruses[J]. *Adv Virus Res*, 2006, 66: 193-292.
- [4] BARIC R S, NELSON G W, FLEMING, et al. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: Implications for viral transcription [J]. *J Virol*, 1988, 62: 4280-4287.
- [5] SURJIT M, LAL S K. The SARS-CoV nucleocapsid protein: A protein with multifarious activities [J]. *Infect Genet Evol*, 2007, 07: 004.
- [6] 萨母布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学技术出版社, 2001.
- [7] CALVO E, ESCORS D, LO'PEZ J A, et al. Phos-

- phorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsidprotein in infected cells [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86: 2255-2267.
- [8] CHEN H, GILL A, DOVE B K, et al. Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in RNA binding by using surface plasmon resonance[J]. *J Virol*, 2005, 79:1164-1179.
- [9] JAYARAM J, YOUN S, COLLISSON E W. The virion N protein of infectious bronchitis virus is more phosphorylated than the N protein from infected cell lysates[J]. *Virology*, 2005, 339:127-135.
- [10] KNUCHEL M, ACKERMANN M, MILLER H K, et al. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein[J]. *Vet Microbiol*, 1992, 32:117-134.
- [11] STOHLMAN S A, FLEMING J O, PATTON C D, et al. Synthesis and subcellular localization of the murine coronavirus nucleocapsid protein[J]. *Virology*, 1983, 130:527-532.
- [12] HOGUE B G. Bovine coronavirus nucleocapsid protein processing and assembly[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 380: 259-263.
- [13] EGBERINK H F, EDERVEEN J, CALLEBAUT P, et al. Characterization of the structural proteins of porcine epidemic diarrhea virus strain CV777[J]. *Am J Vet Res*, 1988, 49(8):1320-1324.
- [14] CHEN H, WURM T, BRITTON P, et al. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell[J]. *J Virol*, 2002, 76: 5233-5250.
- [15] SINGH M. A novel internal open reading frame product expressed from a polycistronic of porcine epidemic diarrhea virus may not contribute to virus attenuation[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80:1959-1963.
- [16] WURM T, CHEN H, HODGSON T, et al. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins and the protein may disrupt host cell division[J]. *J Virol*, 2001, 75: 9345-9356.
- [17] HISCOX J A, WURM T, WILSON L, et al. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus[J]. *J Virol*, 2001, 75: 506-512.
- [18] DONGWAN YOO, SARAH K. WOOTTON, GANG LI, et al. Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin [J]. *J Virol*, 2003, 77(22): 12173-12183.

动物疫情速递

克罗地亚发生新城疫

2009年5月11日,克罗地亚 Sanja Separovic 博士向 OIE 通报了新城疫疫情。疫情始于2009年4月9日,于5月8日确诊。此次疫情是临床发病,病原是鸽1型副黏病毒(PPMV-1),属速发型毒株。依靠临床检测、实验室检测作出诊断,克罗地亚家禽中心(国家实验室,位于萨格勒布)通过病毒测序确诊。疫区位于斯普利特-达尔马提亚县 Kaštel Kambelovac 的养殖场,易感动物是鸽子,有133只易感鸽,病例2例,死亡2只,未销毁、扑杀。感染来自接触野生动物和引进活体动物。克罗地亚采取的控制措施有检疫、国内限制移运、筛查和染疫场区消毒,未禁止免疫,未对动物进行治疗;即将采取紧急免疫措施。克罗地亚上一次发生新城疫是1991年3月。

巴林发生口蹄疫

2009年5月12日,巴林 Salman Abdul Nabi 博士向 OIE 通报了口蹄疫疫情。疫情始于2009年4月20日,于5月11日确诊。此次疫情是临床发病,病原是 Asia 1 型口蹄疫病毒。依靠临床检测和实验室检测作出诊断,Pirbright 实验室(OIE 参考实验室)的 PCR 和抗原检测 ELISA 结果均为阳性。疫区位于麦纳麦 Al bahama 的养殖场,易感动物是牛,该畜群在免疫 1 d 后发病,有 64 头易感牛,病例 64 例,未出现死亡,未销毁、扑杀。感染来自引进活体动物。巴林采取的控制措施有国内限制移运、区域化、紧急免疫和染疫场区消毒,未禁止免疫,对动物进行了对症治疗(使用抗炎药物)。

(摘译自 OIE 网站)