



不同品系小型猪对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的敏感性筛选

潘金春^{1,2}, 任柏桦^{3,4}, 闵凡贵^{1,2}, 陈瑞爱^{3,4}, 王希龙^{1,2},
王林川^{3,4}, 王凤国³, 罗书明³, 叶健聪³, 刘玲³, 黄鹏华³

(1. 广东省实验动物监测所, 广东 广州 510663; 2. 广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663;
3. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 新兴 527400; 4. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

【摘要】 目的 筛选对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(HP-PRRSV)敏感的小型猪品系, 以用于HP-PRRS活疫苗的评价。方法 本研究选择蓝塘猪、蕨麻小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪(白系)接种PRRSV NVDC-JXA1株强毒, 并以本地二元杂猪作为对照。攻毒后每天观察动物精神、食欲、死亡等情况, 死亡动物进行剖检, 并采取肺组织做RT-PCR检测病毒, 连续观察5周, 试验结束时采取存活动物血清分别检测PRRSV抗体。结果 攻毒后各组都有动物出现精神沉郁、食欲下降、死亡等现象, 死亡动物RT-PCR检测都显示为阳性, 存活动物PRRSV抗体检测阳性。从死亡率看, 巴马小型猪和五指山小型猪白系对PRRSV NVDC-JXA1株强毒的敏感性最高, 并且敏感性超过了对照组二元杂猪。结论 巴马小型猪和五指山小型猪白系对HP-PRRSV敏感, 可用于HP-PRRS活疫苗的检验。

【关键词】 小型猪; 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒; 敏感性筛选

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0014-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.003

Susceptibility screening of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in several strains of minipigs

PAN Jin-chun^{1,2}, REN Bo-hua^{3,4}, MIN Fan-gui^{1,2}, CHEN Rui-ai^{3,4}, WANG Xi-long^{1,2}, WANG Lin-chuan^{3,4},
WANG Feng-guo³, LUO Shu-ming³, YE Jian-cong³, LIU Ling³, HUANG Peng-hua³

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663;

3. Guangdong Dahuanong Animal Health products Stock Co., Ltd., Xinxing 527400;

4. South China Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Guangzhou 510642)

【Abstract】 **Objective** To screen strains of minipigs sensitive to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) for evaluation of HP-PRRS live vaccine. **Methods** Lantang pigs, Juema, Bama and Wuzhishan (white) minipigs were inoculated with virulent strain NVDC-JXA1 of PRRSV, and local binary hybrid pigs

【基金项目】 广东省科技计划项目(2012B060300001), 广东省教育部产学研结合项目(2012B091100466)。

【作者简介】 潘金春(1979-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 比较医学、实验动物标准化和实验动物质量监测。Email: jcp@ sina.com; 任柏桦(1988-), 男, 研究方向: 预防兽医学。Email: 764684361@qq.com。

【通讯作者】 王希龙(1963-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 小型猪遗传育种与实验动物化。Email: wangxilonggd@163.com; 王林川, 男, 博士, 教授, Email: lcwang65@163.com。

were used as control. The animals were continuously observed for 5 weeks on mental status, appetite, survival, etc. after inoculation of virus. The dead pigs were autopsied and the lung tissue samples were collected for detecting virus by RT-PCR. By the end of the experiment, serum of survival animals were collected for detecting PRRSV antibody by ELISA assay. **Result** The animals showed depression, anorexia, and other clinical signs and death in each group after inoculation. Meanwhile, the testing results were all positive in the RT-PCR and ELISA detection. Bama and Wuzhishan (white) minipigs were the most sensitive to virulent strain NVDC-JXA1 of PRRSV regarding mortality rate. **Conclusions** Bama and Wuzhishan (white) minipigs are sensitive to HP-PRRSV, and can be used for the inspection of HP-PRRS live vaccine.

【Key words】 Minipigs; Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS; Highly pathogenic PRRS virus, HP-PRRSV; Susceptibility screening

猪繁殖与呼吸道综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又称为蓝耳病, 是目前全球养猪业面临的最重要的传染病之一, 并给养猪业造成了巨大的损失, 据估计 2004 年给美国养猪业造成约 5.6 亿美元的损失, 高于猪瘟的 3.64 亿美元和伪狂犬病的 0.36 亿美元^[1], 而到 2011 年 PRRS 造成的损失金额上升到了 6.44 亿美元^[2]。我国是世界上最大的养猪与猪肉消费大国, PRRS 也严重威胁着我国养猪业的安全, 特别是 2006 年我国南方部分省市发现的高致病性 PRRS (highly pathogenic PRRS, HP-PRRS) 给养猪业造成了巨大的经济损失, 该病是由于高致病性的 PRRSV 变异株 (NVDC—JXA1 株) 引起的^[3]。

目前 PRRS 没有特异的治疗方法, 疫苗免疫仍是最主要的防控措施^[4], 有临床应用证实^[5], HP-PRRS 活疫苗可以大幅度降低猪的 PRRS 疫病发病率及死亡率, 免疫效果十分理想。根据农业部第 1548 号公告^[6], HP-PRRS 活疫苗需要进行安全检验和效力检验, 而这两项都要用健康易感猪来进行检验。目前 HP-PRRS 疫苗检验用的易感猪主要为从本地收购的二元杂猪。

研究证明, 猪不但在解剖学、生理学、代谢和疾病发生机理等方面与人体十分接近, 还有易于饲养和捕捉, 繁殖周期短, 多产等特性, 是理想的实验动物。与普通家猪相比, 小型猪体型较小便于实验处理和饲养管理, 成本较低, 遗传选择、遗传控制也更符合实验动物的要求^[7]。目前小型猪已经在生命科学领域中得到了广泛的应用, 标准化程度较高。而从本地收购的二元杂猪标准化程度较低, 背景不清, 也有可能存在由于疫病流行等原因造成供应不足威胁。

为选择合适的敏感小型猪种, 本研究对蓝塘猪、蕨麻小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪这几种

小型猪种进行了 HP-PRRSV 攻毒试验, 以便筛选出合适的小型猪种用于 HP-PRRS 活疫苗的检验。

1 材料和方法

1.1 实验动物

蓝塘猪来源于连平县深连生态农牧发展有限公司, 数量为 10 头; 蕨麻小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪来源于广东省实验动物监测所和大华农公司合作建立的小型猪繁育基地, 其中五指山小型猪为近交群白系, 数量分别为 10 头、8 头和 3 头; 二元杂猪从本地购得, 数量为 5 头, 作为对照组。各猪种 4 周龄左右, 雌雄不限。实验动物生产许可证号为: SCXK (粤) 2013-0022, 设施使用许可证号为: SYXK (粤) 2013-0087。各猪种试验前采血清检测 PRRSV 抗体都呈阴性。

1.2 毒株

HP-PRRSV NVDC-JXA1 强毒株由中国动物疫病预防控制中心提供, 用 Marc-145 细胞进行培养, 测得 TCID₅₀ 为 $10^{5.0}$ /mL, 1:5 稀释备用。

1.3 试剂及仪器

PRRSV 抗体 ELISA 检测试剂盒由 IDEXX 公司提供, PRRSV RT-PCR 检测试剂盒由世纪元亨提供, PCR 仪为 Eppendorf 5333。

1.4 接种

每头猪的攻毒量为 2 mL, 其中病毒含量为 $6 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀, 接种方法为肌肉注射。

1.5 观察内容

接种后每天观察动物精神、食欲、死亡等情况, 死亡动物进行剖检, 连续观察 5 周。

1.6 病毒检测

试验中死亡动物采取肺组织, 采用 RT-PCR 方法检测 PRRSV, 主要步骤如下: 病毒 RNA 抽提 → RT-PCR 扩增 (42℃ 45 min, 95℃ 3 min; 循环 94℃

30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 共 35 次;再 72°C 延伸 7 min)→电泳;试验结束时存活动物前腔静脉丛采血 3 mL,分离血清检测 PRRSV 抗体。

1.7 统计学方法

动物死亡情况用 SPSS 16.0 软件制作成生存曲线。

2 结果

2.1 一般观察

攻毒后从第 4 天开始各组陆续有动物出现精神沉郁、食欲下降现象,部分猪表现气喘、呼吸困难,并都有动物出现死亡,具体发病时间及发病率参见表 1。

表 1 各组动物发病时间及发病率

Tab.1 The onset time and incidence of the disease in animals of each group

品系 Strains	数量(头) Number	发病时 间(d) Onset time	发病率 (发病数/总数) Incidence (case quantity/total)
蓝塘猪 Lantang pigs	10	6~10	5/10
蕨麻小型猪 Juema minipigs	10	6~9	4/10
巴马小型猪 Bama minipigs	8	4~9	8/8
五指山小型猪 Wuzhishan minipigs	3	5~8	3/3
二元杂猪 Binary hybrid pigs	5	5~10	5/5

2.2 死亡情况

攻毒后各组动物生存曲线见图 1,动物死亡时间在接种后 15 d~21 d 之间。从死亡率来看,巴马小型猪和五指山小型猪白系最高,都达到了 100%,蓝塘猪、蕨麻小型猪都为 40%,对照组二元杂猪为 60%。

2.3 病理剖检

死亡动物剖检可见肺局部有灶性实变以及充血、出血变化,病变主要出现在肺心叶和尖叶。此外还有腹股沟淋巴结、扁桃体出现肿大、出血,皮下、肝脏、肾脏可见出血点或出血斑等病变。

2.4 病毒检测

2.4.1 RT-PCR:所有死亡动物都出现 436 bp 的特征性电泳条带(图 2),可判断结果为阳性。

2.4.2 PRRSV 抗体:未死亡动物抗体检测全为阳性。

3 讨论

PRRS 可以引起猪呼吸障碍、免疫抑制、生长缓慢、生产性能下降、繁殖性能下降,甚至死亡,可通过接触感染、空气传播、精液传播和垂直传播等多种途径传播,是一种高度接触性传染病,并可持续性感染,是养猪业的一个重大威胁^[8]。根据流行病学调查,目前我国所流行的 PRRSV 基本上均属于 HP-PRRSV,临床样品的阳性率达到 35.9%~60.8%^[9]。因此 HP-PRRS 的防控尤为重要。

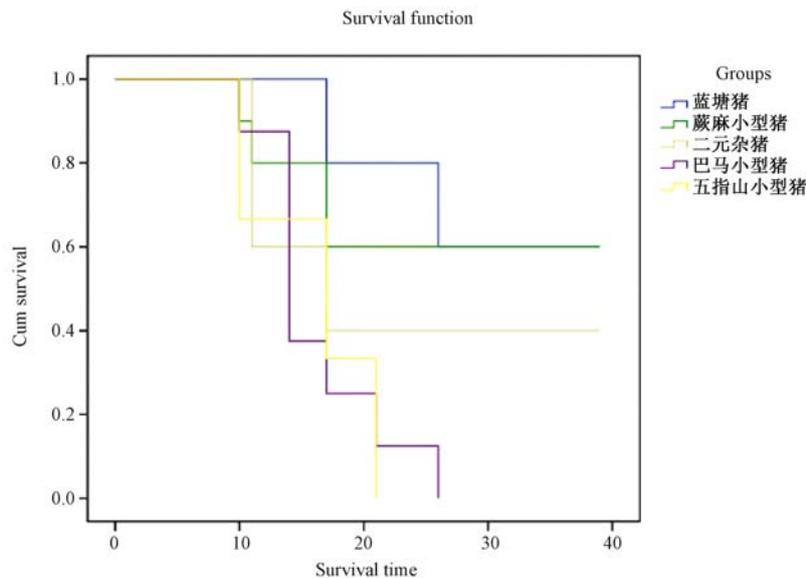
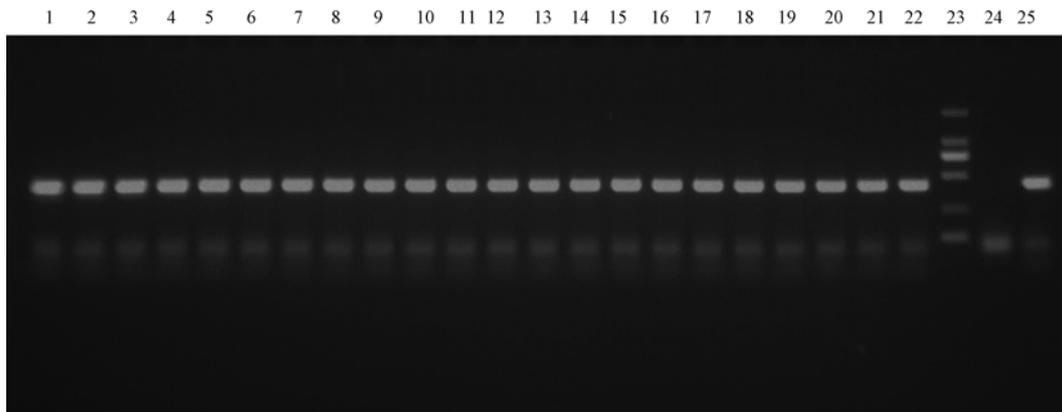


图 1 攻毒后各组生存曲线

Fig.1 Survival curves of the minipigs of each group after inoculation



注:1~22 泳道分别为蓝塘猪(4 头)、蕨麻小型猪(4 头)、巴马小型猪(8 头)、五指山小型猪(3 头)、二元杂猪(3 头);23 泳道为 marker(DL2000);24 泳道为阴性对照;25 泳道为阳性对照(436 bp 条带)

图 2 RT-PCR 检测电泳图 Note. Tracks 1~22: Lantang minipigs (4), Juema minipigs (4), Bama minipigs (8), Wuzhishan minipigs (3), Binary hybrid pigs (3); Track 23: DNA marker (DL2000); Track 24: Negative control; Track 25: Positive control (436 bp)

Fig. 2 The patterns of RT-PCR electrophoregram

本研究选取的实验动物都为 PRRSV 抗体阴性,而攻毒后动物出现了 PRRS 的典型症状和病变,RT-PCR 检测为阳性,存活动物的 PRRSV 抗体全为阳性,说明动物死亡是由 HP-PRRSV 造成的,符合农业部《高致病性猪蓝耳病防治技术规范》高致病性蓝耳病的诊断标准。

接种 HP-PRRS 活疫苗是防控 PRRS 的有效方法,而检验该疫苗需要使用对 HP-PRRSV NVDC-JXA1 强毒株敏感的猪种,并且该猪种攻毒后 21 d 死亡率要达到 40% (2/5) 以上^[6]。本研究中所有动物的死亡时间在接种后 15 d~21 d 之间,符合 21d 内死亡的要求;对照组二元杂猪死亡率达到 60%,符合第 1548 号公告 40% 以上死亡率的要求,本次试验结果能够成立;从猪种上看,所有动物都出现死亡,且死亡率达到 40% 或 40% 以上,说明这 4 种猪对 PRRS 都有一定的敏感性;其中巴马小型猪和五指山小型猪白系死亡率达到 100%,初步说明这两种小型猪对 PRRS 比较敏感,其敏感性超过了对照组二元杂猪,可用于 HP-PRRS 活疫苗的检验。

参考文献:

- [1] Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States [J]. J Am Vet Med Assoc, 2005, 227(3): 385-392.
- [2] Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers [J]. J Swine Health Prod. 2013, 21(2): 72-84.
- [3] 张青娟,王克领,张立宪,等. 高致病性蓝耳病的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(9): 105-107.
- [4] 张传红. 高致病性猪蓝耳病的防治技术 [J]. 中国畜禽种业, 2014, (4): 132-133.
- [5] 许进红,黄跃明,尚建明,等. 高致病性猪蓝耳病活疫苗免疫效果观察及临床应用探讨 [J]. 当代畜牧, 2014, 2:26-29.
- [6] 高致病性猪繁殖与呼吸道综合征活疫苗 (JXA1-R 株) 质量标准、说明书和内包装标签 [E]. 中华人民共和国农业部公告第 1548 号.
- [7] 孙倩. 实验动物学基础 [M]. 北京:北京科学技术出版社. 2005:75.
- [8] 陈溥言. 兽医传染病学 [M]. 北京:中国农业出版社. 2008: 221-223.
- [9] 薛平,曲向阳. 我国高致病性蓝耳病研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(5): 138-139.

[修回日期] 2015-04-21