

# 我国南方猪高热病的研究 ( )

## ——猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒的分离、鉴定和致病性测定

宁宜宝<sup>1</sup>, 郑杰<sup>1,2</sup>, 张纯萍<sup>1</sup>, 赵启祖<sup>1</sup>, 刘业兵<sup>1</sup>  
宋立<sup>1</sup>, 丘惠深<sup>1</sup>, 邱伯根<sup>3</sup>, 邱立新<sup>3</sup>, 王琴<sup>1</sup>, 沈青春<sup>1</sup>

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 中国农业大学, 北京 100094; 3. 湖南省兽医总站, 湖南长沙 410007)

[收稿日期] 2006-12-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1208(2007)01-0014-05 [中图分类号] S858.28

[摘要] 从我国南方某猪场高热病死猪的组织中分离出能引起 Marc145 细胞病变的病毒, 经过血清中和试验、RT-PCR 测定, 确定分离物中存在美洲型猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 (PRRSV)。将细胞病毒液感染 13 头 55 ~ 105 日龄健康猪, 另有 3 头健康猪用于同居感染。随意挑取 13 头中 7 头再用大肠杆菌培养物加强感染, 感染后每天测温, 观察临床症状, 记录死亡情况和病理变化。结果表明: PRRSV 单独感染猪 6/6 发病, 5/6 死亡; 大肠杆菌与 PRRSV 混合感染猪 7/7 发病, 5/7 死亡; 同居感染的 3 头全部发病, 1 头死亡。所有感染猪于感染后 2 ~ 4 d 内均出现体温升高。两周后体温下降至正常, 直到死亡前体温不再升高。死亡多集中在感染后的 34 ~ 50 d 的 2 周时间内。将圈舍温度升至 29 ℃ 对感染猪发病无加强作用。死亡猪的病理变化主要表现为严重的出血性、间质性肺炎, 肢体远端皮表出血。结果表明, 虽然 PRRSV 感染能够引起猪产生高热和高的发病死亡率, 但从发病到死亡时间及某些病理变化上看, 和南方猪场的发病死亡猪还存在一定的差异, 这可能与猪场的一些激发因子或其他病原混合感染有关, 从组织和细胞分离物的电子显微镜照片也证明了这一点。

[关键词] 猪高热病; 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒; 感染; 分离; 鉴定

## Research on Swine High Fever without Confirmed Pathogen ( ) —— Isolation, Identification and Pathogenic Test about Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus

N NG Yi-bao<sup>1</sup>, ZHENG Jie<sup>1,2</sup>, ZHANG Chun-ping<sup>1</sup>, ZHAO Qi-zu<sup>1</sup>, LU Ye-bing<sup>1</sup>,  
SONG LI<sup>1</sup>, Q U Hui-shen<sup>1</sup>, Q U Be-gen<sup>3</sup>, Q U Li-xin<sup>3</sup>, WANG Qin<sup>1</sup>, SHEN Qing-chun<sup>1</sup>

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; 2. China Agricultural University, Beijing 100094;

3. Hunan Provincial Veterinary Station, Changsha, Hunan 410007; China )

**Abstract:** A virus strain was isolated by Marc-145 cell lines from dead pigs with swine high fever disease in south China. The virus was identified by serological neutralization, RT-PCR and electricitic microscope, the result showed that it was porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). 13/16 healthy pigs (55 ~ 105 days) were infected by the PRRSV, and in order to reinforced the infection, 7/13 pigs were injected by *Escherichia coli* (*E. coli*). Body temperature was measured and clinic symptoms were noted everyday. 6/6 pigs in the group infected by PRRSV appeared classical symptoms, and 5/6 died. 7/7 pigs in the group challenged by PRRSV

作者简介: 宁宜宝 (1956年 ~), 男, 湖北省大悟县人, 研究员, 主要从事动物微生物与传染病研究。

and *E. coli* appeared classical symptoms, 5/7 died. 3/3 contagion pigs appeared classical symptoms, and 1/3 died. All the infected pigs' temperature rises in 2 ~ 4 d, most pigs died in 34 ~ 50 d. Interstitial pneumonia, carnification, haemorrhage in all dead pigs' lung, are the features of anatomy. The result indicated that PRRSV was the major cause of swine high fever without confirmed pathogeny in south China, although there were different feature in our laboratory with some disease prevalence areas in south China.

**Key words:** swine high fever; PRRSV; infection; isolation; identification

2006年夏季,在我国高温高湿的南方地区的猪群中出现了一种不明原因的高热病,疫情来势猛,传播快,波及范围广,各品种、各年龄的猪均易感,临床抗生素治疗效果差或根本无效。在一些疫区,发病率死亡率高达50%以上。本试验所用病料来源于一个管理规范的大规模的养猪场,自2006年8月中旬开始发病,发病猪体温突然升高至41~42,并连续出现大量死亡,死猪全身出血,以肢体远端如四肢、耳尖出血最为严重,肺脏等器官和全身淋巴结出血严重,消化道和泌尿生殖道出血。该猪场曾经免疫过猪瘟、猪丹毒、猪肺疫、仔猪副伤寒、伪狂犬、口蹄疫、乙脑、细小病毒、萎缩性鼻炎和猪链球菌疫苗,有规范的免疫程序。调查采样的其他猪场除规模较小外,发病死亡情况基本相似。为了从病原学摸清猪感染发病死亡原因,在试验<sup>[1]</sup>中进行了细菌分离和病原性测定,结果排除了大肠杆菌为主要致死病原的可能性,同时在试验中发现了病毒致病的潜在因素,故进行了本实验。

## 1 材料

1.1 病料 11份来自猪场发病死亡猪的病料和两头用猪场病死猪组织悬液人工感染病死猪的病料,分别采自发病猪的心、肝、脾、肺、肾、扁桃体、淋巴结、胎儿组织、胎盘、胃肠等。

1.2 细胞 Veero, MDCK、Marc145及 PK15,中国兽医药品监察所鉴定、保存和提供。

1.3 PRRSV 抗血清 中国农业大学杨汉春教授惠赠,中和效价为1:40。

1.4 SPF鸡胚 乾元浩生物股份有限公司提供。

1.5 实验猪 12头 55日龄左右的健康仔猪,4头 105日龄左右健康猪。均来自河北省保定市满城县中国兽医药品监察所猪实验基地。经伪狂犬、猪繁殖与呼吸综合征及猪瘟病毒检测,均为阴性。

1.6 大肠杆菌 从病死猪组织分离,活菌滴度为  $2 \times 10^8$  CFU/mL。分离鉴定方法见参考文献<sup>[1]</sup>。

1.7 感染用攻毒液 为 Marc145细胞分离物,病毒滴度为  $1 \times 10^{6.5}$  TC<sub>D50</sub>。

## 2 方法

### 2.1 分离病毒的鉴定

2.1.1 病毒分离 将病料组织剪碎,加入少量生理盐水用组织研磨器研磨,在-25℃下反复冻融3次,以8000 r/min,离心30 min,取上清,用0.2 μm滤膜过滤除菌,分别接种 Veero、MDCK、Marc145及 PK15细胞培养,观察细胞病变。

2.1.2 PRRSV病毒中和试验 将致 Marc145细胞病变的病毒分离物分别作1:2~1:16倍稀释,然后用1:5倍稀释的 PRRSV高免血清对倍加入,室温中和2 h后,4℃过夜,然后将中和的病毒液接种 Marc-145细胞,观察病毒对细胞的致病情况。

2.1.3 RT-PCR 鉴定 用特异性的 PRRSV、PRV、PCV- 这3对引物,对病毒分离物进行扩增,并将得到的扩增产物测序。

2.1.4 电子显微镜观察 取用于病毒分离的组织液和细胞分离的病毒浓缩液分别固定和灭活后送中国农科院原子能所透射电镜观察。

2.1.5 血凝试验 将细胞分离的病毒液和用病毒液传 SPF鸡胚第2代的尿囊液与1%鸡红细胞按规程方法进行微量血凝试验。

2.1.6 感染猪组织病原检测 试验猪在感染24 d后,活体采集扁桃体,死亡后采取扁桃体和肺脏组织,用荧光抗体作猪瘟和伪狂犬抗原测定。

### 2.2 实验猪的感染和观察

2.2.1 试验分组 将16头实验猪随机分成3组,第1组7头猪,同时感染大肠杆菌和 PRRSV;第2组6头猪,单独感染 PRRSV;第3组3头猪,不感染,用于病毒感染猪同舍混合饲养,作同居感染观察。

#### 2.2.2 感染方法和途径

2.2.2.1 大肠杆菌感染 以新鲜培养物( $2 \times 10^8$  CFU/mL)左侧颈部肌肉注射,3 mL/头。

2.2.2.2 PRRSV感染 将病毒细胞培养液连续冻融3次后,以原倍病毒液( $1 \times 10^{6.5}$  TC<sub>D50</sub>) 2 mL/头右侧颈部肌肉注射,1.5 mL/头滴鼻感染。

2.2.3 饲养温度控制 将每组感染猪分为两组,一组在不加热的猪舍(10~20℃)饲养,一组在加热的猪舍(28~29℃)饲养。25 d后将加温设施除掉,将所有猪舍的温度统一控制在10~20℃。

2.2.4 试验猪观察 连续观察 50 d, 每天测温, 观察临床症状, 及时解剖死亡猪, 观察病变, 采样, 记录结果。

### 3 结果

3.1 病毒分离结果 将过滤除菌的病死猪组织悬液同时接 Vero, MDCK、Marc145 及 PK15 四种细胞作病毒分离, 只有 Marc145 细胞在接种组织悬液后出现细胞病变, 而其他 3 种细胞在接种组织悬液后未发现任何细胞病变。同时将病料接种 SPF 胚, 连传二代没有出现鸡胚死亡。

#### 3.2 病毒鉴定结果

3.2.1 血清中和试验 将引起 Marc-145 细胞病变的病毒分离液经抗 PRRSV 的高免血清中和后, 再接种 Marc-145 细胞, 病毒丧失了对此细胞的致病能力。结果证明, 分离物中存在 PRRSV, 而且该病毒能被抗 PRRSV 的高免血清特异性中和。

3.2.3 RT-PCR 鉴定 用 PRRSV、PRV、PCV 3 对引物分别对攻毒用 Marc-145 细胞病毒分离物人工感染死亡猪的脏器悬液进行扩增, 结果只有 PRRSV 引物扩增出了目的片段, 而 PRV 引物、PCV 引物均未扩增出目的片段。将 PRRSV 扩增产物进行基因序列测定, 并将该基因序列与 PRRSV 美洲型标准株 2332 株的基因序列进行比较, 结果证明: 细胞分离的病毒和死亡猪脏器组织中的病毒均为美洲型 PRRSV, 见图 1。

3.2.4 电子显微镜观察 将病死猪组织和细胞分离的病毒用透射电镜进行观察, 结果在用于病毒分离的组织脏器中发现有 3 种不同直径的病毒粒子, 其中占主导的一种是直径 60 nm 左右与 PRRSV 大小接近的病毒粒子, 此外还有 120 nm 左右和 30 nm 左右的两种病毒粒子。然而在细胞分离的病毒液样品中, 我们只发现了 60 nm 左右的一种病毒粒子。这表明: 只有 60 nm 左右病毒适应 Marc-145 细胞, 而 120 nm 左右和 30 nm 左右的两种病毒粒子不

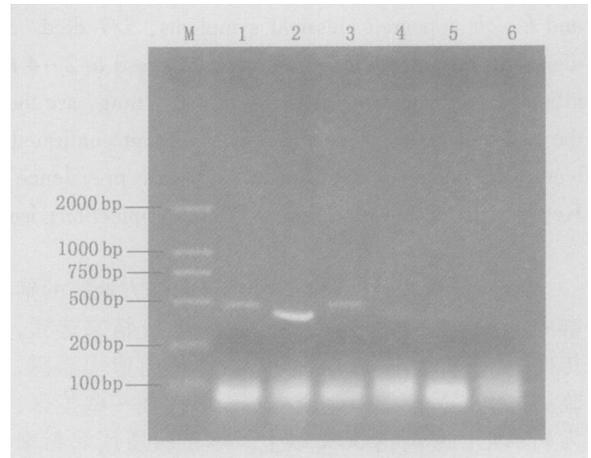


图 1 PRRSV 引物扩增结果

M: Marker, 1 ~ 2: Marc-145 细胞病毒分离物套式 RT-PCR 结果, 3 ~ 6: 死亡猪脏器组织的套式 RT-PCR 结果

能在 Marc-145 细胞中增殖。

3.2.5 感染猪组织荧光抗体结果 所有猪在感染 24 d 后扁桃体和死亡猪扁桃体与肺脏中猪瘟和伪狂犬抗原均为阴性。

3.2.6 血凝试验 将细胞分离的病毒液和病毒液传 SPF 鸡胚第 2 代的尿囊液与 1% 鸡红细胞按常规方法进行微量血凝试验, 结果全部为阴性反应。

#### 3.3 用 Marc-145 细胞分离的 PRRSV 感染猪的发病死亡结果

3.3.1 感染猪的体温变化结果 从表 1 可以看出: 不同圈舍温度对感染猪的体温变化有一定的影响, 将圈舍温度从 10 ~ 20 提高到 28 ~ 29, 能使感染猪的体温升高 0.5 左右。由此可见, 高温高湿可以增加猪的发病程度。

3.3.2 临床症状 感染猪的体温升高后, 食欲明显减退, 畏寒、扎堆, 后肢跛行, 背拱起, 喜卧。到后期, 感染猪明显消瘦, 被毛丛乱, 部分猪出现咳嗽, 呼吸急促以致困难。

表 1 感染猪的体温变化

组 别	感染后开始时间 /h	升温持续时间 /d	温度升幅 /	最高温度 /
大肠杆菌 + PRRSV (未加温组)	72 (3/3)*	8 (2/3)	1.5 (3/3)	41.4 (1/3)
大肠杆菌 + PRRSV (加温组)	72 (4/4)	13 (3/4)	2 (4/4)	41.8 (3/4)
PRRSV (未加温组)	72 (1/1)	13	1.4	41
PRRSV (加温组)	24 (3/5)	14 (5/5)	2.0 (5/5)	41.8 (3/5)
	48 (2/5)			41.6 (2/5)

\* 分子为出现温度变化的猪数, 分母为试验猪数。

3.3.3 感染猪的发病死亡 在感染后, 将猪分成 两组, 一组将猪圈加温到 28 ~ 29, 一组不加

温, 25 d后, 将加温设施除掉, 使所有猪舍的温度保持 10 ~ 20 , 观察感染猪的发病死亡情况, 见表 2。

表 2 感染猪的发病死亡时间

组 别	感染猪死亡情况	感染后死亡时间 /d	肉眼病理变化
大肠杆菌 + PRRSV	5/7	18(1/5)*	体表远端出血, 蹄部黄豆大小
		35(1/5)	扣状坏死, 严重出血性肺炎,
		39(1/5)	局部淋巴结出血, 以背部淋巴
		50(2/5)	结出血多见。
PRRSV	5/6	34(1/5)	同上
		38(1/5)	
		40(1/5)	
		41(2/5)	
同居感染	1/3	47(1/1)	同上

\*分子为出现死亡的猪数, 分母为试验组在观察期间死亡总猪数。

在圈舍加温的 25 d期间, 除了感染大肠杆菌 + PRRSV后在 10 ~ 20 条件下饲养的 1头猪于感染后 18 d死亡外, 其他感染猪并没有出现更为严重的临床症状, 也没有出现死亡。有意思的是, 当所有猪圈温度降至 10 ~ 20 后, 多数试验感染猪出现死亡。猪的死亡是出现在较低温度下, 而不是发生在高温的情况下, 尽管发病死亡率非常相似, 但这与 2006年南方猪高热发病死亡主要出现在夏天高温高湿季节有所不同。

3.4 同居感染试验结果 将 1头 PRRSV 感染的 105日龄猪与 3头同日龄健康猪同圈饲养, 第 3天 PRRSV 感染猪出现体温升高, 并于感染后 41 d死亡, 而同居饲养的 3头猪于 1w左右体温升高, 其中 1头于感染后 47 d死亡, 眼观病理变化与其他感染猪相似。结果证明: 感染猪与健康猪同圈饲养可造成同居感染。

3.5 不同日龄猪对 PRRSV 感染敏感性的差异 从试验结果看, 55日龄 PRRSV 感染猪 12头猪全部发病, 其中有 9头死亡; 105日龄的 4头猪, 1头感染, 3头不感染但同居饲养, 所有猪均发病, 1头死亡, 另外 2头猪中还有 1头处于濒死状态。结果证明, 各种日龄猪对此次分离的 PRRSV 均易感, 不同的只是大日龄的感染猪症状较小猪轻一些, 死亡时间较小猪晚几天而已。

3.6 大肠杆菌的协同作用 从此试验结果看, 大肠杆菌和 PRRSV 双重感染的 7头猪尽管都出现高热, 但大肠杆菌同时感染对 PRRSV 的致病性似乎没有明显的协同作用, 此结果与本研究第 1报<sup>[1]</sup>的试验结果不完全一致, 这可能与实验猪的年龄有

关, 因为大肠杆菌主要引起断奶前的小猪发病死亡, 第 1报的试验所用的猪为 30日龄的猪, 而本试验所用猪均为 55日龄以上的猪。另外, 此试验用于感染实验猪的病原是 Marc-145 细胞分离的 PRRSV, 较第 1报试验直接使用的死亡猪组织悬液在病原方面可能更单一和更纯净一些。

#### 4 讨论

通常情况下, PRRSV 感染导致小猪高发病死亡多发生在怀孕期间和断奶前, 对断奶后的小猪, PRRSV 感染多表现为生长发育不良, 死亡率并不高, 特别是年龄在 50日龄以上的猪更是如此。而本试验的结果是 55 ~ 105日龄猪感染 PRRSV 后仍然出现 100%的发病率和 70%的死亡率, 这和前些年蓝耳病流行的情况也相差甚远。作者认为出现这种情况有以下几种原因: 一是此次引起高热高死亡率的 PRRSV 毒株是一种高度变异株, 根据初步的基因序列测定结果, 该毒株在基因结构上与 PRRSV 标准株 2332差异较大, 在一些区域, 连续缺失 3 ~ 4个碱基, 有的地方又多出一些碱基, 基因结构变异很大(另报)。可能是这种基因结构的高度变异导致了 PRRSV 对大日龄猪的致病力提高了。

本试验用 Marc-145 细胞分离的 PRRSV 感染, 虽也能像猪场一样引起感染猪高的发病死亡率, 但感染猪的死亡时间基本集中在感染后的 34 ~ 50 d的时间里, 明显比田间猪场从发病到死亡的时间(2 ~ 3周)要长, 与作者前期用猪场病死猪组织悬液感染 30日龄猪, 在感染后 12和 19 d死亡的时间也推迟了 20多天。结果表明, PRRSV 可能是引起猪高热、死亡关键的病原, 但可能还有其他应激因素或病原在起协同作用。为证实这一点, 作者将病死猪组织和细胞分离的病毒用透射电镜进行观察, 结果在病死猪组织脏器中发现有直径约 60 nm、30 nm和 120 nm的 3种病毒粒子, 而在本次感染试验猪的细胞分离病毒液中, 只发现了 60 nm左右的一种病毒粒子(另报)。本试验的结果与前期 30日龄猪的结果不一致也说明了这一点。因为用于前期 30日龄猪感染的是同时存在 3种病原的过滤除菌的组织悬液, 所以用其复制的疾病与田间相似, 而将悬液接种细胞作病毒分离时, 只有适应 Marc-145细胞的病毒才能分离出来, 用这种较为纯净的 PRRSV 复制的疾病可能和田间发病情况有一些差异。另外, 尽管我们提高了室内温度, 但我们没有提高湿度, 这也可能是试验结果与田间猪场高温高湿的环境下疾病的表现有一定差异的原因。从另一方面也可以看出, 尽管是在温度湿度不高的情况

下, PRRSV 感染的确可以引起感染猪高的发病率和死亡率。这一点必须引起我们高度重视。

致谢:徐璐,范学政,江焕贤,范运峰,邹兴启同志也参加了该项研究工作,特此致谢。

参考文献:

[1] 宁宜宝,郑杰,张纯萍,等.我国南方猪高热病的研究( )——大肠杆菌的分离、鉴定和致病性测定[J].中国兽药杂志,2006,40(12):1-4.

[2] AlbinaE, CarraC, CharleyB. Interferon-alpha Response to Swine Arterivirus (PoAV), the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus[J]. Interferon Cytokine Res, 1998, 18: 485 - 490.

[3] Allan G, McNeilly F, Ellis J, et al Experimental Infection of Colostrum Deprived Piglets with Porcine Circovirus 2 (PCV2) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Potentiates PCV2 Replication[J]. Arch Virol, 2000, 145: 2421 - 2429.

[4] Allende R, Kutish G F, Laegreid W, et al Mutations in the Genome of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Responsible for the Attenuation Phenotype[J]. Arch Virol, 2000a, 145: 1149 - 1161.

[5] Allende R, Laegreid W W, Kutish G F, et al Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs Upon Experimental Infection[J]. J Virol, 2000b, 74: 10834 - 10837.

[6] Allende R, Lewis TL, Lu Z, et al North American and European Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Differ in Non-structural Protein Coding Regions[J]. J Gen Virol (Pt2) 1999: 307 - 315.

[7] Benson J, YaegerM, Christopher-henningsJ, et al A Comparison of Virus Isolation, Immunohistochemistry, Fetal Serology and Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Transplacental Infection in the Fetus[J]. Vet Diagn Invest, 2002, 14: 8 - 14.

[8] Botner A, Stradbygaard B, Sorensen K J, et al Appearance of Actue PRSS-like Symptoms in Sow Herds after Vaccination with a Modified-like PRRS Vaccine[J]. Vet Res, 1997, 141: 497 - 499.

[9] Christopher-Hennings J. The Pathogenesis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in the Boar[J]. Vet Res, 2000, 31: 57 - 58.

[10] Halbur P G, Bush E Update on abortion storms and sow mortality[J]. Swine Health Prod, 1997, 5 (2): 73.

兽药 GMP合格企业名录 (1)

企业名称	检查验收范围	证书编号	状态	有效期
佛山市南海区佛丹动物药业有限公司	口服溶液剂、消毒剂 (液体)、粉剂 预混剂 散剂	(2006)兽药 GMP证字 393号	改扩建	5年
丹东市绿丹和华动物药业有限公司	小容量注射剂 (激素类)	(2006)兽药 GMP证字 394号	新建	5年
山东动物药品厂	粉剂 散剂 预混剂、消毒剂 (固体、液体)	(2006)兽药 GMP证字 395号	改扩建	5年
宁波第二激素厂	小容量注射剂 (激素类)	(2006)兽药 GMP证字 396号	改扩建	5年
山西省阳城县蚕药厂	蚕用溶液剂、消毒剂 (固体)	(2006)兽药 GMP证字 397号	改扩建	5年
甘肃武威天马药业有限责任公司	粉针剂、大容量注射剂 (静脉注射剂)、片剂、粉剂 散剂 预混剂	(2006)兽药 GMP证字 398号	改扩建	5年
湖南润邦生物工程有限公司	粉针剂、小容量注射剂 (含中药提取)、原料药 (土霉素钙盐)、消毒剂 (液体)、粉剂 散剂 预混剂	(2006)兽药 GMP证字 399号	改扩建	5年
上海源森医药原料有限公司	原料药 (维生素 B1 -盐酸硫胺 >)	(2006)兽药 GMP证字 400号	改扩建	5年
重庆市川通兽药有限责任公司	小容量注射剂、消毒剂 (液体)、粉剂 散剂 预混剂	(2006)兽药 GMP证字 401号	改扩建	5年
重庆方通动物药业有限公司	小容量注射剂、口服溶液剂、消毒剂 (固体、液体)	(2006)兽药 GMP证字 402号	改扩建	5年
四川省七大洲农牧科技有限公司	粉剂 散剂 预混剂	(2006)兽药 GMP证字 403号	改扩建	5年
天津市华鑫药业有限公司	散剂 预混剂、消毒剂 (液体、固体)、外用杀虫剂 (液体)	(2006)兽药 GMP证字 404号	改扩建	5年
天津市圣世莱科技有限公司	粉剂 预混剂 散剂	(2006)兽药 GMP证字 405号	新建	5年
湖南省亚牧动物药业有限公司	小容量注射剂、粉针剂、粉剂 散剂 预混剂	(2006)兽药 GMP证字 406号	改扩建	5年
爱迪森 (北京) 生物技术有限公司	口服溶液剂 (含中药提取)、消毒剂 (液体 非氯制剂)	(2006)兽药 GMP证字 407号	新建	5年