

高国丽,官凯锋,孟向阁,等. HP-PRRSV 人工感染后猪血清病毒载量和体重增长的变化规律 [J].华中农业大学学报,2020,39(5):56-61.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.05.008

HP-PRRSV 人工感染后猪血清病毒载量 和体重增长的变化规律

高国丽,官凯锋,孟向阁,王媛,周翔,刘榜

华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/

生猪健康养殖省部共建协同创新中心/湖北省地方猪品种改良工程技术研究中心,武汉 430070

摘要 为研究高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(high pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome virus,HP-PRRSV)感染猪后其血清病毒载量和体重增长的变化规律,以大白猪和通城猪的高代横交群体中 72 头健康仔猪为研究对象进行 HP-PRRSV 人工感染,观察临床症状,并在感染前和感染后第 4、7、11、14、21、28、35 天进行空腹采血、体重称量、血清分离以及病毒载量检测。结果显示:在感染第 0~4 天体重增长速度缓慢,第 4~21 天体重一直呈负增长、第 7~11 天体重减少量达最大值、第 21~35 天体重呈正增长;病毒载量在感染第 4 天达到峰值并持续到第 7 天,第 7~35 天病毒载量逐渐下降至 6.62 lg copies/mL;感染第 7 天出现死亡,死亡个体主要集中在 7~14 d,在第 10 天出现死亡高峰,第 19 天后基本稳定;依据第 14 天存活与否,将试验猪分为抗病和易感 2 个组,抗病组的病毒载量在第 4、7、11 天均显著低于易感组($P<0.05$),该组的体重增长量在第 4~7、7~11、11~14 天均显著高于易感组($P<0.05$)。上述结果表明,在感染过程中体重增长和病毒载量 2 个性状可作为预测 PRRS 抗病性的指示性状。

关键词 通城猪;大白猪;HP-PRRSV;人工感染;病毒载量;PRRS 抗病性;指示性状

中图分类号 S 828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)05-0056-06

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome,PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)引起的一种以各年龄段猪呼吸障碍、母猪繁殖障碍、仔猪高死亡率为主要特征的病毒性疾病^[1]。PRRSV 分为北美型和欧洲型^[2]。2006 年中国第一次暴发的高致病性 PRRS (high pathogenic-PRRS,HP-PRRS)是由高致病性 PRRSV 变异株引起,该毒株属于北美型毒株变异型,与经典 PRRSV 相比,HP-PRRSV 的毒力、致病性和对免疫器官损伤程度等均更强^[3]。PRRSV 基因组的长度从 14.9 kb 到 15.5 kb 不等,有多个开放阅读框^[4],ORF3 和 ORF5 是易变区^[5],ORF6 和 ORF7 是保守区^[6]。由 ORF7 编码的 N 蛋白是 PRRS 病毒颗粒中含量较高的结构蛋白^[7]。PRRSV 感染后病毒基因组复制、编码的 mRNA 和

蛋白质大量表达,组装形成新的病毒;其中 ORF7 编码的结构蛋白表达量高,因此,可以通过检测 ORF7 mRNA、蛋白的表达量来测定病毒的量^[7]。

PRRSV 感染可抑制机体免疫应答,易造成其他病原的混合感染和继发感染^[8]。研究表明,PRRSV 感染早期对机体免疫功能的抑制十分明显^[9],从而促进病毒在机体内大量繁殖;感染后期机体免疫应答能力与病毒水平的对弈决定着机体的抗病性和个体的存活能力,而存活个体的免疫系统将抑制病毒增殖并使病毒载量逐渐降低,甚至完全被清除^[10]。PRRSV 感染后,其结构蛋白和非结构蛋白可能通过靶向调节宿主细胞的不同细胞组分来调控细胞周期进程和促进病毒的增殖^[11],进而导致宿主的生长发育阻滞。

笔者所在课题组前期研究发现通城猪与大白猪相比具有更强的抗病力,通过 HP-PRRSV 人工感

收稿日期:2020-03-25

基金项目:国家自然科学基金重点项目(31930104);武汉市应用基础前沿项目(2018020401011306)

高国丽,硕士研究生.研究方向:动物遗传育种. E-mail: gaoguoli@webmail.hzau.edu.cn

通信作者:刘榜,博士,教授.研究方向:动物遗传育种. E-mail: Liubang@mail.hzau.edu.cn

染后发现两品种在临床症状、细胞因子水平、血常规指标、组织病理损伤程度、病毒载量等方面存在较大差异^[12]。为了探究在 HP-PRRSV 感染过程中是否存在早期抗病指示性状,本研究以大白猪和通城猪高代横交群体为对象,进行 HP-PRRSV 人工感染,通过感染前后不同时间点病毒载量和体重的测定结果来研究其变化规律,并进行 PRRS 抗病性与易感性的分析,以鉴定 PRRS 抗病指示性状。

1 材料与方法

1.1 HP-PRRSV

人工感染用病毒是高致病性的 PRRSV-WUH3 毒株(由华中农业大学农业微生物国家重点实验室肖少波教授惠赠),病毒滴度为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL。

1.2 试验猪来源及分组

在通城县云志生态养殖场选择通城猪与大白猪杂交构建的高代横交群体中的健康断奶仔猪,5 周龄时通过前腔静脉采血并检测猪 PRRSV、圆环病毒和伪狂犬病毒病原和抗体,所检测的 3 种病毒病原和抗体均为阴性后挑选试验用猪,共 72 头,分批次进行试验。试验猪进入预试,注射抗生素进行保健,预试期为 7 d,11 周龄时进入 HP-PRRSV 感染试验。对 72 头猪全部进行感染试验并按照 3 mL/15 kg 的剂量接种 HP-PRRSV(滴鼻接种 1 mL 和肌肉注射 2 mL),依据第 14 天存活与否,将试验猪分为抗病和易感 2 个组,其中抗病组 36 头,易感组 36 头。感染第 0~35 天在 08:00 测量猪的直肠温度,在不同感染时间(days post infection, dpi),即感染前(第 0 天)和感染后第 4、7、11、14、21、28、35 天空腹称量体重。同时通过前腔静脉进行采血,随后分离血清,血清于 -80 °C 保存备用,用于病毒载量的测定。

1.3 血清病毒载量测定

使用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(Tiangen, 中国)从已分离的血清中提取 RNA,用 Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 日本)将提取的 RNA 反转录为 cDNA。抽提已构建好的 HP-PRRSV pMD18-ORF7 质粒,测定浓度后进行梯度稀释,以猪 cDNA 和梯度稀释的 pMD18-ORF7 质粒为模板,根据 HP-PRRSV ORF7 设计引物(上游引物:5'-TCAGCT-

GTGCCAAATGCTGG-3', 下游引物:5'-AAATGGGGCTTCTCCGGGTTTT-3')和探针(5'-FAM-TCCCGGTCCCTTGCCTCTGGA-TAMRA-3'),按照 Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa, 日本)说明进行定量 PCR 检测。扩增程序为:95 °C 预变性 30 s, 40×(95 °C 5 s, 60 °C 30 s)。质粒拷贝数计算公式:质粒分子质量=碱基数×660,质粒拷贝数(copies/mL)= $6.02 \times 10^{17} \times$ 质粒浓度÷质粒分子质量。以 6 个梯度稀释的 pMD18-ORF7 载体的 Ct 值和拷贝数构建标准曲线,并根据标准曲线和所有 HP-PRRSV 感染个体 cDNA 的 Ct 值计算病毒载量。

1.4 体重增长测定

在感染前(第 0 天)和感染后第 4、7、11、14、21、28、35 天对 72 头试验猪进行空腹称量体重,不同时间段的体重增长为当前体重减去前一次称量的体重。

1.5 统计分析

本研究的数据使用 R3.6.3 进行分析和 Graph-Pad Prism 7.0 软件作图;采用 *t* 检验对抗病组和易感组进行差异显著性检验,以 $P < 0.05$ 表示结果差异显著(*), $P < 0.01$ 表示差异极显著(**);使用 R 软件计算病毒载量和体重增长与感染第 14 天存活的 Pearson 相关系数,进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 HP-PRRSV 感染后临床症状

HP-PRRSV 人工感染前猪的精神状态良好,采食、饮水正常。HP-PRRSV 感染后,第 3 天开始陆续出现流鼻涕、咳嗽、打喷嚏、腹式呼吸、呼吸困难、腹泻、卧地不起、抽搐、眼睑水肿、皮肤发绀等临床症状。

感染前所有个体体温正常,感染第 1 天出现体温升高,体温持续升高到感染后第 6 天,平均体温(41.2 ± 1.1) °C,有些个体最高体温达 43.9 °C,之后体温略有下降但仍高于正常体温,第 10 天后以锯齿形式逐渐降低,第 21 天后体温恢复正常(图 1)。

HP-PRRSV 感染后第 7 天出现死亡,第 10 天为死亡高峰期,第 14 天后平缓,第 19 天后稳定(图 2)。死亡猪剖检的大体病理变化主要是:肺呈暗红色、水肿、肉样病变、肺间隔增宽;心脏质地柔软、心包有积液;淋巴结肿大,呈大理石样外观等。

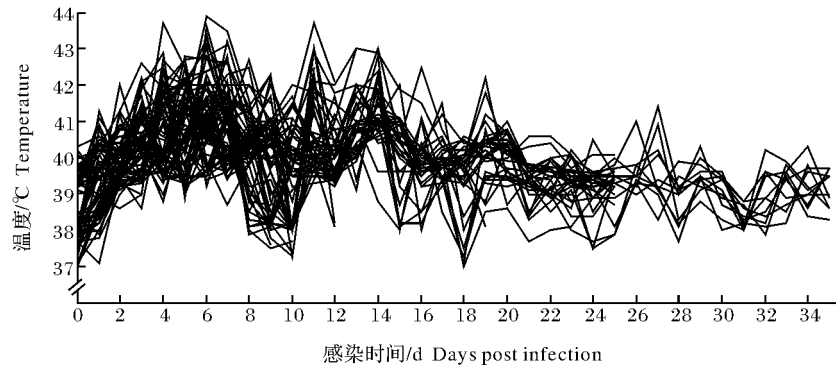


图 1 HP-PRRSV 感染后群体体温变化

Fig.1 The change of temperature after HP-PRRSV infection

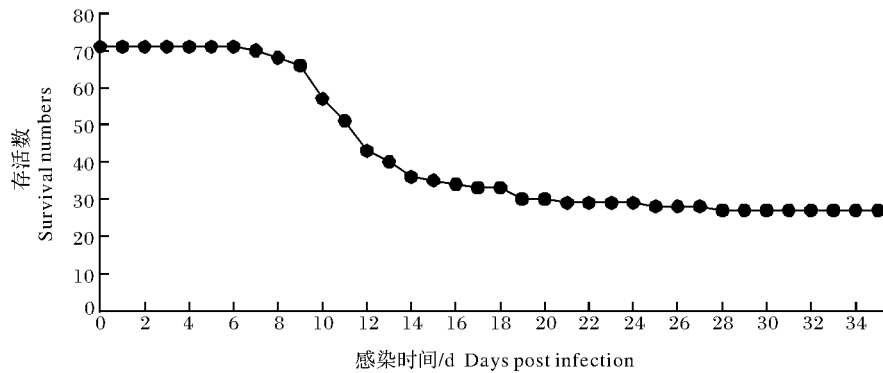


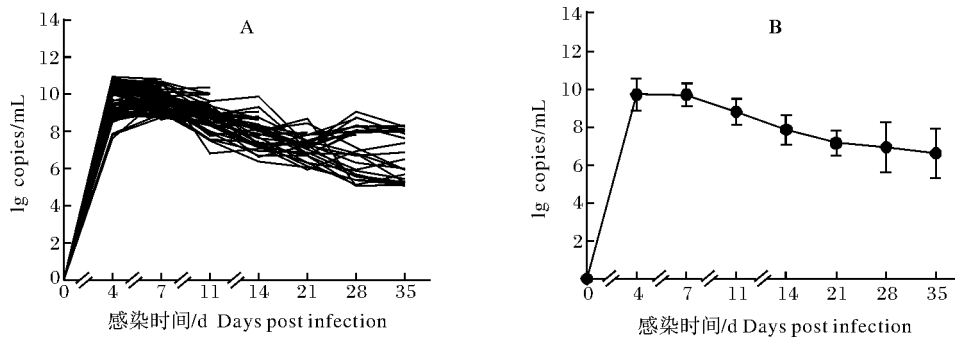
图 2 HP-PRRSV 感染后个体存活数量变化

Fig.2 The number of surviving individuals after HP-PRRSV infection

2.2 病毒载量

HP-PRRSV 感染后病毒开始在宿主体内复制增殖,在所有个体内第 4 天的病毒载量升高到最高值,一直持续到第 7 天,峰值约为 9.71 lg copies/mL,相当于每毫升中约有 10^{10} 个病毒;个体间存在较大差异,最高值达到 10.84 lg copies/mL,相当于每毫升中约有 10^{11} 个病毒,最低值为 8.65 lg copies/

mL,相当于每毫升中约有 10^9 个病毒,最高值和最低值个体间相差 100 倍;第 7~35 天病毒载量逐渐降低至 6.62 lg copies/mL 左右,相当于每毫升中约有 10^7 个病毒(图 3A)。在感染后不同时间点个体间的病毒载量都存在着差异(图 3B),这种差异反映出不同个体中病毒增殖能力及机体清除病毒能力的差异。



A:感染 HP-PRRSV 后所有个体在不同时间点病毒载量变化 Viremia of all individuals at different time points after HP-PRRSV infection;
B:感染 HP-PRRSV 后群体在不同时间点病毒载量变化 Viremia of group at different time points after HP-PRRSV infection.

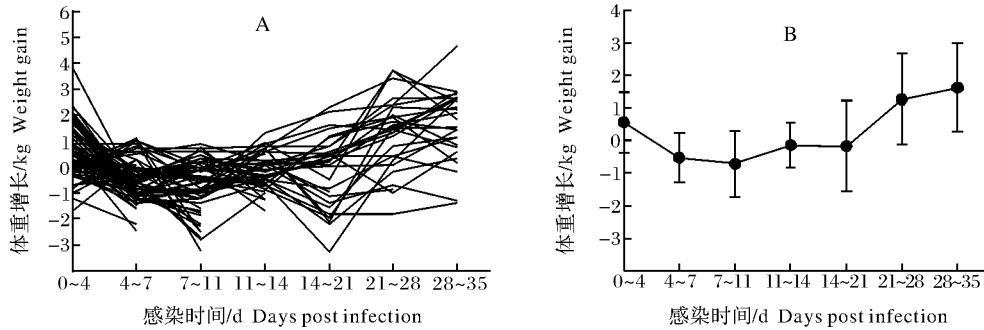
图 3 感染 HP-PRRSV 后猪病毒载量变化

Fig.3 Viremia after HP-PRRSV infection

2.3 HP-PRRSV 感染对体重增长的影响

HP-PRRSV 感染严重影响了猪的生长速度,并且在感染的不同时期对体重增长的影响也有所不同。感染第 0~4 天猪的采食量减少,体重增长速度

缓慢;第 4~21 天猪的食欲降低,体重呈负增长;第 7~11 天持续负增长且体重减少量达到最大;第 21~35 天猪的采食量逐渐增加,体重呈正增长且增长量逐渐增加(图 4)。



A:HP-PRRSV 感染后所有个体在不同时间段体重增长 Weight gain of all individuals at different time periods after HP-PRRSV infection; B:HP-PRRSV 感染后群体在不同时间段体重增长 Weight gain of group at different time periods after HP-PRRSV infection.

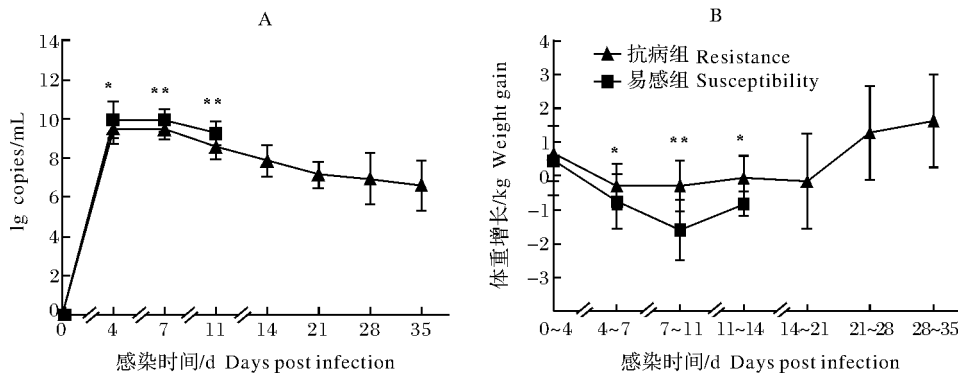
图 4 HP-PRRSV 感染后猪在不同时间段体重增长量

Fig.4 Weight gain at different time periods after HP-PRRSV infection

2.4 抗病组与易感组间病毒载量和体重增长的差异

比较易感组和抗病组在同一时间点的病毒载量和体重增长,结果显示:在 HP-PRRSV 感染第 4、7、11 天抗病组的病毒载量显著低于易感组的病毒载

量($P<0.05$)(图 5A)。在 HP-PRRSV 感染第 0~4 天抗病组和易感组体重呈正增长,而第 4~7、7~11、11~14 天抗病组和易感组的体重呈负增长,第 4~7、7~11、11~14 天抗病组的体重增长都显著高于易感组($P<0.05$)(图 5B)。



A:HP-PRRSV 感染后抗病组和易感组不同时间点病毒载量 Viremia of resistance and susceptibility at different time points after HP-PRRSV infection; B:HP-PRRSV 感染后抗病组和易感组不同时间段体重增长 Weight gain of resistance and susceptibility at different time periods after HP-PRRSV infection.

图 5 HP-PRRSV 感染后抗病组和易感组的病毒载量和体重增长的差异分析

Fig.5 The differential analyse of resistance and susceptibility on viremia and weight gain after HP-PRRSV infection

2.5 病毒载量和体重增长与感染第 14 天存活的相关分析

将不同时间点的病毒载量与 14 d 存活情况进行相关分析,结果显示:感染第 7 天病毒载量与 14 d 存活之间呈中度负相关($r=-0.43$),亦即感染第 7 天的病毒载量愈高的个体存活到第 14 天的可能性愈低;而对不同时间段的体重增长与 14 d 存活结果进行相关分析,发现第 7~11 天的体重增长与 14 d 存活之间呈中等正相关($r=0.55$),亦即在感染后

7~11 d 体重下降愈少的个体存活 14 d 的可能性愈高。

3 讨论

自 2006 年 HP-PRRS 暴发至今,通城猪无一例因 HP-PRRSV 感染而死亡(跟踪调查结果),笔者所在课题组前期通过 HP-PRRSV 人工感染试验证明通城猪与大白猪相比具有较强的抗病力^[12]。本研究在课题组前期利用抗病的通城猪和易感的大白

猪杂交再连续多代横交建立的高代横交群体基础上,进一步进行 HP-PRRSV 人工感染试验,该群体在人工感染后个体间在存活力、病毒载量和体重增长等反映抗病力的性状上均表现出很大的变异;一些个体在感染后 1~2 周死亡,一些个体能够抗过病毒感染而存活下来。试验猪能否抗过病毒感染而存活下来是对抗病性最直接的评价,存活的是抗病者,死亡的是易感者。但以感染后什么时间的存活和死亡来进行判断到目前尚未有标准和依据,本研究根据 PRRSV 感染后病毒载量的变化、试验猪死亡高峰出现的时间以及病毒感染后引起的继发感染时间等综合分析,将感染第 14 天存活与否作为抗病性判断标准,亦即 HP-PRRSV 感染第 14 天存活个体为抗病个体,14 d 前死亡个体为易感个体。

病毒载量是病毒感染后宿主与病毒相互斗争进而影响疾病进程的一个指标^[13]。本研究中感染第 4 天血清病毒载量达到高峰,峰值一直持续到第 7 天,第 7 天后病毒载量逐渐下降。PRRSV 病毒感染后血清中病毒载量的变化规律在不同毒株间具有相似性,本研究的结果与美国 PRRS 宿主遗传联合会 (PRRS Host Genetics Consortium, PHGC) 采用 PRRSV 经典毒株(北美型 NVSL97-7985)进行的人工感染试验结果一致^[14]。PRRSV 进入宿主后首先与肺泡巨噬细胞表面特异性受体结合,随后通过胞吞作用进入肺泡巨噬细胞后进行增殖^[15],造成肺泡巨噬细胞破裂、释放病毒粒子,病毒粒子进入血液循环导致病毒血症的出现,第 4~7 天形成高滴度的病毒载量,第 7 天后病毒载量开始下降,但在第 35 天仍然存在病毒,病毒要完全被清除则需要更长的时间^[16]。机体对疾病的抗性体现在机体对疾病的防御能力和免疫应答能力^[17]。本研究中感染第 1 天至第 4 天,抗病组中 PRRSV 的复制速度比易感组慢;第 7~11 天抗病组的病毒载量下降速度高于易感组,这可能是由于抗病组抵抗病毒增殖和清除病毒的能力较强的缘故。

HP-PRRSV 感染会严重影响到猪的生长性能,一方面由于病毒感染后引起猪食欲减退或废绝使进食的食物大量减少而影响到生长;另一方面是由于机体与病毒斗争需要消耗大量的能量而使体重出现负增长;同时病毒感染后可扰乱宿主细胞周期的正常进程^[18],进而对机体的生长发育产生影响。本研究结果显示 HP-PRRSV 感染后猪体重增长缓慢甚至呈负增长,此结果与美国 PHGC 的研究结果相似^[14]。

本研究中以感染后第 14 天存活与否来划分抗

病组和易感组,对病毒载量和体重增长 2 个性状分析的结果表明感染第 7 天病毒载量和第 7~11 天体重增长都与感染第 14 天存活呈中度相关,根据这种相关性可通过早期的病毒载量高低和体重增长量来判断个体能否抗过病毒感染而存活下来,因此,早期病毒载量和体重增长可作为 PRRS 抗病指示性状。

参考文献 References

- [1] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J].中国畜禽传染病,1996(2):3-7.GUO B Q, CHEN Z S, LIU W X, et al. Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from aborted fetuses suspected of PRRS[J]. Chinese journal of preventive veterinary medicine, 1996(2):3-7 (in Chinese with English abstract).
- [2] MARDASSI H, MOUNIR S, DEA S. Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Quebec strain and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. J Gen Virol, 1994, 75(3):681-685.
- [3] TIAN K, YU X, ZHAO T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of a typical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J/OL]. PLoS One, 2007, 2: e526 [2020-03-25]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000526>.
- [4] KAO O E S, FAABERY K S. PRRSV structure, replication and recombination: origin of phenotype and genotype diversity [J]. Virology, 2015, 479/480:475-486.
- [5] OLEKSIWICZ M B, BOTNER A, TOFT P, et al. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutants: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF3 structural glycoprotein[J]. Virology, 2000, 267(2):135-140.
- [6] ALLENDE R, KUTISH G F, LAGREID W, et al. Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype[J]. Arch Virol, 2000, 145(6):1149-1161.
- [7] BAUTISA E M, MEULENBERG J J, CHOI C S, et al. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Arch Virol, 1996, 141(7):1357-1365.
- [8] VANHEE M, BREEDAM W V, COSTERS S, et al. Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies[J]. Vaccine, 2011(29):4794-4804.
- [9] 杨汉春.猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策[J].中国畜牧兽医, 2004(5):41-43. YANG H C. Epidemic characteristics and control strategies of immunosuppressive diseases in pigs [J]. Chinese animal husbandry and veterinary, 2004(5):41-43 (in Chinese).
- [10] LOVING C L, OSORIO F A, MURTAUGH M P, et al. Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respir-

- atory syndrome virus[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2015, 167(1/2): 1-14.
- [11] MELEY D, SPILLER D G, WHITE M R H, et al. p53-mediated delayed NF-kappaB activity enhances etoposide-induced cell death in medulloblastoma[J/OL]. *Cell death & disease*, 2010, 1(5): e41 [2020-03-25]. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.16>.
- [12] LIANG W, JI L, LIU B, et al. Transcriptome differences in porcine alveolar macrophages from Tongcheng and Large White pigs in response to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1457-1474.
- [13] MACKAYI M, ARDEN K E, NISTICHE A. Real-time PCR in virology[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(6): 1292-1305.
- [14] LUNNEY J K, STEIBEL J P, REECY J M, et al. Probing genetic control of swine responses to PRRSV infection: current progress of the PRRS host genetics consortium[J/OL]. *BMC Proceedings*, 2011, 5 (Suppl 4): S30 [2020-03-25]. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S4-S30>.
- [15] NAUWYNCK H J, DUAN X, FAVOREEL H W, et al. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis[J]. *Journal of general virology*, 1999, 80: 297-305.
- [16] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual review of animal biosciences*, 2016, 4: 129-154.
- [17] 刘榜. 家畜育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 35-36. LIU B. *Animal breeding* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2007: 35-36 (in Chinese).
- [18] LAMONTAGNE L, PAGE C, LAROCHELLE R, et al. Polyclonal activation of B cells occurs in lymphoid organs from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pigs[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2001, 82(3/4): 165-182.

Changes of viremia and weight gain in pigs after HP-PRRSV artificial infection

GAO Guoli, GUAN Kaifeng, MENG Xiangge, WANG Yuan, ZHOU Xiang, LIU Bang

Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University/The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Wuhan 430070, China

Abstract High pathogenic-porcine reproductive and respiratory syndrome (HP-PRRS) has caused great economic losses to pig industry in China. In order to study the changes of serum viremia and body weight gain in pigs after HP-PRRSV (HP-PRRS Virus) infection, 72 healthy piglets from a large white pigs and Tongcheng pigs crossed population were selected and infected with HP-PRRSV. The clinical symptoms were observed, weight was measured, blood samples were collected, serum was separated and viremia was measured on 0, 4, 7, 11, 14, 21, 28, 35 dpi (days post infection). The results showed that the growth rate of body weight was slow at 4 dpi, the body weight increased negatively from 4 to 21 dpi, the loss of weight reached the maximum from 7 to 11 dpi, the body weight increased positively and the growth increased gradually from 21 to 35 dpi. Viremia peaked on 4 dpi and lasted until 7 dpi, and decreased to 6.62 log₁₀ copies/mL from 7 dpi to 35 dpi. Death occurred from 7 dpi, and the dead individuals were mainly concentrated from 7 to 14 dpi. The death peak appeared on 10 dpi, and the number of dead individuals was basically stable after 19 dpi. According to the survival on 14 dpi, the pigs were divided into two groups: disease-resistant and susceptible group. The viremia of the disease-resistant group was significantly lower than that in the susceptible group on 4, 7, 11 dpi ($P < 0.05$), and the weight gain of the disease-resistant group was significantly higher than that of the susceptible group on 4-7 dpi, 7-11 dpi, and 11-14 dpi ($P < 0.05$). The above results suggested that body weight gain and viremia could be used as indicators to predict the resistance of PRRS.

Keywords Tongcheng pig; Large white pig; HP-PRRSV; artificial infection; viremia; PRRS disease resistance; indicative trait

(责任编辑:边书京)