

黄梅清, 郑敏, 陈仕龙, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 欧洲株和美洲株的理化特性及致病性比较 [J]. 福建农业学报, 2012, 27(1): 24~26.
HUANG M-Q, ZHENG M, CHEN S-L, et al. Differences in the Physicochemical Characteristics and Pathogenicity Between European Type PRRSV and North American Type PRRSV [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 27 (1): 24~26.

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 欧洲株和美洲株的理化特性及致病性比较

黄梅清^{1,2}, 郑 敏^{1,2}, 陈仕龙^{1,2}, 车勇良^{1,2}, 江 斌^{1,2}, 王隆柏^{1,2}, 魏 宏^{1,2}, 周伦江^{1,2},
庄向生^{1,2}, 陈少莺^{1,2}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;
2. 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要: 对分离自福建的 3 株美洲型猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 与 2 株欧洲型 PRRSV 进行了细胞致病性、动物致病性及理化特性的比较试验, 结果显示 PRRSV 分离株均能在 Marc-145 细胞上增殖并产生细胞病变, 但在 PK-15、Vero、CEF、MDEF 中盲传 3 代均不能产生细胞病变。理化性质试验表明美洲株与欧洲株 PRRSV 对酸、pH=3、氯仿、胰酶的敏感性一致; 当 pH=9 时, PRRSV 欧洲株比美洲株具有更强的抵抗力; 不同的 PRRSV 毒株对温度的敏感性差异较大, 同一型的病毒对温度的敏感性也不同。动物致病性试验结果表明欧洲型 PRRSV-FJ0602 株为弱毒株, 对保育猪不具有致病性, 而美洲型 PRRSV-FJ0604 株致病力强。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 欧洲型; 美洲型; 致病性; 理化特性

中图分类号: S 85

文献标识码: A

Differences in the Physicochemical Characteristics and Pathogenicity Between European Type PRRSV and North American Type PRRSV

HUANG Mei-qing^{1,2}, ZHENG min^{1,2}, CHEN Shi-long^{1,2}, CHE Yong-liang^{1,2}, JIANG Bin², WANG Long-bai^{1,2},
WEI Hong^{1,2}, ZHOU Lun-jiang^{1,2}, ZHUANG Xiang-sheng^{1,2}, CHEN Shao-ying^{1,2}

(1. Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China;
2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences,
Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: The Physicochemical Characteristics and Pathogenicity of five PRRSV strains including two European types PRRSV and three North American types PRRSV were studied, which were isolated from pig farms in Fujian province. The results showed that all the five PRRSV strains could induce regular cytopathogenic effects (CPE) on Marc-145 cells, but CPE was not appeared on PK-15, Vero, CEF or MDEF cells after three times of blind passages. The five PRRSV strains showed the same sensitive to acid, pH value 3, chloroform and trypsin, but different to the temperature. Compared with the North American types PRRSV, the European types PRRSV were more resistant to pH value 9. It was confirmed that the European type PRRSV-FJ0602 has a low pathogenicity to pigs but the North American type PRRSV-FJ0604 has a high pathogenicity to pigs according to the animal experiment.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); European type; North American type; physicochemical characteristics; pathogenicity

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是一种有囊膜的单股正链 RNA 病毒,

直径 50~65 nm, 电镜下为球型的病毒粒子, 呈二十面体对称。根据病毒的抗原性、基因变异程度、致病性的差异, PRRSV 可分为 2 个型, 即欧洲型

收稿日期: 2011-09-22 初稿; 2011-12-13 修改稿

作者简介: 黄梅清 (1980-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事预防兽医学研究

通讯作者: 陈少莺 (1962-), 女, 研究员, 从事动物传染病病原与防治研究 (E-mail: chensy58@163.com)

基金项目: 福建省科技计划重大专项 (2006NZ003-2); 福建省科技计划项目 (2008N0113); 福建省农业科学院青年创新基金 (B2007QJ09)

(LV 株为代表株) 和美洲型 (VR2332 株为代表株)。该病毒最早由荷兰科学家 Wensvoort 博士于 1991 年分离鉴定^[1], 随后德国、加拿大、美国等相继报道。在我国, 郭宝清等 1996 年从流产胎儿中分离到 PRRSV CH-1a 株^[2], 首次证实该病毒在我国存在并开始流行, 此后许多不同地区分离出该株, 但大部分都是北美洲型 PRRSV, 2006 年出现的高致病性 PRRSV (又称“PRRSV 变异株”)^[3] 也为美洲型 PRRSV。关于欧洲型 PRRSV 的报道, 最早见于 1997 年孙颖杰等从北京某猪场的死胎中分离到 B13 株^[4], 经赵耘、罗长宝等鉴定该分离株为欧洲型 PRRSV^[5-6]; 2007 年张战峰等从浙江省宁波地区养猪场疑似 PMWS 猪的肺、肝、脾、扁桃体和淋巴结等 50 份病料组织中检测到 4 份欧洲型 PRRSV 阳性^[7], 但未进行病毒分离; 从 GenBank 上可查询到 2006~2011 年登录了多株来自中国的欧洲型 PRRSV 的部分基因序列, 但未查询到相关引用文章。2006~2007 年, 从福建省各地分离到了 3 株美洲型 PRRSV 变异株和 2 株欧洲型 PRRSV 并开展理化特性和致病性研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 毒株

5 株 PRRSV 福建分离株均由本项目组分离鉴定并保存, 命名为 FJ0602 株 (HM755885)、FJ0603 株 (HM114313)、FJ0604 株 (HM070381)、FJ0605 株 (HM114311) 和 FJ0701 株 (HM114312)。其中 FJ0602、FJ0603 株为欧洲型 PRRSV, FJ0604、FJ0605、FJ0701 为美洲型 PRRSV。

1.2 细胞和试剂

Marc-145、PK-15、Vero、CEF、MDEF 等单层细胞均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所病毒室制备。RPMI 1640 和 DMEM 为 GIBCO 公司产品; 新生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司。

1.3 细胞致病性试验

将 5 株 PRRSV 分离株分别接种在 Marc-145、PK-15、Vero、CEF、MDEF 等细胞, 置 5% CO₂、37℃ 培养, 连续观察 4~7 d, 待 CPE 达 75% 以上时收获细胞毒, 或盲传 3 代。

1.4 保育猪的致病性试验

取 4 头 PRRS 抗体阴性保育猪, 体重约 12 kg, 其中 2 头肌肉注射 PRRSV-FJ0602 株 (欧洲型 PRRSV)^[8], 4 mL·头⁻¹, 同时滴鼻 1 mL·头⁻¹。

另外 2 头肌肉注射 PRRSV-FJ0604 (美洲型 PRRSV)^[9], 4 mL·头⁻¹, 同时滴鼻 2 mL·头⁻¹。每天测量 2 次体温, 观察行为变化, 连续 25 d; 同时取病死猪各器官供病理组织学研究。

1.5 病毒 TCID₅₀ 测定

将收获的细胞毒冻融 3 次, 1 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清以 Hank's 作 10⁻¹~10⁻⁸ 系列稀释, 分别接种于已单层的 Marc-145 细胞 96 孔培养板, 每个稀释度 4 孔, 100 μL·孔⁻¹, 同时以不加病毒的正常细胞为对照, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养, 逐日观察记录细胞病变 7 d。按照 Reed-Muench 法计算各 TCID₅₀。

1.6 理化因子敏感性

将 5 株本实验室分离保存的 PRRSV 在 96 孔细胞培养板中按常规方法^[10] 进行, 测定病毒对氯仿、胰蛋白酶、热、酸碱度等的敏感性。

2 结果与分析

2.1 不同细胞的致病性

PRRSV 分离株均能在 Marc-145 细胞上增殖并能产生细胞病变, 表现为细胞圆缩、脱落; 但在 PK-15、Vero、CEF、MDEF 中盲传 3 代均不能产生细胞病变。

2.2 保育猪的致病性

接种 PRRSV-FJ0602 的 2 头试验猪体温、精神、食欲、呼吸均正常, 生长良好, 没有出现发病症状。接种 PRRSV-FJ0604 的 2 只试验猪攻毒后第 3 d 2 头试验猪都出现体温升高, 走路不稳, 精神食欲差; 其中 1 头连续 19 d 体温升高后耐过, 康复; 另 1 头攻毒 14 d 后死亡, 临床症状、剖检病变与自然发病^[9] 表现一致。

2.3 理化因子的敏感性

如表 1 所示: 5 株分离株 PRRSV 对温度十分敏感, 经 56℃ 处理 15 min 后, 病毒滴度下降 100 倍以上, 甚至完全失去感染力; 经 56℃ 45 min 或 37℃ 48 h 以上处理后, 病毒失去感染力; 病毒经 37℃ 处理 24 h, FJ0602、FJ0701 株失去感染力, FJ0603、FJ0604、FJ0605 株病毒滴度反而增加。病毒对酸敏感, PRRSV 分离株在 pH 为 3.0 环境中作用 1 h, 病毒失去感染力; 在 pH 为 9 的环境下 FJ0602、FJ0603 株滴度保持不变, 而 FJ0604、FJ0605、FJ0701 的感染力明显下降, 尤其 FJ0605 株感染力下降 100 倍以上。PRRSV 对氯仿敏感, 可使病毒灭活。PRRSV 分离株对胰酶抵抗力强, 经胰酶处理 1 h 其病毒滴度反而增加。

表 1 PRRSV 分离株对部分理化因子的敏感性
Table 1 Sensitivity of PRRSV strains to parts of physicochemical factors

毒株	病毒对照	56℃			37℃			pH		胰酶处理	氯仿处理
		15 min	30 min	45 min	24 h	48 h	72 h	3.0	9.0		
FJ0602	$10^{-4.25}$	$10^{-0.75}$	$10^{-0.5}$	10^0	10^0	10^0	10^0	$10^{-0.25}$	$10^{-4.25}$	$10^{-4.5}$	10^0
FJ0603	10^{-3}	10^0	10^0	10^0	$10^{-4.75}$	10^0	10^0	10^0	10^{-3}	$10^{-4.5}$	10^0
FJ0604	10^{-3}	$10^{-0.25}$	10^0	10^0	$10^{-3.5}$	10^0	10^0	10^0	$10^{-2.5}$	$10^{-4.25}$	10^0
FJ0605	$10^{-4.75}$	$10^{-0.75}$	10^0	10^0	$10^{-5.5}$	10^0	10^0	10^0	$10^{-0.75}$	10^{-6}	10^0
FJ0701	$10^{-2.25}$	10^0	10^0	10^0	10^0	10^0	10^0	$10^{-1.5}$	$10^{-1.5}$	$10^{-2.75}$	10^0

注: 表中数据为 $10 \times (\text{TCID}_{50} \cdot \text{mL}^{-1})$ 。

3 讨论与结论

3.1 接种 PRRSV-FJ0602 株的 2 头试验猪体温、精神、食欲、呼吸均正常, 生长良好, 在观察期内未见临床症状, 表明本实验室分离保存的欧洲型 PRRSV-FJ0602^[8] 为弱毒株, 对动物不具有致病性。接种 PRRSV-FJ0604 株的 2 只试验猪攻毒后都出现临床症状, 一只死亡, 另一只康复, 表明美洲型 PRRSV 变异株 FJ0604 株^[9] 具有较强的动物致病性, 会引起保育猪发生临床症状甚至死亡。

3.2 温度敏感性试验结果表明不同的 PRRSV 毒株对温度的敏感性差异较大, 同一型的病毒对温度的敏感性也不同。5 株 PRRSV 分离株经 56℃ 15 min 或 37℃ 48 h 以上处理后, 病毒滴度都下降甚至失去感染力; 但是经 37℃ 处理 24 h, 不同的病毒表现出不同的抵抗力, 欧洲型 FJ0602 株和美洲型 FJ0701 株都失去感染力, 而欧洲型 FJ0603 株、美洲型 FJ0604 及 FJ0605 株病毒滴度反而增加。由此提示在分离及传代过程中应十分注意收毒时间, 若培养时间过长病毒可能降低病毒效价。

3.3 酸、碱、氯仿敏感性试验结果表明: 欧洲型和美洲型 PRRSV 对酸、氯仿敏感性相同, 当病毒处于 pH=3 的环境中 1 h 以上, 病毒滴度都降低甚至失去感染力; 氯仿可使 PRRSV 灭活。而在碱性环境中, 欧洲型 PRRSV 比美洲型 PRRSV 具有更强的抵抗力。欧洲型 PRRSV-FJ0602、FJ0603 株在 pH=9 的环境下 1 h, 其病毒滴度保持不变, 而美洲型 PRRSV-FJ0604、FJ0605、FJ0701 株的感染力明显下降, 尤其 FJ0605 株感染力下降 100 倍以上。由此提示对 PRRSV 感染猪场的消毒过程中应注意提高碱性环境的作用浓度及时间。

3.4 鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) 对动物的红细胞无凝集性, 但 Corbo 和 Cannigham 研究发现 IBV 经胰酶处理后可凝集鸡红细胞, 金梅林等认为

不同浓度胰酶处理 IBV 会获得不同的血凝价, 用 2% 胰酶处理的 IBV 血凝抗原具有良好的稳定性^[11]。本研究也发现, 经胰酶处理 1h 的 PRRSV 会增强病毒对细胞的感染力, 病毒滴度升高。PRRSV 和 IBV 都是单股正链 RNA 病毒, 胰酶是否能使病毒的蛋白质结构发生变化从而改变病毒的生物学特性还需进一步研究。

参考文献:

- WENSOORT G, TERPSTRA C, POL JM A, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. J Vet Diagn, 1991, 13: 121–130.
- 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, 87(20): 1–4.
- 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29 (5): 323–327.
- 孙颖杰, 孙延峰, 潘凤城, 等. 猪生殖和呼吸综合征的检疫和诊断 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23 (2): 8–9.
- 赵耘, 罗长宝, 陈茹, 等. 猪生殖和呼吸综合征病毒 B₁₃ 株 ORF7 基因的克隆及在杆状病毒系统中的表达 [J]. 病毒学报, 2001, 17 (1): 75–80.
- 赵耘, 罗长宝, 林志雄, 等. 猪生殖和呼吸综合征病毒中国分离株 B₁₃ 株 ORF_5 基因在杆状病毒系统中的表达 [J]. 农业生物技术学报, 2000, 8 (3): 211–215.
- ROPP S L, WEES C E, FANG Y, et al. Characterization of emerging European-like PRRSV isolates in the United States [J]. J Virol, 2004, 78 (7): 3684–3703.
- 黄梅清, 车勇良, 陈少莺, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒欧洲型 FJ0602 株的分离及其 ORF7 的序列分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30 (3): 174–178.
- 叶耀辉, 吴南洋, 黄梅清, 等. 呼吸道综合症病猪群病原检测与分析 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (2): 131–134.
- 殷震, 刘景华. 动物病毒学: 第 2 版 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- 陈汉阳. 鸡传染性支气管炎病毒感染 HeLa 细胞的研究及其天然受体的鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.

(责任编辑: 林海清)