

冯松林, 邢秀琳, 陈耀, 等. 2014—2016 年广东省规模化猪场猪繁殖与呼吸综合症的流行病学调查[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(3): 19-24.

2014—2016 年广东省规模化猪场猪繁殖与呼吸综合症的流行病学调查

冯松林¹, 邢秀琳², 陈耀¹, 汪志¹, 张桂红¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究广东省猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV) 的流行情况。【方法】2014—2016 年共采集广东省各规模化猪场猪组织样品 1 137 份进行抗原检测, 血清样品 9 432 份进行抗体检测。对不同年份、不同季度、不同区域的 PRRSV 抗原抗体检测情况进行比较分析, 对分离的病毒进行遗传进化分析。【结果】2014、2015 和 2016 年的 PRRSV 抗原阳性率分别为 30.86%、34.35%、37.50%; 抗体阳性率为 82.86%、68.87%、74.56%。从季度分析来看, 第 1 季度抗原阳性率最高, 为 40.27%; 第 2 季度抗原阳性率最低, 为 28.66%; 各季度抗体水平均在 70% 以上。不同区域间的 PRRSV 感染率差异明显, 粤东粤西感染率显著低于珠三角和粤北; 在抗体水平上, 粤东地区较低, 抗体阳性率为 69.51%, 其他 3 个区域均高于 75%。抗原检测阳性的样品中共分离到 69 株 PRRSV 毒株, 其中有 39 株位于 Subgenotype I 亚群。【结论】广东地区 PRRSV 抗原阳性率呈逐年上升趋势, 抗体水平较高但并不稳定, 从病毒分离结果看, Subgenotype I 亚群为省内主要流行亚群。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合症 (PRRS); 流行病学调查; 抗原检测; 抗体检测; 广东地区
中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)03-0019-06

Epidemiological survey of porcine reproductive and respiratory syndrome in scaled pig farms of Guangdong province

FENG Songlin¹, XING Xiulin², CHEN Yao¹, WANG Zhi¹, ZHANG Guihong¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Guangdong province. 【Method】From 2014 to 2016, totally 1 137 porcine tissue samples and 9 432 porcine serum samples were collected from scaled pig farms in Guangdong for antigen and antibody detection respectively. The results were compared among different years, seasons and regions. Phylogenetic analysis were performed on isolated viruses. 【Result】From 2014 to 2016, the yearly positive rates of PRRSV antigens were 30.86%, 34.35% and 37.50% respectively, while the yearly antibody positive rates were 82.86%, 68.87% and 74.56% respectively. In quarterly analysis, the first quarter had the highest antigen positive rate of 40.27% and the second quarter had the lowest antigen positive rate of 28.66%. The antibody level of every quarter was above 70%. There were significant differences in PRRSV infection rates among different regions.

收稿日期: 2017-10-09 优先出版日期: 2018-04-16
优先出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180416.1031.004.html>
作者简介: 冯松林 (1992—), 男, 硕士研究生, E-mail: chinafsl@qq.com; 通信作者: 张桂红 (1968—), 女, 教授, 博士, E-mail: guihongzh@scau.edu.cn
基金项目: 国家生猪现代农业产业技术体系项目 (CARS-36); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203039); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划 (YQ201530)

The infection rates in eastern Guangdong and western Guangdong were significantly lower than those in the Pearl River Delta and northern Guangdong. The antibody positive rate was the lowest (69.51%) in eastern Guangdong and above 75% in the other three regions. A total of 69 PRRSV strains were isolated from samples with positive antigen, of which 39 strains belonged to Subgenotype I. 【Conclusion】 The antigen positive rate of PRRSV in Guangdong shows an increasing trend, while the antibody positive rate is relatively high but unstable. Subgenotype I is the predominant subgroup in Guangdong based on the virus isolation results.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS); epidemiological investigation; antigen detection; antibody detection; Guangdong province

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) 引起的一种威胁全球养猪行业的传染病^[1]。自 20 世纪 90 年代传入我国以后, PRRSV 给我国养猪业造成了严重的经济损失^[2]。PRRSV 为单股正链的 RNA 病毒, 具有变异速度快、传播能力强、隐性带毒、难以净化等特点^[3]。随着养猪业集约化、规模化发展, PRRSV 的防控变得越来越重要。为了解 PRRSV 在广东省猪场的流行情况, 本研究采集 2014—2016 年广东地区各规模化猪场的组织和血清样品, 检测 PRRSV 的抗原抗体水平, 并分析其遗传进化情况, 以期为广东省乃至国内的 PRRSV 防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2014 年 1 月至 2016 年 12 月采集广东地区规模化猪场的猪血清样品共 9 432 份用于抗体检测, 组织样品共 1 137 份用于抗原检测。每个猪场的血清和组织样品采集数量不等。

酶标仪购自北京普朗新技术有限公司; C1000 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 反转录、PCR 等相关试剂购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 总 RNA 的抽提试剂盒购自天根生化科技有限公司; 凝胶电泳相关仪器购买自 Bio-Rad 公司; ELISA 抗体检测试剂盒购自美国 IDEXX 公司, 产品批号为 99-41269。

1.2 方法

1.2.1 ELISA 血清抗体检测 利用美国 IDEXX 公司的 ELISA 抗体检测试剂盒对猪血清样品进行检测, 具体操作按照试剂盒说明书进行, 在酶标仪上进行读数。

1.2.2 RT-PCR 抗原检测 研磨病料, 根据总 RNA 抽提试剂盒说明书提取病料总 RNA, 将抽提

的 RNA 反转录为 cDNA, 随后以 cDNA 为模板进行 PCR, 并用琼脂糖凝胶电泳试验检测 PCR 结果。

根据 Genbank 上登录的多组 PRRSV *ORF5* 基因设计检测引物, 建立了针对 PRRSV 的 PCR 检测方法。引物序列为 *ORF5-F*: 5'-TGAGACCATGAGGTGGGC-3', *ORF5-R*: 5'-GAAAACGCCAAAAGCACC-3'。检测所用引物由广州华大基因公司合成。

1.2.3 病毒的分离鉴定 将抗原检测为阳性的病料研磨离心, 上清过 0.22 μm 的滤膜除菌后接种至长满单层 MARC-145 细胞的培养皿中, 置于 CO₂ 培养箱中培养。每隔 72 h 传 1 代, 盲传 3 代后, 将细胞置于显微镜下观察, 将出现细胞病变的细胞冻融 3 次后进行 RT-PCR 检测和测序鉴定。

1.3 数据处理

抗原抗体检测数据处理及分析采用 SPSS 软件, 差异显著性分析采用卡方检验, 病毒分离以及遗传进化分析使用 DNASTAR 软件和 MEGA 5.0 软件。

2 结果与分析

2.1 广东地区抗原抗体检测情况

2014—2016 年从广东省各地区规模猪场共采集了 1 137 份组织样品和 9 432 份猪血清样品, 检测结果见表 1。

由表 1 可以看出, 1 137 份组织样品中检出 PRRSV 抗原阳性样品 394 份, 总阳性率为 34.65%, 95% 置信区间为 31.89%~37.50%, 这表明广东省猪场猪群 PRRS 带毒排毒情况十分普遍, 此外, 阳性率从 2014 年的 30.86% 到 2016 年的 37.50%, 也呈逐年上升的趋势。卡方检验结果表明不同年份间的抗原总阳性率差异不显著 ($\chi^2=3.193$, $P=0.20$)。9 432 份猪血清样品中检出 PRRSV 抗体阳性的样品 7 116 份, 总阳性率为 75.45%, 95% 置信区间为 74.56%~76.31%, 其中 2014 年的抗体阳性率最高, 达到 82.86%, 2015 年的抗体阳性率最低, 仅有

表 1 2014—2016 年广东省规模猪场 PRRSV 抗原和抗体检测阳性率

Tab. 1 The PRRSV antigen and antibody positive rates of scaled pig farms in Guangdong from 2014 to 2016

年份	样品数		阳性数		阳性率/%		95%置信区间/%	
	抗原	抗体	抗原	抗体	抗原	抗体	抗原	抗体
2014	269	2 824	83	2 340	30.86	82.86	25.39~36.75	81.42~84.23
2015	460	2 657	158	1 830	34.35	68.87	30.01~38.89	67.08~70.63
2016	408	3 951	153	2 946	37.50	74.56	32.79~42.40	73.17~75.92
总计	1 137	9 432	394	7 116	34.65	75.45	31.89~37.50	74.56~76.31

68.87%。卡方检验结果表明不同年份之间的抗体总阳性率差异极显著 ($\chi^2=147.415, P<0.01$)。

将 2014—2016 年间广东省 PRRSV 的抗原抗体检测阳性率按月份和季度汇总统计 (图 1), 从图 1 可以看出, 广东省这 3 年的抗原抗体阳性率不

存在月份相关性, 2014 和 2016 年的抗体阳性率比较稳定且处于一个比较高的水平, 而 2015 年的抗原阳性率和抗体阳性率波动均较大。从季度统计折线图来看, 2015 年的整体抗体水平要低于 2014 和 2016 年, 而抗原阳性率在 2015 年第 1 季度上升后

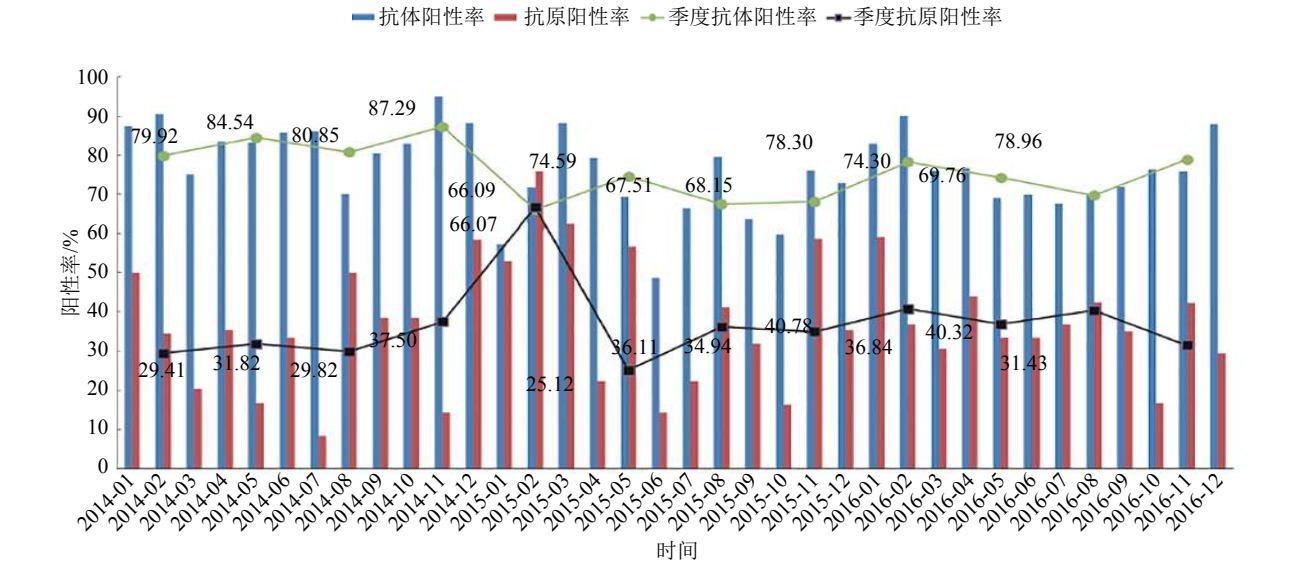


图 1 2014—2016 年间广东省 PRRSV 抗原抗体阳性率情况
Fig. 1 PRRSV antigen and antibody positive rates in Guangdong from 2014 to 2016

回落并趋于平稳。

2.2 不同季度 PRRSV 感染的抗原抗体检测结果

对 2014—2016 年不同季度的 PRRSV 抗原和抗体阳性率进行统计, 结果 (表 2) 显示, 第 1 季度 PRRSV 抗原阳性率最高, 为 40.27%(118/293); 第 2 季度抗原阳性率最低, 为 28.66%(96/335)。卡方检验表明, 第 3、4 季度间的阳性率差异不显著 ($\chi^2=0.506, P=0.477$), 而第 1、2 季度间的阳性率差异极显著 ($\chi^2=9.388, P=0.002$)。4 个季度间的抗原阳性率差异有显著统计学意义 ($\chi^2=10.030, P=0.018$)。

PRRSV 抗体阳性率统计结果 (表 2) 显示, 第 2 季度的抗体水平最高, 为 77.54%(2 437/3 143), 第 3 季度的抗体水平最低, 为 71.99%(1 884/2 617)。对各季度的抗体水平间做卡方检验, 其中第 1、4 季度 ($P=0.776$) 和第 1、2 季度间 ($P=0.176$) 的抗体水平差异不显著, 第 2、3 季度和第 3、4 季度的抗体水平差异极显著 ($P<0.01$), 总体 4 个季度间的抗体水平差异极显著 ($\chi^2=129.801, P<0.01$)。

2.3 不同区域 PRRSV 感染的抗原抗体检测结果

对 2014—2016 年广东省不同区域的 PRRSV 抗原和抗体阳性率进行统计, 结果 (表 3) 显示, 粤北地区 PRRSV 抗原阳性率最高, 为 47.22%(17/36); 粤

表 2 2014—2016 年广东省各季度 PRRSV 抗原和抗体检测阳性率

Tab. 2 The PRRSV antigen and antibody positive rates of different quarters in Guangdong from 2014 to 2016

季度	样品数		阳性数		阳性率/%		95%置信区间/%	
	抗原	抗体	抗原	抗体	抗原	抗体	抗原	抗体
第 1 季度	293	2 225	118	1 690	40.27	75.96	34.61~46.13	74.12~77.72
第 2 季度	335	3 143	96	2 437	28.66	77.54	23.87~33.82	76.04~78.99
第 3 季度	289	2 617	106	1 884	36.68	71.99	31.11~42.52	70.23~73.70
第 4 季度	220	1 447	74	1 105	33.64	76.36	27.42~40.30	74.09~78.53
总计	1 137	9 432	394	7 116	34.65	75.45	31.89~37.50	74.56~76.31

表 3 2014—2016 年广东省各地区 PRRSV 抗原和抗体检测阳性率

Tab. 3 The PRRSV antigen and antibody positive rates of different regions in Guangdong from 2014 to 2016

地区	样品数		阳性数		阳性率/%		95%置信区间/%	
	抗原	抗体	抗原	抗体	抗原	抗体	抗原	抗体
珠三角	661	5 655	270	4 279	40.85	75.67	37.07~44.70	74.53~76.78
粤东	96	1 620	22	1 126	22.92	69.51	14.95~32.61	67.20~71.74
粤西	344	1 051	85	836	24.71	79.54	20.24~29.62	76.98~81.94
粤北	36	1 106	17	875	47.22	79.11	30.41~64.51	76.60~81.47
总计	1 137	9 432	394	7 116	34.65	75.45	31.89~37.50	74.56~76.31

东地区抗原阳性率最低,为 22.92%(22/96)。由于粤北粤东地区山区多,交通和经济欠发达,采样量较少,因此对不同区域的抗原阳性率不做差异显著性分析。

PRRSV 抗体阳性率统计结果(表 3)显示,粤西地区的抗体水平最高,抗体阳性率为 79.54%(836/1 051),粤东地区的抗体水平最低,抗体阳性率为 69.51%(1 126/1 620)。对各地区的抗体水平做卡方检验,结果表明粤西粤北之间的抗体水平差异不显著($P=0.806$),珠三角和粤北之间的抗体水平差异显著($P=0.014$),其他两两区域之间的抗体水平平均差异极显著($P<0.01$),总体 4 个区域间的抗体水平差异极显著($\chi^2=48.559, P<0.01$)。

2.4 2014—2016 年检测的 PRRSV ORF5 基因的遗传进化分析

2014—2016 年广东省抗原检测阳性的病料中共分离到 69 株 PRRSV 毒株,其中 2014 年分离到 17 株,2015 年分离到 23 株,2016 年分离到 29 株,呈逐年上升趋势,这一点也和按年份统计的抗原阳性率相符。使用 DNASTAR 和 MEGA5.0 软件对这 69 株毒株的 ORF5 基因进行遗传进化分析,结果如图 2 所示。3 年内分离得到的 69 株 PRRSV 毒株

中,有 39 株属于 Subgenotype I 亚群,该亚群以引起 2006 年国内 PRRS 大流行的 JXA1 株为代表^[4],对猪群致病力强,这说明广东省流行的毒株仍然以高致病病毒株为主,这些毒株和早期的 JXA1 等毒株有较近的亲缘关系,提示它们可能是由高致病性野毒或者疫苗毒重组进化而来;有 15 株分离病毒处于以 GM2 株为代表的 Subgenotype VI 亚群上,GM2 毒株是近几年国内新出现的毒株,有研究发现该毒株为 MLV 疫苗毒和 QYYZ 毒的重组毒^[5],此类毒株在广东省内分离较多,同样需要引起足够重视。此外,还有 13 株处于以 HB-1(sh)_2002 株为代表的 Subgenotype II 亚群上,该亚群中不同的毒株存在着不同程度的缺失,被认为是 HP-PRRSV 形成过程中的过渡亚群^[6],这说明广东省内的 PRRSV 毒株仍然在不断进化。剩下 1 株处于以 VR-2332 株为代表的 Subgenotype IV 亚群上;没有分离毒株处于 Subgenotype III 亚群和 Subgenotype V 亚群上。综上所述,在 2014—2016 年间,以 JXA1 株为代表的 Subgenotype I 亚群仍然是广东地区 PRRSV 流行的优势毒株,这提示我们使用该亚群的毒株作为疫苗可能会产生比较好的保护作用,同时我们还应该

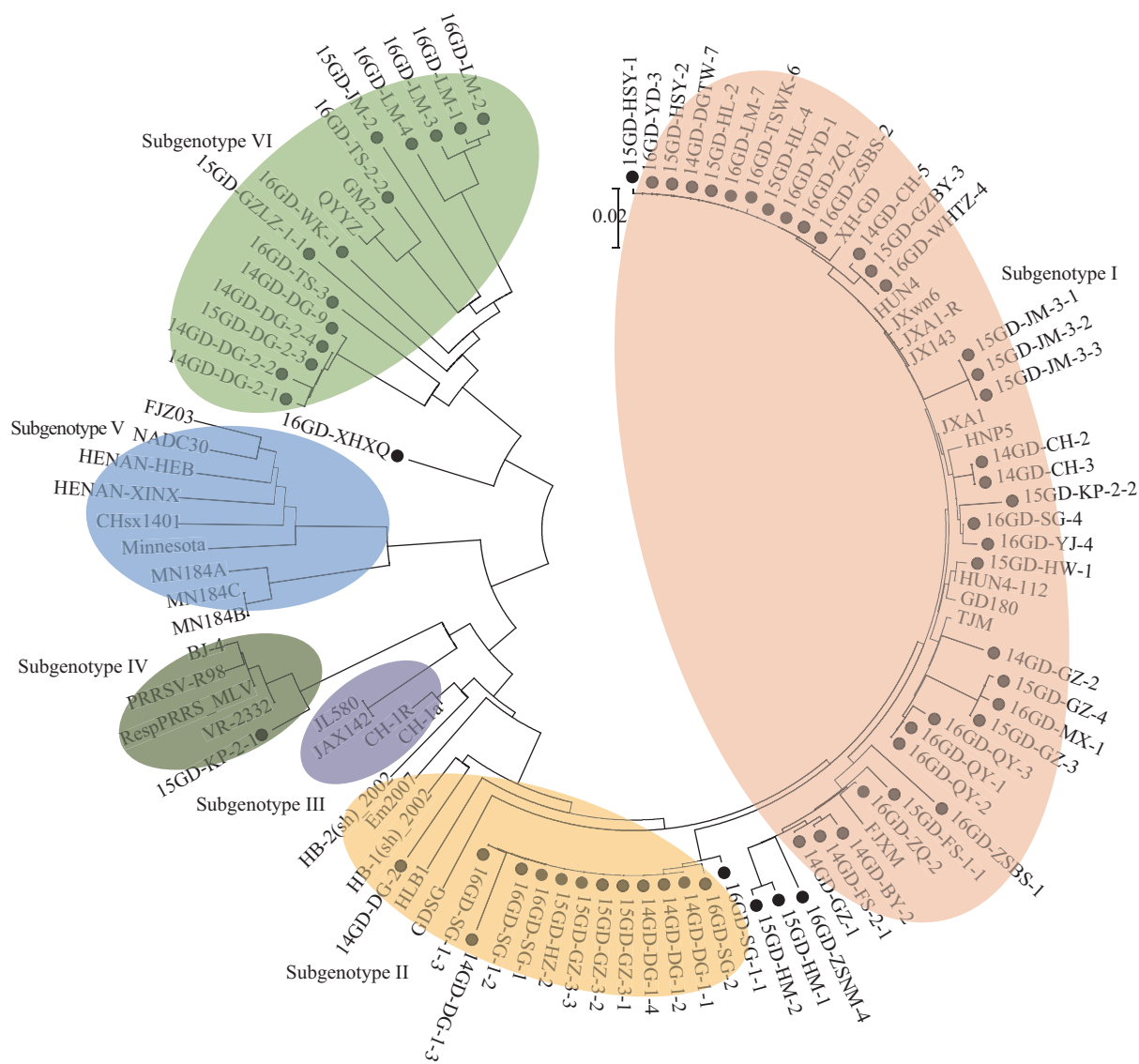


Fig. 2 Phylogenetic tree of PRRSV based on *ORF5* gene

关注以 GM2 为代表的 Subgenotype VI 亚群和以 HB-1(sh)_2002 株为代表的 Subgenotype II 亚群, 这 2 个亚群的毒株分离率也比较高。

3 讨论与结论

PRRSV 主要引起种猪的繁殖障碍和呼吸困难,是威胁我国养猪业的头号疫病。该病毒有欧洲型和美洲型 2 种基因型,目前在国内流行的主要是美洲型^[7]。我国于 1996 年首次分离到 PRRSV 毒株^[8],之后该病毒不断传播衍化,2006 年出现了以在 *Nsp2* 基因区域存在 30 个不连续氨基酸为特征的高致病性 PRRSV(HP-PRRSV),HP-PRRSV 传播速度快、致死率高、现有疫苗交叉保护能力弱,对养猪业造成了严重的经济损失^[9],该种毒株在随后的几年里成为了国内猪场流行的优势毒株,并随着相应疫苗

的研发应用逐渐得到控制^[10]。2014 年国内养殖场出现了一种新型的 PRRSV 毒株, 该种毒株与美国 2008 年分离的 NADC30 毒株高度同源, 统称为 NADC30-like 毒株^[11], NADC30-like 毒株为美国 NADC30 毒株与国内高致病毒株重组后产生的新毒株, 其出现以后也很快在国内传播开^[12], 有逐渐取代高致病毒株成为新的优势毒株的趋势, 给我国 PRRSV 的防控带来了新的挑战。

对 2014—2016 年间广东省规模猪场 PRRSV 抗原抗体监测情况进行总结分析,结果表明广东省 PRRSV 感染面积较大,抗原阳性率普遍较高且呈逐年上升趋势;PRRSV 抗体水平并不稳定,和 2014 年相比,2015 年和 2016 年的整体阳性率均有所下降。在 2015 年年初,广东省出现了 1 次 PRRS 疫情波动,PRRSV 抗原阳性率上升到 1 个顶点,该次疫

情波动也导致 2015 年的 PRRSV 抗体水平呈现出一个不稳定的状态, 抗体阳性率时高时低, 直到 2016 年才逐渐稳定, 但依然低于 2014 年的水平。这也和 2014—2016 年总的抗原抗体阳性率检测结果相吻合。

从抗原抗体的季度统计上看, 冬季的 PRRSV 抗原阳性率显著高于其他季节, 这段时间猪场不仅要做好猪舍的保暖通风, 还需要应对猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 等病毒病的威胁^[13], 因此 PRRSV 的防控难度较大。春季的 PRRSV 抗原阳性率最低, 秋季的抗体阳性率最低但发病率不高, 这可能和春秋季节天气温和, 适合猪群生长有关。

从地理区域的统计上看, 养殖密度最大的珠三角地区抗原阳性率也处于较高的水平, 珠三角的冲积平原地形使得该地区成为整个广东省的经济中心, 地势平坦但环境复杂且与外界交流频繁。尽管该地区的抗体阳性率处于一个较高的水平, 但抗原的检出率依然很高。而粤东地区虽然抗体水平在 4 个地区中最低, 但抗原的检出率也是最低的, 可能原因是粤东地区三面环山形成天然的地理屏障, 加上该地区猪肉消费基本自给自足, 和外界的生猪交流有限, 这些因素有利于粤东地区对 PRRSV 的防控。

PRRSV *ORF5* 基因编码病毒的囊膜蛋白, 是病毒变异程度最大的结构蛋白^[14]。因此常把 *ORF5* 作为 PRRSV 分子流行病学调查的靶基因。2014—2016 年广东省内分离的毒株全部是美洲型, 且主要以 Subgenotype I 亚群为主, Subgenotype VI 亚群和 Subgenotype II 亚群也占一定比例。欧洲型毒株和近年传入中国的 NADC30-like 毒株在广东省内暂未检测到, 但前期研究在其他省份的送检病料中都检出了这 2 种类型的 PRRSV^[15]。因此, 广东地区的猪场在防控 PRRS 时, 不仅要着重于省内流行的优势亚群的控制, 同时还要加强生物安全措施, 防止欧洲型毒株和 NADC30-like 毒株的传入。

总体而言, 广东地区 PRRSV 的感染呈逐年上升趋势, 而 PRRSV 抗体虽然处于一个较高的水平, 但并不稳定, 结果表明广东省各规模化猪场的免疫水平仍然有需要改善的地方。从季度分析上看, 冬季的 PRRS 发病率要显著高于夏季, 因此, 各猪场依然需要在冬季严格做好各项防控措施, 进一步降低 PRRSV 的感染。珠三角地区是广东省养猪最为密集的区域, 也是广东省的经济核心, 高密度的养殖和复杂的环境, 使得该区域 PRRS 发病率处在一个较高的水平。根据 *ORF5* 基因进行的遗传进化分

析表明, 分离毒株所属亚群仍然主要集中在高致病性亚群 Subgenotype I, 亚群 Subgenotype VI 和 Subgenotype II 的分离毒株也占一定比例, 这些可以作为猪场选择疫苗的参考信息。

参考文献:

[1] 王东东, 邓雨修, 招丽婵, 等. 我国猪繁殖与呼吸综合征流行概况[J]. 动物医学进展, 2009(5): 101-104.

[2] 康艳梅, 赵明秋, 张学涛, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒分离株 *ORF5* 和 *Nsp2* 基因的序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(2): 108-112.

[3] KAPPES M A, FAABERG K S. PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity[J]. Virology, 2015, 479/480: 475-486.

[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(5): 323-327.

[5] LUW H, TUNH M, SUNB L, et al. Re-emerging of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (lineage 3) and increased pathogenicity after genomic recombination with vaccine variant[J]. Vet Microbiol, 2015, 175(2/3/4): 332-340.

[6] 安同庆, 田志军, 李冉, 等. 我国高致病性猪蓝耳病病毒的演化分析[J]. 中国兽医杂志, 2011(4): 3-6.

[7] 杨汉春. 2014 年猪病流行情况与 2015 年流行趋势及防控对策[J]. 猪业科学, 2015(2): 38-40.

[8] 代军, 雷蕾, 任志华. 猪繁殖与呼吸综合征防控研究进展[J]. 动物医学进展, 2014(4): 97-101.

[9] TIAN K, YU X, ZHAO T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. PLoS One, 2007, 2(6): e526.

[10] 杨汉春, 周磊. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异与演化[J]. 生命科学, 2016(3): 325-336.

[11] TIAN K. NADC30-like porcine reproductive and respiratory syndrome in China[J]. Open Virol J, 2017, 11: 59-65.

[12] 张洪亮, 张晶, 李真, 等. 2016 年我国部分地区类 NADC30 新亚群猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2016(9): 675-680.

[13] 郭振华, 乔松林. 规模化猪场猪繁殖与呼吸综合征防控体会[J]. 中国猪业, 2016(5): 43-46.

[14] ZHOU L, KANG R, JI G, et al. Molecular characterization and recombination analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in southwestern China during 2012-2016[J]. Virus Genes, 2017. doi: 10.1007/s11262-017-1519-y.

[15] 白小磊. 华南部分地区 PRRSV 流行病学调查及 *Nsp1a* 和 *Nsp1b* 的原核表达[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.

【责任编辑 霍 欢】