

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.04.02

一例猪繁殖与呼吸综合征高致病性毒株与链球菌混合感染的实验室诊断

韩相敏¹, 马晶晶¹, 吴汉字¹, 奉中花¹, 贾济宇¹, 孔维苏², 盘金华², 高俊锋¹, 赖志^{1,2*}

(1. 上海创宏生物科技有限公司, 上海 201619; 2. 龙阔(苏州)生物工程有限公司, 江苏太仓 215421)

[收稿日期] 2022-09-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2023)04-0011-07 [中图分类号] S858.28

[摘要] 某规模化自繁自养猪场产房母猪出现流产, 保育猪关节肿胀、倒地不起、大量死亡, 为研究发病原因, 采集流产胎儿、死亡仔猪的肺脏、脾脏、淋巴结和关节液, 进行分子生物学检测, 病毒和细菌分离鉴定, 并检测不同胎龄母猪猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体, 结果显示猪繁殖与呼吸综合征病毒检测为阳性, 使用 PAM 分离到一株猪繁殖与呼吸综合征病毒, 经序列鉴定为高致病性毒株; 抗体结果表明四胎及以上母猪猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性率异常升高; 病料分离的细菌经鉴定为猪链球菌, 经实验室诊断确定猪场发病的原因为猪繁殖与呼吸综合征高致病性毒株与猪链球菌混合感染。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征; 高致病性毒株; 猪链球菌; 诊断

Laboratory Diagnosis for Mixed Infection of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRSV) and *Streptococcus*

HAN Xiang-min¹, MA Jing-jing¹, WU Han-yu¹, FENG Zhong-hua¹, JIA Ji-yu¹,KONG Wei-su², PAN Jin-hua², GAO Jun-feng¹, LAI Zhi^{1,2*}

(1. Shanghai Chuanghong Biotech Co., Ltd, Shanghai 201619, China; 2. Longkuo (Suzhou) Bioengineering Co., Ltd, Taicang, Jiangsu 215421, China)

Corresponding author: LAI Zhi, E-mail: zhilai@263.net

Abstract: The sows in the delivery room of a large-scale self-breeding pig farm suffered from miscarriage, and the joints of the pigs were swollen, collapsed, and died. In order to study reason of disease, the aborted fetus and lungs, spleen, lymph nodes and joint fluid of the dead piglets were collected for molecular biological detection, virus and bacteriological isolation and identification, and the antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus of sows were detected. The results showed that the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus was positive. A porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain was isolated

作者简介: 韩相敏, 兽医师, 硕士, 从事动物病毒学研究。

通讯作者: 赖志, E-mail: zhilai@263.net

using PAM and identified as a highly pathogenic virus strain by sequence identification; The antibody results showed that the positive rate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibody in sows with four or more fetuses was abnormally high; The bacteria isolated from the diseased material were identified as *Streptococcus suis*, and laboratory diagnosis confirmed that the cause of the disease in the pig farm was the mixed infection of a highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome with *Streptococcus suis*.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; highly pathogenic; *Streptococcus*; diagnosos

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引起的一种急性、高度传染的病毒性传染病, 临床母猪主要表现为高热、繁殖障碍、妊娠后期流产、产死胎或木乃伊胎; 仔猪表现呼吸障碍。猪感染 PRRSV 后, 免疫系统被攻击, 对一些细菌和病毒性疾病的易感程度增加, 容易造成继发感染; 同时由于 PRRSV 是单链 RNA 病毒, 容易发生突变和重组, 临床上不断的用药和疫苗的使用加剧了病毒变异^[1]。2006 年, 以 JXA1 毒株为代表的高致病性毒株的出现, 是我国 PRRSV 遗传变异过程中一个标志性事件^[2], 该类病毒 Nsp2 蛋白中存在 30(1+29) 个氨基酸的不连续缺失^[3], 该类病毒具有同源性低、重组频繁和致病性差异较大的特点, 已经逐渐成为我国主要的流行株^[4], 给猪场造成了很大的经济损失。本研究通过发病猪进行分子生物学检测、免疫学检测、细菌和病毒分离鉴定, 确定猪场发病原因, 为本场疫情的控制和治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗体检测试剂盒 猪繁殖与呼吸综合征抗体检测试剂盒、猪瘟抗体检测试剂盒和猪伪狂犬 gE 抗体检测试剂盒, 购自 IDEXX。

1.1.2 荧光定量 PCR 试剂盒及普通 PCR 相关试剂 购自北京全式金生物技术股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 临床猪场背景 某 1500 头母猪场, 保育猪出现关节肿胀、倒地不起、四肢划水等临床症状, 死淘率超过 8%; 产房母猪流产, 产房仔猪眼角水肿,

结膜充血, 腹股沟淋巴结发绀。经询问, 该场后备母猪配种前免疫两次 PRRSV 经典株活疫苗, 经产母猪未免疫 PRRSV 疫苗。

1.2.2 血清采集 按胎龄对母猪采血, 一胎母猪、二、三胎母猪、四胎及以上母猪和断奶母猪各采集 30 头, 分离血清, 检测 PRRSV 抗体。

1.2.3 病毒检测 参考国标方法建立猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV)、猪圆环病毒 (porcine circovirus type 2, PCV-2)、猪伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV) 和 PRRSV 的荧光定量 PCR 检测方法, 具体见表 1。采集产房流产胎儿及保育发病猪肺脏、脾脏、淋巴结和关节液, 匀浆后冻融 2 次, 将匀浆液进行 CSFV、PCV-2、PRV 和 PRRSV 检测。

1.2.4 病毒分离

1.2.4.1 细胞制备和病毒增殖 使用原代肺泡巨噬细胞 (Pig alveolar macrophage, PAM) 进行病毒分离。参考徐云红等^[5]报道的方法制备 PAM 细胞, 培养成单层后, 取 1.2.2 项的匀浆液, 用 0.22 μm 滤器过滤后, 接种于 PAM 细胞, 孵育 3 h 后, 倒掉接毒液, 加入含 2% 血清的维持液。置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 96 h 收获病毒液。将收获的病毒液按照相同方法在 PAM 细胞上继续培养 2 代, 记为 F1 ~ F3 代。

1.2.4.2 序列测定和分析 取 F3 代病毒液, 提取病毒 RNA, 并逆转录为 cDNA, 用 PRRSV-NSP2 引物按照相应的扩增程序分别进行扩增, 引物序列及扩增条件见表 2, 取扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将扩增条带送至上海生工进行测序。将获得的序列与 PRRSV 代表毒株 (表 3) 进行同源性比对与遗传进化分析。

表 1 病毒检测方法来源及引物探针序列

Tab 1 Source of virus detection method and primer probe sequence

检测项目及方法来源	引物或探针名称	序列(5'-3')
CSFV GB/T 27540-2011	上游引物	TACAGGACAGTCGTCAGTAGTTCGA
	下游引物	CCGCTAGGGTTAAGGTGTGTCT
	探针	FAM-CCCACCTCGAGATGCTATGTGGACGA-TAMRA
PRV GB/T 35911-2018	上游引物	ACGCTCGGCTTCCTCTCC
	下游引物	GGTAGTCGTCGCTCTCGTG-
	探针	FAM-TCGCGCAGCGTCTGGTGCAT-BHQ1
PCV2 GB/T 35901-2018	上游引物	GGACTCTGGTGACCGTTGC
	下游引物	CCAATCACGCTTCTGCATTTT
	探针	FAM-CCGCTCACTTTCAAAGTTCAGCCA-BHQ1
PRRSV GB/T 35912-2018	上游引物	TTGCTAGGCCGCAAGTAC
	下游引物	ACGCCGGACGACAAATGC
	探针	FAM-CTGGCCCTGCCACCAC-BHQ1

表 2 PRRSV 引物及扩增条件

Tab 2 PRRSV primers and amplification conditions

引物名称	引物序列(5'-3')	循环参数	扩增片段/bp
PRRSV 上游引物	AACRCCCAGGGCACTTCAG	95 °C 5 min→95 °C 45 s, 56 °C 45 s,	经典株 1879
PRRSV 下游引物	TCTCATTAGGAGCAGTTCTTACAC	72 °C 60 s, 30 个循环→72 °C 10 min	变异株 1789

表 3 PRRSV 代表毒株名称及 GenBank 登录号

Tab 3 PRRSV representative strain name and GenBank registration number

GenBank 登录号	名称	毒株类型及致病性	来源
EF635006	HUN4	高致病性变异株	China
AY032626	CH-1a	经典毒株	China
EU807840	CH-1R	经典毒株	China
EF112445	JXA1-R	高致病性变异株	China
EU860248	TJ	高致病性变异株	China
MH500776.1	NADC30	中等毒力	America
AY150564	VR2332	经典株	America
MW887655.1	1-4-4	高致病性变异株	America
KX192119.1	NADC34	中等毒力	America
EU360130.1	3.9	高致病性变异株	China

1.2.5 细菌分离鉴定与培养

1.2.5.1 细菌分离 取保育发病猪肺脏、脾脏、淋巴结和关节液,用接种环勾取组织内部,划线接种至含有 5% 小牛血清的 TSA 培养基上,置 37 °C 温箱培养。挑取单个菌落进行革兰氏染色,根据革兰

氏染色的结果选择引物进行 PCR 扩增。

1.2.5.2 细菌鉴定 将单个细菌菌落置于无菌生理盐水中,煮沸提取核酸。用猪链球菌扩增引物进行扩增,取扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,并将扩增条带送至上海生工进行测序,引物序列如表 4。

表 4 猪链球菌扩增引物及扩增条件

Tab 4 Amplification primers and conditions of streptococcus suis

引物	引物序列(5'-3')	循环参数	片段长度
上游引物	GCAGCGTATTCTGTCAAACG	95 °C 5 min→95 °C 15 s, 55 °C 45 s, 72 °C 30 s, 30 个循环→72 °C 10 min	689 bp
下游引物	CCATGGACAGATAAAGATGG		

2 结果与分析

2.1 抗体检测结果 将不同胎龄的母猪采血检测 PRRSV 抗体,其中一胎母猪 PRRSV 抗体阳性率 95%,S/P 平均值为 1.01;二、三胎母猪阳性率为 40%,S/P 平均值为 0.42;四胎及以上母猪阳性率均为 95%,S/P 平均值为 1.6,四胎及以上母猪抗体阳性率和离散度均高于二、三胎母猪(表 5,图 1)。

表 5 不同胎龄母猪 PRRSV 抗体检测结果

Tab 5 PRRSV Antibody results of Sows of different gestational ages

母猪胎龄	采样数/头	S/P 平均值	阳性率	离散度
一胎	30	1.01	93%	0.63
二、三胎	30	0.42	40%	0.22
四胎及以上	30	1.6	96.7%	0.81
断奶	30	0.75	83.30%	0.6

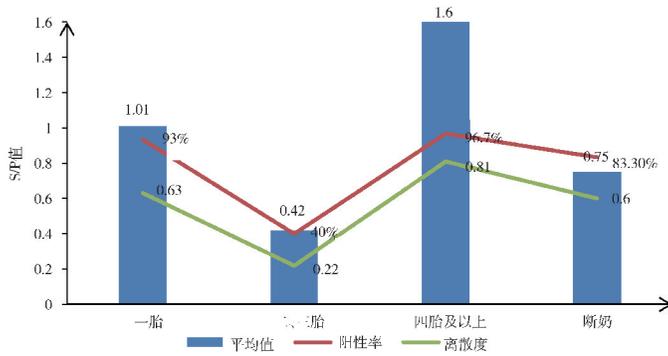


图 1 母猪 PRRSV 抗体检测结果

Fig 1 Results of Porcine PRRSV Antibody Test

2.2 病毒检测结果 CSFV、PCV2 和 PRV 检测结果均为阴性,PRRSV 检测结果为阳性,CT 值为 21.3。

接毒后 72 h 细胞出现肿大、裂解、破碎,细胞病变结果见图 2,收获 F3 代培养 96 h 的病毒液,命名为 PRRSV-202201。

2.3 病毒分离

2.3.1 病毒分离结果 将病料匀浆液接种 PAM,

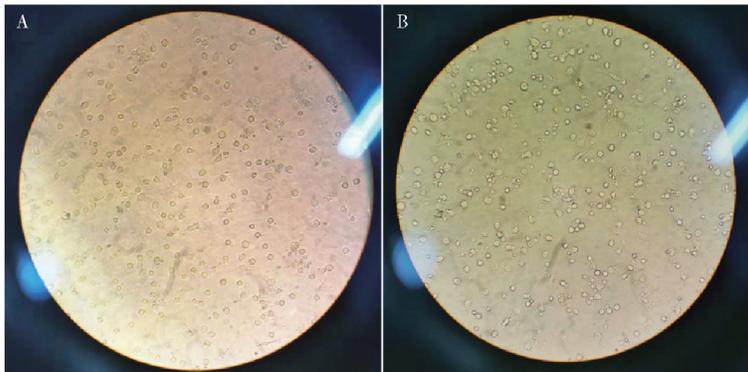


图 2 PAM 细胞接种病料后 72 h 细胞变化

A: 空白 PAM 细胞 B: PAM 细胞接种病料后 72 h 病变

Fig 2 Changes of PAM cells 72 h after inoculation

A: Blank PAM cell B: pathological changes 72 hours after PAM cell inoculation

2.3.2 序列测定和分析结果 用 NSP2 引物对 PRRSV-202201 扩增出 1789 bp 的目的条带。将扩增出的目的条带进行测序,与经典毒株相比有 29 + 1 个氨基酸的缺失,与高致病性毒株具有相同的基因特征,测序结果与高致病性毒株同源性最近,为 95.6% ~ 95.8%,表明分离到的病毒为高致病性毒株(图 3,图 4,图 5)。

2.4 细菌分离及鉴定结果 勾取病料涂布平板后培养 24 h 后,可见边缘整齐的灰白色菌落,将菌落进行革兰氏染色,在油镜下可见紫色链状球菌(图 6),初步判定为链球菌。对菌落进行核酸提取,并用 PCR 引物进行扩增,于紫外灯下有 689 bp 左右的目的条带(图 7),对目的条带进行测序和序列比较,与猪链球菌的同源性为 100%,表明分离的细菌为猪链球菌。

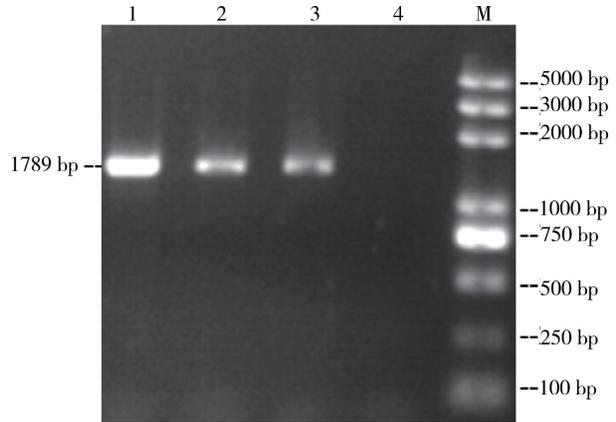


图 3 PRRSV-202201 PCR 扩增结果
M:Marker;1~3:PRRSV-202201 F3、F2、F1 代产物跑胶结果;4:阴性对照

Fig 3 PRRSV-202201 PCR amplification results
M:Marker; 1~3:PRRSV-202201F3, F2, F1 generation results; 4:negative control

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Divergence	1	█	80.5	80.5	95.7	95.6	95.7	95.8	32.7	95.4	68.1	43.5	42.0	1	PRRSV-202201
	2	12.1	█	100.0	83.6	83.7	83.8	83.7	40.4	83.4	80.9	51.9	49.7	2	CH-1a
	3	12.1	0.0	█	83.6	83.7	83.8	83.7	40.4	83.4	80.9	51.9	49.7	3	CH-1R
	4	3.7	9.3	9.3	█	99.5	99.2	99.3	34.6	98.8	71.2	45.5	43.9	4	3.9
	5	3.8	9.2	9.2	0.5	█	99.1	99.2	34.6	98.7	71.3	45.4	43.8	5	HuN
	6	3.7	9.1	9.1	0.9	1.0	█	99.7	34.3	99.2	71.2	45.4	43.8	6	HUN4-F112
	7	3.5	9.2	9.2	0.8	0.9	0.3	█	34.4	99.3	71.3	45.6	44.0	7	JXA1-R
	8	57.9	53.1	53.1	53.4	53.4	54.9	54.5	█	34.1	41.2	69.8	68.9	8	NADC30
	9	4.1	9.6	9.6	1.3	1.4	0.9	0.8	56.0	█	71.0	45.3	43.8	9	TJ
	10	32.2	23.7	23.7	28.3	28.1	28.3	28.1	49.8	28.6	█	47.4	45.6	10	VR2332
	11	39.1	36.0	36.0	36.2	36.5	36.5	35.9	53.3	36.7	49.1	█	94.0	11	NADC34
	12	44.1	42.3	42.3	41.0	41.4	41.4	40.8	57.2	41.3	55.6	9.3	█	12	1-4-4
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

图 4 PRRSV-202201 株与 PRRSV 代表毒株同源性

Fig 4 Homology of PRRSV-202201 strain and PRRSV representative strain

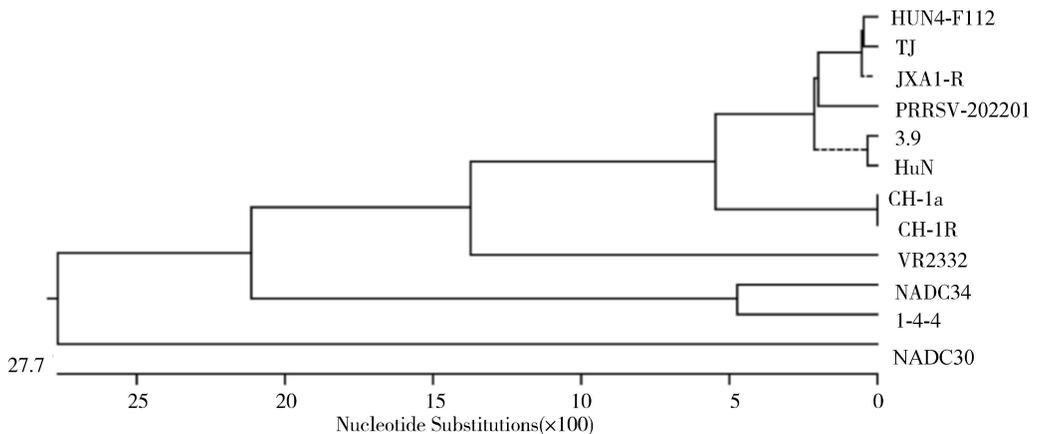


图 5 PRRSV-202201 株进化树分析

Fig. 5 Evolution tree analysis of PRRSV-202201 strain

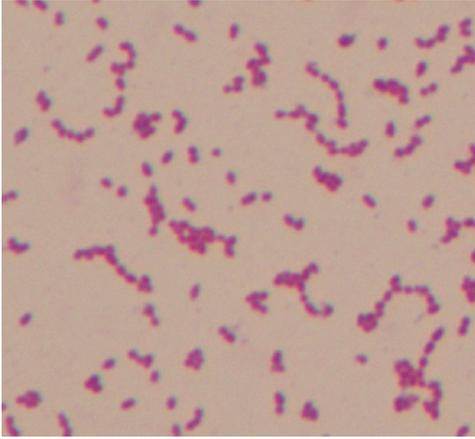


图 6 分离细菌革兰氏染色镜检结果

Fig 6 Gram staining microscopic results of isolated bacteria

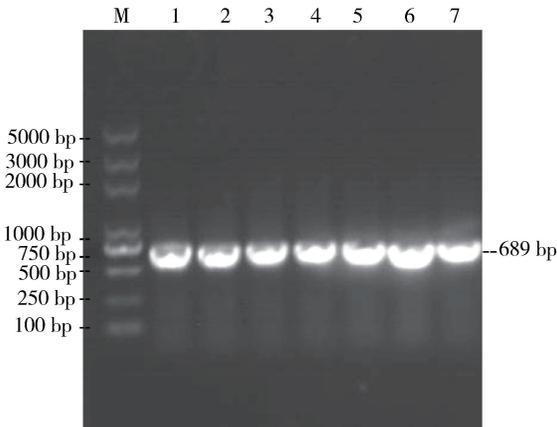


图 7 细菌 PCR 检测结果

M: Marker; 1~7 均为菌落扩增 PCR 产物跑胶结果

Figure 7 Bacterial PCR Detection Results

M: Marker; 1~7: the results of colony amplified PCR products

3 讨论

由于猪场疫病临床症状不典型且混合感染增多,通常需要借助实验室手段来确诊。在对本场母猪 PRRSV 抗体进行 ELISA 检测时,一胎母猪 PRRSV 抗体阳性率 95%,S/P 平均值为 1.01;二、三胎母猪阳性率为 40%,S/P 平均值为 0.42;四胎及以上母猪阳性率均为 95%,S/P 平均值为 1.6。由于母猪仅在后备期免疫过 PRRSV 疫苗,PRRSV 抗体应随着母猪胎龄的升高而下降,由于四胎及以上母猪抗体抗性率和 S/P 平均值出现了明显的升高,

表明四胎及以上母猪有 PRRSV 野毒感染,造成抗体水平的异常。

在对本场的流产胎儿及保育发病猪病料进行抗原检测时,CSFV、PCV2 和 PRV 检测结果均为阴性,PRRSV 检测结果为阳性,我们随即进行了病毒分离,根据 DE ABIN 等的报道^[6],在进行 PRRSV 分离时 PAM 细胞比 Marc-145 更敏感,因此本研究使用 PAMs 细胞接种病料分离 PRRSV,PAM 细胞接毒后 72 h 细胞出现肿大、裂解、破碎等细胞病变,提取病毒 RNA 扩增后 PRRSV 为阳性,表明分离到了一株病毒。

目前区别 PRRSV 高致病性毒株和经典毒株的方法是通过测序查看 Nsp2 蛋白第 481 位和 533-561 位氨基酸(共 30 个 aa)是否发生不连续缺失^[7]。因此,本研究选择分离毒株的 NSP2 基因对 PRRSV-202201 株进行测序和同源性比较,结果与高致病性毒株同源性最高,为 95.6%~95.8%,但是存在一定的差异,可能是病毒的变异造成了这些差异位点的产生。

2013 年,我国发现类 NADC30 毒株^[8-9],2020 年美国报道了高致病性的 1-4-4 Lineage 1C PRRSV 变异株^[10],养猪业每过 3~5 年就会出现一个 PRRSV 新毒株,一方面临床上源源不断出现新毒株,另一方面已存在的毒株又不断发生变异,这些都给 PRRS 防控带来了巨大的挑战,因此必须通过实验室检测对临床毒株的特性进行关注,采取有针对性的防治措施。

参考文献:

- [1] Carlsson U, Wallgren P, Renstrom L H, *et al.* Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: detection, response and eradication[J]. *Transboundary and emerging disease*, 2009, 56(4):121-131.
- [2] K Tian, X Yu, T Zhao, *et al.* Emergence of fatal PRRSV variants; Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoSOne*, 2007, 2(6):e526.
- [3] 周峰,常洪涛,赵军,等. 2012-2013 年猪繁殖与呼吸综合征病毒河南流行株的分离鉴定及分子流行病学调查[J]. 中

- 国兽医学报, 2014, 34(09): 1398 - 1404.
- Zhou F, Chang H T, Zhao J, *et al.* Identification and molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus prevailing in Henan province from 2012 to 2013 [J]. *Chin J Vet Sci*, 2014, 34(09): 1398 - 1404.
- [4] 张洪亮, 张文立, 许 浒, 等. 2014 年 ~ 2019 年 PRRSV 主要流行毒株在我国的变化 [J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(05): 512 - 516.
- Zhang H L, Zhang W L, Xu H, *et al.* The changes of mainly endemic PRRSV in China during 2014 - 2019 [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*. 2020, 42(05): 512 - 516.
- [5] 徐红运, 夏平安, 王中明, 等. 猪肺巨噬细胞 Fc γ R III 受体基因的克隆与序列分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(4): 66 - 71.
- Xu H Y, Xia P A, Wang Z M, *et al.* Cloning and Sequence Analysis of cDNA Encoding Porcine Alveolar Macrophages Fc γ R III [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37(4): 66 - 71.
- [6] De Abin, Martha Fuentes, Spronk, Gordon, Wagner, Mark, *et al.* Comparative infection efficiency of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates on MA104 cells and porcine alveolar macrophages [J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2009, 73(3): 200 - 204.
- [7] Lu W, Wei Z, Zhang G, *et al.* Complete genome sequence of a novel variant porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain; evidence for recombination between vaccine and wild - type PRRSV strains. *J Virol*, 2012, 86(17): 9543.
- [8] Zhao Kuan, Ye Chao, Chang Xiao - bo, *et al.* Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *J Virol*, 2015, 89(20): 10712 - 10716.
- [9] Zhou Lei, Wang Zi - chun, Ding Yu - ping, *et al.* NADC30 - like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015b, 21(12): 2256 - 2257.
- [10] Trevisan G, Li Gan - wU, Moura C A A, *et al.* Complete coding genome sequence of a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 restriction fragment length polymorphism 1 - 4 - 4 Lineage 1C Variant Identified in Iowa, USA [J]. *Microbiol Resour Announc*, 2021, 10: e0044821.

(编辑:侯向辉)