

华利忠, 吴文开, 邵国青. 发酵床与传统水冲圈模式下猪瘟、蓝耳病及口蹄疫血清抗体差异调查[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 178-180.

# 发酵床与传统水冲圈模式下猪瘟、蓝耳病及口蹄疫血清抗体差异调查

华利忠<sup>1</sup>, 吴文开<sup>2,3</sup>, 邵国青<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014;

2. 江苏省阜宁县畜牧兽医站, 江苏阜宁 224400; 3. 南京农业大学, 江苏南京 210095)

**摘要:** 为了比较发酵床模式和传统水冲圈模式下生猪的猪瘟、猪蓝耳病和猪口蹄疫血清抗体的差异, 于 2012 年 11 月以及 2013 年 5 月在江苏省阜宁县 22 个镇(区)分别采集生猪血样 1 313 份(发酵床 602 份)和 1 235 份(发酵床 563 份)共计 2 548 份, 用 ELISA 法检测血清中猪瘟、猪蓝耳病和猪口蹄疫抗体阳性率。结果显示: 2012 年 11 月和 2013 年 5 月发酵床模式下猪瘟血清抗体阳性率分别为 97.7%、97.9%, 略高于水冲圈的 95.4%、96.0%; 猪蓝耳病病毒血清抗体阳性率分别为 65.3%、75.2%, 高于水冲圈的 50.2%、70.4%; 口蹄疫血清抗体阳性率分别为 95.2%、96.8%, 与水冲圈的 94.1%、99.1% 基本持平。

**关键词:** 发酵床; 水冲圈; 猪瘟; 猪蓝耳病; 口蹄疫; 抗体检测; ELISA

**中图分类号:** S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0178-02

发酵床养猪法是近几年从日本、韩国引入的新型养猪方法<sup>[1]</sup>, 是一种使用微生物垫料(锯末、稻壳、花生壳等含粗纤维高的物质中的 2 种或多种混合物, 再加上复合微生物菌种)来养猪的方式<sup>[2]</sup>。有研究表明, 与传统养猪模式相比, 发酵床养猪可大大降低碳排放量和养殖成本, 提高猪肉品质和养猪效益<sup>[3-4]</sup>, 可是在疾病防控方面还有一些争论。一些研究表明, 微生态发酵床内含有多种致病性细菌, 对猪的健康具有潜在威胁, 说明微生态发酵床养猪模式存在较大的安全隐患<sup>[5]</sup>; 也有一些研究得出相反的结论, 认为生物发酵床改善了猪舍环境, 增强了猪的体况, 提高了免疫效果, 保障了猪群的健康<sup>[6-7]</sup>。目前, 疫苗免疫是生猪疾病防控的主要措施之一, 然而发酵床模式对生猪常规疫苗的免疫效率有何影响还没有研究; 因此, 本研究对江苏省阜宁县发酵床与传统水冲圈模式下猪瘟、猪蓝耳病和猪口蹄疫疫苗免疫后的血清抗体进行调查, 探讨发酵床模式对猪常规疫苗免疫效率的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒和猪蓝耳病病毒 ELISA 抗体检测试剂盒购自美国 IDEXX 公司; 猪口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白抗体酶联免疫吸附试验诊断试剂盒购自上海优耐特生物医药有限公司。

### 1.2 主要仪器

Denley Dragon Wellscan MK 3 酶标仪(Ascent software for

Multiskan 分析软件, Thermo, 芬兰), PYX-DHS 数字显示隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂), 微量反应板及封条(上海跃进医疗器械厂), TGL-168 离心机(上海安亭科学仪器厂), 10~1 000  $\mu\text{L}$  移液枪及 300  $\mu\text{L}$  排枪(艾本德中国有限公司)。

### 1.3 样本来源

分别于 2012 年 11 月和 2013 年 5 月采集江苏省阜宁县发酵床和传统水冲圈的生猪(50~75 kg/头)血样共 2 548 份, 进行猪瘟、猪蓝耳病及猪口蹄疫血清抗体检测。其中, 发酵床样品 1 165 份, 水冲圈样品 1 383 份, 样品情况详见表 1。

### 1.4 全血采集后的处理

每次抽血后倾斜 45° 于室温下放置 30 min, 立即放入有冰块的疫苗运输箱内, 带回江苏省阜宁县畜牧兽医站, 将血清倒入 2 mL EP 管中, 5 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清移入另一干净的 2 mL EP 管中, 做好标记, -20℃ 冰箱保存备用。

### 1.5 血清抗体的检测

每批次样品全部采集完后, 严格按相应试剂盒的操作说明进行猪瘟、猪蓝耳病和猪口蹄疫的血清抗体 ELISA 检测。

## 2 结果与分析

由表 2 可知, 发酵床模式下的猪蓝耳病抗体阳性率无论是 2012 年 11 月的 65.3%, 还是 2013 年 5 月的 76.2%, 均比同批次传统水冲圈模式下的高。猪瘟阳性率发酵床模式略高于传统水冲圈, 口蹄疫抗体阳性率基本一致。同时还发现, 2013 年 5 月的抗体阳性率普遍比 2012 年 11 月高, 但蓝耳病血清抗体阳性率普遍偏低, 没有达到农业部的免疫标准。

## 3 结论与讨论

发酵床养猪是依托日本、韩国自然养殖经验, 并根据国内实际情况不断创新完善提出的一种环保、安全、有效的生态养猪法<sup>[8]</sup>。发酵床养猪起到了提高猪的生长性能和猪肉品质

收稿日期: 2013-12-04

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)1001-05]。

作者简介: 华利忠(1982—), 男, 江苏无锡人, 博士, 助理研究员, 从事兽医传染病及兽医病理学研究。E-mail: steven828@126.com。

通信作者: 邵国青, 男, 江苏盐城人, 博士, 研究员, 主要从事兽医传染病学研究。E-mail: gqshaojaas@gmail.com。

表 1 2012 年 11 月及 2013 年 5 月血清样品采集统计情况

镇(区)	2012 年 11 月样品数(份)			2013 年 5 月样品数(份)		
	水冲圈	发酵床	总数	水冲圈	发酵床	总数
沟墩镇	40	36	76	40	35	75
吴滩区	29	25	54	30	25	55
合利区	33	27	60	31	27	58
施庄区	31	25	56	27	23	50
阜城区	31	33	64	27	36	63
陈良镇	39	31	70	39	29	68
郭墅镇	29	23	52	25	24	49
新沟镇	34	30	64	35	29	64
陈集镇	35	27	62	36	29	65
板湖镇	33	25	58	32	31	63
羊寨镇	40	31	71	38	27	65
罗桥镇	37	34	71	35	35	70
硕集区	15	31	46	15	30	45
东沟区	31	29	60	33	31	64
公兴区	31	15	46	36	15	51
益林区	33	31	64	28	23	51
杨集区	23	25	48	23	15	38
古河镇	35	35	70	22	23	45
开发区	35	15	50	40	15	55
澳洋	20	15	35	19	15	34
三灶镇	39	28	67	31	31	62
芦蒲镇	38	31	69	30	15	45
共计	711	602	1313	672	563	1 235

的作用<sup>[9-10]</sup>。然而,目前养猪界对发酵床在疫病防控方面仍然褒贬不一。一些研究认为,发酵床可以通过避免冲洗猪舍、猪粪和尿零排放、无臭味、无公害、环保等因素提高猪的免疫力和生产性能<sup>[11]</sup>。王诚等发现,发酵床模式能提高血清 IgA、IgG 含量以提高机体免疫力<sup>[12]</sup>;王志强等研究发现,发酵床猪舍能有效提高舍内环境温度和地面温度,并能显著降低猪舍的 NH<sub>3</sub> 含量,在寒冷季节通风条件差时能有效控制猪舍的氨气排放,有利于保持猪舍小环境空气质量和减少仔猪发病<sup>[13]</sup>。还有一些研究认为,发酵床容易引起霉菌毒素中毒、寄生虫病滋生<sup>[14-15]</sup>以及因木屑、米糠等粉状物引起的呼吸道疾病<sup>[16]</sup>。

猪瘟、蓝耳病和猪口蹄疫是生猪养殖常见的疫病<sup>[17-18]</sup>,也是国家强制免疫的 3 种猪主要疫病,目前主要靠疫苗免疫防控,所以进行猪瘟、猪蓝耳病和猪口蹄疫疫苗免疫后血清抗体的监测和分析,对防控这 3 种疫病具有重要的指导意义。而发酵床模式对生猪疫苗免疫效率的影响目前还未见报道,本研究通过对阜宁县发酵床养猪模式和传统水冲圈生猪猪瘟、蓝耳病和猪口蹄疫疫苗免疫后血清抗体的监测发现,发酵床模式下猪蓝耳病抗体阳性率、猪瘟阳性率比传统水冲圈高,口蹄疫抗体阳性率基本一致。同时还发现,对于免疫效率较差的蓝耳病疫苗,发酵床养猪有显著促进疫苗免疫保护率的作用;而对于疫苗保护率较好的猪瘟疫苗和口蹄疫疫苗,发酵

表 2 2012 年 11 月和 2013 年 5 月水冲圈和发酵床模式下生猪血清抗体检测结果

模式	猪蓝耳病抗体				猪瘟抗体				猪口蹄疫抗体			
	阳性数/样品数		阳性率(%)		阳性数/样品数		阳性率(%)		阳性数/样品数		阳性率(%)	
	2012-11	2013-05	2012-11	2013-05	2012-11	2013-05	2012-11	2013-05	2012-11	2013-05	2012-11	2013-05
水冲圈	357/711	497/672	50.2	74.0	678/711	645/672	95.4	96.0	669/711	666/672	94.1	99.1
发酵床	393/602	429/563	65.3	76.2	588/602	551/563	97.7	97.9	573/602	545/563	95.2	96.8
总计	750/1 313	926/1 235	57.1	75.0	1 266/1 313	1 196/1 235	96.4	96.8	1 242/1 313	1 211/1 235	94.6	98.1

床促进疫苗抗体产生的作用较小。本研究结果仅仅是阜宁地区 2012 年 5 月和 2013 年 11 月 2 批次抽检的平均结果,并不是每一个猪场的发酵床抗体阳性率均高于水冲圈,其他因素(如技术员、疫苗等)对疫苗免疫效果的影响也很大。

参考文献:

[1] 万昭军,廖党金,田 浪,等. 发酵床养殖生猪的疫病风险性研究[J]. 四川畜牧兽医,2010,37(5):24-25.  
[2] 刘小芳,陈新国. 发酵床养猪的主要技术措施[J]. 河南农业,2010(23):43.  
[3] 刘文科,李会庆,李旭霞,等. 低碳经济下再论发酵床养猪的利与弊[N]. 北方牧业,2010-10-20.  
[4] 童建军. 发酵床养猪技术要领及利弊分析[J]. 中国畜禽种业,2011,7(6):76-78.  
[5] 田 浪,廖党金,万昭军,等. 养猪发酵床中主要致病菌鉴定及致病性研究[J]. 当代畜牧,2010(4):13-15.  
[6] 田 华,李顺荣,冯 强. 生物发酵床条件下育肥猪疾病控制效果观察[J]. 中国动物保健,2010,12(12):15-17,21.  
[7] Tang J Y, Zheng X F, Liu B, et al. Piglets behavior characteristics under breeding mode of microbial fermentation bed[J]. Animal Husbandry and Feed Science,2013,5(1):32-36.  
[8] 王晓东. 传统注射预生态养猪效果对比实验研究[J]. 中国科技

纵横,2013(11):237-238.  
[9] 王小红,吕 锋,陆德祥,等. 发酵床养猪与水泥地面养猪饲养效果比较研究[J]. 上海农业学报,2013,29(3):70-72.  
[10] 李素金. 浅谈发酵床生态养猪技术的优点及其应用[J]. 广东畜牧兽医科技,2011,36(1):47-49.  
[11] 姚茂均. 发酵床香猪养殖和传统香猪养殖的对比试验[J]. 凯里学院学报,2013,31(3):55-57.  
[12] 王 诚,张 印,王怀忠,等. 发酵床饲养模式对猪舍环境、生长性能、猪肉品质和血液免疫的影响[J]. 山东农业科学,2009(11):110-112.  
[13] 王志强,郭成辉,王晓丽,等. 发酵床猪舍与传统猪舍空气质量对比试验[J]. 中国畜牧兽医文摘,2013,9(4):59.  
[14] 李启成,祁永秀,赵永邦. 生物发酵床猪场发生毛首线虫感染的诊治报告[J]. 上海畜牧兽医通讯,2013(3):74.  
[15] 盛清凯,武 英,赵红波,等. 发酵床养猪疾病防治技术[J]. 猪业科学,2010,27(6):80-82.  
[16] 孙吉龙. 发酵床养猪中易引起的疾病[J]. 养殖技术顾问,2010(12):132.  
[17] 吴卫东. 生猪常见传染病的防治[J]. 当代畜牧,2012(2):18-19.  
[18] Kamakawa A, Thu H T, Yamada S. Epidemiological survey of viral diseases of pigs in the Mekong delta of Vietnam between 1999 and 2003[J]. Veterinary Microbiology,2006,118(1/2):47-56.

周 峰,郭龙飞,刘红英,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 XINX 株的分离及 *NSP2* 基因的遗传进化分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):180-182.

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 XINX 株的分离及 *NSP2* 基因的遗传进化分析

周 峰<sup>1</sup>,郭龙飞<sup>1</sup>,刘红英<sup>1</sup>,陈 陆<sup>1</sup>,赵 军<sup>1</sup>,王新卫<sup>1</sup>,常洪涛<sup>1</sup>,王川庆<sup>1</sup>,杨 霞<sup>1</sup>,王永强<sup>2</sup>

(1. 河南农业大学禽病研究所,河南郑州 450002; 2. 河南省安阳市畜牧局,河南安阳 455001)

**摘要:**为了了解猪繁殖与呼吸综合征病毒在河南地区猪体内的进化情况,笔者采集了河南新乡地区出现的疑似猪繁殖与呼吸综合征的流产猪胎,并进行了病毒的分离鉴定,同时对分离病毒株的 *NSP2* 基因部分序列进行遗传进化分析。结果共分离并鉴定出 1 株美洲型猪繁殖与呼吸病毒 XINX,且 *NSP2* 基因部分序列的分析显示,该毒株与以往的分​​离毒株不同,其 *NSP2* 基因存在 393 bp 的不连续缺失,同国内之前报道的经典毒株和高致病性毒株间均存在较大差异,目前在​​国内尚数首次出现。研究结果为进一步研究猪繁殖与呼吸综合征病毒的分子进化提供了重要信息。

**关键词:**猪繁殖与呼吸综合征病毒;Marc-145;*NSP2*;遗传进化分析

**中图分类号:** S855.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0180-03

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome,PRRS)是猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)引起的一种猪的重要传染病,该病以怀孕母猪流产、早产和死胎以及仔猪和育肥猪发生呼吸道疾病为主要特征。PRRS 于 1987 年在美国首次被发现,现已波及全球,给世界养猪业造成了巨大经济损失<sup>[1-2]</sup>。我国于 1996 年首次在流产的猪胎中分离到 PRRSV,并相继发现了多种变异毒株<sup>[3-5]</sup>。目前,PRRSV 主要包括以 Lelystad virus(LV)为代表的欧洲型(type1,European type)和以 VR-2332 为代表株的北美洲型(type2,North American type)2 种基因型,在中国主要流行美洲型。PRRSV 病毒基因组为单股正链 RNA,全长约为 15 kb,包括 10 个开放阅读框(ORFs)和 2 个非编码区(UTRs)<sup>[6]</sup>。ORF1a、ORF1b 大约占了病毒基因组的 80%,分别编码 pp1a、pp1ab 这 2 个复制多聚蛋白,并最终被 ORF1a 编码的蛋白水解酶切割成 14 个非结构蛋白(non-structure protein,NSP)<sup>[7-8]</sup>;ORF2a、ORF2b 分别编码病毒的结构蛋白 GP2a、GP2b;ORF3-7 分别编码病毒的结构蛋白 GP3、GP4、GP5、M、N 蛋白<sup>[9]</sup>。研究表明,*NSP2* 是 PRRSV 基因组中最容易发生变异的基因<sup>[10]</sup>,高致病性 PRRSV(HP-PRRSV)的 *NSP2* 基因在第 482 位和第 533~561 位缺失 30 个不连续的氨基酸<sup>[11-14]</sup>,这些缺失可能与 2006 年中国出现的 HP-PRRSV 的毒力有关。基于这个原因,

*NSP2* 已经成为 PRRSV 流行病学调查和系统进化分析中的一个重要标记<sup>[14]</sup>。本研究首先采集疑似病料并进行病毒的分离鉴定;然后在 *NSP2* 基因序列测定与分析的基础上证实,所分离毒株为 PRRSV 变异株,将其命名为 XINX。研究结果为防控河南新乡地区 PRRS 的发生及进一步开展该病毒分子流行规律、遗传变异及疫苗研制等提供了理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 样品 试验样品为 2012 年采自河南新乡地区某猪场疑似 PRRS 的流产猪胎,样品置于 -70℃ 保存备用。

1.1.2 试剂 Marc-145 细胞,河南农业大学牧医工程学院传染病实验室保存;胎牛血清,购自北京四季青公司;Taq DNA 聚合酶、鼠源反转录酶(M-MLV)、RNA 酶抑制剂(Rnase Inhibitor)、dNTP、pMD18-T 载体,购自大连宝生物工程有限公司;DEPC,购自 Amresco 公司;Trizol Reagent,购自 Invitrogen 公司;琼脂糖,购自 Sigma 公司。

1.1.3 引物 参考 PRRSV VR2332 株(GenBank 登录号 EF536003)和 JXA1(GenBank 登录号 EF112445)*NSP2* 全基因序列,应用 Primer5.0 软件设计针对 *NSP2* 高变区的特异性引物,详见表 1。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 PRRSV *NSP2* 基因扩增引物

引物名称及序列(5'→3')	扩增区域	目的基因	片段长度(bp)
NSP2-F:ACCCTTCYGAAAGAGTRAG;NSP2-R:CCTCATATTCMGTCTGTGAGGAHGC	1388~2915	<i>NSP2</i>	1 528 左右

### 1.2 试验方法

1.2.1 病毒分离 取适量流产猪胎的脾、肺、淋巴结,剪碎后用 PBS 稀释后研磨,冻融 3 次,8 000 r/min 离心 10 min 后取上清,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装后于 -70℃ 保存备用。取单层铺满 90% 的 Marc-145 细胞,用上述处理的病料接种细胞,37℃ 吸附 1 h 后,加入含有 2% 胎牛血清的维持液,于 37℃ CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,若无典型细胞病变(CPE),则

收稿日期:2013-11-15

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:30500254)。

作者简介:周峰(1988—),男,河南固始人,硕士研究生,主要研究方向为分子病原学。E-mail:290679317@qq.com。

通信作者:杨 霞,副教授,研究方向为分子病原学。E-mail:yangxia66@163.com。