

# 猪瘟病毒持续感染对母猪繁殖性能及仔猪猪瘟疫苗免疫效力的影响

宁宜宝, 王 琴, 丘惠深, 张广川, 宋 立, 赵 耘, 王在时, 沈青春  
(中国兽医药品监察所农业部兽药创新与生物安全评价重点开放实验室, 北京 100081)

**摘 要:** 利用来源于同一猪场的 2 头猪瘟病毒(HCV)持续感染的带毒母猪及所产 35 头仔猪(包括 13 头死胎)和 6 头阴性对照猪, 观察母猪的胎儿发育成活状况、仔猪 HCV 带毒率及 HCV 垂直传播对仔猪猪瘟免疫化弱毒疫苗(HCLV)免疫效力的干扰作用, 同时进行水平传播试验和观察 HCV 持续感染对母猪繁殖功能的影响。结果表明: HCV 持续感染对其中 1 头母猪的胎儿发育和成活有明显影响, 而对另 1 头母猪的胎儿发育没有明显影响; HCV 持续感染母猪可经过胎盘垂直传播病毒给仔猪, 传播率达 45%~86%; 吃初乳和接种 HCLV 不能阻止带毒仔猪的死亡, 9 头带毒仔猪在 45 d 内死亡 4 头; 免疫 HCLV 不能使带毒仔猪产生免疫保护力, 5 头猪在强毒攻击后死亡 4 头; HCV 垂直传播的带毒猪可发生水平传播, 并引起 3/4 感染猪死亡; HCV 持续感染可引起母猪生殖系统病理变化, 导致繁殖障碍。

**关键词:** 猪瘟病毒; 持续感染; 仔猪成活; 免疫保护力

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文献编号: 0366-6964(2004)04-0449-05

猪瘟是一种高度接触性传染病, 被 OIE 列为 A 类传染病<sup>[1]</sup>, 由猪瘟病毒(hog cholera virus, HCV)持续感染导致的猪瘟疾病已日渐引起了人们的重视, N. F. Cheville、W. L. Mengeling、Van der Molen E. J. 和 Van Oirschot J. T. 等对低毒力猪瘟病毒的持续性感染猪的组织病理变化及对免疫系统的影响进行了研究, 试验证明 HCV 持续感染能给带毒猪的组织器官造成危害<sup>[4-6]</sup>。丘惠深等的研究表明用猪瘟免疫化弱毒株接种怀孕母猪不发生胎盘垂直传播<sup>[8]</sup>, 但猪瘟野毒感染母猪后导致胎儿木乃伊化或死亡已有报道<sup>[2]</sup>。虽然我国目前使用的猪瘟免疫化弱毒疫苗免疫猪后能有效地抵抗不同地区分离的 HCV 野毒的攻击<sup>[7]</sup>, 但近些年来, 猪瘟免疫失败的现象仍时有发生。本文利用 HCV 野毒持续感染的怀孕母猪研究猪瘟野毒对胎儿的发育、成活率、带毒情况及仔猪带毒对猪瘟疫苗免疫效力的影响, 从而揭示母猪持续感染 HCV 与猪瘟疫苗免疫失败的关系。

## 1 材料

### 1.1 试验猪

收稿日期: 2003-02-17

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(39893290-1-2); 国家“973”项目(G1999011904)

作者简介: 宁宜宝(1956-), 男, 汉族, 湖北大悟人, 研究员, 从事动物病毒学研究。

2 头成年经产怀孕母猪: 来源于北京顺义区某猪场, 产前 4 个月经荧光抗体(FA)检测为 HCV 感染阳性, 而猪细小病毒(PPV)、伪狂犬病毒(PRV)检测均为阴性, 母猪体格健壮, 无临床症状。实验仔猪 22 头: 以上两头 HCV 持续感染母猪所生, 经荧光抗体(FA)检测, 其中 HCV 垂直感染带毒仔猪 14 头, HCV 阴性仔猪为 8 头。木乃伊和死胎 13 头: 为以上两头 HCV 持续感染母猪所生。

6 头 60 日龄阴性对照猪: 来源于未经猪瘟疫苗免疫的健康母猪, 试验前经过 HCVFA 和兔体中和试验检测, 为猪瘟抗原抗体阴性。其中 4 头猪用于 HCV 水平传播试验, 2 头用作攻毒对照试验。

### 1.2 猪瘟免疫化弱毒疫苗(HCLV)

由广东省生物药厂提供。

### 1.3 HCV 石门强毒株

由本实验室保存。

### 1.4 检测试剂

HCV、PPV、PRV 单价荧光抗体及 ELISA 单克隆抗体诊断试剂, 均由本实验室制备。

## 2 方 法

### 2.1 试验分组

将两头 HCV 持续感染带毒母猪各自定为一组, 然后将各自所产仔猪再随机分成两组, 1 组免疫接种 HCLV, 1 组不免疫留作对照。试验期间每窝仔

猪和相应的母猪饲养在一起,以观察在同样条件下 HCLV 接种对带毒仔猪成活的影响。

## 2.2 HCV 病原抗体检测

2.2.1 母猪 HCV 抗原抗体检测 从产前 4 个月开始查到产后 1 个月,每个月从扁桃体采集活体组织用猪瘟荧光抗体作 HCV 抗原检测,采血分离血清用 ELISA 做 HCV 抗体检测,以测定带毒母猪扁桃体中 HCV 的动态变化和体内血清抗体情况。

2.2.2 仔猪 HCV 抗原抗体检测 产后零时和以后每隔 15 d 从扁桃体采集活体组织和血,直到试验结束,分别做抗原抗体检测;死胎直接采取扁桃体和 6 种内脏器官组织做 HCV 抗原检测,以观察带毒仔猪的带毒和抗体产生情况。

2.2.3 水平传播试验 用 HCV 抗体阴性健康对照猪与带毒猪混合饲养,每周采集扁桃体用直接荧光抗体法做抗原检测,直到试验结束,以证实带毒仔猪与阴性对照猪混合饲养是否发生水平传播。

## 2.3 疫苗接种和强毒攻击

将产下的所有存活仔猪在零时以产子顺序,隔头组合分成两组,1 组以 2 头份/头 HCLV 做零时免疫,1 组不免疫留作对照,混合饲养,观察 63 d 后将所有试验存活猪连同阴性对照猪一起攻击 HCV 石门系强毒,1 ml/头肌肉注射,观察 21 d,每天测温、记录临床症状和死亡情况,并将死亡猪解剖,观察器官病变和采集各器官组织做 HCV 检测,研究疫苗接种对带毒仔猪的免疫保护情况。

## 2.4 母猪生殖状况的观察

观察两头母猪产仔断奶后的发情情况,在发情时人工授精配种,将其中 1 头屡配不孕的猪剖杀,观察生殖系统的病理变化并采样用免疫组织化学和 HCVFA 方法检测 HCV。对另 1 头已配种成功的母猪观察下一代的产仔存活及仔猪的带毒情况。

## 3 结果

### 3.1 怀孕母猪扁桃体中猪瘟病毒带毒情况测定结果

产前 4 个月到产后 1 个月每月分别从扁桃体采样用直接免疫荧光法作猪瘟病毒检测,结果表明:怀孕期间,两头持续感染带毒母猪扁桃体中的病毒含量均呈动态变化趋势,在产仔 1 个月前扁桃体中 HCV 浓度一直都很高,荧光抗体检测全呈强阳性反

应,但在接近产仔时,扁桃体中 HCV 含量显著降低,1 头抗原检测阴性,1 头荧光反应极弱,产后 1 个月两头母猪扁桃体中 HCV 又同时回到原来的高浓度水平。

### 3.2 HCV 持续感染母猪所产胎儿的存活及扁桃体中 HCV 的带毒结果

分别记录两头母猪所产胎儿的状况(包括存活和个体大小),并在吸初乳前采取扁桃体组织,检测 HCV,结果为 42 号母猪所产 11 头仔猪全部存活,胎儿发育正常,其中 5 头扁桃体携带 HCV,而 244 号母猪所产 14 头猪中有 3 头死胎,仔猪个体瘦小,精神欠佳,其中从 12 头胎儿的扁桃体中查出了 HCV。结果显示:HCV 持续感染的母猪能将野毒经胎盘垂直传播给胎儿。虽然都为带毒母猪,但猪瘟野毒的垂直传播强度有差异,对胎儿的发育影响、致病力也有差异。这可能与野毒株的毒力、带毒时间及母猪机体免疫状况有关。

### 3.3 HCLV 免疫接种对仔猪成活率和免疫保护力的影响结果

产仔时按仔猪产出顺序隔头进行零时 HCLV 免疫接种,另一半不免疫作为对照,然后观察 63 d,记录仔猪的发病死亡情况,第 63 天攻石门强毒,观察 21 d,每天测温,记录死亡猪头数,结果见表 1。结果表明:免疫接种后 63d 内有 7 头带毒仔猪死亡,其中 4 头接种过 HCV 疫苗,死亡时间除 1 头是在出生后第 7 周外,其余 6 头均在 4 周以内,不带毒仔猪全部健活。经解剖所有猪都呈典型猪瘟的病理变化,证明 HCV 垂直传播可导致仔猪死亡;疫苗接种不能阻止带毒仔猪的死亡,虽经零时疫苗免疫,但 9 头带毒仔猪中有 4 头在 60 d 前死于猪瘟;剩下的 5 头免疫仔猪在攻强毒后的 3 周内又死了 4 头,仅 1 头猪存活;尽管都是带毒母猪,但其所产仔猪的成活率、胎儿的发育状况及免疫保护力相差很大。

### 3.4 仔猪扁桃体中 HCV 持续带毒变化结果

产后零时和以后每隔 15 d 从扁桃体采集活体组织,直到 60 d 强毒攻击,攻毒后每周采样 1 次,持续到试验结束,分别做抗原检测;死胎直接采取扁桃体和 6 种内脏器官组织做 HCV 抗原检测。同时记录带毒猪的存活状况及临床症状。结果见表 2。

表 1 疫苗接种对带毒仔猪成活率及免疫效力的影响

Table 1 Influence on survival and immune efficacy of piglets with HCV by HCLV inoculation

母猪号 No. of sows	组别 Groups of piglets	仔猪带毒 状况 With/without HCV	疫苗接种 仔猪数 Number of vaccinated piglets	不接种疫苗 仔猪数 Number of unvaccinated piglets	攻毒前 63 d 死亡数 Number of died piglets before challenge	攻毒猪数 Number of challenged piglets	体温升高 猪数 Number of piglets with rised temperature	死亡数 Number of died piglets	存活 Number of survival piglets
42	1	带毒 With HCV	3		1	2		1	1
		不带毒 Without HCV	3			3	1		3
	2	带毒 With HCV		2		2	2		2
		不带毒 Without HCV		3		3	1		3
244	1	带毒 With HCV	6		3	3		3	
		不带毒 Without HCV							
	2	带毒 With HCV		3	3				
		不带毒 Without HCV		2		2		2	
对照 Control	不带毒 Without HCV		2		2		2		

表 2 攻毒前后仔猪扁桃腺中 HCV 的变化和存活结果

Table 2 The results of HCV assay in tonsil and survival condition of piglets before and after challenge

组别 Groups	仔猪 号 No.	免疫状况 Vaccined/ unvaccinated	攻毒前 60 d HCV 检测结果 60 days before challenge					攻毒后 HCV 检测结果 days after challenge				保护状况 Protected condition
			0 d	15 d	30 d	45 d	60d	0 d	7 d	14 d	21 d	
42	1	免疫 Vaccinated	+	+++	++	+++	-	-	++++	+++	++++	存活 Survived
	2	不免疫 Unvaccinated	-	-	+++	++++	-	-	++++	++++	+++	存活 Survived
	3	免疫 Vaccinated	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	存活 Survived
	4	不免疫 Unvaccinated	-	-	-	-	-	-	-	++++	++++	存活 Survived
	5	免疫 Vaccinated	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	存活 Survived
	6	不免疫 Unvaccinated	-	-	-	-	-	-	-	-	-	存活 Survived
	7	免疫 Vaccinated	+++	死亡 died								存活 Survived
	8	不免疫 Unvaccinated	++	++	+++	+++	++++	++++	+++	-	+++	存活 Survived
	9	免疫 Vaccinated	++	+++	++++	+++	++++	++++	+++	死亡 died		
	10	不免疫 Unvaccinated	+++	++	+++	++++	++++	++++	++++	-	++++	存活 Survived
	11	免疫 Vaccinated	-	-	-	-	-	-	-	++++	+++	存活 Survived
244	21	免疫 Vaccinated	++++	++	-		死亡 Died					
	22	不免疫 Unvaccinated	-	-	-	-	-	-	-	死亡 Died		
	23	免疫 Vaccinated	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	死亡 Died		
	24	不免疫 Unvaccinated	+++	死亡 died								
	25	免疫 Vaccinated	+++	+++	+++	+++	死亡 Died					
	26	不免疫 Unvaccinated	+++	死亡 Died								
	27	免疫 Vaccinated	++++	+++	死亡 Died							
	28	不免疫 Unvaccinated	+++	++	死亡 Died							
	29	免疫 Vaccinated	+++	+++	+++		+++	+++	+++	死亡 Died		
	30	不免疫 Unvaccinated	-	-	-		-	-	死亡 Died			
	31	免疫 Vaccinated	+++	++	++++		++	+	-	死亡 Died		
	32	木乃伊 Mummy	+++									
	33	死胎 Stillbirth	+++									
	34	死胎 Stillbirth	/									
对照 Control	1						-	+++	死亡 Died			
	2						-	++++	死亡 Died			

从表2结果可以看出:42号猪所产11头仔猪中,刚出生时5头猪HCV阳性,其余6头阴性猪在混合饲养后仅有1头变为阳性,然而在攻强毒后14d内5头阴性猪中4头全部成了HCV阳性带毒猪,说明HCV持续感染母猪所产不带毒仔猪在短期内,由于母源抗体和疫苗免疫的作用,虽在强毒攻击后能存活下来,但它不能像正常健康免疫猪那样有效清除体内人工感染的猪瘟强毒,这种强毒长期在猪体内存在,对猪本身及对周围环境都造成了潜在的危害,如果用其作为后备母猪,则危害更大,244号母猪所产11头存活仔猪攻毒前已死6头,其余5头在攻毒后也全部死亡。死亡猪均呈典型猪瘟病变,值得一提的是其中有5头猪病死前扁桃体中并未查到HCV,而有两头从出生到死的70多天,即使是在强毒攻击后也未从扁桃体中查到HCV,但这些猪死后从内脏器官中却都查到了HCV。

### 3.5 带毒仔猪与非带毒仔猪间的水平传播

①将每窝带毒、不带毒仔猪混群饲养,每隔1周从扁桃体采样作HCV检测,同时观察发病死亡情况;②在每窝仔猪中放入2头HCV抗体阴性健康猪混合饲养,每周采样作HCV检测,观察体温变化和死亡情况。结果表明:同窝仔猪间不发生HCV的水平传播,在混合饲养60d内,8头阴性猪中仅1头扁桃体出现带毒,但无临床症状,然而非同窝间可发生水平传播并引起感染猪死亡,分别饲养在两组中的4头阴性对照猪,3头死亡,1头出现严重的临床症状。这可能与同窝仔猪母源抗体有关;尽管HCV持续感染带毒母猪不显临床症状,但其所带野毒可垂直传播并引起仔猪和正常健康猪发病死亡。

### 3.6 HCV持续感染对母猪繁殖功能的影响

观察两头母猪产仔后发情状况,并进行人工授精,结果244号母猪在第2次发情后受孕,在正常临产期产下10头死胎,其中3头为木乃伊,经HCV-FA检查全为阳性。而42号母猪发情3次,人工授精3次均告失败,剖杀后观察子宫、输卵管病理变化并采取各器官作HCVFA和HCV免疫组化检测,结果卵巢的卵泡全部结石化,各器官组织均为HCVFA阳性。表明HCV持续感染可造成母猪生殖系统病理变化;HCV垂直传播对怀孕母猪胎儿发育和致病力的影响依胎次的增多而呈加重的趋势。

## 4 讨论与结论

猪瘟免疫失败是一个复杂的问题,本研究表明

持续感染母猪经胎盘垂直传播HCV给仔猪是造成免疫失败的一个重要因素。两头母猪的HCV垂直传播率高达45%~100%,这种垂直传播的HCV,不仅在母体内可影响胎儿发育乃至引起胎儿死亡,形成木乃伊,而且在出生后还可引起仔猪死亡,这种带毒仔猪无论是吃初乳,还是免疫接种疫苗,均不能阻止因HCV感染而引起的死亡,疫苗免疫接种对两头母猪中一头的所产仔有一定的保护作用,而同一批疫苗,同样的免疫剂量和免疫方法对另一头母猪所产仔猪则一点保护作用也没有,其原因可能与母猪母源抗体水平的高低、HCV毒力的强弱有关。244号母猪所产仔猪除了3头死胎外,存活下来的仔猪个体普遍偏小,精神状况欠佳,所以死亡率也明显较高,另一头母猪所产仔猪全部健活,发育正常,其仔猪带毒率也低一些,因而存活状况就好得多,免疫保护率也高得多。尽管两头母猪均来自同一猪场,年龄相差不大,体格均很健壮,但所产仔猪的状况相差很大。试验表明:虽然猪体处于良好的免疫状态,但这种持续感染的HCV可在猪体内长期存在,虽然这些病毒在母猪身上不表现临床症状,但垂直传播可引起胎儿及仔猪的死亡。经定期采样检测证明:这种持续感染的HCV可在母猪体内维持750d以上,有可能是终身的,在仔猪体内也可以长期存在。通常情况下,弱毒疫苗株接种10d后很难在扁桃体查到疫苗毒,大量的试验证明接种了猪瘟疫苗的健康猪在强毒攻击后扁桃体中一般也检查不到强毒抗原<sup>[3]</sup>。试验证明HCV持续感染尽管在母猪不表现临床症状,但可造成生殖系统,特别是卵巢产生病理变化,使卵泡结石化,降低或失去排卵功能,对繁殖有严重影响。这种HCV对胎儿的致病作用随胎次增加而加强,本实验室两次试验结果均说明了这一问题。本试验还证明HCV垂直传播给仔猪后可发生水平传播,造成健康敏感猪的感染和死亡,值得一提的是,同窝出生不带毒的仔猪与带毒的仔猪混合饲养60d内没有发生水平传播,这些仔猪既从体内检测不到HCV,也无临床症状,这可能与这些仔猪在哺乳期内获得较高水平母源抗体有关,至于母源抗体消失后是否发生水平传播还有待进一步研究。

以上结果表明:HCV持续感染母猪造成的垂直传播是造成仔猪木乃伊、死胎及仔猪死亡的主要原因之一,加之它的水平传播性,还会造成其它猪的感染。一旦种猪场有HCV持续感染种猪存在,那么那里时刻都有猪瘟流行的危险,因此要根除猪瘟就必

须从源头抓起, 保证母猪不带 HCV 强毒, 一旦发现带毒种猪就应将其及时淘汰, 并进行彻底消毒。

造成这种 HCV 强毒持续感染的原因目前还不十分清楚, 本实验室的试验结果初步证实: 免疫接种猪反复多次感染 HCV 及 HCV、PPV、PRV 和 PRRSV 混合感染均可造成 HCV 在体内的滞留而造成持续感染。另外, 疫苗接种产生的中和抗体在体外对不同野毒株的中和作用表现出了很大差异, 耐受性高的毒株在血清 4 倍稀释时才能中和, 耐受性低的毒株用 320 倍稀释的抗血清就能将其中和。如果在体内也是这样, 那么在机体处于亚免疫状态的情况下, 耐受性强的毒株就有可能侵入机体潜伏下来造成持续感染。另外机体的免疫状态低下也可能是造成持续感染发生的重要原因。

猪瘟疫的预防控制是一项复杂的工程, 除了疫苗质量、免疫接种程序外, HCV 持续感染造成的垂直传播也是引起猪瘟疫免疫失败的一个重要原因, 因此要预防猪瘟疫, 就必须严格把握种猪不受 HCV 感染这一关, 同时做好其他疾病的控制。

#### 参考文献:

- [1] 世界动物卫生组织, 著. 农业部畜牧兽医局, 译. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 185~ 196.
- [2] 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 主译. 猪病学 [M]. 第八版. 北京: 中国农业大学出版社. 157~ 172.
- [3] Biront P, Leunen J I, Vendeputte J. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenged oronasally with a virulent strain of classical swine fever virus [J]. *Vet Microbiol*, 1987, 14: 105~ 113.
- [4] Cheville N F, Mengeling W L. The pathogenesis of chronic hog cholera (swine fever): Histologic, immunofluorescent, and electron microscopic studies [J]. *Laboratory Invest* 1969, 20: 261~ 274.
- [5] Van der Molen E J, Van Oirschot J T. Congenital persistent swine fever (hog cholera): I. Pathomorphological lesions in lymphoid tissues, kidney and adrenal [J]. *Zentralblatt für Veterinärmed (B)*, 1981, 28: 89~ 101
- [6] Van Oirschot J T. Persistent and inapparent infections with swine fever of low virulence: Their effects on the immune system [D]. State Univ Utrecht, 1980.
- [7] 丘惠深, 郎洪武, 王在时. 猪瘟疫病毒野外离物的研究 IV 猪瘟疫化弱毒疫苗与我国近年猪瘟疫野毒的免疫保护相关性实验 [A]. 中国兽药监察所研究报告汇编 [C], 1995~ 1999, 14: 50~ 53.
- [8] 丘惠深, 郎洪武, 王在时, 等. 猪瘟疫病毒野外离物的研究 V. 用猪瘟疫化弱毒疫苗免疫妊娠母猪的试验 [A]. 中国兽药监察所研究报告汇编 [C], 1995~ 1999, 14: 54~ 56.

## Influence of Persistent HCV Infection on Sows Reproduction Ability and Piglets HCLV Immune Efficacy

NING Yi-bao, WANG Qin, QIU Hui-shen, ZHANG Guang-chuan,

SONG Li, ZHAO Yun, WANG Zai-shi, SHEN Qing-chun

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Two sows with field hog cholera virus (HCV), thirty-five piglets stem from the two sows and six HCV negative controls were studied. Observation of development of fetuses, survival rate of piglets, HCV vertical transfer rate, and influence of immune protection efficacy of hog cholera lapinization virus (HCLV) in pigs with HCV were carried out in the laboratory. Meanwhile, HCV horizontal transfer between pigs and influence on ability of sows' reproduction by HCV persistent infection were observed. The results indicated: Foetuses' development of one sow was affected obviously by persistent HCV infection. Among fourteen piglets, three were stillbirths, all piglets were weak. Surprisingly, foetuses' development of the other sow was not affected. Sows with persistent infection can transfer HCV to piglets through placenta, vertical transfer rate of one sow was 45% (5/11), the other was 86% (12/14). Mortality of piglets couldn't be blocked by forecolostrum sucking and vaccine vaccination. The HCV infected piglets couldn't produce enough immune protection efficacy by HCLV vaccination. Four of five vaccinated piglets died after challenge of virulent strain of HCV. HCV can spread horizontally by piglets with virus, and made health pig infected, all four HCV antibody negative pigs that feeded in same pen with HCV carrying piglets were infected, three of them died; Persistent infection of HCV can lead to disability of reproduction.

**Key words:** HCV; persistent infection; survival of piglets; immune protection