

王媛, 刘榜, 官凯锋, 等. HP-PRRSV 人工感染后猪 4 种血液指标的变化规律及与病毒载量的关系[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(5): 62-67.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.05.009

HP-PRRSV 人工感染后猪 4 种血液指标的变化规律 及与病毒载量的关系

王媛^{1,3}, 刘榜^{1,2,3,5}, 官凯锋^{1,3}, 徐航^{1,3},
苏秋菊^{1,3}, 王小康^{1,3}, 周翔^{1,3,5}, 张庆德^{1,4}

1. 华中农业大学动物科学技术学院, 武汉 430070; 2. 生猪健康养殖省部共建协同创新中心, 武汉 430070;
3. 华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;
4. 华中农业大学实验动物中心, 武汉 430070; 5. 湖北省地方猪品种改良工程技术研究中心, 武汉 430070

摘要 为研究高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, HP-PRRSV)感染后猪血液指标的变化及与病毒载量的关系, 以大白猪×通城猪高代横交群体为对象, 选用 72 头平均 11 周龄的健康仔猪进行 HP-PRRSV 人工感染, 在感染前和感染后第 4、7、11、14、21、28 天和第 35 天进行白细胞计数、淋巴细胞百分比、单核细胞计数、粒细胞百分比 4 种血常规指标的测定, 并与病毒载量进行相关分析。结果显示: (1) 感染与感染前相比, 感染第 4、7 天的白细胞计数、淋巴细胞百分比、单核细胞计数均极显著降低, 粒细胞百分比极显著升高; 感染第 11、14 天的淋巴细胞百分比显著降低, 粒细胞百分比显著升高, 其他时间点均无显著变化。 (2) 抗病组和易感组的淋巴细胞百分比和粒细胞百分比在感染第 7 天存在显著差异, 其中抗病组的淋巴细胞百分比显著高于易感组($P < 0.05$), 粒细胞百分比显著低于易感组($P < 0.05$)。 (3) 4 种血液指标与病毒载量之间均存在中度相关($P < 0.01$)。以上结果表明, 血液指标可以考虑作为 PRRS 早期抗病性的指示性状。

关键词 HP-PRRSV; 人工感染; 大白猪×通城猪高代横交群体; 血液指标; 病毒载量; 指示性状

中图分类号 S 828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)05-0062-06

高致病性猪繁殖与呼吸综合征(highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, HP-PRRS)是一种以母猪的繁殖障碍和仔猪的呼吸道疾病为典型特征的传染病^[1], 其病原是高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, HP-PRRSV)。HP-PRRSV 感染后首先在肺和上呼吸道的巨噬细胞^[2]和树突状细胞中复制^[3], 6~12 h 后引发病毒血症, 病程可持续 1~3 周^[4]。在感染前期(0~7 d), 病毒对机体天然免疫的抑制效应大于激活效应^[5], 主要表现为白细胞数^[6]、淋巴细胞百分比^[7]和单核细胞数^[8]等血常规指标下降。病毒感染使巨噬细胞、胸腺 T 淋巴细胞凋亡和胸腺萎缩, 导致 T 淋巴细胞数量下降^[9]。单核细胞在病毒感染后, 从外周血迁移至不同组织分

化成巨噬细胞^[10], 配合组织完成巨噬细胞的定居, 共同介导炎症反应和修复受损组织^[11], 表现为单核细胞数量下降^[8]。此外, 粒细胞作为急性炎症的标志, 机体受创后被募集到损伤部位^[12]; 病毒感染后, IL-1、TNF- α 等炎症因子促进骨髓中的干细胞增殖分化为粒细胞, 使得血液中的粒细胞数量增多^[13]。在感染后期(7~21 d), 机体通过激发免疫应答来实现对病毒的清除, 各血液指标均逐渐恢复至正常^[9]。因此, 分析感染期血液指标的变化, 对于预测病毒感染后机体状况具有重要意义。

笔者所在课题组前期利用对 HP-PRRSV 抗病力强的通城猪与易感的大白猪为对象进行人工感染, 发现感染后通城猪的白细胞计数和淋巴细胞百分比均显著高于大白猪^[14]。本研究以大白猪×通城猪高代横交群体为对象, 通过 PRRSV 人工感染,

收稿日期: 2020-03-03

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31930104); 武汉市应用基础前沿项目(2018020401011306)

王媛, 硕士研究生. 研究方向: 动物遗传育种. E-mail: 859814241@qq.com

通信作者: 张庆德, 高级工程师. 研究方向: 动物健康养殖. E-mail: qdzhang@mail.hzau.edu.cn

研究感染后 4 种血液指标(白细胞计数、淋巴细胞百分比、单核细胞计数、粒细胞百分比)的变化规律以及这些血液指标与血液中病毒载量之间的相关性以及与抗病性的关系,旨在为探讨血液指标是否可作为抗病性的指示性状提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 血液采集

对 72 头试验猪(同高国丽等^[15]文中一致)在感染前和感染后第 4、7、11、14、21、28、35 天进行前腔静脉采血(约 1 mL 抗凝血),立即检测或 4℃ 保存待检。

1.2 血常规检测

使用南京迈瑞公司 BC-2800Vet 兽用全自动血液细胞分析仪检测白细胞计数(WBC)、淋巴细胞百分比(LYMR)、单核细胞计数(MON)、粒细胞百分比(GRAR),后将检测结果录入 Excel 表中进行统计分析。

1.3 血液指标的差异显著性分析

对感染前和感染后第 4、7、11、14、21、28、35 天 4 种血液指标进行测定和计算(平均数±标准差),分析血液指标在感染前后的变化规律;对各时间点血液指标的统计分析采用配对 *t* 检验进行差异显著性检验。

根据感染第 14 天存活与否将试验猪分为抗病和易感 2 组,14 d 存活的为抗病个体,作为抗病组,共有 36 头;感染后 14 d 内死亡的为易感个体,作为易感组,共有 36 头^[15]。对抗病和易感 2 组感染前

后同一时间点的血液指标统计分析采用非配对 *t* 检验进行差异显著性检验。

使用 GraphPadPrism6.0 软件进行数据处理和分析,以 $P<0.05$ 表示差异显著、 $P<0.01$ 表示差异极显著。

1.4 血液指标与病毒载量的相关分析

血清病毒载量结果另文发表^[15],本研究对每头猪不同感染时间点检测的病毒载量和血液指标进行相关分析,使用 R 软件计算 Pearson 相关系数,并进行显著性检验, $P<0.05$ 代表显著相关。

2 结果与分析

2.1 4 种血液指标在 HP-PRRSV 感染后的变化

通过比较感染前后 4 种血液指标的测定结果(表 1),发现白细胞计数在感染第 4 天极显著降低($P<0.01$),第 4~11 天逐渐升高,第 11~35 天波动升高至感染前的水平;淋巴细胞百分比在感染第 4 天极显著降低($P<0.01$),第 4~14 天逐渐升高,但均显著低于感染前水平;单核细胞计数在感染第 4 天极显著降低($P<0.01$),第 4~11 天逐渐升高;粒细胞百分比在感染第 4 天极显著升高至最大值($P<0.01$),4~14 d 逐渐降低且均显著高于感染前。以上结果显示:试验猪在 PRRSV 感染前期(0~4 d),各血液指标均产生波动,白细胞、淋巴细胞、单核细胞、粒细胞均在感染第 4 天达极值;在感染后期(4~35 d)宿主产生一系列的免疫应答来实现对病毒的清除,从而使机体逐渐恢复正常。

表 1 4 种血液指标不同感染期的情况

Table 1 The 4 hematological parameters from different time points

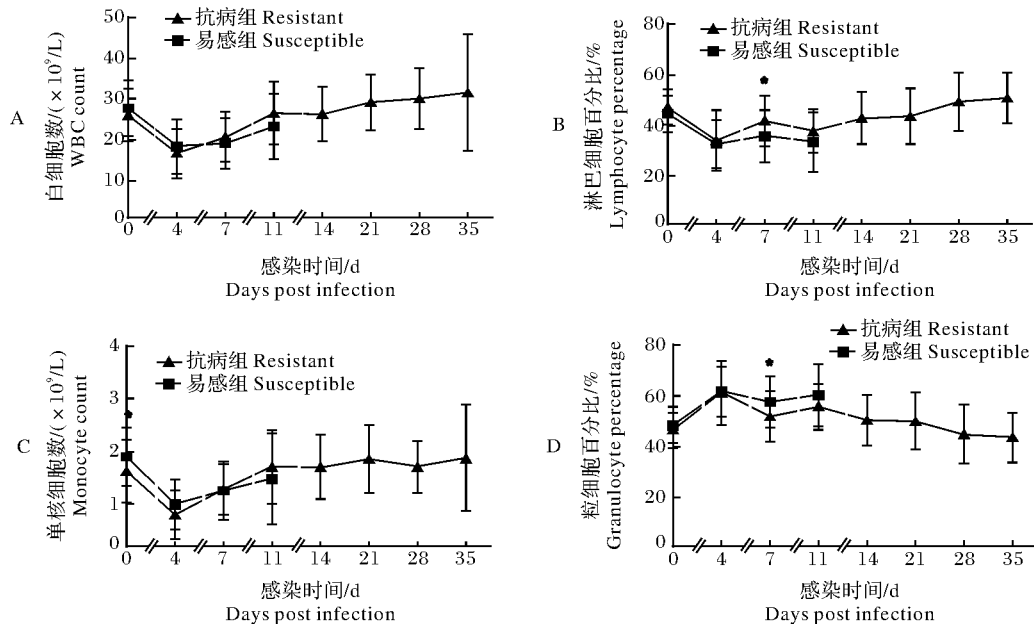
血液指标 Hematological parameters	感染时间/d Days post infection							
	0	4	7	11	14	21	28	35
白细胞数/($\times 10^9/L$)	26.93±	17.60±	19.97±	25.51±	26.22±	29.13±	30.24±	31.75±
WBC count	6.67	6.40 **	6.19 **	7.85	6.51	6.85	7.18	13.98
淋巴细胞百分比/%	45.81±	33.38±	38.90±	36.37±	42.97±	43.60±	48.23±	50.10±
Lymphocyte percentage	7.09	10.78 **	10.45 **	9.78 **	10.00 *	10.90	11.57	10.22
单核细胞数/($\times 10^9/L$)	1.77±	0.90±	1.27±	1.64±	1.70±	1.85±	1.73±	1.87±
Monocyte count	0.59	0.47 **	0.52 **	0.76	0.60	0.63	0.48	0.99
粒细胞百分比/%	47.57±	61.54±	54.74±	57.28±	50.52±	50.04±	46.08±	44.48±
Granulocyte percentage	7.06	11.18 **	10.45 **	10.17 **	9.82 *	11.25	11.87	10.11

注 Note: * : $P<0.05$; * * : $P<0.01$.

2.2 血液指标在抗病和易感个体之间的差异

通过比较易感和抗病 2 组同一时间点 4 种血液指标的测定结果,发现抗病组的白细胞计数、单核细胞计数均从感染第 7 天开始高于易感组(图 1A,图 1C);淋巴细胞百分比在感染第 7 天显著高于易感

组($P<0.05$)(图 1B);粒细胞百分比在感染第 7 天显著低于易感组($P<0.05$)(图 1D)。表明抗病与易感组在感染 PRRSV 后,机体对病毒的应答程度不同,且从感染第 7 天开始,抗病组能激发更有利的免疫应答来应对病毒感染。



* : $P < 0.05$; * * : $P < 0.01$. A: 白细胞计数 WBC count; B: 淋巴细胞百分比 Lymphocyte percentage; C: 单核细胞计数 Monocyte count; D: 粒细胞百分比 Granulocyte percentage.

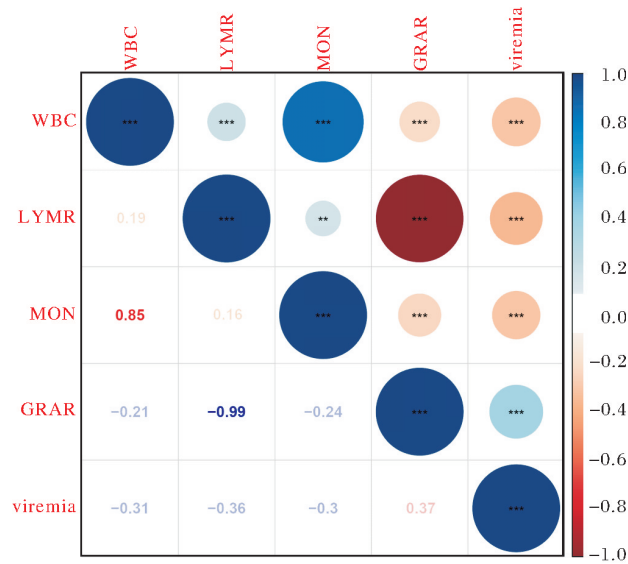
图 1 易感和抗病组的 4 种血液指标变化情况

Fig.1 The 4 hematological parameters of resistant and susceptible

2.3 血液指标与病毒载量的相关性分析

通过对 72 个个体在感染期的 4 种血液指标与病毒载量进行相关分析,结果显示(图 2),白细胞计数与病毒载量呈极显著负相关($r = -0.31$, $P < 0.001$),淋巴细胞百分比与病毒载量呈极显著负相关($r = -0.36$, $P < 0.001$),单核细胞计数与病

毒载量呈极显著负相关($r = -0.3$, $P < 0.001$),粒细胞百分比与病毒载量呈极显著正相关($r = 0.37$, $P < 0.001$)。相关分析结果显示 4 种血液指标与病毒载量之间均存在中度相关,表明 PRRSV 感染后不同血液指标的免疫应答及对病毒清除的影响不同。



** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$.

图 2 4 种血液指标与病毒载量的相关性分析

Fig.2 The correlations of 4 hematological parameters with viremia

3 讨论

3.1 HP-PRRSV 感染前后 4 种血液指标的变化

血常规检测可用于机体的状况分析和诊断。PRRSV 感染后的不同时期,机体对病毒的免疫应答不同,检测到的血液指标变化也不同^[16]。白细胞主要参与机体的防御反应。HP-PRRSV 感染早期(0~7 d)白细胞数目下降^[17],是由于病毒感染后宿主免疫系统被抑制、淋巴细胞数目的减少所导致。本研究选取白细胞类的 4 种血液指标进行分析,其中白细胞计数、淋巴细胞百分比均在 HP-PRRSV 感染第 4 天降至最低值(表 1),说明病毒感染第 4 天宿主的胸腺萎缩较严重,淋巴细胞凋亡情况较为严重;单核细胞计数在感染后第 4 天降低至最低值(表 1),表明病毒感染早期,单核细胞从外周血迁移至组织分化为巨噬细胞,使得单核细胞数量减少,而后随着免疫系统的激活而逐渐恢复至正常值。粒细胞百分比在感染后第 4 天时达最高值,4~11 d 逐渐降低(表 1),表明 PRRSV 感染早期机体的炎症反应较为强烈。

3.2 HP-PRRSV 感染后 4 种血液指标与抗病性的关系

机体对 PRRS 的抗病性具有品种差异^[18]。笔者所在课题组前期研究发现 HP-PRRSV 感染后通城猪的白细胞数、淋巴细胞百分比均高于大白猪^[14]。本研究以大白猪×通城猪高代横交群体为对象,根据存活力情况将其分为抗病组和易感组,分析发现抗病组和易感组的淋巴细胞百分比、粒细胞百分比均在感染第 7 天存在极显著差异(图 1),且易感个体的淋巴细胞百分比极显著低于抗病个体,粒细胞百分比极显著高于抗病个体,这可能与易感个体在 PRRSV 感染后淋巴细胞凋亡和机体的炎症较严重有关。此外,易感组和抗病组的单核细胞数在感染前存在显著差异(图 1C),表明不同个体单核细胞的分化程度不同,且抗病个体单核细胞的分化程度更高。

3.3 HP-PRRSV 感染后 4 种血液指标与病毒载量的相关性

有研究表明小鼠的不同血液指标与 H1N1 感染的病毒载量存在不同程度的相关,其中白细胞计数与病毒载量存在弱相关,淋巴细胞百分比、单核细

胞计数、粒细胞百分比与病毒载量均存在中度相关^[19]。淋巴细胞在机体先天性和获得性免疫应答中均发挥着非常重要的作用,包括自然杀伤细胞(NK 细胞)、T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞。PRRSV 感染前期(0~7 d),病毒对机体天然免疫的抑制效应大于激活效应,淋巴细胞数目下降;后期机体主要通过 T 淋巴细胞介导的细胞免疫,以及其释放的细胞因子调节的其他免疫细胞的参与,来实现对病原的清除^[1,20]。单核细胞通过血管壁从外周血迁移至不同组织分化为不同类型的巨噬细胞,主要通过吞噬和消化损伤或凋亡的细胞、细胞碎片,促进组织损伤的修复^[21];粒细胞会迅速在肺部募集,完成对病毒的杀伤作用后凋亡,而凋亡后的粒细胞被巨噬细胞吞噬,并诱导抗炎因子的释放,促进炎症反应消退,使机体恢复到正常^[22]。病毒载量在感染第 4 天升至最高,第 7 天持续峰值,而后逐渐下降^[15],本研究将白细胞计数、淋巴细胞百分比、单核细胞计数、粒细胞百分比与病毒载量进行相关分析,结果显示 4 种血液指标与病毒载量均存在中度相关,表明单个血液指标的影响有限,机体可能是通过多项血液指标的共同免疫应答来实现对病毒的清除。淋巴细胞百分比、粒细胞百分比与病毒载量存在较高的相关,易感组和抗病组的这 2 种血液指标在感染第 7 天均存在显著差异,抗病组的淋巴细胞百分比高于易感组、粒细胞百分比低于易感组,这些结果表明感染第 7 天淋巴细胞百分比、粒细胞百分比可以考虑作为 PRRS 抗病性的指示性状,但仍需要扩大群体进一步研究。

参考文献 References

- [1] HAN J, ZHOU L, GE X, et al. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. [J]. *Veterinary microbiology*, 2017, 209: 30-47.
- [2] LAWSON S R, ROSSOW K D, COLLINS J E, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection [J]. *Virus research*, 1997, 51(2): 105-113.
- [3] ZHOU Y J, HAO X F, TIAN Z J, et al. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2008, 55(3/4): 152-164.

- [4] PARK J Y, KIM H S, SEO S H. Characterization of interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine dendritic cells[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18 (10): 1709-1716.
- [5] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. Annual review of animal biosciences, 2016, 4(1): 129-154.
- [6] LI Z, HE Y, XU X, et al. Pathological and immunological characteristics of piglets infected experimentally with a HP-PRRSV TJ strain[J/OL]. BMC veterinary research, 2016, 12(1): 230 [2020-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27733150>. DOI: 10.1186/s12917-016-0854-x.
- [7] RENSON P, ROSE N, DIMNA M L, et al. Dynamic changes in bronchoalveolar macrophages and cytokines during infection of pigs with a highly or low pathogenic genotype 1 PRRSV strain [J/OL]. Veterinary research, 2017, 48(1): 15 [2020-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28241868>. DOI: 10.1186/s13567-017-0420-y.
- [8] FERRARI L, CANELLI E, DE ANGELIS E, et al. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 1 (PRRSV-1) strongly modulates cellular innate and adaptive immune subsets upon experimental infection[J]. Veterinary microbiology, 2018, 216: 85-92.
- [9] ZHANG L, ZHOU L, GE X, et al. The Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection suppresses Th17 cells response *in vivo* [J]. Veterinary microbiology, 2016, 189: 75-85.
- [10] GINHOUX F, JUNG S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis[J]. Nature reviews immunology, 2014, 14(6): 392-404.
- [11] KRATOFIL R M, KUBES P, DENISET J F. Monocyte conversion during inflammation and injury[J/OL]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2017, 37(1): 35-42 [2020-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27765768>. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308198.
- [12] NATHAN C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities[J]. Nature reviews immunology, 2006, 6(3): 173-182.
- [13] GEERING B, STOECKLE C, SÉBASTIEN C, et al. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils[J]. Trends in immunology, 2013, 34(8): 398-409.
- [14] LIANG W, LI Z, WANG P, et al. Differences of immune responses between Tongcheng (Chinese local breed) and Large White pigs after artificial infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virus research, 2016, 215: 84-93.
- [15] 高国丽, 孟向阁, 官凯锋, 等. HP-PRRSV 人工感染后血清病毒载量和体重增长的变化规律[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39 (5): 56-61. GAO G L, MENG X G, GUAN K F, et al. Changes of viremia and weight gain after HP-PRRSV artificial infection [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39 (5): 56-61 (in Chinese with English abstract).
- [16] CRYSTAL L, FERNANDO A, MICHAEL P, et al. Innate and adaptive immunity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Veterinary immunology and immunopathology, 2015, 167(1/2): 1-14.
- [17] KICKA R, AMARAL A F, CORTES L M, et al. The T-Cell response to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J/OL]. Viruses, 2019, 11(9): 796 [2020-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31470568>. DOI: 10.3390/v11090796.
- [18] 刘榜. 通城猪抗蓝耳病的遗传基础研究进展[J]. 现代牧业, 2017, 1(1): 9-13. LIU B. Research progress on the genetic basis of Tongcheng pigs against PRRS [J]. Modern animal husbandry, 2017, 1(1): 9-13 (in Chinese with English abstract).
- [19] MATTHIAS P, KLAUS S, ESTHER W, et al. Hematological parameters in the early phase of influenza A virus infection in differentially susceptible inbred mouse strains [J/OL]. BMC research notes, 2015, 8(1): 225 [2020-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26047817>. DOI: 10.1186/s13104-015-1195-8.
- [20] MICHAEL C R, MICHAEL P M, LINDA D, et al. Mechanisms of adaptive immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J/OL]. Viruses, 2017, 9(6): 148 [2020-03-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28608816>. DOI: 10.3390/v9060148.
- [21] GEISSMANN F, MANZ M G, JUNG S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells[J]. Science, 2010, 327(5966): 656-661.
- [22] MALLARY C G. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation [J]. Immunological reviews, 2016, 273 (1): 357-370.

Change of four hematological parameters and relationship with viremia after artificial infection with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus

WANG Yuan^{1,3}, LIU Bang^{1,2,3,5}, GUAN Kaifeng^{1,3}, XU Hang^{1,3},
SU Qiuju^{1,3}, WANG Xiaokang^{1,3}, ZHOU Xiang^{1,3,5}, ZHANG Qingde^{1,4}

1.College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China;

2.The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Wuhan 430070, China;

3.Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of
Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

4.Experimental Animal Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

5.The Engineering Technology Research Center of Hubei Province Local
Pig Breed Improvement, Wuhan 430070, China

Abstract The highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is the most important infectious disease of pigs. The host would respond to PRRSV by regulating different immune responses at different days post infection (DPI). The routine blood testing is the most intuitive way to detect changes of blood cell in the body. Therefore, it is necessary to detect and analyze hematological parameters for predicting the process of the disease. To investigate the changes of hematological parameters after infection with HR-PRRSV, 72 Large White $\times$ Tongcheng advanced generation inter-cross piglets with an average age of 11 weeks, were used for the artificial HP-PRRSV infection experiment. The white blood cell (WBC) count, the lymphocyte percentage, the monocyte count and the granulocyte percentage were determined at 0, 4, 7, 11, 14, 21, 28, 35 DPI, then association analysis of them with viremia were carried on. The results showed that when compared to 0 DPI, the WBC count, lymphocyte percentage and monocyte count were significantly reduced, and the granulocyte percentage was significantly increased at both 4 DPI and 7 DPI. The lymphocyte percentage was significantly reduced and the granulocyte percentage was significantly increased at both 11 DPI and 14 DPI, but there were no significant differences at the other DPI. Groups of piglets with PRRS-resistant and PRRS-susceptible were set on the basis of viremia and survive rate. It was showed that the lymphocyte and the granulocyte percentage were significantly different at 7 DPI between groups. The lymphocyte percentage of the PRRS-resistant group was significantly higher ($P < 0.05$), and the granulocyte percentage was significantly lower ($P < 0.05$) than the PRRS-susceptible group. For other DPI, as well as other hematological parameters, there were no significant differences. Furthermore, correlation analysis showed that the hematological parameters and viremia at all DPI in piglets were moderately correlated ($P < 0.01$). The results demonstrated that the lymphocyte percentage and granulocyte percentage could be used as indicators of resistance to PRRS. Our current study provides basic data for further research on the changes of hematological parameters after PRRSV infection and relationship with viremia.

Keywords HP-PRRSV; artificial infection; Large White $\times$ Tongcheng advanced generation inter-cross population; hematological parameters; viremia; indicative trait

(责任编辑:边书京)