

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒 17-ZJ-HZ 毒株的分离鉴定与分子流行病学分析

巴少波, 石林, 李群景, 刘正奎, 陈琳, 王晓杜\*, 宋厚辉

(浙江农林大学 动物科技学院, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 杭州某猪场断奶仔猪群出现高热、呼吸困难等症状, 疑似猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 感染, 3 头病猪肺脏病变样本送本实验室检测, 通过 RT-PCR 方法检测其病原核酸。肺脏匀浆液无菌处理接种到 MARC-145 细胞, 细胞病变观察、Western-blot、间接免疫荧光等方法验证 PRRSV 病毒分离情况; RT-PCR 方法分五段扩增获得全长病毒基因组序列, 采用 MEGA 等软件分析该毒株的核苷酸序列以及 GP5、NSP2 氨基酸序列; 分离病毒接种 3 日龄 PRRSV 阴性仔猪, 评价该病毒的毒力。结果表明: 该场送检样品为 PRRSV 阳性; 成功分离得到 17-ZJ-HZ 病毒; 获得 15 325 bp 的 PRRSV 全基因组序列。序列分析表明, 该毒株与经典北美株的 NSP2 存在典型的 29 + 1 个氨基酸的缺失, 且进化分析归于 HP-PRRSV 亚群。攻毒 60 h 后猪只出现典型的 PRRSV 临床症状和病理变化, 以上结果表明该毒株为高致病性 PRRSV (highly pathogenic PRRSV, HP-PRRSV) 的北美株。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征; 分离鉴定; 序列分析; 分子流行病学

中图分类号: S855

文献标志码: A

文章编号: 1004-1524(2018)08-1303-09

### Isolation, identification and molecular epidemiological analysis of 17-ZJ-HZ strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

BA Shaobo, SHI Lin, LI Qunjing, LIU Zhengkui, CHEN Lin, WANG Xiaodu\*, SONG Houhui

(College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

**Abstract:** The weaned piglets from a farm in Hangzhou had high fever, expiratory dyspnea and other symptoms, who were suspected infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). The samples of pathological lung from three infected pigs were sent to laboratory testing. The nucleic acids of pathogen were detected by real-time PCR. The lung homogenate was sterilized and inoculated into MARC-145 cells, and the virus replication was confirmed by cytopathic effect observation (CPE), Western-blot and indirect immunofluorescence (IFA). The full-length sequence of the viral genome was obtained by segmental RT-PCR and biological sequencing. The nucleotide sequences of the strain were analyzed by MEGA and other softwares. The molecular epidemiology of GP5 and NSP2 amino acid sequences of this virus were obtained. The piglets of three days were infected with PRRSV to evaluate the virulence. The results showed that the virus was successfully isolated and named as 17-ZJ-HZ. The whole genome se-

收稿日期: 2017-10-30

基金项目: 浙江省科技重点研发计划 (2018C02028); 浙江省自然科学基金 (LY16C180001); 金华市重点研发计划 (2014-2-003, 2016-2-013); 广州市科技计划项目 (201508020039); 浙江省公益性应用研究项目 (2016C32065)

作者简介: 巴少波 (1991—), 男, 湖北天门人, 硕士研究生, 研究方向为预防兽医学。E-mail: 839381907@qq.com

\* 通信作者, 王晓杜, E-mail: xdwang@zafu.edu.cn

quences of PRRSV was obtained, and the length of its sequence was 15 325 bp. The results of sequence analysis showed that, the NSP2 of this virus had deletions of typical 29 + 1 amino acids compared with the classical strain. The results of phylogenetic analysis indicated that 17-ZJ-HZ was attributed to subgroup of HP-PRRSV, and the PRRSV(17-ZJ-HZ) caused typical clinic symptoms and lesions after infected piglets 60 h. In brief, the strain was North American strain of highly pathogenic PRRSV.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus; isolation and identification; sequence analysis; molecular epidemiological analysis

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又名蓝耳病, 其病原体为猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)<sup>[1]</sup>。不同年龄、品种和性别的猪只均可感染 PRRS, 其临床特征为母猪流产、死胎、弱胎、木乃伊胎及各年龄阶段猪呼吸困难、败血症、发育迟缓和高死亡率等<sup>[2]</sup>。PRRSV 基因组长度为 15 kb 左右, 具有 5' 和 3' 非编码区, 有 9 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 自 5' 到 3' 端依次为 ORF1a、ORF1b、ORF2 ~ ORF7。PRRSV 的基因型主要分为欧洲型和美洲型, 2 个基因型的同源性在 60% 左右<sup>[3-4]</sup>。在 PRRSV 中, ORF1a 和 ORF1b 基因编码非结构蛋白 (non-structural protein, NSP), 参与病毒基因组转录、复制; ORF2-ORF7 编码病毒的结构蛋白, 依次编码囊膜蛋白 GP2、GP3、GP4、GP5、膜基质蛋白 M 和核衣壳蛋白 N<sup>[5-7]</sup>。目前, 全国各猪场一直都有 PRRSV 流行, 最主要原因是其病毒变异大和疫苗不能有效防控该病, 核苷酸变异存在于整个病毒基因组中, 尤其以 NSP2 基因变异最大, 不同基因型的毒株 NSP2 核苷酸序列同源性仅为 40% 左右, 同型的毒株之间 NSP2 核苷酸序列同源性 80% 左右, 因此大多数科学家认为 NSP2 为 PRRSV 变异的主要遗传标记<sup>[8-9]</sup>。尽管有研究表明, NSP2 基因的 1 + 29 个氨基酸缺失与 HP-PRRSV 的高致病性无直接相关, 但 NSP2 的该缺失仍然认为是 HP-PRRSV 的标志<sup>[10]</sup>, 而 NSP2 基因高频变异的潜在意义更加值得关注<sup>[11]</sup>。GP5 作为 PRRSV 的主要抗原糖蛋白, 其氨基酸在美洲型和欧洲型之间仅有 51% ~ 55% 的同源性。GP5 蛋白含有 6 个抗原决定簇, 其中决定簇 B 是最主要的中和抗原表位, 可以诱导中和抗体, 因此 GP5 常作为 PRRSV 的疫苗设计<sup>万方数据</sup>的候选对象, 用于开发新型疫

苗<sup>[12-13]</sup>。目前控制 PRRSV 疫情疫苗有弱毒苗和灭活苗两种, 虽然大规模发病有所控制, 但是 PRRSV 的地方性流行和散发所带来的危害仍不容忽视, 中等致病性 PRRSV (NADC30) 已成为国内的主要流行毒株<sup>[14-15]</sup>。随着免疫压力和猪群持续带毒, PRRSV 基因组还在持续变异, 因此定期对 PRRSV 流行情况进行监测, 将为养殖场针对性的免疫预防措施提供科学依据, 也有利于预测 PRRSV 将来发病的趋势。近期浙江省某猪场保育猪群出现高热、呼吸困难和死亡等临床症状; 本研究对该场送检病死猪的病料样本, 开展了病原学检测、病毒分离和鉴定, 确诊该病为高致病性的 PRRSV 引起; 通过观察攻毒猪只的临床表现, 确定该毒株属于高毒力毒株; 同时本研究调查了近几年华东地区 PRRSV 的分子流行病学特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、病料样品及猪只来源

MARC-145 细胞由本实验室保存, 病料样品采集自浙江省杭州市某发病猪场, 初生仔猪购于临安某猪场。

### 1.2 主要试剂

核酸提取试剂盒、cDNA 合成试剂盒及 KOD-PCR 试剂盒购自东洋纺生物科技有限公司 (TOYOBO); 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (中国株) 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒来自浙江多亚隆医药科技有限公司, RNA 提取试剂盒购自宝日生物技术有限公司 (TAKABA), PRRSV 特异性 N 抗体由浙江大学动物预防医学所实验室惠赠。HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体购自于 BBI 公司, FITC 标记羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Invitrogen 公司。

### 1.3 样品核酸提取及 RT-PCR 检测

用 Trizol 法提取病毒核酸, 依据猪繁殖与呼吸综合征病毒(中国株)实时荧光定量 PCR 检测试剂盒方法, 进行一步法荧光定量 RT-PCR 检测。

### 1.4 病毒的分离

PRRSV 阳性的肺脏组织经研磨后,  $12\ 000\ r\ min^{-1}$  离心 5 min,  $0.22\ \mu m$  微孔滤膜过滤, 取 500  $\mu L$  过滤液感染单层 MARC-145 细胞,  $37\ ^\circ C$ 、5% 的  $CO_2$  细胞培养箱中孵育 1 h, 随后弃去上清, 加入含有 2% FBS 的 DMEM 培养液继续培养, 24 h 后观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE)。出现 80% CPE 时, 收取上清病毒液, 同时收集细胞沉淀, 病毒上清液按照前述方法传代至 P4 代, 冻存于  $-80\ ^\circ C$  备用。

### 1.5 Western-blot 病毒的鉴定

取 PRRSV P4 代病毒感染 MARC-145 细胞 48 h, 收集细胞沉淀, 加入细胞裂解液 (1% NP40) 充分裂解细胞沉淀, 超声波进行超声, 获取细胞总蛋白液。以 PRRSV N 蛋白的特异性单抗为一抗, 进行 Western-blot 验证,  $\beta$ -actin 作为内参对照。

### 1.6 间接免疫荧光 (IFA) 病毒的鉴定

将 PRRSV 毒株 P4 代病毒感染 MARC-145 细胞, 48 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,

0.5% Triton X-100 打孔 20 min, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, PRRSV N 蛋白特异性单抗 (1:400) 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 3 min, FITC 标签的 goat-anti-mouse 的二抗 (1:500) 孵育 45 min, TBST 洗涤 5 次, 每次 3 min, DAPI 对细胞核染色 5 min, 荧光显微镜观察结果。

### 1.7 PRRSV 全基因组序列扩增

按照反转录试剂盒说明书, 进行反转录合成 cDNA, 根据 NCBI 上已知 PRRSV 全长进行分段设计引物, 一共 5 段分别为 1-3228、3228-5002、5002-8798、8798-12071、12071-15327。然后以如下 PCR 体系及反应条件进行分段扩增。体系分配如下:  $31\ \mu L$  的灭菌  $ddH_2O$ ,  $5\ \mu L$   $10\times$  KOD buffer,  $5\ \mu L$  dNTPs,  $3\ \mu L$   $MgSO_4$ ,  $1\ \mu L$  KOD Plus Neo, 引物  $1.5\ \mu L$ ,  $2\ \mu L$  cDNA, 反应条件为  $94\ ^\circ C$  1 min;  $98\ ^\circ C$  10 s,  $60\ ^\circ C$  30 s,  $68\ ^\circ C$  2 min, 35 个循环;  $68\ ^\circ C$  7 min。PCR 扩增的 5 段序列分别命名为 788、790、792、794、796, PCR 产物送生物公司进行测序。然后以测序成功的 5 段序列为模板, 设计扩增 5 个片段连接处的引物, 分别命名为 788-790、790-792、792-794、794-796 (表 1)。

### 1.8 生物信息学分析

对序列结果用 Vector NTI 软件进行拼接, 获得 17-ZJ-HZ 全基因组核苷酸序列, 同时用 Vector

表 1 RT-PCR 全基因组扩增各种引物

Table 1 The sets of primers for amplification of whole virus genome by RT-PCR

名称 Name	序列 Sequence	扩增片段大小 Amplified fragment length/bp
788-F	GAGCAGCTGATGACGTATAGGTGTGG	3 228
788-R	GCGGCATGCTTCTTTTCTTTTGGAG	
790-F	GCTGCATGCCTCAGCATCATGCGTGAG	1 774
790-R	GCGTCTAGACGTGCAAAGAGAGCCAGG	
792-F	GCGTCTAGATTGTGCATCTCCCAACAC	3 796
792-R	GCGATCGATCGCAGGACGCAAGATCAG	
794-F	GTCATCGATCCACACCTGCAATTGTCC	3 273
794-R	GCGGATATCAACAATGGACACCAGAAAC	
796-F	CGCGATATCATCATATTTTTGGCCATT	3 256
796-R	TAGCCTGCAGGTTTTTTTAATTACGGCC	
788-790-F	AAAACATGGGCATCCTGGAG	369
788-790-R	CTCAGACACACCATTCAAGGTACG	
790-792-F	CTCATTTGCTGCATTGCATGTTG	375
790-792-R	AGCGCAACCAACAAGGAAAC	
792-794-F	CAAACCTGTTACCCTTGTACCCTC	397
792-794-R	GTTTGACACAGAGGTAATCGGGTC	
794-796-F	CTAATGCCACCAGCATGAGGT	342
794-796-R	CCAGGTGGGAATGTCTACCT	

表2 PRRSV 毒株名称及其来源

Table 2 The strains and sources of PRRSV

序号 No.	名称 Name	地域 Area	时间 Year	登录号 GenBank accession number
1	BJ-4	中国北京 Beijing, China	2001	AF331831
2	VR2332	美国 USA	2003	AY150564
3	INGELVACATC	疫苗株 Vaccine strain	—	EF532801.1
4	CH-1a	中国北京 Beijing, China	2001	AY032626
5	GD3	中国广东 Guangdong, China	2007	EU109503
6	CH2004	中国甘肃 Gansu, China	2004	Eu880439.2
7	EUOPRRS	美国 USA	1999	Ay366525.1
8	LV	荷兰 Poland	1991	M96262
9	HuB2	中国湖北 Hubei, China	2007	EF112446
10	HeB1	中国河北 Hebei, China	2007	EF112447
11	HuN4	中国湖南 Hunan, China	2006	EF635006
12	JAX1	中国江西 Jiangxi, China	2007	EF112445
13	TJ	中国天津 Tianjin, China	2012	EU860248
14	15JX1	中国江西 Jiangxi, China	2016	KX815419.1
15	15JX2	中国江西 Jiangxi, China	2016	KX815420.1
16	15JX3	中国江西 Jiangxi, China	2016	KX815421.1
17	15ZJ1	中国浙江 Zhejiang, China	2016	KX815432.1
18	15ZJ2	中国浙江 Zhejiang, China	2016	KX815433.1
19	15ZJ3	中国浙江 Zhejiang, China	2016	KX815434.1
20	FJ1402	中国福建 Fujian, China	2016	KX169161.1
21	FJM4	中国福建 Fujian, China	2014	KY412888.1
22	FJWQ16	中国福建 Fujian, China	2016	KX758249.1
23	FJXS15	中国福建 Fujian, China	2016	KX758250.1
24	NADC30	美国 USA	2008	JN654459.1
25	JX12	中国浙江 Zhejiang, China	2012	—

JX12 为本实验室 2012 年分离株。

JX12 was isolated by our labrotary in 2012.

NTI 软件对病毒基因组进行核苷酸序列及其推导氨基酸序列的比对分析,用 MEGA7 软件对病毒进行遗传进化分析。

### 1.9 17-ZJ-HZ 毒株致病性分析

将 3 日龄 PRRSV 抗体阴性的 6 只仔猪随机分为两组,第一组为攻毒组 3 头,通过滴鼻的方式接种 PRRSV 17-ZJ-HZ 株,接种剂量为  $10^6$  TCID<sub>50</sub>·头<sup>-1</sup>;第二组为对照组 3 头,接种相同体积不含病毒的 DMEM。攻毒后,每天观察仔猪症状,当猪出现典型 PRRSV 临床症状时,解剖各组仔猪,检查各脏器病理变化,取肺脏正常和病变组织,以 PRRSV 的 N 蛋白单克隆抗体为检测抗体,送生物公司进行免疫组化试验。

## 2 结果与分析

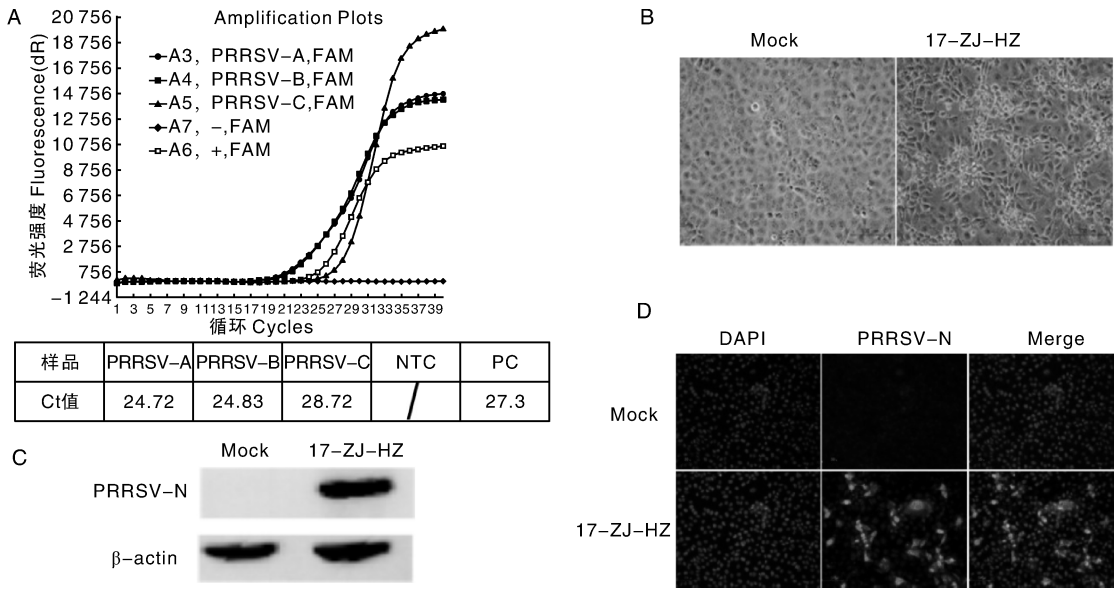
### 2.1 临床样品的检测

送检的 3 个临床样品采用荧光定量 RT-PCR 进行检测,结果表明 3 个阳性样本的通道中有明

显的扩增曲线(图 1-A),其 Ct 值分别为 24.72、24.83、28.72,依据试剂盒判定标准(Ct 值小于 32 则为阳性),所以 3 个样品均判定为阳性。

### 2.2 PRRSV 的分离鉴定

选取其中一个肺脏组织样品进行匀浆处理,0.22 μm 滤膜过滤组织匀浆液,滤液接种单层 MARC-145 细胞。感染 48 h 后,显微镜下观察细胞状况,Mock 组 MARC-145 细胞生长良好,而感染组细胞皱缩呈索状、脱落、细胞核浓缩聚集在一起(图 1-B)。感染 72 h 后收集上清,作为种毒保存,连续传 3 代,第 4 代时进行噬斑纯化(结果未显示),纯化分离的病毒命名为 PRRSV 17-ZJ-HZ 株。该病毒感染 MARC-145,Western-blot 检测细胞沉淀中 PRRSV-N 蛋白的表达,结果表明病毒感染组有明显的表达条带(图 1-C);间接免疫荧光检测结果表明,病毒感染组有明显绿色荧光信号,说明病毒的 PRRSV-N 蛋白得到表达(图 1-D)。以上多个实验证明,本研究分离获得一株 PRRSV 病毒,为开展后续研究奠定了基础。



A, 临床送检样品检测; B, PRRSV 感染 MARC-145 细胞病变观察; C, Western-blot 检测 PRRSV-N 蛋白表达; D, 间接免疫荧光检测 PRRSV-N 蛋白表达。

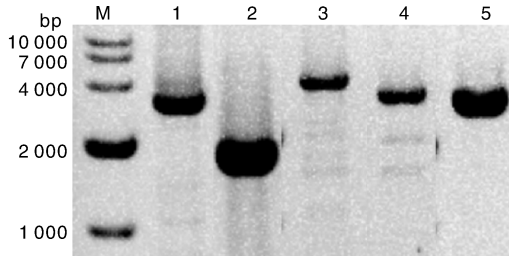
A, Detection of clinic samples by RT-PCR; B, Cytopathic effect of PRRSV infected MARC-145 cells; C, Expression of PRRSV-N by Western-blot; D, Expression of PRRSV-N by IFA.

图 1 PRRSV 的分离鉴定

Fig. 1 Isolation and identification of PRRSV

### 2.3 PRRSV 分离株基因组全长片段扩增

提取 PRRSV 感染的 MARC-145 总 RNA, 反转录合成 cDNA 后, 利用 PRRSV 全基因组扩增引物(表 1), 进行分段扩增(图 2), 所获得片段经纯化后送生物公司测序。由于 PCR 产物测序不能获得全长片段, 所以再以测序结果为模板设计引物(表 1), 扩增相邻两段之间的序列, 然后送生物



M, 10 kb DNA 分子量标准; 1~6, 788、790、792、794、796 扩增片段。

M, 10 kb DNA marker; 1-6, Amplified fragment of 788, 790, 792, 794, 796.

图 2 PRRSV 基因组分段扩增结果

Fig. 2 Results of amplification of PRRSV genome by RT-PCR

公司进行测序。把两次测序的结果进行拼接, 获得 17-ZJ-HZ 株全基因长度为 15 325 bp, 提交给 GenBank 数据库, 获得 GenBank 号为 MF770574。

### 2.4 PRRSV 分离株的生物信息学分析

利用生物信息学软件 (MegAlign) 分析本毒株的 Nsp2 氨基酸序列, 与其他 25 株 PRRSV 毒株(表 2) 序列比较, 结果表明 17-ZJ-HZ 株与高致病性毒株 HUB2、HUN4、TJ 等的 NSP2 蛋白氨基酸序列的关键结构域几乎一样(图 3), 在 482、533-561 aa 位置存在 1+29 个氨基酸的缺失, 指示 17-ZJ-HZ 为高致病性毒株, 而且近几年浙江及其周边的福建、江西等地流行的 15ZJ2、15ZJ3、FJXS15、JX12、15JX2、15JX3 等毒株也存在该位点 1+29 个氨基酸的缺失(图 3), 说明华东地区高致病性毒株仍然存在一定的流行。同时, 近几年浙江及周边地区还存在 15ZJ1、15JX1、FJM4、FJ1406 等缺失特征不同毒株的流行, 这些毒株在 330-441 aa 位置存在 111 个氨基酸的缺失, 533-561 aa 存在不连续的 20 个氨基酸的缺失, 这类毒株 Nsp2 的缺失特征与 2008 年美国分离的 NADC30

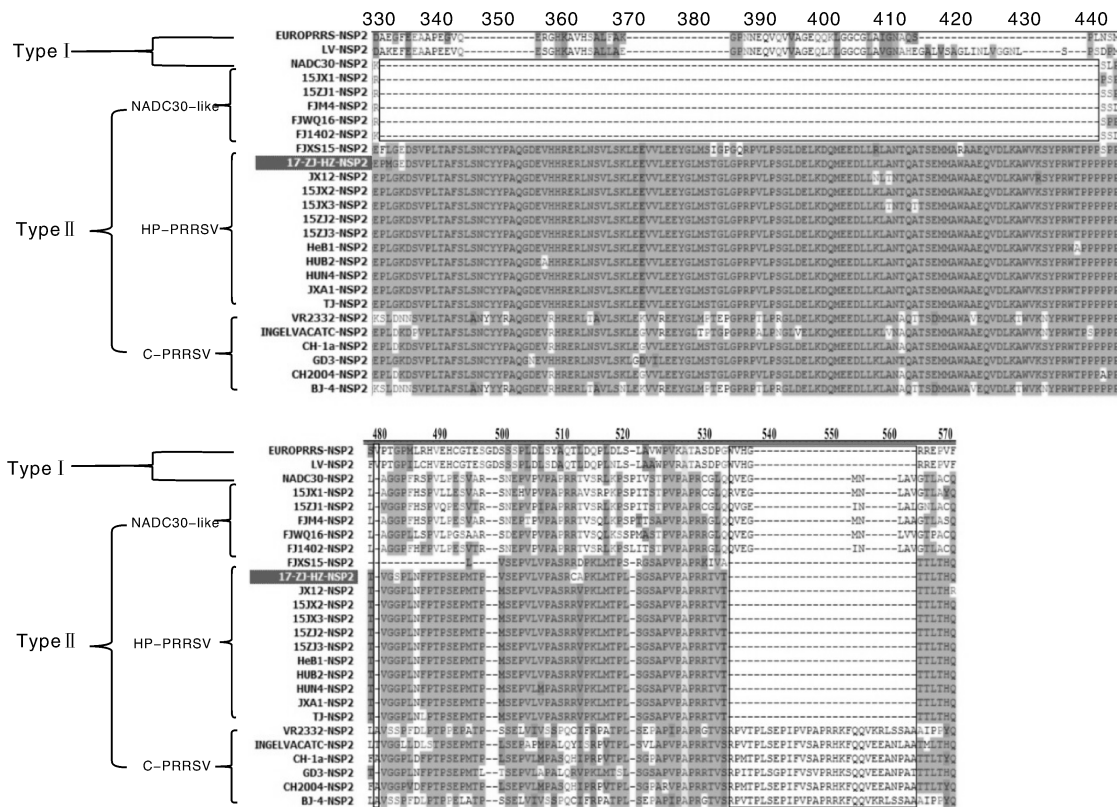


图3 PRRSV的Nsp2氨基酸序列比对分析

Fig.3 Amino acid sequence alignment analysis of PRRSV Nsp2

株相符,说明该地区存在NADC30-like毒株流行。

基于ORF1a、GP5氨基酸序列及病毒全基因组核苷酸序列分别绘制遗传进化树,进化分析表明,25个毒株分两个基因型(欧洲型和北美型),其中基因I型包含经典毒株、高致病性毒株和NADC30-like毒株,17-ZJ-HZ毒株归属于高致病性PRRSV。基于ORF1a进化分析表明17-ZJ-HZ与15ZJ2、15ZJ3、FJXS15、JX12、15JX2、15JX3、HUB2、HUN4、TJ毒株在一个亚群(图4-A),但是独立成为一个新的小分支,它们同属于高致病性毒株,BJ4、CH2004、CH1a等聚在一个亚群,同属于经典毒株,GD3毒株的分子遗传进化位于经典毒株CH1a和HUB2、HUN4、TJ等强变异毒株之间,FJ1406、FJM4、15ZJ1、15JX1等毒株聚在一个亚群,同属于NADC30-like毒株。基于GP5氨基酸序列进化分析表明(图4-B),17-ZJ-HZ单独一个小分支,与GD3相比,17-ZJ-HZ与HUB2、HUN4、TJ毒株亲缘关系更远一些,更靠近经典毒株,强毒株FJXS15株则被分在NADC30-like簇中。全基因组核苷酸进化分析结果显示,17-ZJ-

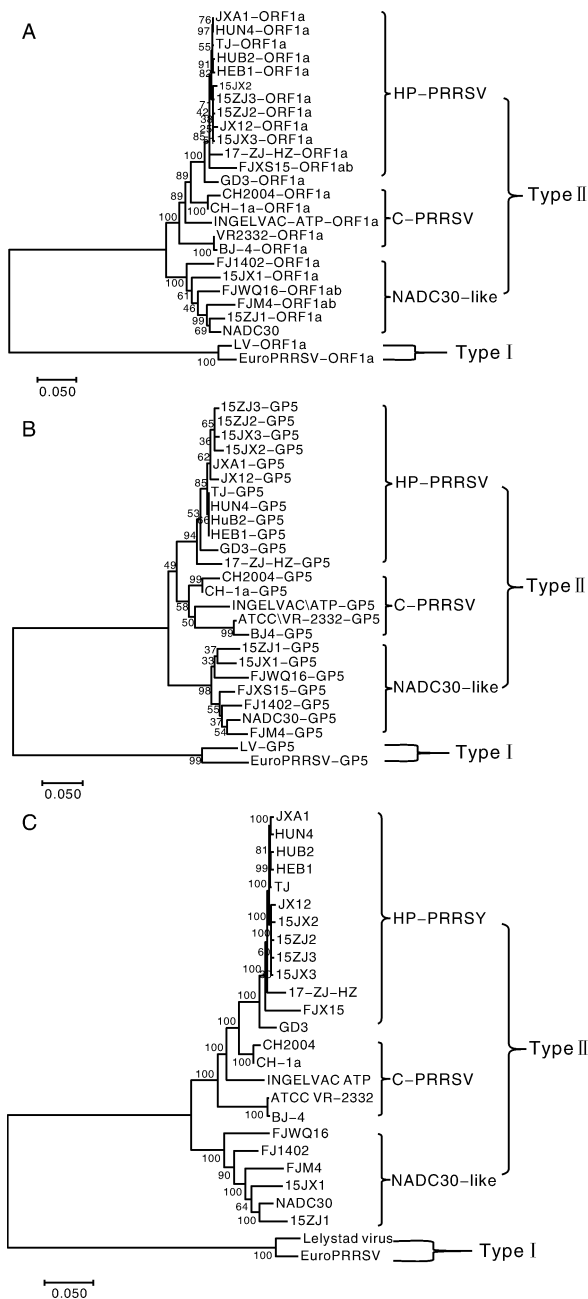
HZ靠近GD3毒株,说明该毒株遗传进化位于经典毒株和强毒株之间。

### 2.5 17-ZJ-HZ毒株的致病性

猪群在感染初期无明显临床症状,攻毒36 h后,攻毒组猪群开始出现食欲减退、精神沉郁、体温在39.5~41.0℃波动,呈现稽留热等症状。当攻毒达60 h时,病猪开始表现为眼结膜炎、眼睑水肿,剧烈喘气、站立不稳,呈俯卧状态,腹部皮肤发红、耳部发绀(图5-A),出现典型的HP-PRRSV症状。解剖发现,病猪的肺脏水肿、充血(图5-B)。免疫组化试验结果显示,感染组肺泡轮廓消失,单核细胞浸润,感染灶周边有大量感染颗粒(棕黄色),PRRSV的N蛋白高表达,出现PRRSV典型病灶(图5-D)。

## 3 讨论

自PRRS暴发以来,高致病性毒株给我国乃至全世界养猪业带来了巨大的经济损失。目前临床上主要靠预防的手段来控制该病,但仍然存在



A、B、C 分别为基于 ORF1a、GP5 氨基酸序列和 PRRSV 病毒全基因组核苷酸序列的遗传进化分析。

A, B, C showed the genetic evolution analysis based on amino acids of ORF1a, GP5 and nucleotide of PRRSV genome.

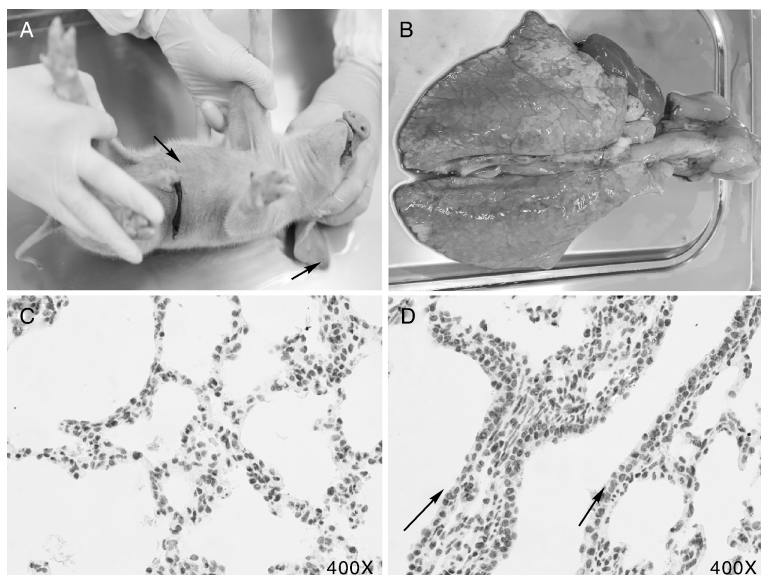
图 4 PRRSV 的遗传进化分析

Fig. 4 Genetic evolution analysis of PRRSV

很多问题, 主要原因是一方面没有专门针对 PRRS 的药物, 另一方面疫苗的防控存在灭活苗抗体针对性不强、弱毒苗容易变异和毒力返强的问题。由于 PRRSV 毒株变异快, 疫苗种类较多,

虽然在预防 PRRS 的发生中发挥了一定的作用, 但是野毒株仍然不断出现, 对猪场危害还继续存在。不同毒株疫苗的交叉和普遍使用, 极易造成 PRRSV 毒株的变异, 特别是弱毒疫苗株会出现毒力返强, 野毒株和疫苗株通常在猪群中共存, 病毒在猪群中的重组产生新的 PRRSV, 因此 PRRS 防控难度非常大<sup>[16-17]</sup>。调查 PRRSV 的遗传进化规律, 有利于掌握 PRRSV 变异趋势, 为新型有效疫苗研发和防控奠定基础。近十年, PRRSV 在不断地进行变异。2006 年我国暴发了 Nsp2 蛋白的 482-533-561 aa 位存在的 1+29 aa 缺失的 HP-PRRSV<sup>[18]</sup>; 2008 年美国分离了 1 株在 NSP2 蛋白的 322-432、482 和 504-522 aa 区域存在 111、1、19 个氨基酸缺失的新毒株 NADC30<sup>[19]</sup>; 2013—2014 年 PRRSV 毒株流行调查分析中发现, 我国也存在 NADC30-like 毒株的流行<sup>[20-21]</sup>, 河南地区以高致病性 PRRSV 流行为主, 同源性只有 83% 左右, 差异明显<sup>[22]</sup>; 2013 年在我国河南省某猪场, 从疑似 PRRSV 症状的发病猪群病料中分离得到 PRRSV 毒株(HeNan-A10), 其在 GP2 蛋白的 247-256 aa 位存在 10 aa 的缺失<sup>[23]</sup>; 2017 年广东报道一例新的重组病毒, 由两个低致病性的病毒重组, 其致病性较强<sup>[24]</sup>。由此可见, PRRSV 在自然条件下, 不管是否免疫都还在不断地进行变异, 因此监测 PRRSV 的流行和进化趋势, 对于科学预防和控制该病是非常重要的。

本研究所采集的临床样品来自浙江省某猪场中正在发生高热、呼吸困难和死亡等临床症状的保育猪群, 该猪场一直使用经典 PRRSV 弱毒疫苗株进行预防接种, 从未使用过 HP-PRRSV 弱毒疫苗。检测结果却显示 3 份临床样品均呈现 HP-PRRSV 阳性, 感染 MARC-145 细胞分离病毒时, 观察到 24 h 细胞出现皱缩、变圆、裂解等典型 PRRSV 细胞病变, 这说明该场存在高致病性毒株的流行, 随后实验也证明所分离的 PRRSV 毒株与 HP-PRRSV 的分子遗传特征一致; PRRSV 接种 3 日龄仔猪, 60 h 后仔猪出现典型的 PRRSV 临床症状, 更进一步证实该毒株属于 PRRSV 强毒株。浙江及周边地区所报道的 PRRSV 病毒(15ZJ2、15ZJ3、FJXS15、JX12、15JX2、15JX3 等毒株) 分析表明, 其遗传特征与 HP-PRRSV 一致, 说明华东地区一直都存在 HP-PRRSV 毒株的流行, 同时该



A, PRRSV 感染猪的典型症状; B, PRRSV 感染肺脏病变; C, 未感染 PRRSV 组的肺脏组织免疫组化; D, PRRSV 感染组的肺脏组织免疫组化。

A, Typical symptoms of PRRSV infection in piglets; B, Pulmonary lesions caused by PRRSV infection; C, Pulmonary tissues from uninfected PRRSV groups were immunohistochemically stained; D, Pulmonary tissues from infected PRRSV groups were immunohistochemically stained.

图5 PRRSV(17-ZJ-HZ)致病性分析结果

Fig.5 The results of PRRSV (17-ZJ-HZ) pathogenicity analysis

地区还存在 NADC30-like (15ZJ1、15JX1、FJM4、FJ1406 毒株) 毒株流行。本实验室前期分离 JX12 毒株遗传距离更靠近典型的高致病性毒株 (HUB2、HUN4、TJ 等), 而本研究所分离的 17-ZJ-HZ 遗传距离相对更靠近 NADC30-like, 以上结果表明, 随着猪群不断长期免疫, PRRSV 随免疫压力增强, 流行毒株通过不断变异, 毒力发生多种多样的变化, 其详细机制需要进一步深入研究。

参考文献 (References):

[1] DEA S, BILODEAU R, SAUVAGEAU R, et al. Outbreaks in Quebec pig farms of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1991, 3(4): 275 - 282.

[2] 杜平, 刘学荣, 黄银君, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 NX-1 株 ORF5, ORF7 基因的克隆 [J]. *浙江农业学报*, 2010, 22(4): 448 - 453.

DU P, LIU X R, HUANG Y J, et al. Cloning and analysis of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF5 and ORF7 gene of NX-1 strain [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2010, 22(4): 448 - 453. (in Chinese with English abstract)

[3] CONZELMANN K K, VISSER N, WOENSEL P V, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group [J]. *Virology*, 1993, 39(1): 329 - 339.

[4] FORSBERG R. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2005, 22(11): 2131 - 2134.

[5] DEA S, GAGNON C A, MARDASSI H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates [J]. *Archives of Virology*, 2000, 145(4): 659 - 688.

[6] FIRTH A E, ZEVENHOVENDOBBE J C, WILLS N M, et al. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production [J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92(Pt 5): 1097 - 1106.

[7] JOHNSON C R, GRIGGS T F, GNANANDARAJAH J, et al. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses [J]. *Journal of General Virology*, 2011, 92(Pt 5): 1107 - 1116.

[8] WANG F X, SONG N, CHEN L Z, et al. Non-structural protein 2 of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: a crucial protein in viral pathogenesis, immunity and diagnosis [J]. *Research in Veterinary Science*, 2013,



- 95(1): 1-7.
- [9] WANG F X, WEN Y J, YANG B C, et al. Role of non-structural protein 2 in the regulation of the replication of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in MARC-145 cells; effect of gene silencing and over expression[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 161(1/2): 58-65.
- [10] 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.
- [11] ZHOU L, ZHANG J, ZENG J, et al. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(10): 5156-5167.
- [12] DU L, LI B, PANG F, et al. Porcine GPX1 enhances GP5-based DNA vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2017, 183: 31-39.
- [13] ROQUES E, GIRARD A, ST-LOUIS M C, et al. Immunogenic and protective properties of GP5 and M structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed from replicating but non-disseminating adenovectors [J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 1-13.
- [14] LENG X, LI Z, XIA M, et al. Mutations in the genome of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentially related to attenuation[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 157(1/2): 50-60.
- [15] ZHOU Y J, HAO X F, TIAN Z J, et al. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China[J]. *Transboundary & Emerging Diseases*, 2008, 55(3/4): 152-164.
- [16] NIELSEN H S, OLEKSIWICZ M B, FORSBERG R, et al. Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations [J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(Pt 6): 1263-1272.
- [17] STORGAARD T, OLEKSIWICZ M, BOTNER A. Examination of the selective pressures on a live PRRS vaccine virus [J]. *Archives of Virology*, 1999, 144(12): 2389-2401.
- [18] TONG G Z, ZHOU Y J, HAO X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13(9): 1434-1436.
- [19] HAN J, WANG Y, FAABERG K S. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Research*, 2006, 122(1/2): 175-182.
- [20] GALLIHER-BECKLEY A, LI X, BATES J T, et al. Pigs immunized with Chinese highly pathogenic PRRS virus modified live vaccine are protected from challenge with North American PRRSV strain NADC-20 [J]. *Vaccine*, 2015, 33(30): 3518-3525.
- [21] BIAN T, SUN Y, HAO M, et al. A recombinant type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus between NADC30-like and a MLV-like: genetic characterization and pathogenicity for piglets [J]. *Infection Genetics & Evolution*, 2017, 54: 279-286.
- [22] ZHANG L, FENG Y, MARTIN D P, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of the ORF5 gene of PRRSV from central China [J]. *Research in Veterinary Science*, 2017, 115: 226-234.
- [23] CHEN J Z, PENG J M, BAI Y, et al. Characterization of two novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with deletions in the GP2 gene [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 176(3/4): 344-351.
- [24] DONG J G, YU L Y, WANG P P, et al. A new recombined PRRSV virulent strain in China [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 19(1): 89-98.

(责任编辑 张 韵)