

张梦婷, 王跃帅, 张晓晓, 等. PRRSV MLV 疫苗样毒株 LY30 的分离鉴定与致病性研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 84-93.

ZHANG M T, WANG Y S, ZHANG X X, et al. Isolation, identification and pathogenicity of PRRSV MLV vaccine-like strain LY30 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 84-93.

PRRSV MLV 疫苗样毒株 LY30 的分离鉴定与致病性研究

张梦婷^{1#}, 王跃帅^{1#}, 张晓晓¹, 李梦娟¹, 胡星星², 刘元俊³, 夏平安^{1*}

(1. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046;

2. 中农华大检测科技有限公司, 湖北 武汉 430070;

3. 动物疫病预防控制和检疫中心, 河南 南阳 473003)

摘要: 旨在对采集的疑似猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 的临床病料进行病毒分离鉴定, 并进行基因序列分析与致病性研究。针对猪场采集的疑似 PRRS 的病料, 运用逆转录 PCR (RT-PCR) 技术进行检测, 将检测为阳性的病料接种于非洲绿猴胚胎肾细胞 (Marc-145) 进行病毒分离, 并采用间接免疫荧光 (IFA) 法进行鉴定; 同时, 对分离毒株的全基因组进行扩增与序列分析, 进而通过感染仔猪探究其致病性。结果: 经 RT-PCR 检测, 临床病料猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 呈阳性, 接种至 Marc-145 细胞后出现稳定的细胞病变; IFA 试验呈现特异性荧光, 表明成功分离到 1 株病毒, 命名为 LY30; 测序结果显示, 该病毒基因组全长为 15 216 nt (不含 polyA 尾), 与 PRRSV MLV 疫苗株、VR2332 经典毒株核酸同源性分别达 99.6% 和 99.3%, 属于 PRRSV MLV 疫苗样毒株; 将分离毒株 LY30 感染仔猪后, 仔猪出现发热、咳嗽和食欲下降等临床症状, 并伴有病毒血症和肺部组织病变, 表明分离毒株 LY30 具有一定的致病性。综上, 本研究从临床病料中分离到具有一定致病性的 PRRSV MLV 疫苗样毒株, 对监测弱毒疫苗株临床使用的安全性及 PRRS 的防控具有重要意义。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 分离鉴定; 间接免疫荧光; 基因组特征; 弱毒疫苗

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)10-0084-10

Isolation, identification and pathogenicity of PRRSV MLV vaccine-like strain LY30

ZHANG Mengting^{1#}, WANG Yueshuai^{1#}, ZHANG Xiaoxiao¹, LI Mengjuan¹,

HU Xingxing², LIU Yuanjun³, XIA Ping'an^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. Zhongnong Huada Testing Technology Co., Ltd., Wuhan 430070, China;

3. Animal Disease Prevention, Control, and Quarantine Center, Nanyang 473003, China)

Abstract: The safety of attenuated vaccine strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) has always been a key concern in the clinical prevention and control of blue ear disease. However, reports on the isolation of attenuated vaccine strains from clinically diseased pigs are extremely rare. In this study, RT-PCR technology was applied to detect suspected blue ear disease samples collected from pig farms. The positive samples were inoculated into African green monkey embryo kidney cells (Marc-145) for virus isolation, and the indirect immunofluorescence (IFA) method was used for identification. Meanwhile, the whole genome of the isolated strain was amplified and sequenced, and its pathogenicity was investigated by infecting piglets. The clinical samples were tested positive for PRRSV through RT-PCR. Then, the processed samples were inoculated into Marc-145 cells, and stable cytopathic effects occurred and specific fluorescence was observed in the IFA test. A virus was successfully isolated and named LY30. The sequencing results showed that the full-length genome of this virus was 15216 nt (excluding the polyA tail). The sequence analysis revealed that the nucleic acid homology of LY30 with the PRRSV MLV vaccine strain and the classical VR2332 strain reached 99.6% and 99.3%, respectively; indicating that LY30 belonged to the PRRSV MLV vaccine-like strain. When infected with the isolated strain LY30, the piglets exhibited clinical symptoms, such as fever, cough, and decreased appetite, accompanied by viremia and lung tissue lesions; which suggested that LY30 had certain pathogenicity. In this study, a

收稿日期: 2024-11-27; 修回日期: 2025-07-22

基金项目: 河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (232102110118)

第一作者: 张梦婷, 女, 硕士研究生; 王跃帅, 男, 硕士研究生。*共同第一作者

*通信作者: 夏平安, 教授, 主要从事动物疫病病原与免疫学研究, E-mail: xpa88@163.com。

pathogenic PRRSV MLV vaccine-like strain was successfully isolated from clinical samples. This achievement is of great significance for monitoring the safety of attenuated vaccine strains during clinical use and for prevention and control of PRRS.

Keywords: PRRSV; isolation and identification; IFA; genomic characterization; MLV

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 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的一种极具危害性的传染病, 病猪因耳部皮肤常出现发绀症状, 故又被称为“蓝耳病”^[1]。PRRSV 作为一种 RNA 病毒, 属于套式病毒目、动脉炎病毒科、动脉炎病毒属, 基因组长度约 15 kb, 至少有 11 个开放阅读框 (ORFs), 具有高度的变异特性^[2-3]。1987 年, PRRSV 首次在美国被发现。1996 年, 我国学者郭宝清等^[4] 成功在国内分离出该病毒, 并命名为 CH-1a。2006 年, 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (HP-PRRSV) 在我国流行, 其致病性较以往毒株更强^[5-6]。2012 年, 美国的 NADC30 毒株传入我国, 与高致病性 PRRSV 一同成为我国的流行毒株^[7-8]。2014 年, 我国学者周峰分离出与美国 NADC30 同源性极高的毒株, 命名为 NADC30-like^[9], 该毒株存在易与其他毒株重组的特点^[10]。

自 PRRS 发现以来, 迅速在全世界范围内流行, 且给我国的养猪行业造成了巨大的经济损失。目前, 针对 PRRS 的防控主要依赖弱毒疫苗, 其中经典型 PRRSV MLV 弱毒疫苗在我国使用较为广泛^[11]。然而, 由于 PRRSV 疫苗毒株极易与其他毒株发生重组变异, 毒力返强的现象时有发生, 给 PRRS 的防控造成了极大的困难。已有研究表明, 成功分离出的 RespPRRS MLV-like 毒株有可能是弱毒疫苗的返强毒株, 因此对 PRRSV 弱毒疫苗临床使用的安全性监测至关重要^[12]。

本研究从河南某地区养殖场中采集疑似 PRRS 的组织病料中, 成功分离鉴定出具有一定致病性且与 PRRSV MLV 疫苗相关的毒株, 并对其进行了全基因组测序, 旨在进一步了解 PRRSV MLV 毒株的流行变异情况, 为 PRRSV 弱毒疫苗临床使用的安全性监测和 PRRS 的防控提供一定的理论基础和实践依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

PRRS 病料来自河南地区某猪场发病猪的血液、肺脏和淋巴结; 非洲绿猴胚胎肾细胞 (Marc-145) 保存于河南农业大学动物医学院分子免疫学实验室; PRRSV、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪瘟病毒 (CSFV) 及猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 抗原抗体双阴性的 42 日

龄仔猪购自河南民望农牧股份有限公司; 鼠源抗 PRRSV N 蛋白单克隆抗体由实验室制备保存; RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒购自上海生工生物公司; 反转录试剂、2×Phanta Max Master Mix、荧光定量酶等 PCR 相关试剂以及 DNA 片段回收试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京擎科生物有限公司; FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 生物公司; DMEM 完全培养基和 DAPI 溶液均购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自上海依科赛生物科技有限公司; pMD18-T 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 核酸提取与检测

参照上海生工生物公司 DNA 提取试剂盒 (产品编号: B511371) 和 RNA 提取试剂盒 (产品编号: B518637) 操作说明书进行总 DNA 和 RNA 的提取, 并检测是否存在 PRRSV、PRV、CSFV 和 PCV2 等病原。检测引物序列见表 1。

1.3 病毒的分离培养

将疑似 PRRS 病料剪碎混匀, 加入含青链霉素且无菌的 PBS 反复研磨至呈匀浆液后, 于 -80 °C 反复冻融 3 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液。上清液经 0.22 μ m 滤器过滤后接种于 Marc-145 细胞中, 吸附 2 h, 然后弃去病毒液并加入含有 2% FBS 的 DMEM 培养基, 将其置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 48~96 h, 观察有无细胞病变 (CPE)。按照上述病毒培养方法盲传 2~3 代, 在细胞出现 70%~80% CPE 时收集病毒液, -80 °C 冻存备用。

1.4 间接免疫荧光试验 (IFA)

用盲传 3 代后的细胞培养物, 感染 Marc-145 细胞。接毒 48 h 后, 弃去上清液, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 使用 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min 后弃去, PBS 清洗 3 次后加入 5% BSA 封闭 1 h; PBS 清洗 3 次, 加入抗 PRRSV N 蛋白单克隆抗体 (1:400) 作为一抗孵育 1 h; PBST 清洗 3 次, 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1:400) 作为二抗孵育 1 h; PBST 清洗 3 次, 加入 DAPI 50 μ L/孔孵育 10 min; PBST 清洗 3 次, 加入适量 PBS 避光保存, 使用荧光倒置显微镜进行观察并拍照。同时, 设立不接毒的 Marc-145 细胞作为阴性对照。

1.5 病毒滴度测定

将 Marc-145 按合适密度接种至 96 孔细胞培养板中, 当细胞密度生长至 80% 时, 将 1.3 中收取的传代

出现稳定病变的病毒液，使用无血清 DMEM 按照 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 进行稀释，每个稀释度 8 个重复。将稀释好的病毒液按照 100 μL /孔加入细胞板，将其置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 3~7 d，每天观察细胞病变情况。根据 Reed-Muench 公式测定病毒的半数组织细胞感染量 (TCID_{50})。

1.6 引物设计与合成

利用 Primer Primer 5 软件并参考 GenBank 中 PRRSV 毒株 VR2332 (登录号: U87392) 的全基因序列设计 PRRSV 全基因分段引物 (表 1)，所有引物均由北京擎科生物公司进行合成。

表 1 引物序列与产物大小

引物名称	引物序列 (5'→3')	扩增长度/bp	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
PRV	F: ACGTCACGGTCATCAAGGA R: GGCGGGACATCAACAGG	603	58
PRRSV-N	F: TATGCCAAATAACAACGG R: TAC ACA GTC GCC CTA AT	501	55
CSFV	F: TTGATTGGGATGTTGTGCTTC R: CAATGATGGCTTGAGCTGAGT	254	58
PCV2	F: CACATACTGGAAACCACCTAGAA R: CCAAGGAAGTAATCCTCCGATAAA	269	60
PRRSV-1	F: TTTCTCCACCCCTTTAAC R: GTCAAGGCAGGCAGGGTC	1 675	55
PRRSV-2	F: CGGATTTGACCCTGCCTG R: GCATTGCGGTGAGGACACA	1 050	55
PRRSV-3	F: TTCAAGTGAGCTGGTGATTGT R: GAATAACCACCGCCAGGGTAG	1 118	58
PRRSV-4	F: GTGGTTATTCTCCGGGTGAT R: GCCATCGAGCAGGCAACAT	1 029	60
PRRSV-5	F: CTGCCCTGCATGTTGCCTGC R: GATCTGCCACAAAACCG	1 571	60
PRRSV-6	F: CTTCTGACAGCAGCTCTTAACA R: GGGCCGTGGGGTCCGGTCCG	757	63
PRRSV-7	F: GCTGGGTCCAAATGACCCG R: TGGCGTAAGGCAGGCA	1 112	60
PRRSV-8	F: GCTGCCTGCCTTACGCC R: GCAATACGCTGCTTACATCTA	2 075	62
PRRSV-9	F: CCCCCTCCCCTCCCGCAC R: CTGGTGGCAGTGGCCTTATAA	1 799	63
PRRSV-10	F: CCACTGCCACTAGCTTGAAGT R: GGCTGTGATGGTAACATACACGGGT	1 488	62
PRRSV-11	F: TTTCACCTAGAATGACTTC R: CTAAGGACGACCCCATTTGT	1 160	58
PRRSV-12	F: AGCAGAACAATGGGGTTCGTCCT R: AATATAGTGCTTAGAGGCACCATGT	986	60

1.7 病毒全基因组克隆

取阳性病料的 cDNA，使用表 1 中的引物进行 PCR 扩增。反应体系总体积为 50 μL ：2 \times Phanta Max Buffer 25 μL ，dNTP Mix (10 mmol/L) 1 μL ，DNA Polymerase 1 μL ，上下游引物各 2 μL ，cDNA 模板

2 μL ，ddH₂O 17 μL 。反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，退火 15 s (退火温度见表 1)，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s，共 35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。将 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，切下与预期大小相符的条带进行胶回收，将纯化后的

目的片段与 pMD-18T 载体连接，连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞，挑取单个菌落进行菌液 PCR 鉴定，将鉴定为阳性的菌液送至北京擎科生物公司进行测序。

1.8 病毒全基因组核苷酸及氨基酸序列分析

通过 GenBank 下载国内外 PRRSV 代表毒株的基

因序列 (表 2)，利用 DNASTAR、Editseq 与 Megalign 软件进行序列拼接与比对，分析各序列之间的同源性，并构建进化树。

表 2 PRRSV 毒株信息

毒株名称	GenBank 登录号	来源	发现年份	毒株名称	GenBank 登录号	来源	发现年份
BJ-4	AF331831	中国	2000	GM2	JN662424	中国	2011
CH-1a	AY032626	中国	1996	HUN4	EF635006	中国	2007
CH-1R	EU807840	中国	2008	Lelystad-virus	AY588319.1	欧洲	1991
HB-2 (sh)	AY262352	中国	2002	LMY	DQ473474	中国	2002
HB-1 (sh)	AY150312	中国	2002	P129	AF494042	中国	2002
HEB1	EF112447	中国	2007	PRRSV MLV	AF159149.1	美国	1994
JXA1	EF112445	中国	2006	QYYZ	JQ308798.1	中国	2011
JXA1-P80	FJ548853	中国	2008	TJ	EU860248.1	中国	2006
SD17-38	MH068878	中国	2018	TP	EU864233.1	中国	2006
VR2332	U87392	美国	1993	GD	GU143913	中国	2009
HN07-1	KX766378.1	中国	2016	EuroPRRSV	AY366525.1	欧洲	2004
NADC30	JN654459.1	美国	2008				

1.9 病毒分离株致病性分析

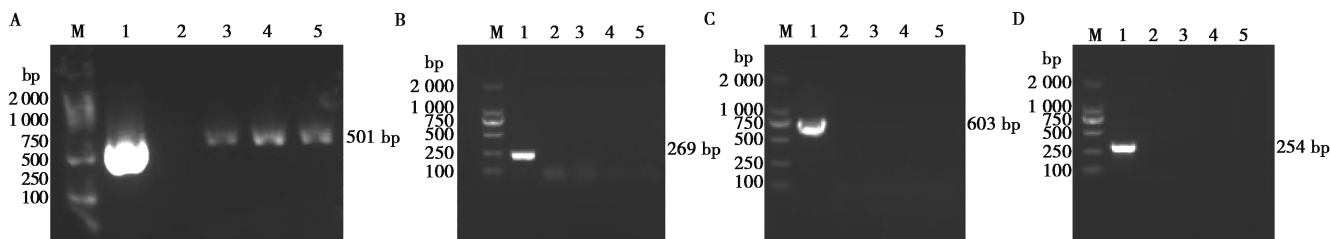
将 7 头试验仔猪随机分成 2 组，其中 5 头用于攻毒，2 头作为阴性对照。攻毒组的每头仔猪经滴鼻感染分离毒株 (1×10^6 TCID₅₀/头)，对照组使用等体积的 DMEM 培养液滴鼻。每隔 7 d 测量体温并观察临床症状，在感染后的第 0~42 天内，每间隔 7 d 通过颈静脉采血并分离血清，利用间接 ELISA 技术检测血清中的抗体水平，并利用荧光定量 PCR 检测血液中的病毒增殖水平。所有存活仔猪均在接毒后的第 42 天处死，根据下述标准对肺部进行综合病变评分，包括肺出血、肺间质增宽、肺实变、肺气肿等指标，然后计算出各组猪的平均得分及标准差。肺损伤评分为

0、1、2、3、4 分，其中最严重的病变得 4 分，其次是 3 分，以此类推，0 分则表示没有明显的肺部病变或者极其轻微。经 HE 染色法和组织学方法观察肺部病理变化。

2 结果与分析

2.1 病料的 PCR 检测

取病料的总 RNA 和 DNA，以反转录的 cDNA 和 DNA 为模板进行 PCR 检测。结果如图 1 所示，PCV2 (269 bp)、PRV (603 bp) 和 CSFV (254 bp) 检测结果均为阴性，PRRSV (501 bp) 检测结果均为阳性，初步判断该批病料为 PRRSV 阳性。



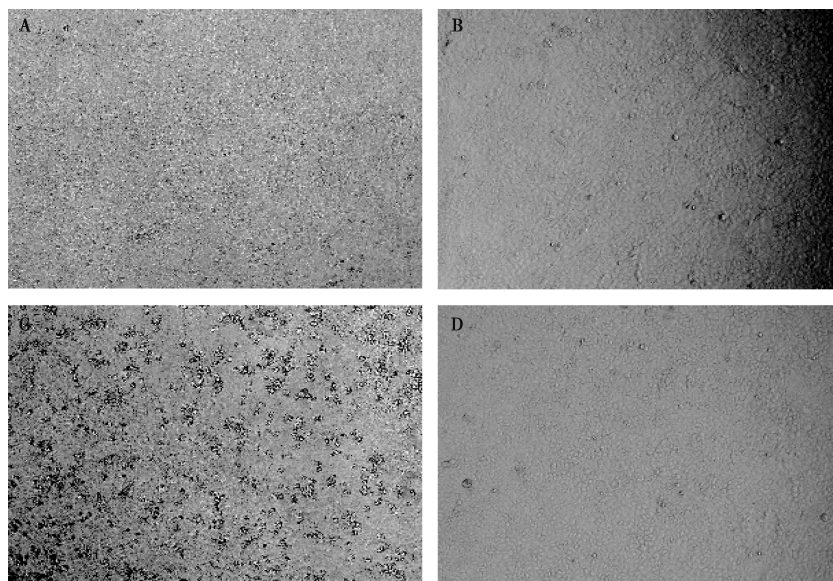
M. DNA Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3. 血液; 4. 肺组织; 5. 淋巴组织。

图 1 临床样品 PRRSV (A)、PCV2 (B)、PRV (C) 和 CSFV (D) 的 PCR 或 RT-PCR 检测

2.2 病毒的分离与鉴定

处理后的病料上清液接种 Marc-145 细胞，盲传 3 代后，观察细胞病变。结果如图 2 所示，血液样品

与淋巴组织样品感染的 Marc-145 细胞与未感染的细胞相似，无细胞病变；肺组织样品在感染 Marc-145 细胞 48 h 后出现细胞皱缩、变圆及堆积的病变现象。

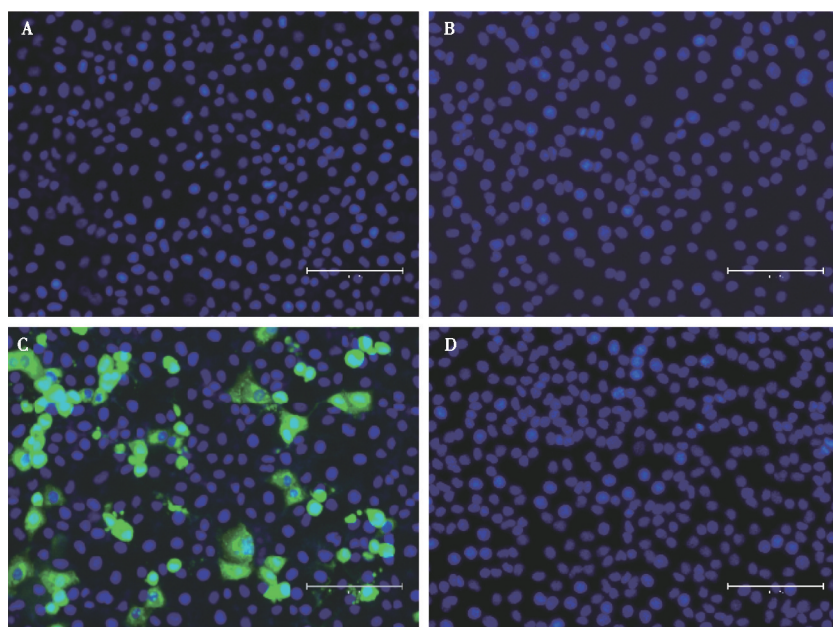


A. 未感染细胞；B. 血液样品感染细胞；C. 肺组织样品感染细胞；D. 淋巴组织样品感染细胞。

图 2 病料接种 Marc-145 细胞后的病变效应 (100×)

将 3 份病料分别接种于 Marc-145 细胞，培养 48 h 后，用 4% 多聚甲醛进行固定，通过 IFA 方法，对其进行鉴定。结果如图 3 所示，血液样品感染的细胞、淋巴组织样品感染的细胞及未感染的细胞在倒置

荧光显微镜下均未观察到绿色荧光，将血液及淋巴组织样品舍弃；肺组织样品感染接种的细胞可观察到特异性绿色荧光。该结果进一步确定肺组织样品中存在 PRRSV 病原，经连续传代后将其命名为 LY30。



A. 未感染 Marc-145；B. 血液样品感染的 Marc-145；C. 肺组织样品感染的 Marc-145；D. 淋巴组织样品感染的 Marc-145。

图 3 PRRSV 感染的 IFA 检测 (标尺 = 150 μm)

2.3 病毒滴度及生长曲线的测定

LY30 病毒感染 Marc145 细胞后，在不同时间点收取病毒液，用 TCID₅₀ 进一步检测病毒的生长曲线。结果如图 4 所示，分离株 LY30 在 0~36 h 处于隐蔽期，42 h 后进入对数增长期，48~60 h 时，病毒增量仍然在增多，但增长率小于对数增长期，在 60 h 左右处于病毒量最高峰，TCID₅₀ 可达 10^{-6.1}/0.1 mL，随后开始逐渐减低。

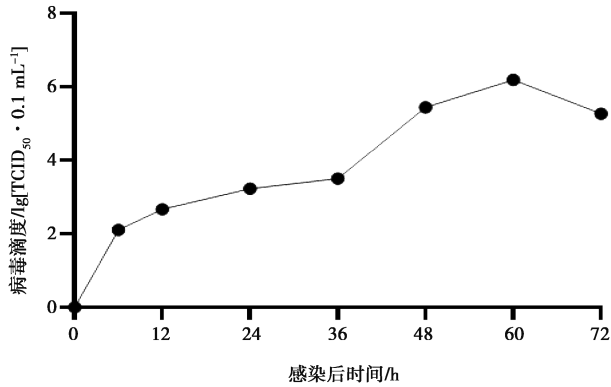
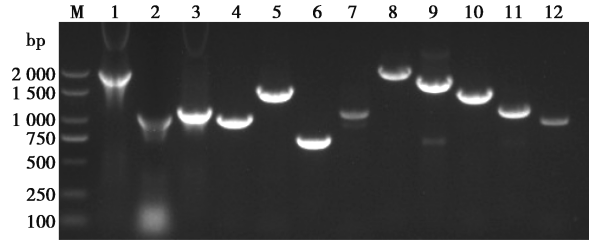


图 4 LY30 分离毒株在 Marc145 细胞上的生长曲线

2.4 LY30 全基因组扩增

使用表 1 中的特异性引物对目的基因进行分段扩增，扩增结果如图 5 所示，片段大小依次为：1 675、1 050、1 118、1 029、1 571、757、1 112、2 075、

1 799、1 488、1 160 和 986 bp。根据测序结果并利用生物软件拼接矫正后获得全长为 15 216 nt 的 PRRSV 基因组序列（不含 ployA 尾），且序列已上传至 NCBI（登录号：PQ893567）。



M. DNA Marker; 1~12. 目的基因片段扩增产物。

图 5 LY30 分离毒株全基因组分段扩增结果

2.5 LY30 全基因组序列对比及进化树分析

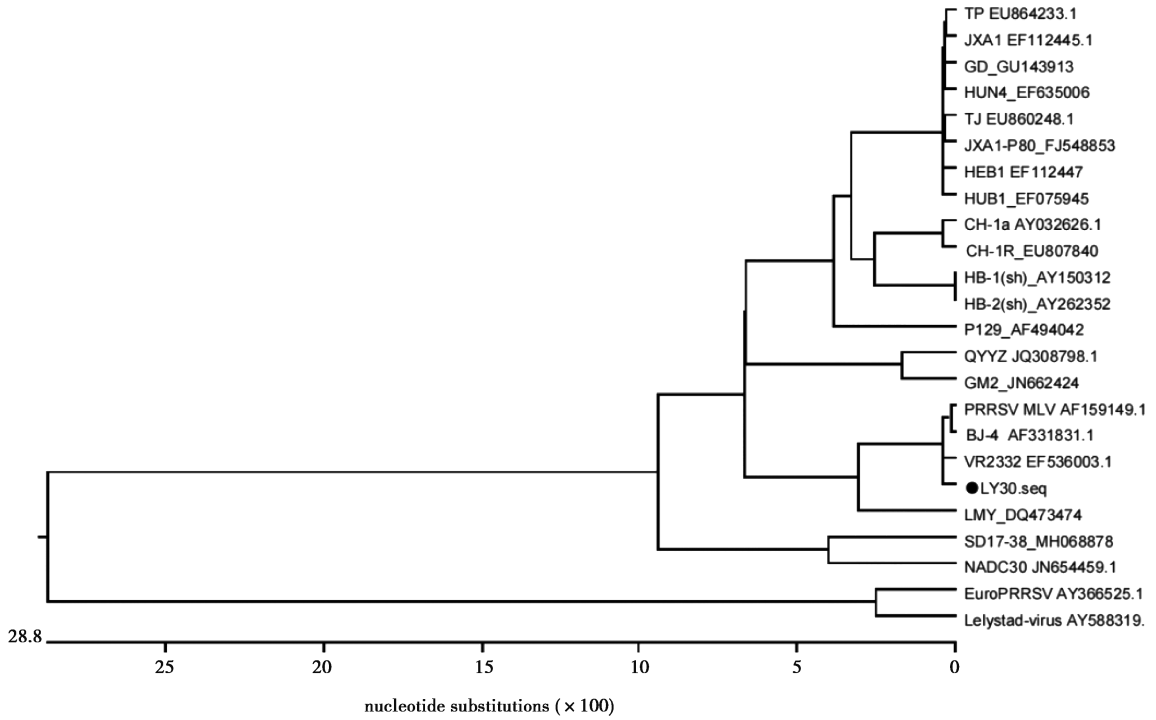
利用 DNASTAR 软件进行同源性分析。结果表明（图 6），LY30 在分子遗传演化上与 Lelystad-virus 的同源性仅为 57.1%，与 CH-1a 毒株的同源性为 91.5%，与 NADC30 毒株和 SD17-38 毒株（NADC30-like）同源性分别为 85.2% 和 85.2%，与 HP-PRRSV 参考毒株 JXA1、HUN4 的同源性为 89.3%、89.4%，与 PRRSV MLV 疫苗株的同源性高达 99.6%，与经典毒株 VR2332 同源性为 99.4%。

		同源性/%																										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
差异性/%	1	91.5	87.6	85.0	92.5	92.4	91.2	91.5	95.0	94.8	60.5	92.3	88.0	92.3	92.3	92.5	92.4	92.5	92.4	92.4	60.6	89.4	84.9	91.2	1	P129_AF494042.seq		
	2	9.2	86.3	85.2	89.6	89.6	99.6	99.8	91.5	91.3	60.3	89.4	88.5	89.5	89.5	89.6	89.6	89.7	89.6	89.6	60.4	94.5	85.2	99.6	2	PRRSV MLV AF159149.1.seq		
	3	14.0	15.6	82.3	87.9	87.9	86.1	86.2	88.7	88.7	59.7	87.8	96.8	87.0	87.0	88.0	87.9	88.0	87.9	87.8	59.8	84.8	82.2	86.0	3	QYYZ_JQ308798.1.seq		
	4	17.3	17.0	20.9	84.0	84.1	85.0	85.1	84.8	84.8	60.2	83.9	82.8	84.1	84.1	84.0	84.0	84.1	84.0	83.9	60.3	84.1	92.5	84.9	4	SD17-38_MH068878.seq		
	5	8.0	11.4	13.5	18.7	99.5	89.4	89.6	95.3	95.2	60.0	99.2	87.8	92.7	92.7	99.4	99.3	99.6	99.5	99.4	60.0	87.9	83.7	89.4	5	TJ_EU860248.1.seq		
	6	8.2	11.5	13.6	18.5	0.5	89.4	89.5	95.2	95.1	60.1	99.2	87.8	92.6	92.6	99.3	99.2	99.6	99.5	99.3	60.2	87.9	83.8	89.3	6	TP_EU864233.1.seq		
	7	9.5	0.4	15.9	17.2	11.7	11.8	99.5	91.2	91.0	60.2	89.2	88.3	89.3	89.3	89.4	89.3	89.4	89.4	89.3	60.3	94.2	84.9	99.3	7	VR2332_EF536003.1.seq		
	8	9.2	0.2	15.7	17.2	11.5	11.5	0.5	91.4	91.2	60.2	89.4	88.5	89.4	89.4	89.6	89.5	89.6	89.5	89.5	60.4	94.4	85.1	99.4	8	BJ-4_AF331831.1.seq		
	9	5.3	9.2	12.5	17.6	4.9	5.0	9.6	9.3	99.3	60.1	95.0	88.7	95.1	95.1	95.2	95.2	95.4	95.2	95.1	60.1	89.2	84.6	91.1	9	CH-1a_AY032626.1.seq		
	10	5.4	9.5	12.5	17.5	5.0	5.1	9.8	9.6	0.7	60.1	94.9	88.7	95.1	95.1	95.1	95.1	95.2	95.1	95.0	60.1	89.0	84.6	91.0	10	CH-1R_EU807840.seq		
	11	56.8	57.2	58.4	57.4	57.9	57.7	57.4	57.3	57.6	57.7	60.0	59.9	59.9	59.9	60.1	60.0	60.0	60.0	60.0	59.9	95.3	60.2	60.2	60.2	11	EuroPRRSV_AY366525.1.seq	
	12	8.3	11.7	13.7	18.8	0.8	0.8	11.9	11.8	5.2	5.3	57.9	87.6	92.4	92.4	99.1	99.0	99.4	99.2	99.0	60.1	87.7	83.7	89.2	12	GD_GU143913.seq		
	13	13.5	12.7	3.3	20.2	13.7	13.0	12.8	12.5	12.5	58.1	13.9	87.1	87.1	87.1	87.1	87.1	87.8	87.8	87.7	87.7	60.0	86.7	86.7	88.3	13	GM2_JN662424.seq	
	14	8.3	11.6	14.6	18.5	7.8	7.9	11.9	11.7	5.1	5.2	58.2	8.1	14.6	100.0	92.6	92.6	92.8	92.6	92.6	60.1	87.5	83.6	89.2	14	HB-1(sh)_AY150312.seq		
	15	8.3	11.6	14.6	18.5	7.8	7.9	11.9	11.7	5.1	5.2	58.2	8.1	14.6	0.0	92.6	92.6	92.8	92.6	92.6	60.1	87.5	83.6	89.2	15	HB-2(sh)_AY262352.seq		
	16	8.1	11.4	13.4	18.6	0.6	0.7	11.7	11.5	5.0	5.1	57.7	1.0	13.6	7.9	7.9	99.3	99.4	99.3	99.2	60.2	87.9	83.7	89.3	16	HEB1_EF112447.seq		
	17	8.1	11.5	13.5	18.6	0.7	0.8	11.8	11.6	5.0	5.2	57.9	1.0	13.7	7.9	7.9	0.7	99.4	99.2	99.1	60.0	87.8	83.7	89.3	17	HUB1_EF075945.seq		
	18	8.0	11.4	13.5	18.5	0.4	0.4	11.7	11.5	4.8	5.0	57.8	0.6	13.6	7.8	7.8	0.6	0.7	99.6	99.4	60.1	87.9	83.8	89.4	18	HUN4_EF635006.seq		
	19	8.1	11.5	13.6	18.6	0.6	0.5	11.8	11.5	5.1	5.2	57.8	0.8	13.8	7.9	7.9	0.7	0.8	0.4	99.3	60.1	87.8	83.8	89.3	19	JXA1_EF112445.1.seq		
	20	8.2	11.5	13.6	18.7	0.6	0.8	11.8	11.6	5.1	5.2	58.0	1.0	13.8	7.9	7.9	0.8	0.9	0.6	0.7	60.0	87.8	83.7	89.3	20	JXA1-P80_FJ548853.seq		
	21	56.4	57.0	58.4	57.2	57.8	57.5	57.2	56.9	57.6	57.6	4.9	57.7	57.9	57.8	57.8	57.4	58.0	57.6	57.7	57.9	60.2	60.3	60.3	21	Lelystad-virus_AY588319.1.seq		
	22	11.8	5.8	17.7	18.6	13.6	13.6	6.1	5.9	11.9	12.2	57.3	13.8	15.1	14.1	14.1	13.6	13.7	13.6	13.7	57.3	84.0	94.2	22	LMY_DQ473474.seq			
	23	17.4	17.1	21.1	8.0	19.0	18.9	17.4	17.2	17.8	17.8	57.3	19.0	20.5	19.2	19.2	19.0	19.1	18.9	18.9	19.1	57.3	18.6	84.9	23	NADC30_JN654459.1.seq		
	24	9.5	0.4	15.9	17.5	11.7	11.8	0.7	0.6	9.6	9.8	57.4	12.0	13.0	12.0	12.0	11.8	11.8	11.7	11.8	11.8	57.2	6.1	17.5	24	LY30.seq		

图 6 分离毒株 LY30 全基因组核苷酸序列同源性比较

使用 MEGA 8.0 软件绘制 LY30 分离株与国内外其他毒株全基因组的遗传进化树。遗传进化树结果表明（图 7），LY30 与 VR2332 及 PRRSV MLV 在同一个分支，与 CH-1a 经典株处在稍微偏远的分支，与

JXA1 及 HUN4 等高致病性株处在较远的分支，与 SD17-38 等类 NADC30 毒株处于更远的分支，与 Lelystad-virus 欧洲株处于最远的分支。



注：●为本试验分离株。

图 7 分离毒株 LY30 全基因组进化树

2.6 LY30 全基因组氨基酸序列分析

将 LY30 的氨基酸序列与 VR2332、PRRSV MLV 的各蛋白氨基酸进行对比。结果显示 (表 3), VR2332 与 PRRSV MLV 共有 24 处氨基酸不同, 在这

24 处差异中, LY30 有 6 处与 VR2332 一致, 分别为 NSP1 中第 331 位, NSP2 中第 569、581 和 595 位, NSP10 中第 306 位, ORF5 中第 151 位, 另有 18 处与 PRRSV MLV 一致。

表 3 LY30 与 PRRSV MLV、VR2332 各基因推导的氨基酸对比

蛋白	氨基酸位置	LY30	PRRSV MLV	VR2332	蛋白	氨基酸位置	LY30	PRRSV MLV	VR2332	
NSP1	99	V	V	I	NSP3	70	T	T	A	
	135	V	V	A			159	V	M	M
	141	F	F	Y	NSP10	62	T	S	S	
	219	K	K	R			306	Y	H	Y
	277	L	L	S	ORF3	15	S	S	N	
331	S	F	S			64	T	T	A	
NSP2	107	S	N	N		85	N	D	D	
	129	T	T	A	ORF4	43	G	G	S	
	324	N	N	A			160	G	E	E
	475	P	P	S	ORF5	11	C	C	Y	
	569	E	K	E			27	A	V	V
	581	H	Y	H			29	A	A	V
	595	P	L	P		151	R	G	R	
	782	A	V	V	ORF6	16	E	E	Q	
	825	A	A	T		ORF7	10	K	K	Q
	834	V	V	A						
1 094	G	R	R							

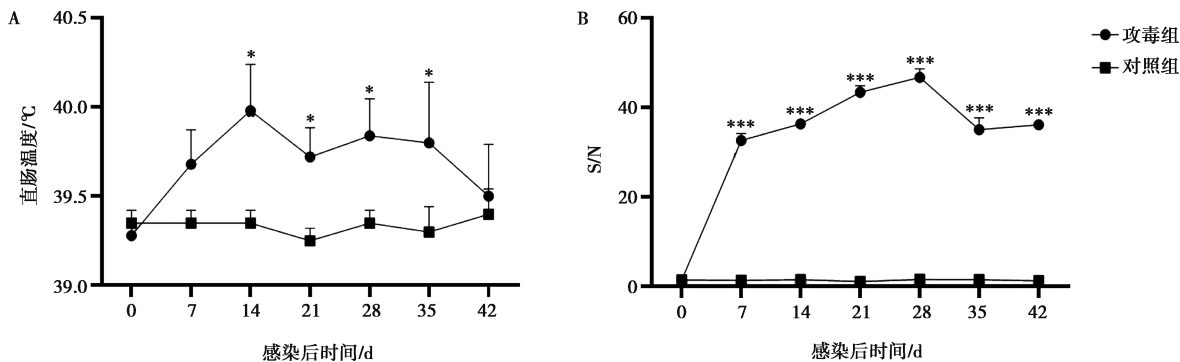
2.7 LY30 毒株的致病性分析

2.7.1 体温及抗体水平变化

42日龄仔猪感染分离毒株 LY30 后, 出现体温升高、食欲下降、精神不佳等症状。仔猪体温在感染后 7 d 即开始升高, 持续 7~28 d, 中间有所下降, 后期体温逐渐下降至正常体温; 未感染组的仔猪未出现上

述症状, 体温也无升高现象 (图 8A)。

检测各个试验组血清中的抗体水平, 结果发现, 仔猪在攻毒 7 d 后, 血清中可以检测到 PRRSV N 蛋白抗体, 并且抗体水平处于不断升高的状态, 而阴性对照仔猪血清中检测不到相关抗体 (图 8B)。



注: 组间比较, * 表示 $P < 0.05$, *** 表示 $P < 0.001$, 下同。

图 8 试验仔猪直肠体温变化 (A) 以及血清中 PRRSV 抗体水平变化 (B)

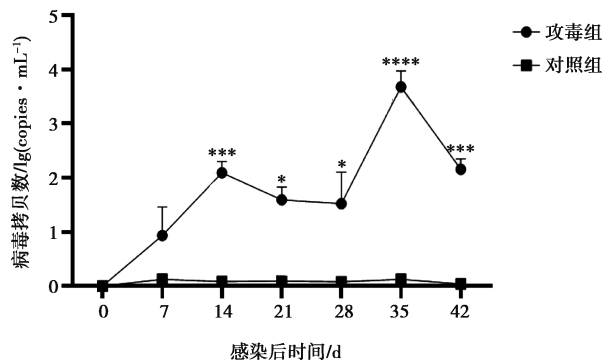
2.7.2 血液中病毒拷贝数的变化

检测各个试验组血液中的病毒拷贝数变化水平, 结果发现, 仔猪在攻毒 7 d 后, 血液中可以检测到少量 PRRSV, 并且病毒量处于不断升高至稳定的状态, 而阴性对照组仔猪血液中检测不到病毒量 (图 9)。

正常, 没有出现特异性病变 (图 10)。

2.7.3 肺部病变评分

攻毒后, 根据 1.9 中标准计算肺部病变综合评分的平均数和标准差, 结果表明, 对照组肺部病变综合评分平均值为 0.12, 标准差为 0.12; 攻毒组肺部病变综合评分平均值为 1.102, 标准差为 0.155 1。

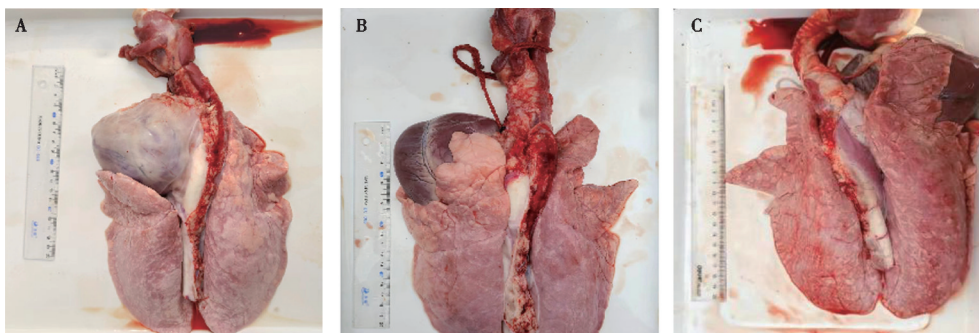


注: 组间比较, **** 表示 $P < 0.000 1$ 。

图 9 试验仔猪血液中病毒拷贝数水平变化

2.7.4 剖检病理观察

在攻毒后的第 21 天将所有仔猪剖杀处理。剖检结果显示, 攻毒组的仔猪肺脏存在少量出血点, 且肺部边缘部分出现实质性病变; 阴性对照组的仔猪肺部

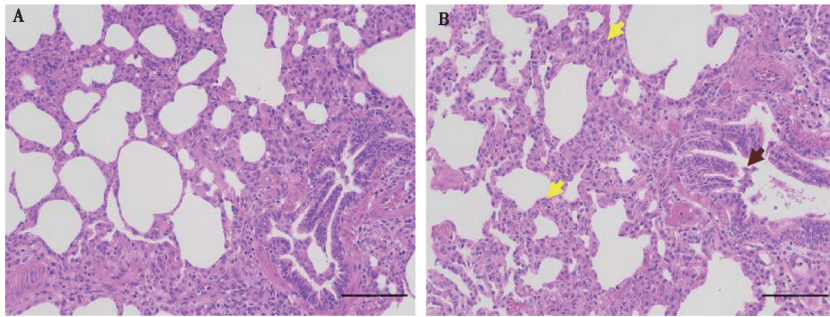


A. 对照组; B、C. 攻毒组。

图 10 PRRSV 攻毒后不同组别猪肺脏剖检变化

肺脏病理切片可见, 攻毒组肺脏组织肺泡壁有少量粒细胞浸润 (黄色箭头), 较大面积肺泡壁轻度增厚, 肺泡间隔增宽, 部分肺泡代偿性扩张; 细支气管

内偶见脱落的上皮及嗜酸性絮状物 (棕色箭头) (图 11)。



A. 对照组; B. 攻毒组。

图 11 PRRSV 攻毒后猪肺脏病理组织学变化 (标尺 = 100 μm)

3 讨论

自 1996 年 PRRS 在我国被报道以来, 迅速在国内大部分地区暴发, 尤其是 2006 年流行的高致病性 PRRS, 给我国养猪业带来沉重打击, 严重阻碍行业发展, 造成了巨大的经济损失, 随后我国学者加快了疫苗研发的脚步^[13-14]。20 世纪 90 年代, 德国勃林格殷格翰公司成功研发出了首个商品化 PRRSV 弱毒疫苗, 其疫苗毒株为致弱的美洲株 (VR2332)。随着 PRRSV 的不断变异, 多种高致病性的毒株相继出现, 国内也针对地研发出了以致弱的 HP-PRRSV 毒株制备的弱毒疫苗^[15]。然而 PRRSV 弱毒疫苗存在诸多安全问题: 一方面, 它不能提供对新兴和异源野毒株的完全保护; 另一方面, 毒力返强、免疫效果受限和免疫逃逸等现象时有发生。因此, 对 PRRSV 弱毒疫苗的安全性检测和 PRRS 的防控对于保障猪群健康、维护养猪业经济利益至关重要, 而有关 PRRSV MLV 毒株的分离鉴定可为其提供一定的研究基础。

有研究表明, VR2332 毒株致弱的关键区域在于 NSP1、NSP2、NSP10、ORF3、ORF5、ORF6 区域^[16]。在非结构蛋白 NSP1 中, 距离催化位点 8 个残基处发生的 S331F 突变可能会引起蛋白质构象改变, 进而影响水解效率, 导致毒株致病性减弱^[17]。但分离毒株 LY30 在 NSP1 的第 331 位为 S, 是强毒株的标志。由于不同毒株型的 NSP2 变化较大, 其生物学功能尚未明确。不过, NSP2 的突变可能会间接导致 ORF1ab 蛋白水解效率的降低, 从而改变毒株的致病性^[18]。而分离毒株 LY30 在 E⁵⁶⁹K、H⁵⁸¹Y、P⁵⁹⁵L 位点发生突变, 与 VR2332 经典毒株相同, 但目前尚无研究证实该位置可作为毒力致弱标志, 其与毒力间的

相关性还需后续进一步研究。在非结构蛋白 NSP10 中, Y³⁰⁶H 位点的突变会改变蛋白的空间结构, 影响解旋酶功能, 干扰病毒复制的效率进而减弱病毒毒力^[19]。而分离毒株 LY30 在此位点氨基酸为 Y, 属于强毒株的分子标记。GP5 蛋白位于病毒粒子表面, 具有免疫原性及中和抗原表位, 在细胞受体结合的过程中发挥重要作用, OFR5 区域 R¹⁵¹G 的突变会导致基因毒力的减弱^[20], 而分离毒株 LY30 在此位点为 R, 同样属于强毒株的分子标志。综上分析, 分离毒株 LY30 共有 6 处潜在的毒力位点突变与经典毒株 VR2332 相同, 这些突变很可能会增强病毒毒力, 引发免疫逃逸现象。

本研究发现, 分离毒株 LY30 的核苷酸序列与 PRRSV MLV 疫苗株的同源性高达 99.6%, 氨基酸序列也高度相似, 据此推测该毒株可能与 PRRSV MLV 相关。将 LY30 感染仔猪后, 仔猪体温明显地上升, 且出现精神萎靡、呼吸困难、后肢麻痹等症状。检测发现, 仔猪血清中 N 蛋白抗体水平和血液中病毒拷贝数均升高, 表明该毒株对仔猪具有一定的致病性。对攻毒组的仔猪进行剖检, 可见仔猪肺部出现出血点, 边缘出现实质性病变。病理切片结果显示, 肺泡壁有少量粒细胞浸润, 大面积肺泡壁轻度增厚, 肺泡间隔增宽, 部分肺泡代偿性扩张, 血管、细支气管周围淋巴细胞小灶性浸润, 这进一步表明了 LY30 对仔猪造成了一定的病理损伤。结合致病性结果分析, 推测该毒株与 PRRSV MLV 的返强毒株相关。

PRRSV 具有高度易变异的特点, 多种重组株和变异株在我国不断涌现, 导致毒株类型复杂多样。目前, 有关经典毒株 PRRSV 及疫苗返强毒株的分离报道不多, 本研究成功从河南某猪场的病料中分离出

PRRSV 毒株 LY30, 并通过全基因组分析和致病性分析, 推测其极有可能与疫苗株 PRRSV MLV 的返强毒株相关。这一研究成果为 PRRSV 弱毒疫苗株的研究提供一定参考基础, 同时也警示相关人员增加对此类毒株的流行病学监测, 以便及时掌握其流行规律, 制定更为有效的防控策略。

参考文献:

- [1] COLLINS J E, BENFIELD D A, CHRISTIANSON W T, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4 (2): 117-126.
- [2] MEULENBERG J J M, PETERSEN - DEN BESTEN A, DE KLUYVER E P, et al. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus [J]. *Virology*, 1995, 206 (1): 155-163.
- [3] GAO Z Q, GUO X, YANG H C. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine reproductive and reproductive syndrome virus [J]. *Arch Virol*, 2004, 149 (7): 1341-1351.
- [4] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. *中国畜禽传染病*, 1996, 18 (2): 1-5.
- [5] ZHANG X, LI Y, XIAO S, et al. High-frequency mutation and recombination are responsible for the emergence of novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus in northwest China [J]. *Arch Virol*, 2019, 164 (11): 2725-2733.
- [6] 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.
- [7] ZHAO K, YE C, CHANG X B, 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.
- [8] GUO Z, CHEN X X, LI R, et al. The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective [J]. *Virol J*, 2018, 15 (1): 2.
- [9] 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 (9): 1398-1404, 1410.
- [10] 张洪亮, 相丽润, 许浒, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗 (HuN4-F112 株) 对类 NADC30 PRRSV 免疫保护效果的评价 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43 (3): 296-301.
- [11] 李文生, 孙志勇. PRRSV 蛋白的功能与疫苗研究进展 [J]. *兽医导刊*, 2019 (5): 43-45.
- [12] 李思琪, 刘莹, 刘濮毓, 等. PRRSV BZ4-19 株的分离鉴定及其全基因序列分析 [J]. *中国兽医科学*, 2024, 54 (2): 200-207.
- [13] LIU J, WEI C, LIN Z, et al. Recombination in lineage 1, 3, 5 and 8 of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 68: 119-126.
- [14] 谷尚品. 2020—2022 年我国部分地区猪繁殖与呼吸综合征病毒的基因序列分析与分离鉴定 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- [15] 张鹤. 猪繁殖与呼吸综合征弱毒疫苗免疫剂量和免疫时间对猪免疫应答的影响 [D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
- [16] ALLENDE R, KUTISH G F, LAEGREID W, et al. Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype [J]. *Arch Virol*, 2000, 145 (6): 1149-1161.
- [17] ZHANG Z, ZHANG H, LUO Q, et al. Variations in NSP1 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in China from 1996 to 2022 [J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14 (7): 1435.
- [18] DEN BOON J A, FAABERG K S, MEULENBERG J J, et al. Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases [J]. *J Virol*, 1995, 69 (7): 4500-4505.
- [19] HU Y, KE P, GAO P, et al. Identification of an intramolecular switch that controls the interaction of helicase nsp10 with membrane-associated nsp12 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2021, 95 (17): e0051821.
- [20] WESLEY R D, MENGELING W L, LAGER K M, et al. Evidence for divergence of restriction fragment length polymorphism patterns following *in vivo* replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Am J Vet Res*, 1999, 60 (4): 463-467.