2021 年我国猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查与遗传变异性分析

吴慧娟，牛登云，段宝敏，秘清灵，吕 钊，马利芳，史秋颖，冯敬敬*
（天津渤海农牧产业联合研究院有限公司，天津 300308）

猪繁殖与呼吸综合征（Porcine reproductive and respiratory syndrome，PRRS）是由病毒（PRRSV）引起的猪的一种繁殖障碍和呼吸系统的传染病，其临床特征是母猪发热厌食，妊娠后期流产，产死胎和木乃伊胎；仔猪则发生呼吸系统疾病且大量死亡，由于部分病猪耳部发紫，俗称“蓝耳病”。PRRSV 为有囊膜的 RNA 病毒，其基因组为单股正链，不分节段，全长大约 15 kb，含有至少 10 个开放阅读框（ORFs）。Nsp2 作为基因编码区内最大的非结构蛋白，具有显著的遗传变异性，也是用于区分欧洲型与美洲型差异的主要蛋白，其氨基酸相似度不超过 40%，PRRSV 被分为两个血清型，即血清 I 型（欧洲型）和血清 II 型（美洲型），Lelystad virus（LV）为欧洲型分离到的第 1 株毒株，VR-2332 则是美洲型的原始毒株，两者分别在 1991 年和 1992 年相继被分离出来。该病毒对原代猪肺泡巨噬细胞（PAM）亲嗜性最高，相对于可以适应多种细胞系的美洲型毒株，欧洲型毒株一般仅能在 PAM 细胞上繁殖并致 CPE，且只有细胞适应的分离株才能适应非洲绿猴胚胎肾细胞（Marc-145）。

该病最早于 1987 年在美国中西部发现，1988 年传染到日本，成为亚洲地区首个 PRRS 暴发的国家。1990 年德国开始暴发，直到 1999 年该病逐渐席卷了荷兰、西班牙、法国等欧洲的多个国家。1991 年，我国台湾首次报道了该病，并于 1995 年底在大陆全面暴发，给整个养猪业带来了巨大的经济损失，直到 1996 年郭宝清等分离出了国内的第 1 株 PRRSV 并命名为 CH-1a。经过 2001—2002 年两次暴发并伴随着混合感染，该病于 2006—2007 年出现了明显变异，即高致病性猪蓝耳病（highly — pathogenic PRRS，HP-PRRS），成为影响我国养猪产业发展的重大危害疫病之一，在此期间，美国学者 Han 于 2005 年曾分离到另一种新的 PRRSV 变异株，而与此变异株具有相同基因缺失特征的另一变异株 NADC30 在 2008 年出现。2012 年，我国发现了一类与上述 NADC30 毒株有高度同源性的毒株，经遗传变异性分析被统称为类 NADC30 毒株（NADC30-like 毒株），该毒株的 Nsp2 区域缺失了 131 个氨基酸，即“111+1+19”氨基酸缺失模式，至此 NADC30-like 毒株在我国大部分地区流行开来。据统计，2014—2016 年我国主要以 HP-PRRSV 为主要流行毒株，但 NADC30-like 毒株的检出比率呈上升趋势，直到 2016 年成为我国主要的流行毒株。

预防该病主要以接种疫苗为主，现阶段商品化的疫苗主要为 PRRSV 活疫苗和 PRRSV 减毒活疫苗（PRRSV-MLV），主要针对的是经典 PRRSV 和 HP-PRRSV 两类，PRRSV-MLV 疫苗可以诱导保护性免疫反应，但它可能不会对所有分离株都具有广泛的交叉保护，这也导致疫苗对异源性病毒保护不完全。通过评价 5 种商品化疫苗也证实了现有疫苗不能对 NADC30-like 毒株提供完全的保护力。2021 年度本研究共检测得到 132 份 PRRSV 阳性临床样本，测序成功 88 个，通过基因测序发现 NADC30-like 有 87 株，占比达到 98.86%，是主要的流行毒株，GP5 与 Nsp2 与参考毒株 NADC30 的同源性在 86.6%~95.2% 和 51.3%~90.9% 之间，说明该毒株已出现不同程度的变异，不排除会有新型 PRRSV 的出现，因此对 PRRSV 进行不间断的分子流行病学分析具有重要意义。

作者简介：吴慧娟 (1997—)，女，天津市人，本科，动物医学专业，主要从事动物疫病诊断工作；
牛登云 (1989—)，女，硕士研究生，天津市人，预防兽医学专业，主要从事动物疫病诊断工作；
二者共为第 1 作者
* 通信作者：冯敬敬，E-mail：fjzb1919@126.com

猪业科学 SWINE INDUSTRY SCIENCE

1 材料与方法

1.1 临床样本剖检

2021 年共收集到来自全国 20 个省份的 1 035 份临床样本，均为疑似 PRRSV 感染的病死猪的口腔拭子、血液和剖检脏器（图 1）。

1.2 主要试剂

RPMI Medium 1640 培养基（RPMI Medium 1640 basic）、双抗（Pen Sterp）均购自 gibco；胎牛血清（Foetal Bovine Serum Sterile）购自 AusGeneX。

1.3 测序引物设计与合成

本研究同时检测 ORF5 和 NSP2 两段基因片段，根据 GenBank 上登录的参考序列设计如下引物登录的参考序列设计了如下引物：ORF5-F：CCTGAGACTATGCGGTGGG，ORF5-R：GCTGTCATTGCAGAAGTCGTC；NSP2-F：GCCAAGTCTACTGCACACGAT，NSP2-R GGTCCTCAAACCCAGGATAGT。引物扩增长度为 696 和 999，由擎科生物科技有限公司合成。

1.4 RT-PCR 鉴定

按照天隆科技核酸提取说明书，对临床样本进行核酸提取，之后采用 ORF5 与 NSP2 扩增引物进行目的基因扩增，RT-PCR 反应条件为：45 ℃逆转录 30 min；95 ℃ cDNA 预变性 5 min；95 ℃变性 30 s；59 ℃退火，72 ℃延伸 30 s；72 ℃ 5 min；4 ℃ 5 min。以上 3 个温度共 35 个循环。最终将扩增后的目的基因片段送至擎科生物科技有限公司进行测序。

1.5 猪肺巨噬细胞制备

本研究采用肺泡灌洗方法制备原代猪肺泡巨噬细胞（PAM）。选 60 日龄的健康仔猪，在检测 PRRSV 阴性后通过前腔静脉放血处死，将肺脏在无菌条件下完整取出；用吸管通过气管向两侧肺脏中灌满含 2% 双抗 RPMI-1640 培养液，轻轻揉捏肺脏使肺泡巨噬细胞充分分散于培养液中，重复 2~3 次；使用无菌的 6 层纱布对滤液进行过滤，分装后以 1 000 r/min 于室温下离心 10 min 后去上清，按此方法用上述培养液重复对细胞进行 2~3 次洗涤；将洗涤后的 PAM 细胞用含 2%~4% 的双抗和 10 % 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液重悬后进行计数，按 4×10^6/ 孔接种到所需孔板中，剩余细胞用含 10%DMSO 的胎牛血清冻存于液氮中备用。

1.6 病毒分离与鉴定

采集到的临床组织样本研磨后反复冻融 2 次，血液样本与拭子无需冻融与研磨。将上述临床样本 1 000 r/min 离心 5 min 取上清，用无菌 PBS 将上清液进行 3 倍稀释，而后用 0.22 μm 滤膜进行过滤，所得即为待检样本。将冻存的 PAM 细胞从液氮中取出并复苏，待细胞贴壁后缓慢吸出培养液，并将过滤好的病毒液按 1 ∶ 2 缓慢接种于细胞板孔中，37℃吸附 0.5 h 后吸出上清弃掉，再加入细胞维持液，放置于 CO_2 培养箱中继续培养，每天观察细胞病变（CPE）情况，细胞病变面积达到 95% 时予以收获，放置 -80℃冰箱放置待测。若接种 PAM 细胞 120 h 后仍无细胞病变，则继续盲传 3 代后进行 PCR 检测，若检测阴性则停止传代。

1.7 流行病学统计与遗传变异性分析

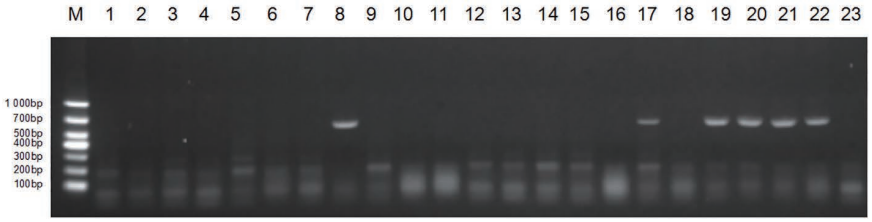
将测序得到的基因序列与 NADC30、HENAN-HEB、CH-1R、CH-1a、VR-2332、MZ-IND-DBT1-18、JXA1、MN187C、R98、HUN4、TJ、GD、HENAN-XINX、QYYZ 参考毒株进行比对分析，按照对应临床样本的送检地区、发病日龄、月份、临床样本类比进行统计分析。

2 结果

2.1 临床样本剖检与 RT-PCR 鉴定

根据剖检发现该病症没有特征性的病变，根据并发与继发感染的不同，病变有差异；由于病原的靶器官为肺泡内巨噬细胞，因此肺部剖检病变明显，呈现弥散性肺实质、肺泡炎和间质纤维化的间质性肺炎特征。经 RT-PCR 检测临床共检测到 132 份阳性样本（图 2）。

图 1 剖检病变



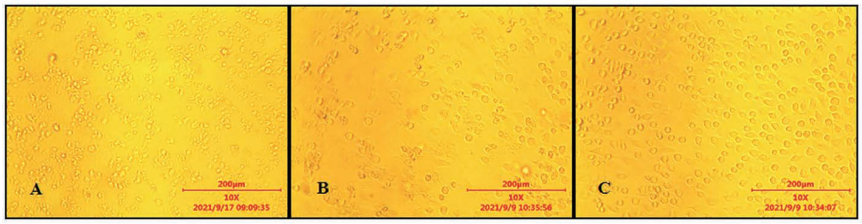
M.DL1000DNA Marker; 22. 阳性对照；23. 阴性对照；1-21. PCR 扩增产物

图 2 部分 RT-PCR 结果

猪业科学 SWINE INDUSTRY SCIENCE

2.2 病毒分离

将采集到的临床样品同步接种于 PAM 细胞，盲传 2~3 代，共得到 33 株可稳定传代的 PRRSV 分离株，PAM 细胞病变为皱缩、裂解并最终脱落。以上分离株细胞液经测序引物检测均能扩增出 GP5 和 NSP2 目的片段，其余临床样本接种 PAM 细胞传至 3 代后仍无细胞病变，经 RT-PCR 检测未得到目的基因，判定为 PRRSV 阴性（图 3）。



A: 接种 48 h 后 PAM 细胞开始出现皱缩、裂解 ; B: 接种 72 h 后细胞已全部脱落 ; C: 正常细胞对照

图 3 PAM 细胞接种结果

2.3 流行病学统计分析

经过 2021 年流调分析结果显示，江西地区检出率最高，山西、内蒙古和江苏次之（图 4）。研究结果显示，各种日龄的猪均易感该病，但以 25 和 80 日龄居多（图 5）。其中以普通型猪蓝耳病为主，高致病性猪蓝耳病数量较少。根据送检样品类别来看，主要送检类别为血样和剖检组织，血液样品检出率最高（图 6）。

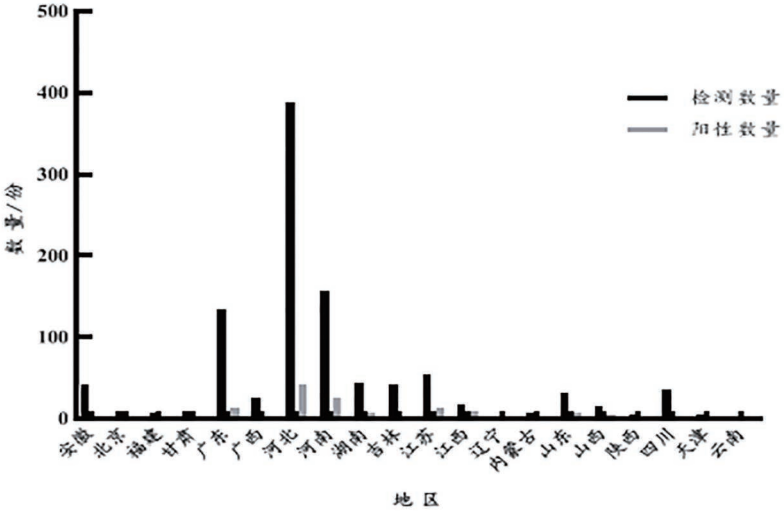


图 4 各地区检测数量与阳性数量

2.4 Nsp2 基因遗传变异性分析

将从临床样本中扩增到的目的基因送至测序公司进行测序，共得到 70 个 Nsp2 序列。

2.4.1 系统进化树显示

经过基因进化树分析发现，70 个 Nsp2 序列均属于美洲型 PRRSV，可分为两个亚群，即亚群 I 和 2（Subgroup1、2）。亚群 I 以 NADC30，MN184C 为代表的普通 PRRSV 分支，亚群 II 是以 VR2332 为代表的经典毒分支。亚群 I 中 65 个序列位与 NADC30 标准毒株和 NADC30 高度同源性的变异毒株 HENAN-HEB/XINX 亲缘关系较近，而与早期的经典毒株如 CH-1a、CH-1R，以及其他代表性毒株均亲缘关系较远。6 个序列位于亚群 II，

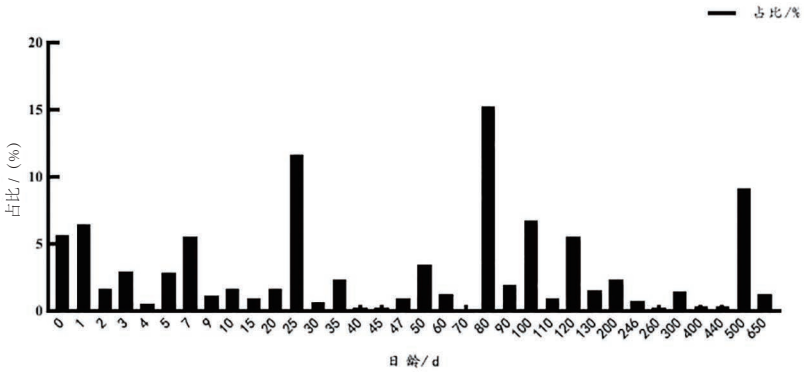


图 5 日龄占比

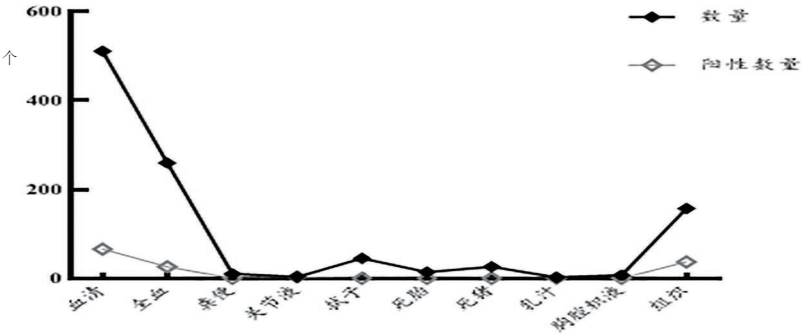


图 6 病料类别与阳性数量

与传代疫苗株 JXA1 亲缘关系最近（图 7）。

2.4.1 Nsp2 同源性和遗传进化分析

经过同源性比对分析发现，亚群 I 中 65 个序列与 NADC30 序列相似度为 71.3%~90.4%。亚群 II 中 6 个序列与 JXA1 相似度为 86.3%~91.8%。两个亚群中的序列与 HP-PRRSV 及经典 PRRSV 均相差较远（图 8）。根据序列比对显示，Nsp2 具有高度变异性，且所有序列均存在氨基酸的不连续缺失。在亚群 I 中的 65 个氨基酸序列与 NADC30 相比，具有相同位置的氨基酸的不连续缺失，而亚群 II 中 6 个氨基酸序列与 JXA1 具有相同位置的氨基酸的不连续缺失，对比发现目前并没有出现新的缺失部位（图 9）。

2.5 GP5 基因遗传变异性分析

本研究测得 GP5 基因序列共有 53 个，系统进化树结果与 Nsp2 相似，分以 NADC30 为代表的亚群 I 和以 VR2332 为代表的亚群 II（Subgroup1、2）

2.5.1 系统进化树显示

NADC30 标准毒株与 NADC30 高度同源的变异毒株 HENAN-HEB 与 HENAN-XINX，以及 NADC30-like 毒株代表 MN184C 均分布于亚群 I 中，而亚群 I 中的 46 个序列与早期标准毒株以及其他代表性毒株亲缘关系相对较远。亚群 II 中的 5 个序列整体与 JAX1 亲缘关系最近（图 10）。

2.5.2 GP5 同源性和遗传进化分析

53 个 GP5 序列的同源性为 79.4%~100%。亚群 I 中 48 个序列与对照毒株 NADC30 的同源性是 86.6%~95.2%，为最高。亚族 2 中 4

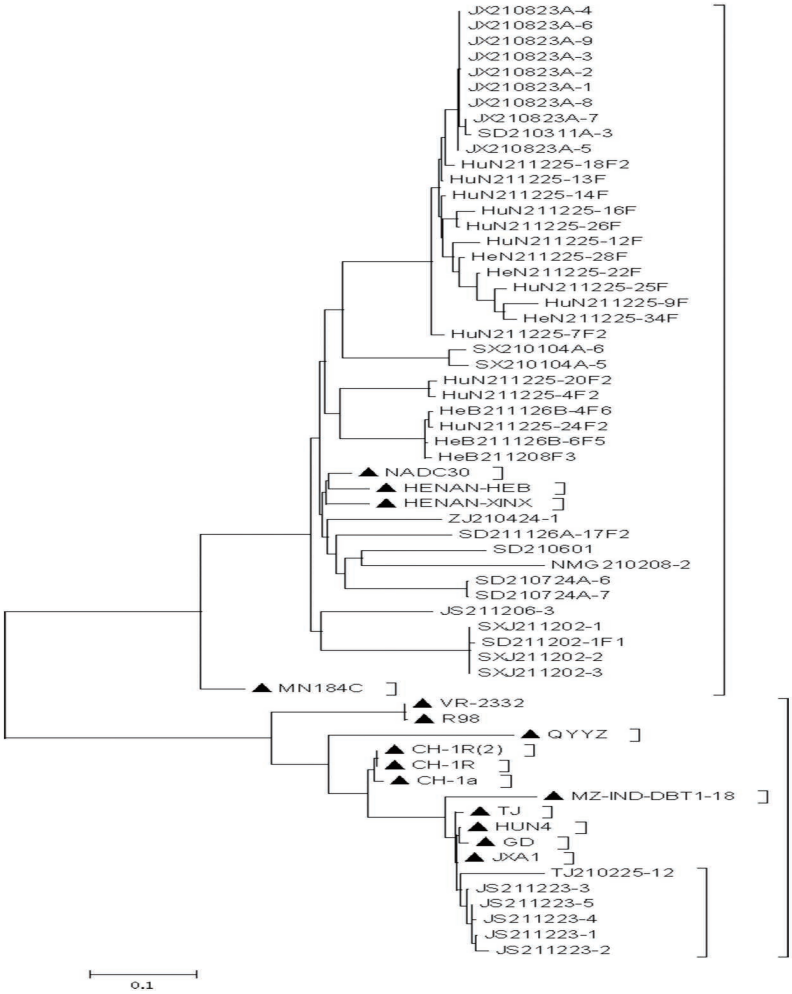


图 7 Nsp2 基因系统进化树

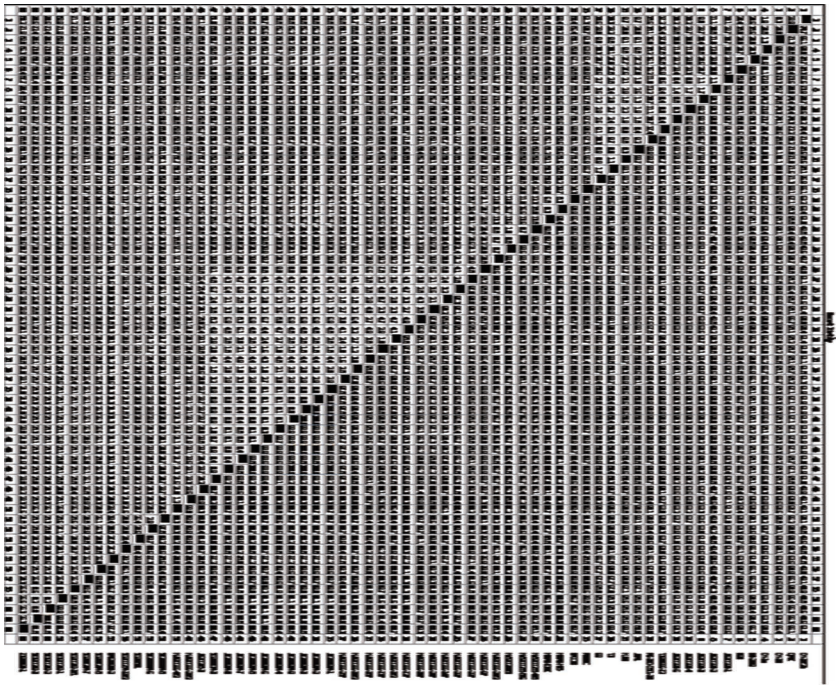


图 8 Nsp2 同源性

个序列与对照序列 JXA1 的同源性最高，为 99.1%~99.4%，另一个与 VR-2332 同源性最高，为 99.2%。两个亚族中的序列经比较均与 HP-PRRSV 相差较远（图 11）。根据序列比对发现，在亚群 I 中每一地区的 GP5 蛋白序列几乎一致，但也存在一些突变位点和缺失，据分析，亚群 I 氨基酸残基在 33，151，192，221 发生了不同程度的突变，亚群 II 则仅在 33 发生了不同程度的突变。所有鉴定毒株在 72 并未产生其他突变，分别为 P 和 L，与参考毒株相符（表 1）。亚群 II 中的 SD210724A-2 与 JAX1 的氨基酸位点几乎一致，其余突变位点与 NADC30 相近。如 54，68，78 等位置均与 NADC30 氨基酸位点相同。整体比较 GP5 相对保守，但此次分析发现在 73 和 74 出现了 6 处氨基酸的缺失部分，分别为 HeB1226B-1/-3，SD210724A-4/-5 以及 SD210601。

表 1 GP5 氨基酸位点分析

毒株	氨基酸位点				
	33	72	151	192	221
NADC30	R	L	A	N	C
CH-1R	R	P	A	D	C
CH-1a	R	P	A	D	C
VR-2332	R	P	A	D	C
MZ-IND-DBT1-18	R	P	A	D	C
JXA1	R	P	A	D	C
MN184C	R	L	A	D	C
R98	R	P	A	D	C
R98(2)	R	P	A	D	C
HUN4	R	P	A	D	C
TJ	R	P	A	D	C
GD	R	P	A	D	C
HENAN-HEB	R	L	A	N	C
HENAN-XINX	R	L	A	N	C
QYYZ	R	P	A	K	C
亚群 I Subgroup I	R/H/C	L	A/V/E	N/D/S/R	Y
亚群 II Subgroup II	R/H	P/L	A	D/N	C

图 9 部分 Nsp2 氨基酸位点分析

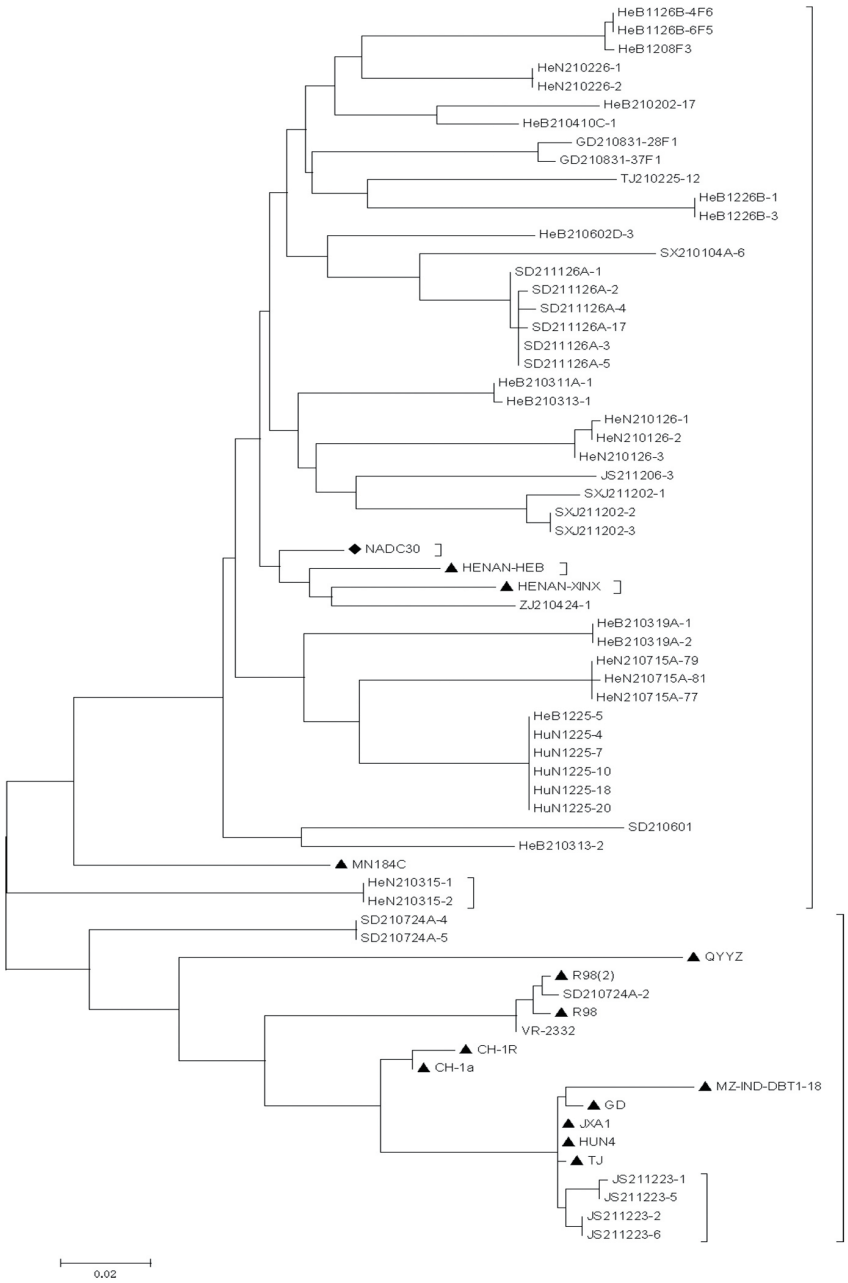


图 10 GP5 基因系统进化树

3 讨论

PRRSV 的欧洲型和美洲型分别是欧洲代表株 LV 和美洲型的毒株 VR2332，在 PRRSV 的基因组中，Nsp2 变异性最高，GP5 次之，且在病毒复制、病毒粒子组装、介导病毒吸附中起着十分重要的作用。通过 Nsp2 与 GP5 基因序列构建的进化分析显示，本研究所有 PRRSV 序列均属于美洲型。其中亚群 I 的所有毒株与 NADC30 毒株亲缘关系较近，根据 NADC30-like 参考毒株 HENAN-HEB/XINX 的比较，这些高度同源性的毒株均为 NADC30-like。以亚群 II 和单独的一株毒株来看，推测为 HP-PRRSV 演化而来的毒株或者是疫苗株。而像 HP-PRRSV 和普通型如 CH-1a 等毒株已经不再占有优势。且经过序列比较发现 Nsp2 的氨基酸序列差异巨大，同源性最低仅为 51.3%，这也符合 Nsp2 为该毒株高变区这一事实，但是不同类型的毒株缺失突变具有规律性，相较于 CH-1a，本实验室分离的 NADC30-like Nsp2 区多存在一段不连续缺失，所有毒株序列的氨基酸缺失位点均相同，并与参考毒株一致。相较于 Nsp2，GP5 的基因变化差异则较为保守，不同毒株的 GP5 蛋白序列均具有较高的相似性，毒株间的同源性最高可达 100%，但此次也发现了 GP5 序列的部分缺失，以及在个别氨基酸位点出现除参考毒株外的新突变，且突变程度较高较复杂，应当在日后加以关注可能出现的其他类似的氨基酸序列的改变和缺失，并推测是否与致病性有关。

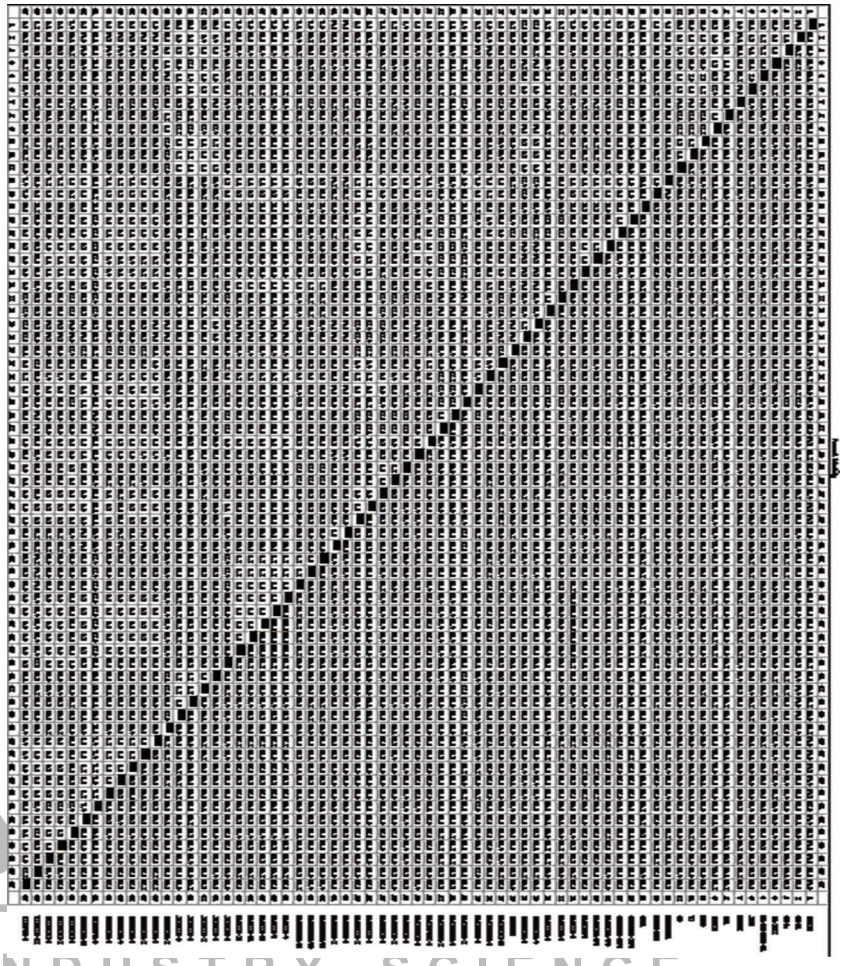


图 11 GP5 同源性

本研究显示 PRRSV 仍具有全国流行性的态势，各个阶段的猪只均易感，并没有明显的季节流行性。检测结果以普通型猪蓝耳病为主，高致病性猪蓝耳病的检出率则已趋向于 0，目前 PRRSV 活疫苗的免疫保护期一般为 4 ～ 5 个月，因此在合适时间进行疫苗或其他合理方式防御该病，控制继发感染，可以降低发病率。但是减毒活疫苗滥用的情况一直存在，不科学的疫苗使用伴随着多种新型毒株的出现，使得我国猪蓝耳病发病变得复杂且难以控制，因此对于猪蓝耳病疫苗的制作与使用应当严格把控。对于此次检测地区来看，送检的类别主要还是以血液为主，此方法可以最大限度的保护被检测猪群，且较为方便。但血清的高送检数量却拥有较低的检出率，应该与发病时间和采样阶段有关，这一点需要在日后检测中加以重视。

综上所述，目前我国 NADC30-like PRRSV 已经取代了 HP-PRRSV 成为了我国主要的流行毒株。对于现有疫苗不能对 NADC30-like 毒株提供完全的保护力的情况看，对于此类新型毒株应该加强调查它的流行规律以及遗传变异情况。本次调查对大量的毒株进行基因组序列的详细分析，为这类病毒的进一步探究和防控提供重要的数据支撑。

（收稿日期：2022-10-26）

猪业科学 SWINE INDUSTRY SCIENCE