



六株 PRRSV 分离毒株的基因组特征与致病性分析

李 刚^{1,2}, 阮胜男^{1,2}, 于学祥^{1,2}, 张 硕³, 白 平³, 李文涛^{1,2}, 何启盖^{1,2}, 江云波^{1,2*}

(1. 华中农业大学 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 武汉 430070; 2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070; 3. 云南西南农牧集团股份有限公司, 昆明 650501)

摘 要: 旨在了解我国当前猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)流行毒株的病原特征与致病性, 探究其重组等变异情况。采集处理病料后使用 Marc-145 细胞和 PAM 细胞连续盲传三代, IFA 检测后空斑纯化, 测序分析分离毒株的全基因组序列, 仔猪感染试验系统评估分离毒株的致病性。结果显示: 本研究分离出 6 株 2 型 PRRSV 毒株, 命名为 WH-2021A、GZ-2021W、SX-2022M、HB-2021A、H-1 和 C-1。WH-2021A、GZ-2021W、SX-2022M 属于 L1.8 的 NADC30-like 毒株, 其中 GZ-2021W 是以 NADC30 为主要亲本, 高致病毒株 HuN4 为次要亲本的重组毒株, SX-2022M 是以 NADC30 为主要亲本, 经典毒株 CH-1a 为次要亲本的重组毒株。HB-2021A 属于 L3.5 QYYZ 分支, H-1 和 C-1 分别属于 L8.7 高致病性毒株和 L5.1 经典毒株。仔猪感染试验发现, WH-2021A 致病性最强, 仔猪死亡率达 100%, 其次是 H-1, 死亡率达 80%, GZ-2021W 和 SX-2022M 两株重组毒株可引起一系列临床病变, 但无仔猪死亡。病理剖检发现感染组猪肺、淋巴结及扁桃体病变均明显。本研究分离到 6 株 2 型 PRRSV 毒株, 探究了其基因组特征和致病性, 为 PRRS 免疫防控提供早期预警以及为 PRRSV-2 的重组进化分析提供重要的数据支撑。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 分离鉴定; 重组分析; 致病性

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1752-07

Analysis of Genomic Characteristics and Pathogenicity of Six PRRSV Isolated Strains

LI Gang^{1,2}, RUAN Shengnan^{1,2}, YU Xuexiang^{1,2}, ZHANG Shuo³, BAI Ping³, LI Wentao^{1,2},
HE Qigai^{1,2}, JIANG Yunbo^{1,2*}

(1. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3. Yunnan Southwest Agriculture and Animal Husbandry Group Co., Ltd., Kunming 650501, China)

Abstract: The aim of this study was to understand the genomic characteristics and pathogenicity of epidemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in China, and to explore their recombination and related variations. Pathological samples were collected, processed, and subjected to three consecutive blind passages in Marc-145 and PAM cells. Plaque purification was performed post-indirect IFA. Complete genomic sequences of the isolated strains were sequenced and analyzed. Piglet infection experiment was conducted for systematic assessment of the strains'

收稿日期: 2025-05-07

基金项目: 国家生猪产业技术体系(CARS-35)

作者简介: 李 刚, 硕士, 主要从事动物传染病流行病学研究, E-mail: gangli@webmail.hzau.edu.cn; 阮胜男, 博士, 主要从事动物传染病研究, E-mail: 2215243751@qq.com; 李刚和阮胜男为同等贡献作者

* 通信作者: 江云波, 主要开展动物病毒性传染病诊断与防控研究, E-mail: jiangyb@mail.hzau.edu.cn

pathogenicity. In this study, six PRRSV type 2 strains were isolated and named WH-2021A, GZ-2021W, SX-2022M, HB-2021A, H-1, and C-1. WH-2021A, GZ-2021W, and SX-2022M belong to NADC30-like strains of L1.8. GZ-2021W is a recombinant strain with NADC30 as the main parent and highly pathogenic strain HuN4 as the secondary parent. SX-2022M is a recombinant strain with NADC30 as the main parent and classical strain CH-1a as the secondary parent. HB-2021A belongs to the L3.5 QYYZ branch, while H-1 and C-1 belong to the L8.7 highly pathogenic strain and the L5.1 classical strain, respectively. Piglets infection experiments showed that WH-2021A had the strongest pathogenicity, and the mortality rate of piglets was 100%, followed by H-1, with a mortality rate of 80%. The two recombinant strains of GZ-2021W and SX-2022M could cause a series of clinical lesions, but no piglets died. Pathological examination showed that the lesions of lung, lymph nodes and tonsils in the infected group were obvious. In this study, 6 epidemic PRRSV strains were isolated, and their genomic characteristics and pathogenicity were explored, which provides early warning of PRRS immune prevention, as well as critical data support for the recombination and evolutionary analysis of PRRSV-2.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; isolation; recombination analysis; pathogenicity

* **Corresponding author:** JIANG Yunbo, E-mail: jiangyb@mail.hzau.edu.cn

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染仔猪后会引起发热、呼吸道症状及高死亡率,感染母猪后会引起流产、死胎等繁殖障碍,给全球养殖业造成了巨大损失^[1]。PRRSV为有囊膜的不分节段的单股正链RNA病毒,基因组极易发生变异。根据地理差异和时空分布,PRRSV可分为欧洲1型(PRRSV-1)和北美2型(PRRSV-2),分别以LV毒株和VR-2332毒株为代表^[2]。由Shi等^[3]于2010年提出的ORF5谱系分类法可将PRRSV-2分为9个不同的谱系(Lineage 1~9),该系统成为PRRSV-2分类的基础。目前PRRSV-2的谱系划分系统不断完善,Yim-im等^[4]于2023年基于全球82 237条ORF5序列,将其更新为11个谱系(L1~L11)和21个亚谱系。在我国流行的PRRSV-2主要是L1、L3、L5和L8。1996—2006年,我国呈现以经典毒株CH-1a为代表性毒株的流行态势^[5]。2006年,高致病性毒株(HP-PRRSV)出现,并在之后的十年间成为我国最主要的流行毒株类型^[6]。2013年起,随着NADC30-like毒株的出现,我国PRRSV的流行毒株已由HP-PRRSV转变为NADC30-like类型。2017年,属于L1.5的NADC34-like毒株也开始逐渐流行,目前,已在我国多个省份快速传播^[4]。PRRSV具有内在的适应和进化能力,在PRRSV流行的近四十年时间里,PRRSV基因组中的核苷酸

及氨基酸的缺失、插入和替换,出现了大量的重组毒株,某些猪场使用不同的疫苗株加剧了重组现象,当前新型重组毒株的重组模式繁杂,呈现明显的基因型和谱系特异性^[7-8]。多种重组毒株的流行易导致PRRS的混合感染,为PRRSV的防控增加了难度^[9]。这些重组病毒在不同PRRSV谱系之间的毒力差异很大,我国目前使用的商业化疫苗主要针对HP-PRRSV,对NADC30-like毒株的交叉保护有限,部分疫苗甚至无法提供有效保护,导致免疫猪群仍频繁暴发疫情^[10]。因此,开展PRRSV流行毒株的分离鉴定及其致病性研究对PRRS的预防与控制具有重要的意义。

本研究通过对我国部分地区PRRSV流行毒株的分离鉴定和遗传分析,揭示当前PRRSV的流行趋势和重组特征,并评估不同毒株的致病性差异,丰富了我国PRRSV流行毒株的遗传信息,为PRRSV的重组机制和致病性研究提供了新的数据支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及试验动物

Marc-145细胞和PAM细胞为本实验室保存。主要试剂:核酸提取试剂购自天根生化科技(北京)有限公司,通用型荧光定量PCR试剂购自北京擎科生物科技股份有限公司,DMEM培养基购自赛默飞

世尔科技公司, ELISA 抗体检测试剂购自北京金诺百泰生物技术有限公司等。试验动物为 28 日龄 PRRSV 抗原抗体双阴性仔猪。

1.2 病毒的分离

从湖北、贵州和陕西四家养殖场采集临床病料,经 RT-qPCR 检测为 PRRSV-2 阳性后,将病料上清接种于 PAM 和 Marc-145 细胞进行病毒分离。经连续三代传代培养,通过 ORF5 基因测序鉴定病毒基因谱系,并通过间接免疫荧光试验确认,最终成功分离到 6 株 PRRSV 毒株。

1.3 全基因组特征分析

设计并合成 8 对覆盖 PRRSV 全基因组的测序引物,测序完成后使用 DNASTAR 软件包中 SeqMan 和 MegAlign 模块及 SnapGene 软件进行序列拼接和比对。采用 Simplot 3.5.1 和 RDP4 软件分析全基因组重组特征。

1.4 仔猪感染试验

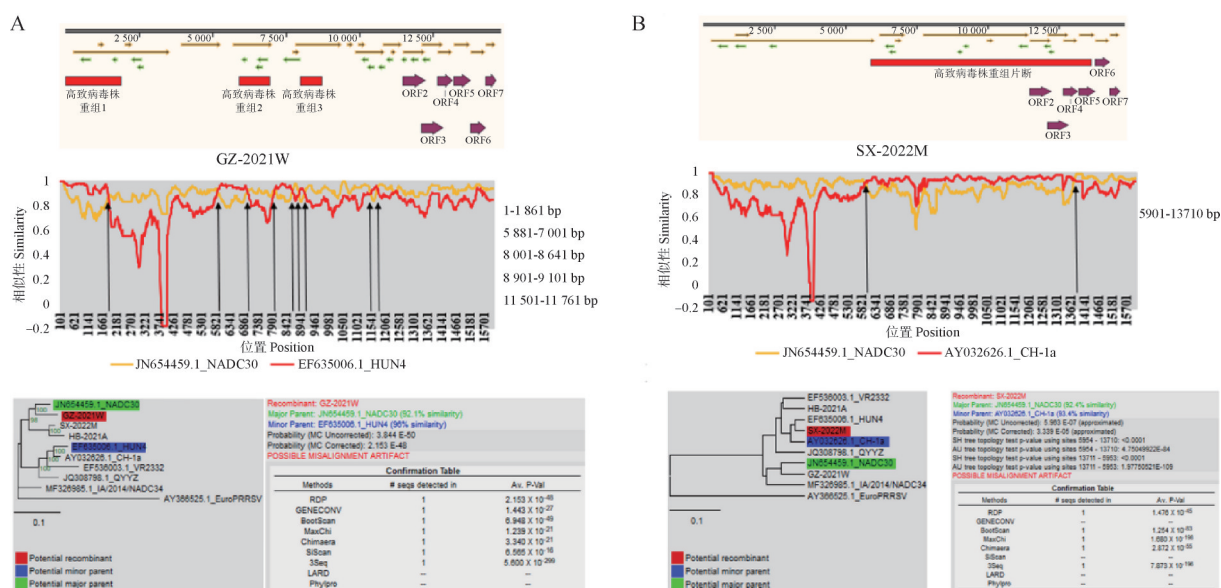
本研究主要验证当前流行毒株 NADC30-like 的致病性,因此选择其中 4 株病毒开展仔猪感染试验,包括重组毒株 GZ-2021W 和 SX-2022M, NADC30-like 毒株 WH-2021A,以及作为对照的高致病性毒株 H-1。19 头 28 日龄 PRRSV 双阴性仔猪随机分为 5 组,其中 GZ-2021W、SX-2022M 和 WH-

2021A 3 组,每组 3 头, H-1 组和阴性对照组各 5 头。每日记录临床症状和体温,每周称重计算日增重。于感染后不同时间点采集抗凝血和口鼻拭子,检测病毒载量、血清 N 抗体水平及中和抗体效价。对中途死亡或感染 28 d 后处死的仔猪,采集扁桃腺、淋巴结、肺、肾和脾组织,分别进行固定,病毒载量检测和 -80°C 保存。

2 结果

2.1 全基因组重组分析

分离到的 6 株 PRRSV 均属于 2 型 PRRSV。使用 Simplot 软件对 6 株分离株的全基因组序列做重组分析,结果显示, GZ-2021W 和 SX-2022M 发现有重组现象,其余毒株无重组现象。RDP4 软件重组分析表明, GZ-2021W 毒株是以 NADC30 毒株为主要亲本,高致病性毒株 HuN4 为次要亲本,重组区域及重组位点为 1 861、5 771~7 001、8 001~8 641、8 901~9 101 和 11 501~11 761 bp (图 1A)。SX-2022M 是以 NADC30 毒株为主要亲本,经典毒株 CH-1a 为次要亲本的重组毒株,重组区域为 5 903~13 710 bp (图 1B)。两种毒株重组事件均通过 GENECONV、Bootscanning、MaxChi 等方法同步验证。



A. GZ-2021W 毒株 RDP4 软件重组分析; B. SX-2022M 毒株 RDP4 软件重组分析

A. Recombination analysis of GZ-2021W strain using RDP4 software; B. Recombination analysis of SX-2022M strain using RDP4 software

图 1 基于全基因组的 GZ-2021W 和 SX-2022M 重组分析

Fig. 1 The recombination analysis of GZ-2021W and SX-2022M isolate based on the whole genomes

2.2 分离毒株致病性

2.2.1 临床症状及检测 体温监测显示,WH-2021A组感染初期体温短暂升高,H-1组出现持续高热,最高可达41.0℃,其余组体温维持在39.5℃左右(图2A)。体重测定中,H-1组与GZ-2021W组日增重显著低于对照组(图2B)。致死率方面,WH-2021A组死亡率为100%,H-1组死亡率为80%(4/5),其余组无仔猪死亡(图2C)。组织病毒载量以WH-2021A组淋巴结最高,达 $10^{9.2}$ copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$,SX-2022M组和GZ-2021W组扁桃体检毒量最高,H-1组肺脏载毒量最高(图2D)。抗凝血中H-1组病毒核酸第5天检出,其余组第3天即可检出,第12天达到峰值,病毒载量可达 $10^{7.5}\sim 10^9$ copies $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (图2E)。口拭子中第3天可检出病毒,第7天达高峰,未死亡个体持续排毒(图2F)。血清N抗体于感染第10天部分阳性,第16天全部转阳,S/P值随时间递增(图2G)。中和抗体效价在21~28 d逐渐上升,28 d时GZ-2021W组达最高(1:10),其余组为1:3~1:10(图2H)。

2.2.2 剖检观察 病理剖检结果显示,感染组肺病变显著,WH-2021A组、GZ-2021W组和H-1组肺心叶和尖叶出现水肿实变,SX-2022M组和H-1组肺表面有不均匀出血;感染组淋巴结肿大、质硬实;扁桃体无明显病变;对照组肺、扁桃体及淋巴结呈粉红色,质地均一,未见病理变化(图3)。

3 讨 论

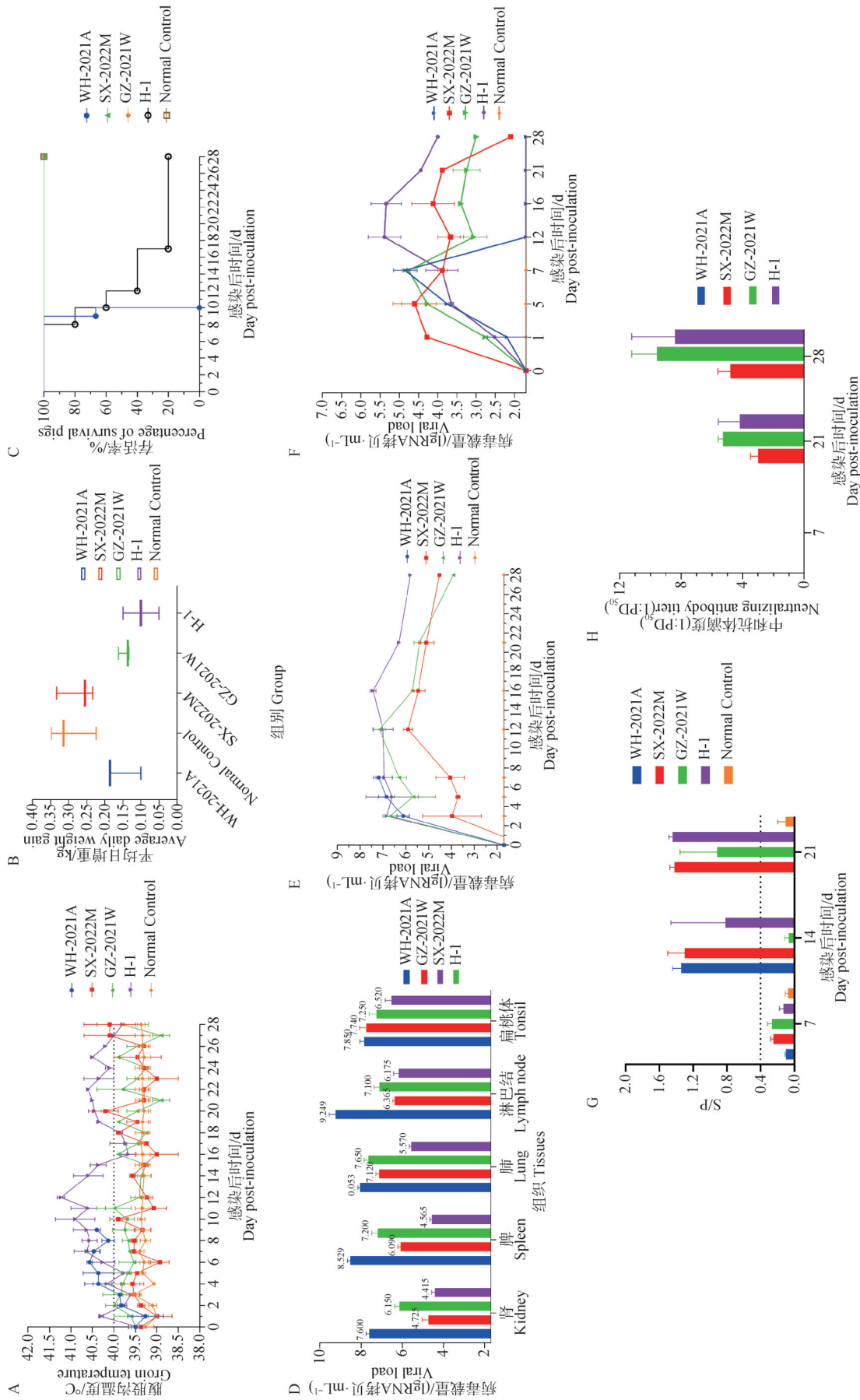
自1996年PRRS被报道以来,近三十年的时间里已给我国生猪养殖行业造成了巨大的经济损失,目前PRRSV仍在我国大部分猪场流行^[11]。虽然已有多种灭活疫苗或减毒活疫苗在猪场被广泛使用,但其免疫效果不尽人意,甚至出现了疫苗株与野毒株交叉重组的现象,反而加重了PRRS病情,而目前也没有针对PRRS治疗效果较好的药物^[12]。

自2013年NADC30-like毒株在我国被报道以来,PRRSV重组情况越来越复杂,时常会有两个或多个谱系的毒株发生重组的现象^[13],如由刘燕燕等^[14]分离的SDhz1512毒株,是由NADC30、经典毒株和HP-PRRSV三种类型毒株自然重组的毒株。重组也带来了毒力的改变,如JL580毒株,其致病性远高于早期的NADC30和经典毒株CH-1a,其毒力与HP-PRRSV相似^[15];有些重组毒株表现为毒力下降,如HNjz15、14LY01-FJ、15LY01-FJ等,仔猪

感染后只表现出较为轻微的临床症状,除了发烧和咳嗽等呼吸系统病症外,没有猪死亡,这一点与最初的NADC30类似^[16]。就本研究分离的两株重组毒株毒力来看,相较于HuN4、GZ-2021W和SX-2022M毒力有明显下降,与最初的NADC30相比,毒力没有显著的提高。没有发生重组现象的WH-2021A毒株同属于NADC30-like,但其毒力较强,仔猪感染后死亡率达100%,与GZ-2021W和SX-2022M毒力相比有显著性差异。这与普遍认为NADC30-like毒株为中低毒力的现象不同,可能出现了非重组依赖的毒力进化路径,如NSP2等毒力相关基因的自发突变积累^[17],提示目前PRRSV可能通过非重组途径突破传统毒力分类,需警惕其流行潜力毒株。GZ-2021W和SX-2022M重组位点和重组片段数量均不相同,但两者毒力差异不显著。目前重组机制尚不清楚,不同重组毒株的重组位点和数量不相同,没有确切的规律可循,这需要研究大量的重组数据才有可能探究到影响毒株毒力进化演变的规律。

从临床症状来看,不同基因型的毒株引发的症状存在差异。NADC30-like毒株导致仔猪出现呼吸系统障碍,而高致病性毒株则引起较高的死亡率^[18]。由吴宇等^[19]分离的GD-H1和GD-F1毒株,可以导致母猪严重流产,产弱胎、死胎和木乃伊胎,也会引起仔猪高烧、食欲不振和肺部病变等,但没有造成仔猪死亡。这种差异可能与毒株特有的致病机制和毒力基因有关^[20]。本试验中,WH-2021A毒株仅能在PAM细胞上增殖,这与最初的NADC30毒株相似,其余毒株均可在Marc-145细胞上增殖。通过仔猪感染试验及结合部分病毒分离猪场的临床症状分析,整体来看,GZ-2021W和SX-2022M毒株感染后未造成猪死亡,发病症状不典型,剖检病变症状轻微。WH-2021A毒株毒力较强,死亡率达100%,剖检病变和发病症状均十分严重与典型。高致病性毒株H-1致病性也较强,仔猪感染后死亡率达80%,其导致的仔猪脏器病变十分明显,如重度肺炎、淋巴结肿大充血显著等。这表明不同基因型的PRRSV毒株对猪群健康的影响存在显著差异^[21],高致病性病毒株的致病力较强,而NADC30-like病毒株的致病力存在较大差异及毒力分化的情况,多数毒株致死率不高,其整体毒力低于高致病性病毒株^[22]。

高频重组带来的后果是新型毒株的不断出现,



A. 体温变化; B. 平均日增重; C. 各组猪死亡情况; D. 组织中病毒载量; E. 抗凝血中病毒载量; F. 口腔病毒载量; G. 血清中 N 抗体变化情况; H. 血清中和效价

A. Changes in body temperature; B. Average daily gain; C. Death of piglets in each group; D. Tissue viral load; E. Anticoagulant viral load; F. Oral viral load; G. Changes of N antibody in serum; H. Serum neutralization titer

图 2 感染后 28 d 内各组临床表现及检测结果

Fig. 2 Clinical manifestations and test results of each group within 28 days after infection

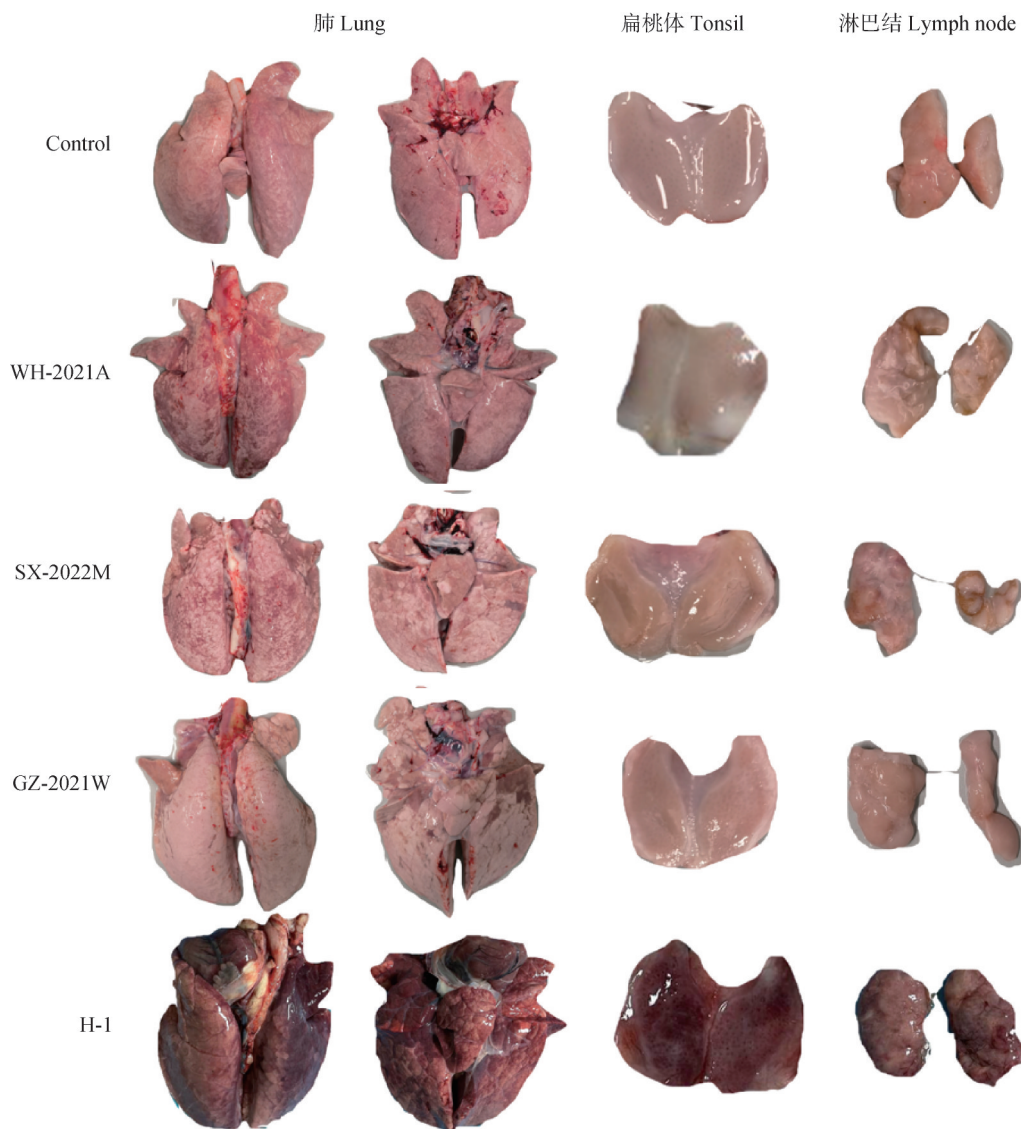


图3 各组脏器剖检图

Fig. 3 Autopsy of each group of organs

毒株的毒力发生变化^[8,23],更加难以预测,这对 PRRS 的防控带来了更大的挑战,也为我国防控策略提出了新的要求。这也提醒猪场在使用 PRRSV 疫苗时尽量选择同一毒株的疫苗,防止疫苗株之间发生重组,一旦出现毒力增强、造成疫情暴发的情况,将为 PRRS 防控带来更大的难度。

4 结 论

本研究从临床分离到 6 株 2 型 PRRSV 流行毒株,其中 GZ-2021W、SX-2022M 为 NADC30-like 重组毒株,其余无重组现象。WH-2021A 致病性最强,其次是 H-1。GZ-2021W、SX-2022M 可引起一系列临床病变,但未造成仔猪死亡。本研究结果丰

富了 PRRSV 的临床数据,为 PRRS 的预警、防控提供科学参考。

参考文献 (References):

- [1] WANG H, FENG W. Current status of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2024, 12(12): 1387.
- [2] TU T, LI Y, ZHANG G, et al. Isolation, identification, recombination analysis and pathogenicity experiment of a PRRSV recombinant strain in Sichuan Province, China [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1362471.
- [3] SHI M, LAM T T, HON C C, et al. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and

- respiratory syndrome viruses [J]. *J Virol*, 2010, 84: 8700-8711.
- [4] YIM-IM W, ANDERSON T K, PAPLOSKI I A D, et al. Refining PRRSV-2 genetic classification based on global ORF5 sequences and investigation of their geographic distributions and temporal changes [J]. *J Virol*, 2023, 11(6): e0291623.
- [5] GUO Z, CHEN 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: 2.
- [6] ZHANG H, LENG C, DING Y, et al. Characterization of newly emerged NADC30-like strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *Arch Virol*, 2019, 164: 401-411.
- [7] WANG X, ZHANG K, MO Q, et al. The emergence and pathogenesis of recombinant viruses associated with NADC34-like strains and the predominant circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in southern China [J]. *Viruses*, 2022, 14: 1695.
- [8] CHEN N, YE M, LI S, et al. Emergence of a novel highly pathogenic recombinant virus from three lineages of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 in China 2017 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65: 1775-1785.
- [9] MONTANER-TARBES S, DEL PORTILLO H A, MONTOYA M, et al. Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV) [J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 38.
- [10] ZHANG H L, ZHANG W L, XIANG L R, et al. Emergence of novel porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (ORF5 RFLP 1-7-4 viruses) in China [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 222: 105-108.
- [11] CASERTA L C, ZHANG J, PIÑEYRO P, et al. Rapid genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) using MinION nanopore sequencing [J]. *PLoS One*, 2023, 18: e0282767.
- [12] LAMBERT M, DELISLE B, ARSENAULT J, et al. Positioning Quebec ORF5 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) within Canada and worldwide diversity [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 74: 103999.
- [13] 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.
- [14] LIU Y Y, LI J, YANG J, et al. Emergence of different recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome viruses, China [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4118.
- [15] LIU J, WEI C, LIN Z, et al. Full genome sequence analysis of a 1-7-4-like PRRSV strain in Fujian Province, China [J]. *Peer J*, 2019, 7: e7859.
- [16] XIA Y, ZHANG T, GONG D, et al. Recombination and mutation in a new HP-PRRSV strain (SD2020) from China [J]. *Viruses*, 2023, 15: 165.
- [17] YU Y, ZHANG Q, CAO Z, et al. Recent advances in porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like research in China: molecular characterization, pathogenicity, and control [J]. *Front Microbiol*, 2022, 12: 791313.
- [18] CUI X Y, XIA D S, HUANG X Y, et al. Recombinant characteristics, pathogenicity, and viral shedding of a novel PRRSV variant derived from twice inter-lineage recombination [J]. *Vet Microbiol*, 2022, 271: 109476.
- [19] WU Y, PENG O, XU Q, et al. Characterization and pathogenicity of two novel PRRSVs recombined by NADC30-like and NADC34-like strains in China [J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2174.
- [20] HUANG B, DENG L, XU T, et al. Isolation and pathogenicity comparison of two novel natural recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome viruses with different recombination patterns in Southwest China [J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12: e04071-23.
- [21] LIU J, LIU C, XU Y, et al. Molecular characteristics and pathogenicity of a novel recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain from NADC30-, NADC34-, and JXA1-like strains that emerged in China [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(6): e0266722.
- [22] LEI Z, JUN H, YANG H C. The evolution and diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *Vet Microbiol*, 2024, 298: 110252.
- [23] 郭振华, 阮海宇, 耿瑞, 等. 1株类NADC30与类JXA1重组的猪繁殖与呼吸综合征病毒基因组遗传特征分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(7): 1677-1687.
- GUO Z H, RUAN H Y, GENG R, et al. Genetic characteristics of a recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus between NADC30-like and JXA1-like [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(7): 1677-1687. (in Chinese)