



兽医临床科学

云南大理地区猪繁殖与呼吸综合征病毒流行株遗传进化特征

李志敏¹, 袁鸿胜¹, 王研¹, 杨蔚¹, 王凤刘², 朱培英³, 李文贵^{3*}

(1. 大理州动物疫病预防控制中心, 云南大理 671000; 2. 宾川县动物疫病预防控制中心, 云南宾川 671600; 3. 云南农业大学 动物医学院, 云南昆明 650201)

摘要: 采用 RT-PCR 和 ELISA 技术, 以大理各地区采集的 4 800 份猪肺脏和脾脏为实验材料, 经 RNA 提取、浓度检测、反转录、RT-PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测、测序、毒株序列进化树分析等步骤, 分析大理地区猪繁殖与呼吸综合征流行情况。结果显示: (1) 阳性样品有 5 份, 其余 4 795 份样品均为阴性, 阳性率仅为 0.104%。(2) 阳性样品测序对比发现均为高致病性 PRRSV 感染。(3) 经 Nsp2 基因测序、序列比对和遗传进化树分析, 5 份样品均属于 JXA1 毒株。研究发现大理地区 PRRSV 流行毒株是 JXA1 毒株, 目前防控效果良好。由于变异毒株不断出现, 市售商品化检测试剂存在漏检, 应基于分子流行病学信息建立特异检测方法, 避免监测工作中的漏诊。此外, 科学合理选择使用疫苗防控, 严格做好生物安全措施和生猪引种调运监管工作。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征; 分子流行病学特征; 大理地区; RT-PCR 检测

[中图分类号] S855.3 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2025)-02-0001-05

Molecular Epidemiological Characteristics of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome in Dali

LI Zhimin¹, YUAN Hongsheng¹, WANG Yan¹, YAN Wei¹,WANG Fengliu², ZHU Peiying³, LI Wengui^{3*}

(1. Dali Animal Disease Control and Prevention Center, Dali, Yunnan 671000, China; 2. Binchuan County Animal Disease Prevention and Control Center, Binchuan, Yunnan 671600, China; 3. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract: RT-PCR and ELISA techniques were used to analyze the prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Dali using 4 800 porcine lungs and spleens collected from various districts of Dali as experimental materials. After RNA extraction, concentration detection, reverse transcription, RT-PCR amplification, agarose gel electrophoresis detection, sequencing, and phylogenetic evolution tree analysis of the strains sequences. The results showed that: (1) There were 5 positive samples, while the remaining 4 795 samples were negative, with a positive rate of only 0.104%. (2) Sequencing comparison of

the positive samples revealed that they were all highly pathogenic PRRSV infections. (3) After Nsp2 gene sequencing, sequence comparison and phylogenetic tree analysis, all 5 samples belonged to the JXA1 strain. The study found that the prevalent strain of PRRSV in Dali is the JXA1 strain, which is currently well prevented and controlled. Due to the contin-

[收稿日期] 2024-10-09

[基金项目] 云南省国际科技特派员项目(202203AK140015); 云南省兽医公共卫生国际联合研发中心(202403-API140033)

[第一作者] 李志敏(1979-), 男, 主要从事动物疫病防控工作。E-mail: 104765843@qq.com

* [通信作者] 李文贵, E-mail: wengui@yeah.net

uous emergence of mutant strains, there is leakage of commercially available commercial testing reagents, and specific testing methods should be established based on molecular epidemiological information to avoid leakage in the monitoring work. In addition, the use of vaccines for prevention and control should be scientifically and rationally selected, and biosecurity measures and regulation of pig introduction and transfer should be strictly done.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome; molecular epidemiological characteristics; Dali prefecture; RT-PCR detection

猪繁殖与呼吸综合征(俗称猪蓝耳病)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的一种猪的烈性传染病,临床主要表现为母猪流产、死胎或者生长育肥各阶段猪群呼吸道症状。中国于1996年分离出经典 PRRSV^[1]毒株;2006年分离到的 PRRSV 是以 Nsp2 蛋白的氨基酸发生不连续缺失为遗传标志的高致病性 PRRS(HP-PRRS)^[2],给中国养猪业造成了巨大的经济损失。

近年来,PRRSV 新变异毒株不断出现。传入中国的北美流行毒株 NADC30,经遗传变异为 NADC30-like PRRSV 新毒株,已经在中国河南、河北、山西、四川、广西、广东等地区流行。2013~2014年中国已出现新的变异 HP-PRRSV 毒株,并在吉林、黑龙江等几个省份传播扩散,该重组 HP-PRRSV 由 NADC30 毒株与国内 HP-PRRSV 毒株进行遗传重组而成,该重组变异株具有很强的致病性。2017年6月,该病毒权威专家杨汉春教授指出,由中国 HP-PRRSV 变异株类 MLV(高致病性 PRRSV 减毒活疫苗)与类 NADC30 发生重组后具有中等毒力的毒株重组 2 型 PRRSV(TJnh1501)已在中国开始传播。可见,PRRSV 变异性较快,毒株种类较多,给猪场防疫带来困难。

猪蓝耳病流行特点为分布广泛,难以根除;病毒持续性感染,发病呈非典型化,亚临床感染,给临床诊断带来困难;病原出现变异,且变异后的病原毒力增强,导致原有疫苗免疫能力下降;容易导致免疫抑制,进而激发感染猪瘟、圆环、伪狂犬等。因此,加强实验室监测,确定毒株型,提高诊断准确度,是防控该病的有力措施。

目前,检测 PRRSV 和 HP-PRRSV 感染的方法主要有逆转录环介导等温扩增技术(RT-LAMP)、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)、血清中和试验(SNT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和荧光定量

RT-PCR 等,其中最常用的方法是 ELISA 和 RT-PCR,但前者无法区分所检测出来的抗体是来自野毒抗体还是疫苗抗体;而运用 RT-PCR 法操作简便,特异性强。

为了解大理 PRRS 流行情况及流行毒株生物学特征,本研究使用 RT-PCR 方法,对大理地区监测样品进行 PRRSV 分子流行病学调查分析,同时以 Nsp2、ORF5 及 ORF7 等 3 个基因为靶基因进行检测,PCR 产物进行测序,然后使用软件进行毒株同源性分析,建立疫情风险评估方法。

1 材料和方法

1.1 材料

样品来源:根据 PRRS 监测与流调计划,每季度在各县(市)按照配额抽样方法,在全州 12 县市生猪定点屠宰场(点)随机采集脾脏和肺脏,要求全年采集样品覆盖所有县(市)。2018~2019 年共采集肺、脾各 4 800 份,先检测肺脏样品,对于阳性样品再进一步检测脾脏样本。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 DEPC 水、三蒸水、75%和无水乙醇、氯仿、异丙醇、Trizol 试剂、dNTP 和 RNA 酶抑制剂、10×Loading buffer、DNase Stop Solution、M-MLV Reverse Transcriptase、Random primer、Premix Taq 酶、DNA marker、琼脂糖、TAE 溶液、猪繁殖与呼吸综合征病毒通用型 RT-PCR 检测试剂盒、高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 检测试剂盒。

1.2.2 引物设计 为检测本地可能出现的变异毒株,综合 GB/T 18090—2008 猪繁殖与呼吸综合征诊断方法^[3]中所用 ORF7 引物,纪爱英等^[4] ORF7 引物;王文亮等^[5] Nsp2 基因引物。GB/T 27517—2011 鉴别猪繁殖与呼吸综合征病毒高致病性与经典毒株复合 RT-PCR 方法中引物 P₁, P₂ 和共用下游 P₃;根据 4 条 PRRSV 变异株全序列(1-HeB、2-HuB、3-JXA1、4-HuB1,对应的序列号分别为:EF112445、EF112446、EF112447、EF075945)和 1 株 PRRSV 美洲株 VR-2332 株(AY150564)序列进行比较,获得变异株核苷酸缺失区域和核苷酸保守性信息,设计两对引物(表 1),送苏州金维智生物科技有限公司合成^[6-7]。

1.2.3 RNA 的提取及目的基因的扩增 在冰上取 50 mg 组织放入 2 mL 试管,用剪刀剪碎后加入 0.8 mL TRizol 试剂,用电动匀浆器进行匀浆处理;将匀浆样品在室温放置 10 min,使核酸蛋白复合物完全

分离;每管加入 0.2 mL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温放置 5 min。4 °C 10 000 r/min 离心 15 min,匀浆后样品分三层,向新的 1.5 mL Ep 管中吸取上层水相,记录体积,加入等体积预冷的异丙醇,室温放置 10 min。在 4 °C 以 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 75% 的乙醇洗 3 次;将 EP 管放在已经灭菌的卷纸上,室温干燥 5~10 min;加入适量 DEPC 水,RNA 充分溶解后测量浓度,调 RNA 浓度为 1 000 ng/ μ L(小于该值的样品则不调,大于 500 ng/ μ L 才能使用)再进行后续操作。对 RNA 用不含 RNA 酶的 DNA 酶处理后,采用两步法进行反转录。以 cDNA 为模板,反应体系为 50 μ L。上、下游引物各 1 μ L,模板 2 μ L,灭菌水 21 μ L,Premix Taq 酶复合物 25 μ L,混匀。在 PCR 扩增仪上根据各引物的条件进行扩增。PCR 产物进行电泳分析,配制 1%~2% 琼脂糖胶,将 PCR 扩增产物 6 μ L 和 DNA marker 进行点样,100 V 电泳 25 min,用凝胶成像分析系统观察并拍照记录。

表 1 HEV 检测引物

Table 1 Primers for HEV detection

引物名称	引物序列	产物长度 /bp
ORF7F	5'-AGCCAGTCAATCAGCTGTG-3'	400
ORF7R	5'-CAGCATCACCTCAGCATGA-3'	
Nsp2F	5'-CTGTTCGGTGGTCCCCTCAA-3'	400
Nsp2R	5'-ACACGCCAAAATACTCAGC-3'	

2 结果与分析

2.1 RNA 提取

溶解好的 RNA 上、中、下三次检测浓度,结果相近,表示 RNA 溶解完全,其浓度均 $>0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,

且 $A_{260}/A_{280} \approx 2.0$;提取的 RNA 经甲醛变性胶检测,28S、18S 和 5S 条带清楚,且 28S 与 18S 的比值大于 2:1,说明提取的 RNA 完整性完好。提取的 RNA 纯度符合要求。

2.2 试剂盒检测

试验初,取部分宾川、弥渡、祥云样品 RT-PCR 检测,并且采用某公司市售的经典和高致病型猪蓝耳病 RT-PCR 检测试剂盒进行检测,发现所有试验样品均为阴性。

2.3 普通 PCR 检测

本研究从大理 12 个县市脾脏和肺脏样本共为 4 800 份,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 35 min 后,结果如图 1,可见约 400 bp 特异性条带。检测出 ORF7 400 bp 阳性样品共计 5 份,同时用 Nsp2 400 bp 片段检测同样检测出阳性样品共计 5 份,阳性率仅为 0.104%。

2.4 核苷酸同源性分析

将获得的 5 株 ORF7 400 bp 和 5 株 NSP2 400 bp 片段进行序列对比发现检测出阳性样品测序结果同源性 100%。所得 ORF7 和 NSP2 序列命名为:ORF7 Yunnan 和 NSP2 Yunnan。用 DNASTar、DNAman 进行同源性分析,ORF7 Yunnan 扩增片段与 21 株参考序列核苷酸同源性为 88.9%~100%。

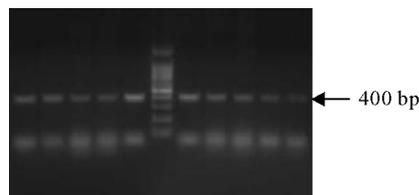


图 1 400 bp RT-PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of 400 bp RT-nPCR products

		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	
离散度	1	97.8	94.4	98.1	97.2	97.2	97.5	97.5	97.5	95.7	90.4	96.3	89.5	89.7	90.4	98.8	89.8	89.8	90.4	89.5	97.8	97.8	1	
	2	2.2	94.1	99.4	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	2
	3	5.9	6.2	94.4	93.5	94.1	93.8	94.4	93.8	93.2	92.9	93.8	91.4	90.9	92.3	94.1	91.0	91.0	92.9	92.6	94.1	94.1	94.1	3
	4	1.9	0.6	5.9	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	4
	5	2.8	0.9	6.9	0.9	98.8	98.8	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	5
	6	2.8	0.9	6.2	0.9	1.3	98.8	98.8	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	6
	7	2.5	0.3	6.5	0.9	1.3	1.3	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	7
	8	2.5	0.6	5.9	0.6	0.9	0.3	0.9	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	8
	9	2.5	0.6	6.5	0.6	0.9	0.9	0.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	9
	10	4.5	2.9	7.3	3.5	3.8	2.5	3.2	2.9	3.5	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	10
	11	10.5	10.1	7.6	9.7	10.9	10.9	9.7	10.5	10.5	11.2	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	11
	12	3.8	1.9	6.5	1.9	1.6	2.2	2.2	1.9	1.9	2.2	9.7	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	12
	13	11.6	12.0	9.4	11.6	12.8	12.4	11.6	12.4	12.4	11.2	3.5	11.6	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	13
	14	11.4	11.8	10.0	11.4	12.6	11.8	11.4	11.4	11.8	10.7	6.7	10.7	6.3	95.0	89.3	95.6	97.5	93.4	94.0	89.3	89.3	89.3	14
	15	10.5	10.8	8.3	10.5	11.6	11.2	10.5	11.2	11.2	10.8	2.5	10.5	0.9	5.3	99.1	95.7	94.4	96.6	96.0	90.1	90.1	90.1	15
	16	1.2	2.5	6.2	2.2	3.2	3.2	2.8	2.8	2.8	4.1	10.8	3.5	11.9	11.8	10.8	89.5	89.5	90.1	89.2	97.5	97.5	97.5	16
	17	11.2	10.9	9.8	10.5	11.6	11.6	10.5	11.2	11.2	11.2	4.5	9.7	5.5	4.6	4.5	11.0	95.1	95.4	95.4	90.1	90.1	90.1	17
	18	11.2	12.4	9.8	12.0	13.2	12.4	12.0	12.0	12.8	11.2	7.3	11.2	6.9	2.6	5.9	11.6	5.2	92.9	94.8	88.9	88.9	88.9	18
	19	10.5	10.1	7.6	9.7	10.8	10.8	9.7	10.5	10.5	12.0	4.2	10.5	4.5	7.0	3.5	10.8	4.8	7.6	96.3	90.7	90.7	90.7	19
	20	11.6	11.2	8.0	10.9	12.0	12.0	10.9	11.6	11.6	12.4	4.2	10.9	5.2	6.3	4.2	12.0	4.9	5.5	3.8	89.8	89.8	89.8	20
	21	2.2	0.3	6.2	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3	3.2	10.1	1.6	12.0	11.8	10.8	2.5	10.9	12.4	10.1	11.2	100.0	21
	22	2.2	0.3	6.2	0.3	0.6	0.6	0.6	0.6	0.3	0.3	3.2	10.1	1.6	11.6	11.9	10.9	2.5	10.9	12.4	10.1	11.3	0.0	22
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	

图 2 ORF7 Yunnan 核苷酸同源性分析

Fig. 2 Nucleotide homology analysis of ORF7 Yunnan

与 MN026347 Jilin 同源性最高为 100% (图 2)。NSP2 Yunnan 扩增片段与 22 株参考序列核苷酸同源性为 93%~98.7%，与 MT163314 Jianguo 同源性最高为 98.7% (图 3)。

应用 MEGA 对所得 ORF7 Yunnan 和 NSP2-Yunnan 核苷酸序列进行遗传进化分析,从所构建的系统进化树分析可知本研究所获得的 ORF7 Yunnan 与广东 JX235365 毒株属于同一分支,均属美洲株 JXA1 毒株,说明大理州祥云县阳性样品属

于 HP-PRRSV 中的 JXA1 毒株 (图 4)。Nsp2 基因属于 PRRSV 全基因组高变区,毒株复杂。但此次监测大理流行株变异相对保守所 5 株阳性毒株测序同源性为 100%,NSP2 Yunnan 与 OL422833 毒株在同一分支 (图 5)。

3 讨论

PRRSV 为单股正链 RNA 有囊膜病毒,其基因组全长 15 kb,有 9 个开放阅读框 (open reading frame,

		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	
离 散 度	1	■	99.2	99.0	99.5	99.0	98.7	93.8	99.2	97.9	97.9	98.2	97.7	95.9	97.4	97.9	97.4	97.4	97.9	98.2	97.9	97.2	98.2	1
	2	0.8	■	99.2	99.7	99.2	99.0	94.0	99.5	98.2	98.2	98.4	97.9	96.1	97.7	98.2	97.7	97.7	98.2	98.4	98.2	97.4	98.4	2
	3	1.1	0.8	■	99.5	99.0	98.7	93.7	99.2	97.9	97.9	98.2	97.6	96.1	97.4	97.9	97.4	97.4	97.9	98.2	97.9	97.1	98.4	3
	4	0.5	0.3	0.5	■	99.5	99.2	94.3	99.7	98.4	98.4	98.7	98.2	96.4	97.9	98.4	97.9	97.9	98.4	98.7	98.4	97.7	98.7	4
	5	1.0	0.8	1.1	0.5	■	99.2	94.3	99.7	98.4	98.4	98.7	98.2	96.4	97.9	98.4	97.9	97.9	98.4	98.7	98.4	97.7	98.2	5
	6	1.3	1.0	1.3	0.8	0.8	■	94.0	99.5	98.2	98.2	98.4	97.9	96.1	97.7	98.2	97.7	97.7	98.2	98.4	98.2	97.4	97.9	6
	7	6.6	6.3	6.7	6.0	6.0	6.3	■	94.6	94.8	94.8	94.6	94.6	93.3	94.3	94.8	94.8	94.3	95.3	95.1	94.3	94.6	93.0	7
	8	0.8	0.5	0.8	0.3	0.3	0.5	5.7	■	98.7	98.7	99.0	98.4	96.6	98.2	98.7	98.2	98.2	98.7	99.0	98.7	97.9	98.4	8
	9	2.1	1.8	2.1	1.6	1.6	1.8	5.4	1.3	■	99.5	98.7	98.7	96.9	98.4	99.5	98.4	97.9	99.0	99.7	98.4	98.7	97.1	9
	10	2.1	1.8	2.1	1.6	1.6	1.8	5.4	1.3	0.5	■	98.7	98.7	96.9	98.4	100.0	98.4	97.9	99.0	99.7	98.4	98.7	97.1	10
	11	1.8	1.6	1.9	1.3	1.3	1.6	5.7	1.0	1.3	1.3	■	98.4	96.6	98.2	98.7	98.2	98.2	98.7	99.0	99.2	97.9	97.4	11
	12	2.4	2.1	2.4	1.8	1.8	2.1	5.7	1.6	1.3	1.3	1.6	■	97.2	99.7	98.7	98.2	97.7	98.7	99.0	98.2	97.9	96.9	12
	13	4.3	4.0	4.1	3.8	3.8	4.0	7.2	3.5	3.2	3.2	3.5	2.9	■	96.9	96.9	96.9	95.9	97.9	97.2	96.4	96.1	95.1	13
	14	2.7	2.4	2.7	2.1	2.1	2.4	6.0	1.8	1.6	1.6	1.8	0.3	3.2	■	98.4	97.9	97.4	98.4	98.7	98.4	97.7	96.6	14
	15	2.1	1.8	2.1	1.6	1.6	1.8	5.4	1.3	0.5	0.0	1.3	1.3	3.2	1.6	■	98.4	97.9	99.0	99.7	98.4	98.7	97.1	15
	16	2.7	2.4	2.7	2.1	2.1	2.4	5.4	1.8	1.6	1.8	1.8	3.2	2.1	1.6	97.4	■	99.0	98.7	97.9	97.7	96.6	96.6	16
	17	2.7	2.4	2.7	2.1	2.1	2.4	6.0	1.8	2.1	2.1	1.8	2.4	4.3	2.7	2.1	2.7	■	97.9	98.2	97.9	97.2	96.6	17
	18	2.1	1.8	2.1	1.6	1.6	1.8	4.9	1.3	1.0	1.0	1.3	1.3	2.1	1.6	1.0	1.0	2.1	■	99.2	98.4	98.2	97.1	18
	19	1.8	1.6	1.9	1.3	1.3	1.6	5.1	1.0	0.3	0.3	1.0	1.0	2.9	1.3	0.3	1.3	1.8	0.8	■	98.7	99.0	97.4	19
	20	2.1	1.8	2.1	1.6	1.6	1.8	6.0	1.3	1.6	1.6	0.8	1.8	3.8	1.6	1.6	2.1	2.1	1.6	1.3	■	97.7	97.1	20
	21	2.9	2.7	3.0	2.4	2.4	2.6	5.7	2.1	1.3	1.3	2.1	2.1	4.0	2.4	2.4	2.9	1.8	1.0	2.4	96.4	■	96.4	21
	22	1.8	1.6	1.6	1.3	1.8	2.1	7.4	1.6	2.9	2.9	2.7	3.2	5.2	3.5	2.9	3.5	3.5	2.9	2.7	2.9	3.7	■	22

图 3 NSP2 Yunnan 核苷酸同源性分析

Fig. 3 Nucleotide homology analysis of NSP2 Yunnan

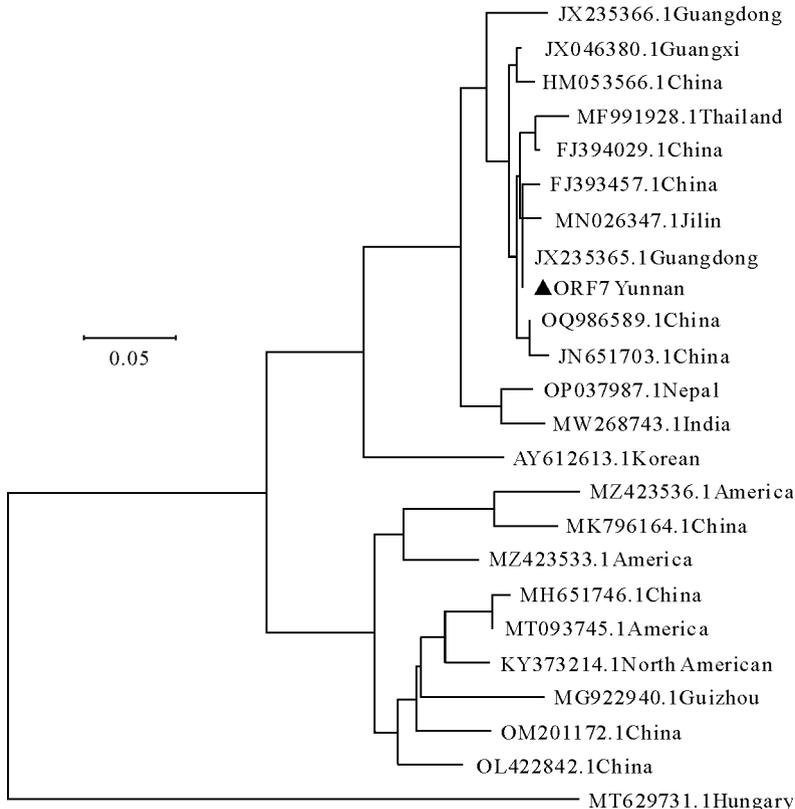


图 4 ORF7 Yunnan 遗传进化分析

Fig. 4 Genetic evolution analysis of ORF7 Yunnan

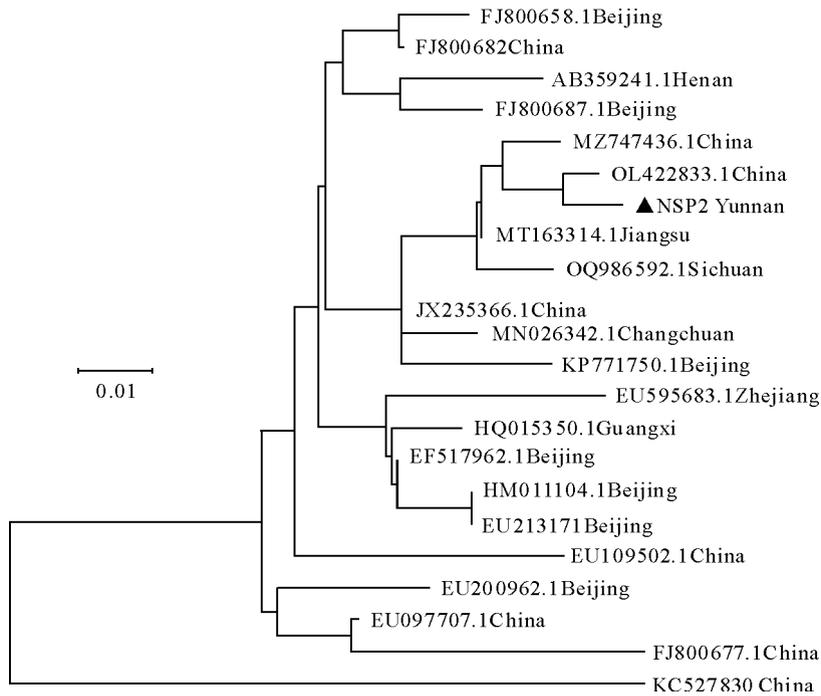


图 5 NSP2 Yunnan 遗传进化分析

Fig. 5 Genetic evolution analysis of NSP2 Yunnan

ORF), 即: ORF1a、1b、2a、2b、3、4、5、6、7。ORF1 编码病毒复制酶, 该酶进一步裂解成 12 种非结构蛋白(Nsp), 其中 Nsp2 变异性最大^[8]。杨汉春教授团队对 2014~2015 年天津地区发病猪场疑似 PRRSV 感染病料进行 Nsp2 基因检测, 结果表明, 天津地区流行的 PRRSV 仍以 HP-PRRSV 为主, 在有经典毒株存在的同时, 又有新的 NADC30-like PRRSV 变异毒株出现。可见, Nsp2 可用于 HP-PRRSV 分子流行病学分析。哈尔滨兽医研究所动物病原监测与流行病学研究团队从吉林省、黑龙江省两个农场中分离得到具有代表性的 JL580 和 HLJ58 的开放阅读框 5(ORF5)序列, 该毒株与 2008 年美国分离得到的中等毒力毒株 NADC30 具有一定的相关性。说明 ORF5 基因也可以作为 PRRSV 进行分子流行病学分析的分子 Marker。ORF7 序列为高度保守, 且是 PRRSV 病毒中含量最多的基因^[9-10]; 该基因编码的核衣壳蛋白 N 在整个病毒蛋白表达水平中最高、免疫原性最强, 试验表明感染 PRRSV 后机体首先产生的是此蛋白的抗体^[11]。可见, Nsp2、ORF5 及 ORF7 基因是目前研究 PRRSV 分子流行病学的重要 Marker。

本研究首先用市售检测试剂盒检测, 没有发现阳性。后对大理当地流行毒株进行序列分析, 设计特异性引物, 建立检测大理州发现的经典型和高风险型特异 RT-PCR 检测方法。应用后发现, 祥云县 5 份样品检测出高风险性 PRRSV, 经 Nsp2 基因测

序、序列比对和遗传进化树分析, 该 5 份样品中检出的病毒同为 JXA1 毒株, 其余样品均为阴性, 检出率 1.04%, 说明近年来大理州 PRRSV 疫情较为稳定, 控制效果显著; 建议祥云县进一步加强 PRRSV 的检测, 被检出阳性的猪场摸清猪群抗体水平, 根据目前疫情状况, 合理选择和使用疫苗进行防控; 严格实施生物安全措施, 严格做好引种和生猪的调运监测工作。

该研究改进了猪蓝耳病检测方法。首先使用血清进行猪蓝耳病病毒抗体 ELISA 检测, 将阳性样品再用 ORF7 基因引物进行 RT-PCR 检测, 阳性者再进行高致病型猪蓝耳病鉴定, 进一步确定其遗传进化关系。证明 ORF7 可以作为经典型繁殖与呼吸综合征病毒阳性猪的检测分子靶标。对云南大理地区 PRRSV 进行流行病学调查发现, 对该类毒株采取综合防控措施, 定期检测 PRRSV 抗原和抗体, 根据检测结果选择与流行毒株相匹配的 PRRS 减毒活疫苗预防该病是有必要的, 同时采取严格的生物安全措施降低 PRRSV 在猪场的循环。加强后备母猪的引种管理, 后备母猪引种后至少需要隔离 60 d, 经检测和观察确定健康后才能入群, 避免引进带毒猪。加强饲养管理, 做好消毒工作, 减少应激, 增强猪非特异性抵抗力。有条件的猪场实行闭群饲养, 定期检测, 这样才能逐步实现猪场 PRRSV 净化。