

猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株的分离鉴定与致病性分析

陈光吉

云南省宣威市落水镇农业农村发展中心

DOI:10.32629/as.v9i1.3638

[摘要] 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)是猪群中常见的重大病毒性疾病,其变异株的出现为疾病防控带来了挑战。随着PRRSV的广泛流行,病毒变异株的分离鉴定及其致病性分析愈发重要。本文探讨了PRRSV变异株的分离方法及其分子特征,通过基因组序列分析和基因型分类,揭示了病毒的遗传变异和流行趋势,有助于优化疫苗研发和病毒防控策略,从而降低猪群的经济损失。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 变异株; 分离鉴定; 分子特征; 致病性

中图分类号: S828 文献标识码: A

Isolation, identification and pathogenicity analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus variants

Guangji Chen

Agricultural and Rural Development Center, Luoshui Town, Xuanwei City, Yunnan Province

[Abstract] Porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV)is a common and significant viral disease in pig populations,and the emergence of its variants presents challenges for disease control.As PRRSV spreads widely,the isolation,identification,and pathogenic analysis of viral variants have become increasingly important.This paper explores the methods for isolating PRRSV variants and analyzing their molecular characteristics.Through genome sequencing and genotype classification,the genetic variations and epidemiological trends of the virus are revealed,which helps optimize vaccine development and virus control strategies,thereby reducing economic losses in pig herds.

[Keywords] Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; Variants;Isolation and identification; Molecular characteristics; Pathogenicity

引言

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)是由一种单链正义RNA病毒引起的疾病,影响全球养猪业。该病毒的流行对猪群健康及经济效益产生了深远影响。PRRSV通过空气传播并且具有较强的变异性,导致了病毒的不同基因型和变异株的产生。随着疫苗研发的不断推进,病毒变异株的出现使得现有疫苗的效果受到威胁,因此,深入研究PRRSV变异株的分离鉴定与致病性分析尤为重要。系统总结PRRSV变异株的分离方法、基因特征及致病性,对其在流行病学和防控中的意义,为PRRSV的有效控制提供理论支持。

1 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的基本概述

1.1 PRRSV的病毒学特征

猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)属于动物流感病毒科,基因组为单链正义RNA,长度约为15.4kb,包含9个开放阅读框。该病毒的结构包括外壳蛋白、膜蛋白、核衣壳蛋白等,具有较强的变异性和免疫逃逸能力。PRRSV主要通过猪的呼吸道和生殖道传

播,感染后病毒能够在宿主体内长期存在,并在免疫系统的压力下发生遗传变异。PRRSV主要分为两大类型:北美型(Type I)和欧洲型(Type II),虽然这两种类型的病毒在基因序列上有明显差异,但它们都具有高度的抗原变异性,导致临床症状的多样性。病毒对外界环境较为稳定,适应能力强,能够在猪体内引起广泛的临床病变,特别是在猪群的繁殖系统和呼吸系统中^[1]。

1.2 PRRSV的流行病学特点

PRRSV在全球范围内广泛传播,特别是在猪养殖业发达的国家和地区。病毒的传播方式多样,可以通过直接接触、空气传播以及带病毒的动物或物资传播。研究表明,PRRSV的流行与气候、养殖管理、猪群密度等因素密切相关。在高密度养殖环境中,PRRSV的传播速度较快,易导致大规模的疫情爆发。该病毒具有显著的季节性,温暖湿润的环境条件更有利于病毒的传播和复制。PRRSV的流行通常呈现出局部爆发与散发的特点,且其临床症状表现多样,包括繁殖障碍、呼吸道症状、免疫抑制等。长期的病毒传播和变异使得疾病防控更加复杂。

1.3 PRRSV的变异现象与研究现状

PRRSV的高变异性是其成为持续传播的重要因素。病毒通过突变和重组迅速演化,导致了多个不同基因型的变异株的产生。特别是在ORF5基因区域,变异株表现出明显的抗原变异,使得免疫系统难以有效识别并清除病毒。研究发现,PRRSV变异不仅限于基因序列的改变,还可能导致病毒在不同猪群中表现出不同的临床症状和致病性。近年来,针对PRRSV变异的研究逐渐增多,重点集中在病毒基因组分析、变异株的流行动态及其对疫苗免疫逃逸的影响等方面。随着分子生物学技术的不断发展,PRRSV变异株的监测和识别能力得到提升,但由于病毒的快速变异,防控工作依然面临挑战。

2 PRRSV变异株的分离方法

2.1 样本采集与病毒分离策略

样本采集是PRRSV变异株分离的关键步骤。通常,从感染猪群中采集呼吸道分泌物、血液、肺部、胎盘或精液等样本。采集时需保证无菌操作,并避免样本污染,确保病毒的活性。在采样过程中,应选择临床症状典型的猪群,尤其是那些表现出呼吸道症状和繁殖障碍的猪。样本应立即在低温条件下运输至实验室,防止病毒降解或失活。样本的保存可采用-80℃冷冻保存,确保其病毒活性不受影响。病毒分离策略通常通过细胞培养法进行,使用猪肺细胞(Marc-145)或其他适合的猪细胞系。细胞培养时,需定期更换培养液,观察细胞病变效应(CPE)的出现,进一步筛选出含有PRRSV的阳性样本。

2.2 病毒分离的实验方法与流程

PRRSV的分离实验通常通过细胞培养技术实现。将采集到的样本接种于Marc-145细胞或其他适合的猪细胞系中,细胞培养环境需要保持在37℃,并在5%的CO₂浓度下进行。接种后,需定期观察细胞的病变效应(CPE),通常在48至72小时内可见CPE的出现。若未见明显CPE,则需通过补充新的培养液并继续观察。在实验过程中,培养液中的病毒可以通过免疫荧光检测法或RT-PCR进行初步检测,确认病毒的存在。PCR扩增的特定基因片段(如ORF5基因)可用于鉴定PRRSV的存在,并确保其在细胞中的成功复制。分离过程中,必要时可采用多次传代培养,进一步提高分离效果并保证病毒的纯度。在实验过程中,应密切监控细胞状态,避免细菌污染的影响。

2.3 分离株的初步鉴定与筛选

分离株的初步鉴定是通过分子生物学技术和免疫学方法进行的。首先,采用RT-PCR技术从细胞培养液中提取RNA,通过反转录生成cDNA并扩增特定的PRRSV基因片段,如ORF5基因。RT-PCR扩增后的产物可通过凝胶电泳进行分离和分析,确定是否存在PRRSV特征性条带。进一步地,可以使用实时定量PCR(qPCR)方法对病毒载量进行定量分析,评估病毒在细胞中的复制水平。为确保分离株的准确性,可通过基因测序技术对PCR产物进行测序,并与已知PRRSV参考序列进行比对,进一步确认其基因型及遗传特征。此外,免疫学方法如免疫荧光法(IFA)或间接ELISA也可以用于确认分离株的抗原性,确保所分离的病毒株

具有特异性抗原。通过这些方法的结合,可以初步筛选出高纯度的PRRSV变异株,为后续的致病性分析和疫苗研究提供重要材料^[2]。

3 PRRSV变异株的分子特征分析

3.1 基因组序列分析

PRRSV的基因组分析通过高通量测序技术获得病毒全基因组序列,常用的平台包括Illumina和Nanopore,这些技术提供了更高的灵敏度和准确性。病毒RNA的提取通常采用TRIzol或RNeasy等试剂盒,确保样本的RNA完整性和纯度。提取后的RNA经过反转录生成cDNA,再使用特定的引物进行PCR扩增,最终构建文库进行测序。测序数据经过过滤和拼接,利用软件如FastQC进行数据质量评估,并使用SPAdes等拼接工具对基因组进行重构。通过与参考基因组的比对,使用BLAST等工具确认序列的准确性。在获得全基因组序列后,可以利用BioEdit和MEGA等软件进行基因型分析和突变点的识别。基因组序列的比较不仅有助于揭示PRRSV的遗传变异,还能够预测病毒的免疫逃逸能力,为疫苗研发提供重要的基因信息。通过多次测序和交叉验证,能够确保基因组序列的高质量,从而为后续的研究和病毒的流行监测提供数据支持。

3.2 基因型分类与变异热点分析

PRRSV的基因型分类通常基于ORF5基因区域的序列差异。ORF5基因是PRRSV的一个关键免疫原性基因,其变异影响病毒的免疫逃逸和疫苗效果。在基因型分类中,首先通过多序列比对分析,使用软件如MEGA和ClustalW进行序列比对,构建进化树。进化树可以揭示病毒之间的遗传关系,帮助区分不同的基因型和亚型。在基因型分析中,常见的PRRSV基因型包括北美型(Type I)和欧洲型(Type II)。在这些基因型中,ORF5基因是变异最为显著的区域,其突变常常导致抗原结构的改变,从而使得疫苗产生免疫逃逸。通过SNP分析和突变位点的识别,能够确定病毒的变异热点,这些热点通常集中在病毒的免疫相关区域,表明这些区域的突变对于病毒的适应性和致病性至关重要。变异热点的监测有助于病毒的流行预测和疫苗的针对性调整,从而提高疫苗的防控效果。

3.3 变异株的遗传变异与流行趋势

PRRSV的遗传变异主要是由高突变率和基因重组驱动的,病毒的RNA基因组没有校正机制,因此变异速率较快。通过全基因组序列分析,可以识别出基因组中的SNPs、插入/缺失(Indels)等遗传变异。研究发现,PRRSV的遗传变异集中在一些与免疫逃逸相关的基因区域,如ORF5和ORF7区域,这些区域的变异直接影响病毒的抗原性。根据不同地区和时间段的病毒序列数据,变异株的流行趋势呈现出地区性差异和时间依赖性。在某些地区,PRRSV变异株的遗传变异加速,导致新的基因型或亚型的出现,这些新型变异株可能具有更强的传播能力和致病性。通过分子流行病学分析,结合地理信息系统(GIS)技术,可以追踪病毒的传播路径和变异模式。变异株的流行趋势和遗传变异的积累,也为全球范围内PRRSV的防控和疫苗研发带来了挑战,尤其是在

疫苗的免疫覆盖范围和有效性方面^[3]。因此,定期的病毒监测和基因组分析是控制PRRSV传播和防治病毒变异的重要手段。

4 PRRSV变异株的致病性分析

4.1 动物实验模型的建立与观察

PRRSV的致病性研究通常通过猪实验模型进行,猪作为PRRSV的天然宿主,能够更真实地反映病毒的致病性。实验猪通常选取健康的、无免疫接种史的种猪,确保实验数据的准确性和代表性。猪的接种方法包括气道、腹腔或静脉接种等,接种后需观察猪的临床表现,包括体温、食欲、呼吸频率等生命体征。实验过程中,通过定期采集血液、肺、肝、脾、肾等组织样本进行病毒载量检测,并进行组织学分析。在观察临床症状时,通常记录猪的呼吸急促、发热、厌食、体重减轻等症状。同时,定期测量猪的体温和呼吸频率,以评估病毒的致病性和猪的免疫反应。通过这些实验数据,可以初步评估PRRSV变异株的致病性差异,并为后续的免疫学研究和疫苗优化提供依据。

4.2 致病性分析指标与临床表现

PRRSV变异株的致病性分析主要依赖于一系列临床表现和病毒学指标的综合评估。常见的致病性指标包括临床症状、病毒载量、免疫应答及组织损伤。实验猪接种病毒后,通常表现出高烧、呼吸急促、体重减轻、厌食等典型症状。此外,通过病毒载量分析,如qPCR和RT-PCR,可以定量检测病毒在血液、呼吸道及其他器官中的分布情况,病毒载量较高通常伴随着更严重的临床症状。通过观察这些症状和检测指标,可以全面了解变异株的致病性和病毒在猪体内的扩散能力。此外,临床症状的严重程度和持续时间也可以反映病毒株的致病性差异,临床研究提供了重要的依据来判断哪些变异株具有较高的致病性,从而影响疫苗的设计和防控措施。

4.3 免疫应答与组织病理学变化

PRRSV的免疫应答通常表现为血清中PRRSV特异性抗体的产生及T细胞反应的增强。在免疫应答研究中,常通过ELISA或Western blot方法检测猪血清中的特异性抗体水平,同时使用

流式细胞术分析T细胞的亚群和免疫反应。免疫应答的强弱直接影响猪的抗病毒能力,较强的免疫应答有助于减少病毒的复制和传播。组织病理学分析是评估PRRSV致病性的重要手段。通过对感染猪的肺、心脏、肝脏等组织进行组织切片,使用HE染色和免疫组化染色,可以观察到典型的组织病变,如肺炎、免疫细胞浸润、组织坏死等。免疫组化染色能够进一步确定病毒在组织中的分布,帮助揭示病毒的传播途径和致病机制。通过免疫学和病理学的双重分析,能够全面了解PRRSV变异株的致病过程,为疫苗研发和防控策略提供理论依据^[4]。

5 结语

PRRSV变异株的分离鉴定与致病性分析为理解该病毒的演变和防控提供了重要依据。通过基因组序列分析、基因型分类与致病性实验,揭示了PRRSV变异株的遗传特征及其对宿主免疫系统的影响。病毒的变异不仅加剧了疫苗的免疫逃逸,还导致了临床症状的多样性。未来应加强病毒监测,优化疫苗设计,提升防控策略的针对性和有效性,从而降低PRRSV对养猪业的经济损失。

[参考文献]

[1]漆启文,王永富,张乐宜,等.鉴别猪繁殖与呼吸综合征2型病毒4种变异株分型RT-PCR方法的建立和应用[J].四川农业科技,2025,(06):104-108.

[2]李文忠,荣新利,刘野,等.天津地区猪繁殖与呼吸综合征病毒流行毒株ORF5基因的克隆及遗传变异分析[J].中国动物传染病学报,2025,33(02):156-164.

[3]覃珍珍,王志远.我国猪繁殖与呼吸综合征病毒ORF5基因变异及全基因组重组分析[J].中国猪业,2024,19(06):66-75.

[4]李玉茹.猪繁殖与呼吸综合征的诊断与防控措施[J].畜牧业环境,2024,(21):116-117.

作者简介:

陈光吉(1971--),男,汉族,云南宣威人,本科,高级畜牧师,主要研究方向为家畜动物养殖。