

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.02

一株猪高致病性蓝耳病病毒的 分离鉴定与遗传变异分析

张维达, 杨康, 李自力*

(农业微生物学国家重点实验室, 华中农业大学动物医学院, 湖北省预防兽医学重点实验室, 武汉 430070)

[收稿日期] 2019-11-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)02-0007-09 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为研究猪蓝耳病病毒(PRRSV)的遗传进化规律,于2018年从新疆某猪场采集的病猪血液中分离了一株 PRRSV,命名为 XJ-b。对临床样品采用 RT-PCR 扩增鉴定,将阳性样品过滤处理之后接种在 Marc-145 细胞系进行培养,将盲传 3 代之后出现病变(CPE)的 Marc-145 样品进行间接免疫荧光鉴定。通过噬斑纯化后,利用 RT-PCR 对分离株的全基因组进行扩增,使用 SeqMan 软件对测序结果进行拼接,并根据 NCBI 上已公布的 PRRSV 全基因组及 Nsp2 基因核苷酸序列进行遗传进化与同源性比对分析。结果表明,临床病料 RT-PCR 检测呈 PRRSV 核酸阳性,处理后的病料接种至 Marc-145 细胞 72 h 之后产生 CPE,间接免疫荧光鉴定为 PRRSV 抗原阳性;序列拼接显示分离株全基因组开放阅读框大小为 15119 bp;全基因组和 Nsp2 基因核苷酸序列分析和同源性比对显示该分离毒株属于中国的高致病性 PRRSV 亚群。研究结果可为近年来新疆地区 PRRSV 的毒株差异分析提供参考。

[关键词] 猪高致病性蓝耳病病毒;分离;Marc-145 细胞;基因组;进化分析

Isolation, Identification and Genetic Variation Analysis of a Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

ZHANG Wei-da, YANG Kang, LI Zi-li*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University,

Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine in Hubei Province, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: LI Zi-li, E-mail: lizili@mail.hzau.edu.cn

Abstract: In order to study the genetic evolution of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a PRRSV strain was successfully isolated from the blood of suspected PRRSV infected pigs in Xinjiang Uygur Autonomous Region in 2018, named as XJ-b. In this study, the Marc-145 cell line was used to isolate and culture the clinical

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YED0500800)

作者简介: 张维达, 硕士研究生, 从事 PRRSV 感染与免疫研究。

通讯作者: 李自力。E-mail: lizili@mail.hzau.edu.cn

material. The isolate was subjected to examinations by RT - PCR, plaque test, IFA identification. After plaque purification, the complete genome of the isolate was amplified by RT - PCR, spliced by SeqMan software, and genetically evolved with the PRRSV whole genome and Nsp2 gene nucleotide sequences published on the NCBI. The results showed that clinical material was positive of nucleic acid of PRRSV. The CPE of Marc - 145 cells were appeared after 72 h of post - infection. Antigenicity positive were proved by IFA tests. Sequence splicing showed that the genome - wide open reading frame size of the isolate was 15119 bp. The isolated strain appertained to the highly pathogenic PRRSV subgroup of China according to its whole genome and Nsp2 nucleotide sequence. The results could provide reference for further study of the genetic variation of PRRSV in Xinjiang.

Key words: PRRSV; isolation; Marc - 145 cell line; genome; evolutionary analysis

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又称猪蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起猪的一种繁殖障碍和呼吸系统的高度接触性传染病。病猪和带毒猪是 PRRS 的主要传染源^[1]。PRRSV 主要侵害 90 日龄左右的妊娠母猪和 21 日龄以下哺乳仔猪, 且仔猪和育肥猪是主要的贮存宿主^[2]。PRRSV 能通过接触^[3]、空气^[4]、精液^[5] 和垂直传播进行病毒扩散。初次感染 PRRSV 后病毒在猪体内存在时间与个体差异有关。1996 - 2006 年间, PRRS 在我国呈散发, 很少出现暴发流行。2006 年以后在江西、河南、湖南等省发生了高致病性蓝耳病 (Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, HP - PRRS), 给我国养猪业带来了严重的经济损失, 所以对 PRRSV 的流行病学调查具有重要意义。根据病毒的抗原性, 分离地和基因组差异, PRRSV 被分为欧洲型 (PRRSV 1 型) 和北美洲型 (PRRSV 2 型) 两个经典的血清型, 代表毒株分别为 Lelystad (LV) 和 VR - 2332^[6-7]。而 Nsp2 作为监测 PRRSV 进化和分子流行病学研究的关键蛋白, 它是病毒的多功能蛋白, 在病毒基因组中具有最高的遗传多样性。本研究通过对新疆某规模化猪场疑似 PRRS 发病猪血液中分离获得 1 株 PRRSV 毒株, 经 Nsp2 基因以及全基因组测序鉴定和分析发现该分离毒株属于高致病性 PRRSV 亚群, 其全基因组核苷酸序列与 GD、TJ、HuN4、JXA1 等高致病性毒株属于同一分支, 其同源性在 98.4% ~ 99.4%

之间, 由此确定该分离株为 HP - PRRSV。本研究探讨了新疆地区 PRRSV 分离株的遗传进化规律, 对 PRRSV 在偏远地区的监测、防控以及对未来猪场 PRRS 净化具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 细胞、病料和载体 非洲绿猴肾细胞 (Marc - 145) 由华中农业大学动物医学院吴斌教授课题组馈赠; 临床血样于 2018 年 10 月采集于新疆某猪场出现呼吸困难、体温升高的 45 日保育猪群, 经抗凝血处理后保存在 -80 ℃; PMD - 18T 克隆载体 (批号 6011) 购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂 DMEM 培养基 (批号 AE29422248) 购自 Hyclone 公司, 胎牛血清 (批号 10270 - 106) 购自 Gibco 公司; 高致病性猪蓝耳病活疫苗 JXA1 - R 弱毒疫苗购自武汉科前生物股份有限公司 (批号 20180711), 由华中农业大学动物医学院兽医微生物学与免疫学实验室保存; RT - PCR 两步法试剂盒 (R223 - 01) 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 琼脂糖 (TSJ001) 和 DL2000 DNA Marker (TSJ011 - 100) 购自北京擎科生物科技有限公司; 凝胶回收试剂盒 (批号 CW2302M) 购自康为世纪有限公司; FITC 标记羊抗鼠 IgG 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 引物设计与合成 使用 Nsp2 鉴定引物^[8] 对野毒株进行鉴定。根据 GenBank 公布的 PRRSV GD (EU825724.1) 全基因组序列以及 PRRSV 基因结构 (图 1) 开放阅读框顺序设计了 12 对扩增 PRRSV 的重叠基因片段引物^[9-10] (表 1), 引物

A ~ H 用于扩增 ORF1a 部分,引物 H ~ K 用于扩增 ORF1b 部分,引物 L 用于扩增 ORF2 ~ 4 部分,引物

M 用于扩增 ORF5 ~ 7 部分,引物序列由北京擎科生物科技有限公司合成。

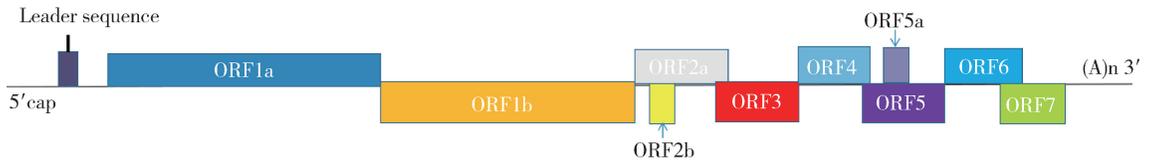


图 1 PRRSV 基因组结构模式图

Fig 1 The structural diagram of PRRSV genome

表 1 PRRSV 全基因组扩增引物

Tab 1 The primers of PRRSV whole genome

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	产物大小 Product Length
PRRSV AF PRRSV AR	5' ATGACGTATAGGTGTTGG 3' 5' GGAACCTGGAGATTCAGAG3'	315bp
PRRSV BF PRRSV BR	5' CTCTCGTGACAGCCCTCTT3' 5' TGGCAGCAGCAATCCTCAAT3'	1964bp
PRRSV CF PRRSV CR	5' AAGGGCGGTCTTGCTTC3' 5' AACTCACAAGCAGTGCCGACT3'	2372bp
PRRSV D F PRRSV D R	5' TGAGCCTCTGGATTGTCTGC3' 5' GCGGATCTCATTAGGAGCAGTT3'	1381bp
PRRSV E F PRRSV E R	5' TGCTTAGGCTTGCCATTGTTG3' 5' ACGGTGTTCAGTGAGGGCTTT3'	1351bp
PRRSV F F PRRSV F R	5' CGGAGGCATGGCTCATAGGTTGAGTTGTAAGGC3' 5' CATCCGGGGCAGGAAAGCATAGGTGCTTAAG3'	1408bp
PRRSV G F PRRSV G R	5' CCTGCTTGCTGCCAAACCCGAAGTGGAAAGGAG3' 5' CACCATCAACCGGTCTGGCAACCGGTGTTG3'	1687bp
PRRSV H F PRRSV H R	5' GAAGTGGCGACCCTGTGACTTTGATC3' 5' CAAGATCAGCTTCAAGGCACCTGCCTAGGACC3'	1464bp
PRRSV I F PRRSV I R	5' CCAACCAAGGACATTCAGAGCCTCCCT3' 5' CCAGGAAGGAGTTCTTGCCAGGACACCAAC3'	1615bp
PRRSV J F PRRSV J R	5' CCAGACGGTGATTACGCTAGTACCGCCTTGCTC3' 5' GTGATGACATCCCCAACGGTGGTACCTTTG3'	1413bp
PRRSV K F PRRSV K R	5' CGGCAGAACTTGCAACCCACTGGCCCGTGGTG3' 5' GCTTCAATAGCGGCAAGATGTTGAAAGTGAGC3'	1517bp
PRRSV L F PRRSV L R	5' CGCTTGATGATCCACTAAGGT3' 5' ACAGACTGCGTAAATGCTACTC3'	2276bp
PRRSV M F PRRSV M R	5' CAACACTACCGCAGCATCAG3' 5' CGGTGCGCCCTAATTGA 3'	2019bp
PRRSV Nsp2F PRRSV Nsp2R	5' ATGTTGTGCTTCTGGGGTTG3' 5' CTTGACAGGGAGCTGCTTGA3'	628bp (NADC30) 931bp (HP - PRRSV) 1021bp (C - PRRSV)

1.4 病料处理和 RNA 的提取 将 2.5 mL 血样病料经过 0.22 μm 滤膜进行过滤,该试验操作均在冰盒上完成。取过滤后的血样加入 750 μL Trizol 和

200 μL 氯仿,振荡混匀,室温静置,离心 15 min;取 500 μL 上清加入等量的异丙醇,颠倒数次,离心 15 min 收集沉淀;75% 酒精洗涤沉淀后,离心 10 min,

弃上清,超净台室温静置 20 min,收集沉淀;20 μ L DEPC 水溶解沉淀即为样品 RNA, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 病毒的分离 将按照步骤 1.4 处理且 RT-PCR 检测呈阳性的血样分别接种于长满单层 Marc-145 细胞的 6 孔细胞培养板内。细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱内吸附 1 h 后弃接种物,并用 1 mL PBS 洗 1 次后每孔补加 2 mL 含 2% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 3~5 d。接种后每天观察细胞状态,将出现细胞病变孔冻融后置于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.6 间接免疫荧光实验 用盲传三代后出现细胞病变的培养物接种 Marc-145 细胞,培养 48 h 后,用 4% 的甲醛固定 30 min。甲醇室温穿透 10 min,再用 2% 的 BSA 37 $^{\circ}$ C 温箱封闭 1 h。使用 1:200 稀释抗 PRRSV GP5 蛋白单克隆抗体于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 1 h,再用 1:500 稀释的 FITC-羊抗鼠 IgG 于 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 45 min,用荧光显微镜观察实验结果,同时设正常细胞作为对照。

1.7 RT-PCR 扩增与核苷酸测序 通过噬斑实验将病毒纯化后,按照 1.4 项步骤提取病毒 RNA,按照说明书进行 RT-PCR 扩增。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,利用胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物,连接到 pMD-18T 载体,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆菌落并鉴定。阳性质粒交给北京擎科生物科技有限公司进行测序。

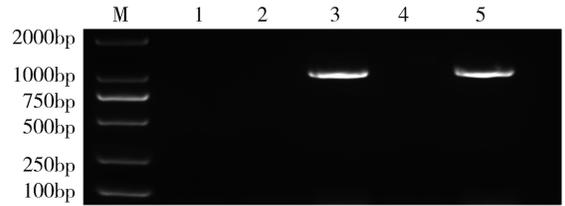
1.8 同源性以及遗传进化分析 采用 SeqMan 根据测序结果进行序列拼接,采用 MegAlign 和 MEGA 等生物信息学软件对分离 PRRSV 全基因组与

GenBank 公布的国内外毒株的全基因组序列进行核苷酸同源性分析及遗传进化分析,使用 DNAMAN 软件进行序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离与鉴定

2.1.1 临床病料的检测 使用 PRRSV Nsp2 特异性引物对临床血样进行 RT-PCR 检测,将 3 号血样扩增产物送至北京擎科生物科技有限公司测序,片段大小为 960 bp。根据表 1 中 Nsp2 基因引物扩增片段大小,判定为高致病性 PRRSV 阳性(图 2)。



M: DL2000 Marker ; 1-3: 临床血样; 4: 阴性对照;

5: JXA1-R 感染的 Marc-145 细胞

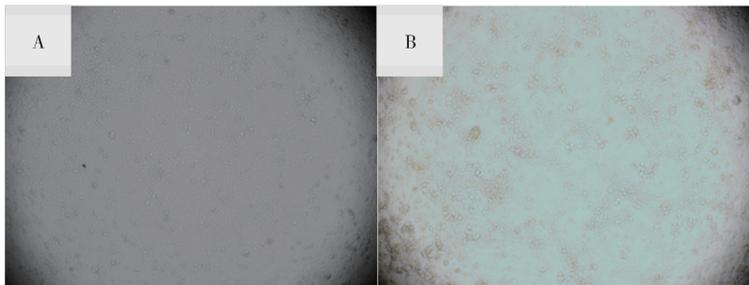
M: DL2000 Marker ; 1-3: blood clinical samples; 4: negative control;

5: Marc-145 cells infected by JXA1-R

图 2 新疆某场血液样品 RT-PCR 检测结果

Fig 2 RT-PCR results of blood samples from a pig farm in Xinjiang

2.1.2 病毒在 Marc-145 细胞上的增殖结果 将检测呈阳性的血样经 0.22 μ m 滤膜过滤后接种 Marc-145 细胞进行增殖培养。感染 72 h 后,相对于空白对照,接种病料的 Marc-145 细胞出现明显的细胞病变(CPE),表现为细胞聚集成簇、变圆和脱落(图 3)。



A: 正常 Marc-145 细胞; B: 接种培养物的 Marc-145 细胞

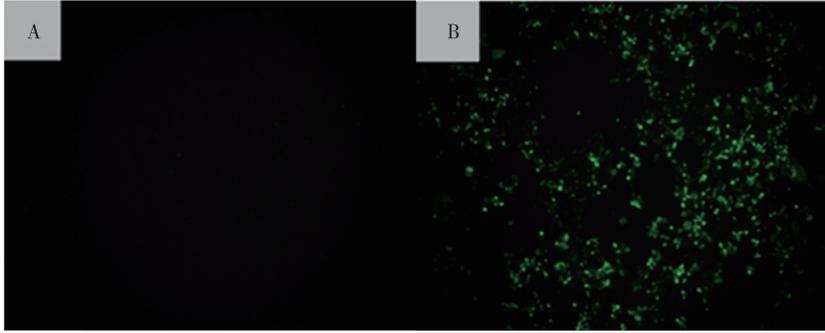
A: Normal Marc-145 cells ; B: Marc-145 cells infected with culture

图 3 PRRSV 感染 Marc 145 细胞 72 h 后的细胞病变(400 \times)

Fig 3 CPE of PRRSV in Marc 145 cells after 72 h post-infection (400 \times)

2.1.3 间接免疫荧光鉴定 使用鼠抗 PRRSV GP5 蛋白的单克隆抗体和 FITC 标记羊抗鼠 IgG 对感染细胞进行间接免疫荧光鉴定,从图 4 中能明显看到

Marc-145 细胞接种盲传三代的细胞培养物后呈绿色,为阳性反应,说明该分离病毒为 PRRSV。



A: 正常 Marc-145 细胞; B: 接种 PRRSV 的 Marc-145 细胞

A: Normal Marc-145 cells; B: Marc-145 cells infected with PRRSV isolate

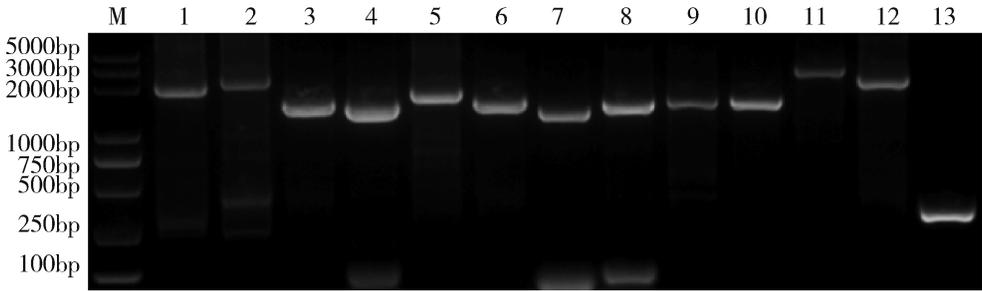
图 4 XJ-b 分离毒株间接免疫荧光检测(400 ×)

Fig 4 IFA detection of XJ-b strain(400 ×)

2.2 病毒的全基因组扩增,同源性及遗传变异分析

使用表 1 中的引物通过 RT-PCR 进行扩增,扩增结果如图 5 所示。

2.2.1 病毒的全基因组扩增 将病毒全长约为 15.2 kb 的全基因组按照参考序列分为 13 个片段,



M: DL5000 Marker; 1-13: PRRSV 全基因组片段: M, L, K, J, I, H, G, F, E, D, C, B, A

M: DL5000 Marker; 1-13: the fragments of PRRSV complete genome: M, L, K, J, I, H, G, F, E, D, C, B, A

图 5 PRRSV 分离株全基因组扩增结果

Fig 5 RT-PCR results of PRRSV complete genome

2.2.2 病毒全基因组的同源性比较及遗传变异分析 将拼接完成的全基因组序列与表 2 中 NCBI 已经公布的 PRRSV 毒株进行同源性比对以及遗传进化分析。由遗传进化树(图 6A)和同源性比较(图 6B)可以看出, XJ-b 分离株属于 PRRSV 2 型毒株,与国外分离的美洲株(VR2332)和欧洲株(M96262)位于不同分支,与两者同源性分别为 89.0% 和

59.9%。XJ-b 株与中国的经典毒株 GM2 和 NADC30-Like 毒株 JL580 的同源性较低,分别为 87.5% 和 84.3%; 与中国的高致病性毒株 JXA1、TJ、GD、HuN4 等同源性较高,其中与 2006 年中国暴发的 JXA1 毒株同源性为 98.9%,与 GD 株同源性高达 99.4%。综上所述,从全基因组进化分析和同源性比对结果来看, XJ-b 属于中国的高致病性 PRRSV。

表 2 PRRSV 参考毒株

Tab 2 The Reference strains of PRRSV

参考毒株	GenBank 登录号
CH-1a	AY032626
CH-1R	EU807840
GD	EU825724
GM2	JN662424
HEB1	EF112447
HENAN-XINX	KF611905
HUN4	EF635006
JL580	KR706343
NADC30	JN654459
JXA1	EF112445
LV	M96262
TJ	EU860248
Xju-1	KF815525
RespPRRS MLV	AF066183
VR2332	EF536003
WUH3	HM853673

2.2.3 病毒的 Nsp2 基因同源性、遗传进化以及序列比对分析 根据 XJ-b 全基因组的分析结果,将 XJ-b 的 Nsp2 基因进行遗传进化分析(图 7A)和同源性比较(图 7B),XJ-b 与 GD 株的同源性最高(99.4%);并且与 JXA1、GD 株等中国高致病性毒株属于同一分支,Nsp2 基因与全基因组的遗传进化分析结果一致。

Nsp2 基因核苷酸序列比对分析(图 8A)显示,XJ-b 在 Nsp2 基因组高变区碱基缺失的位置和数量与 JXA1、GD、Xju-1 等高致病性蓝耳病病毒株一致,说明 XJ-b 为高致病性蓝耳病病毒株,这与全基因组的分析结果一致。此外 XJ-b 与其他毒株最主要的区别在于 Nsp2 基因在基因组 5090~5170 bp 位置(图 8B 红框处)上有一段 63 bp 的连续碱基缺失;在 6470~6479 bp 位置(图 8C 红框处)之间有 5 处连续碱基缺失和 4 个碱基突变,分别为:6270(G)→6274(T),6471(T)→6471(A),6472(A)→6472(G)和 6474(T)→6474(C)。

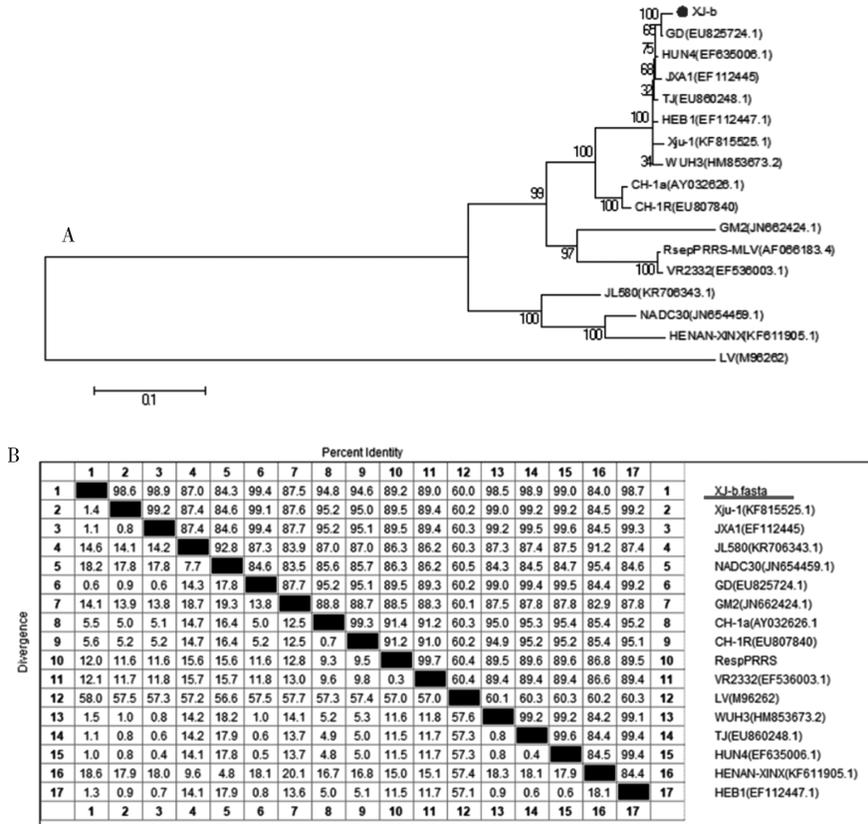


图 6 XJ-b 株全基因组核苷酸序列遗传进化树(A)与同源性比较结果(%) (B)

Fig 6 Phylogenetic analysis(A) and comparison of identity(B) of XJ-b complete genome

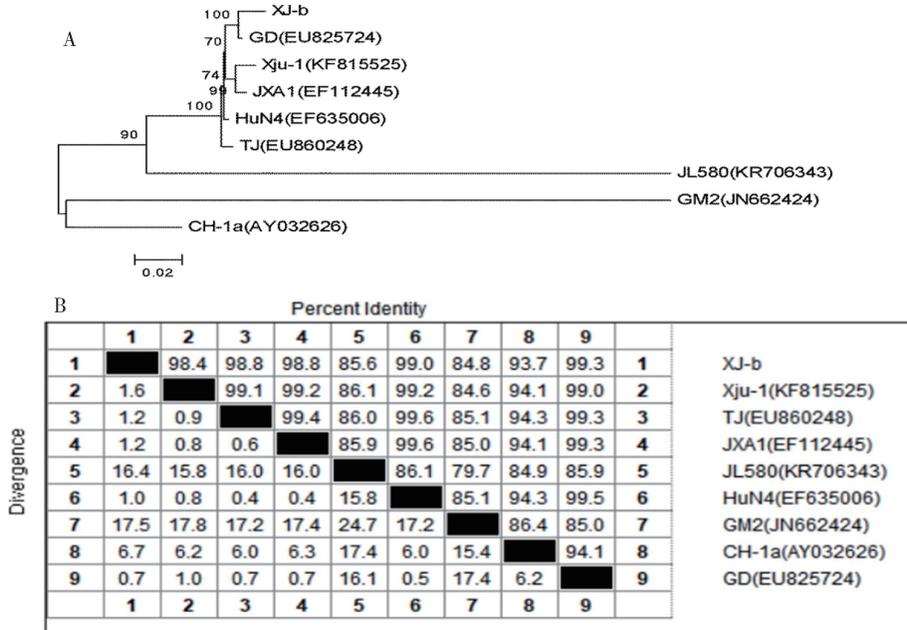
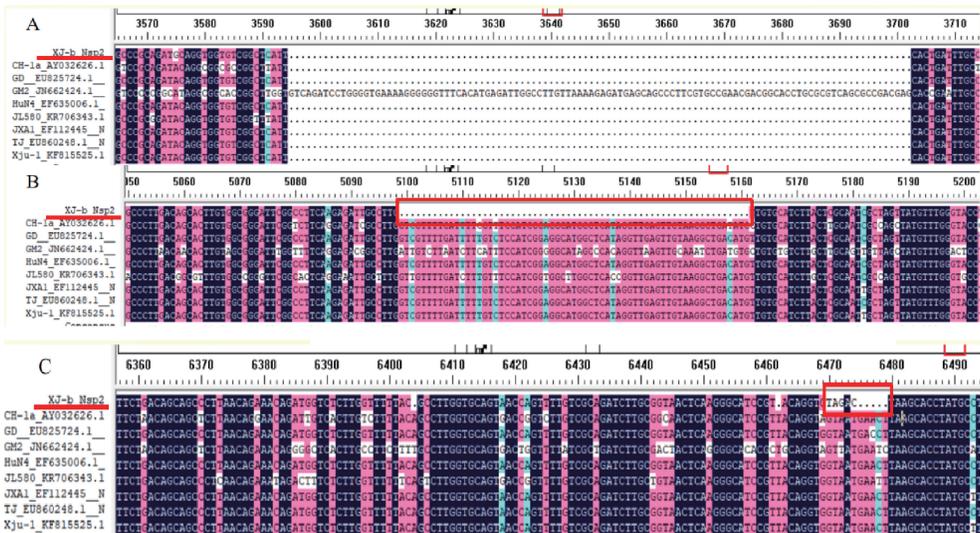


图 7 XJ - b 株 Nsp2 基因组核苷酸序列遗传进化树图 (A) 与同源性比较结果 (%) (B)
 Fig 7 Phylogenetic analysis (A) and comparison of identity (B) of XJ - b Nsp2 genome



A, B, C: XJ - b Nsp2 基因变异缺失位点
 A, B, C: The variation and deletion sites of XJ - b Nsp2 gene
 图 8 PRRSV Nsp2 基因组推导核苷酸序列比对分析
 Fig 8 Alignment of Nsp2 genome nucleotide sequence

3 讨论与结论

PRRS 是猪的一种急性病毒性传染病^[11]。我国于 1996 年首次分离到 PRRSV CH - 1a 株, 该病开始在全国蔓延。2006 - 2007 年在我国江西、河南、湖南等省发生了猪高致病性蓝耳病。2014 年后

出现了较多的 NADC30 - like 毒株, 并逐渐成为目前主要的 PRRSV 流行毒株^[12]。但是 HP - PRRSV 仍然作为 PRRS 重要的流行毒株之一, 经常与猪瘟病毒、猪圆环病毒 2 型等混合感染^[13 - 14], 我国养猪产业对其防控形势依然严峻。为了研究新疆地区

PRRSV 的遗传变异情况,本次研究采取实验室诊断方法,从临床病料中成功分离得到一株 PRRSV,将其命名为 XJ - b。为进一步确定该病原及其属性,经全基因组遗传进化以及同源性分析,XJ - b 与 JXA1 高致病性毒株属于同一亚群,且与 2016 年分离的高致病性毒株 GD 株亲缘关系最高。

不同数量碱基插入、缺失和突变具有多态性,是造成 PRRSV 毒株多样性和持续变异的重要原因^[15]。为进一步探究 XJ - b 的遗传进化规律,本研究对 2006 年暴发的高致病性毒株 JXA1 和 2015 年在新疆分离的 Xju - 1 株作了序列比对。XJ - b 相对于 JXA1 与 Xju - 1 的 Nsp2 基因,其最主要的区别是有一段连续 63 bp 的碱基缺失,其次在近 N 端有 6 处碱基缺失和 3 个碱基突变。这些缺失和突变可能与病毒的复制和毒力有关,需要进一步研究。尽管均是从新疆地区分离,Xju - 1 与 JXA1 的 Nsp2 基因的亲缘关系较近,有 99.2% 的同源性,而 XJ - b 与 JXA1 的同源性为 98.8%。除此之外,2015 年分离的 Xju - 1 在 Nsp2 基因中有 450 bp 的连续缺失^[16],而 XJ - b 的 Nsp2 基因的缺失位置以及缺失数量都不一样,所以 XJ - b 并不是由 Xju - 1 进化而来。另外,从已有的新疆 PRRSV 流行病学报道来看^[17-18],新疆地区流行的 PRRSV 毒株仍然以高致病性蓝耳病病毒株为主。从地域相关性上来看,XJ - b 与 Xju - 1 全基因组的同源性只有 98.5%,但是与在广东分离的 GD 毒株,天津分离的 TJ 株,武汉分离的 WUH3 株分别有 99.4%、98.9% 和 98.5% 的同源性,说明新疆地区不同 PRRSV 毒株之间差异性较大,而这种差异一方面可能是 XJ - b 与内陆地区流行的 PRRSV 高致病性毒株重组所造成的,另一方面也可能是由新疆本地的 PRRSV 毒株进化变异而来,具体情况有待于实验室对更多新疆地区的 PRRSV 分离毒株进行进一步的流行病学调查。实验室分子生物学检测是鉴别不同类型猪蓝耳病病毒毒株的最准确方法之一,本研究在一定程度上反映出 PRRSV 在我国新疆地区的遗传进化规律,相对于中国内陆来说,PRRSV 在新疆地区流行的毒株类型相对单一。实验室鉴

别诊断和流行病学调查对我国养猪业 PRRS 的防控与净化具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Wagstrom E A, Chang C C, Yoon K J, *et al.* Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, 62(12): 1876 - 1880.
- [2] 刘萍,陈苗苗,乔莉萍,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒致病机理的研究进展[J].*中国畜牧兽医*, 2010, 37(1): 158 - 160.
Liu P, Chen M M, Qiao L P, *et al.* Research progress on pathogenic mechanism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 37(1): 158 - 160.
- [3] Bilodeau R, Archambault D, Vezina S A, *et al.* Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation [J]. *Can J Forest Res*, 1994, 58(4): 291 - 298.
- [4] Brockmeier S L, M V Palmer, Steven R Bolin, *et al.* Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Bordetella bronchiseptica, or a combination of both organisms in pigs [J]. *Am J Vet Res*, 2000, 61(8): 892 - 899.
- [5] Gradil C, Dubuc C, and Eaglesome M D. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission [J]. *Vet Rec*, 1996, 138(21): 521 - 522.
- [6] Meulenber J J M, Besten P D, Kluyver E P D, *et al.* Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus [J]. *Virology*, 1995, 206(1): 155 - 163.
- [7] Benfield D A, Nelson E, Collins J E, *et al.* Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (Isolate ATCC VR - 2332) [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1992, 4(2): 127 - 133.
- [8] 冷雪.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒分离鉴定、遗传变异及致病性分析[D].吉林:中国农业科学院,2012.
Leng X, Isolation, Identification, Genetic mutation and pathogenicity analysis of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus [D]. Jilin: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [9] 王业华,张欣欣,宋庆庆,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒强弱毒株全基因序列比对分析[J].*中国畜牧兽医*, 2016, 43(7): 1709 - 1716.
Wang Y H, Zhang X X, Song Q Q, *et al.* Comparison and analysis of two porcine reproductive and respiratory syndromes virus (PRRSV) attenuated strains complete genome sequences [J].

- China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 43 (7):1709 - 1716.
- [10] Zhou L, Kang R, Ji G, *et al.* Molecular characterization and recombination analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in southwestern China during 2012 - 2016[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(1): 98 - 110.
- [11] Halbur P G, Paul P S, Meng X J, *et al.* Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five - week - old cesarean - derived, colostrum - deprived pig model[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1996, 8 (1): 11 - 20.
- [12] Liu J, Zhou X, Zhai J, *et al.* Genetic diversity and evolutionary characteristics of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus in southeastern China from 2009 to 2014 [J]. *Arch Virol*, 2017, 162(9): 2603 - 2615.
- [13] 刘杏. 猪圆环病毒 2 型和猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查及基因进化分析 [D]. 吉林: 中国农业科学院, 2016.
- Liu X. Molecular epidemiology and evolution analysis of genes of porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus [D]. Jilin: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [14] 陈婧, 覃丽娟. 猪瘟与高致病性蓝耳病诊断与防治 [J]. *畜牧兽医科学*, 2019(5): 123 - 124.
- Chen J, Tan L J. Diagnosis and control of classical swine fever and highly porcine reproductive and respiratory syndrome [J]. *Graziery Veterinary Sciences*, 2019(5): 123 - 124.
- [15] Wang F X, Qin L T, Liu Y, *et al.* Novel Nsp2 deletion based on molecular epidemiology and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Shandong Province from 2013 to 2014[J]. *Infect Genet Evol*, 2015(33): 219 - 26.
- [16] Xia J, Chen S, Huang J, *et al.* Complete genomic characterization of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in Xinjiang province of China[J]. *Virus Genes*, 2015, 50(1): 39 - 45.
- [17] 简子健, 盛卓君, 苏贵成, 等. 新疆高致病性猪蓝耳病病毒分离与鉴定 [J]. *新疆农业科学*, 2008, 45(6): 1172 - 1175.
- Jian Z J, Sheng Z J, Su G C, *et al.* Isolation and Identification of highly porcine reproductive and respiratory syndrome virus from Xinjiang [J]. *Xinjiang Agricultural Science*, 2008, 45 (6): 1172 - 1175.
- [18] 彭晓玲, 马晓艳, 王文, 等. 新疆地区生猪高致病性猪蓝耳病病原学监测与分析 [J]. *新疆农业科学*, 2014, 51(9): 1749 - 1753.

(编辑:李文平)