

猪繁殖与呼吸综合征病毒及其检测方法研究进展

董忠¹ 王建华² 王怡丹² 郭荟³ 王瑞军³ 于彦³

1 内蒙古正大食品有限公司, 呼和浩特, 010000;

2 内蒙古科迪检测有限公司, 呼和浩特, 010000;

3 内蒙古正大有限公司, 呼和浩特, 010000;

摘要: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 是引发猪蓝耳病的病原体, 属于动脉炎病毒科, 具有高度变异性与免疫逃逸特性, 对全球养猪业造成重大经济损失。本文综述 PRRSV 的病原学特征 (单股正链 RNA 病毒, 基因组约 15 kb, 含至少 10 个开放阅读框)、流行病学规律 (欧洲型 PRRSV-1 和美洲型 PRRSV-2 并存, 中国以 PRRSV-2 谱系 1/3/5/8 为主), 分析病毒分离、血清学检测及分子诊断等技术进展, 为应对 PRRSV 感染、精准防控疫情提供参考。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 流行病学; 检测方法

DOI: 10. 64216/3080-1486. 25. 06. 013

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 自 1987 年在美国首次报道以来, 迅速蔓延至全球主要养猪地区。我国 1996 年分离到首株病毒 (CH-1a), 2006 年暴发高致病性毒株 (HP-PRRSV) 疫情, 导致 200 万头猪感染、40 万头死亡, 近年来 NADC30-like 毒株的重组事件进一步加剧防控难度^[1,2]。由于 PRRSV 抗原漂移频繁、疫苗保护有限, 早期精准诊断成为阻断传播的关键。本文整合近年病原学、流行病学及检测技术研究进展, 为优化防控策略提供参考。

1 PRRSV 概述

1.1 病原学特征与基因组

PRRSV 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组长度约 15-15.5 kb, 包含至少 10 个开放阅读框 (ORF)。ORF1a/ORF1b 编码非结构蛋白 (NSPs), 参与病毒复制与免疫逃逸; ORF2-7 编码结构蛋白 (如 GP5、M 蛋白), 其中 GP5 是主要抗原蛋白。非结构蛋白 NSP2 作为基因组中变异最大的蛋白, 其氨基酸缺失 (如 HP-PRRSV 的 Nsp2 缺失 30 个氨基酸) 是毒力增强的标志。NSP5 通过劫持宿主泛素结合酶 UBE2L6, 促进 RIG-I/MDA5 的 K48 泛素化降解, 抑制 I 型干扰素通路, 实现免疫逃逸^[1-3]。

表 1 PRRSV 主要结构蛋白与非结构蛋白功能

蛋白类型	编码基因	功能
非结构蛋白	NSP1 - NSP12	病毒复制酶组分; NSP5 介导免疫逃逸
主要囊膜蛋白	GP5	主要抗原, 诱导中和抗体
基质蛋白	M	病毒组装关键成分
核衣壳蛋白	N	包裹病毒 RNA

1.2 流行病学特征

根据遗传差异, PRRSV 分为欧洲型 (PRRSV-1) 和美洲型 (PRRSV-2), 两者核苷酸同源性仅 55-70%。PRRSV-2 进一步分为 9 个谱系 (Lineage 1-9), 中国主要流行谱系 1 (NADC30-like)、3、5 (HP-PRRSV) 和 8。2012 年后, NADC30-like 毒株因其高重组率 (与经典株、HP-PRRSV 重组) 成为优势毒株, 例如四川地区 2021-2023 年监测显示该毒株占比超 60%。病毒通过持续感染和垂直/水平传播维持流行, 猪群密度与活疫苗滥用会加速其进化^[2,3]。

2 PRRSV 检测技术研究进展

2.1 病原学与血清学检测

病毒分类一直是病毒感染诊断领域的金标准, 可为病毒感染的诊断提供直接的证据。传统病毒分离采用猪肺泡巨噬细胞 (PAMs) 或 MARC-145 细胞系, PAMs 作为猪肺部天然存在的免疫细胞, 对猪相关病毒具有一定的易感性, 在病毒分离中曾被广泛应用。MARC-145 细胞系则是一种经过传代培养的细胞系, 相对稳定且易于培养, 也常被用于病毒的培养和分离。但上述两种方法的操作周期较为漫长 (3-7 天) 且敏感性低, 对于一些低病毒载量的样本, 无法有效分离出病毒, 容易导致漏诊。免疫组化技术可定位病毒抗原, 它是将抗原与抗体特异性结合的原理作为基础, 通过标记抗体的方式, 对组织中的病毒抗原进行识别和定位。比如, 针对病毒的 N 蛋

白设计特异性抗体,应用免疫组化技术在猪的肺、淋巴结等组织中检测N蛋白的存在,借此直观地观察病毒抗原在组织中的分布情况,为病毒感染的诊断提供重要的形态学依据。但该方法需对组织进行切片处理,需通过固定、脱水、透明、浸蜡、包埋等多个步骤,并且每个步骤都需严格控制条件,以免对切片质量和后续检测结果产生影响。

血清学方法以ELISA为主,该方法通过检测抗GP5或N蛋白抗体判断感染,两种蛋白在PRRSV的结构和感染过程中具有重要作用,当猪感染PRRSV后,机体免疫系统会针对它们产生相应抗体。该检测方法具有较高准确性,能够对样本中PRRSV抗体的存在情况展开精准检测。并且,该方法在面对其他主要猪病病原时,不会发生交叉反应,充分体现了其良好的特异性。但ELISA法也存在一定局限,无法对疫苗株和病毒株所引发的抗体反应进行有效区分,导致在实际应用的过程中,无法判断猪群是接种疫苗后产生的免疫反应,还是真正感染了病毒,给疫情的监测和防控带来一定困难。近年发展的急性期蛋白检测可作为PRRSV早期感染标志,因为急性期蛋白是动物在受到感染、炎症或创伤等刺激后,肝脏迅速合成并释放到血液中的一类蛋白质。如触珠蛋白在PRRSV疫苗接种后显著升高,其水平与病毒血症正相关。说明可通过检测触珠蛋白的含量,将猪体内病毒的感染情况一定程度地反映出来,为病毒早期诊断提供重要参考。为进一步提升猪群监测效率,超高效液相色谱-质谱联用技术应运而生,具有高灵敏度、高分辨率和高通量的特点,可同时定量触珠蛋白、C反应蛋白等5种急性期蛋白的含量,通过对其展开综合分析,更全面、准确地评估猪群的健康状况,及时发现潜在的感染风险,提升健康监测效率^[2,3]。

2.2 分子生物学检测

常规的单重或多重PCR结合测序技术是PRRSV检测与分型的传统手段,该手段基于Nsp2缺失或ORF5变异设计引物,可通过片段大小差异初步鉴别HP-PRRSV,但此结果无法完成精确分析,需借助测序进一步分型,且试验耗时长。实时荧光定量RT-PCR通过实时监测荧光信号追踪扩增产物,具有快速、高灵敏度的特点,并能实现定量分析,主要分为染料法和探针法两种类型。染料法无需荧光探针,成本较低。主要是利用荧光染料与双链DNA结合后发出荧光信号,通过检测荧光信号的强

度来反映扩增产物的数量,操作相对简单,不需要复杂的探针设计和优化过程,适合应用在实验条件有限的实验室来。但荧光染料可以与所有双链DNA结合,容易出现非特异性扩增产物也被检测的情况,对检测结果准确性产生影响。探针法采用特异性探针,通常在两端分别标记荧光报告基团和荧光淬灭基团,常见如FAM/BHQ标记组合。该方法通常会靶向ORF1、ORF6等保守区域,这些保守区域在病毒的不同毒株之间具有较高的同源性,可通过设计针对的特异性探针,实现对多种病毒亚型或变异株的准确检测和定量分析。该方法成本较高,且针的设计和优化需要一定的专业知识和实验经验,对其广泛应用产生一定限制。在大规模的筛查实验中,对成本控制要求较高,可以优先考虑染料法。对检测结果的准确性要求极高,或者需要区分不同亚型或变异株的情况下,选择探针法。此外,在此基础上开发的多重qRT-PCR能在同一反应体系中同时完成多毒株鉴别分型,为常见的多种病毒混合感染诊断提供高效且准确的检测手段^[4,5]。

2.3 等温扩增技术

重组酶聚合酶扩增(LAMP/RPA/RAA)是在恒温(37~42℃)快速扩增,与传统PCR、荧光定量PCR技术相比,可结合侧流层析试纸条(LFD)实现结果可视化,靶向特定基因,30分钟内即可检出病毒,无需专业设备,适用于现场快速筛查,且灵敏度接近qPCR,为现场快速检测提供可能。现阶段,LAMP/RPA/RAA等等温扩增技术已在PRRSV检测中得到有效应用。其中,LAMP技术的引物组由4-6个特异性引物构成,这能对靶DNA序列中的不同区域进行精准识别,并且在恒温条件下完成反应,能让反应条件得到大大简化。在对检测结果进行判定时,可借助琼脂糖凝胶电泳、肉眼比色法(依据浊度变化)以及荧光法等多种方式,显示出一定的灵活性。RPA和RAA较为相似,其区别在于酶的来源。RPA的酶来源于T4噬菌体,RAA的酶来自细菌或真菌。两种技术都不需要对模板进行热变性处理,对于设备的要求较低,可在恒温条件下完成反应,操作十分简便。同时,RAA技术更为高效,仅需15-30分钟即可完成扩增过程。但等温扩增技术也存在难点,其引物设计在扩增过程中容易产生非特异条带^[6]。比如,LAMP检测方法需要使用多对引物进行扩增,加大了假阳性结果的产生风险。RAA方法对引物的要求较高,需从大量引物中进行筛选,才能对

其高灵敏度的检测需求进行满足^[7]。

2.4 原位检测技术

原位杂交 (ISH) 是通过寡核苷酸探针标记组织切片中的病毒 RNA。该技术能够定位病毒在组织内的具体分布 (如感染后 3 天见于扁桃体、淋巴结), 探针靶向 ORF6/ORF7 保守区 (298 bp 片段), 因为保守区序列相对稳定, 能保证探针与目标 RNA 结合的特异性和准确性。这种方法具有病毒-组织亲和性, 空间分辨率高, 说明可以清晰地观察到病毒在组织细胞水平上的分布位置, 为研究病毒的感染机制和致病过程提供了重要的形态学依据。但该技术也存在一定局限, 其灵敏度低, 感染后期易漏检。为克服技术不足, 经过技术改进开发的原位 RT-PCR 比 ISH 早 2-4 天检出病毒, 信号强度提升 3-5 倍, 让检测准确性与可靠性得到有效提升^[8]。

3 总结与展望

当前 PRRSV 研究已揭示其复杂免疫逃逸网络 (如 PDCD4 降解、UBE2L6 劫持)^[1-3], 并推动检测技术向高敏、快速、多靶标方向发展。四重 RT-PCR 与 ASEA 技术显著提升临床诊断效率, TF 样本应用降低监测成本。然而, 病毒高频重组仍对疫苗设计构成挑战。未来研究需聚焦于广谱疫苗开发、多组学技术应用、便携式检测设备, 通过跨学科协作破解 PRRSV 防控难题, 为养猪业可持续发展提供保障。

参考文献

[1] 帅文娜, 郭子强, 李佳乐, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒基因重组的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2025, 45

(01): 145-152+162.

[2] Zhou L, Han J, Yang H. The evolution and diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China. *Vet Microbiol.* 2024 Nov;298:110252.

[3] Qiu Y, Qiu M, Li S, Li S, Zhu J, Tian K, Chen N. Emergence, prevalence and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in China from 1994 to 2024. *Virology.* 2025 Apr;605:110457.

[4] 陈旭, 汤德元, 曾智勇, 等. 检测 PRRSV 及鉴别 HP-PRRSV 毒株的二重 PCR 与二重 TaqMan 荧光定量 PCR 方法[J]. 中国兽医科学, 2024, 54(03): 316-324.

[5] 茹敏, 高洁, 赵治铃, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒三重纳米 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2025, 46(07): 18-25.

[6] 陈耀, 仲欣雨, 吴陈雨, 等. 反转录-重组酶介导等温扩增 (RT-RAA) 快速检测基因 2 型猪繁殖与呼吸综合征病毒[J]. 中国动物检疫, 2023, 40(01): 121-127.

[7] 刘凯, 冯康, 熊江广, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 NSP9 的表达纯化及多克隆抗体的制备[J]. 畜牧与兽医, 2025, 57(08): 108-114.

[8] 李雪梅. 寡核苷酸探针原位杂交和原位 RT-PCR 检测石蜡切片中 PRRSV 方法的建立及其应用[D]. 四川农业大学, 2005.

作者简介: 董忠, (1972—), 男, 汉族, 内蒙古巴彦淖尔市人, 主要从事畜牧技术研发、推广及应用工作。