

DOI: 10.13376/j.cblls/2016041

文章编号: 1004-0374(2016)03-0325-12



杨汉春, 博士, 中国农业大学动物医学院教授, 国家杰出青年基金获得者、“973”项目首席科学家、全国优秀博士学位论文指导教师、入选国家百千万人才工程、国家有突出贡献中青年专家、农业科研杰出人才。现任中国畜牧兽医学会秘书长、国际猪兽医学学会 (IPVS) 执委会委员。所属实验室为农业部动物流行病学与人兽共患病重点开放实验室, 也是国家生猪产业技术体系疫病控制研究室。领导的研究团队长期从事猪病研究, 以猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒 2 型、猪流行性腹泻病毒、猪伪狂犬病病毒等为研究对象, 涉及病原生物学、致病与免疫机制以及预防与控制技术等。现承担国家重点基础研究发展计划 (“973”项目)、国家自然科学基金重大项目和重点项目。在 *PLoS Pathogens*、*Autophagy*、*Journal of Virology* 等国际学术期刊发表论文 60 余篇。

猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异与演化

杨汉春*, 周磊

(中国农业大学动物医学院农业部动物流行病学与人兽共患病重点实验室, 北京 100193)

摘要: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 是一种严重影响全球养猪业的重要病原, 引起母猪繁殖障碍和生长猪的呼吸道疾病。PRRSV 分为基因 1 型和 2 型, 极易变异和演化, 并呈现毒株的多样性与致病性的差异。PRRSV 基因组的变异主要集中于非结构蛋白 Nsp2 编码区、结构蛋白 ORF5 和 ORF3 基因。毒株间的重组是 PRRSV 变异与演化以及新毒株产生的主要机制之一, 天然免疫和特异性免疫因素在加速其变异与演化中起着重要的作用。深入理解 PRRSV 变异与演化的本质以及相关分子机制有助于预防与控制其传播与流行。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 遗传变异; 演化; 重组

中图分类号: Q939.47; S852.65 **文献标志码:** A

Genetic variation and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

YANG Han-Chun*, ZHOU Lei

(Key Laboratory of Animal Epidemiology and Zoonosis of the Chinese Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the most important pathogen that severely impacts swine industry worldwide, which causes reproductive failure in sows and respiratory disease in growing pigs. PRRSV is divided into genotype 1 and genotype 2, with characteristics of easy variation and evolution as well as diversified strains and pathogenicity differences. The genetic variation of PRRSV genome is mainly distributed in its nonstructural protein 2-coding region and structural protein genes ORF5 and ORF3. The

收稿日期: 2016-03-13

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(31490603); 国家重点基础研究发展计划 (“973”项目)(2014CB542700)

*通信作者: E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn; Tel: 010-62731296

recombination among different strains is one of the major mechanisms contributing to the variation and evolution and emergence of novel strain of PRRSV, and meanwhile innate and adaptive immunity of pigs play important roles in accelerating its variation and evolution. A better understanding of the nature and mechanism associated with the variation and evolution of PRRSV will be helpful for prevention and control of its transmission and prevalence.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); genetic variation; evolution; recombination

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是一种严重影响全球养猪业的重要病原, 所致疫病为猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 在我国俗称“猪蓝耳病”, 以母猪繁殖障碍和生长猪的呼吸道疾病为特征, 给养猪生产造成巨大经济损失。PRRSV 的出现和流行迄今已近 30 年, 然而在全球范围内仍未取得实质性控制, 其影响和危害依旧。目前, 除澳大利亚、新西兰、瑞士等少数国家无疫情而外, PRRSV 仍在许多国家和地区呈地方性流行, 我国的养猪业同样深受其害。

PRRSV 是一种呈球形、大小为 60~65 nm 的有囊膜的 RNA 病毒^[1-3], 具有严格的宿主特异性, 仅感染猪。该病毒归类于套式病毒目 (Nidovirales) 的动脉炎病毒科 (Arteriviridae) 的动脉炎病毒属 (*Arterivirus*), 与同属成员的马动脉炎病毒 (equine arteritis virus, EAV)、小鼠乳酸脱氢酶增高症病毒 (lactate dehydrogenase elevating virus, LDV) 和猴出血热病毒 (simian hemorrhagic fever virus, SHFV) 具有相似的形态与病毒粒子大小、基因组结构以及复制方式和基因表达策略, 同时还具有一些共同的生物学特性^[4-5]。PRRSV 具有广泛的变异与毒株多样性, 特别是高致病性毒株和流行新毒株的不断出现, 从而引起疫病的局部暴发和再流行^[6-11]。因此, PRRSV 的持续变异与演化成为养猪生产中防控 PRRS 所面临的巨大挑战, 其变异与演化及其相关分子机制成为人们关注的重要研究课题。本文将着重阐述 PRRSV 的变异与演化特性以及相关分子机制研究方面的进展。

1 PRRSV 的起源与分化

PRRSV 于 20 世纪 80 年代末和 90 年代初首先流行于北美和欧洲, 尽管出现的时间相近和引起的疾病的临床症状十分相似, 但欧洲的原型毒株 Lelystad virus (LV) 与北美的原型毒株 VR-2332 的基因组存在惊人的差异, 其全基因组同源性大约仅有 60%, 且同一基因在两个原型毒株间的核苷酸同

源性也仅有 50%~80%^[12-13]。此外, 两个毒株的抗原性也存在明显的差异^[14-15]。随后, 相继分离的所有 PRRSV 毒株均可聚类于 LV 或 VR-2332, 故将 PRRSV 分为两个基因型 (genotype), 即聚类于 LV 的毒株称为基因 1 型 (type 1), 聚类于 VR-2332 的毒株为基因 2 型 (type 2)。1 型毒株主要流行于欧洲, 北美和亚洲也有 1 型毒株流行, 2 型毒株则主要流行于北美和亚洲。

PRRSV 的起源 (origin) 和两个基因型毒株的分化 (divergence) 引起学者们的关注。回顾性血清学调查数据认为, PRRSV 是在 1985 年之前甚至更早就已进入美国和加拿大猪群, 而欧洲的家养猪群最早感染可能出现在 20 世纪 80 年代中期^[16-17]。2003 年, Plagemann^[18] 提出了一个分化假设, 认为 PRRSV 可能来源于一种早期只能感染啮齿类动物的类 LDV 动脉炎病毒, 随后经跨越种间屏障感染野猪, 野猪的引入将 PRRSV 的祖先病毒从欧洲传到了美洲, 然后病毒在两个大陆的野猪群中独立演化大约 70 年, 最后分别将病毒传给家养猪。然而, 从野猪中检测到的 PRRSV 并不能支持或验证这一假设, 因为发现来自野猪的 PRRSV 序列可形成两个分别处于 1 型和 2 型 PRRSV 分支内的高度同源群^[19], 提示野猪中的病毒极有可能是来自家养猪群的外溢病毒。从流行病学数据来看, 两型 PRRSV 的分化时间无疑发生于疫情首次暴发之前。有两种观点试图解释两型 PRRSV 的分化, 其一是认为两型毒株的分化发生时间并不长, 仅是在首次暴发前突然发生极高突变率的核苷酸替换, 估计分化时间为 1972—1988 年^[20]; 其二则认为两型毒株分化于疫情暴发之前, 分别在欧洲、北美两大陆上独立演化很长时间后在同一时期相继造成疫情暴发, 所有 PRRSV 分离毒株的最近共同祖先 (the most recent common ancestor, MRCA) 大约存在于 1880 年^[21]。进一步的研究和分析推算出基因 1 型 PRRSV 的 MRCA 为 1946—1967 年, 而基因 2 型 PRRSV 的 MRCA 为 1977—1981 年^[22], 这不仅支持了两型 PRRSV 毒株早期分化后分别在欧洲和北美两个大陆独立演化的

观点, 也表明其分化发生于数十年以前。近十多年来, PRRSV 毒株的多样性更是急剧攀升, 新毒株层出不穷, 其变异和演化的速度出人意料。

2 PRRSV的基因组结构与变异

基因 1 型和 2 型 PRRSV 的基因组结构基本一致^[4-5,23-28]。除少数基因或区域相对保守而外, PRRSV 基因组具有广泛的变异, 无论是 1 型还是 2 型毒株间的基因组差异较大, 呈现遗传多样性^[29-31]。

2.1 基因组结构

PRRSV 基因组为不分节段、单股正链 RNA, 全长约 15 kb, 5' 端带有帽子结构和非编码区 (untranslated region, UTR), 3' 端有 UTR 和 poly(A) 尾。病毒基因组至少含有 10 个开放阅读框 (open reading frame, ORF)^[23-24,32], 从 5' 端到 3' 端依次为 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b 和 ORFs3~7, 以及新近确认的 ORF5a^[33]。位于基因组 5' 最前端的为 5' UTR, 其核苷酸序列在同一基因型毒株间相对保守, 其后为 ORF1a 和 ORF1b, 该部分占病毒基因组全长的 3/4, 编码病毒复制酶多聚蛋白 pp1a 和 pp1ab, 能自剪切为至少 14 个非结构蛋白 (nonstructural protein, Nsp)^[34]。ORF2a、ORF2b 和 ORFs3~7 占基因组的 1/4, 编码组成病毒粒子的结构蛋白 (structural protein), 其中 ORF2a、ORF2b、ORF3 和 ORF4 分别编码病毒的次要结构蛋白 GP2a、E、GP3 和 GP4, ORF5、ORF6 和 ORF7 分别编码病毒的主要结构蛋白 GP5、M 和 N^[23,35-37]。编码病毒结构蛋白的 ORF 相对较小, 多数相邻的 ORF 之间有部分重叠, 它们通过翻译一组套式亚基因组 mRNAs 而合成。

2.2 基因组变异

2.2.1 5' UTR与3' UTR

基因 1 型与基因 2 型 PRRSV 的 5' UTR 差异较大, 核苷酸同源性仅约 50%, 其中 1 型毒株的 5' UTR 长 221~223 nt, 而 2 型毒株为 189 nt 或 190 nt。大多数 2 型毒株的 5' UTR 相对保守, 仅有个别碱基的置换或缺失, 少数毒株变异较大。1 型与 2 型毒株 5' UTR 的近 3' 端的 40 个核苷酸序列高度保守, 其中嵌有一个 8-11-9 的保守核苷酸序列。此外, 序列中还有 1 个 9 nt 的含 CACCC 位点的保守基序, 其功能尚不完全清楚, 可能在调控 PRRSV 的复制及介导 RNA 与蛋白质相互作用方面有重要作用^[38]。两型毒株的 3' UTR 也存在明显的差异, 核苷酸同源性大约仅为 59%, 2 型毒株的 3' UTR 序列比 1

型毒株长, 此外还发现一些毒株的 3' UTR 存在碱基的插入或缺失^[39]。

2.2.2 非结构蛋白编码区

ORF1a 和 ORF1b 为 PRRSV 的非结构蛋白编码区, 基因 1 型和基因 2 型毒株间的差异很大, 核苷酸序列同源性约为 60%。其中, ORF1a 是基因组中变异度最大的 ORF, 变异主要集中于 Nsp1 和 Nsp2 编码区, 后者在两型毒株间的同源性仅为 32%, 是 PRRSV 基因组中变异最大的区域^[40]。同一基因型的不同毒株之间 Nsp2 编码区差异也较大。Nsp2 是 PRRSV 最大的非结构蛋白, 其编码区的变异除碱基突变外, 还存在不同长度的碱基缺失或插入, 导致产生各式各样的毒株^[7,39,41-43]。因此, Nsp2 编码区在 PRRSV 的变异与演化中扮演着重要的角色, 可以作为分子流行病学研究和监测新毒株出现的靶基因。与 ORF1a 相比, ORF1b 的保守性相对较高, 特别是 Nsp9 编码区的保守性最高, 但两型毒株 Nsp12 的序列差异非常大, 其生物学意义尚不清楚。

2.2.3 结构蛋白编码区

PRRSV 结构蛋白编码区的核苷酸序列在两型毒株间的差异较大, 编码蛋白的氨基酸同源性介于 55%~79%^[24]。基因 1 型毒株间的变异程度明显小于基因 2 型。在基因 1 型与 2 型毒株间, ORF2(a 和 2b) 的核苷酸同源性为 65% 左右, 同型毒株间相对较为保守。由 ORF3 编码的 GP3 是 PRRSV 毒株间保守性较差的蛋白之一, 其推导氨基酸的同源性在两型毒株间仅为 54%~60%, 而且多数变异发生在 N 末端, N 端潜在的糖基化位点及疏水性氨基酸较为保守^[44]。与基因 1 型毒株 LV 相比, 基因 2 型毒株 GP3 的 C 端少 12 个氨基酸残基。基因 1 型和 2 型均有 GP3 氨基酸缺失变异毒株^[39,44]。ORF3 与编码 GP4 的 ORF4 间重叠区 (GP4 的 N 端) 有一疏水的高变区^[32,36], 1 型毒株 LV GP4 的这一区域含有一个推测的中和位点, 其中由 9 个氨基酸构成的基序 (aa59-67) 是该中和位点的核心, 其突变可造成 GP4 抗原性发生改变^[45-46]。

ORF5 在基因 1 型与基因 2 型毒株间差异较大, 编码的 GP5 的氨基酸序列相似性为 52%~55%。同型毒株中, ORF5 的变异也较大, 推导氨基酸序列相似性为 88%~99% 之间^[47], 且有 GP5 氨基酸缺失或插入的变异毒株^[48]。同型毒株间 GP5 推导氨基酸的变异主要位于邻近信号肽序列外区近端的高变区内 (aa26-39), GP5 N 端潜在的糖基化位点在不同

毒株间也有差异。因此, ORF5 基因是分析 PRRSV 变异与演化的重要靶基因。

基因 1 型和 2 型毒株间的 ORF6 最为保守, 编码的 M 蛋白氨基酸序列同源性为 78%~81%^[25], 同型毒株间的同源性大于 96%, M 蛋白的特异性单克隆抗体可以用于区分两型毒株。基因 1 型和 2 型毒株间的 ORF7 差异较大, 其核苷酸序列及其编码 N 蛋白推导氨基酸的同源性分别为 63% 和 59%, 基因 1 型毒株 N 蛋白的 N 端和 C 端有两个氨基酸延伸区 (STAPM 和 SQGAS)^[49]。研究表明, 两型毒株的 N 蛋白存在明显的抗原性差异, 既有共同表位, 也有各自独特的表位, 可以用单克隆抗体进行区分^[50]。然而, 同型毒株间的 ORF7 非常保守, 1 型毒株间 N 蛋白氨基酸序列相似性为 94%~99%, 2 型毒株间为 96%~100%。

3 基因1型PRRSV的变异与演化

基因 1 型 PRRSV 主要流行于欧洲。20 世纪 90 年代初, 疫情暴发期间分离于比利时、法国、德国、英国、荷兰、西班牙等其他国家的毒株与荷兰 Lelystad 研究所分离的 LV 株高度同源^[31,46,51-52]。然而, 后来发现欧洲地区的一些毒株虽然分离时间晚于 LV, 但在演化关系中却早于 LV, 提示基因 1 型 PRRSV 在欧洲疫情暴发之前就已经存在于猪群。

早期的研究认为 1 型 PRRSV 的变异较小^[46], 而 2 型 PRRSV 变异相对较大^[14,30,53]。但后来的分子流行病学研究表明, 1 型毒株的变异与多样性不亚于 2 型毒株, 且具有明显的地域特征, 也发现毒株间有重组现象^[31,44,54-61]。东欧和西欧的 1 型毒株的变异与演化程度有所不同, 相对于西欧而言, 波兰、保加利亚、爱沙尼亚以及俄罗斯等东欧国家的毒株的变异性和多样性更大, 其 ORF5 和 ORF7 的平均变异率分别为 18.2% 和 12.0%, 高于西欧毒株 (11.9% 和 5.8%)。因此, 有学者认为 1 型 PRRSV 首先出现于东欧, 且存在的时间早于西欧, 其流行具有更强的地域限制性^[59,61]。2010 年, Shi 等^[62] 基于 GenBank 收录的完整 ORF5 序列数据, 系统分析了基因 1 型 PRRSV 的遗传演化关系, 将 1 型毒株分为 3 个亚型 (subtype I、II、III)。亚型 I 分布于欧洲的很多国家, 且可进一步划分为 12 个演化分支 (clade A~L); 亚型 II 主要流行于俄罗斯、立陶宛和白俄罗斯; 亚型 III 流行于白俄罗斯, 2010 年出现的东欧高致病性 PRRSV Lena 株被划分到该亚型^[9]。

除欧洲以外, 美国^[41-42,63]、加拿大^[64]、韩国^[65-66]、

泰国^[67] 和中国^[68-69] 等证实有基因 1 型 PRRSV 毒株的感染和流行, 且在系统发生树中可形成多个不同的演化分支。2004 年, Ropp 等^[42] 在美国分离到类欧洲型毒株, 全基因组与 LV 株的同源性为 95.3%, 其结构蛋白和非结构蛋白编码区与 LV 株的氨基酸相似性介于 90.1%~100%, 但其 Nsp2 编码区内有 51 个碱基缺失, 表明类 LV 病毒传入美国后经过流行和较长时间的变异和演化, 其子代病毒的基因组已发生了较大的变异。泰国和我国的一些基因 1 型毒株与源自欧洲的 1 型毒株的减毒活疫苗很接近, 可能来源于疫苗病毒演化的毒株或因引进疫苗免疫种猪而传入^[70]。

4 基因2型PRRSV的变异与演化

基因 2 型 PRRSV 首先流行于北美, 疫情流行期间分离到的毒株均与原型毒株 VR-2332 高度同源^[53,71]。随后, 由于病毒的变异与演化而形成了很多分支, 类 VR-2332 病毒不再是北美的优势流行毒株, 加之源于 VR-2332 的减毒活疫苗的广泛使用, 很多毒株与 VR-2332 具有密切的遗传演化关系。2010 年, Shi 等^[62] 基于 ORF5 基因序列的演化分析, 将基因 2 型 PRRSV 分为 9 个谱系 (linage), 包括 5 个大的演化分支和 4 个毒株数量相对较少的演化分支, 相邻谱系之间至少有 10% 以上的遗传演化距离。9 个谱系中有 7 个含有北美毒株, 其他两个谱系 (3 和 4) 仅存于亚洲国家。以 VR-2332 为代表的早期流行毒株属于谱系 5。1996 年晚夏, 在美国的一些州开始暴发严重型 PRRS, 且发病猪场均进行过 PRRSV 活疫苗的接种, 分离到的毒株属于谱系 8 和 9, 其遗传演化关系与疫苗病毒无关^[6]。谱系 1 的毒株大部分来自加拿大的魁北克, 位于系统发生树根 (root) 的位置, 因此认为基因 2 型 PRRSV 很有可能起源于加拿大。2001 年末, 美国明尼苏达州出现高毒力的 PRRSV 变异株 MN184 A、B 和 C, 其基因组特征是 Nsp2 存在 131 个氨基酸的不连续缺失, 缺失模式为 111+1+19, 对应于 VR-2332 基因组的位置分别为 aa324-434、aa486 和 aa505-523^[43]。MN184 毒株属于谱系 1, 依据美国与加拿大之间的猪只交易和流动情况, 推测其极有可能源于加拿大。2012 年 Brockmeier 等^[72] 报道的分离于 2008 年的高毒力毒株 NADC30, 其 Nsp2 存在 111+1+19 的缺失模式, 缺失氨基酸位置分别为 aa323-433、aa481 和 aa533-551, 其演化与 MN184 密切相关。谱系 6~9 的毒株处于一个大的分支上, 由 20 世纪 90 年

代早期到中期流行的同一个毒株演化而来, 其中谱系 6 和 7 分化较早, 然后是谱系 8 和 9。亚系 (sublineage) 5.1 和 8.9 为减毒活疫苗毒株及其相关毒株的两个大群, 包括野生型毒株、疫苗毒株、毒力返强毒株以及相关毒株。

除美国和加拿大而外, 亚洲也主要以基因 2 型 PRRSV 流行为主, 少数欧洲国家也有。北美毒株的 7 个谱系中包含有亚洲和欧洲的毒株, 在系统发生树中欧洲和亚洲的毒株形成一个小分支。谱系 1 含有一些源于泰国的毒株。源于 VR-2332 的谱系 5 毒株分布最广, 目前至少有 8 个北美以外的国家存在这类病毒。谱系 3 的毒株存在于中国大陆、香港和台湾, 谱系 4 存在于日本。在允许使用减毒活疫苗的国家, 有从疫苗病毒演变而来的毒株^[73-76]。谱系 8 和 9 包含一些意大利毒株, 可能来源于美国。亚系 8.7 是我国 2006 年以来引起 PRRS 疫情暴发的高致病性 PRRSV 毒株, 从演化关系来看, 起源于属于谱系 8 的早期毒株。

5 我国 PRRSV 的变异与演化

5.1 基因 2 型毒株

基因 2 型 PRRSV 是我国的主要流行毒株。我国 PRRS 疫情最早暴发于 20 世纪 90 年代中期, 晚于北美和欧洲。1996 年, 郭宝清等^[77]自华北地区发病猪场流产胎儿分离到我国第一个基因 2 型 PRRSV 毒株 CH-1a。CH-1a 的全基因组序列与美国的 VR-2332 差异较大, Shi 等^[62]的演化关系分析将其置于基因 2 型毒株的谱系 8, 没有确证的证据显示该毒株是源于北美还是我国本土演化的毒株。1997 年, 杨汉春等^[78]分离到另一 PRRSV 毒株 BJ-4, 与 VR-2332 高度同源, 属于谱系 5.1, 显然该毒株是由于引进种猪或相关产品的进口贸易由北美传入。2004 年, Gao 等^[39]报道的分离自河北地区感染猪场和临床发病猪场的 2 株 PRRSV [HB-1(sh)/2002 和 HB-2(sh)/2002] 的遗传演化关系与 CH-1a 十分密切, 表明是由 CH-1a 演化而来, 且 HB-2(sh)/2002 是首次报道的基因组自然缺失的 PRRSV 毒株, 其 Nsp2 缺失 12 个氨基酸, GP3 缺失 1 个氨基酸。随后的遗传演化分析表明, HB-1(sh)/2002 是我国早期毒株 CH-1a 或类 CH-1a 向高致病性毒株演化过程中的重要中间毒株^[79]。

2006 年初夏, 我国出现和流行高致病性 PRRSV (highly pathogenic PRRSV, HP-PRRSV), 发病猪以高热、高发病率和死亡率高以及妊娠母猪严重的繁

殖障碍为特征, 疫情给我国养猪业造成了巨大经济损失。HP-PRRSV 基因组分子特征为 Nsp2 不连续缺失 30 个氨基酸, 缺失位置分别为 aa481、aa531-561^[7,80-82]。HP-PRRSV 成为随后数年内我国的优势流行毒株^[79], 并传播到相邻的周边国家^[8]。全基因组序列同源性和遗传演化关系分析表明, HP-PRRSV 与 CH-1a 的同源性为 94.9%~95.4%, 与 HB-1(sh)/2002 的同源性为 96.7%~97.2%, 与 GenBank 数据库中 2004 年分离毒株 NB/04 的同源性为 97.6%~98.2% (该毒株的 Nsp2 的 aa481 缺失), 从而推断 HP-PRRSV 是由早期毒株经历基因组的变异和逐渐积累过程演变而来^[79]。

近年来, 我国基因 2 型 PRRSV 的变异与演化以及毒株多样性受到广泛关注。基于全基因组、Nsp2 和 ORF5 基因序列的分析, 我国毒株存在广泛的变异和毒株多样性, 可分为 3~4 个亚群^[79,83-85]。目前, 我国基因 2 型 PRRSV 的变异与演化速率呈现加快和毒株多样性加剧的趋势, 基因组具有不同缺失、插入及突变类型的新毒株以及重组毒株出现的频率不断增高, 特别是 Nsp2 编码区不同程度的缺失更加多样化^[86-88]。显然, 这与我国猪场欠缺完善的生物安全措施造成 PRRSV 的传播, 无序引种和引入带毒种猪造成多毒株在猪场共存和循环, 以及不加限制地大范围普遍使用 PRRSV 减毒活疫苗密切相关。近年发现命名为类 NADC30 的新毒株在我国流行, 引起不少猪场发病, 成为优势流行毒株之一; 分离毒株的全基因组序列与美国的高毒力毒株 NADC30 高度同源, 而且其 Nsp2 编码区存在完全相同的缺失模式^[89]。显而易见, 该毒株是由美国传入并经历了一定时间演化而来。

5.2 基因 1 型毒株

2011 年, Chen 等^[68]报道了 2 株分别分离于 2006 年和 2009 年的基因 1 型毒株 (BJEU06-1 和 NMEU09-1) 的全基因组序列, 在这之前几乎没有临床分离毒株的报道。他们的研究表明, BJEU06-1 和 NMEU09-1 与 2007 年中国香港分离毒株 HKEU16 的遗传演化关系较近, 且均在 Nsp2 编码区以及 ORF3 和 ORF4 重叠区内存在氨基酸缺失, 且缺失模式与丹麦毒株 21191 相似。新近的文献报道从全国性病原监测的样本中分离到 4 株基因 1 型毒株, 其全基因组核苷酸序列与 LV 的同源性介于 87.4%~90.7%, 变异区域主要集中于 Nsp2、ORF3 和 ORF4, 且存在不连续的碱基缺失或插入^[69]。因此, 很有必要关注基因 1 型 PRRSV 在我国猪群中的感

染及导致的相关临床疾病, 监测其变异与演化以及可能出现的新毒株。

6 PRRSV变异与演化的分子机制

PRRSV 变异频繁、毒株多样, 其演化速率可能是所有 RNA 病毒中最快的。除其复制特性之外, 造成 PRRSV 变异与演化的机制还涉及病毒准种和毒株重组, 一些宿主因素可能在驱动其变异与演化中发挥重要作用。同其他 RNA 病毒一样, PRRSV 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 缺乏 3'-5' 校正功能, 导致 PRRSV 基因组复制时易于出错, 从而产生相对较高的突变率。因此, PRRSV 在复制过程中不可能不产生突变病毒。此外, 宿主细胞的一些酶类可能有助于提高其突变率, 其中一些可能是宿主先天性抗病毒防御机制的重要因素^[90]。

6.1 病毒准种

由于 RNA 病毒复制酶的低保真性, 在复制过程中不可避免地很快产生突变的变异群体, 形成基因组高度异质的准种 (quasispecies)。由于自然选择的结果, 病毒群体中环境适应的突变得以蓄积, 从而实现病毒的演化。已有的研究表明, PRRSV 具有准种现象^[91-93], 这可能是其产生变异和演化的机制之一。然而, 迄今尚无令人信服的证据支持准种是 PRRSV 演化所必需的。从来自单一 PRRSV 毒株的一大群变异体中选择突变株的机制和 PRRSV 以这种方式变异的生物学意义仍不清楚。从自然感染猪的扁桃体扩增的单一 ORF5 基因克隆的测序分析显示, 在特征性的表位及其他表位中, 同义和非同义核苷酸替换的比率并没有差异, 表明 PRRSV 的多样性并非是通过逃逸宿主免疫的阳性选择而维持的^[92]。同样, 来自细胞培养研究的有限数据也未能提供变异选择或变异热点相关的确信证据^[93-95]。

6.2 重组

较早的研究表明, 基因 2 型 PRRSV 可在体外培养系统中发生毒株间的重组而产生新的病毒, 且重组频率较高^[96]。有学者将基因 1 型和基因 2 型 PRRSV 毒株共同感染细胞, 通过序列分析发现基因 1 型毒株有 0.1%~2.5% 的 RNA 发生重组, 但是基因 1 型和基因 2 型间不发生重组。对毒株间最大重组风险值进行评估后发现, 基因 1 型内不同毒株间的重组概率比基因 1 型与基因 2 型毒株间重组概率大约高 10 000 倍, 表明这种高频率的重组事件更易发生在具有高度同源性的两个亲本 PRRSV 之间^[97]。

越来越多的自然重组毒株的发现, 揭示了基因 1 型和 2 型 PRRSV 在野外流行和感染过程中均可发生毒株间的重组而产生新的毒株^[31,63,86,98-100]。随着 PRRSV 减毒活疫苗的广泛使用, 除了疫苗病毒的毒力返强外, 疫苗病毒与野外流行毒株之间的重组以及由此可能产生致病性增强的毒株已备受瞩目。2009 年, Li 等^[101]报道, PRRSV 毒株 Em2007 是野外流行毒株 WUH1 和疫苗毒株 CH-1R 的重组病毒, 动物实验进一步发现 Em2007 的致病性高于 CH-1R 的亲本毒株 CH-1a, 表明重组不仅产生了新毒株, 且重组病毒的致病性增强。2013 年 Frossard 等^[102]分析了英国 PRRSV 毒株的遗传多样性, 发现一些分离毒株与减毒疫苗病毒十分相似, 并存在 ORF3 基因缺失和基因组重组的毒株, 从而提出疫苗的使用可影响 PRRSV 演化的观点。同年, Mu 等^[103]基于 61 个 ORF5 基因序列分析表明, ORF5 基因可发生重组, 免疫压力可能导致 ORF5 相关位点的演化。

2011 年, Liu 等^[104]将两个 PRRSV 毒株 JXwn06-81c 和 HB-1/3.9c 进行人工共感染猪, 通过对感染猪体内病毒噬斑克隆纯化和克隆病毒的 ORF5、ORF3 和 Nsp2 基因的序列分析, 系统分析了 PRRSV 的重组模式。结果表明, 两毒株在猪体内可发生重组, 且重组模式多样和复杂, 既有基因内重组, 也有基因间的片段交换, 其中 Nsp2 基因的重组现象最为复杂。Shi 等^[105]分析了 34 株 HP-PRRSV 毒株的序列, 结果显示它们具有相同的重组模式, 提示 HP-PRRSV 所致疫情的暴发起源于一个简单的重组事件。由于重组病毒在筛选过程中获得了较其亲本毒株更强的适应性和增殖能力, 因此, 理论上重组病毒会逐渐替代正在流行的毒株并成为优势毒株^[106]。2014 年, Franzo 等^[107]基于对收集自意大利北部地区 2009—2012 年实验室和 GenBank 数据库中的 ORF5、ORF7 基因序列和相关序列的分析, 发现 66 个相关序列中有 6 个独立的重组毒株, 得出在野外条件下 PRRSV 可发生高重组率的结论, 这一分析结果支持了关于“PRRSV 极易重组”的体内外实验证据。上述证据表明, 毒株间的重组是 PRRSV 变异与演化以及新毒株产生的重要分子机制, 而且在 PRRSV 致病性增强中可能起着关键性作用。

6.3 驱动 PRRSV 变异的因素

除了 PRRSV 复制特性、病毒准种的多样性和毒株间的重组以外, 可能还有一些因素会诱导或驱使其发生变异, 其中天然免疫和特异性免疫等宿主

因素诱导 PRRSV 的变异受到高度关注。已有研究表明, 猪 IFN- β 可促进 PRRSV 在 MARC-145 细胞上的变异, 其免疫压力可加速 ORF5、Nsp2 和 ORF3 基因的变异, 但对 ORF6 基因无作用^[108]。最新的研究显示, 在用猪 IFN- β 处理 MARC-145 细胞的条件下进行 PRRSV 的连续传代, 其 ORF5 基因变异加速, 非同义突变与同义突变的比率 (NS/S) 大于 2.50, 但 ORF3 基因的变异不明显^[109]。由此可见, 宿主的先天性免疫因素在加速 PRRSV 的变异与演化中具有重要作用, 特别是选择性免疫压力影响 GP5 变异的机制值得深入研究^[110]。

2010 年, Costers 等^[111]的研究结果表明, 猪体内的 GP4 中和抗体可驱动基因 1 型 PRRSV GP4 中和表位的快速演化。2012 年, Zhao 等^[112]基于 ORF5 基因分析了在抗体选择压力的细胞培养条件下 PRRSV 准种多样性的演化, 结果表明抗体选择压力能明显影响 PRRSV 准种的多样性, 可促进能逃逸免疫反应的优势准种产生。2014 年, Nilubol 等^[113]基于 145 株基因 1 型分离毒株和 132 株基因 2 型分离毒株的 277 个 ORF5 基因序列, 分析了在 PRRSV 感染猪群使用减毒活疫苗 (MLV) 免疫后 ORF5 基因的动态与演化情况, 结果表明疫苗免疫前后均可分离到两型毒株, 且在猪只体内共存, 每个基因型独立演化且互不影响; 尽管两型毒株的碱基替换率十分相似, 但 MLV 免疫可增加 2 型毒株的异源性, 导致出现 3 个新的 2 型 PRRSV 分支。这些有限的数​​据揭示了特异性免疫压力可以加速 PRRSV 的变异和演化。然而, 有一项研究用 PRRSV 感染联合免疫缺陷品系猪, 通过对病毒结构蛋白基因进行深度测序分析了 PRRSV 在猪体内的复制和准种演化, 结果鉴定出感染后 11 天和 21 天, 在正常猪和免疫缺陷猪间病毒有 7 个氨基酸的替换, 认为其变异可能是病毒适应在猪体内复制的结果, 而非免疫压力造成的氨基酸替换^[114]。

其他病原的共感染在 PRRSV 的演化中可能起着一定的作用。已有研究表明猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 共感染可增加 PRRSV 在猪体内连续传代过程中的氨基酸突变率, PRRSV/PCV2b 共感染猪体内病毒的 ORF5 与 ORF6 和 PRRSV/PCV2a 共感染猪的 ORF7 突变率明显高于 PRRSV 单独感染, 提示了 PCV2 共感染在 PRRSV 的变异和演化中的重要性^[115]。

此外, 抗病毒药物也可诱导 PRRSV 的变异。新近的实验研究表明, 在三氮唑核苷 (Ribavirin) 的

选择下, PRRSV 的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 的 2 个氨基酸会发生替换 (A283T、H421Y), 并参与介导三氮唑核苷抗性和限制性准种的多样性, 并通过影响病毒 RdRP 的保真性而在 PRRSV 复制中起着关键作用, 此项研究结果对于理解 PRRSV 演化与致病性的关系以及研发更加安全的减毒活疫苗有重要意义^[116]。

7 PRRSV 变异与致病性

毋庸置疑, PRRSV 的变异和演化会导致出现致病性增强的新毒株, 一旦成为优势毒株将造成 PRRS 的重现甚至大范围流行。美国的 PRRSV 高毒力毒株 NADC30 演化于强毒株 MN184^[72], 我国的高致病性毒株是由早期流行毒株演化而来^[79], 其致病性和毒力远高于遗传演化关系相近的早期毒株^[82,117-118]。迄今为止, 人们仍未完全理解和解析 PRRSV 基因组变异与其致病性增强的相关性及其分子机制。本实验室的研究揭示了我国 HP-PRRSV 的 Nsp2 编码区的特征性变异 (30-aa 氨基酸缺失) 与其致死性毒力无关^[82], 而其 Nsp9 和 Nsp10 与其体内外的增殖能力密切相关, 并赋予 HP-PRRSV 致死性毒力^[119]。同样, 东欧出现的高致病性毒株 (Lena) 在感染猪体内也呈现出较高的增殖能力, 感染猪的病毒血症显著高于早期流行毒株^[9]。这些研究提示了 PRRSV 的增殖能力与致病性增强密切相关。然而, 不同的 PRRSV 毒株的致病性存在差异, 一些毒株虽然基因组高度同源且遗传演化关系相近, 但致病性会大不相同^[72], 因此, PRRSV 基因组变异与致病性增强或减弱之间的关系仍不明确。此外, 常常由于新毒株的传入而造成猪场 PRRS 不稳定, 猪群出现临床发病, 这除了新毒株本身的致病性以外, 还与新毒株的传入使猪场毒株的多样性和复杂性加剧以及与猪场原有毒株发生重组而出现致病性增强的毒株密切相关^[11]。因此, 深入研究 PRRSV 的变异与致病性之间的关系以及毒株致病性增强或减弱的分子机制对于 PRRSV 的预防与控制具有重要的理论和实践意义。

目前, 我国 PRRSV 减毒活疫苗应用广泛, 疫苗病毒的回复突变和毒力返强以及与野毒株重组的现象令人忧心忡忡。新近的研究表明, 从一些发生 PRRS 的猪场分离到与 HP-PRRSV 减毒活疫苗病毒高度同源的毒株, 且分离毒株呈现对猪的致病性增强, 为这一现象提供了有力的证据^[120]。因此, 在 PRRSV 的防预与控制中, 合理、有条件地有限使

用减毒活疫苗十分必要,这不仅有利于有效阻止疫苗病毒的演化和毒力回复返强,而且可降低疫苗病毒与野毒重组而产生新毒株的几率,并延缓 PRRSV 变异和演化的速度。

8 展望

PRRSV 是变异和演化速度极高的一种 RNA 病毒,其持续变异与演化和毒株的多样性加剧了预防与控制的难度。迄今,人们对 PRRSV 变异和演化本质的认识仍十分肤浅。深入研究和揭示 PRRSV 变异的分子机制与演化规律,明确驱动其变异与演化的关键因素,解析 PRRSV 致病性/毒力增强的分子机制,这无疑有助于通过采取科学的防控技术来有效控制 PRRSV 的流行和传播,从而降低 PRRS 的发生及其对养猪生产的危害和经济损失。与此同时,开展 PRRSV 分子流行病学研究,监测其变异毒株和新毒株的出现,明晰毒株间的遗传演化关系,对于 PRRS 发生与流行的预警和及时采取积极有效的防控策略具有十分重要的意义。虽然人们还不能有效阻止 PRRSV 的变异与演化,但可以通过推行现代养猪生产管理、生物安全、人工授精、生猪屠宰与种猪贸易控制与检疫以及合理使用疫苗等,以阻断其传播和流行,从而延缓其变异与演化的速度和降低新毒株出现的几率。

[参 考 文 献]

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*, 1991, 13: 121-30
- [2] Benfield DA, Nelson E, Collins JE, et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4: 127-33
- [3] Collins J, Benfield DA, Christianson WT, et al. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4: 117-26
- [4] Meulenber JJ, Hulst MM, De Meijer EJ, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 1993, 192: 62-72
- [5] Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel P, et al. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 1993, 193: 329-39
- [6] Key KF, Haqshenas G, Guenette DK, et al. Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet Microbiol*, 2001, 83: 249-63
- [7] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One*, 2007, 2: e526
- [8] Feng Y, Zhao T, Nguyen T, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant, Vietnam and China, 2007. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14: 1774-6
- [9] Karniychuk UU, Geldhof M, Vanhee M, et al. Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res*, 2010, 6: 30-9
- [10] Zhou L, Yang H. Porcine reproductive and respiratory syndrome in China. *Virus Res*, 2010, 154: 31-7
- [11] Chaikhumwang P, Tantituvanont A, Tripipat T, et al. Dynamics and evolution of highly porcine reproductive and respiratory syndrome virus following its introduction into a herd concurrently infected with both types 1 and 2. *Infect Genet Evol*, 2015, 30: 164-74
- [12] Murtaugh MP, Elam MR, Kakach LT. Comparison of the structural protein coding sequence of the VR-2332 and Lelystad virus strain of the PRRS virus. *Arch Virol*, 1995, 140: 1451-60
- [13] Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol*, 1999, 73: 270-80
- [14] Magar R, Larochele R, Dea S, et al. Antigenic comparison of Canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. *Can J Vet Res*, 1995, 59: 232-4
- [15] Nelson E, Christopher-Hennings J, Drew T, et al. Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 3184-89
- [16] Carmen S, Sanford SE, Dea S. Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario--1978 to 1982. *Can Vet J*, 1995, 36: 776-7
- [17] Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, et al. General overview of PRRS virus: a perspective from the United States. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 187-16
- [18] Plagemann PG. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: origin hypothesis. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9: 903-8
- [19] Reiner G, Fresen C, Bronnert S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in wild boars. *Vet Microbiol*, 2009, 136: 250-8
- [20] Hanada K, Suzuki Y, Nakane T, et al. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol Biol Evol*, 2005, 22: 1024-31
- [21] Forsberg R. Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes. *Mol Biol Evol*, 2005, 22: 2131-34
- [22] Shi M, Lam TT, Hon CC, et al. Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection

- of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol*, 2010, 84: 8700-11
- [23] Meulenbergh JJ, Petersen-Den Besten A, De Kluyver EP, et al. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, 1995, 206: 155-63
- [24] Meulenbergh JJ, Petersen-Den Besten A, De Kluyver EP, et al. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 197-202
- [25] Meng XJ, Paul PS, Halbur PG. Molecular cloning and nucleotide sequence of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 1994, 75: 1795-801
- [26] Morozov I, Meng XJ, Paul PS. Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 1995, 140: 1313-19
- [27] Wootton S, Yoo D, Rogan D. Full-length sequence of a Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate. *Arch Virol*, 2000, 145: 2297-323
- [28] Shen S, Kwang J, Liu W, et al. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the *Nsp2* gene with a unique insertion. *Arch Virol*, 2000, 145: 871-83
- [29] Murtaugh MP, Faaberg KS, Laber J, et al. Genetic variation in the PRRS virus. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 440: 787-94
- [30] Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol*, 2000, 74: 309-29
- [31] Forsberg R, Storgaard T, Nielsen HS, et al. The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically shewed within Europe. *Virology*, 2002, 299: 38-47
- [32] Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 2000, 145: 659-68
- [33] Johnson CR, Griggs TF, Gnanandarajah J, et al. Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J Gen Virol*, 2011, 92: 1107-16
- [34] Snijder EJ, Meulenbergh JJ. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*, 1998, 79: 961-79
- [35] van Nieuwstadt AP, Meulenbergh JJ, Van Essen-Zanbergen A, et al. Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J Virol*, 1996, 70: 4767-72
- [36] Mardassi H, Mounir S, Dea S. Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Quebec reference strain. *Arch Virol*, 1995, 140: 1405-18
- [37] Wu WH, Fang Y, Farwell R, et al. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology*, 2001, 287: 183-91
- [38] Tan C, Chang L, Shen S, et al. Comparison of the 5' leader sequences of North American isolates of reference and field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes*, 2001, 22: 209-17
- [39] Gao Z, Guo X, Yang H. Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 2004, 149: 1341-51
- [40] Allende R, Lewis TL, Lu Z, et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol*, 1999, 80: 307-15
- [41] Fang Y, Kim DY, Ropp S, et al. Heterogeneity in *Nsp2* of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Res*, 2004, 100: 229-35
- [42] Ropp SL, Wees CE, Fang Y, et al. Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J Virol*, 2004, 78: 3684-703
- [43] Han J, Wang Y, Faaberg KS. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 2006, 122: 175-82
- [44] Oleksiewicz MB, Bötner A, Toft P, et al. Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus deletion mutants: correlation with the porcine antibody response to a hypervariable site in the ORF 3 structural glycoprotein. *Virology*, 2000, 267: 135-40
- [45] Katz JB, Shafer AL, Eernisse KA, et al. Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3. *Vet Microbiol*, 1995, 44: 65-76
- [46] Suárez P, Zardoya R, Martín MJ, et al. Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res*, 1996, 42: 159-65
- [47] Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Can J Vet Res*, 1998, 62: 170-7
- [48] Liu C, Zhang L, Ning YB. Complete genome sequence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus variant with a new insertion in glycoprotein 5, isolated from a stillborn fetus. *Genome Announc*, 2015, 3: e01359-15
- [49] Mardassi H, Athanassios R, Mounir S, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Can J Vet Res*, 1994, 58: 55-64
- [50] Yang L, Yoon KJ, Li Y, et al. Antigenic and genetic variations of the 15 kD nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Arch Virol*, 1999, 144: 525-46

- [51] Drew TW, Lowings JP, Vapp F. Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK. *Vet Microbiol*, 1997, 55: 209-21
- [52] Le Gall A, Legeay O, Bourhy H, et al. Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res*, 1998, 54: 9-21
- [53] Meng XJ, Paul PS, Halbur PG, et al. Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 1995, 76: 3181-88
- [54] Indik S, Valicek L, Klein D, et al. Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2497-502
- [55] Stadejek T, Stankevicius A, Storgaard T, et al. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1861-73
- [56] Indik S, Schmoll F, Sipos W, et al. Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. *Vet Microbiol*, 2005, 107: 171-8
- [57] Pesch S, Meyer C, Ohlinger VF, et al. New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol*, 2005, 107: 31-48.
- [58] Mateu E, Diaz I, Darwich L, et al. Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res*, 2006, 115: 198-206
- [59] Stadejek T, Oleksiewicz MB, Potapchuk D, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol*, 2006, 87: 1835-141
- [60] Balka G, Hornyak A, Balint A, et al. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains circulating in Hungarian swine herds. *Vet Microbiol*, 2008, 127: 128-35
- [61] Stadejek T, Oleksiewicz MB, Scherbakov AV, et al. Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe. *Arch Virol*, 2008, 153: 1479-88
- [62] Shi M, Lam TT, Hon CC, et al. Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res*, 2010, 154: 7-17
- [63] Fang Y, Schneider P, Zhang WP, et al. Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Arch Virol*, 2007, 152: 1009-17
- [64] Dewey C, Charbonneau G, Carman S, et al. Lelystad-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) identified in Canadian swine. *Can Vet J*, 2000, 41: 493-4
- [65] Nam E, Park CK, Kim SH, et al. Complete genomic characterization of a European type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in Korea. *Arch Virol*, 2009, 154: 629-38
- [66] Lee C, Kim H, Kang B, et al. Prevalence of and phylogenetic analysis of the isolated type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea. *Virus Genes*, 2010, 40: 225-30
- [67] Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A, et al. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Vet Microbiol*, 2004, 101: 9-21
- [68] Chen N, Cao Z, Yu X, et al. Emergence of novel European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mainland China. *J Gen Virol*, 2011, 92: 880-92
- [69] Zhou Z, Liu Q, Hu D, et al. Complete genomic characterization and genetic diversity of four European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from China in 2011. *Virus Genes*, 2015, 51: 378-84
- [70] Amonsin A, Kedkovid R, Puranaveja S, et al. Comparative analysis of complete nucleotide sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in Thailand (US and EU genotypes). *Virol J*, 2009, 6: 143-53
- [71] Kapur V, Elam MR, Pawlovich TM, et al. Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1271-8
- [72] Brockmeier SL, Loving CL, Vorwald AC, et al. Genomic sequence and virulence comparison of four Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains. *Virus Res*, 2012, 169: 212-21
- [73] Cha SH, Choi EJ, Park JH, et al. Molecular characterization of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses and comparison to other Asian PRRS viruses. *Vet Microbiol*, 2006, 117: 248-57
- [74] Chen J, Liu T, Zhu C, et al. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence. *Biochem Genet*, 2006, 44: 425-35
- [75] An T, Zhou Y, Liu G, et al. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity. *Vet Microbiol*, 2007, 123: 43-52
- [76] Greiser-Wilke I, Fiebig K, Drexler C, et al. Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in selected herds in a pig-dense region of North-Western Germany. *Vet Microbiol*, 2010, 143: 213-23
- [77] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似PRRS流产胎儿分离PRRSV的研究. *中国预防兽医学报*, 1996, 2: 1-5
- [78] 杨汉春, 管山红, 尹晓敏, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与初步鉴定. *中国兽医杂志*, 1997, 20: 9-10

- [79] Zhou L, Chen S, Zhang J, et al. Molecular variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China. *Virus Res*, 2009, 145: 97-105
- [80] Li Y, Wang X, Bo K, et al. Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet J*, 2007, 174: 577-84
- [81] Zhou Y, Hao X, Tian Z, et al. Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55: 152-64
- [82] Zhou L, Zhang J, Zeng J, et al. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence. *J Virol*, 83: 5156-67
- [83] An T, Tian Z, Xiao Y, et al. Origin of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 365-7
- [84] Li B, Fang L, Liu S, et al. The genetic diversity of Chinese porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from 1996 to 2009. *Vet Microbiol*, 2010, 146: 226-37
- [85] Li B, Fang L, Guo X, et al. Epidemiology and evolutionary characteristics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China between 2006 to 2010. *J Clin Microbiol*, 2011, 49: 3175-83
- [86] Chen N, Yu X, Wang L, et al. Two natural recombinant highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses with different pathogenicities. *Virus Genes*, 2013, 46: 473-8
- [87] Zhou L, Yang X, Tian Y, et al. Genetic diversity analysis of genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses emerging in recent years in China. *BioMed Res Int*, 2014, 2014: 748068
- [88] 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. *Virus Genes*, 2015, 50: 39-45
- [89] Zhou L, Wang Z, Ding Y, et al. NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21: 2256-7
- [90] Brar MS, Shi M, Murtaugh MP et al. Evolutionary diversification of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 2015, 96: 1570-80
- [91] Goldberg TL, Lowe JF, Miburn SM, et al. Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology*, 2003, 317: 197-207
- [92] Rowland RR, Steffen M, Ackerman T, et al. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology*, 1999, 259: 262-6
- [93] Brar MS, Shi M, Ge L, et al. Genomic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolated revealed by deep sequencing. *PLoS One*, 2014, 9: e88807
- [94] Schommer SK, Kleiboeker SB. Use of a PRRSV infection clone to evaluate *in vitro* quasispecies evolution. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 581: 435-8
- [95] Lu ZH, Archibald AL, Ait-Ali T. Beyond the whole genome consensus: unravelling of PRRSV phylogenomics using next generation sequencing technologies. *Virus Res*, 2014, 194: 167-74
- [96] Yuan S, Nelsen CJ, Murtaugh MP, et al. Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 1999, 61: 87-98
- [97] van Vugt JJ, Storgaard T, Oleksiewicz MB, et al. High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *J Gen Virol*, 2001, 82: 2615-20
- [98] Murtaugh MP, Yuan S, Faaberg KS. Appearance of novel PRRSV isolates by recombination in the natural environment. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 494: 31-6
- [99] Li Y, Wang X, Jiang P, et al. Genetic variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in China from 2002 to 2007 based on ORF5. *Vet Microbiol*, 2009, 138: 150-5
- [100] Burgara-Estrella A, Reséndiz-Sandoval M, Cortey M, et al. Temporal evolution and potential recombination events in PRRSV strains of Sonora Mexico. *Vet Microbiol*, 2014, 174: 540-6
- [101] Li B, Fang L, Xu Z, et al. Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 2032-5
- [102] Frossard JP, Hughes GJ, Westcott DG, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: genetic diversity of recent British isolates. *Vet Microbiol*, 2013, 162: 507-18
- [103] Mu C, Lu X, Duan E, et al. Molecular evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from central China. *Res Vet Sci*, 2013, 95: 908-12
- [104] Liu D, Zhou R, Zhang J, et al. Recombination analyses between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in vivo*. *Virus Res*, 2011, 155: 473-86
- [105] Shi M, Holmes EC, Brar MS, et al. Recombination is associated with an outbreak of novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in China. *J Virol*, 2013, 87: 10904-7
- [106] Yu X, Chen N, Wang L, et al. New genomic characteristics of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses do not lead to significant changes in pathogenicity. *Vet Microbiol*, 2012, 158: 291-9
- [107] Franzo G, Cecchinato M, Martini M, et al. Observation of high recombination occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in field condition. *Virus Res*, 2014, 194: 159-66
- [108] He D, Niu X, Jiang A, et al. swIFN- β promotes genetic mutation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Marc-145. *Vet Microbiol*, 2013, 166: 174-8

- [109] Xiong Z, Niu X, Song Y, et al. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 and GP3 genes under swIFN- β immune pressure and interferon regulatory factor-3 activation suppressed by GP5. *Res Vet Sci*, 2015, 101: 175-9
- [110] Franzo G, Dotto G, Cecchinato M, et al. Phylodynamic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Italy: action of selective pressures and interactions between different clades. *Infect Genet Evol*, 2015, 31: 149-57
- [111] Costers S, Vanhee M, Van Breedam W, et al. GP4-specific neutralizing antibodies might be a driving force in PRRSV evolution. *Virus Res*, 2010, 154: 104-13
- [112] Zhao P, Ma C, Dong X, et al. Evolution of quasispecies diversity for porcine reproductive and respiratory syndrome virus under antibody selective pressure. *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 788-92
- [113] Nilubol D, Tripipat T, Hoonsuwan T, et al. Dynamics and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) ORF5 following modified live PRRSV vaccination in a PRRSV-infected herd. *Arch Virol*, 2014, 159: 17-27
- [114] Chen N, Dekkers JC, Ewen CL, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication and quasispecies evolution in pigs that lack adaptive immunity. *Virus Res*, 2015, 195: 246-9
- [115] Yin SH, Xiao CT, Gerber PF, et al. Concurrent porcine circovirus type 2a (PCV2a) or PCV2b infection increases the rate of amino acid mutations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during serial passages in pigs. *Virus Res*, 2013, 178: 445-51
- [116] Tian D, Meng XJ. Amino acid residues Ala283 and His421 in the RNA-dependent RNA polymerase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus play important roles in viral Ribavirin sensitivity and quasispecies diversity. *J Gen Virol*, 2016, 97: 53-9
- [117] He Y, Wang G, Liu Y, et al. Characterization of thymus atrophy in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 2012, 160: 455-62
- [118] Han D, Hu Y, Li L, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection results in acute lung injury of the infected pigs. *Vet Microbiol*, 2014, 169: 135-46
- [119] Li Y, Zhou L, Zhang J, et al. Nsp9 and Nsp10 contribute to the fatal virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004216
- [120] Jiang Y, Xia T, Zhou Y, et al. Characterization of three porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from a single swine farm bearing strong homology to a vaccine strain. *Vet Microbiol*, 2015, 179: 242-49