

# 一株牛口咽液分离口蹄疫病毒的特性分析

蔡梦婷<sup>1#</sup>, 袁红<sup>1,2#</sup>, 王利豪<sup>3</sup>, 杨竞纯<sup>1</sup>, 王涛<sup>1</sup>, 包慧芳<sup>1,2</sup>, 杨宇轩<sup>1,2</sup>,  
孙普<sup>1,2</sup>, 李坤<sup>1,2,4</sup>, 黄书伦<sup>1,2</sup>, 郭海洋<sup>1,2</sup>, 李平花<sup>1,2</sup>, 卢曾军<sup>1,2,4</sup>,  
何继军<sup>1,2,4\*</sup>, 白兴文<sup>1,2,4\*</sup>

1 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院, 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州

2 WOA/国家口蹄疫参考实验室, 甘肃 兰州

3 华中农业大学 动物医学院, 湖北 武汉

4 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州

蔡梦婷, 袁红, 王利豪, 杨竞纯, 王涛, 包慧芳, 杨宇轩, 孙普, 李坤, 黄书伦, 郭海洋, 李平花, 卢曾军, 何继军, 白兴文. 一株牛口咽液分离口蹄疫病毒的特性分析[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 2938-2947.

CAI Mengting, YUAN Hong, WANG Lihao, YANG Jingchun, WANG Tao, BAO Huifang, YANG Yuxuan, SUN Pu, LI Kun, HUANG Shulun, GUO Haiyang, LI Pinghua, LU Zengjun, HE Jijun, BAI Xingwen. Characteristics of a strain of foot-and-mouth disease virus isolated from bovine oropharyngeal fluid[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 2938-2947.

**摘要:** 【目的】分离、鉴定一株牛源口咽液中的口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV), 分析其抗原蛋白氨基酸变异及增殖特性。【方法】采用 RT-PCR 及基因测序技术鉴定 FMDV 阳性牛口咽液样本, 通过细胞接种从阳性样本中分离病毒, 并利用间接免疫荧光法对分离病毒进行鉴定。通过 PCR 分段扩增及序列测定获得分离 FMDV 的全基因组, 进一步通过序列比对分析分离 FMDV 的抗原蛋白氨基酸变异, 通过蚀斑形成试验和一步生长曲线评价分离 FMDV 的增殖特性。【结果】成功从牛口咽液中分离、鉴定出一株 FMDV, 命名为 O/FMDV/OP/2022/B。该病毒属于 O 型 Ind-2001 谱系, 其抗原蛋白 VP1、VP2 和 VP3 的氨基酸残基发生变异。在 BHK-21 细胞上, O/FMDV/OP/2022/B 毒株形成的蚀斑显著小于疫苗毒株 O/FMDV/HN/93 的蚀斑, 且其一步生长曲线明显低于 O/FMDV/HN/93。【结论】本研究从牛口咽液中分离出一株 FMDV, 发现其抗原蛋白氨基酸发生变异, 且增殖能力显著低于疫苗毒株 O/FMDV/HN/93。该研究有助于从病毒学角度深入理解 FMDV 持续感染牛口咽组织的机制, 并为口蹄疫的防控提供了参考依据。

**关键词:** 口蹄疫病毒; 持续性感染; 氨基酸突变; 病毒增殖

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800300); 甘肃省科技计划(23JRRA1515); 甘肃省重大科技专项(21ZD3NA001, 22ZD6NA001, 22ZD6NA012); 国家生猪技术创新中心项目(NCTIP-XD/C03)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300), the Science and Technology Plan of Gansu Province (23JRRA1515), the Major Science and Technology Project of Gansu Province (21ZD3NA001, 22ZD6NA001, 22ZD6NA012), and the Project of National Center of Technology Innovation for Pigs (NCTIP-XD/C03).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: HE Jijun, [hejijun@caas.cn](mailto:hejijun@caas.cn); BAI Xingwen, [baixingwen@caas.cn](mailto:baixingwen@caas.cn)

Received: 2024-12-12; Accepted: 2025-02-07; Published online: 2025-04-14

## Characteristics of a strain of foot-and-mouth disease virus isolated from bovine oropharyngeal fluid

CAI Mengting<sup>1#</sup>, YUAN Hong<sup>1,2#</sup>, WANG Lihao<sup>3</sup>, YANG Jingchun<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>1</sup>, BAO Huifang<sup>1,2</sup>, YANG Yuxuan<sup>1,2</sup>, SUN Pu<sup>1,2</sup>, LI Kun<sup>1,2,4</sup>, HUANG Shulun<sup>1,2</sup>, GUO Haiyang<sup>1,2</sup>, LI Pinghua<sup>1,2</sup>, LU Zengjun<sup>1,2,4</sup>, HE Jijun<sup>1,2,4\*</sup>, BAI Xingwen<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, China

<sup>2</sup> World Organization for Animal Health (WOAH)/National Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou, Gansu, China

<sup>3</sup> College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

<sup>4</sup> Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou, Gansu, China

**Abstract:** [Objective] To isolate and identify a strain of foot-and-mouth disease virus (FMDV) from bovine oropharyngeal fluid (OPF) and subsequently analyze the amino acid mutations in antigenic proteins and the proliferative properties of the isolated virus. [Methods] RT-PCR and sequencing were performed to identify the FMDV-positive OPF samples. The FMDV strain was isolated from bovine OPF samples by cell inoculation and identified by indirect immunofluorescence assay. The whole genome sequence of the strain was obtained by fragment amplification and sequencing. The amino acid sequences were compared to reveal the amino acid mutations in the antigenic proteins of the strain. The proliferative properties of the isolated FMDV strain were analyzed by the plaque forming assay and one-step growth curve. [Results] A FMDV strain O/FMDV/OP/2022/B was successfully isolated from bovine OPF, belonging to serotype O and Ind-2001 lineage. Amino acid mutations were identified in the antigenic proteins VP1, VP2, and VP3 of O/FMDV/OP/2022/B. In addition, the plaque of O/FMDV/OP/2022/B in BHK-21 cells was smaller than that of the vaccine strain O/FMDV/HN/93. The one-step growth curves showed that O/FMDV/OP/2022/B had significantly lower replication titer than O/FMDV/HN/93 in BHK-21 cells. [Conclusion] A strain of FMDV was isolated from bovine OPF, and it displayed amino acid mutations in antigenic proteins and had lower proliferative capacity than the vaccine strain O/FMDV/HN/93. This study contributes to a better understanding of the mechanism of persistent FMDV infection in the bovine oropharynx and provides a reference for the prevention and control of FMD.

**Keywords:** foot-and-mouth disease virus; persistent infection; amino acid mutation; viral proliferation

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)作为一种传染性极强的重大动物疫病, 主要感染猪、牛和羊等偶蹄类动物, 其历史可以追溯到1546年。Frosch等发现引起FMD的病原物质

比细菌更小, 随后的研究证实这种传染因子为口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)。FMDV属于小RNA病毒科(Picornaviridae), 口疮病毒属(Aphthovirus), 基因组全长8500 nt左

右, 编码的结构蛋白为 VP1、VP2、VP3 和 VP4, 编码的非结构蛋白为 L、2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D。FMDV 有 7 种血清型, 每种血清型又分为多种拓扑型和谱系。近年来, 我国主要流行 O 型和 A 型 FMDV, 其中 A 型 FMDV 的报道越来越少, 目前流行的 FMDV 多为 O 型。O 型 FMDV 流行毒株复杂, 流行的谱系包括 O/CATHAY、O/Mya-98、O/Ind-2001 和 O/PanAsia, 这种多谱系 FMDV 的共同流行加剧了病毒变异, 使病毒逐渐进化出免疫逃逸能力, 严重威胁我国 FMD 的防控工作<sup>[1]</sup>。

在自然感染中, FMDV 主要通过呼吸道感染易感动物, 极少量的感染性病毒颗粒就足以引发 FMD<sup>[2]</sup>。牛被认为是最容易通过空气传播途径感染 FMDV 的动物, 仅需 10 TCID<sub>50</sub> 即可感染 FMDV<sup>[3-4]</sup>。因此, FMD 流行时牛的症状最明显, 可作为疫情的“指示器”。FMDV 的原发性及持续性感染部位定位于牛的鼻咽和软腭背侧的上皮细胞。在感染后的 24–48 h, FMDV 从感染部位进入血液, 随后扩散到全身不同组织和细胞中进行复制, 同时机体出现发热<sup>[5]</sup>, 可观察到明显的 FMD 临床症状, 患病动物的分泌物、排泄物及组织中可检测到 FMDV 的存在<sup>[6]</sup>。有一定比例的牛在急性感染 FMDV 痊愈后无法完全清除体内的病毒, 发展为 FMDV 携带者或 FMDV 持续性感染者, 在口咽部周期性分泌低水平的 FMDV, 而无任何临床症状。1959 年, Van Bekkum 等<sup>[7]</sup>提出 FMDV 持续性感染的概念, 即感染 FMDV 28 d 后仍然能够在无临床症状动物的口咽液(oropharyngeal fluid, OPF)中检测到 FMDV 的存在。综上所述, 牛的 OPF 中只有在急性感染 FMDV 后或者成为无症状的 FMDV 持续性感染者时, 才会携带 FMDV。由于从无症状动物的 OPF 中分离出 FMDV 较为困难, 致使国内关于此种 FMDV 分离和特性研究的报道屈指可数。

无论是否接种 FMD 疫苗, FMDV 在 OPF 中持续存在的发生率约为 50%<sup>[8]</sup>, 这意味着疫苗

免疫不能清除 OPF 中持续存在的 FMDV。监测显示, 非洲水牛能够将 OPF 中周期性分泌和脱落的 FMDV 传播给同居的牛和黑斑羚。将 FMDV 携带动物的 OPF 注射到牛和猪中, 能够引起牛和猪感染 FMDV<sup>[9]</sup>, 表明 OPF 中持续存在的 FMDV 具有感染性, 可以作为一种引发 FMD 流行的潜在传染源。OPF 中持续存在的 FMDV 不仅会增加 FMD 在种群中的传播风险, 而且这些持续携带 FMDV 的动物可能成为中间宿主, 促使病毒在不同物种之间传播。此外, 口咽部位持续存在的 FMDV 面临宿主免疫系统较大的选择压力, 其基因组易发生变异, 可能使疫苗失去对变异株的有效保护, 加大 FMD 的防控难度<sup>[10]</sup>。近期研究发现, OPF 中持续存在的 FMDV 与急性感染 FMDV 可以发生重组, 这可能更有利于 FMDV 的传播<sup>[11]</sup>。因此, OPF 中持续存在的 FMDV 可能成为自然界中的重要传染源, 是 FMD 难以彻底消灭的根源。研究 OPF 中持续存在的 FMDV 对于 FMD 的防控和清除具有重要的现实意义。本研究从田间收集的无症状牛 OPF 样品中分离出一株 FMDV, 测定了该毒株的全基因组序列, 比对了抗原蛋白氨基酸变异, 研究了其增殖特性, 以期从病毒角度深入研究 FMDV 持续感染牛口咽组织的机理提供材料和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒和细胞

FMDV O/FMDV/HN/93 由中国农业科学院兰州兽医研究所国家口蹄疫参考实验室保存。涉及 FMDV 活病毒的操作均在中国农业科学院兰州兽医研究所 P3 生物安全实验室进行。BHK-21 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所宿主抗病毒感染及免疫生物学团队保存。

#### 1.1.2 主要试剂

MEM 培养基、2×MEM 培养基、胎牛血清

(fetal bovine serum, FBS)、0.25% EDTA 的胰酶溶液均购自 Gibco 公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自白鲨生物科技有限公司; DNA marker 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; RNA Extraction Kit 购自 Omega 公司; FITC 标记的山羊抗鼠二抗和 HRP 标记的山羊抗兔/鼠二抗均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; ECL 超敏显色液购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 抗 FMDV 3A 蛋白鼠源单克隆抗体(3A24)由本团队制备保存<sup>[12-13]</sup>。

## 1.2 引物设计及合成

根据 GenBank 已报道的 FMDV 基因组全长序列 (GenBank 登录号为 MN095354.1、KJ825809.1、MN095364.1、OM562600.1、OK318520.1、KY444646.1、MT944983.1、KJ825803.1), 设计扩增 FMDV 全基因组序列引物和 VP1 基因引物(表 1), 由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

## 1.3 FMDV 阳性 OPF 的鉴定

2022 年国家口蹄疫参考实验室在主动监测中从某地无 FMD 临床症状的牛中采集到 6 份牛

OPF。将牛 OPF 样品在 12 000 r/min 的条件下离心 10 min, 上清液转移到新的 EP 管中, 利用 RNA Extraction Kit 提取样品中的总 RNA。以提取的总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增 FMDV VP1 基因。将凝胶电泳正确的 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行序列测定。由于我国流行 O 型、A 型和 Asia1 型 FMDV, 从 GenBank 下载 3 种血清型 FMDV 的 VP1 基因序列, 与测定的序列通过 MEGA 11 软件进行比对分析, 鉴定测得的基因是否为 FMDV VP1 基因以及属于何种谱系。

## 1.4 OPF 中 FMDV 的分离

使用 0.22 μm 滤器过滤 FMDV 阳性 OPF, 与 1/4 体积的三氯三氟乙烷(trichlorotrifluoroethane, TTE)混合, 振荡均匀后 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液接种至生长状况良好的 BHK-21 细胞, 显微镜下观察 BHK-21 细胞病变(cytopathic effect, CPE)情况。若细胞出现变圆、变大且呈倒挂葡萄串状, 判定为细胞病变。收取病变样品, 在 BHK-21 细胞中连续传代, 直至 CPE 时间稳定, 将传代样品贮存于-80 °C冰箱备用。

表1 引物设计

Table 1 Design of primer

| Primers name | Primer sequences (5'→3')                            |
|--------------|-----------------------------------------------------|
| VP31(+)      | TAGTGCTGGYAARGACTTTG                                |
| NK61(-)      | GACATGTCCTCCTGCATCTG                                |
| S1(+)        | TTGAAAGGGGGCGCTAGGGT                                |
| S1(-)        | GGGGGGGGGGGGGGGTGAAAGGCGGGCTTCG                     |
| S2(+)        | CGCCTTTCACCCCCCCCCCCCCC                             |
| S2(-)        | GAGTTCCTGGTACTGCTGCATGT                             |
| P1(+)        | ACCTCCAACGGGTGGTACGCGAT                             |
| P1(-)        | AGCATGATGGCCACAAGGACTGGGT                           |
| P2(+)        | CTGCCTACCTCTTTCAACTACGGTGC                          |
| P2(-)        | TCAAAGTTTTCTTCAGGCGCTT                              |
| P3-6764(+)   | GCCACCACCAACCTGTACTCGGG                             |
| P3-6764(-)   | GGTGCAAGCTTGGTTTTGCGCAT                             |
| 6455-8200(+) | TGTAGTGTGCATGGACGGAG                                |
| 6455-8200(-) | GACGCGCCGCCATATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT |
| VP1(+)       | ACCACCTCCGCAGGTGAGTCCGCT                            |
| VP1(-)       | GTGGCACCTGTCAAACAGTTGCTG                            |

## 1.5 分离 FMDV 的鉴定

利用间接免疫荧光试验(immunofluorescence assay, IFA)鉴定收取的 BHK-21 细胞病变样品是否为 FMDV。将生长状况良好的 BHK-21 细胞铺于 6 孔板中,当细胞密度达到 80% 左右时,加入 1/10 体积的病毒液。将 6 孔板置于 37 °C 细胞培养箱中,孵育 6 h 后弃去细胞上清液,用 PBS 漂洗 3 次,加入 4% 多聚甲醛,室温固定 15 min。弃去固定液后,加入冰冷的甲醇溶液,通透 10 min,再用 PBS 漂洗 3 次。加入鼠源 3A24 单克隆抗体(1:200 稀释),37 °C 孵育 1 h,用 PBS 漂洗 3 次。加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1:200 稀释),37 °C 孵育 1 h,用 PBS 漂洗 3 次后,在荧光显微镜下观察绿色荧光情况并拍照。

## 1.6 分离 FMDV 的全基因组序列测定及抗原蛋白氨基酸序列比对

按照 RNA Extraction Kit 操作说明书提取第 7 代传代样品的总 RNA。基于设计的 6 对引物,采用 RT-PCR 方法分段扩增牛源 OPF 分离 FMDV 的全基因组。将 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。从 NCBI 上检索并下载 Ind-2001 谱系 FMDV 的氨基酸序列,比对分析 O/FMDV/OP/2022/B 抗原蛋白氨基酸变异情况。

## 1.7 分离 FMDV 的蚀斑表型分析

以疫苗毒株 O/FMDV/HN/93 为阳性对照,通过蚀斑形成试验分析分离 FMDV 的蚀斑表型。将生长状况良好的 BHK-21 细胞接种至 6 孔板中,待细胞长满后,用无血清 MEM 培养基以 10 倍梯度连续稀释 O/FMDV/HN/93 和分离的 FMDV。向 6 孔板的每孔中分别加入 200  $\mu$ L 不同稀释度的 FMDV,置于 37 °C 细胞培养箱中孵育 1 h。加入 2 mL 黄芪胶混合液(2 $\times$ MEM:1.2% 黄芪胶=1:1, 1% FBS, 1% 青链霉素),放入 37 °C 细胞培养箱中培养 48 h。弃去培养液后,加入 2 mL 预冷的固定液(50% 丙酮, 50% 甲

醇),置于-20 °C 固定 1 h。弃去固定液,加入结晶紫溶液,室温染色过夜,清水冲洗后观察蚀斑表型,统计蚀斑数量,并计算 2 株 FMDV 的蚀斑形成单位(plaque forming unit, PFU)。

## 1.8 分离 FMDV 的一步生长曲线测定

以疫苗毒株 O/FMDV/HN/93 为阳性对照,通过一步生长曲线分析分离 FMDV 的复制能力。将 BHK-21 细胞接种至 12 孔板中,待细胞长满后,以 1 MOI (multiplicity of infection)的剂量分别接种 O/FMDV/HN/93 和分离的 FMDV。置于 37 °C 细胞培养箱中,分别在 4、8、12 和 20 h 收取样品,测定样品的 PFU,绘制 2 株 FMDV 的一步生长曲线。

# 2 结果与分析

## 2.1 携带 FMDV 的 OPF 的检测

利用 RT-PCR 检测 6 份牛 OPF 中是否能够扩增出 FMDV VP1 基因。1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,6 个 PCR 产物中仅有 1 个在预期位置出现目的条带(图 1)。将电泳产物胶回收后送至北京擎科生物科技股份有限公司进行序列测定,测得的序列与从 GenBank 下载的 O 型、A

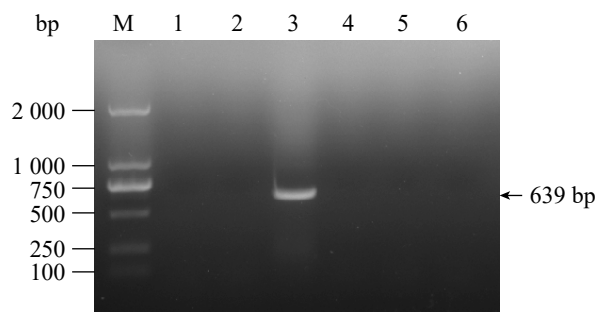


图1 RT-PCR扩增牛OPF样品中VP1基因。泳道 M: DL2000 DNA marker; 泳道1-6: 6份牛源OPF 样品VP1基因片段(639 bp)。

Figure 1 RT-PCR amplification of VP1 gene in bovine OPF samples. Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1-6: VP1 gene fragment of six bovine OPF samples (639 bp).

型和 Asia1 型 FMDV VP1 序列比对。MEGA 11 的比对结果显示, PCR 扩增产物为 FMDV VP1 基因, 且属于 O 型 Ind-2001 谱系(图 2)。上述结果表明检测到 1 份 FMDV 阳性的牛 OPF, 该 OPF 可用于分离 FMDV。

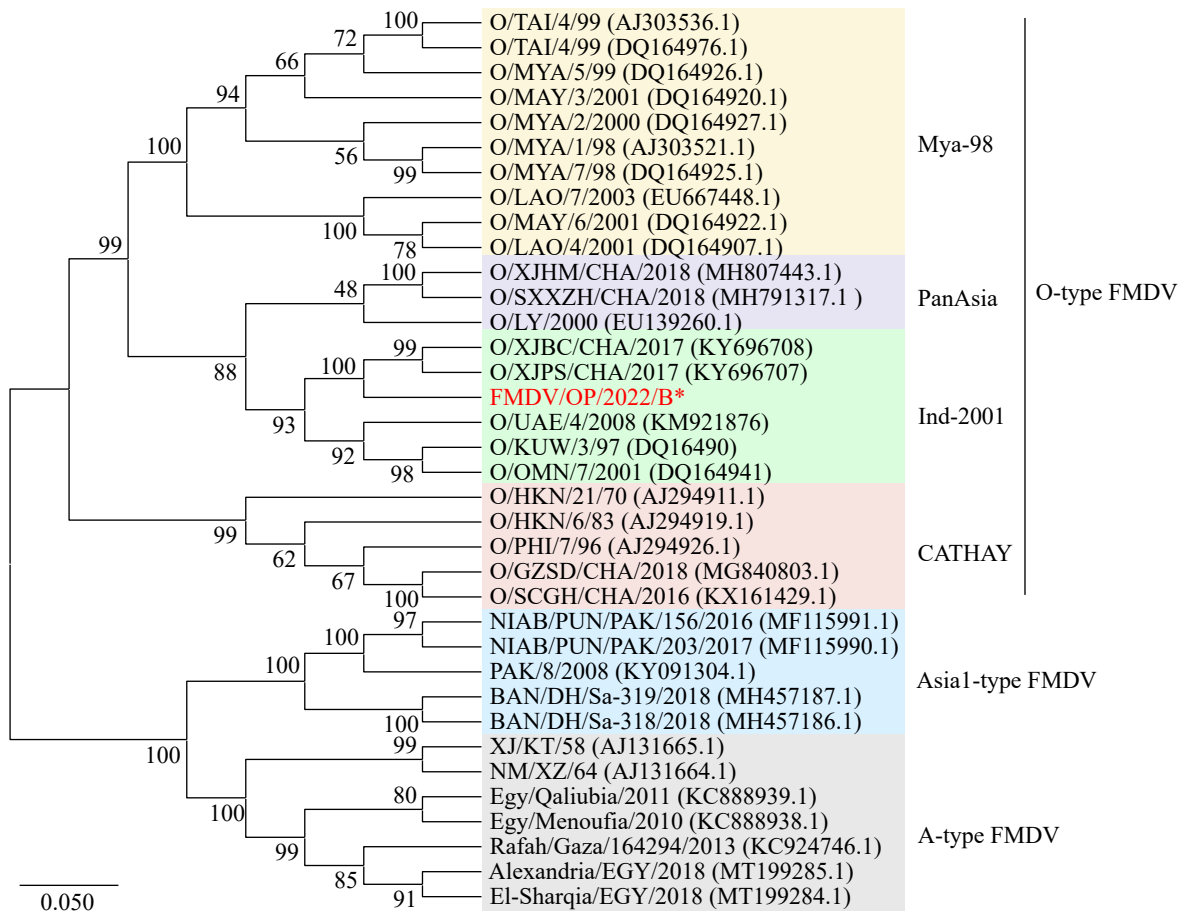
## 2.2 细胞传代法从 OPF 中分离 FMDV

利用 BHK-21 细胞从阳性 OPF 中分离 FMDV。将 PCR 结果为阳性的牛 OPF 经过处理后接种至生长状况良好的 BHK-21 细胞, 连续盲传 3 代, 观察到 BHK-21 细胞出现明显的 FMDV 感染引起的 CPE, 即细胞变大、变圆,

呈现倒挂葡萄串状(图 3)。分离的 FMDV 传至第 6 代时, 完全 CPE 时间稳定为 12 h 左右。大量制备第 7 代病毒样品, 贮存于 -80 °C 冰箱备用。

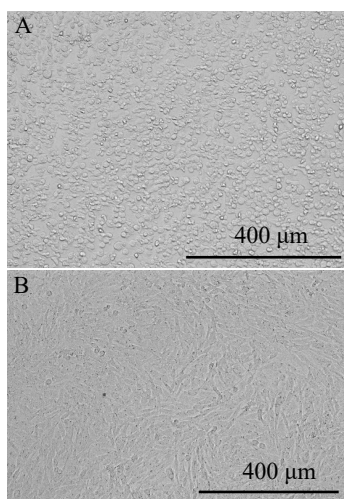
## 2.3 口咽液分离病毒的间接免疫荧光鉴定

利用间接免疫荧光试验鉴定第 7 代样品。将第 7 代样品接种至 BHK-21 细胞, 6 h 后进行间接免疫荧光试验, 使用的一抗为特异性识别 FMDV 3A 蛋白的鼠源单克隆抗体 3A24。结果显示, 接种第 7 代样品的 BHK-21 细胞与 3A24 单克隆抗体及山羊抗鼠 FITC 二抗作用后, 出现



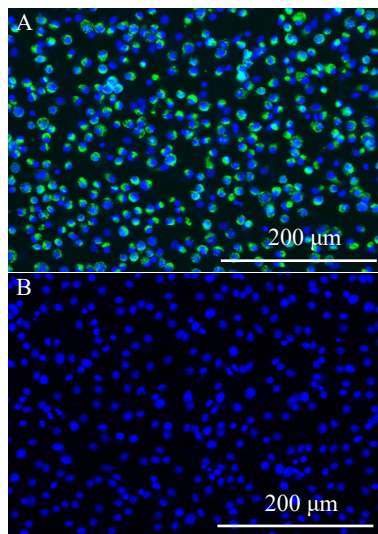
**图2 FMDV VP1基因聚类分析。**使用neighbor-joining法构建遗传进化树; 括号中显示的为GenBank序列号; 分支点上的数字代表置信度; 标尺代表遗传变异度。

Figure 2 Cluster analysis of FMDV VP1 genes. Evolutionary trees were constructed using the neighbor-joining method. GenBank sequence numbers were shown in parentheses. Numbers at the branching points represented confidence levels. Scale represented the degree of genetic variability.



**图3** 分离FMDV在BHK-21细胞上的病变(25×)。A: 病变的BHK-21细胞; B: 正常的BHK-21细胞。  
Figure 3 CPE of isolated FMDV in BHK-21 cells (25×). A: Cytopathic BHK-21 cells; B: Normal BHK-21 cells.

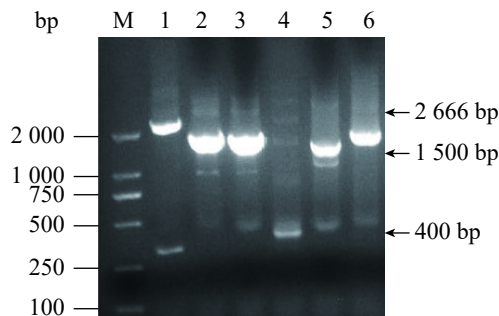
明显绿色荧光, 而对照细胞无绿色荧光(图 4), 表明从牛的 OPF 中成功分离到 FMDV, 将其命名为 O/FMDV/OP/2022/B。



**图4** 分离FMDV的间接免疫荧光鉴定。A: 病毒感染的BHK-21细胞; B: 正常的BHK-21细胞。  
Figure 4 Identification of isolated FMDV by IFA. A: Virus-infected BHK-21 cells; B: Normal BHK-21 cells.

## 2.4 口咽液分离 FMDV O/FMDV/OP/2022/B 的全基因组序列测定

以第 7 代样品提取的总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 分段扩增持续性感染 FMDV O/FMDV/OP/2022/B 的全基因组序列。如图 5 所示, 使用设计的 6 对特异性引物(表 1), 扩增到 6 个与预期片段大小(2 666、1 808、1 724、393、1 439 和 1 745 bp)相符的目的片段。将 6 个 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序并拼接出全基因组序列, O/FMDV/OP/2022/B 的基因组全长为 8 161 bp [不包括 poly(C)和 poly(A)序列], 5' 非编码区长 1 076 bp, 开放阅读框长 6 996 bp, 3' 非编码区长 89 bp。从 NCBI 数据库中下载 33 株 Ind-2001 谱系 FMDV 的抗原蛋白氨基酸序列, 与 O/FMDV/OP/2022/B 的相应蛋白序列进行比对, 发现 O/FMDV/OP/2022/B 在 VP1、VP2 和 VP3 蛋白上均发生了氨基酸残基突变, 且多数突变位于 VP1 (表 2)。



**图5** RT-PCR扩增O/FMDV/OP/2022/B毒株的全基因组序列。泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1: P1片段(2 666 bp); 泳道2: P2片段(1 808 bp); 泳道3: P3片段(1 724 bp); 泳道4: S1片段(393 bp); 泳道5: S2片段(1 439 bp); 泳道6: 6 455–8 200片段(1 745 bp)。

Figure 5 RT-PCR amplification of the whole genome of O/FMDV/OP/2022/B. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: P1 fragment (2 666 bp); Lane 2: P2 fragment (1 808 bp); Lane 3: P3 fragment (1 724 bp); Lane 4: S1 fragment (393 bp); Lane 5: S2 fragment (1 439 bp); Lane 6: 6 455–8 200 fragment (1 745 bp).

表2 O/FMDV/OP/2022/B抗原蛋白氨基酸突变分析

| Table 2 Analysis of amino acid mutations in major antigen proteins of O/FMDV/OP/2022/B |                          |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Antigen protein                                                                        | Amino acid mutation site |       |       |       |       |       |       |       |
| VP2                                                                                    | L137Q                    | N191T |       |       |       |       |       |       |
| VP3                                                                                    | Q76R                     | T99A  | E131K | A174V |       |       |       |       |
| VP1                                                                                    | T4A                      | T13A  | A96T  | D99E  | V150M | P158A | R172Q | E198K |

2.5 口咽液分离 FMDV O/FMDV/OP/2022/B 的蚀斑表型

通过蚀斑形成试验测定 OPF 分离株 O/FMDV/OP/2022/B 和疫苗毒株 O/FMDV/HN/93 的蚀斑表型。结果显示(图 6)，2 个毒株均可以在 BHK-21 细胞上形成大小混合蚀斑，但 O/FMDV/OP/2022/B 以小斑为主，平均蚀斑直径约为 0.05 cm，而 O/FMDV/HN/93 几乎全为大斑，平均蚀斑直径约为 0.5 cm。此外，与 O/FMDV/HN/93 相比，O/FMDV/OP/2022/B 的蚀斑明显偏小。统计蚀斑数量后，计算出的 O/FMDV/OP/2022/B 和 O/FMDV/

HN/93 的病毒滴度分别为  $5.28\times10^5$  PFU/mL 和  $1.70\times10^8$  PFU/mL。

2.6 口咽液分离 FMDV O/FMDV/OP/2022/B 的一步生长曲线

通过一步生长曲线分析 O/FMDV/OP/2022/B 和 O/FMDV/HN/93 毒株的复制能力。结果表明(图 7)，O/FMDV/OP/2022/B 在不同时间点的复制滴度均低于 O/FMDV/HN/93，表明 O/FMDV/OP/2022/B 的复制能力弱于 O/FMDV/HN/93。

3 讨论与结论

FMD 对畜牧养殖业构成了巨大威胁，而 OPF 中长期存在的无症状 FMDV 潜伏感染，即 FMDV 持续性感染，使得 FMD 的防控变得更加复杂。多种因素影响 FMDV 持续感染易感动物的口咽组织，主要包括宿主和病毒两方面。宿主动物为了避免频繁产生炎症，上呼吸道黏膜免疫对外来刺激具有较高的耐受水平。当上呼

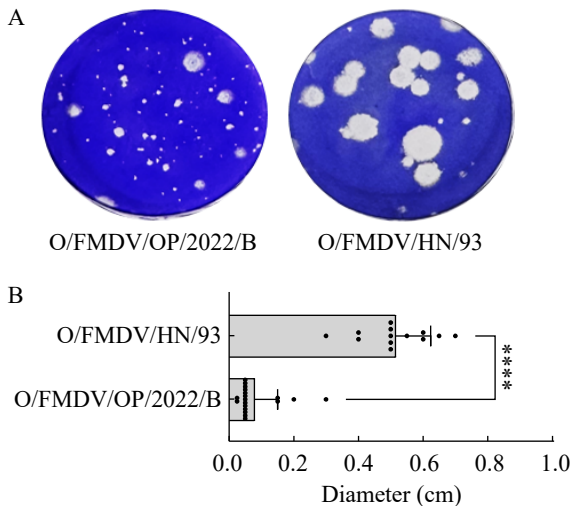


图6 O/FMDV/OP/2022/B的蚀斑表型测定。A：分离毒株(左)和疫苗毒株(右)的蚀斑表型；B：分离毒株(左)和疫苗毒株(右)的蚀斑大小统计。  
Figure 6 Plaque phenotype of O/FMDV/OP/2022/B. A: Plaque phenotype of isolate (left) and vaccine strain (right); B: Plaque size statistics of isolate (left) and vaccine strain (right). Data show mean±SD. \*\*\*\*:  $P<0.0001$ .

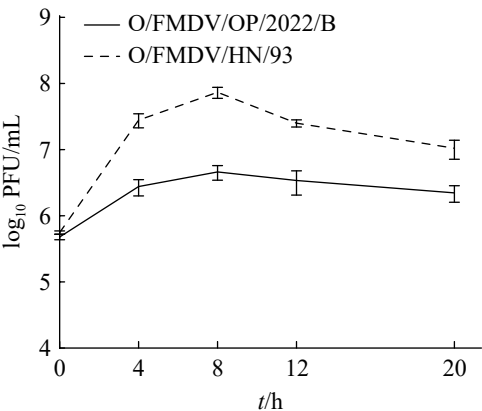


图7 O/FMDV/OP/2022/B的一步生长曲线分析  
Figure 7 One-step growth curve of O/FMDV/OP/2022/B.

吸道鼻咽黏膜未能建立起强有效的抗病毒免疫时,病毒可能会发生持续性感染。此外,当动物机体的天然免疫和获得性免疫能力偏低时,也不容易完全清除体内感染的 FMDV。在病毒方面,国外有研究显示,持续感染口咽组织的 FMDV 具有独特特性,主要包括病毒复制能力降低、蚀斑减小、致病力降低和抗逆性增强等,还可能与病毒抗原变异导致的免疫逃逸有关<sup>[14]</sup>。然而,目前国内对 OPF 中 FMDV 的分离及特性研究较少,这不利于 FMD 的防控和根除。

本研究在国家口蹄疫参考实验室从田间无症状牛采集的 OPF 样品中分离出一株 FMDV,命名为 O/FMDV/OP/2022/B。溯源结果显示,采样牛在采样前 2 个月内未发生过 FMD,采样后 1 个月内也未出现 FMD 临床症状。因此,从牛口咽液中分离出的 O/FMDV/OP/2022/B 可基本认定为持续性感染 FMDV。为了增强适应性并在宿主体内存活,持续性感染 FMDV 在与宿主相互选择、相互进化的过程中会发生遗传变异。Biswal 等<sup>[14]</sup>发现, FMDV 在持续性感染形成过程中会出现基因突变,这种突变增加了病毒种群的多样性,也可能影响病毒的抗原性。另有研究确定,持续性感染 FMDV 的 VP1 蛋白发生 V50A 突变,可能影响 VP1 G-H 环的稳定性,也可能破坏其与 SUMO1 (small ubiquitin-like modifier, SUMO)的结合<sup>[15]</sup>。目前已报道 FMDV 的抗原位点共有 5 个,分布在 VP1、VP2 和 VP3 衣壳蛋白上,分别为 VP1 G-H 环和 C 末端组成的抗原位点 1, VP2 的 B-C 环、E-F 环和 H-I 环组成的抗原位点 2, VP1 的 B-C 环组成的抗原位点 3, VP3 的 B-B 结组成的抗原位点 4,以及 VP1 G-H 环组成的抗原位点 5。本研究测定了牛口咽分离 FMDV O/FMDV/OP/2022/B 的全基因组序列,并与 NCBI 数据库中的 33 株 FMDV 氨基酸序列进行比对,发现 O/FMDV/OP/2022/B 在 VP1、VP2 和 VP3 蛋白中均发生了氨基酸残基突变,且多数突变发生在 VP1 (表 2)。在 13 个氨基酸残基突变中,VP1

V150M 和 VP1 P158A 突变位于抗原位点 1 内,VP2 N191T 突变位于新鉴定的抗原位点 2 内,VP3 E131K 突变位于新鉴定的抗原位点 3 内<sup>[16]</sup>。VP1 E198K 突变位于抗原位点 1 的 C 末端附近,VP2 L137Q、VP3 Q76R 和 VP3 A174V 突变可能与 FMDV 特异性抗体的相互作用相关<sup>[17-19]</sup>,VP3 T99A 和 VP1 R172Q 可能影响 FMDV 特异性抗体的产生<sup>[10]</sup>,VP1 A96T 突变可能影响 FMDV 的受体利用能力。由此可见,O/FMDV/OP/2022/B 衣壳蛋白中高达 71% 的氨基酸残基突变与 FMDV 抗体的产生相关,推测 O/FMDV/OP/2022/B 在牛 OPF 中的存在可能与其逃逸宿主免疫清除的能力密切相关。

本研究还分析了口咽分离 FMDV O/FMDV/OP/2022/B 的蚀斑表型和一步生长曲线。蚀斑表型与 FMDV 的复制、毒力和宿主嗜性等特性相关。结果显示,O/FMDV/OP/2022/B 的蚀斑显著小于疫苗毒株 O/FMDV/HN/93 的蚀斑,且 O/FMDV/OP/2022/B 的 PFU 也明显低于 O/FMDV/HN/93。一步生长曲线与 FMDV 的复制能力相关,结果表明,O/FMDV/OP/2022/B 的一步生长曲线明显低于 O/FMDV/HN/93。上述结果表明,O/FMDV/OP/2022/B 的增殖能力较弱,更容易与宿主细胞维持平衡,从而在 OPF 中持续性存在。本研究从 OPF 中成功分离到一株牛源 FMDV,命名为 O/FMDV/OP/2022/B,测定了其全基因组序列,并分析了其增殖特性,为深入研究 FMDV 持续感染牛口咽组织的机制以及 FMD 的防控提供了参考。

## 作者贡献声明

蔡梦婷:收集样品,操作试验;袁红:操作试验,修改文章;王利豪:操作试验;杨竞纯:操作试验;王涛:分析数据;包慧芳:指导试验操作;杨宇轩:操作试验;孙普:分析数据;李坤:指导试验操作;黄书伦:操作试验;郭海洋:辅助试验操作;李平花:分析数据;卢曾军:修改文章;何继军:设计试验,

撰写文章；白兴文：设计试验，撰写文章。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] BELSHAM GJ. Translation and replication of FMDV RNA[M]//Foot-and-Mouth Disease Virus. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005: 43-70.
- [2] RODRÍGUEZ-HABIBE I, CELIS-GIRALDO C, PATARROYO ME, AVENDAÑO C, PATARROYO MA. A comprehensive review of the immunological response against foot-and-mouth disease virus infection and its evasion mechanisms[J]. *Vaccines*, 2020, 8(4): 764.
- [3] ALEXANDERSEN S, QUAN M, MURPHY C, KNIGHT J, ZHANG Z. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2003, 129(4): 268-282.
- [4] KITCHING RP, HUTBER AM, THRUSFIELD MV. A review of foot-and-mouth disease with special consideration for the clinical and epidemiological factors relevant to predictive modelling of the disease[J]. *The Veterinary Journal*, 2005, 169(2): 197-209.
- [5] LONGJAM N, DEB R, SARMAH AK, TAYO T, AWACHAT VB, SAXENA VK. A brief review on diagnosis of foot-and-mouth disease of livestock: conventional to molecular tools[J]. *Veterinary Medicine International*, 2011, 2011: 905768.
- [6] BROWN E, NELSON N, GUBBINS S, COLENTT C. Environmental and air sampling are efficient methods for the detection and quantification of foot-and-mouth disease virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 287: 113988.
- [7] Van BEKKUM D, VOS O, WEYZEN WW. The pathogenesis of the secondary disease after foreign bone marrow transplantation in X-irradiated mice[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1959, 23: 75-89.
- [8] ALEXANDERSEN S, ZHANG ZD, DONALDSON AI. Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals: the carrier problem[J]. *Microbes and Infection*, 2002, 4(10): 1099-1110.
- [9] KLEIN J. Understanding the molecular epidemiology of foot-and-mouth-disease virus[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009, 9(2): 153-161.
- [10] FISH I, STENFELDT C, PALINSKI RM, PAUSZEK SJ, ARZT J. Into the deep (sequence) of the foot-and-mouth disease virus gene pool: bottlenecks and adaptation during infection in naïve and vaccinated cattle[J]. *Pathogens*, 2020, 9(3): 208.
- [11] ARZT J, FISH IH, BERTRAM MR, SMOLIGA GR, HARTWIG EJ, PAUSZEK SJ, HOLINKA-PATTERSON L, DIAZ-SAN SEGUNDO FC, SITT T, RIEDER E, STENFELDT C. Simultaneous and staggered foot-and-mouth disease virus coinfection of cattle[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(24): e0165021.
- [12] GAO Y, LI PH, MA XQ, BAI XW, SUN P, DU P, YUAN H, CAO YM, LI K, FU YF, ZHANG J, BAO HF, CHEN YL, LI ZY, LU ZJ, LIU ZX, LI D. The rescue and selection of thermally stable type O vaccine candidate strains of foot-and-mouth disease virus[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(8): 2131-2140.
- [13] LI PH, LU ZJ, BAI XW, LI D, SUN P, BAO HF, FU YF, CAO YM, CHEN YL, XIE BX, YIN H, LIU ZX. Evaluation of a 3A-truncated foot-and-mouth disease virus in pigs for its potential as a marker vaccine[J]. *Veterinary Research*, 2014, 45(1): 51.
- [14] BISWAL JK, RANJAN R, SUBRAMANIAM S, MOHAPATRA JK, PATIDAR S, SHARMA MK, BERTRAM MR, BRITO B, RODRIGUEZ LL, PATTNAIK B, ARZT J. Genetic and antigenic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in naturally infected cattle and Asian buffalo in India[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0214832.
- [15] KOPLIKU L, RELMY A, ROMÉY A, GORNA K, ZIENTARA S, BAKKALI-KASSIMI L, BLAISE-BOISSEAU S. Establishment of persistent foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection in MDBK cells[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(10): 2503-2516.
- [16] LI K, HE Y, WANG L, LI PH, WANG S, SUN P, BAO HF, CAO YM, LIU XR, ZHU GQ, SONG YL, BAI XW, MA XQ, FU YF, YUAN H, ZHANG J, WANG J, CHEN YL, LI D, LOU ZY, LIU ZX, LU ZJ. Two cross-protective antigen sites on foot-and-mouth disease virus serotype O structurally revealed by broadly neutralizing antibodies from cattle[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(21): e0088121.
- [17] LI FJ, WU SQ, LV L, HUANG SL, ZHANG ZL, ZERANG ZX, LI PH, CAO YM, BAO HF, SUN P, BAI XW, HE Y, FU YF, YUAN H, MA XQ, ZHAO ZX, ZHANG J, WANG J, WANG T, LI D, et al. Discovery, recognized antigenic structures, and evolution of cross-serotype broadly neutralizing antibodies from porcine B-cell repertoires against foot-and-mouth disease virus[J]. *PLoS Pathogens*, 2024, 20(10): e1012623.
- [18] LI K, HE Y, WANG L, LI PH, BAO HF, HUANG SL, ZHOU SS, ZHU GQ, SONG YL, LI Y, WANG S, ZHANG QL, SUN P, BAI XW, ZHAO ZX, LOU ZY, CAO YM, LU ZJ, LIU ZX. Conserved antigen structures and antibody-driven variations on foot-and-mouth disease virus serotype A revealed by bovine neutralizing monoclonal antibodies[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(11): e1011811.
- [19] HE Y, LI K, CAO YM, SUN ZX, LI PH, BAO HF, WANG S, ZHU GQ, BAI XW, SUN P, LIU XR, YANG C, LIU ZX, LU ZJ, RAO ZH, LOU ZY. Structures of Foot-and-mouth disease virus with neutralizing antibodies derived from recovered natural host reveal a mechanism for cross-serotype neutralization[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(4): e1009507.