

# PRRSV-GSLZ-1/2009 细胞毒和组织毒致病特征的比较

杜平<sup>1,2</sup> 尚佑军<sup>2</sup> 刘学荣<sup>1</sup> 董文教<sup>1</sup> 贺延玉<sup>3</sup> 黄银君<sup>1</sup> 牟克斌<sup>1\*</sup>

(1. 中农威特生物科技股份有限公司 甘肃 兰州 730046)

(2. 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点实验室  
国家口蹄疫参考实验室 甘肃 兰州 730046)

(3. 甘肃农业大学研究测试中心 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** 为了研究猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)野毒株在细胞适应中的遗传变异与其致病性的关系。在进行遗传变异分析后,将 GSLZ-1/2009 细胞适应毒和组织毒同时接种 36 日龄健康仔猪,对感染后的临床症状、体征变化、抗体及炎症因子水平进行了实时监测和动力学分析,并对组织病变进行了显微观察。结果显示:在细胞适应过程中致病相关基因并未发生任何突变,但细胞适应株所诱发的抗体及炎症因子反应均明显较组织毒弱,且所造成的病理损伤也比较轻微。表明 PRRSV 野毒株在细胞适应过程中毒力会减弱,而毒株的弱化可能由遗传变异之外的因素决定。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 病毒特性, 致病特征

## Comparison of pathogenic characteristics between PRRSV-GSLZ-1/2009 cell propagated virus and field sample virus

DU Ping<sup>1,2</sup> SHANG You-Jun<sup>2</sup> LIU Xue-Rong<sup>1</sup> DONG Wen-Jiao<sup>1</sup> HE Yan-Yu<sup>3</sup>  
HUANG Yin-Jun<sup>1</sup> MU Ke-Bin<sup>1\*</sup>

(1. China Agriculture Veterinary Biology Science and Technology Corporation, Lanzhou, Gansu 730046, China)

(2. Key Laboratory of Animal Virology, Ministry of Agriculture; State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology; National Foot-and-Mouth Disease Virus Referenced Laboratory; Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Lanzhou, Gansu 730046, China)

(3. Instrumental Research & Analysis Center of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** The objective of this study was to analyze the correlation between genetic variation and

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA10A204)

\* 通讯作者: Tel: 86-931-8313415; ✉ mukb@chvst.com

收稿日期: 2010-07-23; 接受日期: 2010-11-03

pathogenicity of field sample virus during the propagation in sensitive cells. 36-day-old pigs were challenged with PRRSV GSLZ-1/2009 cell propagated virus and field sample virus after genetic variation analyse. Carry out real-time monitor and dynamics analyse to clinical symptoms, signs of change and the levels of antibody and inflammatory factors, and the histopathologic changes were observed under light microscope. The results showed that the disease-related genes was no variation, the antibody, inflammatory factors response and histopathologic lesions induced by field sample virus were more powerful than those induced by cell propagated virus. The researches indicated that virulence of field PRRSV could be weakened when it propagated in cells, and there are other possible factors except genetic variation playing on the role of virulence weaken.

**Keywords:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Virus characters, Pathogenic characteristics

猪繁殖与呼吸综合征以怀孕母猪早产、流产、木乃伊胎、死胎等繁殖障碍及仔猪的呼吸系统症状为特征<sup>[1]</sup>。本病自 1986 发现以来,其目前所造成的经济损失已不亚于猪瘟和口蹄疫。2006 年夏至 2007 年初在我国南方一些省份暴发了“猪高热”综合症,发病猪体温高于 41 °C,食欲不振甚至废绝,腹部、耳及后驱皮肤发红,发病率 50%–100%,死亡率 20%–100%。该病传播迅速,在短短的半年内几乎传遍了大半个中国,对养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。病原学鉴定表明,PRRSV 为主要病原,且其 Nsp2 基因的 481 位缺失 1 个氨基酸,532–560 位缺失 29 个氨基酸,为变异的 PRRS 毒株<sup>[3]</sup>。随后许多研究单位也相继分离到该毒株,但许多分离株经敏感细胞适应后再回归本动物并不出现临床症状。通常,PRRSV 感染易继发细菌及其它病毒感染,而自然感染病例的典型症状不无继发感染存在一定的关系,蔡雪辉等的研究表明人工感染时很难复制出典型症状<sup>[4]</sup>。细胞适应毒株难以复制出典型症状可能与无并发症有关,但也不能排除与分离株在细胞适应过程中的遗传变异有关。鉴于此,本文对 GSLZ-1/2009 细胞毒和组织毒的致病特征进行比较,以期揭示遗传变异与 PRRSV 致病特性的关系,并为 PRRSV 免疫学研究提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒

试验用 GSLZ-1/2009 F4 代细胞毒由本实验室

分离并保存, Nsp2 基因测序表明为 PRRSV 变异毒株, TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>5.5</sup>; GSLZ-1/2009 组织毒采自田间,使用时在本动物繁殖 1 代, TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>3.25</sup>,且猪细小病毒、圆环病毒检测均为阴性,攻毒前过滤除菌。

### 1.2 主要试剂及试剂盒

DMEM 培养基购自北京清大天一有限公司;新生牛血清购自兰州荣晔生物技术有限公司;克隆载体 pGEM-T Easy Vector、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; *E. coli* JM109、One-Step RT-PCR 试剂盒、DNA 快速纯化回收试剂盒购自大连宝生物有限公司;小量质粒快速提取试剂盒购自博大泰克生物科技公司; RNeasy Mini Kit 试剂盒购自 Qiagen 公司; PRRS 抗体检测试剂盒购自 IDEXX 公司; IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 及 IL-6 细胞因子检测试剂盒购自武汉中美生物科技股份有限公司; Marc-145 细胞、抗 PRRSV 猪阳性血清、阴性血清均由本实验室保存。

### 1.3 动物及实验设计

12 头 36 日龄体重相当的健康仔猪购自甘肃省定西市某无 PRRS 猪场,试验前用 IDEXX 的 PRRS 抗体检测试剂盒(2 $\times$ )检测抗体为阴性。将 12 头仔猪随机分为 3 组,每组 4 头,隔离饲养。A 组为对照, B 组滴鼻接种 6 mL GSLZ-1/2009 F4 代细胞毒, C 组滴鼻接种 6 mL GSLZ-1/2009 F1 代本动物繁殖毒。每日测量体温,观察采食、饮水、精神状况及其它临床表现。试验时间为 21 d, 22 d 时迫杀,进行病理剖检,取肺脏、脾脏、淋巴结、肾脏等组织作 RT-PCR 检测,并作石蜡切片进行病理观察。

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

### 1.4 血清抗体及细胞因子的检测

在攻毒后的 3、7、10、14、17、21 d 采集试验猪血液, 4 °C 静置过夜后, 5 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 每份血清分装 3 份, -70 °C 保存备用。用猪繁殖与呼吸综合征抗体检测试剂盒(2×)检测血清抗体, 细胞因子检测试剂盒检测 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 及 IL-6。

### 1.5 病毒血症的确定

将不同时间采集的过滤除菌血清接种于长成单层的 96 孔细胞培养板, 每份样品设 2 个重复, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中吸附 2 h, 弃去样品加入 100  $\mu$ L 维持液, 继续培养 5 d, 观察 CPE, 并用 IPMA 方法进行 PRRSV 检测。

同时用巢式 PCR 对细胞培养物和各血清进行检测。先用 RT-PCR 方法扩增 ORF7 基因, 然后以 RT-PCR 产物作 nPCR 模板。ORF7a: 5'-TCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGC-3'; ORF7b: 5'-GCCATTCAC CACACATTCTCC-3', 预期长度为 481 bp。按 RNeasy Mini Kit 说明书操作提取总 RNA, 目的基因 RT-PCR 扩增程序为: 50 °C 30 min; 94 °C 4 min, 94 °C 50 s, 53 °C 50 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 8 min。nPCR Forward primer: 5'-CGGAATTCATGCC AAATAACAACGGCAAGCAGC-3'; Reverse primer: 5'-TACTCGAGCTATCATGCTGAGGGTGATGCTGT G-3', 扩增片段大小为 372 bp, 扩增程序为: 94 °C 50 s; 58 °C 50 s, 72 °C 50 s, 35 个循环。由大连宝生物有限公司合成。

### 1.6 GP5 及 Nsp2 基因的扩增

参考 GenBank 中发表的 EF112446、AY032626、PRU87392 和 EF112445 序列, 用 Primer 软件设计 Nsp2 和 GP5 特异性引物。GP5-1: 5'-CCTGAGACCATGAGGTGGG-3'; GP5-2: 5'-TTTAGGGCATA TATCATCACTGG-3', 预期长度为 774 bp。RT-PCR 扩增程序为: 50 °C 30 min; 94 °C 4 min; 94 °C 50 s, 56 °C 50 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 8 min。ORFN1: 5'-TGATGGGCGACAATGTCC-3'; ORFN2: 5'-CGCAGACAAATCCAGAGG-3'; RT-PCR 扩增程序为: 50 °C 30 min; 94 °C 4 min; 94 °C 50 s, 59 °C 50 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 8 min。从 F4 代细胞毒和 F1 代组织毒中扩增 Nsp2 和 GP5 基因, 进行遗传变异分析。

## 2 结果

### 2.1 临床症状

攻毒后 2-3 d, B 组所有动物体温均升至 40 °C 以上, 并持续 2-3 d, 但均未超过 40.5 °C; C 组动物体温攻毒后 6-7 d 升至 40 °C 以上, 持续 6-9 d, 所有动物体温均超过 40.5 °C, 并有 2 头最高体温超过 41 °C (图 1)。B 组和 C 组的其它临床症状及剖检大体病变相似, 但 C 组要明显比 B 组严重。表现为食欲不振、精神沉郁、喜欢扎堆、咳嗽、打喷嚏、眼部形成黑色泪斑, 耳朵、腹下及后躯皮肤发红。剖检可见腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结、肺门淋巴结及颌下淋巴结肿大、淤血或出血; 肺大面积肉变, 但以尖叶最为严重; 心房淤血; 脾脏表面有点状红色丘疹; 肝脏表面灰白色坏死斑比较常见; 消化道损伤轻微(表 1)。

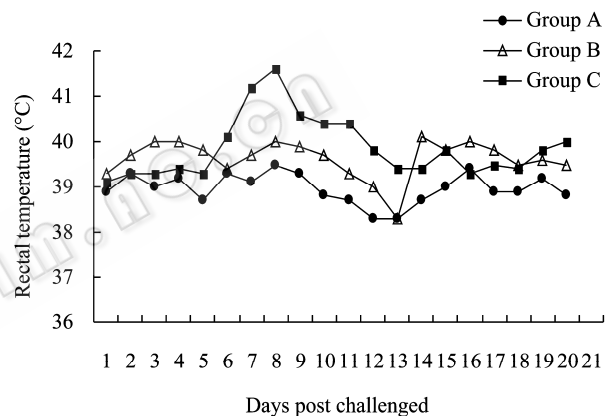


图1 攻毒动物体温变化曲线

Fig. 1 Mean rectal temperatures after challenging different virus

注: 直肠温度 40.0 °C 判定为发烧, 发烧持续天数 3 d 时判为发病。B 组有 2 头发烧天数持续 3 d, 另 2 头持续 2 d; C 组发烧天数平均为 6-7 d。

Note: Rectal temperatures equal or above 40.0 °C were defined as fever. Fever lasting equal or more than 3 days was defined as illness. There were an average of 6 to 7 days of high fever for pigs in group C, and 2 to 3 days of high fever for pigs in group B.

### 2.2 血清抗体水平

用 IDEXX PRRSV 抗体检测试剂盒检测攻毒后各动物血清抗体水平, 当 S/P 0.4 时判为阳性。B 组有 1 头在 14 d 时为阳性, 其余在试验期间均未发生血清转化; C 组在 11 d 时所有均为阳性(图 2)。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

表1 攻毒动物各组织的病理损伤  
Table 1 Histopathologic lesions in organs of piglets after challenging different virus

组别 Groups	肺 Lug		淋巴结 Lymph node		肝脏 Liver	脾脏 Spleen	肾脏 Kindey	胃 Stomach	小肠 Intestine	扁桃体 Tonsil
	++ <sup>a</sup>	+	++	+						
Group A	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Group B <sup>b</sup>	0/4	4/4	0/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4
Group C	4/4	0/4	4/4	0/4	2/4	4/4	4/4	0/4	4/4	1/4

注: <sup>a</sup>: 用“+”评定病理损伤, “+”的数量代表病理损伤的程度; <sup>b</sup>: B 组的病理变化主要集中在肺脏和淋巴结, C 组在各组织和器官都有病理变化。

Note: <sup>a</sup>: Histologic analysis was scored as “+”, the amount of “+” represents the degree of severity of impairment; <sup>b</sup>: In groups B, lesions were mainly localized to the lung and lymph nodes. In groups C, lesions were detected in all tissues.

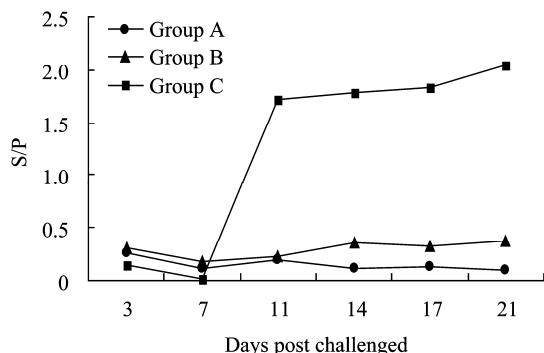


图2 攻毒动物平均抗体水平变化曲线

Fig. 2 The changing of average antibody levels of sera in infection animals

### 2.3 血清中细胞因子水平

B组和C组攻毒动物血清中IFN- $\alpha$ 和IL-1水平与对照相比均无明显变化; C组IFN- $\gamma$ 水平在感染后7 d明显升高, 之后恢复至对照水平, 而B组IFN- $\gamma$ 水平与对照无明显区别, B组和C组IL-6水平分别在感染后21 d和14 d明显升高, 但C组升高的幅度要明显大于B组(图3)。

### 2.4 病毒血症与脏器中病原的确定

B组动物感染后7 d和14 d分别有1头出现病毒血症, 而剩余2头试验期间病毒血症检测均为阴性; C组感染后7 d 2头检测到病毒血症, 14 d时4头动物 nPCR 检测均为阳性, 并一直持续到感染后21 d。22 d 迫杀时 C组动物肺脏、脾脏、淋巴结、扁桃体、肾脏等脏器 RT-PCR 或 nPCR 检测均为阳性; B组2头动物的肺脏、脾脏、淋巴结和扁桃体 PRRSV 检测为阳性, 另2头只有肺脏和淋巴结检测为阳性(表2)。

表2 攻毒动物病毒血症的出现  
Table 2 Development of viremia in challenged animals

分组 Groups	感染后的天数 Days post-inoculation (DPI) (d)					
	3	7	11	14	17	21
Group A	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Group B	0/4	1/4	0/4	1/4	0/4	0/4
Group C	0/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4

### 2.5 显微组织学变化

镜下可见肺、脾脏、肝脏、心脏等组织有严重的炎症反应, 其中以肺脏最为典型, 并有全身性的血管炎、血栓和淤血。肺脏以间质性肺炎为特征, 肺泡腔中有大量炎性细胞浸润, 肺泡扩张或融合(图4A); 腹股沟淋巴结淋巴细胞减少, 淋巴小结呈现小空泡状(图4B); 脾脏中淋巴细胞减少, 浆细胞增多(图4C); 肝脏中肝窦内少量肝细胞变性, 并有少量嗜酸性细胞浸润(图4E); 肾脏间质增宽, 少量淋巴细胞浸润(图4F); 小肠粘膜上皮坏死、脱落, 有大量嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞浸润(图4G); 胃黏膜上皮坏死、脱落, 并有大量嗜酸性细胞浸润(图4D); 心肌纤维结构散乱, 伴有肌纤维的断裂(4H)。

## 3 讨论

B组动物接种 GSLZ-1/2009 F4 代细胞毒后2 d, 体温即升至40 °C以上, 并有咳嗽、喘气等呼吸道症状, 但发烧时间较短, 只持续了2 d, 而呼吸道症状一直持续至试验结束。C组动物感染后6-7 d 体温才升至40 °C以上, 但持续了6-7 d, 且4头感染动物体温均超过40.5 °C, 其中有2头体温甚至高达

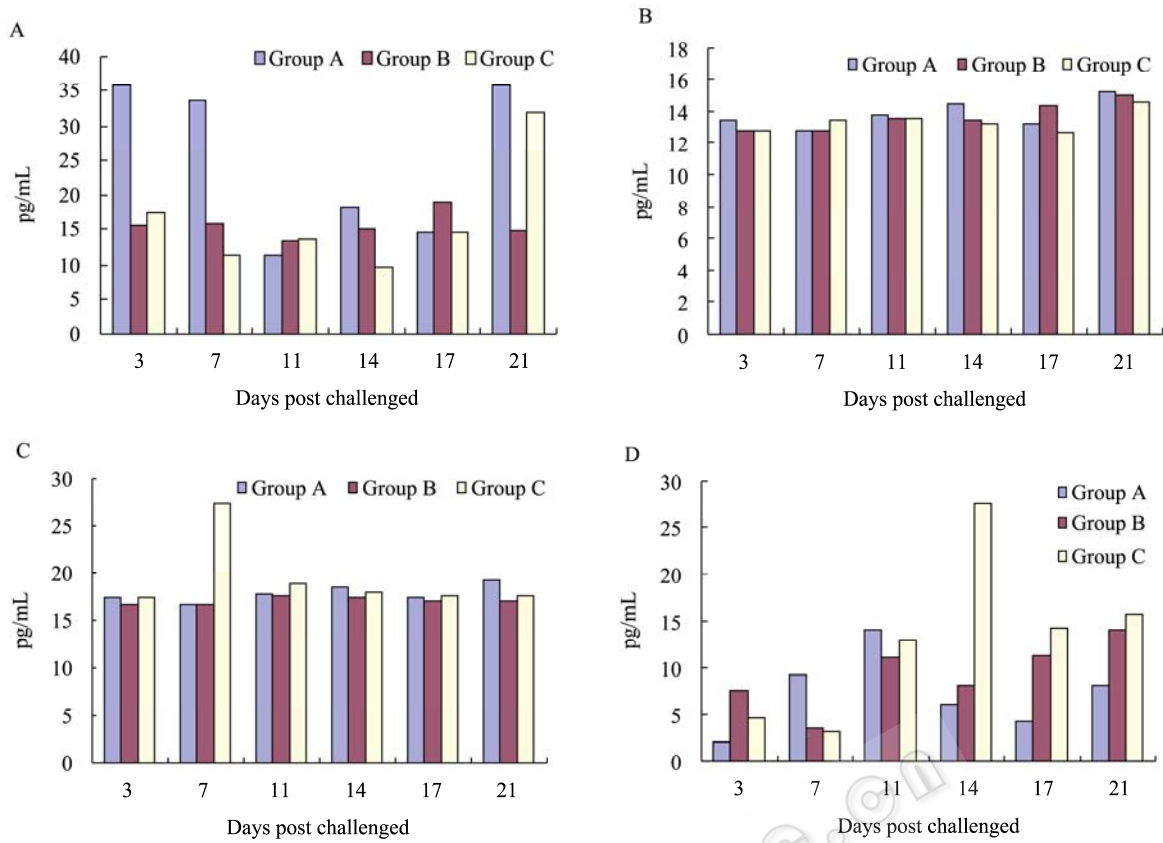


图 3 攻毒动物各炎症因子的平均水平

Fig. 3 Mean level of every proinflammatory cytokines

注: A: IFN-α 平均水平; B: IL-1平均水平; C: IFN-γ平均水平; D: IL-6平均水平.

Note: A: Means IFN-α levels; B: Means IL-1 levels; C: Means IFN-γ levels; D: Means IL-6 levels.

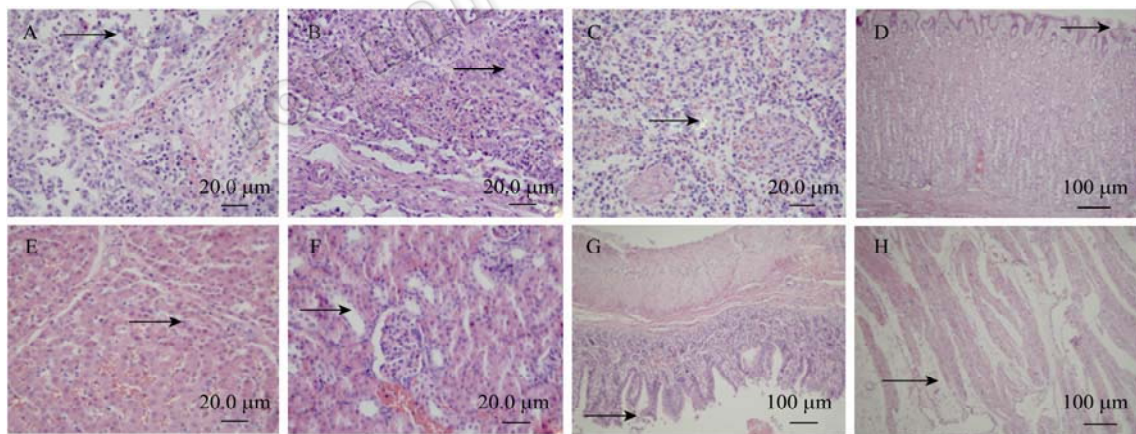


图 4 PRRSV 感染后主要脏器的组织学变化

Fig. 4 Histological changes of of several organs after PRRSV infection

注: A: 肺脏; B: 淋巴结; C: 脾脏; D: 胃脏; E: 肝脏; F: 肾脏; G: 小肠; H: 心脏.

Note: A: Lung; B: Lymph nodes; C: Spleen; D: Stomack; E: Liver; F: Kidney; G: Small intestine; H: Heart.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

41.3 °C, 而临床症状也更为严重, 病猪食欲废绝, 卧地不起, 全身皮肤发红。通常, 蓝耳病病毒攻毒动物的直肠温度 40.0 °C 判定为发烧, 而发烧持续天数 3 d 时才判为发病<sup>[5]</sup>, B 组攻毒动物发烧时间虽出现较早, 但只持续 2 d, 表明其致病力较弱。C 组动物临床症状出现较晚可能与初始攻毒的病毒感染滴度较低有关。I 型干扰素在抵抗病毒感染过程中起着重要作用, 而其水平又决定着获得性免疫的反应强度<sup>[6]</sup>。ELISA 检测发现, 攻毒后 C 组和 B 组动物血清中的 IL-1 和 IFN- $\alpha$  水平与对照均无明显差别, 表明 PRRSV 感染后抑制了先天性免疫。在猪中, 用分泌的 IFN- $\gamma$  来评价抗原特异性的 T 细胞反应, 且 IFN- $\gamma$  的水平还与组织病变程度有关<sup>[7]</sup>, 本研究发现攻毒后 B 组动物血清中 IFN- $\gamma$  水平无变化, 而 C 组在感染后 7 d 出现一过性的升高, 说明 PRRSV 的感染会诱发暂时性的细胞免疫, 且其程度可能与毒株的强弱有关。IL-6 是一种急性感染因子, 它的水平与呼吸道症状及体温的升高呈正相关<sup>[8]</sup>。C 组动物 IL-6 水平在攻毒后 14 d 升高幅度最大, B 组动物 IL-6 水平在感染后 21 d 才有明显升高, 但让人不解的是此时动物并未发烧。血清抗体 ELISA 检测发现, C 组在 11 d 时 4 头动物血清抗体均为阳性, 而 B 组直到 14 d 才有 1 头为阳性。nPCR 检测发现 C 组感染后 7 d 有 2 头检测到病毒血症, 14 d 时 4 头动物 nPCR 检测均为阳性, 并一直持续到感染后 21 d; B 组在 7 d 和 14 d 时各有 1 头阳性。血清转化和临床症状与病毒血症的出现有关, 病毒血症又反映了病毒在组织中的量<sup>[9]</sup>。病理学检查发现 C 组攻毒动物出现全身性的炎症反应, 肺脏、淋巴结、扁桃体、肾脏和肝脏等组织 PRRSV RT-PCR 检测也均为阳性, 而 B 组动物只在肺脏和淋巴结有明显变化, 且病变程度也相对较轻, 只有肺脏和淋巴结 RT-PCR 检测为阳性。结合临床症状、血清转化、病毒血症、感染因子水平的变化及病理学检查, 不难得出, GSLZ-1/2009 F4 代细胞毒的毒力明显弱于 GSLZ-1/2009 F1 代本动物传代毒。

笔者起初认为 GSLZ-1/2009 F4 代细胞毒致病性的减弱可能与 PRRSV 在传代过程中关键基因的

突变有关, 但对 Nsp2 和 GP5 基因的分析表明, 这两个可能与致病性有关的基因均未发生任何突变。刘长明等对 PRRSV-HBR 毒株的第 5、10、20、30、40 和 55 代毒种的 Nsp2、GP5 基因序列分析发现, Nsp2 从第 40 和 55 代毒序列发生变异现象, 位于第 3115 位核苷酸处插入 12 个碱基序列 (GAGATCGCCTTT); 对第 5 代和 40 代毒种进行 GP5 基因序列比较, 其第 566 位核苷酸发生点突变 (C $\rightarrow$ T), 导致编码的氨基酸序列发生丝氨酸(Ser) $\rightarrow$ 亮氨酸(Leu)突变, 而随着这些突变的出现, 毒株的致病性也随之减弱<sup>[10]</sup>。但本研究中未发现任何突变, 细胞毒的致病力却减弱, 确实难以理解。当然也不排除与其它基因的突变有关。近年国内分离了众多 PRRSV 毒株, 但经敏感细胞传代后无致病性或致病力减弱的报道屡见不鲜。张婉华等分离的 PRRSV-SA 毒株同居饲养 45 d 虽可检测到特异性的血清抗体, 但感染动物未出现任何临床症状<sup>[11]</sup>; 黄梅清等分离的欧洲型 PRRSV-FJ0602 毒株攻毒动物亦无任何临床症状<sup>[12]</sup>。目前对于野毒株经敏感细胞传代后致病性减弱的现象还无合理的解释。

Zuckermann 等建立了一种对 PRRSV 十分敏感的猪肺泡巨噬细胞细胞系 ZMAC-3, 并给仔猪分别注射了用 ZMAC-3 和 MARC-145 细胞繁殖的疫苗, 28 d 后用 NADC-20 毒株攻击, 结果用 ZMAC-3 细胞所制疫苗的免疫效果要明显好于 MARC-145 所制的疫苗, 特别是在减少病毒血症和清除肺部病毒感染方面, 并推断疫苗免疫效果的好坏可能与所用细胞有关<sup>[13]</sup>。如果 Zuckermann 的推断成立, 不能排除 PRRSV 在 MARC-145 繁殖过程中, 其蛋白构象的改变有关。目前, 已确定猪肺泡巨噬细胞 (Porcine alveolar macrophages, PAM) 表面的硫酸乙酰肝素 (Heparan sulphate, HS)、唾液酸黏附素 (Sialoadhesin, Sn) 及清道夫蛋白 CD163 等与 PRRSV 的感染有关<sup>[14]</sup>。在 PRRSV 和 PAM 相互作用的早期, 主要由 HS 介导, 而在病毒内在化时, 则通过唾液酸黏附素的作用。HS 单独作用, 既可使病毒与敏感细胞充分结合, 但病毒不能进入易感细胞, 病毒进入细胞需要 Sn 的存在。Sn 介导 PRRSV 内在化并不必须需要 HS 的

存在, 但 Hs 与 PRRSV 的充分结合, 可使病毒粒子在 PAM 表面浓缩, 促使病毒粒子内在化时更充分的与内在化相关受体结合, 提高了内在化和感染率<sup>[15]</sup>。现已明确 MARC-145 细胞表面存在 HS 受体, 但无 Sn 受体, 至于是否存在 CD163 还不确定<sup>[16]</sup>。Sn 是 PRRSV 内在化受体, 而其的缺乏表明 PRRSV 利用其它受体进入 MARC-145 细胞, 而是否正是其它受体的介导导致病毒蛋白构象的改变, 需进一步研究的证实。

## 参 考 文 献

- [1] 郝晓芳, 周艳君, 田志军, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 鉴别诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(9): 704-709.
- [2] 童光志, 周艳君, 郝晓芳, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离鉴定及其分子流行病学分析[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 323-326.
- [3] Yoshii M, Okinaga T, Miyazaki A, et al. Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type-Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Arch Virol, 2008, 153(7): 1323-1334.
- [4] 蔡学辉. “猪高热病”的防制及其启示[J]. 今日畜牧兽医, 2009(10): 13-14.
- [5] Tian ZJ, An TQ, Zhou YJ, et al. An attenuated live vaccine based on highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) protects piglets against HP-PRRS[J]. Vet Microbiol, 2009, 138(1/2): 34-40.
- [6] Xiao ZG, Batista L, Dee S, et al. The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load[J]. J Virol, 2004, 78(11): 5923-5933.
- [7] Meier WA, Galeota J, Osorio FA, et al. Gradual development of the interfe- $\gamma$  response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination[J]. Virology, 2003, 309(1): 18-31.
- [8] Van Reeth K, Nauwynck H. Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs[J]. Vet Res, 2000, 31(2): 187-213.
- [9] Duan X, Nauwynck HJ, Pensaert MB. Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. Vet Microbiol, 1997, 56(1/2): 9-19.
- [10] 刘长明, 危艳武, 张朝霞, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒分离鉴定及其体外传代遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(5): 329-333.
- [11] 张婉华, 叶向阳, 祁贤, 等. 猪繁殖呼吸综合征病毒 (PRRSV) SA 毒株的分离与鉴定[J]. 上海农业学报, 2002, 18(2): 76-79.
- [12] 黄梅清, 车勇良, 陈少莺, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒欧洲型 FJ0602 株的分离及其 ORF7 的序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(8): 174-178.
- [13] Zuckermann FA. A study on the feasibility of using a porcine alveolar macrophage cell line to produce a PRRS modified live virus vaccine-NPB #05-200. 2007, <http://www.porkboard.org/>.
- [14] Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 5): 1441-1445.
- [15] Shanmukhappa K, Kim JK, Kapil S. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection[J]. Virol J, 2007, 4(1): 62.
- [16] Van Breedam W, Delputte PL, Van Gorp H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage[J]. J Gen Virol, 2010, 91(Pt 7): 1659-1667.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>