

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.05.01

# 猪轮状病毒阳性血清(G5型)制备及初步鉴定

高金源,高月异,邓永,王兆,秦义娴\*,李翠\*,吴华伟,薛青红

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-10-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 05-0001-05 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 采用常见猪病毒抗体阴性仔猪制备了猪轮状病毒 G5 型阳性血清,经冻干鉴定,其性状、无菌检验、特异性检验、剩余水分测定、真空度测定结果均符合要求,效价高达 1:11482,为我国猪轮状病毒活疫苗或其联苗成分的外源病毒检验、鉴别检验提供阳性血清,以满足疫苗检验需求。

**[关键词]** 猪轮状病毒;阳性血清;鉴定

## Preparation and Preliminary Identification of Porcine Rotavirus Positive Serum (G5)

GAO Jin-yuan, GAO Yue-yi, DENG Yong, WANG Zhao, QIN Yi-xian\*, LI Cui\*,  
WU Hua-wei, XUE Qing-hong

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding authors: QIN Yi-xian, E-mail: yixianqin87@126.com; LI Cui, E-mail: licui@souhu.com

**Abstract:** In the test, the positive serum of porcine rotavirus G5 was prepared from piglets with negative antibodies to common swine viruses. After freeze-drying identification, its character, sterility test, potency test, specificity test, residual water test, and vacuum degree test all met the requirements, providing standard positive serum for the identification test and detection of foreign viruses in live attenuated porcine rotavirus vaccine or its vaccine components in China, so as to meet the needs of vaccine test.

**Key words:** porcine rotavirus; positive serum; identification

猪轮状病毒(Porcine Rotavirus, PoRV)属呼肠孤病毒科(Reoviridae)轮状病毒属(Rotavirus)成员,是引起幼龄仔猪病毒性腹泻的主要病原之一,为双链 RNA 病毒,基因组包含 11 段双链 RNA,编

码 6 种病毒结构蛋白(VP1-VP4, VP6 和 VP7)和 5 种非结构蛋白(NSP1-NSP5);病毒粒子有 3 层衣壳,最内层为 VP1、VP2 和 VP3,其包裹着轮状病毒的基因组 RNA,中间层为 VP6,具有抗原特异性,最

基金项目:兽药行业公益性重点专项(GY202014)

作者简介:高金源,副研究员,从事兽用生物制品的检验和研究工作。

通讯作者:秦义娴, E-mail: yixianqin87@126.com;李翠, E-mail: licui@souhu.com

外层衣壳由 VP4 和 VP7 蛋白组成,能够诱导机体产生中和抗体<sup>[1-2]</sup>。根据 VP6 核苷酸序列差异,将轮状病毒分为 10 个基因群(A-J),A、B 和 C 群轮状病毒(RVA、RVB 和 RVC)普遍感染人和动物。目前已在 A、B、C、E、H 群中发现猪轮状病毒,其中 RVA 的流行性最高。通常基于 VP7、VP4 和 VP6 基因序列,进一步将轮状病毒分为 G、P 和 I 基因型<sup>[2]</sup>。VP7 蛋白是猪轮状病毒重要的糖蛋白和主要的中和抗原,现有已知的 G 基因型和血清型均相同,相互对应<sup>[3]</sup>,故根据 VP7(G)基因序列进行 G 血清型定型,并作为猪轮状病毒流行毒株分析及其疫苗毒株筛选的主要依据。猪轮状病毒需经胰酶处理,方可在 Marc-145 细胞上增殖,并出现典型的细胞病变,根据该生物学特性,可采用细胞中和试验测定其抗体中和效价。

我国目前主要流行猪轮状病毒 A 群 G5、G9 等血清型<sup>[2,4]</sup>,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研制成功的猪传染性胃炎、猪流行性腹泻、猪轮状病毒(G5)三联活疫苗(弱毒华毒株+弱毒 CV777 株+NX 株)已于 2014 年批准应用,但我国缺少猪轮状病毒 G5 型相关疫苗检验及研究用标准化阳性血清。本试验采用仔猪制备了猪轮状病毒特异性阳性血清(G5),可解决目前猪轮状病毒标准阳性血清(G5)缺乏问题,以满足检验及研究之需。

## 1 材料与方法

1.1 细胞、毒株、动物 Marc-145 细胞、猪轮状病毒强毒 G5 型 LN 株,由中国兽医药品监察所保存;猪轮状病毒 G5 型 NX 株,由哈尔滨维科生物技术有限公司提供;30 日龄健康仔猪 6 头,购自哈尔滨国生生物科技股份有限公司。

1.2 主要试剂 DMEM 营养液、0.25% 胰酶为 gibco 公司产品;阳性血清对照(中和抗体效价 1:1024)、阴性血清对照(中和抗体效价 <1:4),由哈尔滨维科生物技术有限公司提供。

### 1.3 血清制备

1.3.1 免疫程序 筛选猪常见病毒抗体为阴性(PRRSV、PRV、CSFV 和 FMDV O 型 ELISA 抗体检

测为阴性,PCV2、PED、TGEV、PoRV 中和抗体效价不高于 1:4,JEV、PPV、SIV 的 HI 抗体效价不高于 1:10)且 ASFV 核酸检测为阴性的健康易感仔猪 6 头。采用 PoRV NX 株细胞毒 4 次肌肉注射筛选到的 PRRSV、PRV、CSFV 等抗体阴性猪,免疫间隔时间为 21 d,然后采用 G5 型 PoRV 强毒株 LN 株进行攻击,攻毒后 14 d 开始采血、分离血清并检测血清中和抗体效价,当血清中和抗体效价不低于 1:1024 时进行颈动脉放血,分离血清,并将获得 6 份阳性血清放置 -40 °C 冰箱保存。

1.3.2 血清冻干 采血前监测中和抗体效价水平为 3/6 不低于 1:8000,3/6 在 1:2000~4096 之间,选取 1 份中和抗体效价不低于 1:8000 的猪轮状病毒阳性血清混匀分装,每瓶 2 mL,参照《中国兽用生物制品规程》(2000 年版)<sup>[5]</sup>的规定进行冻干,冻干后放置 -20 °C 冰箱保存。

### 1.4 血清鉴定

1.4.1 性状、无菌检验、剩余水分测定和真空度测定 按照《中国兽药典》三部(2020 年版)的规定进行性状、无菌检验、剩余水分测定和真空度测定。

1.4.2 效价测定 参照猪传染性胃炎、猪流行性腹泻、猪轮状病毒(G5)三联活疫苗(弱毒华毒株+弱毒 CV777 株+NX 株)质量标准方法进行检验,效价应不低于 1:1024。

1.4.2.1 病毒处理 取含量为 300 μg/mL 胰酶溶液 1 mL 加入到 9 mL 猪轮状病毒(G5 型 NX 株,下同)液中,使其胰酶最终含量为 30 μg/mL,混匀后置 37 °C 作用 1.5 h,备用。

1.4.2.2 血清稀释、中和 将待检血清、阳性血清对照和阴性血清对照放置 56 °C 灭能 30 min,然后用 DMEM-胰酶液(含胰酶 3 μg/mL,下同)将待检血清进行 4 倍系列稀释(200 μL 血清+600 μL DMEM-胰酶液)至 1:65536,取稀释度 1:64~1:65536 用于中和抗体效价测定;取稀释后血清,每个稀释度加入等量 200 TCID<sub>50</sub>/0.1 mL 猪轮状病毒液,混匀后放入 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱作用 1 h,期间振荡 2 次。

1.4.2.3 接种与观察 将中和液接种到已长满良

好单层 Marc - 145 细胞的 96 孔细胞培养板上, 每个稀释度接种 6 孔, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 放置 37  $^{\circ}\text{C}$  二氧化碳培养箱作用 1 h; 同时设立阴性血清对照、阳性血清对照、病毒对照 (200 TCID<sub>50</sub>/0. 1mL 病毒液 500  $\mu\text{L}$  + 500  $\mu\text{L}$  DMEM - 胰酶稀释液) 及正常细胞对照; 并用 DMEM - 胰酶液将 200 TCID<sub>50</sub>/0. 1mL 病毒液进行 10 倍系列稀释至 10<sup>-3</sup>, 取 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 三个稀释度接种细胞进行病毒回归, 每个稀释度接种 6 孔, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 放置 37  $^{\circ}\text{C}$  二氧化碳培养箱作用 1 h。1 h 后, 每孔补加 DMEM - 胰酶液 100  $\mu\text{L}$ , 置 37  $^{\circ}\text{C}$  CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 每天观察并记录细胞出现 CPE 情况, 连续观察 5 ~ 7 d。

1. 4. 2. 4 结果判定 病毒对照、阴性血清对照应全部出现 CPE, 阳性血清对照应达到规定的中和抗体效价 (误差不超过  $\pm 1$ ), 正常细胞对照应无 CPE 且生长良好, 病毒回归时病毒含量应在 50 ~ 300 TCID<sub>50</sub>/0. 1mL 之间, 试验成立, 否则应重检。根据细胞出现 CPE 情况, 按 Reed - Muench 法计算中和抗体效价, 应不低于 1: 1024。

1. 4. 3 特异性检验 采用我国国标或行业标准的方法分别进行冻干血清常见猪病原抗体检测, 详见表 1。

## 2 结果与分析

2. 1 性状 从冻干的血清中随机选取 3 瓶, 样品

表 1 病原抗体检测方法

Tab 1 Detection method of pathogenic antibody

病原抗体	检验方法	病原抗体	检验方法
PRRSV	ELISA	PEDV	VNT
PRV	ELISA	TGEV	VNT
CSFV	ELISA	JEV	HI
FMDV O 型	ELISA	PPV	HI
PCV2	VNT	SIV	HI

均为微黄色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

2. 2 无菌检验 从冻干的血清中随机选取 5 瓶进行无菌检验, 均无菌生长 (表 2), 符合《中国兽药典》三部 (2020 年版) 规定。

2. 3 剩余水分测定 从冻干的血清中随机选取 4 瓶进行剩余水分测定, 含量分别为 1. 3%、1. 6%、1. 2%、1. 0% (表 3), 符合《中国兽药典》三部 (2020 年版) 规定。

2. 4 真空度测定 使用高频火花真空测定仪对冻干血清进行测定, 出现白色、粉色或紫色辉光的判为合格。经测定, 冻干血清均真空检验合格。

2. 5 效价测定 结果表明, 采用制备疫苗用猪轮状病毒 G5 型 NX 株进行冻干血清 (G5 型) 效价测定, 中和抗体效价可达 1: 11481 (表 4)。

2. 6 特异性检验 冻干血清的病原抗体检测结果均为阴性, 冻干血清的特异性符合规定 (表 5)。

表 2 无菌检验结果

Tab 2 Sterility test results

瓶号	36 $^{\circ}\text{C}$ 培养结果		24 $^{\circ}\text{C}$ 培养结果		36 $^{\circ}\text{C}$ 培养结果	
	TG 小瓶	TG 小管	TSB 小管	GA 斜面	TG 小管	GA 斜面
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-

“-” 表示无菌生长

表 3 剩余水分测定结果

Tab 3 Determination results of residual moisture

编号	空瓶重/g	干燥前总重/g	干燥后总重/g	干燥前重/g	干燥后重/g	剩余水分含量/%
1	9. 0424	9. 2058	9. 2037	0. 1634	0. 1613	1. 3
2	9. 3416	9. 4956	9. 4932	0. 1540	0. 1516	1. 6
3	8. 8171	8. 9335	8. 9321	0. 1164	0. 1150	1. 2
4	8. 5981	8. 7326	8. 7312	0. 1345	0. 1331	1. 0

表 4 效价测定结果

Tab 4 Potency Determination Results

项 目	血清稀释度	观察结果	距离比例	LgPD <sub>50</sub>	PD <sub>50</sub>	判 定
制备阳性血清	1: 64	6/6 -	0.750	-4.06	1: 11482	符合要求
	1: 256	6/6 -				
	1: 1024	6/6 -				
	1: 4096	6/6 -				
	1: 16384	2/6 -				
	1: 65536	0/6 -				
阳性血清对照	1: 64	6/6 -	0.400	-3.25	1: 1778	
	1: 256	6/6 -				
	1: 1024	5/6 -				
	1: 4096	0/6 -				
	1: 16384	0/6 -				
	1: 65536	0/6 -				
阴性血清对照	1: 4	0/6 -	/	/	<1: 4	试验成立
	1: 16	0/6 -				
	1: 64	0/6 -				
病毒回归	病毒稀释度	观察结果	距离比例	LgTCID <sub>50</sub>	TCID <sub>50</sub> 含量	
	10 <sup>-1</sup>	6/6 +	0.400	-2.24	174	
	10 <sup>-2</sup>	5/6 +				
10 <sup>-3</sup>	0/6 +					
病毒对照	/	6/6 +	/	/	/	
正常细胞对照	/	6/6 -	/	/	/	

“+”表示观察到细胞出现 CPE;“-”表示未观察到细胞出现 CPE;“/”表示未涉及

表 5 特异性检验结果

Tab 5 Specific test results

病原抗体	检测方法	结 果	病原抗体	检验方法	结 果
PRRSV	ELISA	阴性	PEDV	VNT	阴性
PRV	ELISA	阴性	TGEV	VNT	阴性
CSFV	ELISA	阴性	JEV	HI	阴性
FMDV O 型	ELISA	阴性	PPV	HI	阴性
PCV2	VNT	阴性	SIV	HI	阴性

### 3 小 结

为了保证商品化的动物用病毒类活疫苗的纯净性、特异性,疫苗成品和生产毒种需采取先使用特异性阳性血清完全中和、再接种敏感细胞的方法来进行外源病毒检验、鉴别检验。由于猪轮状病毒 G 血清型繁多,不同血清型之间交叉中和效果差,

只有同型间才能获得较高的免疫交叉保护效果和中和抗体效价<sup>[6-8]</sup>,故试验采用猪轮状病毒 G5 型抗原来制备特异性阳性血清,以便能够有效中和疫苗中猪轮状病毒 G5 型抗原成分,保证疫苗外源病毒检验和鉴别检验的顺利进行。

试验采用国家标准或行业标准,对试验用仔猪

的血清样品进行了 PRRSV、CSFV、PRV、FMDV O 型、PCV2 等常见猪病毒抗体检测,选择阴性健康仔猪用于试验,并对该试验的环境、动物舍及进出人员采取严格隔离控制的管理措施,防止试验动物感染外源病原,保证所制备阳性血清的特异性;同时,原疫苗成品质量标准中仅用弱毒抗原免疫程序制备的阳性血清中和抗体效价一般可达 1:1024,通过尝试采用猪轮状病毒 G5 型 NX 株弱毒抗原进行 4 次免疫、猪轮状病毒 G5 型 LN 株强毒 1 次攻毒试验的免疫程序制备猪轮状病毒 G5 型阳性血清,中和抗体效价明显提高,一般可达 1:4000 以上,最高可达 1:10000 以上。

所制备的阳性血清经冻干后进行了质量鉴定,结果其性状、无菌检验、效价测定、特异性检验、剩余水分测定、真空度测定结果均符合要求。试验采用的免疫程序可以获得抗猪轮状病毒的特异性高效价阳性血清,为该阳性血清在疫苗检验中的有效应用提供了基础保证。为了确保冻干血清在保存期间的质量稳定性,下一步将适时进行稳定性试验,以便确定其 -20 ℃ 保存条件下的有效期。

## 参考文献:

- [1] 杨汉春,主译.猪病学(第11版)[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2021.  
Yang H C, Chief translator. Swine diseases (11th Edition)[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2021.
- [2] 苗艳,朱庆贺,陈亮,等.猪轮状病毒的分子流行病学研究进展[J].动物医学进展,2020,41(1):93-97.

- Miao Y, Zhu Q H, Chen L, *et al.* Advances in molecular epidemiology of porcine rotavirus [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(1): 93-97.
- [3] Saif L, Yuan L, Ward L, *et al.* Comparative studies of the pathogenesis, antibody immune responses, and homologous protection to porcine and human rotaviruses in gnotobiotic piglets [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 412: 397-403.
  - [4] 王璐,时洪艳,陈建飞,等.2011年~2012年G9型猪轮状病毒流行病学调查及VP7基因遗传进化分析[J].中国预防兽医学报,2013,35(4):276-279.  
Wang L, Shi H Y, Chen J F, *et al.* Epidemiological investigation of porcine rotavirus type G9 from 2011 to 2012 and genetic evolution analysis of VP7 gene[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(4):276-279.
  - [5] 冯静兰,单卯斗,周齐,等.中国兽用生物制品规程(2000年版)[M].北京:化学工业出版社,2000:208-211.  
Feng J L, Shan M D, Zhou Q, *et al.* China Veterinary Biological Products Regulations (2000 Edition)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 208-211.
  - [6] 何孔旺,林继煌,丁再棣,等.牛猪轮状病毒血清分型及其抗原性比较[J].病毒学报,1992,8(4):332-336.  
He K W, Lin J H, Ding Z D, *et al.* Serotype and antigenicity of bovine porcine rotavirus[J]. *Chinese Journal of Virology*, 1992, 8(4): 332-336.
  - [7] Bohl E H, Theil K W, Saif L J. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1984, 19(2):105-111.
  - [8] Gaul S K, Simpson T F, Woode G N, *et al.* Antigenic relationships among some animal rotaviruses: virus neutralization *in vitro* and cross-protection in piglets [J] *J Clin Microbiol*, 1982, 16(3): 495-503.

(编辑:李文平)