

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810173656.8

[51] Int. Cl.

*C12N 7/00 (2006.01)*  
*A61K 39/12 (2006.01)*  
*A61P 31/14 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年5月6日

[11] 公开号 CN 101423821A

[22] 申请日 2008.11.5

[21] 申请号 200810173656.8

[71] 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所  
地址 150001 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号

[72] 发明人 刘长明 危艳武 张朝霞 袁婧  
黄立平

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有限公司  
代理人 孙皓晨 费碧华

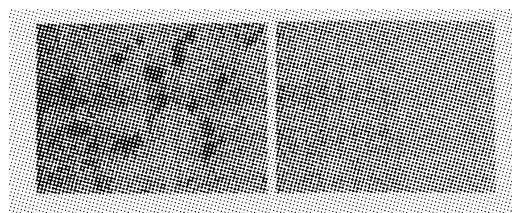
权利要求书1页 说明书17页 附图2页

## [54] 发明名称

高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株及其应用

## [57] 摘要

本发明公开一株高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株，其微生物保藏号是CGMCC.2657。本发明从临床“高热综合征”病例分离到高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株，经细胞传代和蚀斑克隆，培育得到增殖性能稳定的新毒株。本发明新毒株Nsp2序列中第483和535~563位氨基酸存在缺失，属PRRSV变异株。该毒株第40代毒种序列的第3116~3127位核苷酸发生突变，添加了12个碱基序列。通过靶动物感染试验及免疫学检测，证实本发明毒株具有高致病性和遗传变异性，该毒株带有遗传标志，体外繁殖能力稳定，对新型疫苗的研制具有重要参考价值，也为今后病毒致病机理、遗传变异、鉴别诊断及分子生物学研究奠定了基



1、一株高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) 变异株, 其特征在于: 所述高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株的 Nsp2 序列中第 483 和 535~563 位氨基酸存在缺失; 其传代毒株的 Nsp2 基因的第 3116~3127 位核苷酸发生突变, 添加了 SEQ ID NO. 1 所示的核苷酸序列。

2、按照权利要求 1 所述的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株, 其特征在于: 其第 5 代和 40 代毒种 ORF5 框架内的第 566 位核苷酸由 C 突变为 T。

3、按照权利要求 1 所述的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株, 其特征在于: 其微生物保藏号是: CGMCC. 2657。

4、权利要求 1-3 任何一项所述的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株在制备预防或治疗猪繁殖与呼吸综合征疫苗中的用途。

5、权利要求 1-3 任何一项所述的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株在制备鉴别或诊断猪繁殖与呼吸综合征试剂中的用途。

## 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株及其应用

### 技术领域

本发明涉及病毒变异株，尤其涉及一株高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）变异株，本发明还涉及该病毒变异株的培育方法和应用，属于病毒分子生物学领域。

### 背景技术

猪繁殖与呼吸综合征病毒（Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）是引起猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）的病原，该病以妊娠母猪流产、死胎、弱仔、木乃伊胎等繁殖障碍及各年龄段猪的呼吸道疾病和高死亡率为特征（BE 斯特劳，SD 阿莱尔，WL 蒙加林，等主编. 猪病学 [M]. 赵德明，等译. 第 8 版，2000，205-238）。Wensvoort 等首次分离该病病原，相继许多国家报道本病流行（Wensvoort G, Tepstra C, Pol J M A, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. Vet Q, 1991, 13(3): 121-130.）。郭宝清等证实本病在中国存在，并从流产胎儿中分离到 PRRSV CH-1a 株（郭宝清，陈章水，刘文兴，等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究 [J]. 中国畜禽传染病，1996，2: 3-7.）。PRRSV 具有抗原变异性、嗜巨噬细胞性、持续感染性及抗体依赖增强性作用，临床上常与其它病原混合感染使临床表现形式复杂化。在自然感染中，PRRSV 容易发生遗传变异，导致病毒的致病性、细胞嗜性、生物学特性等发生较大改变。Halbur 等从美国衣阿华州分离到一株 PRRSV 变异株能够引起更严重的母猪繁殖障碍和仔猪较高死亡率，并证实变异株由基因突变演化而来（Halbur P G, Paul P S, Meng X J, et al. Comparative pathogenicity of nine U.S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates a five-week-old cesarean-derived, colostrums-deprived pig model [J]. J Vet Diagn Invest, 1996, 8: 11-20.）。2006 年中国南方爆发的“猪高热综合征”，病原学研究表明由一种新的 PRRSV 变异株引起，证明变异株编码的 Nsp2 基因第 483 和 535~563 位氨基酸存在缺失（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): 323-327.)。

大量研究表明, PRRSV在复制过程中, 基因组内容易发生很高频率的突变, 导致临床上流行不同的毒株, 而不同的分离株引起的疫病临床表现不尽一致 (Yoshiil M, Kaku Y, Murakamil Y, et al. Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan [J]. Arch Virol, 2005, 150: 2313-2324; Enric M, Marga M, Dolors V. Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain [J]. J Gen Virol, 2003, 84: 529-534; Truong H M, Lu Z, Kutish G F, et al. A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus [J]. Virology, 2004, 325: 308-319; Cha S H, Choi E J, Park J H, et al. Molecular characterization of recent Korean porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses and comparison to other Asian PRRS viruses [J]. Vet Microbiol, 2006, 117: 248-257. )。如欧洲型毒株感染猪常观察到耳、乳头、鼻、颈腹部皮肤呈蓝紫色, 而北美型毒株出现几率较低 (BE斯特劳, SD阿莱尔, WL蒙加林, 等主编. 猪病学 [M]. 赵德明, 等译. 第8版, 2000, 205-238.)。自2006年我国流行的高致病性PRRSV变异株属北美型, 临床病例常见有典型蓝耳或皮肤发紫症状, 致死率较经典毒株显著提高, 基因测序结果显示流行毒株与经典毒株有较大差异, 集中表现在Nsp2基因发生缺失现象 (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): 323-327.)。

由于 PRRSV 变异毒株感染猪引起严重的临床疾病, 对其致病机理、遗传变异规律及防控对策尚待深入研究, 分离得到增殖性能稳定的 PRRSV 变异毒株是开展上述研究的前提或关键技术之一。

## 发明内容

本发明目的是提供一株增殖性能稳定的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 变异株。

本发明上述目的是通过以下技术方案来实现的:

本发明从临床“高热综合征”病例分离到高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)变异株,经细胞传代和蚀斑克隆,培育得到增殖性能稳定的新毒株,命名为 PRRSV-HBR;所述高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株的 Nsp2 序列中第 483 和 535~563 位氨基酸存在缺失;其传代毒株的 Nsp2 基因的第 3116~3127 位核苷酸发生突变,添加了 12 个核苷酸序列(GAGATCGCCTTT, SEQ ID NO.1);

另外,对本发明 PRRSV-HBR 株第 5 和 40 代毒种进行 ORF5 基因序列比较发现,ORF5 框架内的第 566 位核苷酸由 C 突变为 T;

本发明所述毒株的微生物保藏号是:CGMCC.2657;分类命名是:猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*);保藏时间是:2008 年 8 月 29 日;保藏单位是:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;保藏地址是:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所。

本发明所分离的 PRRSV-HBR 毒株接种细胞后能够产生细胞病变(CPE),随传代次数增加毒价显著提升,第 45~55 代毒价测定达  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL。采用免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)检测,发现病毒抗原分布在细胞浆中;电镜观察到的病毒粒子呈圆形,直径约 50~55nm。

本发明所分离的 PRRSV-HBR 变异株,根据其基因序列与致病性特点,属于高致病性 PRRSV 变异株,经过细胞传代与克隆纯化培育的新毒株,又发生了较大变异,在 Nsp2 基因添加了 12 个碱基序列,获得的这种遗传标志为今后开展变异株的致病性、遗传变异与毒力的相关性及其分子标记疫苗的研制开辟了新途径。

关于南方发生的“高热综合征”的报道较多,多数学者认为高致病性 PRRSV 变异株为原发病原,也证实有其它病原混合感染存在。用本发明所分离的 PRRSV 变异株第 5 代培养物滴鼻接种试验猪( $1 \times 10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>),试验结果表明该毒株能够引起猪只严重的临床症状,出现持续高热、精神萎靡、食欲减退、皮肤充血、进行性消瘦、眼睑水肿等症状,发病率达 100%(10/10),死亡率为 30%左右(3/10)。然而,试验猪并没有复制出临床上的皮肤发紫、耳部发绀现象,这与相关的报道存在一定差异(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):323-327.)。基因序列表明,尽管本发明 PRRSV-HBR 株与 HUN4-07-China 和 JXA1-06-Chian 株序列同源性较高,但毒力较后两者低一些。由于高致病性 PRRSV 变异株易发生遗传变异,通过细胞传代后毒力下

降较快，本发明人用本毒株第 13 代培养物接种 2 头试验猪，没有引起显著的临床反应，证明毒株经细胞传代毒力下降很快。

用分离的本发明毒株感染试验猪接种后第 2d 可检测到病毒血症，第 7d 检测到血清抗体。病毒急性感染期，感染猪多种脏器中病毒抗原与核酸检测均呈阳性，表明病毒在这些脏器有大量繁殖；但感染后主要分布诸如扁桃体、脾脏、淋巴结组织，表明变异株的组织嗜性发生了一定改变。由于病毒在这些组织中大量增殖，释放较多的组织胺，从而刺激神经中枢系统调节体温，导致临床上持续高热。持续高热期与病毒血症呈正相关，高热期内 RT-PCR 检测血清中病毒核酸阳性率极高，而体温下降后毒血症逐渐消退。病毒感染急性死亡与耐过猪脏器病毒抗原和核酸检测显示，感染急性死亡猪只多种脏器均呈阳性，而耐过猪以淋巴结、脾脏和扁桃体等组织阳性检出率高，这对本病诊断有一定意义。

总之，本发明通过靶动物感染试验及免疫学检测，证实了本发明所分离毒株 PRRSV-HBR 具有高致病性和遗传变异性；通过细胞传代驯化，产生了标志性基因突变，获得了带有遗传标志的新毒株，该毒株体外繁殖能力稳定，这对新型疫苗的研制具有重要参考价值，也为今后病毒致病机理、遗传变异、鉴别诊断及分子生物学研究奠定了基础。

#### 附图说明

图 1 PRRSV-HBR 株感染 Marc145 细胞产生的病变 (A: 病毒感染; B: 细胞对照)。

图 2 PRRSV-HBR 株的病毒蚀斑克隆纯化。

图 3 IPMA 法检测 PRRSV-HBR 株感染细胞病毒抗原; (A: 病毒感染; B: 细胞对照)。

图 4 PRRSV-HBR 株电镜形态学观察; A: 病毒免疫复合物; B: 感染细胞切片。

图 5 直接免疫荧光法检测 PRRSV-HBR 株感染猪脾脏中病毒抗原; A: 感染猪脾脏免疫荧光阳性; B: 健康对照呈阴性。

图 6 PRRSV-DIFA 法检测本发明病毒株在 MARC-145 细胞繁殖动力学试验结果。

图 7 DIFA 法检测 PRRSV-HBR 毒株人工感染猪脏器组织抗原分布 (200

×); A: 心脏; B: 肝脏; C: 脾脏; D: 肺脏; E: 肾脏; F: 下颌淋巴结; J: 肠系膜淋巴结; H: 腹股沟淋巴结; I: 空肠; J: 扁桃体; K: 脑; L: 睾丸。

## 具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本发明, 本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的, 并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是, 在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换, 但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

## 实施例 1 PRRSV-HBR 毒株的分离和鉴定

### 1 材料和方法

#### 1.1 病毒分离

##### 1.1.1 样品处理

从临床患“猪高热综合征”病例采集血清, 经 4000r/min 离心 30min, 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 用培养液按 5% 稀释后接种 Marc145 细胞分离病毒。

##### 1.1.2 细胞培养

Marc145 细胞株本室保存, 培养液为 RPMI 1640 含 5% 灭活的犊牛血清(FCS) 和青、链霉素各 100U(μg)/mL, 按常规法进行细胞传代。

1.1.3 病毒传代 病毒培养物接种 Marc145 细胞单层, 37℃ 孵育 1h, 加入含 1% FCS 培养液和青、链霉素各 100U(μg)/mL, 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养 72h~96h, 出现 75% 细胞病变 (CPE) 时收毒, 冻融 3 次后进行病毒传代, 毒种于 -80℃ 保存备用。

### 1.2 常规病毒学鉴定

#### 1.2.1 血清学鉴定

采用免疫过氧化物酶单层细胞试验法 (IPMA) 进行病毒血清学鉴定 (谭斌, 刘长明, 危艳武, 等. PRRSV-IPMA 抗体检测试剂盒的研制及应用 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36 (11): 858-862)。PRRSV 阳性血清自制, 抗体效价为 12800 倍, 用于病毒检测; 猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪细小病毒 (PPV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 参考血清用于交叉试验。

### 1.2.2 毒价测定

不同代次病毒培养物进行 10 倍系列稀释，分别接种于 96 孔板培养的单层细胞，每个稀释度设 4 孔，同设不加病毒的正常细胞作对照，置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养，逐日观察记录 CPE，按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。

### 1.2.3 蚀斑克隆

病毒培养物经 10 倍系列稀释，接种于 6 孔板培养的单层细胞，于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 感作 1h，吸出接种物后覆盖第 1 层营养琼脂糖，继续培养 72h 后覆盖第 2 层含 0.05% 中性红营养琼脂糖，挑选单斑进行病毒克隆纯化。

### 1.2.4 病毒形态观察

取分离毒株感染细胞制作电镜切片样品；用病毒 3 次冻融培养物，经 12000 r/min 离心 20 min，取上清液加入 1% 的 PRRSV 阳性血清混合后 4℃ 过夜，离心取沉淀，病毒与抗体形成的免疫复合物用于制作电镜负染样品。上述两种样品进行电镜观察与拍照。

## 1.3 分子病毒学鉴定

### 1.3.1 引物设计与合成

参考 GenBank 发表的 PRRSV 变异株序列 (EF635006)，采用 DNASTAR 软件设计引物。扩增 Nsp2 基因引物序列：

Nsp2-F2508: 5' - ACCATGGAGGAGGATCTGCTAAAAC-3' (SEQ ID NO. 2);

Nsp2-R3350: 5' -CTGGTAAGCAGACGTGTTGCG-3' (SEQ ID NO. 3);

PCR 产物为 843bp。扩增 ORF5 基因引物序列：

ORF5-F13695: 5' - AGTATGGTGGGGAAGTGCTTGAC-3' (SEQ ID NO. 4);

ORF5-R14297: 5' -GAGACGACCCCATAGTTCCGC-3' (SEQ ID NO. 5);

PCR 产物为 603bp。

### 1.3.2 病毒 RNA 提取与 RT-PCR 鉴定

用 BIOZOL 总 RNA 提取试剂盒 (博日公司) 从病毒培养液提取总 RNA 为模板，采用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒进行 RT-PCR 扩增，反应条件 RT: 50℃ 30 min, 94℃ 2 min; PCR: [94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 1min] × 35 个循环，72℃ 延伸 7min，PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.3.3 核苷酸序列测定

PCR 产物克隆到 pcDNA3.1/V5-His TOPO TA 载体上 (Invitrogen)，筛选 3 个阳性克隆重组质粒，纯化后送上海英骏生物技术有限公司测序，采用

DNASar 软件进行序列分析与比较。

## 2 实验结果

### 2.1 病毒分离

病毒血症样品接种 Marc145 细胞带毒盲传 3 代, 第 4d~5d 出现细胞病变 (CPE), 病变细胞呈现圆缩、聚堆、拉网、破碎(图 1A), 对照细胞无明显变化(图 1B)。分离毒株经细胞传代, 适应性明显增强, CPE 出现的时间提前, 病变程度加重。

### 2.2 病毒蚀斑克隆

对 PRRSV-HBR 分离株进行了 3 次蚀斑克隆, 形成的蚀斑直径约 1~2 mm, 挑取单斑进行克隆纯化(图 2), 将获得的克隆毒株命名为 PRRSV-HBR 株。

### 2.3 血清学鉴定

用克隆后的 PRRSV-HBR 分离株接种 Marc145 细胞, 经固定后与已知 PRRSV 阳性血清进行 IPMA 法检测, 病毒感染的细胞染成棕红色(图 3A), 病毒抗原局限于细胞浆内, 对照细胞无着色反应(图 3B)。IPMA 检测与其它几种猪病毒参考血清(PCV2、CSFV、PPV、TGEV 和 PEDV)均呈阴性反应, 证明无其他病毒污染。

### 2.4 毒价测定

PRRSV-HBR 株经细胞连续传 55 代, 不同代次取样测定毒价, 结果见表 1。分离株随细胞传代次数递增毒价显著升高, 第 45~55 代毒价可稳定在  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL。

表 1 PRRSV-HBR 株细胞培养适应毒株不同代次毒价测定

代次 (Passages)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	55
毒价 (TCID <sub>50</sub> /mL)	$10^{4.5}$	$10^{4.8}$	$10^{5.0}$	$10^{5.5}$	$10^{5.6}$	$10^{6.3}$	$10^{7.0}$	$10^{7.3}$	$10^{7.5}$	$10^{7.5}$

### 2.5 病毒形态学观察

免疫电镜观察到病毒粒子呈圆形或椭圆形外观, 也见有少量条形粒子, 直径约 50~55nm(图 4A); 电镜切片观察到数十个带囊膜的成熟病毒粒子, 带有核心, 位于细胞空泡内, 直径约 50nm 左右(图 4B)。

### 2.6 Nsp2 与 ORF5 序列分析

对所分离的本发明 PRRSV-HBR 变异株的 Nsp2 与 ORF5 基因进行了序列分析。结果表明,在 Nsp2 基因编码的第 483 和 535~563 位氨基酸存在缺失,PRRSV-HBR 株属于变异株基因群,与 GenBank 发表的国内变异毒株序列:HUN4-07-China(EF635006)、JXA1-06-China(EF112445)、HUB1-06-China(EF075945)核苷酸同源性均达 98.3%左右。对 PRRSV-HBR 株第 5 和 40 代毒种进行 Nsp2 基因序列比较发现,第 40 代毒种的第 3116~3127 位核苷酸发生突变,新突变毒株添加了 12 个碱基序列(GAGATCGCCTTT),该序列为 HBR 传代毒株特有的遗传标志序列。此外,对 PRRSV-HBR 株第 5 和 40 代毒种进行 ORF5 基因序列比较发现,ORF5 框架内的第 566 位核苷酸发生点突变(C→T),导致编码的氨基酸序列发生丝氨酸(Ser)→亮氨酸(Leu)突变。

## 试验例 1 PRRSV-HBR 毒株感染动物试验

### 一、试验方法

选用 35 日龄非免疫健康仔猪 9 头,PRRSV 抗体检测呈阴性,用第 5 代 PRRSV-HBR 株(实施例 1 所分离)培养物原液( $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL)经滴鼻途径接种试验猪 10 头,每头剂量 1mL;同设未接种病毒对照猪 3 头。试验猪隔离饲养,逐日观察临床反应,测定直肠体温,每周测量体重并采集血清样品。采用 IPMA 法检测血清抗体效价,RT-PCR 法检测病毒血症。病毒接种后 28d 迫杀,取脏器组织进行病理学检验,冷冻切片进行直接免疫荧光法检测病毒抗原分布。

### 二、试验结果

#### 1、临床发病情况

病毒接种后 2d~3d 起发热,直肠温度达 40.5℃~41.5℃,持续高热 9d~12d。病程前期临床表现为食欲不振、精神沉郁、眼睑水肿、皮肤充血、呼吸困难、便秘;病程后期表现为生长缓慢、消瘦、四肢无力、喜卧、皮肤苍白、被毛粗乱、体表淋巴结肿大,粪便干硬并带白色粘膜,有的排酱油色稀便。病毒接种后 5d~19d 死亡 3 头猪,发病率为 100%(10/10),死亡率为 30%(3/10)。第 28d 迫杀时,尚有 1 头试验猪表现极度消瘦、皮肤极度苍白、贫血,其余 6 头逐渐耐过康复。

#### 2、病理学变化

感染猪腹股沟淋巴结肿大,肺肉样病变,肠系膜淋巴结肿大,脾脏梗死,

肾於血、水肿，肝脏呈现灰白色坏死灶和黄疸，心包积液，脑充血水肿，胃底淤血。组织病变：颌下淋巴结淋巴小结体积缩小，淋巴细胞减少呈现空泡状，淋巴小结周围伴有嗜酸性粒细胞浸润，边缘伴有出血；脾脏红髓增生，白髓减少，动脉周围淋巴鞘变薄，无明显淋巴小结；心肌纤维结构散乱，伴有肌纤维的断裂，纤维间有大量红细胞；扁桃体淋巴小结内淋巴细胞缺失、呈现出小空泡状；肺脏严重淤血，肺泡腔内在红细胞，伴有黑色颗粒附着；腹股沟淋巴结淋巴细胞减少，淋巴小结呈现小空泡状，周围伴有大量嗜酸性粒细胞浸润；肝脏间质水肿增宽，汇管区内有少量嗜酸性粒细胞浸润，肝细胞无明显坏死，窦状隙内有少量红细胞；肾脏间质轻度增宽，伴有少量淋巴细胞浸润；小肠粘膜上皮坏死、脱落，固有层内有大量嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞浸润；肠系膜淋巴小结内淋巴细胞坏死崩解减少。

### 3、毒血症、血清抗体检测与脏器抗原分布

病毒接种后第2d可检测到病毒血症，持续14d~19d消退；接种后7d可检测到血清抗体，28d达到高峰，抗体效价达3200~6400倍。直接免疫荧光法检测感染猪多种组织脏器中病毒抗原呈阳性反应，其中以脾、淋巴结、扁桃体及小肠组织中抗原含量较高（图5A）。在试验过程中，未接种病毒对照组猪无临床反应，PRRSV抗原与抗体检测均呈阴性结果。

### 试验例2 本发明PRRSV-HBR毒株在直接免疫荧光诊断方法中的应用

#### 1、试验材料与方法

##### 1.1 毒株、细胞系、试剂

PRRSV-HBR变异毒株为实施例1所分离鉴定；MARC-145传代细胞系用于病毒增殖，异硫氰酸荧光素（FITC）、Triton X-100、伊文思蓝均为Sigma产品，NP-40为Amresco产品，抗荧光衰减封片剂为北京普利莱产品，其它化学试剂为国产分析纯级。

##### 1.2 猪抗PRRSV高免血清的制备

用PRRSV-HBR毒株第5代培养物（ $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL）经滴鼻途径接种35日龄PRRSV抗体阴性的非免疫健康仔猪3头，剂量为1mL/头。攻毒耐过猪于第5周颈静脉采血，采用免疫过氧化物酶单层细胞试验（IPMA）测定血清抗体效价，达到1:12800者用于抗体纯化和荧光标记。

##### 1.3 免疫球蛋白（IgG）的提取与荧光素标记

采用硫酸铵盐析法提取血清中IgG，纯化的IgG进行FITC荧光标记，在

280nm、495nm 波长下测定标记抗体的 OD 值，计算 F/P 值（吸光值比率），选取适当组分合并，加入终浓度 0.02%叠氮钠分装，4℃避光保存。

#### 1.4 PRRSV-DIFA 操作程序

##### 1.4.1 病毒感染单层细胞培养物的检测

MARC-145 细胞培养于 96 孔板内形成单层，按 1% 毒种剂量接种 PRRSV-HBR 株毒种，置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养 24h。病毒感染细胞经 PBS 浸洗 1 次，用 33%丙酮-PBS 液室温下固定 20min。细胞干燥后用 PBS 浸洗 1 次，每孔加入 50 μL 含伊文思蓝-PBS 稀释的标记抗体工作液，置湿盒内 37℃感作一定时间取出。轻轻倒掉荧光抗体染液并用滤纸吸干，用 PBS 洗 3 次，每次 5min，再用蒸馏水洗 1min。每孔加入 50 μL 抗荧光衰减封片剂，用荧光倒置显微镜观察与拍照。同设未接种病毒健康细胞孔作为阴性对照。

##### 1.4.2 病毒感染动物组织冷冻切片的检测

取 PRRSV-HBR 毒株第 5 代感染猪脏器，用冷冻切片机制作 5 μm 组织切片，固定后自然干燥。将切片置 PBS 中浸洗 10min，用组织通透剂处理。于每张切片上滴加 100 μL 含伊文思蓝-PBS 稀释的标记抗体工作液，置湿盒内 37℃感作一定时间取出。排干残留反应液，用 PBS 浸洗 3 次，每次 5min，再用蒸馏水浸洗 2min。用滤纸吸去多余水分，每张切片滴加一滴抗荧光衰减封片剂，封片后用荧光倒置显微镜观察与拍照。同设未感染病毒的健康猪脏器组织作为阴性对照。

#### 1.5 PRRSV-DIFA 反应条件的优化

##### 1.5.1 固定剂与固定条件的选择

用已知人工感染猪淋巴组织切片对 7 种固定剂及固定方法进行筛选，确定 DIFA 固定条件。

##### 1.5.2 切片组织的通透剂处理

PRRSV-HBR 毒株人工感染猪淋巴结组织切片，经适当固定后，分别用 0.5%、1%、2% Triton X-100 或 NP-40 分别处理 5min、10min、20min，比较两种试剂组织通透效果。

##### 1.5.3 荧光抗体工作浓度和反应条件的确定

将标记的荧光抗体按 1:8~1:256 系列稀释，分别与已知病毒感染的细胞培养物进行荧光染色，确定荧光抗体使用效价。荧光抗体工作浓度确定后，对抗体感作时间（30min、45min、60min）进行测定。

#### 1.5.4 伊文思蓝工作浓度的确定

分别用含 0.01%~0.001%伊文思蓝的 0.01mol/L PBS 缓冲液 (pH7.4) 稀释荧光抗体,对已知病毒感染的细胞培养物进行荧光染色,确定伊文思蓝衬染浓度。

#### 1.6 PRRSV-DIFA 特异性、敏感性、重复性及保存期

用本方法对已知几种猪病毒感染细胞培养物进行抗原交叉反应试验,其中包括猪圆环病毒 2 型 (PCV2)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪细小病毒 (PPV)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪流行性腹泻病毒 (PEDV)。对已知 PRRSV 感染猪和健康对照猪的脏器组织切片进行了检测,检验该方法的特异性和敏感性。取同批次 PRRSV 感染细胞培养板,在相同条件下不同时间进行 DIFA 检测,检验本方法的重复性。在 4℃ 条件下保存荧光抗体试剂至 1、3、6 个月进行检测,测定其保存期。

#### 1.7 PRRSV-HBR 毒株繁殖动力学测定

用 1%PRRSV-HBR 毒株毒接种 96 孔板培养的 MARC-145 细胞单层,接毒后 0h、4h、8h、12h、16h、20h、24h、36h、48h、60h、72h、96h 逐一取出固定。按 DIFA 操作进行病毒繁殖动力学测定。

#### 1.8 人工感染猪及临床病料采集

选用 35 日龄非免疫健康仔猪 15 头,经 IPMA 法检测 PRRSV 抗体阴性,用 PRRSV-HBR 毒株第 5 代病毒培养物 ( $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL),经滴鼻途径接种试验猪 12 头,剂量 1mL/头;同设未攻毒健康对照猪 3 头。病毒接种后 28d 迫杀,采集心、肝、脾、肺、肾、下颌淋巴结、肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结、扁桃体、脑等脏器,制作冰冻切片。临床病料来自山东、内蒙古、吉林、黑龙江等 10 个猪场送检的 38 份病料。以上组织样品用 PRRSV-DIFA 进行检测。

#### 1.9 与 RT-PCR 方法比较试验

按常规方法对 PRRSV 感染猪脏器病料进行了 RT-PCR 法与 DIFA 平行检测和结果比较,计算两种方法的符合率。

### 2 试验结果

#### 2.1 PRRSV-DIFA 反应条件的确定

通过反复试验,最终确定病毒细胞培养物经 33%丙酮-PBS 固定 20min、伊文思蓝衬染浓度为 0.002%,荧光抗体工作浓度为 1:32 稀释,感作时间 45min;组织冷冻切片采用甲醇-丙酮固定法,1%NP-40 通透 10min,伊文思蓝衬染浓

度为 0.002%，荧光抗体工作浓度为 1:32 稀释，感作时间为 45min，为最佳反应条件。用优化的反应条件对已知病毒感染的细胞培养物和组织切片进行荧光抗体试验，镜下观察到特异性黄绿色荧光较清晰，阳性细胞形态保持较好，组织背景和未被病毒感染的阴性细胞呈暗红色，无非特异性荧光。用不同固定剂及固定方法染色效果的比较结果见表 2。

表 2 用 7 种固定剂进行的 PRRSV-DIFA 检测结果的比较

固定剂	固定方法	免疫荧光检测结果	效果评价
甲醇-丙酮	冷甲醇固定 10min 后， 用冷丙酮固定 1min	阳性细胞数适中，荧光亮度适中， 组织细胞形态较好	优
50%甲醇：50%丙酮	室温固定 10min	阳性细胞数适中，荧光亮度适中， 组织细胞形态较好	优
60%丙酮：40%乙醇	-20℃固定 5min	组织细胞形态不很完整，荧光亮度稍 弱	良
100%丙酮	-20℃固定 5min	阳性细胞数较少，荧光亮度较强	一般
100%甲醇	-20℃固定 5min	可保持细胞形态，荧光亮度减弱	一般
4%多聚甲醛	室温固定 2min	组织细胞形态保持较好，但荧光亮度 弱	差
95%乙醇：5%乙酸	-20℃固定 5min	阳性细胞数极少，荧光强度极微弱	差

## 2.2 PRRSV-DIFA 特异性、敏感性、重复性及保存期试验

用 PRRSV-DIFA 法仅与 PRRSV 感染细胞呈阳性反应结果，而与 PCV2、CSFV、PPV、PRV、TGEV、PEDV 感染细胞无抗原特异性交叉反应，同设各病毒抗原阳性对照组成。敏感性试验结果显示，当荧光抗体做 1:128 稀释后，仍能检测到阳性细胞，敏感性较好。经 5 次重复性试验结果表明，该免疫荧光试验检测结果稳定，检测的阳性细胞数量及荧光强度无较大变化，具有良好的重复性。保存期试验证明，该荧光抗体在 4℃ 条件下保存 6 个月后，其抗体效价仍保持稳定。

### 2.3 病毒繁殖动力学检测

病毒感染单层细胞后 4h~12h, 未能检测到特异性阳性细胞; 感染后 16h 开始出现单个阳性细胞, 表明病毒抗原已完成复制与装配; 感染后 20h, 病毒从感染细胞中释放, 以初始感染细胞为中心, 向周围邻近细胞扩散, 继续增殖; 感染后 24h~60h, 阳性细胞逐渐增多, 多数细胞在胞浆和胞膜上出现黄绿色特异荧光; 感染后 72h, 几乎所有细胞均被感染; 感染 96h 后, 细胞出现崩解, 病毒释放。同设的未感染病毒健康细胞均呈阴性结果。PRRSV-DIFA 法检测病毒繁殖动力学结果见图 6。

### 2.4 人工感染猪脏器组织抗原检测

用 PRRSV-DIFA 法对 12 头病毒感染猪的 12 种不同组织样品检测结果见表 3。病毒抗原阳性检出率最高的组织为腹股沟淋巴结、空肠和睾丸 (100%); 其次为脾脏、下颌淋巴结、肠系膜淋巴结和扁桃体 (91.7%); 肺脏和肝脏检出率较低 (41.7%和 33.3%); 心、肾、脑均呈阴性。按平均荧光强度排序依次为: 空肠、腹股沟淋巴结、下颌淋巴结、肠系膜淋巴结、脾脏、睾丸、扁桃体、肺脏、肝脏。本试验对病毒人工感染猪脏器组织抗原检测结果表明, 以腹股沟淋巴结和空肠最为敏感 (12/12), 其敏感性均达到 100%。同设的 3 头健康对照猪各脏器组织切片检测结果均为阴性 (36/36), 其特异性为 100%。

表 3 PRRSV-DIFA法对人工感染猪各组织脏器病毒抗原检测结果

脏器组织名称	样品阳性数	平均荧光强度*	阳性数/样品总数	阳性检出率
心脏	0	0.000	0/12	0%
肝脏	4	0.167	4/12	33.3%
脾脏	11	1.125	11/12	91.7%
肺脏	5	0.292	5/12	41.7%
肾脏	0	0.000	0/12	0%
下颌淋巴结	11	1.542	11/12	91.7%
肠系膜淋巴结	11	1.500	11/12	91.7%

腹股沟淋巴结	12	2.042	12/12	100%
空肠	11	2.455	11/11	100%
扁桃体	11	0.792	11/12	91.7%
脑	0	0.000	0/7	0%
睾丸	3	1.000	3/3	100%

\*荧光强度判断标准：以阴性样品判为 0；阳性细胞比例占整个视野的 0~30%判为 1；占 30~60%判为 2；占 >60%判为 3；达 100%判为 4。每个样品荧光强度值之和/被检样品总数=平均荧光强度。

## 2.5 人工感染猪病毒抗原分布特点

PRRSV-HBR 毒株感染猪脏器组织病毒抗原分布有如下特点：在空肠的肠绒毛内和固有层的肠腺周围阳性细胞较集中。在腹股沟淋巴结、下颌淋巴结和肠系膜淋巴结，阳性细胞位于淋巴结边缘、被膜结缔组织中及淋巴小结外。在脾脏，阳性细胞位于脾小梁周围、白髓的中央动脉周围和脾小结外。在扁桃体的隐窝两侧、淋巴小结周边及结缔组织中阳性细胞较集中。在肺脏和肝脏中，阳性细胞数量较少，在肺泡、气管支气管周围、肝索中阳性细胞零星散在分布，肝小叶边缘、汇管区相对集中。选择其中一头感染猪的 12 种脏器组织切片 DIFA 检测结果见图 7。

## 2.6 DIFA 与 RT-PCR 检测符合率

用 PRRSV-DIFA 和 RT-PCR 法对来自感染猪和健康对照猪 135 份样品进行了平行检测。用 RT-PCR 检测出 80 份阳性和 55 份阴性；DIFA 法检测出 79 份阳性和 56 份阴性。RT-PCR 阳性样品中 DIFA 检测阴性者 3 份，RT-PCR 阴性样品中 DIFA 检测为阳性样品者 2 份。两种方法检测均为阳性 77 份，均为阴性 53 份。二种方法总符合率为 96.3%。

## 2.7 临床发病猪样品检测

用 PRRSV-DIFA 法对来自山东、内蒙古、吉林、黑龙江等地 10 个猪场送检的 38 份临床发病猪样品进行了检测，结果见表 4。其中 3 个猪场送检的病料阳性检测率达 75.0%；5 个猪场阳性检出率达 66.7%；10 个猪场平均阳性检出率达 63.2% (24/38)。由此可见，我国部分猪场 PRRSV 感染情况较为严重。

表4 DIFA法对临床发病猪组织样品PRRSV抗原检测结果

猪场别	样品份数	被检脏器组织	检测阳性数	检测阴性数	阳性率
A	4	淋巴结、脾	3	1	75.0%
B	3	淋巴结、脾、肺	2	1	66.7%
C	3	淋巴结、脾、肺、肝	2	1	66.7%
D	3	淋巴结	2	1	66.7%
E	4	淋巴结、脾、肝	3	1	75.0%
F	3	淋巴结	1	2	33.3%
G	6	淋巴结、脾、肺	4	2	66.7%
H	4	淋巴结、脾、肺	3	1	75.0%
I	5	淋巴结、脾、肺、肝	2	3	40.0%
J	3	淋巴结、脾、扁桃体	2	1	66.7%
总计	38		24	14	63.2%

## 序列表

<110> 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所	
<120> 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株及其应用	
<130> KLPI08087	
<160> 5	
<170> PatentIn version 3.1	
<210> 1	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	
<400> 1 gagatcgctt	12
<210> 2	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 2 accatggagg aggatctgct aaaac	25
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 3 ctggtaagca gacgtgttc g	21
<210> 4	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 4	

---

agtatggtgg ggaagtgctt gac 23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

gagacgaccc catagttccg c 21

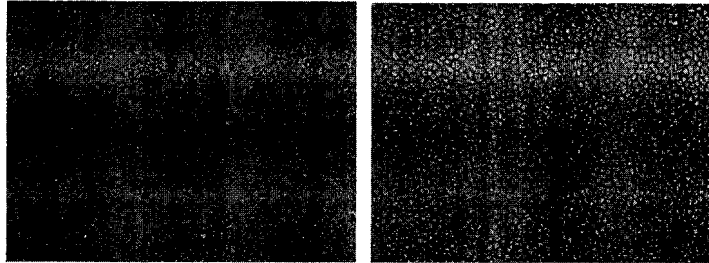


图 1

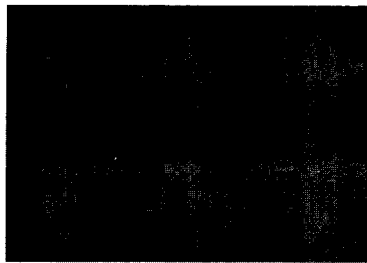


图 2

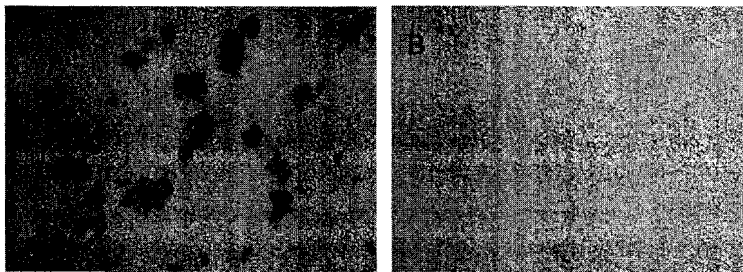


图 3

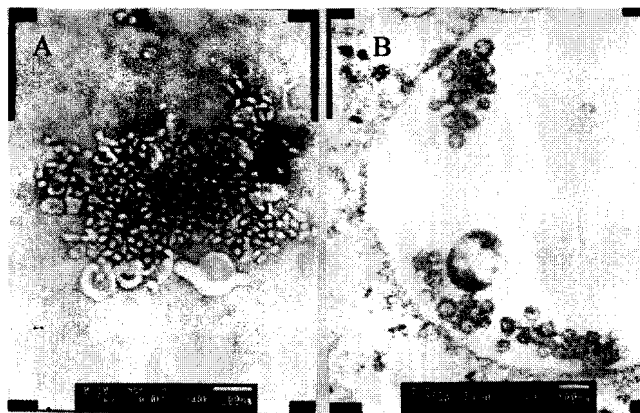


图 4

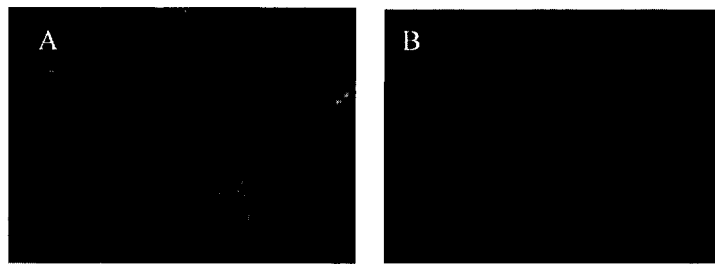


图5

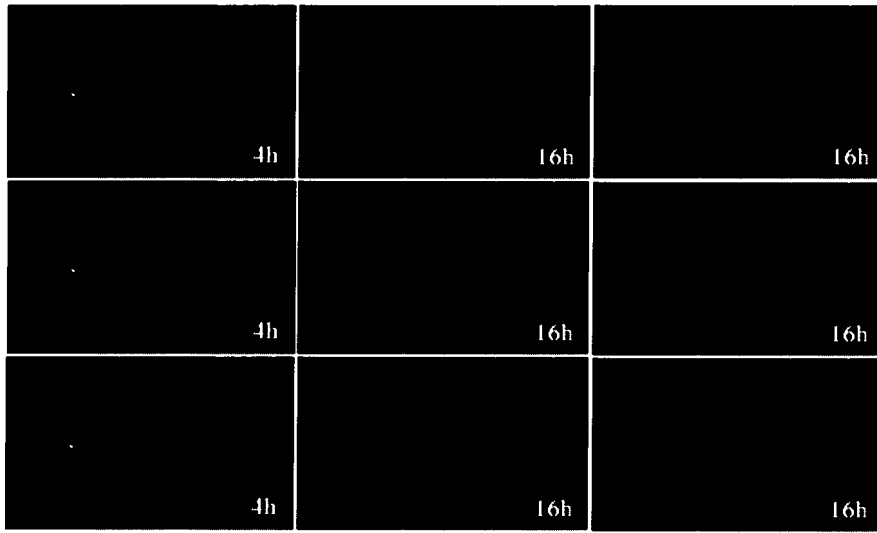


图6

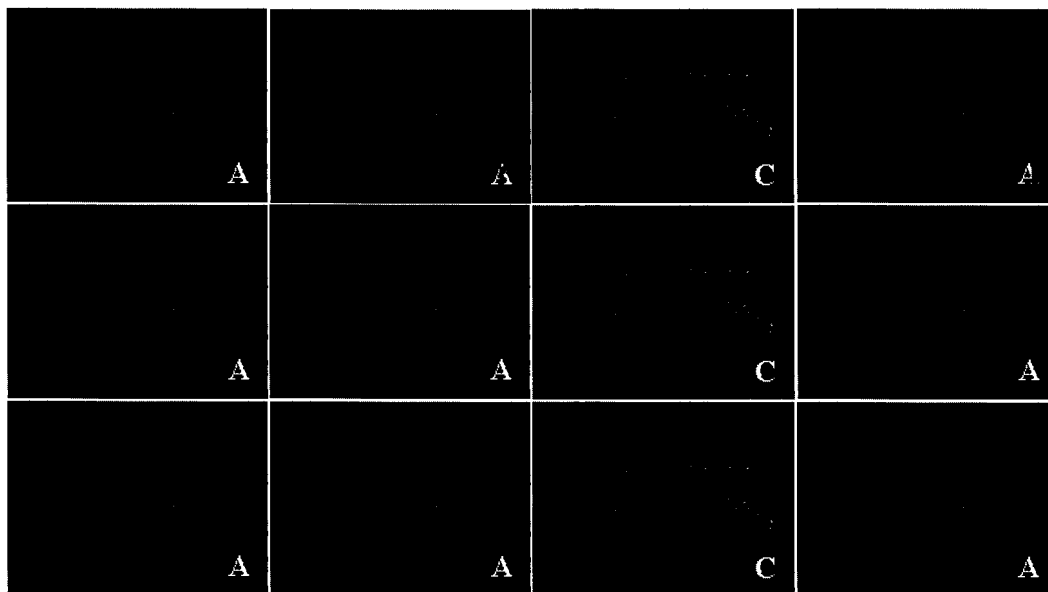


图7

专利名称(译)	高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101423821A</a>	公开(公告)日	2009-05-06
申请号	CN200810173656.8	申请日	2008-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院哈尔滨兽医研究所		
[标]发明人	刘长明 危艳武 张朝霞 袁婧 黄立平		
发明人	刘长明 危艳武 张朝霞 袁婧 黄立平		
IPC分类号	C12N7/00 A61K39/12 A61P31/14 G01N33/53		
代理人(译)	孙皓晨		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一株高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株，其微生物保藏号是CGMCC.2657。本发明从临床“高热综合征”病例分离到高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株，经细胞传代和蚀斑克隆，培育得到增殖性能稳定的新毒株。本发明新毒株Nsp2序列中第483和535~563位氨基酸存在缺失，属PRRSV变异株。该毒株第40代毒种序列的第3116~3127位核苷酸发生突变，添加了12个碱基序列。通过靶动物感染试验及免疫学检测，证实本发明毒株具有高致病性和遗传变异性，该毒株带有遗传标志，体外繁殖能力稳定，对新型疫苗的研制具有重要参考价值，也为今后病毒致病机理、遗传变异、鉴别诊断及分子生物学研究奠定了基础。

