



西北农林科技大学

硕士学位论文

抗 PoRV 和 PEDV 二联卵黄抗体的研制
及初步应用

专业学位类型 兽医硕士

领域名称 兽医

论文作者 郝峰

指导教师 郭抗抗 教授

论文提交时间 2023 年 5 月

Thesis Submitted to Northwest A & F University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Professional Degree of
Master of Veterinary Medicine

Preparation and preliminary application of
anti-PoRV and PEDV dual yolk antibody

Field: Veterinary Medicine

Degree Type: Master of Veterinary Medicine

Candidate: Hao Feng

Supervisor: Prof. Guo Kang-kang

Date of submission: May,2023

Northwest A & F University

分类号：S858.9

UDC：636.09

密 级：公 开

学校代码：10712

研究生学号：2020055488

西北农林科技大学硕士学位论文

抗 PoRV 和 PEDV 二联卵黄抗体的研制 及初步应用

论文作者：郝峰

指导教师：郭抗抗

答辩委员会：

西北农林科技大学动物医学院	王晶钰 教授（主席）
西北农林科技大学动物医学院	赵光辉 教授（委员）
西北农林科技大学食品科学与工程学院	王 新 教授（委员）
西北农林科技大学动物医学院	齐雪峰 教授（委员）
西北农林科技大学动物医学院	邓 文 教授（委员）
西北农林科技大学动物医学院	杨 新 博士（秘书）

答辩日期：2023 年 5 月 23 日

本研究得到陕西省农业专项资金项目（2021-XN18、XNDY2201）
资助。

This work was supported by Agriculture special fund Project of Shaanxi
Province
(No. 2021-XN18、XNDY2201)

摘要

仔猪腹泻是对养猪业危害严重的消化系统疾病，病原微生物引起的传染性仔猪腹泻的暴发造成了大量仔猪死亡或生产性能的下降，严重影响猪场生产成绩和经济效益。猪流行性腹泻（PED）和猪轮状病毒（PoRV）感染造成新生仔猪死亡严重，但又缺少有效的防控和治疗手段，一旦发病将难以控制，短时间大量死亡，发病仔猪的死亡率达到100%。对PED和PoRV感染的防控目前最常用的策略是对怀孕母猪进行产前疫苗免疫，初生仔猪可以从初乳中获得特异性保护抗体，但实际效果并不是很理想，原因是一旦初生仔猪感染猪流行性腹泻病毒（PEDV）或猪轮状病毒（PoRV），将很快造成小肠绒毛的损伤，出现严重的腹泻和脱水，母源抗体并不能完全阻止病毒的感染，使得保护程度有限。对初生仔猪进行疫苗免疫接种也是一种策略，但是仔猪的免疫系统不健全，产生具有保护作用的免疫反应需要较长时间，但由以上病毒感染导致疾病的病程又很短，还没等产生免疫反应，感染仔猪就会发病死亡；另外，目前也没有特效药物进行病毒病的治疗；再者，近年来PEDV和PoRV变异毒株的出现，也使得疫苗免疫效果受到很大影响，疫苗毒株产生的免疫抗体并不能完全抵抗流行毒株（野毒株）的侵害。卵黄抗体（IgY）是通过免疫蛋鸡特定病原所产生的抗体，具有性质稳定、对酸碱有抵抗力的特点。国内外多项研究证实，通过对病原感染猪应用特异性的卵黄抗体，可以大大减少感染猪的发病及疾病的严重程度。特异性的卵黄抗体以其效果明确、制备简单、安全性好等优势越来越在畜禽疫病防治方面受到重视。

基于对当前猪场引起仔猪腹泻主要病毒的检测分析，本研究拟对检测发现的仔猪腹泻病毒进行分离鉴定，分析其遗传变异情况；制备特异性鸡卵黄抗体，进行攻毒保护试验。为仔猪病毒性腹泻病原的流行病学研究提供基础资料，为仔猪腹泻的防控提供新型制剂。本研究获得以下结果：

（1）猪腹泻病毒的检测及分离鉴定

在陕西省4个市的25个猪场中进行主要腹泻病毒的检测，结果发现PEDV检出率最高，阳性率为18.5%（22/119），PoRV阳性率次之，为16.0%（19/119），PEDV与PoRV混合感染阳性率为10.9%（13/119）。TGEV与PDCoV均未检出。将19份检测为PoRV阳性、22份检测为PEDV阳性的粪便处理后分别接种到MA-104、Vero细胞，连续传代培养并观察细胞病变。在当培养至第7代时，接种PoRV阳性病料细胞出现病变，经PCR检测和IFA鉴定，表明分离到1株PoRV，该毒株的TCID₅₀为10^{-6.11}/0.1 mL；未分离到PEDV。

（2）PoRV分离毒株的遗传进化分析

对 PoRV 分离株进行全基因组测序和分析,确定该毒株的 VP6 基因的基因型为 I5,与猪 A 型轮状病毒 NMTL (JF781162.1) 核苷酸同源性最高 (98.03%); VP7 基因的基因型为 G9,与 TM-a (KC113248.1) 毒株同源性最高 (94.69%); VP4 基因的基因型为 P[23],分离毒株为近年来在猪群中的流行毒株。

(3) 卵黄抗体的制备及抗体水平消长规律分析

将 PoRV 和 PEDV 病毒液过滤除菌并进行浓缩后,加入 β -丙内酯(终浓度为 0.1%)灭活。用 PoRV 和 PEDV 病毒混合液制备 PoRV+PEDV 二联灭活免疫原,进行免疫原物理性状检验后用于蛋鸡的免疫。选取 28 只产蛋高峰期蛋鸡,免疫二联灭活免疫原。收集三免后效价较高的鸡蛋,提取卵黄抗体,结果显示提取的卵黄抗体浓度为 13.26 mg/mL。采取固定病毒稀释卵黄抗体的方式测定提取的抗 PoRV 卵黄抗体中和效价为 1:273,抗 PEDV 卵黄抗体中和效价为 1:307。提纯的卵黄抗体在 pH 为 3 的酸性环境中,OD₄₅₀ 值仍然能保持在 0.9 左右,IgY 在 pH 为 10 的碱性环境中,OD₄₅₀ 值为 1.1 左右。结果说明,卵黄抗体在弱酸或者弱碱环境中稳定;建立 ELISA 检测方法对免疫接种蛋鸡血清和卵黄中抗体效价进行测定,分析其消长规律。鸡血清中 PoRV 抗体水平的升高早于卵黄中 PoRV 抗体水平,血清中抗体在免疫后第 42 d 后达到顶峰,抗体水平维持 30 d 后开始下降,与 PoRV 卵黄抗体相比,血清中抗体产生的较早,但是在免疫 63 d 后,测得卵黄中抗体要高于血清中抗体水平。观察 PEDV 血清抗体和卵黄抗体,同样初始血清抗体要高于卵黄抗体水平,免疫 56 d 后 PEDV 卵黄抗体高于血清抗体水平。

(4) 卵黄抗体的仔猪攻毒保护试验

试验分为 3 组,攻毒组在 5 日龄口服 PoRV 和 PEDV 病毒混合液;治疗组在 3 日龄开始每日灌服二联卵黄抗体冻干粉,连续灌服 5 d,5 日龄时口服 PoRV 和 PEDV 病毒混合液;阴性组仔猪正常饲喂。所有试验猪均为未吃初乳仔猪,根据仔猪的存活率、肠道病毒含量和组织病理切片结果评估卵黄抗体的效果。结果显示,卵黄抗体治疗组存活率为 66.7%,攻毒组存活率为 0%;治疗组各段小肠病毒含量均显著小于攻毒组小肠;卵黄抗体治疗组小肠组织病理切片显示有少量绒毛断裂,形态基本正常,而攻毒组则出现小肠黏膜脱落、绒毛断裂等病理变化。试验结果表明,卵黄抗体可以很大程度保护仔猪免受病毒侵害。

综上,在 25 个猪场中检测发现 PEDV 和 PoRV 检出率最高,分别为 18.5%、16.0%,PEDV 和 PoRV 混合感染率为 10.9%。并从阳性粪便中分离到 1 株 PoRV 毒株,进行遗传进化分析,发现分离株为近年来流行毒株。制备得到 PoRV 和 PEDV 二联卵黄抗体,进行仔猪攻毒保护试验,结果发现对人工感染哺乳仔猪具有近 70%的免疫保护效果。

关键词: 猪轮状病毒; 猪流行性腹泻病毒; 病毒分离鉴定; 卵黄抗体; 攻毒保护试验

ABSTRACT

Diarrhea of piglet is the most harmful digestive system disease to pig industry in recent years, causing a large number of piglets death or production performance decline, seriously affecting the production performance and economic benefits of pig farms. Porcine epidemic diarrhea (PED) and porcine rotavirus (PoRV) infection caused serious death of newborn piglets, but the lack of effective prevention and control and treatment means, once the disease will be difficult to control, infected pigs often in a short time after the occurrence of diarrhea a large number of deaths, serious mortality even up to 100%. The most commonly used strategy for the prevention and control of PED and PoRV infection is prenatal vaccination of pregnant sows. Newborn piglets can obtain specific protective antibodies from the colostrum, but the practical effect is not satisfactory. The reason is that once newborn piglets are infected with porcine Epidemic diarrhea virus (PEDV) or porcine rotavirus (PoRV), It will soon cause damage to the villi of the small intestine, and there will be severe diarrhea and dehydration. The maternal antibody cannot prevent the infection of the virus, so the protection degree is limited. Vaccination of newborn piglets is also a strategy, but the piglets' immune system is not sound, and it takes a long time to produce a protective immune response. However, the disease course caused by the above viruses is short, and the infected piglets will become sick and die before the immune response is produced. In addition, there are no specific drugs for the treatment of viral diseases; Moreover, the emergence of PEDV and PoRV mutant strains in recent years has also greatly affected the immunization effect of the vaccine, and the immune antibodies produced by the vaccine strain cannot completely resist the damage of the epidemic strain (wild strain). Egg yolk antibody (IgY) is produced by immunizing specific pathogens of laying hens. It is stable and resistant to acid and base. A number of studies at home and abroad have confirmed that the application of specific yolk antibody to infected pigs can greatly reduce the incidence and severity of infected pigs. Specific egg yolk antibody has been paid more and more attention in the prevention and control of animal disease due to its advantages such as clear effect, simple preparation and good safety. (1) Isolation and identification of porcine rotavirus epidemic strains

Based on the detection and analysis of the main viruses causing diarrhea of piglets in pig farms, this study intends to isolate and identify the detected piglet diarrhea viruses and

analyze their genetic variation. The specific egg yolk antibody was prepared for infection protection test. It provides basic data for the epidemiological study of viral diarrhea of piglets and a new preparation for the prevention and control of diarrhea of piglets. This study obtained the following results:

(1) Detection, isolation and identification of porcine diarrhea virus

Major diarrhea viruses were detected in 25 pig farms in 4 cities of Shaanxi Province, and the positive rate of PEDV was the highest, with a positive rate of 18.5% (22/119), followed by that of PoRV 16.0% (19/119), and the positive rate of PEDV mixed infection with PoRV was 10.9% (13/119). Neither TGEV nor PDCoV was detected. After treatment, 19 fecal samples tested positive for PoRV and 22 feces tested positive for PEDV were inoculated into MA-104 and Vero cells for continuous culture and observation of cytopathosis. When cultured to the 7th generation, PoRV positive disease cells showed pathological changes, PCR detection and IFA identification showed that the isolated strain was PoRV, and the TCID₅₀ of this strain was 10^{-6.11}/0.1 mL. PEDV is not isolated.

(2) Genetic evolution analysis of PoRV isolates

Whole genome sequencing and analysis showed that the VP6 gene of PoRV was I5, which had the highest nucleotide homology with porcine rotavirus A NMTL (JF781162.1) (98.03%). The genotype of VP7 gene was G9, which had the highest homology with TM-a(KC113248.1) (94.69%). The genotype of VP4 gene was P[23], and the isolated strain was widely circulated in humans and pigs in recent years.

(3) Preparation of yolk antibody and analysis of its level

PoRV and PEDV venom were filtered for sterilization and concentrated, then β -propanolactone was added (the final concentration was 0.1%) for inactivation. PoRV+PEDV vaccine was prepared from the mixture of PoRV and PEDV virus, and then used for immunization of laying hens. Twenty-eight laying hens in peak laying period were inoculated with two inactivated vaccines. Eggs with high titer after triple immunity were collected to extract yolk antibody. The results showed that the extracted yolk antibody concentration was 13.26 mg/mL. The neutralizing titer of the extracted anti-PoRV yolk antibody and anti-PEDV yolk antibody was 1:273 and 1:307 respectively by fixing virus diluted yolk antibody. In the acidic environment with pH 3, the OD₄₅₀ value of purified yolk antibody can still be maintained at about 0.9. In the alkaline environment with pH 10, the OD₄₅₀ value of IgY is about 1.1. The test results show that the yolk antibody is relatively stable in the weak acid or weak base environment; The ELISA method was established to determine the antibody titers in serum and yolk of immunized laying hens. The level of

PoRV antibody in serum increased earlier than the level of PoRV antibody in yolk. The level of PoRV antibody in serum peaked on the 42nd day after immunization and began to decline after maintaining 30 days. Compared with PoRV yolk antibody, the production of antibody in serum was earlier, but the level of antibody in yolk was higher than that in serum after immunization 63 days. PEDV serum antibody and yolk antibody were observed. Similarly, the initial serum antibody was higher than the level of yolk antibody, and the PEDV yolk antibody was higher than the serum antibody level after 56 days of immunization.

(4) Challenge protection test of yolk antibody in piglets

The experiment was divided into 3 groups. The challenge group was given PoRV and PEDV virus mixture at 5 days of age. At 3 days of age, the treatment group was given freeze-dried powder with double yolk antibody daily for 5 days, and at 5 days of age, PoRV and PEDV virus mixture was orally administered. The negative group was fed normally. All piglets were not fed colostrum. Survival rate, enterovirus content and histopathological section results were used to evaluate the effect of yolk antibody. The results showed that the survival rate of the yolk antibody treatment group was 66.7% and that of the challenge group was 0%. The virus content of each small intestine in the treatment group was significantly lower than that in the challenge group. The small intestinal histopathologic sections of the yolk antibody treatment group showed a small number of villi breakage, the shape of which was basically normal, while the challenge group showed pathological changes such as small intestinal mucosa shedding and villi breakage. The results showed that the yolk antibody could protect piglets against virus to a great extent.

In conclusion, the detection rates of PEDV and PoRV were the highest among the 25 pig farms, which were 18.5% and 16.0%, respectively, and the mixed infection rate of PEDV and PoRV was 10.9%. One PoRV strain was isolated from positive feces, and the genetic evolution analysis showed that the isolated strain was the prevalent strain in recent years. PoRV and PEDV dual yolk antibodies were prepared, and the challenge protection test of piglets was conducted. The results showed that the immune protection effect of PoRV and PEDV was nearly 70%.

KEY WORDS: Porcine rotavirus; Porcine epidemic diarrhea virus; Virus isolation and identification; Yolk antibody; Challenge protection test

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
文献综述	1
第一章 仔猪病毒性腹泻及卵黄抗体研究进展	1
1.1 猪轮状病毒感染的研究概况	1
1.1.1 猪轮状病毒感染的流行情况	1
1.1.2 猪轮状病毒的基因组结构及功能	2
1.1.3 猪轮状病毒感染的传播、致病和防控	4
1.1.4 猪轮状病毒的分离鉴定	4
1.2 猪流行性腹泻的研究概况	4
1.2.1 猪流行性腹泻的流行情况	4
1.2.2 猪流行性腹泻病毒的基因组结构及功能	5
1.2.3 猪流行性腹泻的传播、致病和防控	5
1.3 卵黄抗体的研究概况	6
1.3.1 卵黄抗体的形成	6
1.3.2 卵黄抗体的结构及生物学特性	6
1.3.3 卵黄抗体的应用	7
1.4 研究目的和意义	7
第二章 仔猪主要腹泻病毒的检测及分离鉴定	8
2.1 材料	8
2.1.1 样品及细胞株来源	8
2.1.2 主要试剂和仪器	8
2.2 方法	9
2.2.1 病料的处理	9
2.2.2 引物序列与合成	10
2.2.3 粪便病料中腹泻病毒的检测	10
2.2.4 腹泻病毒的分离鉴定	11
2.2.5 分离毒株基因分型及序列分析	12
2.3 结果	13

2.3.1 病料中腹泻病毒的检测和分离鉴定	13
2.3.2 猪轮状病毒滴度测定及遗传进化分析	16
2.4 讨论	19
2.4.1 仔猪腹泻病毒的检测	19
2.4.2 仔猪腹泻病毒的分离鉴定	19
2.4.3 PoRV 的遗传进化分析	20
2.5 小结	20
第三章 抗猪轮状病毒和猪流行性腹泻病毒二联卵黄抗体的制备及初步应用	22
3.1 材料	23
3.1.1 材料及动物	23
3.1.2 主要试剂及仪器	23
3.2 方法	24
3.2.1 猪轮状病毒、猪流行性腹泻病毒流行株灭活免疫原的制备及检验	24
3.2.2 制备的灭活免疫原接种蛋鸡	24
3.2.3 卵黄抗体的提取及检验	25
3.2.4 卵黄抗体冻干粉的制备	26
3.2.5 抗 PoRV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立	26
3.2.6 免疫鸡血清和卵黄抗体中 PoRV 和 PEDV 特异性抗体效价检测	27
3.2.7 卵黄抗体基本特性检验	27
3.2.8 卵黄抗体中和效价测定	28
3.2.9 卵黄抗体攻毒保护试验	28
3.3 结果	29
3.3.1 灭活免疫原的制备及检验	29
3.3.2 卵黄抗体的提取与检验	30
3.3.3 抗 PoRV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立	31
3.3.4 卵黄和血清中抗 PoRV、PEDV 抗体消长规律分析	32
3.3.5 卵黄抗体对 PoRV、PEDV 中和效价	33
3.3.6 卵黄抗体的理化性质	34
3.3.7 卵黄抗体攻毒保护试验	35
3.4 讨论	38
3.5 小结	39
结 论	41
参考文献	42

致 谢	48
个人简介	49

文献综述

第一章 仔猪病毒性腹泻及卵黄抗体研究进展

仔猪腹泻是导致仔猪死亡的最主要原因之一，防控难度大。仔猪腹泻病因复杂多样，除饲养管理不当外，导致仔猪腹泻最重要的原因是病原感染，以病毒和细菌最为常见(Stevenson et al. 2013)。其中病毒性腹泻主要病原有猪流行性腹泻病毒（Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV）、猪传染性胃肠炎病毒（Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV）、猪轮状病毒（Porcine rotavirus, PoRV）和猪德尔塔冠状病毒（Porcine delta coronavirus, PDCoV）等(Niederwerder and Hesse 2018)。由于病毒性腹泻传染性强，发病急、病程短，呈现高发病率、高死亡率的特点，对哺乳仔猪的危害更为严重，是当前危害养猪业的重要问题。四种病毒引起的腹泻症状相似，难以区分，具体表现为急性水样腹泻、脱水、呕吐等症状，耐过猪会出现饲料转化率下降，日增重减缓等问题，给养猪业造成重大经济损失，严重制约养猪业的健康发展。近年来国内外频发由 PEDV、PoRV 混合感染仔猪引起严重腹泻的病例(Praharajd et al. 2019)，防治由 PEDV、PoRV 感染仔猪引起的腹泻主要还是依靠疫苗免疫接种，通过免疫母猪产生母源抗体，初生仔猪通过初乳获得抗体保护，但是这并不能完全保护仔猪不受感染。一方面传统疫苗都是通过注射途径接种，不能有效诱导母猪产生良好的黏膜免疫应答，初乳中 sIgA 抗体的分泌不足，无法给初生仔猪提供有效被动免疫保护，另一方面由于病毒不断变异，各基因型之间交叉保护性差(Praharajd et al. 2019)，现有的疫苗保护效果不理想，腹泻病毒感染仔猪会引起小肠严重损伤，感染仔猪死亡率和发病率较高。目前生产中依然没有特效治疗病毒性腹泻的药物，急需开发能够防治仔猪病毒性腹泻的生物制剂。

卵黄抗体（Immunoglobulin of yolk, IgY）是通过给产蛋禽类免疫特定的抗原所产生的抗体，IgY 具有特异性中和体内外抗原的作用，可以保护机体不被病原感染。IgY 具有价格低廉、制备简单等特点在生物领域受到广泛的关注。

1.1 猪轮状病毒感染的研究概况

1.1.1 轮状病毒感染的流行情况

轮状病毒（Rotavirus, RV）是世界上公认的导致婴幼儿以及幼龄动物剧烈腹泻的病原之一(Banerjee et al. 2007)，发病后临床主要表现出呕吐、腹泻以及脱水等症状。1969 年在美国阿拉斯加州牧场犊牛腹泻粪便中首次发现 RV，并证实犊牛腹泻是由 RV 引起

的(Mebus et al. 1969), Bishop 等人在 1973 年发现了感染人类的轮状病毒(Bishop et al. 1973)。随后发现了大量由 RVA 引起的幼畜腹泻情况, 研究发现幼畜发病呈现年龄相关性, 即幼龄动物更加易感(Bridger and Woode 1975)。RVC 于 1980 年首次在仔猪中分离得到(Saif et al. 1980), 后来在猪中也发现了 RVB 毒株(Bridger and Brown 1985), 研究表明除猪以外, 在其他动物如牛、羊、大鼠也可感染 RVB。1982 年我国首次检测到猪轮状病毒, 至此不断有猪场因轮状病毒导致仔猪腹泻的情况被报道出来。王璐等对 2011-2012 年全国部分猪场发生严重腹泻的 531 份猪小肠或粪便样品进行了轮状病毒检测, 发现 PoRV 阳性率为 7.34%(王璐等 2013)。常铁城等对 2014 年全国部分地区的 165 份病料进行了检测, 结果发现轮状病毒个体阳性率为 24.14%(常铁城等 2016)。李丽敏等对河北腹泻仔猪病料进行检测, 结果显示 PoRV 的阳性率为 25.81%(李丽敏等 2016)。世界各地均有轮状病毒报道, 如今已经呈现出全球流行态势, 对生猪养殖行业造成巨大的威胁, 严重影响养猪业的健康发展。

1.1.2 猪轮状病毒的基因组结构及功能

猪轮状病毒 (Porcine rotavirus, PoRV) 属于呼肠孤病毒科 (Reoviridae), 轮状病毒属 (Rotavirus) 的成员, 为双股 RNA 病毒。RV 是没有囊膜结构的类似车轮状的病毒粒子, 呈现 20 面体对称结构, 病毒粒子是由三种蛋白质衣壳组成: 外衣壳、中间衣壳和内衣壳, 粒子直径为 66-75 nm(Stannard and Schoub 1977)。中央是直径约为 40 nm 的致密六角形核心, 是 RV 的核髓芯, 病毒内衣壳围绕粒子髓芯呈放射状分布, 外衣壳包裹着内衣壳, 形成了 RV 特有的车轮状结构(庞昕等 2000)。

轮状病毒基因组全长约为 18.5 kb, 由 11 个独立 RNA 片段组成(Estes and Cohen 1989)。11 个基因片段编码了结构和非结构蛋白, 6 种结构蛋白: VP1~VP4、VP6 和 VP7, 5 种非结构蛋白: NSP1~NSP5, 也有资料表明基因 11 具有两个开放阅读框, 两个非结构蛋白 NSP5 和 NSP6 被基因 11 所编码(Dickman et al. 2000)。病毒粒子的中央核心是由三种结构蛋白 VP1、VP2、VP3 组成的核心髓蛋白; 内衣壳蛋白是由 VP6 蛋白构成; 外衣壳则是由 VP4、VP7 蛋白共同组成(Matthijnsens et al. 2012)。RV 的基因片段 1 编码 VP1 蛋白, 基因全长为 3302 bp, 蛋白质大小为 125 kDa, 由 1088 个氨基酸构成。VP1 在轮状病毒复制过程中起着 RNA 聚合酶的重要作用, VP1 蛋白含量约占病毒总蛋白的 2%(Valenzuela et al. 1991)。基因片段 2 编码 VP2 蛋白, 基因全长为 2687 bp, 蛋白质大小为 94 kDa, 由 880 个氨基酸组成。VP2 蛋白与 RNA 结合进行装配轮状病毒粒子, 参与轮状病毒的复制, 被认为是病毒的群特异性抗原, 起着十分重要的作用。基因片段 3 编码 VP3 蛋白, 全长 2592 bp, 蛋白质大小 88 kDa, 由 835 个氨基酸构成。VP3 蛋白具有鸟苷酸转移酶活性, 与 RNA 结合, 在 mRNA 成熟中起重要作用 (Mitchell and Both)。

VP4 蛋白是由基因片段 4 编码, 基因全长为 2362 bp, 蛋白质大小为 86 kDa, 由 776 个氨基酸组成。VP4 蛋白是非糖基化的胰蛋白酶敏感蛋白, 是病毒粘附蛋白, 且具有血凝性, VP4 蛋白与病毒致病性有关。VP4 蛋白位于病毒粒子表面, 具有 60 个超过 10 nm 的刺突(Sereno and Gorziglia 1994)。VP4 蛋白通过与宿主细胞表面受体特异性结合进入细胞内, 在胰蛋白酶的作用下, VP4 蛋白会裂解为 VP5 和 VP8 两个亚单位蛋白(范秀娟等 2015), VP4 蛋白的裂解通过增强轮状病毒在体外细胞的适应性以及病毒本身的增殖能力来提高 PoRV 感染宿主细胞的能力。VP5 蛋白与病毒粒子进入宿主细胞有关, 而 VP8 蛋白具有 VP4 主要的抗原位点, 与细胞表面受体相互作用, 决定了 VP4 特异性中和反应(Yu et al. 2011)。VP4 蛋白在轮状病毒免疫保护和致病性中发挥着重要作用。

基因片段 7 编码 VP7 蛋白, 基因全长为 1062 bp, 其编码的蛋白质大小为 37 kDa, 由 326 个氨基酸组成。VP7 蛋白是一种重要糖蛋白, 位于细胞外衣壳, 是猪轮状病毒主要的中和抗原表位之一。该蛋白氨基酸序列存在数个高变区域, 在同一基因型中, 高变区表现保守, 不同基因型间差异较大(Ianiro et al. 2015)。VP7 以三聚体形式存在, 是与钙离子结合的主要蛋白, 形成配位复合物, 在轮状病毒的外衣壳稳定性中起着重要作用(Parbhoo et al. 2016)。轮状病毒 VP7 抗原决定簇是构象性的, 所以空间构型较为复杂, 所以给猪轮状病毒疫苗的研发增加了阻碍。

VP6 蛋白是由基因片段 6 编码, 基因全长为 1356 bp, 蛋白质大小为 44 kDa, 由 397 个氨基酸组成。VP6 蛋白是病毒粒子的核心蛋白, 为群抗原, 即同一血清群轮状中任意毒株共同含有的片段, 故常被用作实验室诊断的靶位。VP6 抗原介导黏膜免疫, 具有非常强的免疫原性和抗原性(Tsunemitsu et al. 2005), 是 PoRV 复制酶和转录酶必须的亚基, 在猪轮状病毒复制增殖过程中发挥非常重要的功能。

由猪轮状病毒的第 5 基因片段编码的非结构蛋白为 NSP1, 分子量大小约为 6.5 kDa, 具有影响宿主细胞干扰素因子的表达通路从而达到干扰宿主细胞先天性免疫的功能(Barro and Patton 2005), 是 RV 重要的非结构蛋白之一。NSP2 是由猪轮状病毒的基因片段 8 编码的非结构蛋白, 分子量大小为 35 kDa(Jayaram et al. 2002), 以八聚体形式存在发挥功能, NSP2 参与 PoRV 复制和装配过程, 具有修饰 RNA 的二级结构功能(Taraporewala et al. 1999)。NSP3 是一种分子质量为 34 kDa 的非糖基化蛋白, 研究表明 NSP3 蛋白可能参与 PoRV 的复制与形态转变。NSP4 是由猪轮状病毒的基因片段 10 编码的非结构蛋白, 分子量大小为 28 kDa, 区别于其他蛋白, 不同基因型毒株的 NSP4 一般高度保守, 而不同宿主的毒株生物特性则表现的各不相同。NSP5/NSP6 则是由轮状病毒的基因片段 11 所编码, NSP5 蛋白可能与病毒复制有关, 有研究表明 NSP6 蛋白在病毒复制中与 NSP5 蛋白相互作用(Torres-Vega et al. 2000)。不同非结构蛋白参与病毒的增殖和其他生命活动, 承担着重要的角色。

1.1.3 猪轮状病毒感染的传播、致病和防控

本病的主要传染源为病猪和带毒猪，接触到腹泻猪的呕吐物或粪便等引起幼龄猪的感染，各个年龄段猪只均可感染该病毒，但初生的哺乳仔猪对 PoRV 更加易感，成年猪感染后一般不表现出症状。轮状病毒主要存在于猪小肠上皮细胞中，传播途径为粪-口传播，做好消毒措施和健全管理系统是预防本病的关键措施，近年来有研究称动物也可通过呼吸道感染轮状病毒(Nelsen et al. 2022)。猪轮状病毒感染猪只后潜伏期一般为 1~10 d 不等，初期表现为精神萎靡和腹泻等症状，后期出现急性水样腹泻、呕吐、脱水。轮状病毒主要通过感染成熟的小肠上皮细胞，破坏其结构使得出现生理功能障碍，猪轮状病毒介导的肠上皮细胞损伤主要表现为肠绒毛稀疏、断裂、缩短；小肠固有层单核细胞浸润等病理变化(Estes et al. 2001)。引起损伤的机制主要是因为肠上皮细胞遭到破坏，引起营养物质吸收障碍、肠绒毛缺血导致上皮细胞神经调节释放血管活性物质；RV 的非结构蛋白 NSP4 影响 Ca^{2+} 通道改变上皮屏障的完整性。目前轮状病毒感染尚无特效治疗药物，主要依靠免疫接种疫苗防控轮状病毒感染，例如灭活疫苗、亚单位疫苗和病毒样颗粒疫苗等，在一定程度上缓减了疫情，但是由于轮状病毒极易发生变异，且不同轮状病毒基因型之间交叉保护力较差，使得现有疫苗防护效果不佳，仍然有猪轮状病毒感染发生(Vlasova et al. 2017)。

1.1.4 猪轮状病毒的分离鉴定

目前轮状病毒的分离多使用 MA-104 细胞、Marc-145 细胞等，研究表明 MA-104 是最适宜分离轮状病毒的细胞(Lee et al. 2013)。猪轮状病毒体外培养较为困难，需要借助胰蛋白酶进行轮状病毒的体外分离，在病毒的培养过程中不得添加血清。胰酶可以将 VP4 蛋白裂解为 VP5 和 VP8，VP5 蛋白被认为是影响病毒进入宿主细胞的蛋白，在培养液中添加胰酶可以释放 VP5 蛋白，促进病毒进入细胞复制增殖(Wang et al. 2011)，因此实验室分离轮状病毒时，经常需要添加适当浓度的胰酶来增强病毒感染细胞的能力。

1.2 猪流行性腹泻的研究概况

1.2.1 猪流行性腹泻的流行情况

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是由 PEDV 引起的一种肠道传染病，PEDV 主要感染新生仔猪，成年猪也会感染，但较仔猪症状轻，死亡率低。仔猪感染后，表现为呕吐、食欲不振、水样腹泻、脱水，病死率高达 100%(Lin et al. 2016)。该病最早是在英格兰发现，1976 年逐渐在欧洲部分地区流行，我国首次报道类似 PED 的急性腹泻病是在 1973 年。2010 年，在我国南方许多地区的猪场出现了急性腹泻，导致了大量的仔猪死亡，随后猪流行性腹泻很快蔓延至全国各地(Wang et al. 2010)。根据

流行病学调查发现, 2011年至2014年, 我国共有29个省份报道了PED疫情, PEDV阳性率高达61%~78%(张志等 2014); 2011年至2017年浙江省每年PEDV阳性率平均达50%以上(徐丽华等 2018); 2012年至2016年山东地区每年平均检出率为72%(张月等 2018)。2012年至2018年华南地区5个省份中, PEDV检出率高达45.53%, 猪场阳性率为96.43%(Zhang et al. 2019)。根据NCBI公布的PEDV毒株S基因序列, 目前在全球范围内流行的PEDV主要分为三类, 以CV777为代表的G-I群经典毒株、以S-INDEL为代表的重组毒株、G-II群变异毒株。通过对近年来PEDV毒株遗传进化分析可知, 2010年后, 主要流行毒株已经从G-I群变为以S-INDEL为代表的重组毒株和G-II群变异毒株, 现如今G-II群变异毒株占比高达90%以上, G-II群又可分为G-II a和G-II b, 其中G-II a所占比例逐年增大(Wang et al. 2016)。近年来, PED疫情不断在我国爆发, 成为了困扰我国养殖业的重要传染病之一, 严重阻碍我国养猪业健康发展。

1.2.2 猪流行性腹泻病毒的基因组结构及功能

猪流行性腹泻病毒为冠状病毒属成员, 是单链正义的RNA病毒, 病毒粒子具有包膜, 直径约为95~190 nm。PEDV基因组全长为28 kb, 含有多个开放阅读框, 主要编码纤突蛋白(S)、核衣壳蛋白(N)、小膜蛋白(E)和膜蛋白(M)四种结构蛋白和辅助蛋白ORF3, 以及编码nsp1~nsp16总计16种成熟的非结构蛋白(Li et al. 2016)。PEDV的S蛋白是跨膜糖蛋白, 位于病毒粒子表面, 以三聚体形式存在(Song and Park 2012)。包含多个抗原表位, 具有诱导产生中和抗体、介导病毒吸附和入侵宿主细胞等功能, 是目前PEDV亚单位疫苗以及减毒活疫苗研究的主要靶标蛋白(Tang et al. 2020)。S蛋白的S2亚基相对于S1亚基较为保守(Walls et al. 2017), S1亚基的N端易发生变异, 因此可以根据S蛋白进行PEDV的遗传变异分析, 了解PED的流行情况(Chen et al. 2016)。E蛋白是一种较小的膜内蛋白, 主要存在于内质网中, E蛋白具有调节细胞离子通道功能, 与病毒的组装释放有关, 近年来有研究称, E蛋白还与病毒感染的内质网应激以及细胞凋亡相关(Li et al. 2016)。M蛋白为跨膜糖蛋白, 主要参与激活宿主免疫应答、调节病毒粒子组装(Xu et al. 2015), 由于PEDV M基因与其他冠状病毒M基因相比, 同源性较低, 故可作为检测靶位区别于其他冠状病毒(Ren et al. 2011)。猪流行性腹泻病毒的N蛋白为核衣壳蛋白, N蛋白不光存在于细胞质中, 同时存在于细胞核中, 通过调节宿主细胞的生命周期来影响病毒的复制(Jaru-Ampornpan et al. 2017)。

1.2.3 猪流行性腹泻的传播、致病和防控

仔猪感染PEDV主要是通过接触病猪或带毒猪的腹泻物、呕吐物等, 传播方式为粪-口传播。对5日龄的仔猪通过鼻腔雾化接种PEDV, 也可引起典型的病理变化, 证明PEDV也可经过鼻腔黏膜感染仔猪(Li et al. 2018)。PEDV感染后表现为呕吐、水样腹泻、脱水症状, 仔猪症状较育肥猪更加严重, 致死率高达100%, 育肥猪死亡率不高,

但是会导致生长性能下降(Alvarez et al. 2015)。病毒侵入机体后, 主要感染小肠引起腹泻, 导致小肠肠壁变薄透明、常常伴有积液积气, 小肠段组织中空肠和回肠往往受损严重, 十二指肠的感染程度较轻(Jung et al. 2018)。PEDV 引起仔猪小肠绒毛发生萎缩、断裂, 绒毛比下降, 导致小肠营养吸收障碍引发严重水样腹泻(Kim and Lee 2014)。接种疫苗仍然是预防本病的有效手段之一, 如减毒活疫苗 CV777、G-II型 PEDV 和 TGEV 二联苗等在 PED 防控中发挥了重要作用, 但在生产中弱毒苗或灭活苗无法诱导足够的黏膜免疫应答, 产生的分泌性 sIgA 不足以对抗病原的侵入, 可能会出现免疫失败的情况, 因此需要刺激母猪肠道内的黏膜免疫, 通过“肠道—乳腺—sIgA 轴”获得足够的 sIgA 保护(Ohno 2016)。

1.3 卵黄抗体的研究概况

1.3.1 卵黄抗体的形成

当给予禽类外来抗原刺激时, 法氏囊中的 B 细胞接收到信号, 分化为浆细胞, 分泌出特异性抗体, 主要为血液中的 IgG 抗体, 特异性抗体随着血液流经全身, 在卵巢部位的卵细胞中蓄积为卵黄抗体 (IgY) (Han et al. 2021)。IgY 与哺乳动物中的 IgG 功能相似, 可以与抗原特异性结合, 相比于血清 IgG, IgY 在获得过程中, 以收取鸡蛋的方式代替了采血, 更加符合动物福利原则(Grando et al. 2017)。禽类与哺乳类动物亲缘关系远, 与哺乳动物相比, 禽类产生特异性的抗体效率更高, 少量的抗原刺激就能产生效价较高的抗体, IgY 在生产率方面具有显著优势(李明亮等 2018)。卵黄抗体是存在于禽类蛋黄中的球蛋白, 加之 IgY 不会与哺乳动物中的 Fc 受体结合, 也不会激活补体系统, 不会引起相关免疫反应和介导炎症反应。葡萄球菌蛋白 G 和 A 以及类风湿因子不会与 IgY 发生相互作用(Carlander et al. 2000), 对动物机体无任何毒性作用以及不良反应, 因此卵黄抗体也不存在安全问题(Rahman et al. 2013)。

1.3.2 卵黄抗体的结构及生物学特性

与哺乳动物不同, 鸡体内共有三种免疫球蛋白, 分别是 IgA、IgY、IgM, 其中 IgA 和 IgM 的作用结构与哺乳动物相似, IgY 虽然与 IgG 功能相似, 但是结构却不相同(Warr et al. 1995)。卵黄抗体分子量为 180 kDa, 具有两条重链 (H) 和两条轻链 (L), IgY 的轻链组成与 IgG 相同, 与 IgG 相比, 最大的不同体现在重链上, 重链约 67 kDa, 大于哺乳动物 IgG 重链 (50 kDa) (Carlander et al. 1999)。卵黄抗体等电点为 pH5.7~7.6, 低于哺乳动物 IgG 等电点, 因此具有更强的疏水性(He et al. 2016), 可以在蛋黄中稳定存在。卵黄抗体 IgY 虽然是一种蛋白质分子, 但却对酸、碱、热具备一定的抵抗力(Gassmann et al. 1990)。IgY 在 30~70°C 时, 其活性相对稳定, 如长期保存可在卵黄抗体种加入蔗糖或麦芽糖等进行冻干保存, 这样可以防止 IgY 变性(Rahman et al. 2013)。

1.3.3 卵黄抗体的应用

卵黄抗体由于其结构区别于哺乳动物 IgG，系统发育距离与之较远，IgY 与人类免疫系统的一些成份不发生反应，但与哺乳动物保持高度亲和力，IgY 也因此具有了作为诊断材料的作用，IgY 经常被用于免疫诊断、疾病治疗、免疫治疗等(Rahman et al. 2013)。IgY 作为疾病治疗在生物领域的应用越来越广泛，可以对抗多种病菌的侵害，如 IgY 可以与细菌菌毛结合或与肠道黏膜受体作用，进而抑制了细菌的黏附，避免了机体受到损伤(Sanches et al. 2022)。IgY 可以和病原的抗原表位特异性结合，阻断了病原入侵宿主细胞。Wang 等用抗大肠杆菌 K88 的卵黄抗体处理大肠杆菌 K88，结果发现，当卵黄抗体浓度达到一定程度时，可以显著抑制大肠杆菌的生长，并且可以降低 K88 在肠道中的黏附能力，用卵黄抗体可以防止仔猪感染大肠杆菌 K88(Wang et al. 2019)。由轮状病毒引起的新生犊牛腹泻严重影响养牛业经济效益，Vega 等人通过制备抗牛轮状 IgY 来防治犊牛腹泻，结果发现口服卵黄抗体后，犊牛腹泻症状减轻，病程明显缩短，研究表明口服卵黄抗体可以防止由轮状病毒引起的犊牛腹泻(Vega et al. 2020)。Lee 等人制备得到了抗 PEDV S 蛋白的卵黄抗体，对 4~5 日龄的仔猪进行攻毒试验，然后给予患猪卵黄抗体，结果发现治疗组仔猪在口服病毒后 1~2 天症状较轻，4~5 天后腹泻仔猪逐渐恢复正常，肠道轻微损伤，与对照组形成鲜明对比(Lee et al. 2015)。综上所述，卵黄抗体由于其诸多优点，被广泛应用到动物疾病的治疗和预防中，为疾病的防治提高了新思路新途径。

1.4 研究目的和意义

由 PoRV、PEDV 引起的仔猪病毒性腹泻来势凶猛，严重威胁养猪产业的健康发展，临床中混合感染导致仔猪更加严重的腹泻，防治难度加大。虽然猪腹泻三联等疫苗已经在生产中广泛使用，但由于病毒不断变异，现有疫苗毒株与临床中流行毒株差异较大，交叉保护性差，仍然会出现免疫失败，疫情频发的情况。另外传统疫苗不能有效刺激母猪产生足够的 sIgA，而病毒主要损害肠上皮细胞，sIgA 分泌不足导致疫苗接种防控失败。口服卵黄抗体能直接在肠道中作用于病毒，阻止由 PoRV、PEDV 引起的仔猪病毒性腹泻，而且卵黄抗体还具有制备简单、成本低廉、安全性好的优点，在疾病的防治中应用广泛。

本研究通过分离 PoRV 流行毒株，联合 PEDV 流行毒株制备二联灭活免疫原免疫产蛋鸡，制备得到抗 PoRV 和 PEDV 的二联卵黄抗体，进一步对二联卵黄抗体进行中和病毒的效果评估，进行理化性质研究，并初步应用，验证本试验制备的卵黄抗体的防治效果。

试验研究

第二章 仔猪主要腹泻病毒的检测及分离鉴定

猪病毒性腹泻主要是由猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪轮状病毒 (PoRV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪德尔塔冠状病毒 (PDCoV) 引起, 病毒主要引起猪场中哺乳仔猪发病, 临床症状相似, 难以区分, 表现为腹泻、呕吐、脱水等, 严重者出现死亡, 部分仔猪耐过后也会出现饲料转化率下降、僵猪等问题, 对生猪养殖行业造成巨大的威胁。轮状病毒在全球范围内呈现广泛流行, 主要流行株为 OSU 株, 其基因型为 G5P[7], 我国主要流行株也是该型毒株(杨娟等 2016), 但是近年来越来越多研究证明 G 基因型中 G9、G11、G2, P 基因型中 P[23]、P[13]、P[19] 逐渐呈现流行趋势(Xue et al. 2018)。PEDV 商品疫苗毒株与目前生产中流行株的差异也是导致 PED 防控失败的重要原因, 目前防治腹泻病毒感染主要还是疫苗免疫, 但是由于不同基因型交叉保护性较差, 流行毒株和疫苗毒株存在在差异, 影响了疫苗免疫效果, 急需根据国内流行毒株基因型选择优势毒株进行生物制剂的研发以控制仔猪腹泻病毒感染的感染。

生产中对猪场流行毒株的不了解, 盲目的治疗是导致仔猪病毒性腹泻发生的重要原因, 另外腹泻病毒不断变异也加大了防控难度。为了解生产中引起仔猪病毒性腹泻的病原流行情况, 以及明确当地流行毒株类型, 为仔猪病毒性腹泻防控提供科学依据。本研究将采集陕西不同地区规模化和散养猪场中腹泻仔猪粪便, 通过 PCR 方法进行病原的检测, 对检测为阳性的病料用对应的细胞进行分离鉴定, 研究分离毒株的特性。为腹泻病毒的疫苗研发等提供基础材料。

2.1 材料

2.1.1 样品及细胞株来源

陕西省 25 个规模化/散养猪场的仔猪腹泻粪便及肠道组织共计 119 份; Vero 细胞、MA-104 细胞、PoRV 多克隆抗体由西北农林科技大学兽医公共卫生与畜禽产品安全团队实验室保存。

2.1.2 主要试剂和仪器

主要试剂、耗材和仪器见表 2-1。

表 2-1 主要试剂及仪器

Table 2-1 Main reagents and instrument

名称 Name	公司 Company
DMEM 培养基	美国 HyClone 公司
胎牛血清、胰酶	Zeta 公司
琼脂糖 Agarose	德国 BioFroxx 公司
RNA 提取试剂 RNAiso Plus	宝生物工程（大连）公司
5×qRT Super Mix 逆转录酶	南京诺唯赞生物公司
2×Taq Master Mix	北京康为世纪生物科技有限公司
DNA Marker	宝生物工程（大连）公司
Rabbit Anti-Chicken IgG Secondary Antibody (HRP)	武汉三鹰生物公司
微量移液器	Eppendorf 公司
电子天平	美国 Millipore 公司
梯度 PCR 仪、核酸电泳仪	Bio-Rad 公司
紫外凝胶成像仪	Bio-Rad 公司
高速冷冻台式离心机	Eppendorf 公司
倒置荧光显微镜	Nikon 公司
细胞培养箱	Thermo Fisher Scientific

2.2 方法

2.2.1 病料的采集

病料采自 2021 年~2022 年陕西省 4 个市 25 个规模化/散养猪场，采集临床表现为传染性腹泻的仔猪粪便或肠道组织共计 119 份。用棉签蘸取仔猪腹泻粪便，放入 DMEM 液中，截取仔猪小肠段组织低温运输至实验室检测，具体采样信息见表 2-2。

表 2-2 样品信息

Table 2-2 Information of the sample

采样地点 Sampling site	猪场数量 Number of pig farms	样品数量 Sample quantity
榆林	11	55
延安	7	28
咸阳	4	21
宝鸡	3	15

2.2.2 病料的处理

将腹泻仔猪的粪便加入 10 mL 的无菌 DMEM 溶液稀释混匀，然后将混合液反复冻

融 3 次,取若干个 2 mL EP 管,每管加入适量冻融后的样品,在 4°C 条件下以 12000 r/min 离心 15 min 后,吸取上清液过滤除菌。收集滤液置于-80°C 保存;取适量肠道组织加入液氮研磨,将研磨液分装至无菌管中备用。

2.2.3 引物序列与合成

参考 NCBI 网站公布的 A 群轮状病毒(登录号: JF781162.1) VP6 完整基因序列,利用 Primer5.0 软件进行轮状病毒检测引物设计。用于检测 PEDV、PoRV、TGEV、PDCoV 引物信息见表 2-3。引物由擎科生物西安分公司合成,使用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 2-3 检测引物序列

Table 2-3 Primer sequence of detection

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	长度 Primer length
PoRV-F	AAAGATGCTAGGGACAAAATTG	300 bp
PoRV-R	TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA	
PEDV-F	GCATTTCTACTACCTCGGAA	748 bp
PEDV-R	GCGATCTGAGCATAGCCTGA	
TGEV-F	GCGTCTGATTGTGAGTGATG	238 bp
TGEV-R	AATAGTCCTGCTGGGTAATG	
PDCoV-F	ATTCTGCTTTGGCTGCTC	359 bp
PDCoV-R	TCCTGTGGCGGATTTC	

2.2.4 粪便病料中腹泻病毒的检测

2.2.4.1 病毒核酸提取及逆转录

粪便全基因组 RNA 采用 Trizol 法提取,核酸提取过程须在 4°C 下进行。取 2.2.1 中处理好的 100 μL 病料样品于 2 mL 离心管中,向离心管中加入 1 mL Trizol 裂解液,充分吹打混匀后,室温下静置 10 min;加入 200 μL 氯仿,充分涡旋混匀,室温静置 6 min,12000 r/min 离心 15 min;用移液器吸取离心后上清液 500 μL 于新的 EP 管中,加入等量的经预冷后的异丙醇,轻柔颠倒混匀于-20°C 下静置 10 min,4°C 12000 r/min 离心 10 min;弃掉离心处理后的管内容物;加入 1 mL 无水乙醇溶液洗涤沉淀,4°C 8500 r/min 离心 8 min,重复洗涤一次后弃掉上清将离心管倒置在干净 PE 手套上晾干,用 20 μL 无核酶水溶解提取的 RNA 沉淀。利用 RNA 浓度测定仪器测量 RNA 浓度后,按照逆转录试剂盒说明,配置逆转录反应体系合成 cDNA,反转录体系如表 2-4 所示,反应条件:50°C 15 min,85°C 2 min,反应产物于-20°C 下保存。

表 2-4 反转录体系

Table 2-4 System of reverse transcription

组分 Component	体积 Volume
5×qRT Super Mix	2 μL
RNase free water	6 μL
Total RNA	2 μL (1 μg)

2.2.4.2 腹泻病毒基因目的片段的扩增

以制备的 cDNA 为模板，用 PoRV、PEDV、TGEV、PDCoV 特异性引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系见表 2-5，反应条件：95°C 预变性 5 min，98°C 变性 30 s，退火 30 s（PoRV、PEDV 为 55°C，TGEV、PDCoV 为 58°C），72°C 延伸 30 s，32 次循环，72°C 终延伸 10 min 结束反应。

表 2-5 PCR 反应体系

Table 2-5 System of PCR reaction

组分 Component	体积 Volume
2×Taq Master Mix	10 μL
Forward primer	1 μL
Reverse primer	1 μL
ddH ₂ O	6 μL
cDNA	2 μL

2.2.5 腹泻病毒的分离鉴定

2.2.5.1 Vero 细胞和 MA-104 细胞的复苏

将 Vero 细胞和 MA-104 细胞从冰箱中取出，放入 37.5°C 水中快速解冻，向冻存管中加入 200 μL DMEM 溶液颠倒混匀，以 800 r/min 离心 2 min，弃掉上清后加入一定量的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液，吹打重悬细胞，将细胞转移到 6 cm 细胞培养皿中，补加含 FBS 的 DMEM 培养液 2 mL，吹打混匀，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱静置培养。

2.2.5.2 细胞胰酶耐受试验

取长满单层 Vero 细胞和 MA-104 细胞的 24 孔细胞培养板，用 PBS 液洗涤三次，分别加入终浓度为 12 μg/mL、10 μg/mL、8 μg/mL、6 μg/mL、5 μg/mL、4 μg/mL、3 μg/mL、2 μg/mL、1 μg/mL、0 μg/mL 的胰蛋白酶细胞维持液，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱静置培养，观察细胞最佳胰酶耐受浓度，为后续猪流行性腹泻病毒、轮状病毒的增殖提供最佳条件。

2.2.5.3 病料接种与病毒分离

分别将 6 cm 细胞培养皿中状态良好的 Vero 细胞和 MA-104 细胞用无菌 PBS 洗涤 3 次, 加入 0.25% 的胰酶溶液处理细胞 1.5 min, 弃去胰酶, 加入 3 mL 细胞培养液轻轻吹打混匀, 分别吸取 500 μ L 细胞悬液于 6 孔板中, 补加 1.5 mL 细胞培养液。观察待细胞长至 70% 左右时, 弃掉培养液, 用无菌的 PBS 洗涤 3~4 次, 充分洗掉细胞残留的 FBS, 在处理好的病料中预先加入终浓度为 15 μ g/mL 的胰酶并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5 h。将孵育后的病料样品分别接种到洗涤后的 Vero 细胞和 MA-104 细胞上, 加入适量的空白 DMEM 液使得 Vero 细胞中胰酶终浓度为 5 μ g/mL、MA-104 细胞中胰酶终浓度为 3 μ g/mL。将细胞培养板放入二氧化碳培养箱中 48~72 h, 连续盲传 3 代, 检测细胞上清中 PEDV 和 PoRV 核酸。

2.2.5.4 间接免疫荧光鉴定分离毒株

利用本实验室前期建立的间接免疫荧光检测方法对分离到的病毒进行鉴定。将 MA-104 细胞铺至 24 孔板中, 待细胞长至 70%~80% 时, 接种分离到的 PoRV 病毒液, 设置阴性对照组, 每日观察细胞病变情况, 待细胞出现细胞病变 (CPE) 后, 用无菌的 PBS 溶液洗涤细胞, 重复三次, 弃掉洗涤液, 用 4% 多聚甲醛室温下固定细胞 15 min, PBS 清洗 3 次, 加入穿透液 (1% Triton) 在室温下作用 15 min, 接着用 PBS 洗涤三次, 加入 5% 脱脂奶粉进行封闭 1 h, PBS 清洗 3 次, 加入 1:800 稀释的 PoRV 多克隆抗体, 室温作用 2 h, PBS 洗涤 3 次, 用羊抗兔 IgG (二抗) 室温避光孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次后用 DAPI 染核 8 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 将 24 孔板置于倒置荧光显微镜下观察、拍照。

2.2.5.5 病毒 TCID₅₀ 测定

将病毒液做 10 倍倍比稀释, 共计 10 个稀释度, 依次接种 100 μ L 病毒液到长至单层的 MA-104 细胞上, 每个稀释度重复 8 孔, 同时设立空白对照组。接毒后置于培养箱中孵育 2 h, 弃掉病毒液, 加入含 3 μ L/ml 胰酶的维持培养基继续培养 5~7 d, 每天观察并记录细胞病变, 根据 Reed-munch 法计算分离毒株的 TCID₅₀。

2.2.6 分离毒株基因分型及序列分析

将病毒送至广东美格基因科技有限公司进行全基因组测序分析获得基因序列, 在 NCBI 库中进行 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 下载代表性毒株序列进行同源性分析。利用 MEGA7 软件邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 分析分离毒株的遗传进化情况。

2.3 结果

2.3.1 病料中腹泻病毒的检测和分离鉴定

2.3.1.1 粪便中病毒核酸的检测

(1) 样品病原阳性率

采用 PCR 方法检测仔猪腹泻粪便样品中 PoRV、PEDV、TGEV、PDCoV, PCR 扩增产物电泳结果在约 300 bp 处出现特异性条带 (图 2-1), 条带位置与目的条带大小一致, PCR 扩增产物电泳结果在约 748 bp 处出现特异性条带 (图 2-2), 位置与目的条带大小一致。检测结果共有 22 份 PEDV 阳性仔猪腹泻粪便, PEDV 阳性率为 18.5% (22/119), 共有 19 份 PoRV 阳性仔猪腹泻粪便, PoRV 阳性率为 16.0% (19/119); PEDV 和 PoRV 混合感染数量为 13 份, 阳性率为 10.9% (13/119)。未检测到 TGEV、PDCoV 核酸阳性, 检测结果统计信息见表 2-6。

表 2-6 腹泻病毒的检测结果统计

Table 2-6 Diarrhea virus test results statistics

病原 Virus	阳性数量 Positive numbers	阴性数量 Negative numbers	阳性率 (%) Positive rate (%)
PEDV	22	97	18.5
PoRV	19	100	16
TGEV	0	119	0
PDCoV	0	119	0
PEDV/PoRV	13	106	10.9

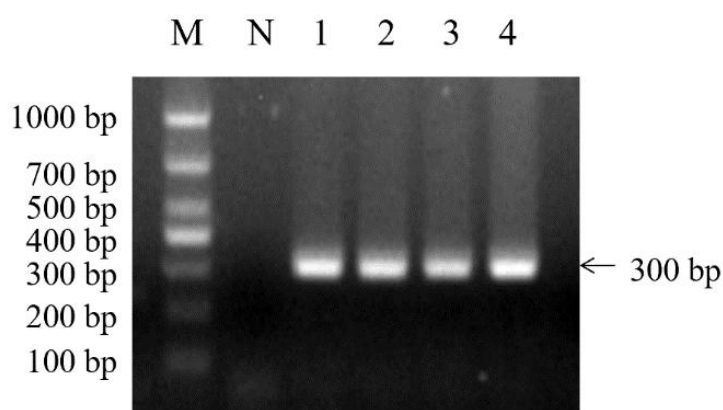


图 2-1 部分病料中 PoRV 核酸检测结果

Fig. 2-1 PoRV nucleic acid test results in some samples

M. DNA 分子量标准 (DL1000); N. 阴性对照; 1~4. 扩增结果

M. DL1000 DNA marker; N. Negative control; 1~4. Results of PCR for virus

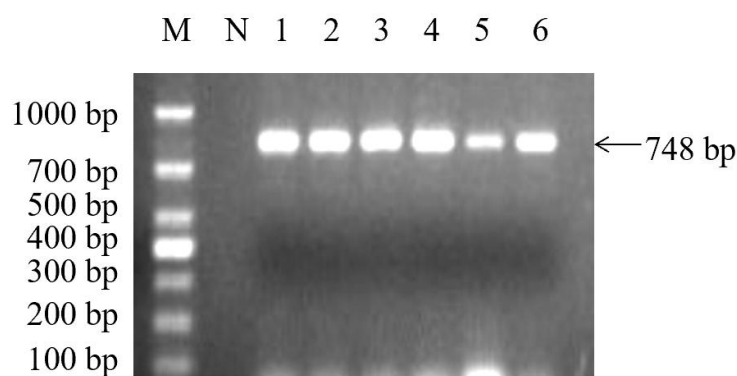


图 2-2 部分病料中 PEDV 核酸检测结果

Fig. 2-2 PEDV nucleic acid test results in some samples

M. DNA 分子量标准 (DL1000); N. 阴性对照; 1~6. 扩增结果

M. DL1000 DNA marker; N. Negative control; 1~6. Results of PCR for virus

(2) 不同地区核酸检测结果

对 2021 年~2022 年从陕西 4 个市的 25 个猪场中采集的发病仔猪粪便或肠道内容物进行 PEDV、PoRV、TGEV、PDCoV 病原核酸检测, 检测发现榆林市猪场 PEDV 阳性率最高, 为 23.6%, 延安市猪场次之, 为 21.4%; 宝鸡市猪场 PoRV 阳性率最高。为 26.6%, 榆林市猪场次之, 为 21.8%。

表 2-7 不同地区病原核酸阳性率

Table 2-7 Positive rate of pathogenic nucleic acid in different regions

地区 Region	检测场数 Detection fields	样品数 Sample numbers	阳性数 (率) Positive number (rate)			
			PEDV	PoRV	TGEV	PDCoV
榆林	11	55	13 (23.6%)	12 (21.8%)	0 (0)	0 (0)
延安	7	28	6 (21.4%)	3 (10.7%)	0 (0)	0 (0)
咸阳	4	21	3 (14.3%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
宝鸡	3	15	0 (0)	4 (26.6%)	0 (0)	0 (0)

2.3.1.2 腹泻病毒的分离

通过向 Vero 细胞和 MA-104 细胞添加终浓度为 12 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、3 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0 $\mu\text{g/mL}$ 的含胰酶维持液, 在细胞培养箱中定时观察细胞生长状况, 如细胞形态出现皱缩、脱落和变圆等变化表明胰酶浓度过大, 结果发现 Vero 细胞在胰酶终浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞生长受到胰酶作用影响较小, 因此后续猪流行性腹泻病毒分离胰酶浓度的选择为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。MA-104 细胞在胰酶终浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞生长受到胰酶作用影响较小, 因此后续猪轮状病毒分离胰酶浓度的选择为 3 $\mu\text{g/mL}$ 。将处理好的病料分别接种到 Vero 细胞、MA-104

细胞，盲传 7 代后，MA-104 细胞出现了明显的皱缩、拉丝、破碎等病理变化（CPE），第 10 代时，细胞病变趋于稳定，细胞病变见图 2-3，Vero 细胞始终未出现细胞病变。

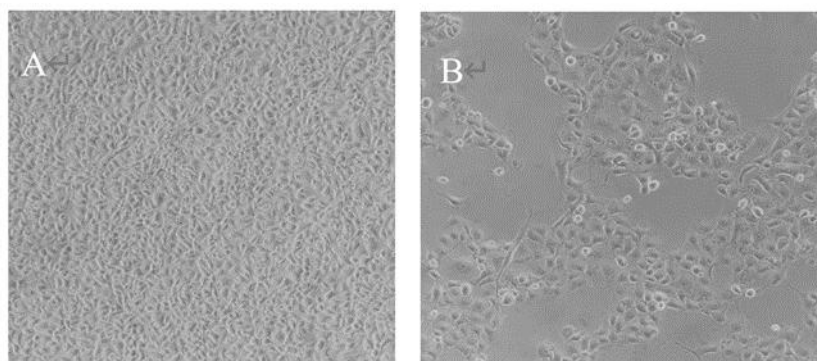


图 2-3 分离株在 MA-104 细胞上的病变情况（100×）

Fig. 2-3 Lesions of isolate on MA-104 cells (100×)

A. 正常 MA-104 细胞；B. 分离株在 MA-104 上病变

A. Normal MA-104 cells control; B. Typical CPE of isolated strains in MA-104 cells

2.3.1.3 细胞培养上清液中核酸的检测

分别提取 Vero 细胞和 MA-104 细胞 P3、P6、P9 代病毒培养液总 RNA，利用 RCR 方法进行检测，合成 cDNA，扩增猪流行性腹泻病毒 N 基因和猪轮状病毒 VP6 基因，MA-104 细胞在 300 bp 位置处均出现目的条带，与目的条带保持一致，在分子水平上提示分离得到 PoRV 毒株，PCR 扩增结果如下图所示（2-4）。Vero 细胞培养上清液未检测到目的条带。

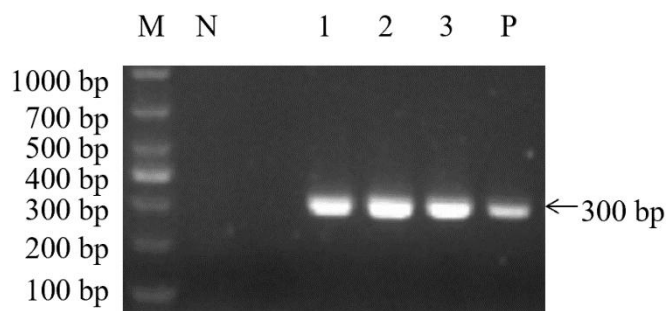


图 2-4 细胞上清中 VP6 基因的 PCR 扩增检测

Fig. 2-4 Detection of VP6 gene by PCR in cell supernatant

M. DNA 分子量标准（DL1000）；N. 阴性对照；P. 粪便病料；1~3. 扩增结果

M. DL1000 DNA marker; N. Negative control; P. Fecal disease material; 1~3. Results of PCR for virus

2.3.1.4 细胞接毒后间接免疫荧光（IFA）结果

用本试验前期建立的间接免疫荧光方法，检测 MA-104 细胞中的 PoRV。结果如图 2-5 所示，在接有 PoRV 的 MA-104 细胞中，可见大量红色的荧光，而对对照组细胞未见

红色荧光信号，提示分离得到 PoRV。将其命名为 SX-2021 PoRV 毒株。

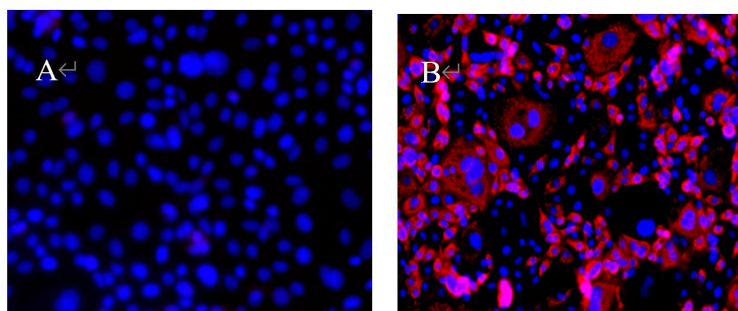


图 2-5 分离毒株间接免疫荧光检测

Fig. 2-5 Detection of isolated strain by IFA

A. MA-104 细胞对照; B. 抗 PoRV 抗体与接毒组 MA-104 细胞作用
A. Control MA-104 cells; B. The results of anti-PoRV antibody on MA-104

2.3.2 猪轮状病毒滴度测定及遗传进化分析

2.3.2.1 猪轮状病毒 TCID₅₀ 的测定

取 P10 代纯化后的病毒液进行 TCID₅₀ 测定。PoRV 感染 MA-104 细胞后连续观察 5~7 天，详细记录每日细胞病变情况（表 2-8）。采取 Reed-Muench 方法进行 PoRV 分离毒株 TCID₅₀ 的计算，最终算出病毒的 TCID₅₀ 为 10^{-6.11}/0.1 mL。

表 2-8 PoRV 分离株 TCID₅₀ 的测定

Table 2-8 Detection of TCID₅₀ of PoRV isolate

病毒稀释度 Dilution	CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计 (Total)		病变孔数占比 (CPE)
			CPE 孔数	无 CPE 孔数	
10 ⁻¹	8	0	45	0	100% (45/45)
10 ⁻²	8	0	37	0	100% (37/37)
10 ⁻³	8	0	29	0	100% (29/29)
10 ⁻⁴	8	0	21	0	100% (21/21)
10 ⁻⁵	6	2	13	2	86.7% (13/15)
10 ⁻⁶	4	4	7	6	53.8% (7/13)
10 ⁻⁷	2	6	3	12	20% (3/15)
10 ⁻⁸	1	7	1	19	5% (1/20)
10 ⁻⁹	0	8	0	27	0% (0/27)

2.3.2.2 猪轮状病毒 VP6、VP4、VP7 遗传进化分析

提取分离毒株的总 RNA，将 RNA 样品随机打断，合成双链 cDNA，将制备的 cDNA 的粘末端修复为平末端，利用 PCR 技术扩增修复 DNA，以此作为上机测序的基因文库，去除低质量的数据提高数据的可信度，对测序得到的数据进行组装后分析，共获得一株猪轮状病毒的全基因组序列信息。根据 RCWG 对轮状病毒的分类方案，VP6 基因、

VP4 基因、VP7 基因的核苷酸序列同源性分别大于 85%、80%、80%判定为同一基因型。

(1) 分离毒株 VP6 基因的遗传进化分析

VP6 蛋白具有群特异性，决定轮状病毒的 I 型，本研究通过全基因组测序方式获得分离得到的毒株 VP6 全长，基因长度为 1356 bp，其中具有蛋白质编码功能长度为 1194 bp，共编码 297 个氨基酸。分离毒株遗传进化系统发育树显示，SX-2021 分离株与猪 A 群轮状病毒 NMTL (JF781162.1) 核苷酸同源性最高，为 98.03%，且从整体观察，该病毒与猪源轮状病毒 I5 型聚为一支（图 2-6），表明分离毒株为 I5 型 A 群轮状病毒。

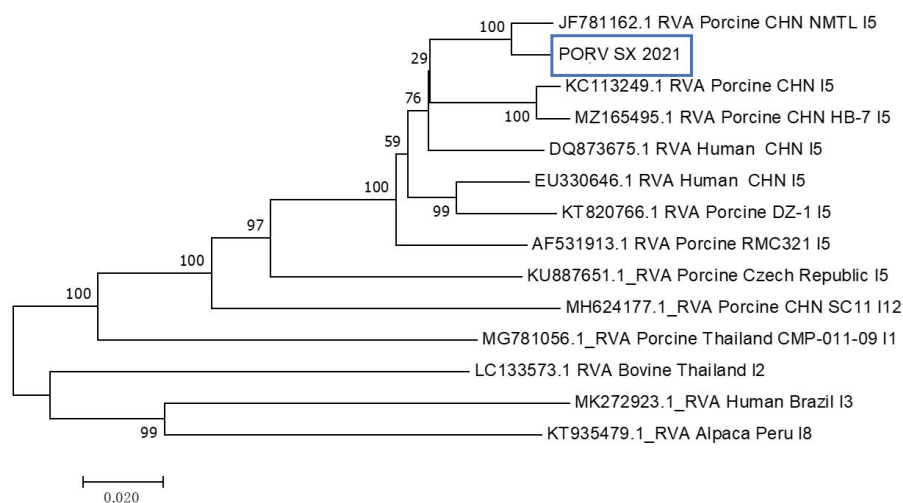


图 2-6 SX-2021 VP6 基因遗传进化分析

Fig. 2-6 Analysis of genetic evolution of SX-2021 VP6

(2) 分离毒株 VP7 基因的遗传进化分析

VP7 蛋白是 RV 的外衣壳蛋白的组成部分，是病毒的主要中和抗原，决定病毒的 G 型。若 VP7 基因同源性大于 80%可认为是同一基因型。本研究通过测序得到了分离毒株的 VP7 全长序列，长度为 1061 bp，编码区长度为 981 bp，共编码 326 个氨基酸。由遗传进化树可知，SX-2021 分离株与 TM-a (KC113248.1) 毒株核苷酸同源性最高为 94.69%。该分离株与 G9 型轮状病毒聚为一支（图 2-7），表明 SX-2021 毒株为 G9 型轮状病毒。

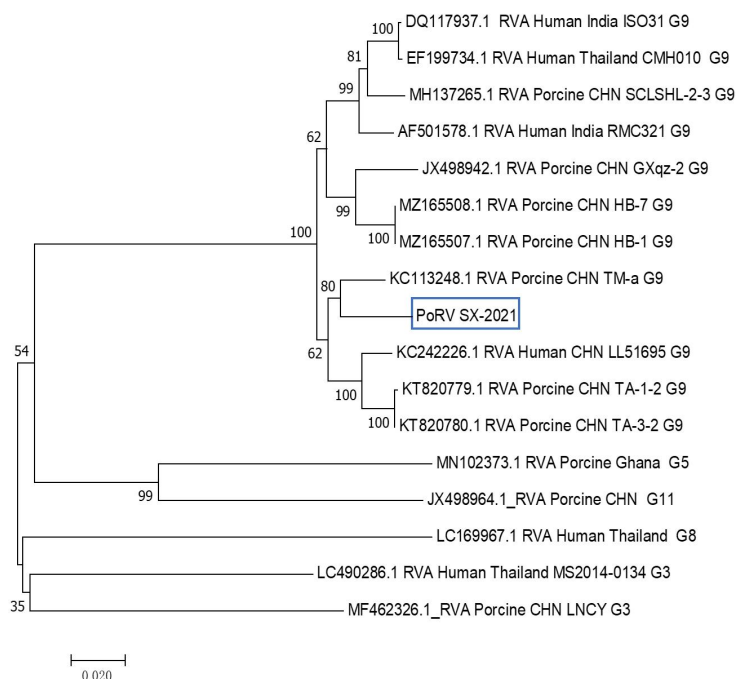


图 2-7 SX-2021 VP7 基因遗传进化分析

Fig. 2-7 Analysis of genetic evolution of SX-2021 VP7

(3) 分离毒株 VP4 基因的遗传进化分析

VP4 是病毒重要的中和抗原，决定病毒的 P 型。若 VP4 基因同源性大于 80% 可认为是同一基因型。本研究通过测序得到了分离毒株的 VP4 全长序列，长度为 2347 bp，编码区长度为 1756 bp，共编码 778 个氨基酸。该分离株与 P[23]型轮状病毒聚为一支（图 2-8），表明 SX-2021 毒株为 P[23]型轮状病毒。

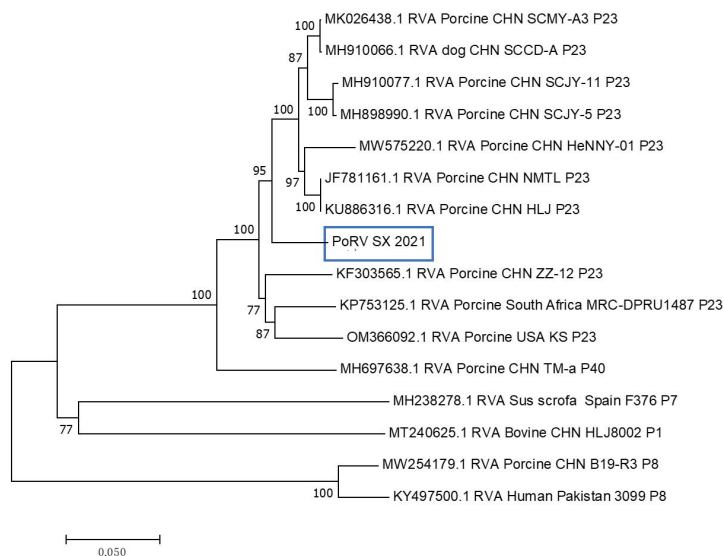


图 2-8 SX-2021 VP4 基因遗传进化分析

Fig. 2-8 Analysis of genetic evolution of SX-2021 VP4

2.4 讨论

2.4.1 仔猪腹泻病毒的检测

由 PEDV、PoRV、TGEV 和 PDCoV 引起的仔猪病毒性腹泻严重影响猪场的经济效益，国内多个地区报道过仔猪病毒性腹泻的情况，曾秀秀等发现江西部分地区 PEDV 阳性率为 13.27%、PDCoV 阳性率为 12.24%(曾秀秀等 2020)；李丽敏等对河北腹泻仔猪病料进行检测发现 PEDV 和 PoRV 的共感染率为 12.9%(李丽敏等 2020)；李媛等检测发现 PEDV、TGEV、PoRV、PDCoV 的阳性率分别为 46.69%、6.77%、14.55%、0.79%，PEDV 和 PoRV 的共感染率为 2.95%(李媛等 2021)。本研究检测陕西范围内 25 个猪场 119 份粪便中，PEDV 阳性率为 18.5%、PoRV 阳性率为 16.0%，PEDV 和 PoRV 共感染率为 10.9%，这与文献报道一致，PEDV 和 PoRV 在我国各个地区广泛流行，并且在我国不同地区均出现了腹泻病毒的混合感染现象，病毒性腹泻疫情频发说明目前仔猪病毒性腹泻的防控措施仍然存在不足，对相关地区猪病毒性腹泻病的监测还需更加重视，积极探索新的综合防控措施势在必行。国内外报道 TGEV 和 PDCoV 检出率低于 PEDV 和 PoRV，本研究中 TGEV 和 PDCoV 未检测出的原因可能是在试验猪场没有该病原的感染，也可能是由于本研究样本量不足、病料中病毒载量低以及样品运输途中核酸降解等原因造成的，后续还应该采取加大采样数量、使用 RNA 保存液等措施进行病原的检测。

2.4.2 仔猪腹泻病毒的分离鉴定

病毒的分离是研究病毒致病机制、研发疫苗等工作的基础，但猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒体外培养较为困难。PEDV 之所以能够感染猪小肠，和小肠中各种酶密不可分，因此胰蛋白酶在 PEDV 体外的分离过程中必不可少，添加胰酶可以使得 S 蛋白发挥其功能作用，增强 PEDV 感染宿主细胞的能力，但是 PEDV 体外分离率依然很低。本研究在 Vero 中添加了适宜的胰酶剂量，但未分离到 PEDV，推测原因可能是 PEDV 难以适应 Vero 细胞，也可能在病料的运输时间过长，病毒已经失活，丧失了感染细胞的能力。

有研究称胰蛋白酶可以将轮状病毒 VP4 蛋白裂解产生 VP5 和 VP8，由于轮状病毒 VP4 蛋白能抑制病毒感染能力，因此对 RV 的体外分离需借助胰酶的作用。Bohl 用 MA-104 细胞成功对轮状病毒分离(Bohl et al. 1984)、范秀娟等利用 Vero 细胞进行了 RV 的体外分离(范秀娟等 2015)。本研究在空白 DMEM 中添加 3 $\mu\text{g/ml}$ 的胰酶促进病毒的分离，盲传至第 7 代时，可见 MA-104 细胞出现拉丝、聚团、破碎等病理变化，成功分离到一株 A 群轮状病毒，在轮状病毒的分离过程中，胰酶的作用十分重要，胰酶负责切割轮状病毒 VP4 蛋白，可以显著提升轮状病毒分离概率。

将分离毒株的 P3、P6、P9 代的细胞培养上清液用 RT-PCR 方法进行检测, 出现了目的条带且阴性对照成立, 说明病毒在 MA-104 细胞上成功复制, 用猪轮状病毒多克隆抗体进行病毒粒子追踪, 结果发现接毒的细胞中出现了大量的红色荧光, 未接毒的细胞未出现荧光, 说明本试验分离的毒株为猪轮状病毒。对毒株的进行病毒滴度的测定, 结果 TCID₅₀ 为 10^{-6.11}/0.1 mL, 说明本次分离的毒株在 MA-104 细胞上适应性良好。轮状病毒的分离为进一步研究猪轮状病毒的生物特性研究以及疫苗等生物制品的研制提供了基础材料。

2.4.3 PoRV 的遗传进化分析

本试验成功获得 SX-2021 株轮状病毒基因组为 G9、P[23]、I5、R1、C1、M1、A8、N1、T1、E1、H1。轮状病毒分型采用双命名规则, 即以 VP7 基因确定病毒的 G 基因型、以 VP4 基因确定病毒的 P 型, 因此本试验中所分离到的毒株为 A 群 G9P[23]型轮状病毒。

在全球范围内, 猪 A 群轮状 G 基因型流行最广泛的是 G5、G3、G4、G9 型等(原霖 2018), 常与 P[5]、P[6]、P[7]、P[23]等形成组合。G9 基因型最早被发现于猪群中(Kim et al. 2012), 不光在猪轮状病毒中流行, 近年来越来越多 G9 型人轮状病毒被检测出, 在亚洲地区, 日本主要流行毒株为 G9P[23]型、G9P[13]型和 G3P[7]型等(Miyazaki et al. 2011), 韩国 G9P[23]型基因组合的流行程度仅次于 G5P[7]、G8P[7], 泰国等地区也报道过 G9 型轮状病毒, 美洲 G9 型毒株检出率较低, 仅为 2.3%(Papp et al. 2013)。在我国时常有猪轮状感染被报道, 中国大陆首次发现 G9 型轮状是 1994 年, 但是检出率并不高, 直至 2015 年 G9P[8]型 RVA 比例从 3.4%到 60.9%显著增强(Yu et al. 2019), 2012 年以来, 我国 RVA 主要的基因型已经转变为 G9P[8]组合型(Liu 2022), 山东地区轮状病毒优势基因型为 G5 和 G9(Xue et al. 2018), 耿超等通过采集湖北省某猪场腹泻仔猪病料, 成功分离到 G9 型轮状病毒(耿超等 2022), 提示 G9 基因型轮状病毒已经变得举足轻重。目前商用的疫苗主要为 G5P[7]基因型, 已经不能满足生产需求, 因此分离得到的 PoRV 毒株可能为今后疫苗的研发提供基础材料, 而且本研究分离得到的 G9 型轮状病毒丰富了轮状病毒的基因组信息, 为轮状病毒的防控提供理论基础, 具有重要的临床意义。

2.5 小结

- (1) 本研究调查发现陕西部分地区仔猪病毒性腹泻主要病原为 PEDV 和 PoRV, 阳性率分别为 18.5%、16.0%, PEDV/PoRV 混合感染率为 10.9%。
- (2) 从仔猪腹泻粪便中分离得到 1 株猪轮状病毒, 分离毒株在 MA-104 细胞中 TCID₅₀ 为 10^{-6.11}/0.1 mL。
- (3) 经过对分离毒株进行基因型分析, 确定该毒株的 VP6 基因的基因型为 I5、

VP7 基因的基因型为 G9、VP4 基因的基因型为 P[23]，为近年来在猪中广泛流行的毒株类型。

第三章 抗猪轮状病毒和猪流行性腹泻病毒二联卵黄抗体的制备及初步应用

由猪轮状病毒和猪流行性腹泻病毒引起的病毒性腹泻是导致初生仔猪严重腹泻甚至死亡的重要病因之一，进行防控时，尚无特效治疗药物及效果确实的生物产品。目前临床主要依靠疫苗预防本病的发生，免疫猪后会对同基因型的轮状病毒产生较强的保护，但是对不同基因型的轮状病毒交叉保护性差。目前市售疫苗已经不能满足流国内国外新的型基因型病毒。猪流行性腹泻的防控主要依靠肌肉注射疫苗，由于 PEDV 主要存在与猪小肠上皮细胞中，肌肉注射产生的黏膜免疫应答不足以应对病毒的感染，导致 PED 的防控失败。由于临床中猪轮状病毒和猪流行性腹泻病毒感染率高，且混合感染情况比较严重，急需开发针对 PoRV 和 PEDV 的生物制剂。

在生产实践中多克隆抗体已经广泛应用到动物的被动免疫中，针对特定的病原分子进行暂时性的保护，特别是在养殖业中。当给予禽类细菌或病毒感染后，会产生针对这类细菌或者病毒的特异性抗体，这种多克隆抗体生产方式前景已经显现出来。用肠道病毒感染产蛋禽类为通过消化道感染的粪-口传播提供了新的被动免疫策略(Lee et al. 2021)。研究中发现 IgY 不光具有较强的亲和力，同时也有高度的靶特异性，在应对呼吸道和消化道中病毒感染表现突出。由于 IgY 在机体内不激活抗体介导的免疫反应，不依赖机体产生免疫应答以对抗病原微生物，从而可以保护免疫功能低下的机体不受侵害。卵黄抗体由于工艺简单、成本低廉、安全有效、产量大等优势，已经在生物学多个领域得到了广泛应用。

有研究人员针对猪流行性腹泻病毒 S 蛋白制备了特异性卵黄抗体，对 4-5 日龄的仔猪进行 PEDV 攻毒试验，仔猪感染 PEDV 后，用抗 PEDV 卵黄抗体进行口服治疗，治疗组仔猪在 4~5 天后，逐渐痊愈，剖检可见肠道组织轻微损伤，攻毒组则出现重度腹泻，肠道绒毛受损严重(Redwan et al. 2021)。丁雨善用抗 PEDV 卵黄抗体进行仔猪感染 PEDV 预防试验，结果显示，预防组仔猪死亡率为 20%，阳性攻毒对照组死亡率为 100%，预防组小肠绒毛受损轻微(丁雨善 2020)。所以本研究针对 G9P[23]型 PoRV 分离毒株和 PEDV 流行株制备二联卵黄抗体，对初生仔猪进行攻毒试验，应用卵黄抗体进行防治试验。为多联卵黄抗体的研发提供数据支撑及为临床生产中由 PoRV 和 PEDV 引起的仔猪病毒性腹泻提供预防和治疗的生物产品。

3.1 材料

3.1.1 材料及动物

MA-104 细胞、Vero 细胞、G-II 亚型的 PEDV, TCID₅₀ 为 $1 \times 10^{-6.2}/0.1$ mL (本实验室分离保存)、28 只产蛋高峰期蛋鸡 (陕西省兴平市某鸡场)。

3.1.2 主要试剂及仪器

主要的仪器以及试剂耗材如表 3-1 所示。

表 3-1 主要试剂及仪器
Table 3-1 Main reagents and instrument

名称 Name	公司 Company
Glycine、Tris	德国 BioFroxx 公司
考马斯亮蓝染色液	上海麦克林生化科技有限公司
脱脂奶粉	Sigma 公司
硫酸铵	天津致远化学试剂有限公司
TMB 显色液	北京索莱宝科技公司
6×Protein Loading Buffer	北京全式金生物科技有限公司
辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY (H+L)	博奥龙公司
β-丙内酯	源叶生物科技有限公司
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	西安晶彩生物科技有限公司
弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂	Sigma 公司
梯度 PCR 仪	Bio-Rad 公司
电子天平	美国 Millipore 公司
高速冷冻台式离心机	Eppendorf 公司
细胞培养箱	Thermo Fisher Scientific 公司
超纯水仪	美国密理博公司
紫外凝胶成像仪	Bio-Rad 公司
酶标仪	Thermo Fisher Scientific 公司
恒温培养箱	碧云天生物公司
高速离心机	日本 HITACHI 公司
蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司
倒置荧光显微镜	Nikon 公司

3.2 方法

3.2.1 猪轮状病毒、猪流行性腹泻病毒流行株灭活免疫原的制备及检验

3.2.1.1 病毒的灭活及浓缩

将 PoRV 分离株感染 MA-104 细胞出现明显细胞病变后,在超低温冰箱中反复冻融 3 次,在 4°C 条件下,12000 r/min 离心 10 min,弃掉沉淀部分,将上清液经 0.22 μm 的滤器过滤后加入终浓度为 0.1% 的 β-丙内酯进行病毒的灭活,灭活条件为 4°C,24 h,使 PoRV 完全失去感染能力。同样步骤大量制备灭活的 PEDV 病毒液。分别取处理好的病毒液装入透析袋中,密封透析袋口,在透析袋周围放置 PEG-6000,病毒液中的水分子会通过空隙被透析袋外的 PEG-6000 吸收,导致透析袋里液体体积减少,达到浓缩病毒液的目的,待体积减少至原来的一半时,停止透析,保存备用。

3.2.1.2 灭活免疫原的制备

PoRV 和 PEDV 二联灭活免疫原:将浓缩为原来体积一半的 PoRV 和 PEDV 灭活病毒液等体积混合,分别与弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂按 1:1 混合 (V:V),在 4°C 下,置于乳化机中充分乳化,4°C 保存备用。

3.2.1.3 灭活免疫原的检验

(1) 黏度检验:在室温下,用移液器吸取 0.4 mL 制备的灭活免疫原,使其自然垂直流出,记录免疫原滴落所需时间,大于 2~6 s 为黏度合格,同时自然流出时间不能超过 10~15 s。

(2) 稳定性检查:在离心管中加入 1 mL 灭活免疫原,3000 r/min 离心 15 min,检查制备的免疫原有无分层现象,如免疫原无分层且水相析出小于 50 μL,则认为该免疫原合格。

(3) 无菌检验:无菌吸取 0.1 mL 的灭活免疫原接种到 5 mL 的 LB 液体培养基、吸取适量的免疫原接种到 TSB 平板后,置于恒温培养箱 24 h,观察培养基是否浑浊现象,是否存在细菌或其他污染物生长。

(4) 剂型检查:在室温清水中滴加一滴乳化好的免疫原,观察有无油相扩散,如免疫原无扩散则视为合格。

3.2.2 制备的灭活免疫原接种蛋鸡

28 只正值产蛋高峰期的蛋鸡均自由采食和饮水。对每只蛋鸡免疫猪轮状病毒和猪流行性腹泻病毒二联灭活免疫原。将制备的灭活免疫原分 4 次免疫蛋鸡,免疫间隔时间均为 14 d,试验组首次免疫弗氏完全佐剂免疫原,诱导产生高滴度的抗体,2 免到 4 免均采用弗氏不完全佐剂进行免疫,其中 2 免和 3 免为加强免疫,4 免为强化免疫。注

射部位为胸肌，采取多点注射方式，每只蛋鸡每次注射灭活免疫原 1 mL。自免疫后每隔 7 d 收集一次试验组鸡蛋，4°C 保存，并且随机进行蛋鸡翅下静脉采血，收集血清进行血清抗体效价的测定。

3.2.3 卵黄抗体的提取及检验

3.2.3.1 卵黄抗体的提取

根据本实验室前期研究结果，采用 PEG-6000 法对采集的鸡蛋进行卵黄抗体的提取。将采集的鸡蛋用新洁而灭消毒液进行浸泡消毒，并用酒精棉球擦拭仔细擦拭表面，小心敲破蛋壳气室，分离卵黄。在卵黄液中加入 2 倍体积的超纯水，充分搅拌混匀，置于 4°C 静置 12 h 后，提取分层后的上清液，加入 PEG-6000 粉末至蛋黄上清液终浓度为 3.5%，室温静置 1 h，在 4°C 条件下 9500 r/min 离心 20 min，弃掉黄色半固体脂肪层，将上清液经过滤纸粗过滤后转移至新的离心管中，添加上清液总体积的 8.5% 的 PEG-6000 粉末，室温静置 30 min，低温 9500 r/min 离心 20 min，将上清液弃掉，此时卵黄抗体沉淀在管底，用适量的 PBS 将沉淀溶解，向 PBS 中加入终浓度为 12% 的聚乙二醇 6000 粉末，室温静置，弃掉上清液，最后加入与初始卵黄抗体液体积相等的 PBS 溶解离心后的沉淀。将提取的卵黄抗体液装入透析袋中，放入装有 PBS 缓冲液的烧杯中，不断搅拌过夜透析，透析完成后的 IgY 于 4°C 保存。

3.2.3.2 卵黄抗体的检验

(1) 卵黄抗体蛋白浓度的测定

测定制备得到的两种卵黄抗体蛋白浓度，试验采用 BCA 试剂盒进行蛋白的测定，按照试剂盒说明操作。将蛋白标准品 (BSA) 按照使用说明进行稀释，取 7 个 EP 管，将稀释好的 BSA 用 PBS 分别稀释为 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 (mg/mL) 7 个不同浓度，每个稀释度所需体积为 20 μ L。将制备的卵黄抗体用 PBS 稀释 10 倍。将上述稀释好的 BSA、卵黄抗体加到 96 孔板中，每孔 20 μ L，所有试验孔作 2 个重复。向每孔中加入 200 μ L BCA 工作液，置于 37°C 恒温箱中作用 30 min，用酶标仪测定 OD₅₆₂ 数值，根据测定读数绘制蛋白浓度标准曲线，代入曲线计算卵黄抗体蛋白浓度。

(2) 卵黄抗体纯度检验

卵黄抗体具有两条链，轻链大小约 20~30 kDa，重链大小约 60~70 kDa。对提取的卵黄抗体进行蛋白纯度检验，采用 SDS-PAGE 电泳，观察条带数目情况判定抗体的纯度。抗体检验步骤如下：

①蛋白制样：在 EP 管中加入 50 μ L 提纯的卵黄抗体液，向管中加入 10 μ L 的 6 \times 蛋白上样缓冲液，涡旋震荡混匀后，在沸水中煮 10 min，冷却后准备上样电泳。

②分离胶和浓缩胶的配置：装配好试验所需的胶槽，在烧杯中，依次将配置分离胶所需的组分加入并混合均匀，快速用移液器将配置好的分离胶液体吸入胶槽，加至

刻度线处后补加异丙醇以消除配置分离胶时所产生的气泡，待自然凝固 40~50 min 后，倒出异丙醇，用滤纸吸干残留的异丙醇。在另外一个烧杯中按照浓缩胶的组分依次加入并混匀，迅速加入胶槽内，插入梳子，室温静置 30 min，待浓缩胶凝固后拔出梳子。配置分离胶和浓缩胶所需的方法如表 3-2 所示。

表 3-2 分离胶和浓缩胶配制
Table 3-2 Preparation of separating gel and concentrated gel

组分 Component	10%分离胶 10% separation glue	5%浓缩胶 5% concentrated glue
10%SDS	0.1 mL	0.04 mL
10%过硫酸铵	0.1 mL	0.04 mL
TEMED	0.004 mL	0.004 mL
去离子水	4 mL	2.7 mL
1.5M Tris-HCl, pH8.8	2.5 mL	0
30%Acr-Bis	3.3 mL	0.67 mL
1M Tris- HCl, pH6.8	0	0.5 mL

③上样电泳：将②中配置好的蛋白胶放入蛋白电泳槽中，倒入 1×SDS-PAGE 电泳液。在胶孔中加入处理好的蛋白样品 20 μ L，另外向胶孔中加入 5 μ L 蛋白标准作为蛋白大小参照。70 V 电泳 35 min、110 V 电泳 60 min，待指示剂到胶底部，结束电泳。

④考马斯亮蓝染色：电泳结束后取出蛋白胶，切去顶部多余的胶块，用超纯水轻柔冲洗后，浸泡在考马斯亮蓝染液中，放置摇床缓慢染色 2~3 h。染色结束后，将蛋白胶放入去离子水中脱色，每隔 30 min 进行去离子水的更换，洗脱至有清晰的条带出现，在 Bio-Rad 成像仪拍照。

3.2.4 卵黄抗体冻干粉的制备

将收集的高免鸡蛋清洗后，用新洁尔灭浸泡消毒 15 min，将蛋清与蛋黄完全分离，并用滤纸对蛋黄表面的残留的蛋清进行清除。在蛋黄液中加入适量的去离子水充分搅拌，加入终浓度为 5%的蔗糖作为保护剂。置于超低温冰箱预冻处理，将预冻好的样品装入干燥架，并放入冷阱中，罩上有机玻璃罩，检查密封性后，调节真空度为 20 kPa，待样品干燥后，慢慢旋开充气阀门，取下玻璃罩，结束干燥。将制备得到的冻干粉与 4°C 保存，也可于 -80°C 长期保存。

3.2.5 抗 PoRV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

3.2.5.1 包被抗原的浓度和一抗稀释

(1) 抗原包被：用 MA-104 细胞大量增殖 PoRV，收毒后反复冻融 3 次，4°C 12000 r/min 离心 15 min，在上清液中加入终浓度为 0.1%的 β -丙内酯进行病毒的灭活。在超高速离心机中离心 4 h，轻柔倒掉上清液，用适量的 PBS 重悬沉淀备用。将浓缩后的 PoRV

作为 ELISA 板的包被抗原，用碳酸盐缓冲液将浓缩的病毒依次作 1:30, 1:60, 1:120, 1:240, 1:480 稀释，每孔 100 μL ，每个稀释度作 8 个重复，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜包被。

(2) 封闭：待抗原包被后，取出 96 孔板，弃掉包被液，每孔加入 PBST 350 μL 洗涤，洗脱三次后，拍干 ELISA 板内液体。配置 5% 的脱脂奶粉作为封闭液，每孔加入 300 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 1 h。

(3) 一抗：ELISA 板封闭好后，用 PBST 洗脱液洗涤三次，用力拍干包被板。将提纯后的卵黄抗体用 PBST 分别按照 1:60, 1:120, 1:240, 1:480 比例稀释，每孔 100 μL 分别加入到对应的孔中，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

(4) 酶标抗体：孵育后的 ELISA 板取出，倒掉一抗液体，用 350 μL 的 PBST 洗涤三次。用 PBST 稀释 HRP 标记的兔抗鸡酶标抗体，稀释比例为 1:2000，所有孔中加入稀释后的酶标抗体，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

(5) 显色：取出 ELISA 板，用 PBST 洗涤三次，加入 100 μL 的显色液，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 20 min。

(6) 终止反应：避光显色完成后，每孔中加入 50 μL 的终止液，结束反应，在酶标仪 450 nm 测定吸光度。

判定条件：阴性孔 (N) OD_{450} 读数须小于 0.2，阳性孔 OD_{450} (P) 读数接近 1，P/N 数值最大时为抗原包被浓度及抗体稀释比例，以此确定 ELISA 的最佳包板条件。

3.2.5.2 酶标抗体最佳工作浓度的确定

确定最佳的抗原包被浓度以及抗体稀释比例后，将酶标抗体作 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 比例稀释，每组三个重复，试验方法同 3.2.5.1，计算 P/N 值，当 P/N 最大时所对应的稀释比例为酶标抗体的最佳工作浓度。

3.2.5.3 ELISA 方法卵黄抗体特异性检测

分别将猪圆环病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪瘟病毒和猪轮状病毒按照 1:120 比例稀释，将稀释液包被 ELISA 板，本试验中制备提纯的 PoRV 阳性卵黄抗体，进行 1:120 比例稀释，与 ELISA 板中抗原进行孵育结合，每孔中加入 100 μL 卵黄抗体液进行反应，以此来检验制备得到的 PoRV 卵黄抗体是否可以与其他病原进行非特异性结合。

3.2.6 免疫鸡血清和卵黄抗体中 PoRV 和 PEDV 特异性抗体效价检测

PoRV 抗体效价：将每隔 7 d 采集的鸡血清和卵黄抗体，用建立好的 ELISA 方法进行 OD_{450} 的测定，明确免疫轮状病毒后鸡血清和鸡蛋中抗 PoRV 抗体的消长规律。

PEDV 抗体效价：将每隔 7 d 采集的鸡血清和卵黄抗体，用本实验室前期建立的 PEDV 抗体 ELISA 检测方法进行测定。

3.2.7 卵黄抗体基本特性检验

3.2.7.1 胃蛋白酶对卵黄抗体效价的影响

将提纯的卵黄抗体与等体积的胃蛋白酶溶液混合,于 37°C 恒温培养箱中作用 0.5 h、1 h 和 1.5 h, 设置对照组。卵黄抗体于胃蛋白酶作用结束后,用本试验建立的 ELISA 方法测定抗 PoRV 卵黄抗体的吸光度值。

3.2.7.2 pH 对卵黄抗体效价的影响

将 3 份提纯的卵黄抗体分别置于 2.0、3.0、4.0、6.0、7.0、9.0、11.0 不同 pH 值的液体中,37°C 恒温培养箱中作用 1 h, 试验结束后将 pH 调至 7, 用本试验建立的 ELISA 方法测定抗 PoRV 卵黄抗体的吸光度值。

3.2.7.3 温度对卵黄抗体效价的影响

将提纯的卵黄抗体分别置于 37°C、46°C、56°C、65°C 4 个不同温度环境中, 放置时间为 60 min, 对照组卵黄抗体在 4°C 保存。用本试验建立的 ELISA 方法测定抗 PoRV 卵黄抗体的吸光度值。

3.2.8 卵黄抗体中和效价测定

根据 ELISA 测定结果,用提纯后效价较高的抗 PoRV 卵黄抗体,经 0.22 μm 滤器过滤后备用。中和效价的测定采取固定病毒稀释抗体的方式,在 9 个无菌离心管中分别加入 500 μL 灭菌的 PBS 液,在第一个离心管中加入 PBS 等量的卵黄抗体液充分混匀,然后倍比稀释至最后一管。将稀释为 200 TCID₅₀ 的病毒液与等量稀释好的卵黄抗体液混合均匀,置于 37°C 培养箱孵育 1 h, 设置病毒阳性对照组、IgY 阴性对照组、空白细胞对照组。将 MA-104 细胞在 96 孔板中培养,长至单层后用无菌 PBS 清洗 3 次,加入 100 mL 卵黄抗体和病毒混合溶液,每个稀释度作 8 个重复,同时对照组各加 8 孔,置于二氧化碳培养箱细胞培养箱中,每天观察记录细胞病变孔数,持续观察 5~7 d, 利用 Reed-Muench 公式计算卵黄抗体的 PD₅₀。抗 PEDV IgY 的中和效价测定方法同上。

$$\text{距离比例} = (\text{高于 } 50\% \text{ 保护率} - 50\%) / (\text{高于 } 50\% \text{ 保护率} - \text{低于 } 50\% \text{ 保护率})$$
$$\text{IgPD}_{50} = \text{距离比例} \times \text{稀释度对数之间的差} + \text{高于 } 50\% \text{ 保护率的稀释度对数。}$$

3.2.9 卵黄抗体攻毒保护试验

3.2.9.1 仔猪饲养

选取 9 只未吃初乳的初生仔猪,经过检测为无 PoRV 和 PEDV 感染,采用人工饲喂不含添加剂的乳粉。仔猪分为三组,每组三只,包括阴性对照组、PoRV+PEDV 攻毒组、卵黄抗体治疗组,三组仔猪分别饲喂到不同的房间。

3.2.9.2 仔猪攻毒及灌服卵黄抗体

第一组仔猪为阴性对照组,正常饲喂;第二组仔猪为 PoRV+PEDV 攻毒组,第 5 d 时对攻毒组口服本研究中分离得到的 G9P[23]型 PoRV 和本实验室保存的 G-II 亚型 PEDV 病毒液;第三组仔猪为二联卵黄抗体治疗组,根据抗体体外中和效价结果进行估算,从第 3 d 开始将二联卵黄抗体粉 2 g 溶解到乳粉中灌服卵黄抗体治疗组仔猪,3

次/日,连续灌服 5 d。第 5 d 时对卵黄抗体治疗组口服病毒液。攻毒剂量如表 3-3 所示,混合到乳粉中灌服。观察仔猪生长状况、精神状态及腹泻情况。

表 3-3 攻毒程序

Table 3-3 Challenge procedure

分组 Group	仔猪日龄 Piglets age	仔猪数量 Number of piglets	攻毒剂量 Challenge dose
对照组	5	3	2 mL DMEM
PoRV+PEDV 攻毒组	5	3	1 mL 10^6 TCID ₅₀ /mL PoRV 病毒液+ 1 mL 10^6 TCID ₅₀ /mL PEDV 病毒液
卵黄抗体治疗组	5	3	1 mL 10^6 TCID ₅₀ /mL PoRV 病毒液+ 1 mL 10^6 TCID ₅₀ /mL PEDV 病毒液

3.2.9.3 肠道病毒含量测定

攻毒后 5 d,将所有仔猪剖检后,采集十二指肠、空肠、回肠,分别取适量截取的肠段小心放入组织固定液中保存。另取一部分肠段用于组织病毒含量的测定,分别取 0.1 g 不同的肠段加入液氮研磨后,参照 2.2.3 中 RNA 提取步骤进行核酸提取,对提取的 RNA 反转录制备 cDNA,对各个肠段 cDNA 利用荧光定量 PCR 方法进行病毒载量的测定。荧光定量引物如表 3-4 所示,反应条件为 95°C 预变性 5 min,95°C 变性 30 s,50°C 退火 30 s,72°C 延伸 30 s。试验结果用单因素方差方法进行分析。

表 3-4 定量引物序列

Table 3-4 Primer sequence of qRT gene

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
qRT PoRV-F	CTTTCAGACAGGAGGGA
qRT PoRV-R	TTCAGATTGCGGAGC
qRT PEDV-F	ATGACCGTGGTGAATGACATC
qRT PEDV-R	GAAGCAAGCTGCTACGCTATT

3.2.9.4 肠道组织病理切片

将 3.2.9.3 中固定好的不同试验组的不同肠段按照常规组织学方法制备石蜡切片,然后进行 HE 染色,置于显微镜下,观察肠道组织病理变化情况。

3.3 结果

3.3.1 灭活免疫原的制备及检验

(1) 制备的灭活免疫原为油包水型油乳状,颜色呈现淡粉色;将免疫原滴落到冷水中,无扩散现象,整体性较好;将免疫原离心处理后未见水相析出、未分层,证明

稳定性良好；用移液器吸取 0.4 mL 免疫原，垂直自然下落时间未 7 s，黏度符合免疫原标准要求。

(2) 3.2.1 中制备的 PoRV 和 PEDV 二联灭活免疫原在 TSB 平板培养基中无细菌和霉菌生长；LB 液体培养基澄清透明、无污染迹象，表明本试验制备的 PoRV 和 PEDV 二联灭活免疫原无菌检验合格。将制备的灭活免疫原接种到 MA-104 细胞中，未引起细胞发生病变，说明免疫原安全可靠。

3.3.2 卵黄抗体的提取与检验

3.3.2.1 卵黄抗体的提取

将收集的高免鸡蛋经过浸泡消毒后，分离卵黄与卵清，将卵黄与水充分混合均匀后静置，通过向蛋黄液中多次添加不同浓度 PEG-6000 粉末，反复沉淀。PEG-6000 是一种不带电荷的大分子物质，可特异性沉降蛋白，而不引起蛋白变性，经过多次沉降，可见离心管底乳白色的 IgY 沉淀，用与蛋黄液等体积的 PBS 将沉淀溶解即为提纯的卵黄抗体液，颜色呈半透明、乳白色。

3.3.2.2 卵黄抗体的提取含量的测定

对经 PEG-6000 提纯后的卵黄抗体，用 BCA 方法测定卵黄抗体浓度，根据梯度稀释标准品在 OD₅₆₂ 下的数值绘制标准曲线（图 3-1），通过数值得出标准曲线方程为 $y=0.08967X+0.111$ ， $R^2=0.995$ ，根据标准曲线方程代入吸光度值计算卵黄抗体浓度。提纯的卵黄抗体 OD₅₆₂ 值为 1.300，经计算，蛋白浓度为 13.26 mg/mL。

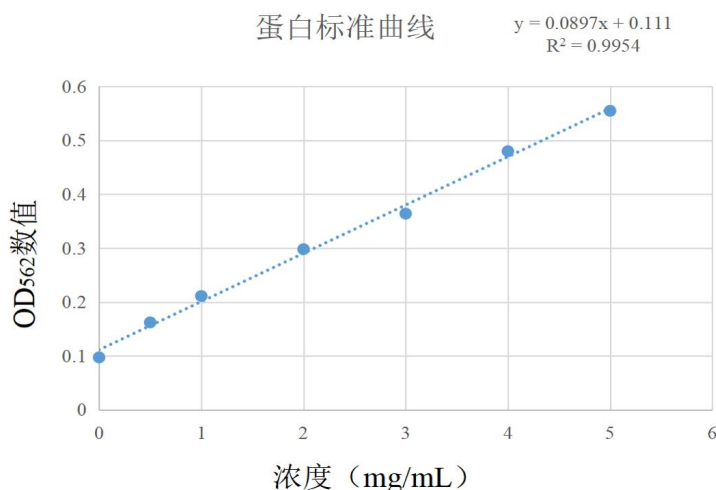


图 3-1 BSA 标准曲线

Fig. 3-1 BSA standard curve

3.3.2.3 卵黄抗体的纯度

用 PBS 将提取的 IgY 稀释后，加入 SDS-PAGE Loading Buffer，煮沸变性后电泳，结束用考马斯亮蓝染液进行染色。可以看到提取的卵黄抗体轻链和重链条带清晰（图 3-2），杂带较少，说明用 PEG-6000 法提取纯度较高。

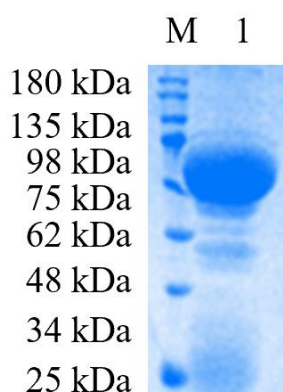


图 3-2 卵黄抗体的纯度分析

Fig. 3-2 Analysis of the purity of yolk antibody

M. 蛋白标准品; 1. 提纯卵黄抗体

M. Protein standard; 1. Yolk antibody

3.3.3 抗 PoRV 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

3.3.3.1 包被抗原的浓度和一抗稀释

利用棋盘滴定试验探索包被抗原浓度和一抗稀释倍数的最佳条件，试验结果如表 3-5 所示，随着抗体稀释度增加或者抗原包被浓度的降低，OD₄₅₀ 值呈下降趋势。分析结果可知当抗原稀释度为 1:240、卵黄抗体稀释度为 1:120 时，卵黄抗体 OD 值近似 1 且此时 P/N 值达到最大，因此，将抗原稀释度为 1:240 和卵黄抗体稀释度为 1:120 作为最佳条件。

表 3-5 抗原的包被浓度和一抗最佳稀释度的测定结果

Table 3-5 The results of antigen coating concentration and optimal dilution of IgY

稀释度 Dilution	抗原不同稀释度的 OD ₄₅₀ 值 The OD ₄₅₀ of different dilutions of antigen					
	1:30	1:60	1:120	1:240	1:480	
1:60	P	1.518±0.009	1.293±0.031	1.123±0.013	0.945±0.031	0.664±0.008
	N	0.212±0.012	0.174±0.008	0.128±0.025	0.103±0.006	0.093±0.015
	P/N	7.16	7.43	8.77	9.17	7.14
1:120	P	1.326±0.017	1.22±0.012	1.098±0.017	0.988±0.016	0.703±0.021
	N	0.153±0.023	0.121±0.013	0.112±0.002	0.089±0.022	0.079±0.034
	P/N	8.67	10.08	9.80	11.10	8.90
1:240	P	1.002±0.015	0.923±0.009	0.734±0.022	0.666±0.003	0.423±0.012
	N	0.118±0.008	0.104±0.010	0.091±0.012	0.081±0.015	0.061±0.067
	P/N	8.49	8.875	8.06	8.22	6.93
1:480	P	0.889±0.053	0.712±0.043	0.598±0.032	0.563±0.034	0.423±0.021
	N	0.103±0.014	0.087±0.015	0.061±0.019	0.077±0.004	0.066±0.021
	P/N	8.63	8.18	9.80	7.31	6.41

3.3.3.2 酶标抗体最佳稀释度

将酶标抗体按比例稀释后，在最佳的包被抗原浓度和抗体稀释度下，进行 ELISA 检测，结果如表 3-6 所示，当酶标抗体稀释比例为 1:2000 时，P/N 值达到最大，因此将酶标抗体稀释 1:2000 作为最佳条件。

表 3-6 酶标抗体的最佳工作浓度测定结果
Table 3-6 The result of best dilution of enzyme labeled antibody

项目 Items	酶标抗体的不同稀释度的 OD ₄₅₀ 值 The OD ₄₅₀ of different dilutions of enzyme labeled antibody			
	1:1000	1:2000	1:3000	1:4000
阳性抗体	1.235±0.012	1.068±0.002	0.979±0.032	0.812±0.022
阴性抗体	0.139±0.023	0.116±0.021	0.131±0.014	0.111±0.012
P/N	8.09	9.21	7.47	7.32

3.3.3.3 卵黄抗体特异性试验

用 PCV2、TGEV、CSFV 抗原包被酶标板，测试本试验建立的 ELISA 方法的特异性，结果如表 3-7，PoRV 检测结果均大于 1，而其他 3 种病原用 ELISA 方法检测值均为 0.1 左右，研究表明本次建立的 ELISA 方法可以特异性结合 PoRV，不发生交叉反应。

表 3-7 卵黄抗体的特异性试验结果

Table 3-7 Specificity test results of yolk antibody

序号 Sample number	包被抗原 Coating antigen			
	PCV2	TGEV	CSFV	PoRV
1	0.124	0.113	0.102	1.099
2	0.108	0.120	0.145	1.123
3	0.095	0.111	0.183	1.201

3.3.4 卵黄和血清中抗 PoRV、PEDV 抗体消长规律分析

利用本试验建立的 ELISA 方法测定免疫后的血清和卵黄抗体效价，由图 3-3 可知，PoRV 从一免后 7 d 开始，血清抗体和卵黄抗体水平快速升高，三免后抗体水平维持在较高水平，3 免后 14 d 抗体效价水平达到顶峰，之后开始下降，血清效价和卵黄抗体效价消长变化规律总体保持一致。初始免疫后血清抗体水平较卵黄抗体水平上升快，直至 42 d 二者抗体水平接近，63 d 后血清抗体消退较快。PEDV 抗体水平整体消长规律与 PoRV 相近，抗体水平略高于 PoRV，从总体看，二者均表现为血清抗体的产生早于卵黄抗体、卵黄抗体消退晚于血清抗体。

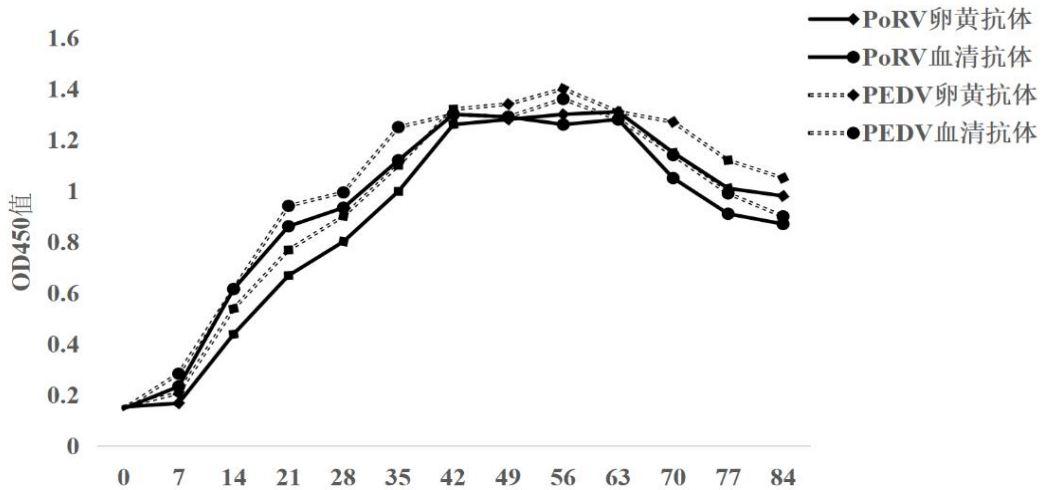


图 3-3 卵黄抗体和血清中抗体的 ELISA 检测结果

Fig. 3-3 The ELISA results of yolk antibody and serum antibody

3.3.5 卵黄抗体对 PoRV、PEDV 中和效价

分别取抗体水平较高的 PoRV、PEDV 卵黄抗体进行中和效价的测定，采取固定病毒稀释抗体的方法，计算卵黄抗体的中和效价，PoRV 卵黄抗体试验结果如表 3-8-1 所示，结果显示距离比例 = $(53.85 - 50) / (53.85 - 21.43) = 0.12$; $IgPD_{50} = 0.12 \times (-0.3) + (-2.4) = -2.436$; $PD_{50} = 10^{-2.436} = 0.004$ 。将 PoRV 卵黄抗体按照 1:273 稀释后，仍能保护半数 MA-104 细胞免受 PoRV 感染，所以 PoRV 卵黄抗体中和效价为 1:273。PEDV 卵黄抗体试验结果如表 3-8-2 所示，距离比例 = $63.64 - 50 / (63.64 - 16.67) = 0.29$; $IgPD_{50} = -2.4 + 0.29 \times (-0.3) = -2.487$; $PD_{50} = 10^{-2.487} = 0.003$ 。将 PEDV 卵黄抗体按照 1:307 稀释后仍能够保护半数 Vero 细胞免受 PEDV 的感染，所以 PEDV 卵黄抗体中和效价为 1:307。

表 3-8-1 PoRV 卵黄抗体的中和试验结果
Table 3-8-1 Neutralization test results of PoRV yolk antibody

IgY 稀释度	CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计		保护率
			CPE 孔数	无 CPE 孔数	
1:2	0	8	0	61	100% (61/61)
1:4	0	8	0	53	100% (53/53)
1:8	0	8	0	45	100% (45/45)
1:16	0	8	0	37	100% (37/37)
1:32	0	8	0	29	100% (29/29)
1:64	0	8	0	21	100% (21/21)
1:128	2	6	2	13	86.67% (13/15)
1:256	4	4	6	7	53.85% (7/13)
1:512	5	3	11	3	21.43% (3/14)

表 3-8-2 PEDV 卵黄抗体的中和试验结果
Table 3-8-2 Neutralization test results of PEDV yolk antibody

IgY 稀释度	CPE 孔数	无 CPE 孔数	累计		保护率
			CPE 孔数	无 CPE 孔数	
1:2	0	8	0	62	100% (62/62)
1:4	0	8	0	54	100% (54/54)
1:8	0	8	0	46	100% (46/46)
1:16	0	8	0	38	100% (38/38)
1:32	0	8	0	30	100% (30/30)
1:64	0	8	0	22	100% (22/22)
1:128	1	7	1	14	93.33% (14/15)
1:256	3	5	4	7	63.64% (7/11)
1:512	6	2	10	2	16.67% (2/12)

3.3.6 卵黄抗体的理化性质

3.3.6.1 pH 对抗 PoRV 卵黄抗体的影响

将提纯的卵黄抗体调至不同 pH 值处理后, 运用 ELISA 检测方法进行 OD₄₅₀ 测定, 从表 3-9-1 可以看出, 卵黄抗体在 pH 为 7 的环境中, 受到的影响最小, 随着 pH 的增大或者减小, 相应的活性也有所降低, 在 pH 为 2 或 11 时, 仍能保持一定活性。说明卵黄抗体具有一定的耐酸耐碱能力。

表 3-9-1 pH 对 PoRV IgY 效价的影响

Table 3-9-1 The effect of pH on the titer of PoRV IgY

pH	抗体效价 OD ₄₅₀ 值 (Antibody titer of OD ₄₅₀ value)		
	样品 1 (Sample 1)	样品 2 (Sample 2)	样品 3 (Sample 3)
2	0.721	0.778	0.698
3	0.893	0.902	0.814
4	1.012	1.104	0.976
6	1.218	1.222	1.167
7	1.267	1.30	1.190
8	1.112	1.219	1.199
10	1.145	1.189	1.175
对照组	1.321	1.178	1.253

3.3.6.2 胃蛋白酶对抗卵黄抗体的影响

胃蛋白酶处理提取的卵黄抗体后,用 ELISA 方法检测卵黄抗体活性,试验结果如表 3-9-2 所示,IgY 用胃蛋白酶作用后,与未处理的对照组相比,仍保持了较高的抗体效价,说明胃蛋白酶对卵黄抗体影响较小。

表 3-9-2 胃蛋白酶对 PoRV IgY 效价的影响

Table 3-9-2 The effect of pepsin on the titer of PoRV IgY

作用时间 (h)	抗体效价 OD ₄₅₀ 值 (Antibody titer of OD ₄₅₀ Value)		
	样品 1 (Sample 1)	样品 2 (Sample 2)	样品 3 (Sample 3)
0.5	1.203	1.109	1.165
1	1.108	0.034	1.051
2	1.012	0.934	1.023
对照组	1.355	1.247	1.298

3.3.7 卵黄抗体攻毒保护试验

3.3.7.1 卵黄抗体治疗试验

在仔猪 3 日龄时,首先对卵黄抗体治疗组仔猪口服 2 g 卵黄抗体粉,每日三次,另外两组正常饲喂。直至 5 日龄时,分别对卵黄抗体治疗组和 PoRV+PEDV 攻毒组口服 1 mL TCID₅₀ 为 10⁶/mL 的 PoRV 病毒液+1 mL TCID₅₀ 为 10⁶/mL 的 PEDV 病毒液,对照组仔猪口服 2 mL DMEM。卵黄抗体治疗组攻毒后,继续口服卵黄抗体进行治疗两天。通过观察各组仔猪发现,阴性对照组仔猪在整个试验过程中,生长状况良好,未出现腹泻情况,整体无任何变化;PoRV+PEDV 攻毒组在 12 h 后出现躁动不安,陆续出现呕吐现象,呕吐物中含有未消化的凝乳块,同时仔猪出现腹泻,为黄色粘稠粪便,24 h

后仔猪出现严重腹泻，为黄绿色水样腹泻，卧地不起，精神沉郁，食欲废绝。36 h 时有一头仔猪死亡，42 h 后另外两只仔猪也相继死亡；卵黄抗体治疗组中仔猪前期均表现为正常，30 h 后仔猪陆续出现轻微腹泻，为黄绿色稀软粪便，但进食量基本正常，但是在 48 h 时有一只仔猪腹泻加重，60 h 时死亡，另外两只仔猪陆续恢复，未出现死亡情况。分析试验结果，攻毒组 3 只仔猪全部死亡，存活率为 0%，阴性对照组三只仔猪未出现死亡，而卵黄抗体治疗组存活率为 66.7%。试验结果说明，卵黄抗体在仔猪病毒性腹泻中可以发挥良好的作用。

3.3.7.2 组织病毒含量测定

将剖检后仔猪的各个肠段研磨后，分别提取 RNA，采用荧光定量 PCR 方法测定各个肠段 PoRV 和 PEDV 病毒含量，结果如图 3-4、3-5 所示，攻毒组和治疗组中十二指肠中 Ct 值均高于空肠和回肠，说明病毒主要感染的是空肠和回肠，十二指肠中攻毒组 PEDV Ct 值显著低于治疗组 Ct 值 ($P < 0.05$)，空肠中攻毒组 PEDV Ct 值极显著低于治疗组 Ct 值 ($P < 0.005$)，回肠中攻毒组 PEDV Ct 值极显著低于治疗组 Ct 值 ($P < 0.01$)，说明治疗组各段小肠中 PEDV 病毒含量均低于攻毒组，制备的二联卵黄抗体对 PEDV 具有较好的作用；空肠、回肠中攻毒组 PoRV Ct 值均极显著低于治疗组 Ct 值 ($P < 0.005$)，说明治疗组各段小肠中病毒含量均低于攻毒组，制备的二联卵黄抗体对 PoRV 具有很好的作用。

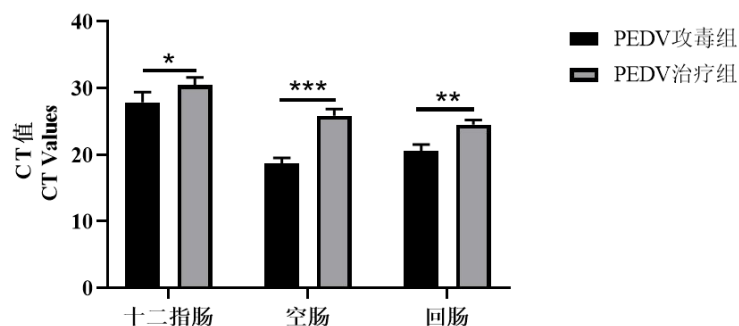


图 3-4 PEDV Ct 值测定结果

Fig. 3-4 PEDV Ct value determination results

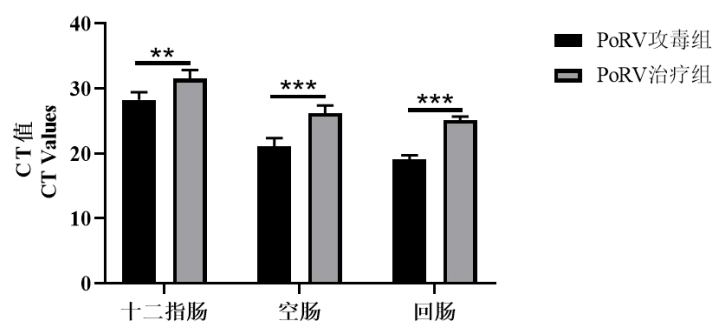


图 3-5 PoRV Ct 值测定结果

Fig. 3-5 PoRV Ct value determination results

3.3.7.3 肠道病理组织切片

将 3.2.9.3 中保存的肠段制作组织病理切片结果如图 3-6 所示，阴性对照各个肠段无明显病理变化，PoRV+PEDV 攻毒组可见十二指肠绒毛脱落，黏膜上皮细胞萎缩并伴有少量的炎性细胞浸润；空肠绒毛显著缩短，肠腔内脱落的小肠上皮细胞增多，细胞质空质化，核坏死，扁平细胞代替柱状上皮细胞；回肠上皮细胞形成空泡并充血，伴有炎性细胞浸润；卵黄抗体治疗组肠绒毛有少量的断裂及空泡化病变，不表现出充血、表皮脱落等现象，形态基本恢复正常。

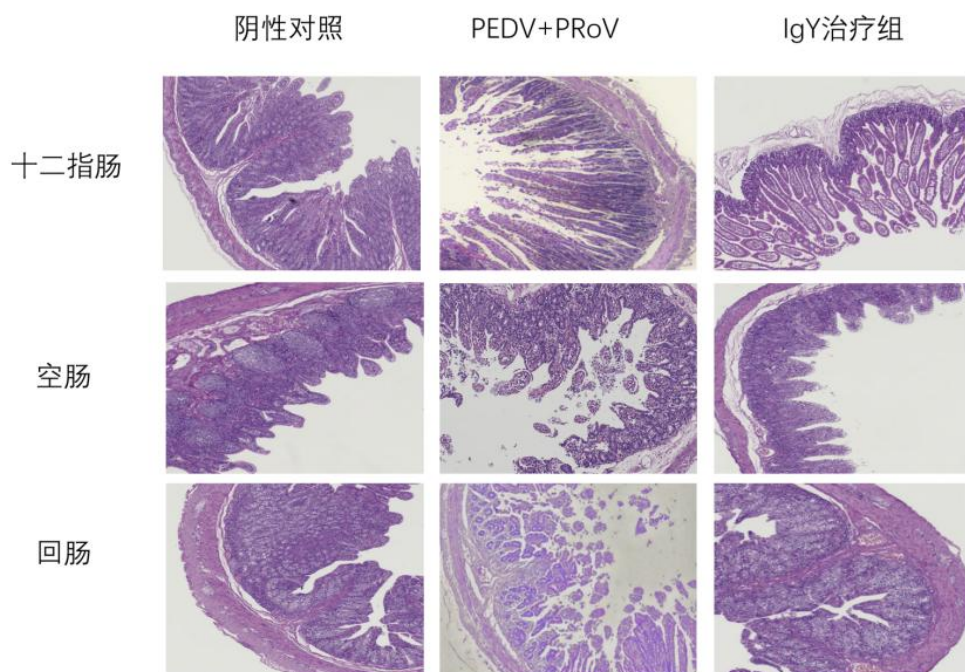


图 3-6 病理切片图

Fig. 3-6 Pathological section diagram

3.4 讨论

仔猪感染肠道病毒导致严重腹泻，表现为高感染率、高发病率、高死亡率，对国内外养猪业造成巨大的经济损失。朱子健等人报道了 2015~2016 东北地区 PoRV 和 PEDV 混合感染率为 20.45%(朱子健等 2017)，常新见等人报道了 2017~2019 华东地区 PoRV 和 PEDV 混合感染率为 13.3%(常新见等 2020)，目前并没有针对 PoRV 和 PEDV 的特效治疗药物或效果确实的生物制剂。IgY 是从免疫特定病原鸡蛋中提取的可以对抗特定病原的抗体，具有获取方便、价格低廉、产量高、安全无污染等众多优势，在动物疾病安全防治乃至人类生物安全防控领域备受青睐，近年来，关于卵黄抗体的研究越来越多。在本研究对仔猪腹泻病料的检测中发现，PoRV 和 PEDV 是主要引起仔猪腹泻的肠道病毒，并且生产中存在许多的 PoRV 和 PEDV 混合感染病例，单一病原的防控已经不能解决生产中存在的问题，因此本研究利用 PEDV 流行株和 PoRV 流行株制备二联灭活免疫原免疫蛋鸡，研制二联卵黄抗体用于仔猪轮状病毒感染和猪流行性腹泻的防治。

本研究将病毒与弗氏佐剂进行乳化制备得到油乳剂灭活免疫原，弗氏佐剂作为动物试验中常用的油乳佐剂，不仅能起到缓释的作用，持续刺激机体产生免疫反应，同时也能增大抗原的表面积，促进巨噬细胞的吞噬作用。但是由于弗氏佐剂价格较高，在生产中，弗氏佐剂并不能作为广泛使用的免疫原佐剂，还需通过大量试验去筛选经济性好、免疫原性强的免疫原佐剂来代替弗氏佐剂。江兴华等将浓缩的新城疫病毒作为抗原免疫 SPF 鸡，发现浓缩后由于抗原量的增加，提高了机体免疫后抗体效价水平(江兴华等 2016)；陈静怡将病毒浓缩后制备灭活疫苗，进行了动物试验，结果也发现，在一定范围内疫苗中抗原量越多，机体所产生的抗体水平也越高、持续时间越长(陈静怡 2019)。因此，浓缩抗原也是提高抗体水平的有效途径。

临床上病原不仅存在单一感染，混合感染也屡见不鲜，因此越来越多的多价疫苗和多联疫苗被研发，但是当两种或多种抗原混合可能会造成某一抗原免疫原性下降(王春华 2002)。我们还进行了单独卵黄抗体和二联卵黄抗体的防治效果研究，将灭活后的 PoRV 与弗氏佐剂乳化后免疫试验 1 组蛋鸡，将灭活的 PoRV 浓缩为原来的 1/2，再与等量 PEDV 病毒液混合后制备免疫原免疫试验 2 组蛋鸡。结果发现，在保证抗原量基本一致的前提下，免疫单独免疫原制备的 IgY 中和效价与免疫二联免疫原的 IgY 中和效价水平也基本相当，并没有明显差异，说明 PoRV 和 PEDV 二联苗可以作为制备卵黄抗体的材料，1 次免疫可以进行 2 种疾病的防治，这样可以减少卵黄抗体的制备过程中对鸡的损伤，更加符合动物福利原则。

本研究将制备的 PoRV 和 PEDV 二联灭活免疫原免疫蛋鸡，进行了连续 12 周的抗体水平免疫监测，对血清和卵黄中抗体水平消长规律进行了分析，结果发现免疫蛋鸡

后,鸡血清中 PoRV 抗体水平的升高早于卵黄中 PoRV 抗体水平,血清中抗体在免疫第 42 d 后达到顶峰,抗体水平维持 30 d 后开始下降,与 PoRV 卵黄抗体相比,血清中抗体产生的较早,但是在免疫 63 d 后,卵黄中抗体水平要高于血清中抗体。观察 PEDV 血清抗体和卵黄抗体,同样初始血清抗体要高于卵黄抗体,免疫 56 d 后 PEDV 卵黄抗体高于血清抗体。结果表明,在免疫 35~70 天收集鸡蛋制备卵黄抗体是最适宜的时间。本研究还将卵黄液加入保护剂制备为冻干粉,这样可以更好的保存以及定量饲喂仔猪。

从卵黄抗体中和效价试验结果分析,抗 PoRV IgY 的中和效价为 1:273,抗 PEDV IgY 的中和效价为 1:307,说明本研究制备的卵黄抗体具有病毒中和能力。刘政龙将制备的 PEDV 蜂胶佐剂疫苗接种蛋鸡,测得中和效价为 1:125.9(刘政龙 2016),免疫后在卵黄中抗体效价存在差异,可能是和制备疫苗时抗原总量、免疫程序、佐剂相关。由于卵黄抗体的诸多优点,在临床上应用越来越广泛,但对于仔猪肠道腹泻病毒的防治,须通过口服方式到达肠道中和病毒,虽然卵黄抗体对酸以及胃蛋白酶具有较强的抵抗力,但仍然会有部分抗体失活,因此后续可以考虑作微胶囊等材料处理卵黄抗体,使卵黄抗体具有更加广泛的应用场景。

制备得到抗轮状病毒和流行性腹泻病毒的二联卵黄抗体,并初步应用到轮状病毒感染和流行性腹泻的治疗中。本研究通过对 5 日龄仔猪人工感染 PoRV+PEDV 病毒致使其腹泻,并在攻毒前和攻毒后口服卵黄抗体。结果显示,卵黄抗体治疗组仔猪存活率高于攻毒组,为 66.7%;对各组仔猪肠道病毒含量进行测定,治疗组各段小肠病毒含量也低于攻毒组;对小肠组织进行病理变化分析,发现治疗组的小肠组织结构病变程度低于攻毒组。结果说明本试验制备的二联卵黄抗体对混合感染的仔猪病毒性腹泻具有较好的防治效果,为卵黄抗体在混合感染的病毒性腹泻防治提供了相应的资料。但是治疗组也出现了 1 只仔猪死亡,我们推测可能是由于饲喂的卵黄抗体量不足,不能完全中和进行肠道的病毒,可以尝试增加卵黄抗体用量来提高仔猪存活率。后续还可以在卵黄抗体中加入肠黏膜修复剂及益生菌等制备复合卵黄抗体制剂,为仔猪病毒性腹泻提高新的治疗及预防生物制剂。

3.5 小结

- (1) 制备了 PoRV-PEDV 二联卵黄抗体,提纯的卵黄抗体浓度为 13.26 mg/mL。
- (2) 利用建立的 ELISA 检测方法,测得在免疫后 56 d 左右抗体水平达到顶峰。血清抗体的产生早于卵黄抗体、卵黄抗体消退晚于血清抗体。
- (3) 提纯后的抗 PoRV 卵黄抗体的中和效价达 1:273;抗 PEDV 卵黄抗体的中和效价达 1:307。
- (4) IgY 在 pH 为 3 的环境中 OD 值为 0.9 左右,在胃蛋白酶作用 2 h 后 OD 值大于 0.9,卵黄抗体具有较好的稳定性。

(5) 二联卵黄抗体治疗组仔猪存活率为 66.7%，攻毒组存活率为 0%。二联卵黄抗体治疗组仔猪小肠有少量绒毛断裂，形态基本正常，攻毒组毛断裂、肠上皮细胞脱落，肠道组织病变严重。

结 论

(1) 经过病原检测发现陕西部分地区仔猪病毒性腹泻主要病原为 PEDV 和 PoRV, 阳性率分别为 18.5%、16.0%, 混合感染率为 10.9%。从病料中分离得到 1 株 PoRV。经鉴定该分离株为 A 群 G9P[23]型轮状病毒, 为近年来流行毒株。

(2) 利用分离毒株制备了二联卵黄抗, 提纯的卵黄抗体蛋白浓度为 13.26 mg/mL。提纯后的 IgY 抗 PoRV 的中和效价达 1:273; 抗 PEDV 的中和效价达 1:307。制备的卵黄抗体理化性质稳定, 具有一定的酸碱及胃蛋白酶抵抗力。

(3) 在人工感染仔猪的初步应用中, 卵黄抗体治疗组存活率为 66.7%, 攻毒组存活率为 0%。用二联卵黄抗体防治由 PoRV 和 PEDV 混合感染引起的病毒性腹泻具有一定的效果。

参考文献

- 常铁城, 陈建飞, 冯力, 倪宏波. 2016. 2014年部分地区猪流行性腹泻病毒流行病学调查. *中国预防兽医学报*, 38(4): 335-338
- 常新见, 周金柱, 殷杰, 牛贝贝, 范宝超, 郭容利, 赵永祥, 牛家强, 何孔旺, 李彬. 2020. 2017~2019年华东地区猪场主要病毒性腹泻病原调查. *畜牧兽医学报*, 51(12): 3141-3150
- 陈静怡. 2019. 不同纯化浓缩方法制备的新城疫疫苗对SPF鸡免疫效果的研究. *福建畜牧兽医*, 41(3): 10-12
- 丁雨善. 2020. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)卵黄抗体的研制. [硕士学位论文]. 河南安阳: 南阳师范学院
- 范秀娟, 孙燕, 孙振鹏, 马超, 孟子新, 李欢, 李薇. 2015. 生物反应器培养轮状病毒基因重配株Ls条件的优化. *微生物学免疫学进展*, 43(6): 18-21
- 耿超, 赵红梅, 梁婉, 杨克礼, 郭锐, 袁芳艳, 刘威, 高婷, 刘泽文, 陆泓宇, 高扬, 周丹娜, 田永祥. 2023. 猪A群轮状病毒HuB2020株的分离与基因型分析. *中国动物传染病学报*, 1-6[2023-03-15]
- 江兴华, 赵华娥, 林晓荣, 包松英, 崔龙萍, 王全溪. 2016. 不同禽流感病毒含量的新-流二联灭活疫苗免疫SPF鸡后抗体水平的监测. *福建畜牧兽医*, 38(4): 22-24
- 李丽敏, 朱卫霞, 王晓波, 魏艳秋, 张鹤, 张义明, 宋勤叶. 2016. 猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、猪A型轮状病毒多重RT-PCR方法的建立及其应用. *中国兽医学报*, 36(2): 216-220+227
- 李明亮, 冷超粮, 宋安东, 秦鑫鑫, 阚云超. 2018. 卵黄抗体的应用及纯化研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, (15): 34-38
- 李媛, 程兰玲, 张慧敏, 张志鹏, 杜久斌, 侯凤, 任立松, 贺笋, 唐慧芬. 2021. 2018年~2019年新疆部分地区猪病毒性腹泻病原检测与分析. *中国预防兽医学报*, 43(5): 477-481+500
- 刘政龙. 2016. 猪流行性腹泻病毒S1蛋白间接ELISA方法的建立与应用及卵黄抗体的制备. [硕士学位论文] 山东泰安: 山东农业大学
- 庞昕, 柴家前, 赵宏坤, 姜仁辉. 2000. 猪轮状病毒感染研究进展. *动物医学进展*, (4): 43-45
- 王春华. 2002. 不同抗原含量和配苗比例的新城疫油乳剂灭活苗对鸡免疫后抗体监测和攻毒试验. *辽宁畜牧兽医*, (2): 26-27
- 王璐, 时洪艳, 陈建飞, 张鑫, 史楠, 石达, 刘随新, 张莎, 冯力. 2013. 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. *中国预防兽医学报*, 35(4): 276-279
- 徐丽华, 李军星, 苏菲, 余斌, 王赛, 田瑞雨, 袁秀芳. 2018. 2011~2017年浙江省猪病毒性腹泻病的流行病学调查. *中国兽医科学*, 48(5): 625-630
- 杨娟, 赵振鹏, 杨振, 王婉, 王仙, 汪恽旻, 王姣, 郑建高, 秦爱建, 金文杰. 2016. 一株猪轮状病毒的分离与鉴定. *畜牧与兽医*, 48(9): 32-37
- 原霖. 2018. 猪轮状病毒G4P[6]株的分离鉴定及新型检测方法的建立与应用. [硕士学位论文]. 中国北京: 中国农业大学

- 曾秀秀, 宋德平, 张帆帆, 李凯, 叶昱, 丁珍, 吴琼, 肖琦, 于振兴, 顾俊, 陈君, 张誉瀚, 曾秀, 何后军, 唐玉新. 2020. 三种猪的肠道腹泻冠状病毒三重 RT-PCR 检测方法的建立与应用. *黑龙江畜牧兽医*, (15): 105-109
- 张月, 田夫林, 李玉杰, 马慧玲, 王贵升, 蔺晓月. 2018. 山东省 2012 年~2016 年猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查及其 ORF3 基因分析. *中国预防兽医学报*, 40(5): 447-450
- 张志, 董雅琴, 刘爽, 吴发兴, 邵卫星, 李晓成. 2014. 我国部分省份猪流行性腹泻的流行病学监测. *中国动物检疫*, (10): 47-51
- 朱子健, 闫丽辉, 鞠妍, 唐志芬, 杨金雨, 朱庆虎. 2017. 2015~2016 年我国东北地区猪病毒性腹泻流行病学调查. *中国预防兽医学报*, 39(5): 356-360
- Alvarez J, Sarradell J, Morrison R, Perez A. 2015. Impact of porcine epidemic diarrhea on performance of growing pigs. *PLoS One*, 10(3): e0120532
- Banerjee I, Gladstone BP, Le Fevre AM, Ramani S, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, Estes MK, Mulyil JP, Jaffar S, Kang G. 2007. Neonatal infection with G10P[11] rotavirus did not confer protection against subsequent rotavirus infection in a community cohort in Vellore, South India. *J Infect Dis*, 195(5): 625-32
- Barro M, Patton JT. 2005. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(11): 4114-9
- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2(7841): 1281-3
- Bohl EH, Theil KW, Saif LJ. 1984. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. *J Clin Microbiol*, 19(2): 105-11
- Bridger JC, Brown JF. 1985. Prevalence of antibody to typical and atypical rotaviruses in pigs. *Vet Rec*, 116(2): 50
- Bridger JC, Woode GN. 1975. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. *Br Vet J*, 131(5): 528-35
- Carlander D, Kollberg H, Wejåker PE, Larsson A. 2000. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res*, 21(1): 1-6
- Carlander D, Stalberg J, Larsson A. 1999. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups J Med Sci*, 104(3): 179-89
- Chen F, Ku X, Li Z, Memon AM, Ye S, Zhu Y, Zhou C, Yao L, Meng X, He Q. 2016. Genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus in Chinese mainland, revealing genetic markers of classical and variant virulent parental/attenuated strains. *Gene*, 588(1): 95-102
- Dickman KG, Hempson SJ, Anderson J, Lippe S, Zhao L, Burakoff R, Shaw RD. 2000. Rotavirus alters paracellular permeability and energy metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(4): G757-66
- Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus Gene Structure and Function. *Microbiol Rev*, 53(4): 410-449
- Estes MK, Kang G, Zeng CQ, Crawford SE, Ciarlet M. 2001. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp*, 238: 82-96
- Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk

- antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J*, 4(8): 2528-32
- Grando TH, Baldissera MD, de Sá MF, do Carmo GM, Porto BCZ, Aguirre GSV, Azevedo MI, de Jesus FPK, Santurio JM, Sagrillo MR, Stefani LM, Monteiro SG. 2017. Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *J Immunol Methods*, 449: 56-61
- Han S, Wen Y, Yang F, He P. 2021. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Protects Mice Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection Through Improving Intestinal Health and Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol*, 11: 662710
- He Z, Tong C, Sheng L, Ma M, Cai Z. 2016. Monitoring glycation-induced structural and biofunctional changes in chicken immunoglobulin Y by different monosaccharides. *Poult Sci*, 95(11): 2715-2723
- Ianiro G, Delogu R, Fiore L, Ruggeri FM. 2015. Genomic characterization and molecular investigation of VP7 epitopes of uncommon G10P[8] group A rotavirus strains detected in Italy in 2009. *J Gen Virol*, 96(Pt 7): 1801-10
- Jaru-Ampornpan P, Jengarn J, Wanitchang A, Jongkaewwattana A. 2017. Porcine Epidemic Diarrhea Virus 3C-Like Protease-Mediated Nucleocapsid Processing: Possible Link to Viral Cell Culture Adaptability. *J Virol*, 91: e01660-16
- Jayaram H, Taraporewala Z, Patton JT, Prasad BV. 2002. Rotavirus protein involved in genome replication and packaging exhibits a HIT-like fold. *Nature*, 417(6886): 311-5
- Jung K, Miyazaki A, Saif LJ. 2018. Immunohistochemical detection of the vomiting-inducing monoamine neurotransmitter serotonin and enterochromaffin cells in the intestines of conventional or gnotobiotic (Gn) pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and serum cytokine responses of Gn pigs to acute PEDV infection. *Res Vet Sci*, 119: 99-108
- Kim HH, Matthijnssens J, Kim HJ, et al. 2012. Full-length genomic analysis of porcine G9P[23] and G9P[7] rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in South Korea. *Infect Genet Evol*, 12(7): 1427-1435
- Kim Y, Lee C. 2014. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology*, 460-461: 180-193
- Lee DH, Jeon YS, Park CK, Kim S, Lee DS, Lee C. 2015. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Arch Virol*, 160(9): 2197-207
- Lee JH, Lee GC, Kim JI, Yi HA, Lee CH. 2013. Development of a new cell culture-based method and optimized protocol for the detection of enteric viruses. *J Virol Methods*, 191(1): 16-23
- Lee L, Samardzic K, Wallach M, Frumkin LR, Mochly-Rosen D. 2021. Immunoglobulin Y for Potential Diagnostic and Therapeutic Applications in Infectious Diseases. *Front Immunol*, 12:696003
- Li R, Qiao S, Yang Y, Guo J, Xie S, Zhou E, Zhang G. 2016. Genome sequencing and analysis of a novel recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from Henan, China. *Virus genes*, 52(1): 91-98
- Li W, van Kuppeveld FJM, He Q, Rottier PJM, Bosch BJ. 2016. Cellular entry of the porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res*, 226:117-127
- Li Y, Wu Q, Huang L, Yuan C, Wang J, Yang Q. 2018. An alternative pathway of enteric PEDV dissemination from nasal cavity to intestinal mucosa in swine. *Nat Commun*, 9(1): 3811

- Lin CM, Saif LJ, Marthaler D, Wang Q. 2016. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res*, 226: 20-39
- Liu X, Wang M, Li S, Li J, Xiao J, Li H, Zhang Q, Kong X, Wang H, Li D, Duan Z. 2022. Genomic and evolutionary characteristics of G9P[8], the dominant group A rotavirus in China (2016-2018). *Front Microbiol*, 13: 997957
- Matthijssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol*, 157(6): 1177-82
- Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ. 1969. Further studies on neonatal calf diarrhea virus. *Proc Annu Meet US Anim Health Assoc*, 73: 97-9
- Mitchell DB, Both GW. 1990. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. *Virology*, 177(1): 324-331
- Miyazaki A, Kuga K, Suzuki T, Kohmoto M, Katsuda K, Tsunemitsu H. 2011. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. *Vet Res*, 42(1): 112
- Nelsen A, Lager KM, Stasko J, Nelson E, Lin CM, Hause BM. 2022. Identification of Pulmonary Infections With Porcine Rotavirus A in Pigs With Respiratory Disease. *Front Vet Sci*, 9: 918736
- Niederwerder MC, Hesse RA. 2018. Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada. *Transbound Emerg Dis*, 65(3): 660-675
- Ohno H. 2016. Intestinal M cells. *J Biochem*, 159(2): 151-60
- Papp H, László B, Jakab F, et al. 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol*, 165(3-4): 190-9
- Parbhoo N, Dewar JB, Gildenhuis S. 2016. Sequence analysis and structural implications of rotavirus capsid proteins. *Acta Virol*, 60(3): 260-70
- Praharaj I, Platts-Mills JA, Taneja S, Antony K, Yugas K, Flores J, Cho I, Bhandari N, Revathy R, Bavdekar A, Rongsen-Chandola T, McMurry T, Houpt ER, Kang G. 2019. Diarrheal Etiology and Impact of Coinfections on Rotavirus Vaccine Efficacy Estimates in a Clinical Trial of a Monovalent Human-Bovine (116E) Oral Rotavirus Vaccine, Rotavac, India. *Clin Infect Dis*, 69(2):243-250
- Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo FC Jr, Umeda K, Kodama Y. 2013. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum Vaccin Immunother*, 9(5): 1039-1048
- Redwan EM, Aljadawi AA, Uversky VN. 2021. Simple and efficient protocol for immunoglobulin Y purification from chicken egg yolk. *Poult Sci*, 100(3): 100956
- Ren X, Suo S, Jang YS. 2011. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol Lett*, 33(2): 215-20
- Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA. 1980. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J Clin Microbiol*, 12(1): 105-11
- Sanches RF, Dos Santos Ferraro ACN, Marroni FEC, Venancio EJ. 2022. Synergistic activity between beta-lactams and igY antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Mol Immunol*, 148: 1-5

- Sereno MM, Gorziglia MI. 1994. The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus strain Eb represents a tentative new P type. *Virology*, 199(2): 500-504
- Song D, Park B. 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes*, 44(2): 167-75
- Stannard LM, Schoub BD. 1977. Observations on the morphology of two rotaviruses. *J Gen Virol*, 37(2): 435-439
- Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burrough ER, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG, Killian ML, Yoon KJ. 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J Vet Diagn Invest*, 25(5): 649-54
- Tang T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S. 2020. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res*, 178: 104792
- Taraporewala Z, Chen D, Patton J T. 1999. Multimers formed by the rotavirus nonstructural protein NSP2 bind to RNA and have nucleoside triphosphatase activity. *J Virol*, 73(12): 9934-9943
- Torres-Vega MA, González RA, Duarte M, Poncet D, López S, Arias CF. 2000. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J Gen Virol*, 81(Pt 3): 821-30
- Tsunemitsu H, Kamiyama M, Kawashima K, Katsuda K, Kohmoto M, Saif LJ, Shouji T, Onodera T. 2005. Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. *J Gen Virol*, 86(Pt 9): 2569-2575
- Valenzuela S, Pizarro J, Sandino AM, Vásquez M, Fernández J, Hernández O, Patton J, Spencer E. 1991. Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol*, 65(7): 3964-7
- Vega CG, Bok M, Ebinger M, Rocha LA, Rivolta AA, González Thomas V, Muntadas P, D'Aloia R, Pinto V, Parreño V, Wigdorovitz A. 2020. A new passive immune strategy based on IgY antibodies as a key element to control neonatal calf diarrhea in dairy farms. *BMC Vet Res*, 16(1): 264
- Vlasova AN, Amimo JO, Saif LJ. 2017. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses*, 9(3): 48
- Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, Xiong X, Bosch BJ, Rey FA, Veerler D. 2017. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114(42): 11157-11162
- Wang D, Fang L, Xiao S. 2016. Porcine epidemic diarrhea in China. *Virus Res*, 226: 7-13
- Wang W, Donnelly B, Bondoc A, Mohanty SK, McNeal M, Ward R, Sestak K, Zheng S, Tiao G. 2011. The rhesus rotavirus gene encoding VP4 is a major determinant in the pathogenesis of biliary atresia in newborn mice. *J Virol*, 85(17): 9069-77
- Wang XM, Niu BB, Yan H, Gao DS, Yang X, Chen L, Chang HT, Zhao J, Wang CQ. 2013. Genetic properties of endemic Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains isolated since 2010. *Arch Virol*, 158(12): 2487-2494
- Wang Z, Li J, Li J, Li Y, Wang L, Wang Q, Fang L, Ding X, Huang P, Yin J, Yin Y, Yang H. 2019. Protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against enterotoxigenic Escherichia

- coli K88 adhesion in weaned piglets. *BMC Vet Res*, 15(1):234
- Warr GW, Magor KE, Higgins DA. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today*, 16(8): 392-8
- Xu XG, Zhang HL, Zhang Q, Dong J, Huang Y, Tong DW. 2015. Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells. *Acta Virol*, 59(3): 265-75
- Xue R, Tian Y, Zhang Y, Zhang M, Li Z, Chen S, Liu Q. 2018. Diversity of group A rotavirus of porcine rotavirus in Shandong province China. *Acta Virol*, 62(3): 229-234
- Yu J, Lai S, Geng Q, Ye C, Zhang Z, Zheng Y, Wang L, Duan Z, Zhang J, Wu S, Parashar U, Yang W, Liao Q, Li Z. 2019. Prevalence of rotavirus and rapid changes in circulating rotavirus strains among children with acute diarrhea in China, 2009-2015. *J Infect*, 78(1): 66-74
- Yu X, Coulson BS, Fleming FE, Dyason JC, von Itzstein M, Blanchard H. 2011. Novel structural insights into rotavirus recognition of ganglioside glycan receptors. *J Mol Biol*, 413(5): 929-39
- Zhang F, Luo S, Gu J, Li Z, Li K, Yuan W, Ye Y, Li H, Ding Z, Song D, Tang Y. 2019. Prevalence and phylogenetic analysis of porcine diarrhea associated viruses in southern China from 2012 to 2018. *BMC Vet Res*, 15(1): 470