

中文摘要

A 型塞内卡病毒 CH/JL/2022 株的分离鉴定及灭活疫苗免疫原性初步评价

A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA), 也称为塞内加谷病毒 (Seneca Valley virus, SVV), 是猪原发性水疱病 (Porcine idiopathic vesicular disease, PIVD) 的病原体之一。自 2015 年 SVA 首次在我国发现以来, 该病毒引起的塞内卡病毒病已经在我国多个地区爆发。最新研究发现, 部分 SVA 毒株已发生变异重组, 其致病性和传播能力均发生了变化, 对养猪业的危害不能忽视。目前, 预防接种疫苗仍然是控制塞内卡病毒病传播的最有效, 最经济的手段, 然而当前市场上仍缺乏有效的商品化疫苗。此外, 佐剂作为疫苗的“助力剂”是传统的灭活疫苗、亚单位疫苗等疫苗的关键组成部分, 其能够增强抗原的免疫原性, 然而对于制备 SVA 疫苗的最适佐剂仍需进一步筛选。因此, 结合临床病例分离获得 SVA 变异毒株并开发其灭活疫苗, 对于塞内卡病毒病防控具有重要意义。

本研究利用 2022 年来自吉林省某猪场的水疱性疾病病猪的淋巴组织进行鉴别诊断, 经 PCR 检测结果发现该病猪感染病原为 SVA, 而非其他水疱性疾病的病原体。此外, 将该病料处理后, 接种至单层乳仓鼠肾细胞 (BHK-21), 在连续传代培养至第四代后出现了稳定的细胞病变 (CPE), 收集细胞上清, 经 PCR 检测为阳性; 以及应用空斑试验、电子显微镜观察、间接免疫荧光试验、Western Blot、TCID₅₀ 等方法检测发现该毒株成功感染 BHK-21 细胞并复制增殖。将收集的 SVA 病毒液通过超速离心法进行浓缩, 并由生物公司进行全基因组测序, 得到的相关序列已上传 NCBI, 并命名为 SVA CH/JL/2022 (GenBank 登录号:OP562896)。利用 DNASTar、MegAlign、MEGE11.0.13 等软件对 SVA CH/JL/2022 进行全基因序列分析, 并与 NCBI 上筛选出的现有 SVA 序列进行比对, 结果显示: SVA CH/JL/2022 与所筛选出的部分中国分离株进化关系更为密切, 并且形成了一个独立的进化分支。SVA CH/JL/2022 毒株与国内外参考毒株的核苷酸序列同源性以及氨基酸序列同源性分别为 97.4%-98.3% 与

97.5%-98.3%，在两组同源性分析中该毒株均与所筛选的中国分离株同源性最低，与国外分离株同源性最高。通过与其他具有代表性的 SVA 参考毒株 poly 结构蛋白的氨基酸序列进行比对分析，结果发现本试验分离株存在 8 个氨基酸突变位点，与 SVV-001 毒株氨基酸序列相比存在 46 个氨基酸突变位点。与参考毒株进行共线性分析，分析表明该毒株与参考毒株基因构成及行使功能高度相似。上述研究表明，本研究成功分离一株 SVA 流行毒株，可用于制作 SVA 灭活疫苗。

为了探索 SVA CH/JL/2022 毒株的免疫原性，以及筛选制备 SVA 灭活疫苗最适佐剂，本研究首先使用终浓度为 4‰ 的甲醛对病毒滴度为 $10^{6.375}$ TCID₅₀/mL 的 SVA 病毒液进行灭活，将完全灭活的 SVA 病毒液按照 SEPPIC 的建议方法，分别与 MONTANIDE™ GEL02 PR (GEL02)、MONTANIDE™ ISA 201 VG (ISA201)、MONTANIDE™ IMS 1313 VG N (IMS1313) 和 Rehydragel LV (LV) 混合制成灭活疫苗。其次，以小鼠为动物模型，将四组灭活疫苗通过背部皮下多点注射的方式对 3 周龄的雄性 BALB/c 小鼠进行免疫，并在初免后第 14d 进行加强免疫，在加强免疫后第 14d 进行攻毒试验。通过血常规检测、血清生化指标检测、ELISA、IFA、中和抗体检测以及脾淋巴试验检测等方法，检测各时间点免疫小鼠体内特异性抗体以及细胞因子水平，并对疫苗安全性进行评估。结果表明，四组灭活疫苗均能刺激小鼠产生免疫原性良好的抗体，其中 SVA-GEL 免疫组能具有更强的免疫原性，并且安全性更高。在攻毒后第 14d 处死小鼠，对各组织器官进行 qPCR 检测以及组织病理学观察。结果显示，与未免疫小鼠各器官相比，免疫组各器官内 SVA 水平均明显降低。此外，免疫组和未免疫组小鼠的大部分器官均无明显的病理变化。然而，在解剖未免疫组小鼠时发现该组小鼠心脏均显示出明显的白色纤维条纹，分别用 HE 和 Von Kossa 染色后，在光学显微镜下观察到未免疫组的心脏有严重的心外膜钙化，而免疫组的小鼠均未出现心脏损伤，表明本研究制备的四组 SVA 灭活疫苗均可以对免疫小鼠产生良好的保护效果。

综上所述，本研究成功分离得到一株 SVA 吉林毒株(SVA CH/JL/2022)，同时完成了该毒株的全基因组测序及分析，并将制备的不同佐剂 SVA

CH/JL/2022 灭活疫苗免疫小鼠，通过免疫原性初步评价，首次发现 MONTANIDE™ GEL02 PR 作为佐剂用于 SVA 灭活疫苗，具有良好免疫原性以及保护性。总之，这些结果能为塞内卡病毒病的流行病学调查，SVA 的致病机制研究，以及 SVA 灭活疫苗的制备和应用提供研究基础。

关键词：

A 型塞内卡病毒；分离鉴定；序列分析；灭活疫苗；免疫反应；攻毒保护

目 录

前 言	1
第一篇 文献综述	3
第 1 章 猪 A 型塞内卡病毒研究进展	3
1.1 SVA 病原学简介	3
1.2 临床症状	5
1.3 病理变化	6
1.4 SVA 流行特点	7
第 2 章 SVA 诊断及防控方法研究进展	11
2.1 临床诊断与鉴别诊断	11
2.2 病原学诊断方法	11
2.3 血清学诊断方法	12
2.4 预防控制	13
第二篇 研究内容	16
第 1 章 一株 A 型塞内卡病毒的分离鉴定及遗传进化分析	16
1.1 材料	16
1.2 实验方法	21
1.3 实验结果	28
1.4 讨论	37
1.5 小结	38
第 2 章 SVA 病毒灭活疫苗的制备及免疫效果研究	39
2.1 材料	39
2.2 实验方法	41
2.3 实验结果	47
2.4 结论	56
2.5 小结	58
结 论	59
参考文献	60

导师简介	69
作者简介及在学期间取得的科研成果	70
致 谢	71

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
SVV	Seneca Valley Virus	塞内卡谷病毒
SVA	Senecavirus A	A型塞内卡病毒
SVDV	Swine Vesicular Disease	猪水疱病
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光试验
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamidegel	聚丙烯酰胺电泳
qPCR	Quantitative Real-time PCR	实时荧光定量 PCR
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
BHK-21	Baby Hamster Syrian Kidney	乳仓鼠肾细胞
CPE	Cytopathic effect	细胞病变
TCID ₅₀	50% tissue-culture infective dose	组织细胞半数感染量
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
OD	Optical density	吸光度
IL-2	Interleukin-2	白介素-2
IL-4	Interleukin-4	白介素-4
IL-6	Interleukin-6	白介素-6
IFN	Interferon	干扰素
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
UTR	Untranslated Region	非翻译区
ORF	Open reading frame	开放阅读框

前 言

SVA 是一种无囊膜、单股、正链 RNA 病毒，属于小核糖核酸病毒科的 Senecavirus 属^[1,2]。SVA 基因组长约 7.3 kb，由一个 5'-非翻译区（UTR）、一个 3'-UTR 和一个开放阅读框（ORF）组成^[2]。该 ORF 编码一个多聚蛋白，随后被切割形成 12 种成熟蛋白。该多聚蛋白由 1 个 5'前导肽（L）、4 个结构蛋白（VP1、VP2、VP3、VP4）、3 个非结构蛋白（2A、2B、2C）和 4 个其他非结构蛋白（3A、3B、3C、3D）组成^[2]。这些元件按照标准顺序“L-4-3-4”从 n-末端排列到 c-末端，这是小核糖核酸病毒多蛋白的特征^[2]。

在发现 SVA 后不久，养猪业未能将 SVA 视为重大威胁，因其在猪中的感染率较低，并且明显缺乏致病性。然而，在 2007 年加拿大一家养猪场报告了 SVA 诱发的 PIVD 病例，其特征是临床体征类似于特发性水疱病（IVD）^[1]。这些体征包括沿着蹄和腿之间的冠状带连接处出现的破裂水疱，导致冠状带肿胀和漂白，蹄垫和边缘之间的组织分离，以及腿上的露爪脱落。

自 2014 年底以来，在北美、巴西和其他国家的多个地区，猪群中发生了大规模 SVA 疫情^[3-6]。在这些疫情之后，中国于 2015 年首次报告了疫情，随后蔓延到湖北、河南、黑龙江、福建和其他省份，导致猪肉生产明显减少和巨大的经济损失^[6-10]。有趣的是，随着该病毒在中国的持续传播，最初对养殖猪的高毒力逐渐减弱。这种变化导致频繁的亚临床感染，使早期发现感染猪和有效控制疾病传播变得困难。因此，新的 SVA 亚型的出现和传播给全球猪肉行业带来了重大挑战。由于市场上缺乏可用于预防和控制 SVA 感染和传播的有效商品化疫苗，这一威胁进一步加剧。

研发有效预防 SVA 感染和传播的候选疫苗面临诸多挑战，如疫苗安全性和猪体内免疫性能测试相关的高成本、SVA 快速进化以及缺乏合适的 SVA 易感动物模型等。然而，使用小鼠模型评估 SVA 候选疫苗为了解与疫苗效力相关的因素提供了有价值的见解^[6,12]。此外，一些研究强调了佐剂配方在增强 SVA 灭活疫苗诱导的适应性免疫应答中的关键作用^[13,14]。但更适合制备 SVA 灭活疫苗的佐剂仍需进一步筛选。

本研究成功分离鉴定了一株吉林省 SVA 毒株 SVA CH/JL/2022，以 SVA CH/JL/2022 为免疫原，结合 4 种佐剂：MONTANIDE™ GEL02 PR（GEL02）、

MONTANIDE™ ISA 201 VG (ISA 201)、MONTANIDE™ IMS 1313 VG N (IMS1313)和 Rehydragel LV (LV),制备了4组灭活疫苗。将SVA-ISA 201 (SVA-ISA)、SVA-IMS1313 (SVA-IMS)、SVA-GEL 02 (SVA-GEL)和SVA-LV分别接种于小鼠,评估疫苗的免疫原性和对SVA感染的体内保护作用,以选择最合适的灭活疫苗的佐剂,为研究SVA疫苗提供新思路,为我国防止SVA的传播提供参考。

第一篇 文献综述

第 1 章 猪 A 型塞内卡病毒研究进展

A 型塞内卡病毒首次发现于 2002 年美国的马里兰州盖斯堡，由“塞尼卡河州立公园（Seneca Creek State Park）”附近的实验室偶然发现，科研人员从被胎牛血清或猪胰蛋白酶污染的人胚胎视网膜细胞（PER.C6）系中首次分离出塞内卡谷病毒，并将该株病毒命名为 SVV-001^[15]。在随后的研究中发现 SVV 具有与心病毒属相关病毒相似的特征，证明与其有较近的亲缘关系^[2]，还发现其具有溶瘤病毒特性，对神经内分泌源性肿瘤具有有效的杀伤性，例如非小细胞肺癌和儿童神经内分泌肿瘤^[15-17]。起初因早期 SVV 分离株对猪感染率较低，且无明显的致病性，并未引起养猪业的广泛重视^[5,15,18]。自 2014 年底北美、巴西等国家的多个地区的猪群发生大面积的猪水疱性疾病的爆发，并从病猪的多个组织中检测出塞内卡谷病毒^[3,5,16,19]。2015 年，SVV 被国际病毒分类委员会（ICTV）更名为“A 型塞内卡病毒”（Senecavirus A,SVA），其所在的属命名为塞内卡病毒属（Senecavirus）^[20]。同年，SVA 首次在中国广东地区被发现，随后蔓延至湖北、河南、黑龙江和福建等其他省份，造成了生产和经济上的严重损失^[8,21,22]。目前，SVA 的流行范围正在逐渐扩大，在巴西、加拿大、哥伦比亚、泰国、美国、中国、越南、澳大利亚等国家的猪群中均有 SVA 疫情的爆发^[3,5,19]。中国猪场 SVA 的毒力随着传播逐渐减弱，导致亚临床感染情况频繁出现，增加了对该病的防治难度^[11]。SVA 的主要临床症状与口蹄疫病毒、猪水疱疹和水疱性口炎病毒等水疱性病毒病极为相似，并且与 7 日龄仔猪的存活率紧密相关，对养猪业的生产经济有着重大的威胁。因此随着人们广泛关注，关于 A 型塞内卡病毒的研究也越来越丰富，为 SVA 的防治提供了帮助。

1.1 SVA 病原学简介

1.1.1 SVA 分类

A 型塞内卡病毒（Senecavirus A,SVA）旧称塞内卡谷病毒（Seneca valley virus,SVV），是微 RNA 病毒科塞内卡病毒属（Senecavirus）的唯一成员，通过基因组测序分析，在微 RNA 病毒中与心病毒属（Cardiovirus）亲缘关系最为接

近^[2,23]。

1.1.2 形态与结构

A型塞内卡病毒是无囊膜的线性不分节段、单股、正链RNA病毒，其病毒粒子结构与口蹄疫病毒较为相似，呈典型的对称正二十面体球型结构，直径为25-30nm左右^[18]。

1.1.3 基因组结构

SVA基因组的长度约为7.2-7.3kb，由5'端的5'非翻译区（5'-Untranslated region,5'-UTR）、一个大的开放阅读框（Open reading frame,ORF）和3'端的3'非翻译区（3'-Untranslated region,3'-UTR）组成。其中5'末端包含基因组连接蛋白（Viral Protein Genome-Linked,VPg）序列和1个内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site,IRES），因其结合方式与经典猪瘟病毒（CSFV）和丙型肝炎病毒（HCV）基本一致，所以该内部核糖位点又称为IV型IRES^[24]；并且3'UTR下游部位包含一个多聚腺苷酸（polyA）尾巴^[2,25]。

SVA作为微RNA病毒，拥有与其它微RNA病毒基因组相同的特征，其基因组布局呈典型的L-4-3-4排列。SVA仅有一个较大的ORF阅读框，由P1、P2和P3组成的包含2181个氨基酸的多聚蛋白前体构成，可被病毒和编码细胞蛋白酶切割。首先，多聚蛋白前体被水解成先导蛋白（Lpro）和P1、P2、P3这三个主要的多聚蛋白；随后P1、P2、P3被进一步水解成四种结构蛋白（1A、1B、1C、1D）和七种非结构蛋白（2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D）^[2,25-27]。其中最保守的区域是Lpro，较为保守的区域为3B蛋白、3D蛋白和VP4蛋白^[27]。

P1可被病毒自身的非结构蛋白3C水解成VP0、VP1（1D）、VP3（1C），当VP0成熟时可被进一步加工形成VP2（1B）、VP4（1A）。SVA的衣壳蛋白由60个拷贝的VP1、VP2、VP3和VP4结构蛋白组成，其中VP1、VP2、VP3三种形状相似的衣壳蛋白相互交织折叠排列暴露于病毒的外表面，并与细胞表面炭疽毒素受体1（ANTXR1）和一些其他潜在的细胞受体相互作用，进而引起宿主发生感染；VP4则位于病毒粒子衣壳的内侧^[26,28,29]。

P2和P3一共被水解成7种非结构蛋白，又称为功能蛋白主要参与蛋白质的加工和病毒复制的过程。P2被水解成2A、2B和2C，其中2A蛋白的形成机制与其他蛋白相比较为特殊，全部蛋白只由9个氨基酸组成，与心病毒的2A蛋白

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/388046014112006141>