

高致病性 PRRSV 浓缩灭活疫苗的研制及免疫效果

田永祥, 杨克礼*, 段正赢, 周丹娜, 郭锐, 刘泽文, 袁芳艳, 孟丽 (湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 动物胚胎工程与分子育种湖北省重点实验室, 湖北武汉 430064)

摘要 [目的] 研制高致病性 PRRSV 浓缩灭活疫苗。[方法] 分别以病毒液、病毒浓缩液作为抗原, 以甲醛、 β -丙内酯为灭活剂, 制成 A、B、C、D 4 种灭活疫苗, 进行物理性状和无菌检验, 安全检验合格后, 与商品疫苗 E 进行免疫效果比较。[结果] 4 种疫苗均有良好的安全性。免疫后 35 d, 未浓缩抗原的 A、C 疫苗及商品疫苗 E 组抗体均未阳转, 浓缩抗原的 B、D 疫苗组抗体阳转率分别达到 80% 和 100%。[结论] 浓缩病毒液制成的灭活疫苗比未浓缩病毒液制成的灭活疫苗及商品疫苗具有较好的免疫效果。

关键词 高致病性 PRRSV; 浓缩; 灭活疫苗; 免疫效果

中图分类号 S852.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)16-150-02

Development and Efficacy of Concentrated Inactivated Vaccines against Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

TIAN Yong-xiang, YANG Ke-li*, DUAN Zheng-ying et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Hubei Key Laboratory of Animal Embryo and Molecular Breeding, Wuhan, Hubei 430064)

Abstract [Objective] The research aimed to develop vaccine against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome. [Method] Using virus and concentrated virus as antigen, and using formaldehyde and β -propiolactone as inactivator, four inactivated vaccines against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome were prepared respectively. After the physical behavior, sterilizing test, and the safety test, the immunity effect of these four kinds of vaccines and one commercial vaccine were compared. [Result] These four kinds of vaccine all had good safety. After immunization 5 weeks, the specific antibody titers produced by concentrated inactivated vaccines B and D were 80% and 100% respectively, while no specific antibody titers produced by the unconcentrated inactivated vaccines A, C and the commercial vaccine E. [Conclusion] The immune effect of inactivated vaccines prepared with concentrated virus was better than those prepared with unconcentrated virus and the commercial vaccine in this study.

Key words Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome; Concentrated; Inactivated vaccines; Immune effect

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 俗称猪蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的猪的具有高度传染性的病毒性疾病。任何年龄的猪均会被该病毒感染, 其临床表现主要为: 怀孕母猪感染后出现流产、早产和死胎等综合繁殖障碍性疾病, 仔猪和育肥猪感染后则多出现呼吸道综合症状^[1-3]。1987年, 该病毒引起的疾病首次发现于美国, 随后几年迅速在美洲、欧洲及亚洲的许多国家广泛流行, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失^[4]。我国最早于1995年底发现此病, 随后的2年内先后有研究人员分离到此病毒^[5-6], 目前 PRRSV 仍然在我国很多省(市)的猪群内流行, 是严重影响规模化养猪场健康可持续发展的主要疫病之一^[7]。2006年, 我国南方一些省份猪场暴发的高致病性猪蓝耳病传播迅速, 在短短的半年内几乎传遍了大半个中国, 特别是在养猪业比较发达的省份造成了巨大的经济损失^[8-11]。

对猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)的预防, 目前大多采用免疫注射的方法, 临床上常用的疫苗主要有2种: 弱毒苗和灭活苗。弱毒苗注入猪体内的效果与感染野毒基本相同, 只是病毒无致病性, 能够诱导较强的有效免疫力, 但弱毒苗接

种体内后疫苗毒会在体内增殖, 因此接种弱毒苗的猪有可能将疫苗病毒排出传递给尚未接种疫苗的猪, 或者可能出现弱毒返强而引发疾病。灭活苗的安全性大大高于弱毒苗, 并且不存在散毒的危险, 但灭活苗诱导有效免疫力的能力较差。此外, PRRSV 有抗体依赖增强作用的特点, 低水平的抗体可能是诱发该病的原因之一。因此, 研究能产生有效水平抗体的高效灭活疫苗具有现实意义。为了获得能够产生有效保护力的猪高致病性 PRRSV 疫苗, 笔者在对高致病性 PRRSV 进行流行病学调查和病原分离与鉴定的基础上, 进行了 PRRSV 浓缩灭活疫苗的研制, 并研究了其疫苗免疫效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 疫苗用毒株。 PRRSV EZ 株, 由动物胚胎工程与分子育种湖北省重点实验室分离、鉴定与保存。

1.1.2 灭活疫苗。 试制苗是采用 EZ 株 Marc145 细胞培养浓缩物, 经灭活后加入油佐剂乳化而成。对照苗为购买的商品灭活苗。

1.1.3 试验动物。 30~45 日龄 PRRS 抗体阴性仔猪 100 头, 购自湖北省农业科学院畜牧兽医研究所试验猪场。

1.1.4 试剂。 PRRS 抗体检测试剂盒, 为 IDEXX 公司产品, 购自北京爱德士元亨生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 疫苗制备。 将制苗毒株接种已长成单层的 Marc145 细胞, 按照 5% 的剂量接种病毒液, 37 °C 条件下吸附 1 h 后, 加入维持液, 置于 37 °C 条件下继续培养。当细胞病变达 70% 以上时收获, 置于 -20 °C 条件下冻融 2 次, 取样测定毒

基金项目 湖北省农业科技创新中心项目(2011-620-001-003); 湖北省重点自然科学基金(2012FFA067); 湖北省重点新产品新工艺研究开发项目(2012BBA15004); 动物胚胎及分子育种湖北省重点实验室开放课题(2013ZD156)。

作者简介 田永祥(1965-), 男, 湖北武汉人, 研究员, 从事动物疫病防控研究。* 通讯作者, 助理研究员, 硕士, 从事动物传染病研究。

收稿日期 2015-04-16

价。将已冻融 2 次的病毒收集液以 40 000 r/min 离心 3 h,用 TEN 洗涤沉淀(体积为收集液的 1/10,即浓缩 10 倍)。将病毒液和浓缩病毒液按以下分组进行灭活:A、B 组分别将病毒液、病毒浓缩液按终浓度为 0.1% 的比例加入甲醛溶液,混匀,置于 37 °C 条件下灭活 18 h 取出,置于 2~8 °C 条件下保存。C、D 组分别将病毒液、病毒浓缩液按终浓度为 0.1% 的比例加入 β -丙内酯,混匀,置于 37 °C 条件下灭活 2 h 取出,置于 2~8 °C 下保存。

分别取上述检验合格的灭活病毒悬液 96 份,加入 4 份灭菌吐温-80,搅拌均匀制成水相。取 10#白油 94 份,加入 6 份司本-80,硬脂酸铝 2 份,加热搅拌溶化后 116 °C 下灭菌 30 min,制成油相。水相与油相接 1:1.5 的比例分别制成 4 种油佐剂灭活苗,即 A 苗(甲醛灭活未浓缩病毒苗)、B 苗(甲醛灭活浓缩病毒苗)、C 苗(β -丙内酯灭活未浓缩病毒苗)、D 苗(β -丙内酯灭活浓缩病毒苗)。

1.2.2 4 种疫苗的物理性状检验。按照《中华人民共和国兽药典》3 部 2010 年版中的方法,分别对 4 种灭活疫苗的注射剂型、稳定性等物理性状检验。

1.2.3 4 种疫苗的无菌检验。按照《中华人民共和国兽药典》3 部 2010 年版中的方法,分别对 4 种灭活疫苗进行细菌、霉菌、支原体的检测。

1.2.4 4 种疫苗的安全性检验。4 种灭活疫苗分别接种 18~20 g 小鼠 10 只,皮下注射 0.2 ml/只,观察 14 d,小鼠全部健活为合格。

1.2.5 4 种疫苗的免疫效果试验。将 PRRS 抗体检测为阴性的 30~45 日龄仔猪 100 头随机分成 5 组,每组 20 头,分别肌肉注射 A、B、C、D 自制灭活疫苗和市售商品灭活疫苗(E 苗)2 ml。分别于注射疫苗 3、4、5 周时静脉采血分离血清,检测 PRRS 抗体。

1.2.6 抗体检测方法。采用 IDEXX 公司 PRRS 抗体检测试剂盒,按照试剂盒说明书进行操作。试验结果有效的条件为:阳性对照 PRRSV 孔 OD 值-阴性对照 PRRSV 孔 OD 值 ≥ 0.15 ,阳性对照 NHC 孔 OD 值 ≤ 0.12 ,阴性对照 NHC 孔 OD 值 ≤ 0.25 。PRRSV 抗体的结果判定标准为:当 S/P 值 ≥ 0.4 时,被检样品为阳性;当 S/P 值 < 0.4 时,被检样品为阴性。

2 结果与分析

2.1 4 种疫苗的物理性状检验 按照现行兽药典的方法进行检验,4 种灭活疫苗均为混悬液,混合均匀,无分层现象,达到油乳剂灭活疫苗标准。

2.2 4 种疫苗的无菌检验结果 按照现行兽药典的方法进行检验,发现 4 种灭活疫苗均无细菌、霉菌及支原体生长,无菌检验合格。

2.3 4 种疫苗的安全性检验结果 4 种疫苗所接种的 18~20 g 小鼠 10 只,于接种后连续观察 14 d,均全部健活,存活率为 100%,安全检验合格。

2.4 免疫后抗体检测结果 抗体检测结果表现,注射疫苗 3~5 周后,用甲醛或 β -丙内酯灭活未浓缩病毒液自制的 A

苗、C 苗组及商品苗 E 苗组抗体均未阳转;用甲醛或 β -丙内酯灭活病毒浓缩液自制的 B 苗、D 苗组抗体阳转率分别为 20%、40%、80% 和 40%、60%、100% (表 1)。

表 1 免疫后仔猪 PRRS 抗体的检测结果

组别	抗体阳性率/%		
	免疫 3 周	免疫 4 周	免疫 5 周
A	0	0	0
B	20	40	80
C	0	0	0
D	40	60	100
E	0	0	0

3 讨论

该试验结果表明,浓缩病毒液制成的灭活疫苗比未浓缩病毒液制成的灭活疫苗及商品疫苗具有较好的免疫效果,能够在免疫后相同时间内产生抗体,有利于临床上该病的免疫预防。该疫苗系用从湖北省分离的猪繁殖与呼吸综合征高致病性病毒制成的油乳剂灭活苗,针对性强、产毒稳定、免疫原性良好。因此,用该病毒作为抗原制备疫苗对控制高致病性 PRRSV 以及减轻目前该病对湖北省部分猪群造成的危害意义重大。

该研究中笔者观察到疫苗免疫后出现阳性抗体的时间较长,符合油佐剂灭活疫苗特点。未浓缩抗原疫苗及商品疫苗在免疫后 35 d 仍未出现能检测到的 PRRS 阳性抗体,而浓缩抗原疫苗在免疫后 21 d 部分猪出现能检测到的 PRRS 阳性抗体,28 d 左右半数或接近半数抗体阳转,抗体阳转高峰出现在免疫后 5 周,初步表明 PRRSV 灭活疫苗的免疫效果与抗原浓度有直接的关系。

免疫后 3~5 周,用 β -丙内酯灭活的 D 苗比用甲醛灭活的 B 苗抗体阳转数高,说明 PRRSV 灭活苗用 β -丙内酯作病毒抗原灭活剂效果较好。

该研究中浓缩灭活苗免疫后抗体阳转高峰出现时间与 Yoon 等^[12]报道基本一致,而与以前国内报道的用 PRRS 油乳剂灭活疫苗免疫后 20 d 左右达到抗体高峰有一定差异^[13-14]。是否与抗原差异、检测方法及试剂盒有关,则有待进一步研究。

笔者制备的 PRRSV 浓缩灭活疫苗,没有弱毒苗残余毒力或毒力返强导致 PRRS 暴发流行的危险,并便于运输和保存,并且具有对母源抗体无干扰作用的优点,适于国内受高致病性 PRRSV 威胁的猪群使用。

参考文献

- [1] HILL H. Overview and history of mystery swine disease (swine infertility and respiratory syndrome) [C]//Proceedings of the mystery swine disease communication meeting. Denver, CO, 1990:29-31.
- [2] CAVANAGH D. Nidoviridae: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae [J]. Arch Virol, 1997, 142:629-633.
- [3] MAYO M A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV [J]. Arch Virol, 2002, 147:1655-1656.
- [4] ALBINA E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): An overview [J]. Vet Microbiol, 1997, 55(1/4):309-316.
- [5] 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, 18(2):1-4.

℃。多云时最高气温升温幅度山地比湖滨高 2.1~3.8℃,最大升温月分别出现在冬末春初和秋季,最小升温月分别出现在夏季和冬季。

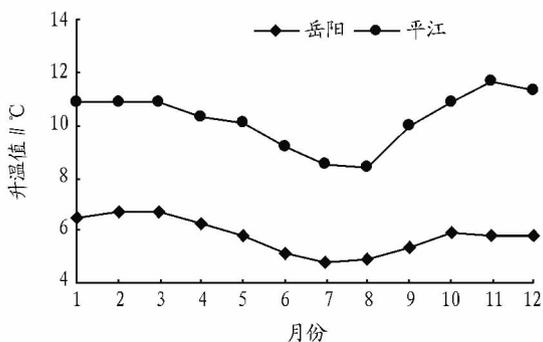


图2 1994~2013年岳阳和平江少云时逐月最高气温升温幅度分布

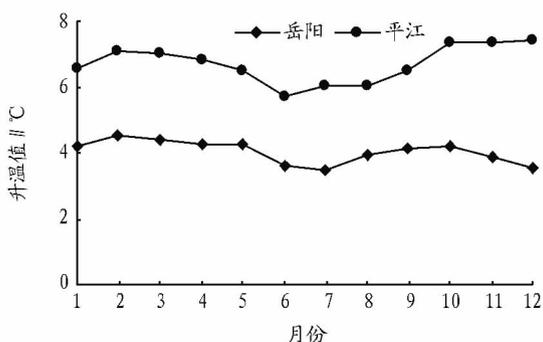


图3 1994~2013年岳阳和平江多云时逐月最高气温升温幅度分布

2.4 阴天 从图4可看出,阴天时最高气温升温幅度平江略高于岳阳,岳阳站在 1.6~2.5℃,平江站在 2.1~3.3℃,阴天时山地比湖滨最高气温升温幅度高 0.3~1.1℃;季节特征为冬季均小于其他季节。

3 小结

天空状况分类统计结果显示,晴天时山地最高气温升温幅度为 10.0~14.9℃,比湖滨最高气温升温幅度高 5.3~7.0℃;少云时山地最高气温升温幅度为 8.4~11.7℃,比湖滨最高气温升温幅度高 3.6~5.9℃;多云时山地最高气温升温幅度为 5.7~7.4℃,比湖滨高 2.1~3.8℃;阴天时山地

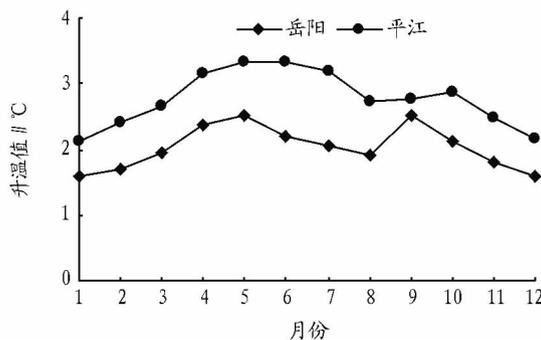


图4 1994~2013年岳阳和平江阴天时逐月最高气温升温幅度分布
最高气温升温幅度为 2.1~3.3℃,比湖滨高 0.3~1.1℃。

季节差异显示,晴天时山地与湖滨最高气温升温幅度最大升温月均出现在冬末春初,最小升温月均出现在夏季;少云时最高气温升温幅度最大月湖滨出现在冬末春初、山地出现在秋季,最小升温月山地与湖滨均出现在夏季;多云时最高气温升温幅度最大升温月山地与湖滨分别出现在冬末春初和秋季,最小升温月分别出现在夏季和冬季;晴天、少云、多云时升温幅度夏季低于其他季节,阴天时升温幅度冬季均小于其他季节。

参考文献

- [1] 喻长建,喻宇,王威. 岳阳区域最低气温差异分析[J]. 沙漠与绿洲气象,2015,9(2):52-56.
- [2] 马亚维,任哲,王英俊. 近百余年来全球气温长期变化趋势分析[J]. 山东气象,2014,34(1):21-24.
- [3] 齐贵英. 阿勒泰地区 1962-2008 年最高最低气温变化特征分析[J]. 沙漠与绿洲气象,2011(3):33-37.
- [4] 刘海涛,张向军,李绣东,等. 和田河流域 1954-2007 年气温及降水气候特征分析[J]. 沙漠与绿洲气象,2009(4):22-25.
- [5] 孙翠凤,窦坤,徐国栋,等. 近 50a 菏泽气温与高低温日数变化特征分析[J]. 山东气象,2014,34(2):20-25.
- [6] 黄菊梅等. 近 60a 来洞庭湖区气温的变化特征[J]. 气象科学,2013(4):457-463.
- [7] 孙东霞,杨建成. 克拉玛依高温日数的气候特征及持续高温过程环流分析[J]. 沙漠与绿洲气象,2010,4(1):12-15.
- [8] 喻长建,喻宇. 岳阳气温预报系统研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(27):9459-9460.
- [9] 陈春艳,李如琦,唐治,等. 日较差分级的新疆逐时气温预报[J]. 沙漠与绿洲气象,2007,1(2):10-12.
- [10] 贾丽红. 新疆 15 个地州首府城市最高最低温度预报检验[J]. 沙漠与绿洲气象,2013,7(1):16-20.

(上接第 151 页)

- [6] 杨汉春,管山红,尹晓敏,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志,1997,23(11):3-5.
- [7] CHEN J, LIU T, ZHU C G, et al. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence[J]. Biochem Genet,2006,44:421-431.
- [8] TIAN K G, YU X L, ZHAO T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. PLoS One,2007,2(6):526.
- [9] TONG G Z, ZHOU Y J, HAO X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome in China[J]. Emerg Infect Dis,2007,13(9):1434-1436.
- [10] 杨克礼,梁望旺,伍锐,等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒湖北株

- 的分离与鉴定[J]. 畜牧与兽医,2009,41(11):60-63.
- [11] 杨克礼,曹宏云,田永祥,等. 高致病性猪蓝耳病毒湖北分离株细胞培养特性研究[J]. 江西农业学报,2010,22(9):103-106.
- [12] YOON K J, ZIMMERMAN J J, MCGINLEY M J, et al. Failure to consider the antigenic diversity of porcine reproductive and respiration syndrome virus isolates may lead to misdiagnosis[J]. Vet Dian Invest,1995,3(3):386-387.
- [13] 仇华吉,郭宝清,董光志,等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1 α 株的基因型鉴定[J]. 中国兽医学报,1996,18(2):118-121.
- [14] 金光明,杨倩. 猪繁殖与呼吸综合征免疫学研究[J]. 安徽农业科学,2003,31(1):111-114,116.