

猪伪狂犬病基因缺失疫苗的制备、安全性、免疫原性、保存期测定及区域试验

何启盖, 方六荣, 吴 斌, 刘正飞, 吴美洲, 肖少波, 金梅林, 陈焕春*

(华中农业大学动物医学院预防兽医学湖北省重点实验室,
农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

摘 要: 为了提供有效的伪狂犬病疫苗, 用鸡胚成纤维细胞扩大培养了 PrV HB-98 突变株(TK⁻/gG⁻/LacZ⁺), 研制了伪狂犬病基因缺失疫苗, 并对该疫苗经肌肉接种、经口等免疫途径的最小免疫剂量进行了测定, 同时也对 4 批疫苗的安全性、效力、免疫期和保存期进行了检测; 同时将 4 批疫苗用于免疫 23 个猪场的母猪、新生仔猪和育肥猪进行区域试验。测定结果表明, 疫苗经上述两种途径接种对不同阶段猪的最小免疫剂量均为 10^{5.0}TCID₅₀; 10 倍免疫剂量的疫苗对初生仔猪、15 日龄仔猪和妊娠母猪是安全的, 免疫猪能抵抗强毒的攻击; 疫苗在 4 ℃和- 20 ℃下分别可保存 6 个月和 12 个月。对伪狂犬病毒抗体阴性的 70 日龄商品猪和种猪的免疫期为 6 个月。田间试验表明, 4 批猪伪狂犬病基因缺失疫苗安全有效, 并可用于仔猪发病时的紧急接种。为猪伪狂犬病基因工程疫苗的制备与应用提供了有力的依据。

关键词: 伪狂犬病基因缺失疫苗; PrV HB-98 突变株; 安全性; 免疫原性; 区域试验

中图分类号: S858. 285. 3; S852. 5⁺ 2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)10-1055-09

猪伪狂犬病可引起母猪繁殖障碍, 主要表现流产、产死胎、木乃伊胎或弱仔, 1~ 15 日龄仔猪感染后死亡率可达 80%~ 100%, 育肥猪生长缓慢, 种公猪精液品质下降, 丧失种用价值, 给养猪业带来严重的经济损失^[1-4]。应用基因缺失疫苗实施免疫是预防猪伪狂犬病的根本措施, 结合使用相应的 gE-ELISA、gG-ELISA 或 gC-ELISA 等鉴别诊断方法将野毒感染猪与免疫猪相区分, 是开展本病根除计划的主要途径。目前我国所使用的弱毒活疫苗是以国外引进的分离自牛的伪狂犬病毒 gE 基因缺失的 Bartha 株为基础研制的疫苗, 我国尚无以自行分离的毒株研制的活疫苗。近几年来, 许多试验表明, 伪狂犬病 gG 基因缺失疫苗毒株的免疫效力优于包括 Bartha 株在内的一些 gE 基因缺失疫苗^[5,6], 究其原因, 这是由于 Bartha 株中所缺失的 gE 基因是该病毒诱导机体免疫反应的重要组成部分之一, 此外, Bartha 株除了缺失 gE 基因外, 也缺失了编码 gC、

11 K、28 K 等蛋白的基因^[7-9], 而 gC 糖蛋白也是伪狂犬病毒的重要免疫原之一。

在前期工作中, 笔者以自行分离的猪源伪狂犬病毒鄂 A 株为亲本毒株, 构建了一系列以缺失胸苷激酶基因(TK)为特征的突变株, 有较好的安全性和免疫原性^[10]。将其中 TK 和 gG 双基因缺失株命名为 PrV HB-98 株。生物学特性测定表明, PrV HB-98 突变株双基因缺失株具有很好的安全性和稳定性, 并能在接种的动物中激发较强的免疫反应, 是较为理想的疫苗候选毒株。为了满足我国养猪业对安全有效伪狂犬病基因缺失疫苗的大量需求, 预防和控制伪狂犬病的发生和蔓延, 笔者以该缺失株为材料, 进行了疫苗的制备、安全性、免疫原性、保存期测定及田间试验等。

1 材料与方 法

1.1 病毒与细胞

伪狂犬病毒鄂 A 野毒株由本室分离鉴定保存^[11], PrV HB-98 双基因缺失株为本室构建保存^[11], PK-15、BHK-21 细胞等, 均由本室保存。

1.2 试验动物

1 日龄、14 日龄仔猪、70 日龄育肥猪和妊娠 50~ 60 d 母猪, 购自健康猪场, 经乳胶凝集试验或中和试验证实为伪狂犬病毒抗体阴性。

收稿日期: 2004-10-19

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2002BA514A-18); “863”计划(2001AA213051; 2002AA241341)

作者简介: 何启盖(1966-), 男, 贵州荔波人, 副教授, 主要从事动物传染病防治研究。E-mail: heqigai@yahoo.com

* 通讯作者: 陈焕春, Tel: 027-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

1.3 PrV HB-98 株毒种的培养和滴定

将伪狂犬病毒 PrV HB-98 突变株接种于已长成单层的 PK-15 细胞, 37 °C 吸附 1 h, 加入含 5% 犊牛血清的 DMEM 液体培养基, 37 °C 恒温箱中培养, 待出现 80% 细胞病变时, 收获病毒液, 置 -20 °C 冰箱, 反复冻融 3 次, 按常规方法测定 TCID₅₀^[12]。种毒保存于 -70 °C 冰箱中。

1.4 弱毒疫苗的制备

1.4.1 疫苗病毒的增殖 将经检测无外源病毒污染的 PrV HB-98 株毒种作 10 倍稀释后接种于已长成单层的鸡胚成纤维细胞的 10 000 mL 转瓶, 吸附 1 h 后, 加入 1 000 mL 含 5% 犊牛血清的 Hanks 培养液, 置 37 °C 温室中转瓶培养, 转速为 6 r/h。待 80% 细胞病变后, 反复冻融 2 次, 收获病毒悬液。用 BHK-21 细胞测定 TCID₅₀。病毒液置 -70 °C 保存。

1.4.2 疫苗的制备与检测 将病毒液与经高压蒸气灭菌(121 °C 30 min)的保护剂按一定的体积比充分混合, 分装至灭菌的安瓶中, 每瓶装量 2.5 mL。按常规方法冻干, 随后随机抽取 5 瓶疫苗, 用 DMEM 溶解至冻干前的体积, 测定 TCID₅₀, 进行疫苗冻干前后病毒液效价变化测定; 并将溶解后的疫苗分别接种血清琼脂培养基和 DMEM 培养基, 37 °C 培养, 观察有无细菌生长。

1.5 疫苗最小免疫剂量的确定

将研制的基因缺失疫苗用稀释液溶解, 并稀释成每头份病毒含量分别为 10^{6.0} TCID₅₀、10^{5.0} TCID₅₀、10^{4.0} TCID₅₀ 和 10^{3.0} TCID₅₀ 4 个不同的剂量进行免疫。1 日龄仔猪经滴鼻或肌肉注射 2 种途径免疫, 70 日龄育肥猪和母猪经肌肉注射接种。每组 4~5 头。对照猪注射等量的稀释液。3 周后采血测定中和抗体, 根据抗体水平和抗体阳转率的高低, 确定最小免疫剂量。

1.6 疫苗的安全性测定

1.6.1 4 批疫苗对妊娠母猪的安全性 将已妊娠 3 个月的初胎母猪分为 5 组, 每组 4 头, 每头猪接种 10 头份疫苗(2 mL)。对照组接种等量的稀释液。注射后观察精神状态、产仔成绩以及仔猪的存活率等。

1.6.2 4 批疫苗对 1 日龄仔猪的安全性 选用 PRV 抗体阴性母猪所产的 1 日龄健康仔猪分成 5 组, 每组 10 头, 试验组肌肉注射 10 头份的疫苗(2 mL), 对照组接种等量的稀释液。接种后每日测定体温, 共测定 7 d, 并观察其食欲和生长状况。

1.6.3 4 批疫苗对 15 日龄仔猪的安全性 将 15

日龄仔猪分成 5 组, 每组 8 头。将 4 批疫苗分别按 10 头份的量(2 mL)经肌肉注射接种仔猪, 对照组接种等量的稀释液。接种后每日测定体温, 共测定 7 d, 同时观察临床症状和生长状况。

1.7 疫苗的免疫效力测定

1.7.1 4 批疫苗对妊娠母猪的效力测定 将 4 批疫苗经肌肉注射妊娠 50~60 d、且 PRV 抗体阴性的母猪, 每组 4 头, 对照组注射等体积的稀释液, 4 周后用 10^{7.0} TCID₅₀ 的 PRV 鄂 A 株进行攻毒, 观察母猪的精神状况和产仔情况。

1.7.2 4 批疫苗对仔猪的效力测定 对抗体阴性母猪所产仔猪, 用 4 批疫苗分别进行肌肉注射免疫, 每组 9 头, 同时设只注射等量稀释液的对照, 3 周后用 10^{7.0} TCID₅₀ 的 PRV 鄂 A 强毒进行攻毒, 观察仔猪的临床表现, 共观察 4 周。

1.8 4 批疫苗的免疫期测定

选用 70 日龄抗体阴性商品猪和种猪进行免疫期的测定。2 个阶段的猪各分 5 组, 每组 4 头, 其中 4 组分别用 4 批疫苗进行免疫, 另一组注射等量的稀释液作对照, 于免疫后每隔 1 个月采血, 测定中和抗体水平。

1.9 4 批疫苗的保存期试验

将 4 批疫苗分别置 4~8 °C 和 -20 °C 条件下保存, 于不同时间取出, 将其稀释到每头份 1 mL, 然后按常规方法测定疫苗的毒价, 比较其毒价的变化。然后用在两种温度条件下保存最长时间而毒价又不发生变化的疫苗以 1 头份的量免疫 70 日龄 PRV 抗体阴性断奶仔猪, 每组 5 头, 同时设 1 组只接种稀释液的阴性对照组, 于免疫后 28 d 采血测定 PRV 中和抗体效价。

1.10 田间试验

1.10.1 母猪免疫试验 用上述 4 批疫苗分别对湖北省内外 5 个猪场的 2 102 头母猪进行免疫试验, 每批疫苗约免疫 520 头母猪, 免疫后观察母猪的临床表现, 并于免疫前和免疫后 1 个月分别采血, 测定部分母猪的血清中和抗体效价, 同时对免疫母猪与非免疫母猪的产仔成绩进行比较。

1.10.2 育肥猪的免疫试验 用上述 4 批疫苗分别对湖北省内外曾经发生伪狂犬病的 20 个猪场共 9 000 头 50~70 日龄猪进行免疫, 每批免疫 2 200 头左右, 免疫后观察免疫猪的临床表现, 并于免疫前和免疫后 1 个月分别采血, 测定中和抗体效价。

1.10.3 仔猪紧急接种试验 用上述 4 批疫苗对 6

个猪场发生伪狂犬病的仔猪进行滴鼻和肌肉接种, 观察其效果。

2 结果与分析

2.1 疫苗的制备

PrV HB-98 突变株在鸡胚成纤维细胞中扩大培养后, 其病毒含量为 $10^{5.3}$ TCID₅₀/0.1 mL, 然后加入保护剂混匀, 分装, 按照常规方法冻干后, 抽真空。疫苗为白色疏松海绵状, 真空度和水分测定达到要求, 加入稀释液后迅速溶解。将冻干苗用 DMEM 稀释至原体积, 测定 TCID₅₀ 为 $10^{5.29}$ TCID₅₀/0.1 mL, 两者差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 不同阶段猪最小免疫剂量的确定

2.2.1 新生仔猪 4 种不同剂量的疫苗经滴鼻或肌肉接种免疫仔猪后 3 周, 经颈静脉采血, 分离血清, 测定中和抗体效价, 结果 2 种不同接种途径的免疫效果相当, 都是以 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 免疫组的中和抗体水平明显高于 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 组, 并且 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 免疫组间无显著差异, 因此选择 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 为最小免疫剂量 (表 1、2)。

表 1 滴鼻免疫 3 周后仔猪的中和抗体水平

Table 1 The level of neutralization antibody in intranasally immunized piglets at 3 weeks postimmunization

分组	疫苗病毒含量(TCID ₅₀)	动物数量/头	抗体效价
Group	Vaccine dose (TCID ₅₀)	No. animals	Antibody level
1	$10^{6.0}$	7	1: (22.5 ± 5.8)
2	$10^{5.0}$	5	1: (26.8 ± 11.6)
3	$10^{4.0}$	5	1: (8.9 ± 5.9)
4	$10^{3.0}$	5	1: (6.52 ± 2.8)
对照	/	5	< 1: 2
Control	/	5	< 1: 2

表 2 肌肉注射疫苗 3 周后仔猪的中和抗体水平

Table 2 Neutralization antibody level in intramuscularly immunized piglets at 3 weeks postimmunization

分组	疫苗病毒含量(TCID ₅₀)	动物数量/头	抗体效价
Group	Vaccine dose (TCID ₅₀)	No. animals	Antibody level
1	$10^{6.0}$	5	1: (23.1 ± 4.6)
2	$10^{5.0}$	5	1: (25.5 ± 5.6)
3	$10^{4.0}$	5	1: (10.2 ± 4.8)
4	$10^{3.0}$	5	1: (7.5 ± 3.1)
对照	/	5	< 1: 2
Control	/	5	< 1: 2

2.2.2 育肥猪 以 4 种不同剂量的疫苗肌肉注射 70 日龄猪后 3 周采血测定中和抗体发现: $10^{4.0}$ 和 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 免疫组的中和抗体水平远低于其它 2 个免疫剂量组 ($10^{5.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀), 并且有部分猪的中和抗体为阴性, 而 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 免疫组所激发的中和抗体水平无显著差异, 因此确定 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 为育肥猪的最小免疫剂量。

表 3 育肥猪肌肉注射疫苗 3 周后的中和抗体水平 (n= 5)

Table 3 The neutralization antibody level of growing pigs 3 weeks postimmunization (n= 5)

分组	疫苗含量 (TCID ₅₀)	抗体产生情况 Antibody	
		效价 Titer	阳转率/%
Group	Vaccine dose (TCID ₅₀)	效价 Titer	Serore conversion
1	$10^{6.0}$	1: (40.8 ± 11.2)	100
2	$10^{5.0}$	1: (45.4 ± 10.5)	100
3	$10^{4.0}$	1: (7.6 ± 2.5)	60
4	$10^{3.0}$	1: (5.6 ± 2.1)	40
对照	/	< 1: 2	0
Control	/	< 1: 2	0

2.2.3 母猪 根据仔猪和育肥猪的试验结果, 鉴于母猪的试验成本高, 只进行了 $10^{6.0}$ 、 $10^{5.0}$ 、 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 3 个剂量的试验, 结果肌肉接种后 3 周, $10^{5.0}$ TCID₅₀ 和 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 免疫组抗体效价均大于 1: 20, 并且阳转率也都为 100%; 而 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 免疫组的抗体水平低, 阳转率也只有 50%, 因此选择 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 为母猪的最小免疫剂量 (表 4)。

表 4 母猪肌肉注射疫苗 3 周后的中和抗体水平 (n= 4)

Table 4 Neutralization antibody level of sows 3 weeks postimmunization (n= 4)

分组	疫苗含量 (TCID ₅₀)	抗体产生情况 Antibody	
		效价 Titer	阳转率/%
Group	Vaccine dose (TCID ₅₀)	效价 Titer	Serore conversion
1	$10^{6.0}$	1: (33.0 ± 17.3)	100
2	$10^{5.0}$	1: (22.1 ± 13.5)	100
3	$10^{4.0}$	1: (11.2 ± 6.8)	50
对照	/	< 1: 2	0
Control	/	< 1: 2	0

2.3 安全性

2.3.1 4 批疫苗对妊娠母猪的安全性 4 批疫苗接种母猪的产仔成绩分别为 38、38、40 和 37 头, 产仔成绩与对照组相近, 并且没有死胎、木乃伊胎和流产

等情况发生。由于本次试验所用的是初产猪,一般而言,产活仔数在 9 头左右就属于正常范围,因此,疫苗对母猪是安全的,对胎儿也没有影响(表 5)。

表 5 4 批伪狂犬病基因缺失疫苗肌肉接种妊娠母猪的安全性(n= 4)

Table 5 The safety test of 4 batches of pseudorabies gene negative vaccine in pregnant sows by intramuscular injection(n= 4)

疫苗批次 Batch	产活仔数 Living piglet	死胎 Stillbirth	木乃伊胎 Mummy	流产 Abortion
9901	38	0	0	无
9904	38	0	0	无
9905	40	0	0	无
9907	37	0	0	无
对照组 Control	39	0	0	无

2.3.2 4 批疫苗对 1 日龄仔猪的安全性 在 7 d 的观察期中,4 批疫苗肌肉注射新生仔猪后所有仔猪食欲正常,其中 2 批接种后,体温略有升高,但很快恢复正常,且无其它临床症状;另外 2 批疫苗接种后,体温波动在正常范围(图 1)。在随后的生长过程中,仔猪也没有出现腹泻、食欲下降等临床症状,生长状况正常,因此疫苗对 1 日龄仔猪是安全的。

2.3.3 4 批疫苗对 15 日龄仔猪的安全性 4 批疫苗接种 15 日龄的仔猪后体温无显著变化。同时,在整个观察期内试验猪精神和食欲正常,随后的生长也正常,这说明即使加倍剂量使用疫苗,对该阶段的仔猪也没有影响,是安全的(图 2)。

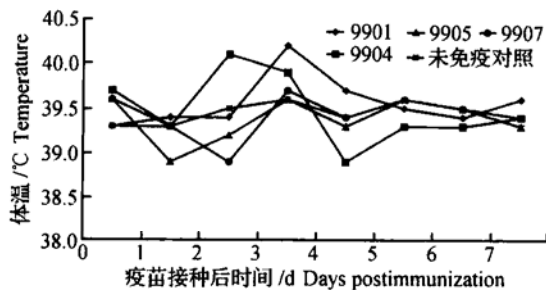


图 1 1 日龄仔猪接种不同批次疫苗后的体温变化
Fig. 1 The temperature variation of immunized 1-day old piglets

综上所述,4 批疫苗对妊娠母猪、1 日龄和 15 日龄仔猪均是安全的。

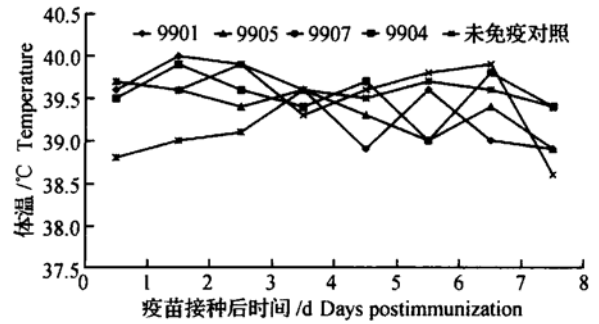


图 2 15 日龄仔猪接种不同批次疫苗后的体温变化
Fig. 2 The temperature variation of immunized 15-day old piglets

2.4 效力试验

2.4.1 4 批疫苗对妊娠母猪的效力测定 4 批疫苗免疫妊娠 50~ 60 d 的母猪 4 周后用 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 的鄂 A 强毒进行攻毒,结果在整个观察期,所有妊娠母猪在精神状况和食欲等方面均未表现可见的临床症状。到产仔时,疫苗免疫组每窝健活仔猪均达 9 头以上,而对照组共出现 6 头弱仔,20 头死胎,健活仔猪仅有 12 头(平均每窝为 3 头)。经方差统计检验,疫苗免疫组之间没有显著差异,但对照组与各疫苗组之间在产仔成绩上差异显著($P < 0.01$),说明基因缺失疫苗能提供较好的保护力。结果见表 6。

表 6 4 批疫苗对妊娠母猪的效力试验(n= 4)

Table 6 The efficacy test of 4 batches of pseudorabies vaccines in pregnant sows(n= 4)

疫苗批次 Batch	攻毒后产仔成绩 Reproductive capacity			
	弱仔 Weak piglet	死胎 Stillbirth	健活仔数 Health	木乃伊胎 Mummy
9901	3	0	37	0
9904	0	0	43	0
9905	0	0	40	0
9907	0	2	41	0
对照组 Control	6	20	12	0

攻毒剂量 $10^{7.0}$ TCID₅₀

Challenged with a dose of $10^{7.0}$ TCID₅₀

2.4.2 4 批疫苗对仔猪的效力测定 用 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 的鄂 A 强毒株对 4 批疫苗免疫的仔猪进行攻毒,结果免疫猪在攻毒后 1 d,体温略有升高,但很快恢复正常,没有死亡;对照猪在攻毒后体温升高达 40 °C 以上,持续 1 周,虽然没有出现死亡,但所有猪

表 7 4 批疫苗对 1 日龄仔猪的免疫保护试验 (n= 9)

Table 7 The protection test of 4 batches vaccines in newborn piglets (n= 9)

疫苗批次 Batch	仔猪免疫保护情况 Protective situation		
	体温/℃ Temperature	死亡数/头 Died piglet	腹泻/头 Diarrhea piglet
9901	< 40	0	0
9904	< 40	0	0
9905	< 40	0	0
9907	< 40	0	0
对照组 Control	> 40	0	6

攻毒剂量 $10^{7.0}$ TCID₅₀Challenged with a dose of $10^{7.0}$ TCID₅₀

出现腹泻、消瘦、增重缓慢的现象(表 7), 这一点与国外报道的伪狂犬病在日龄较大的猪仅导致增重迟缓、有时出现呼吸困难等症状相符。结果说明基因缺失疫苗对仔猪能提供良好的免疫保护。

2.5 免疫期

2.5.1 4 批疫苗对育肥猪的免疫期测定结果 4 批疫苗免疫 70 日龄商品猪后, 在免疫第 1 个月中和抗体效价即上升到 1: 20 以上, 第 2 个月达最高, 以后逐渐下降, 到第 4 个月仍保持在 1: 20 以上(表 8), 由此可见, 在育肥猪抗体水平至少可持续 4 个月, 因此完全能够保护仔猪在整个育肥期不发生伪狂犬病。

表 8 4 批疫苗对育肥猪的免疫期测定 (n= 4)

Table 8 The measurement of immunoprotective duration of 4 batches vaccines in growing pigs (n= 4)

疫苗批次 Batch	免疫后不同时间(月)的中和抗体水平 Neutralizing antibody levels at different month postimmunization			
	1	2	3	4
9901	1: (21 ± 2.3)	1: (47 ± 5.6)	1: (36 ± 3.2)	1: (22 ± 1.6)
9904	1: (26 ± 3.0)	1: (51 ± 6.2)	1: (40 ± 5.7)	1: (28 ± 1.5)
9905	1: (20 ± 2.5)	1: (44 ± 6.1)	1: (37 ± 2.5)	1: (21 ± 4.5)
9907	1: (21 ± 2.4)	1: (43 ± 5.1)	1: (36 ± 2.6)	1: (20 ± 2.1)
对照组 Control	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative	阴性 Negative

2.5.2 4 批疫苗对种猪的免疫期测定结果 4 批疫苗免疫种猪后, 在免疫后第 1 个月中和抗体即达到 1: 20 以上, 第 2 个月、第 3 个月达最高水平, 以后逐渐下降, 到第 4 个月、第 5 个月仍保持在 1: 20 以上, 具有保护力水平(另文报道), 第 6 个月时略低于

1: 20, 到第 7 个月仍为阳性(表 9), 由此可见, 疫苗免疫种猪后, 中和抗体至少可维持 6 个月, 即 4 批疫苗的免疫期均在 6 个月以上, 因此确定疫苗的免疫期为 6 个月。

表 9 4 批疫苗对种猪的免疫期测定 (n= 4)

Table 9 The measurement of immunoprotective duration of 4 batches vaccines in breeding pigs (n= 4)

疫苗批次 Batch	免疫后不同时间(月)的中和抗体水平 Neutralizing antibody levels of different month postimmunization						
	1	2	3	4	5	6	7
9901	1: (21 ± 2.1)	1: (48 ± 4.6)	1: (42 ± 3.1)	1: (28 ± 1.7)	1: (21 ± 2.1)	1: (17 ± 2.0)	1: (8 ± 1.7)
9904	1: (22 ± 2.8)	1: (52 ± 6.1)	1: (44 ± 4.6)	1: (31 ± 1.9)	1: (23 ± 2.3)	1: (18 ± 2.5)	1: (9 ± 2.0)
9905	1: (20 ± 2.4)	1: (45 ± 5.6)	1: (40 ± 2.4)	1: (25 ± 2.5)	1: (20 ± 1.9)	1: (15 ± 1.7)	1: (7 ± 1.5)
9907	1: (21 ± 2.3)	1: (46 ± 5.1)	1: (41 ± 2.4)	1: (26 ± 2.4)	1: (20 ± 1.7)	1: (16 ± 1.8)	1: (7 ± 1.6)
对照组 Control	< 1: 2	< 1: 2	< 1: 2	< 1: 2	< 1: 2	< 1: 2	< 1: 2

2.6 4 批疫苗的保存期试验

4 批疫苗分别置 4~ 8 ℃ 和 - 20 ℃ 条件下保存, 于不同时间取出, 测定疫苗的毒价, 结果发现在 4~ 8 ℃ 条件下保存 6 个月时毒价无显著变化, 保存 8

个月时, 毒价开始出现大幅度下降, 因此在 4~ 8 ℃ 下至少可保存 6 个月(表 10)。而在 - 20 ℃ 条件下保存 15 个月时病毒效价才出现明显的下降, 因此在 - 20 ℃ 至少可保存 1 年(表 11)。

表 10 4 批疫苗在 4~ 8 °C 条件下保存期试验 (n= 5)

Table 10 The shelf life of 4 batches vaccines under 4~ 8 °C (n= 5)

疫苗批次 Batch	冻干后疫苗效价 Vaccine titer after freezing and drying	保存不同时间(月)后疫苗效价/(TCID ₅₀ /mL) Vaccine titer after keeping for different months						
		1	2	4	6	8	12	15
9901	10 ^{-5.33}	10 ^{-5.33}	10 ^{-5.29}	10 ^{-5.15}	10 ^{-5.0}	10 ^{-4.55}	10 ^{-4.29}	10 ^{-4.0}
9904	10 ^{-5.23}	10 ^{-5.21}	10 ^{-5.20}	10 ^{-5.15}	10 ^{-5.03}	10 ^{-4.42}	10 ^{-4.10}	10 ^{-3.5}
9905	10 ^{-5.25}	10 ^{-5.25}	10 ^{-5.23}	10 ^{-5.17}	10 ^{-5.0}	10 ^{-4.55}	10 ^{-4.20}	10 ^{-4.0}
9907	10 ^{-5.31}	10 ^{-5.29}	10 ^{-5.26}	10 ^{-5.19}	10 ^{-5.08}	10 ^{-4.60}	10 ^{-4.28}	10 ^{-4.1}

表 11 4 批疫苗在 -20 °C 条件下保存期试验 (n= 5)

Table 11 The shelf life of 4 batches vaccines under -20 °C (n= 5)

疫苗批次 Batch	冻干后疫苗效价 Vaccine titer after freezing and drying	保存不同时间(月)后疫苗效价/(TCID ₅₀ /mL) Vaccine titer after keeping for different months						
		1	2	4	6	8	12	15
9901	10 ^{-5.33}	10 ^{-5.29}	10 ^{-5.33}	10 ^{-5.2}	10 ^{-5.2}	10 ^{-5.16}	10 ^{-5.10}	10 ^{-4.80}
9904	10 ^{-5.23}	10 ^{-5.21}	10 ^{-5.15}	10 ^{-5.16}	10 ^{-5.12}	10 ^{-5.10}	10 ^{-5.07}	10 ^{-4.80}
9905	10 ^{-5.25}	10 ^{-5.23}	10 ^{-5.20}	10 ^{-5.17}	10 ^{-5.10}	10 ^{-5.10}	10 ^{-5.06}	10 ^{-4.40}
9907	10 ^{-5.31}	10 ^{-5.23}	10 ^{-5.23}	10 ^{-5.2}	10 ^{-5.15}	10 ^{-5.13}	10 ^{-5.10}	10 ^{-4.50}

确定了疫苗在 -20 °C 保存 12 个月和 4~ 8 °C 下保存 6 个月毒价无显著变化后, 然后以分别在 -20 °C 或 4~ 8 °C 下保存 12 个月或 6 个月的疫苗分别免疫仔猪, 并于免疫后 28 d 采血测定中和抗体 (表 12), 结果两种条件下保存的疫苗所激发的抗体效价均在 1: 20 以上 (表 12), 与保存前疫苗免疫猪所诱导的抗体水平相当, 说明疫苗在 -20 °C 保存 12 个月或 4~ 8 °C 下保存 6 个月并不影响其免疫原性, 因此确定疫苗的保存期为 -20 °C 12 个月 4~ 8 °C 6 个月。

表 12 在不同温度下保存的疫苗免疫猪后 28 d 的抗体水平 (n= 5)

Table 12 The antibody levels of pigs 28 days after immunization with vaccine preserved at different temperature (n= 5)

疫苗批次 Batch	疫苗免疫猪后的平均中和抗体效价	
	-20 °C (12 个月)	4~ 8 °C (6 个月)
9901	1: (23.5 ± 2.2)	1: (24.2 ± 3.1)
9904	1: (22.5 ± 2.3)	1: (21.2 ± 1.1)
9905	1: (21.5 ± 1.6)	1: (22.2 ± 2.1)
9907	1: (20.5 ± 1.4)	1: (20.8 ± 1.9)
对照组 Control	< 1: 2	< 1: 2

2.7 田间试验结果

2.7.1 安全性观察 不同阶段猪进行疫苗接种后均没有出现精神、食欲异常、体温升高等不良反应, 注射部位无炎症、肿大等现象; 妊娠母猪没有出现一例流产、早产、产木乃伊胎或弱仔等, 说明所研制的疫苗对妊娠母猪、育肥猪和断奶仔猪均很安全。

2.7.2 免疫原性检测

2.7.2.1 母猪免疫后的抗体水平和产仔成绩: 共抽样检测了 203 头母猪免疫前后 1 个月的血清抗体, 结果 4 批疫苗在对具有不同抗体水平的母猪进行免疫后, 均能有效地激发妊娠母猪的抗体应答, 滴度处于 1: 23.6~ 1: 27.5 (表 13), 说明有低水平的母源抗体时并不影响疫苗的免疫效果。从产仔成绩看, 疫苗接种母猪的窝平均活仔数都在 9.20 头以上, 而对照猪的窝平均活仔数为 6.9 头, 疫苗接种组与对照组的窝平均活仔数相差 2.3 头以上, 两者差异显著, 说明疫苗免疫后能明显提高母猪的产仔成绩 (表 14)。

表 13 母猪免疫前后的血清中和抗体

Table 13 The antibody levels in sows in pre- or post-vaccination

疫苗批号 Batch	免疫猪头数 Immunized sows	抽检头数 Detected sows	中和抗体水平 Neutralizing antibody level	
			免疫前 Pre-vaccination	免疫后 1 个月 1 month after vaccination
9901	502	48	1: (6.0 ± 2.5)	1: (27.5 ± 3.5)
9904	500	49	1: (2.8 ± 1.2)	1: (24.1 ± 2.2)
9905	490	52	1: (3.75 ± 1.7)	1: (25.5 ± 4.1)
9907	610	54	1: (2.6 ± 1.9)	1: (23.6 ± 3.7)

表 14 接种不同批次疫苗妊娠母猪的产仔成绩

Table 14 The productions of sows accepted different batches of vaccines

疫苗批号	统计母猪数	产仔数	活仔数	窝平均活仔数	死胎数	窝平均死胎数
Batch	Detected sows	Litter size	Number of born alive	Mean number of born alive per litter	Number of stillbirth	Mean number of stillbirth per litter
9901	48	462	451	9.39	11	0.23
9904	49	470	456	9.31	14	0.29
9905	52	495	479	9.21	16	0.31
9907	54	512	497	9.20	15	0.28
对照	40	380	276	6.9	104	2.6
Control						

2.7.2.2 育肥猪免疫后的抗体水平:4批疫苗免疫的育肥猪,在免疫前后1个月共抽样检测了123头猪的抗体水平,结果免疫前所有猪的中和抗体效价

均在1:3以下,而免疫后1个月所有猪的抗体水平均有大幅度的上升,达1:22以上,说明所研制的疫苗对育肥猪也具有很好的免疫原性。

表 15 4批疫苗免疫育肥猪的抗体水平

Table 15 The antibody titers in piglets accepted 4 batches of vaccines respectively

疫苗批次	免疫育肥猪数	抽检头数	中和抗体水平 Neutralizing antibody level	
			免疫前 Pre-vaccine	免疫后1个月 1month after vaccination
Batch	Growing pigs immunized	Detected		
9901	2 360	30	< 1:2	1: (22.05 ± 4.2)
9903	2 400	31	< 1:2	1: (28.2 ± 5.1)
9904	2 200	30	< 1:2	1: (37.5 ± 6.3)
9907	2 300	32	1: 2.3	1: (31.2 ± 6.2)

2.7.2.3 断奶仔猪发生伪狂犬病的紧急接种结果:用研制的4批疫苗分别对6个猪场发生伪狂犬病出现腹泻的仔猪进行滴鼻和肌肉接种,结果滴鼻接种的发病仔猪在滴鼻后36h症状就得到了控制,而肌肉注射的发病仔猪大都在疫苗接种后48h症状才得到控制,说明在紧急接种时,研制的基因缺失疫苗无论是滴鼻还是肌肉注射,均可达到控制该病的目的,但滴鼻比肌肉注射的效果要快。

3 分析与讨论

伪狂犬病给养猪业造成严重的经济损失,预防该病的主要措施当推疫苗(尤其是基因缺失疫苗)的应用。我国已有灭活疫苗问世和使用^[13],灭活疫苗安全性好,能阻止伪狂犬病的临床症状和降低病毒的排出量,尤其是免疫母猪后能产生较高水平的母源抗体,给仔猪提供被动免疫^[14,15];事实上,在一些国家如法国、德国,规定只有灭活疫苗或亚单位疫苗才能用于种猪的免疫,并取得了较大的成功。但灭活苗不能将内源性蛋白抗原递呈给免疫系统,因而不能诱生细胞毒T细胞反应(CTL),而CTL可能

在保护性免疫反应中起主导作用;因此,国际上应用基因缺失疫苗并辅以区分野毒和疫苗病毒感染的鉴别诊断方法,有效地控制(甚至消灭)了此病。目前我国尚无以我国分离病毒株研制的基因缺失疫苗,为此笔者选用TK⁻/gG⁻/LacZ⁺突变株开展了基因缺失疫苗的研究。

在本试验中,证明10倍剂量的疫苗对1日龄、15日龄仔猪和母猪及胎儿没有副作用,与国外同类产品相当。这种极高的安全性主要来源于主要毒力基因TK基因的缺失,因此疫苗在免疫剂量时是相当安全的。

在最小免疫剂量的测定上,考虑到在用伪狂犬病基因缺失疫苗进行免疫时,一般采用肌肉注射,因此首先研究了仔猪、育肥猪和母猪肌肉注射免疫的最小剂量测定;同时根据国外的报道,滴鼻免疫有其独特的优点:(1)克服母源抗体的干扰^[16,17],对4~12周龄有母源抗体猪采用鼻内免疫比其它免疫途径效果要好^[18,19];(2)动物免疫并攻毒后,病毒排出时间要短于肌肉接种动物^[20];(3)更能抵抗病毒的攻击(体重不下降,不发热),所以笔者也对仔猪进行

了滴鼻接种试验。本试验结果表明,在伪狂犬病的免疫中, $10^{5.0}$ TCID₅₀和 $10^{6.0}$ TCID₅₀的免疫剂量在不同年龄猪中所激发的抗体水平无显著差异,这说明在临床没有必要使用加倍剂量的疫苗以达到产生双倍抗体的目的;但如果使用剂量低于 $10^{5.0}$ TCID₅₀,则所诱发的免疫反应较低,该结果与国外诸多疫苗所推荐的免疫剂量是一致的^[21,22],综合考虑疫苗最大程度的安全性和生产成本,确定了 $10^{5.0}$ TCID₅₀为最小免疫剂量。考虑到实际操作上的难度,笔者推荐使用的免疫途径为肌肉注射;但是,根据在实验室检测滴鼻接种猪同样产生良好的免疫应答和保护力,以及临床上将疫苗通过滴鼻接种出现以腹泻症状为主的仔猪时,达到了治疗以及预防的目的,滴鼻接种也不失为断奶前小猪的免疫途径之一。

按常规方法制备疫苗后,在冻干前后疫苗病毒效价没有明显的变化;其免疫持续期为半年,完全满足了临床上对商品用途的仔猪出生后免疫一次即可维持出栏的需求。此外,疫苗在4℃条件下保存6个月和-20℃下保存1年,免疫猪后产生达到免疫保护力的抗体水平(1:20)(另文报道),该保存期满足了临床应用时储存条件和时间的要求,也说明了疫苗的制备工艺是可行的。

用本实验室制备的4批疫苗,在田间对2102头妊娠母猪进行免疫接种,无一例母猪因接种疫苗而发生流产、产死胎或木乃伊胎,表明疫苗接种后对胎儿是安全的。滴鼻接种被认为是伪狂犬病毒感染的最敏感途径,其次为肌肉接种,对于仔猪,采用这两种途径来免疫,也未观察到仔猪出现如感染野毒后通常出现的体温升高、呼吸道症状和消化道症状,仔猪免疫后生长良好。说明该基因缺失疫苗在田间试验中对母猪、仔猪和育肥猪是安全的。

区域试验中,抽样检查的123头育肥猪在免疫后1个月的抗体水平为1:22~1:32之间,这一结果与在实验室条件下进行最小免疫剂量的测定是相接近的。因为在50~70日龄猪中,由于不同猪场不同的饲养管理条件以及种猪用伪狂犬病灭活苗免疫后产生抗体水平高低不同而带来仔猪母源抗体水平高低差异,从而对免疫效果有不同程度的干扰,但总体来说,不同批次疫苗刺激猪产生的抗体水平是接近的。

育肥猪感染伪狂犬病毒后,可造成生长迟缓,饲料报酬降低,并出现咳嗽等呼吸道症状。一旦有细菌感染(如传染性胸膜肺炎)还会引起死亡。病猪咳

嗽时排出大量的病毒,导致其它猪感染,因此育肥猪的免疫接种在控制猪群伪狂犬病时显得十分重要。笔者在田间试验中发现,在同一猪场中,接种疫苗仔猪的生长速度高于非免疫猪达20%;另外有一猪场在注射疫苗之前,商品猪推迟一个月才达到规定的上市体重,注射疫苗后解决了此问题,结果与国外报道相似。因此认为该疫苗在感染猪场中应用,可有效预防育肥猪的伪狂犬病,提高接种猪的日增重。

总之,通过本研究的工作,猪伪狂犬病基因工程疫苗的制备工艺已经被确定,重要免疫学特性测定表明了疫苗的安全性和较好的免疫原性,该疫苗完全能够应用于该病的预防。

参考文献:

- [1] 陈焕春,金梅林,王厚钰,等.从母猪爆发产死胎中分离伪狂犬病病毒[J].华中农业大学学报,1992,10(4):390~391.
- [2] 韦华姜,陈克毅,宁玲忠,等.湘北首次爆发猪伪狂犬病的报告[J].中国畜禽传染病,1994,4:36~38.
- [3] 杨小燕,沈绍新,戴爱玲.猪伪狂犬病的诊断报道[J].中国兽医杂志,1999,25(1):14.
- [4] 张立昌,刘尚高,甘孟侯,等.北京地区仔猪伪狂犬病的诊断[J].中国畜禽传染病,1996,4:31~32.
- [5] Vannier P, Hutet E, Bourgueil E, et al. Level of virulent virus excreted by infected pigs previously vaccinated with different glycoprotein deleted Aujeszky's disease vaccines[J]. Veterinary Microbiology, 1991, 29: 213~223.
- [6] Wardley R C, Thomsen D R, Berlinski P J, et al. Immune response in pigs to Aujeszky's disease vaccine defective in glycoprotein gI or gX[J]. Res Vet Sci, 1991, 50: 178~184.
- [7] Lomniczi B, Shozo W. Genome location and identification of functions defective in the Bartha vaccine of pseudorabies virus[J]. Journal of Virology, 1987, 61(3): 796~801.
- [8] Mettenleiter T C, Chreurs C, Thiel H J. Variability of pseudorabies virus glycoprotein gI expression[J]. Virology, 1987, 158: 141~146.
- [9] van Ziji M, Wensvoort G, De Kluyver E, et al. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera[J]. Journal of Virology, 1991, 65: 2761~2765.
- [10] 周复春.猪伪狂犬病病毒鄂A株基因缺失突变株的构建[D].武汉:华中农业大学,1998.
- [11] 陈焕春,方六荣,何启盖,等.猪伪狂犬病病毒鄂A株的分离鉴定[J].畜牧兽医学报,1998,29(2):156~161.
- [12] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学

- 出版社, 1997. 329~ 331.
- [13] 何启盖, 陈焕春, 吴斌, 等. 猪伪狂犬病油乳剂苗最小免疫剂量测定及区域试验[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25 (1): 16~ 18.
- [14] Donaldson A I, Wardley R C, Martin S, et al. Influence of vaccination on Aujeszky's disease and disease transmission [J]. Vet Rec, 1984, 115: 121~ 124.
- [15] Lomniczi B. Efficacy of vaccines and vaccination against Aujeszky's disease of pigs, II: Experiments with inactivated vaccines in seronegative pigs (Hungarina) [J]. Magy Ao Lapja, 1991, 46: 81~ 86.
- [16] De Leeuw P W, Wijsmuller J M, Zantinga J W, et al. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: Comparison of intranasal and parenteral vaccination with attenuated vaccine in 12-week old pig from immunized dams [J]. Vet Q, 1982, 4: 49~ 56.
- [17] De Leeuw P W, Van Oirschot J T. Intranasal vaccination of pig against Aujeszky's disease: comparison with inactivated vaccines in pigs with low maternal antibody titers[J]. Res Vet Sci, 1985b, 39: 24~ 38.
- [18] Pensaert M, Maes L. Parenteral and intranasal vaccination of fattening pigs against Aujeszky's disease (pseudorabies) [J]. Zentralbl Veterinarmed, 1984, 31: 682~ 689.
- [19] Van Oirschot J T. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: comparison with the one or two doses of attenuated vaccines in pigs with high maternal antibody titers[J]. Res Vet Sci, 1987, 42: 12~ 16.
- [20] Aivars V, Michael D S, Brad J T, et al. Vaccine genotype and route of administration affect pseudorabies field virus latent load after challenge [J]. Veterinary Microbiology, 1998, 62: 81~ 96.
- [21] Kit S. Safety and efficacy of genetically engineered Aujeszky's disease vaccines[A]. Van Oirschot J T. Vaccination and control of Aujeszky's disease[C]. MA (U. S. A): Kluwer Academic Publishers, 1989, 45~ 55.
- [22] De Leeuw P W, Van Oirschot J. Vaccines against Aujeszky's disease: Evaluation of their efficacy under standardized Laboratory conditions [J]. Vet Q, 1985a, 4: 49~ 56.

The Preparation of Gene-deleted Vaccine against Swine Pseudorabies, Measurement of Its Safety, Immunogenicity, Shelf Life and the Evaluation of Vaccine by Field Trials

HE Qirgai, FANG Liurong, WU Bin, LIU Zheng-fei, WU Meirzhou
XIAO Shao-bo, JIN Meirlin, CHEN Huan-chun*

(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Hubei Province,
Key Laboratory of Agricultural Microbiology of the State,

College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to provide the effective vaccine for the immunoprophylaxis of swine pseudorabies, a gene-deleted vaccine against pseudorabies was prepared using a previously constructed mutant, PrV HB-98 (TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ mutant), that were grown with primary embryo fibroblast cells. The optimal doses for the oral and intramuscular administration of the vaccine were determined, and the safety, efficacy, immunoprotective duration and shelf life of the gene-negative vaccine were measured. In addition, the performances of four batches of the gene-negative vaccine were assessed through field trials, in which the vaccine was clinically applied to sows, piglets and growing pigs in 23 pig farms. The optimal doses of vaccine for oral and intramuscular administration for pigs at different stages were determined to be 10^{5.0}TCID₅₀. The vaccine was demonstrated to be safe to one-, fifteen-day old piglets and pregnant sows when it was used at dose of 10^{6.0}TCID₅₀, ten fold of the normal immune dose. The immunized pigs could be protected from challenge with the virulent PrV strain. The vaccine could be stored for six and twelve months under 4°C and -20°C respectively without fluctuation of performance. The immunoprotective duration could last for six months in PrV antibody-free commercial and breeding pigs. The highly safety and good efficacy of the vaccine were further confirmed by the results obtained from the field trials, and the vaccine could be used in PrV-suffered piglets to quickly cease the prevalence of Aujeszky's disease. In conclusion, the research provided the useful hints for vaccine production and field applications of the vaccine.

Key words: gene-deleted vaccine against pseudorabies; PrV HB-98 strain; safety; immunogenicity; field trials

* Corresponding author