

# 嵌合型猪圆环病毒(PCV1-2)灭活苗 对商品猪免疫保护效力的研究

汪正亮, 周金柱, 王小波, 李基棕, 高 杏, 俞天奇, 高 崧\*

(扬州大学农业部禽用生物制剂创制重点实验室, 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

**摘 要:** 运用多功能细胞电穿孔仪将本实验室构建的重组 pSK-dPCV1-2 质粒转染 Dulac 细胞, 传代培养后获得具有稳定感染细胞的重组嵌合型猪圆环病毒 PCV1-2。将该重组病毒灭活后与 ISA 206 VG 佐剂乳化制成灭活苗, 通过免疫效力试验来评价该疫苗的免疫保护效力。将 42 日龄 PCV2 母源抗体水平较低的 20 头商品猪随机分成 4 组, 另外 2 头作为健康对照组。分 2 次免疫, 通过检测不同时间的间接免疫荧光抗体滴度、中和抗体滴度、平均日增重、攻毒后病毒血症以及解剖后病理变化和组织中的病毒载量等各项指标评价疫苗的免疫保护效果。结果显示: 二免后 14 d, 所有免疫组试验猪都表现为 PCV2 血清学阳性, 且中和抗体水平在 1/15~1/20。在猪的增重方面, 免疫组猪和健康对照组猪的体重都有增加, 而攻毒对照组猪的体重没有增加, 且 3 个免疫组和攻毒对照组之间平均日增重差异显著 ( $P < 0.05$ )。攻毒后 21 d 扑杀试验猪, 免疫组猪的淋巴结和各脏器的大体和显微病变都比攻毒对照组轻微。攻毒对照组的淋巴结出现多核巨细胞和嗜酸性粒细胞, 且有多量的淋巴细胞缺失, 免疫组未见多核巨细胞, 淋巴细胞缺失也较少。淋巴结中 PCV2 病毒载量的  $\log_{10}$  在攻毒对照组为  $5.566 \pm 0.432$ , 在  $10^{4.0}$ 、 $10^{5.0}$ 、 $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 免疫组分别为  $4.469 \pm 1.023$ 、 $4.434 \pm 0.716$ 、 $3.521 \pm 0.958$ , 其中  $10^{5.0}$ 、 $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 免疫组与攻毒对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 但是, 试验期间各试验组和健康对照组均未观察到明显的类似 PMWS 的临床症状。断奶仔猪免疫  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 以上嵌合型猪圆环病毒 PCV1-2 灭活苗可以有效地抵抗 PCV2b/1B/Jiangsu/Jingjiang/2012/11/08 病毒感染。

**关键词:** 嵌合型猪圆环病毒(PCV1-2)灭活苗; 商品猪; ISA 206 VG 佐剂; 免疫保护

中图分类号: S858.285.3; S852.659.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)12-1961-09

## Chimeric PCV1-2 Inactivation Vaccine Evaluated in Commercial Pigs for Its Protective Efficacy against PCV2 Infection

WANG Zheng-liang, ZHOU Jin-zhu, WANG Xiao-bo, LI Ji-zong, GAO Xing, YU Tian-qi, GAO Song\*

(Key Laboratory of Avian Bioproducts Development of Ministry of Agriculture,

Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** In this study, Dulac cells were electroporated with the recombinant plasmid pSK-dPCV1-2 constructed in our laboratory to obtain chimeric PCV1-2 virus by passage cultures. The inactivated vaccine of chimeric PCV1-2 virus emulsified with ISA 206 VG adjuvant was vaccinated commercial pigs to evaluate its protective efficacy against PCV2 infection. Twenty 42-day-old conventional pigs were randomly assigned to four groups of five pigs each, and other two pigs served as healthy control. The immune efficacy was evaluated by detecting indirect immunofluorescent assay (IFA) antibody titers, neutralizing antibody titers, growth parameters, viremia

收稿日期: 2013-07-01

基金项目: 江苏省科技支撑计划 (BE2010380); 教育部创新团队 (IRT0978); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 汪正亮 (1988-), 男, 安徽无为, 人, 硕士研究生, 主要从事病毒基因工程疫苗研究, E-mail: wangzh1228@126.com

\* 通信作者: 高 崧, 教授, E-mail: gsong@yzu.edu.cn

post-challenge, gross pathology and histopathology. By 35 days post-vaccination (DPV), all vaccinated pigs had seroconversion to antibody against PCV2 and developed high IFA antibody titers and neutralizing antibody titers at 1/15-1/20. In growth parameters, the average daily weight gain (ADWG) was increased in three immunized groups and the mock group, but there were no gains in challenge control group. Comparison of ADWG of vaccinated pigs with that of challenge pigs revealed statistically significant difference between them ( $P < 0.05$ ). By 21 days post-challenge, gross and microscopic lesions of lymph nodes and lungs in non-vaccinated but challenged pigs were significantly more severe than those found in vaccinated groups. There were multinucleated giant cells, a number of eosinophilia and lymphocyte depletion in lymph nodes in non-vaccinated but challenged pigs. There were no multinucleated giant cells and less lymphocyte depletion in vaccinated pigs. The  $\log_{10}$  of PCV2 viral copy loads detected in lymph nodes in non-vaccinated but challenged pigs were  $5.566 \pm 0.432$ , in vaccinated pigs with  $10^{4.0}$ ,  $10^{5.0}$ ,  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> were  $4.469 \pm 1.023$ ,  $4.434 \pm 0.716$ ,  $3.521 \pm 0.958$ , respectively. Comparison between pigs vaccinated with  $10^{5.0}$ ,  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> and challenging only pigs, the differences were significant ( $P < 0.05$ ), but there were no clinical syndrome during the whole experiment period. The results illuminated that the inactivated chimeric PCV1-2 could induce protective immunity against PCV2b/1B/Jiangsu/Jingjiang/2012/11/08 infection effectively.

**Key words:** chimeric PCV1-2 inactivated vaccine; commercial pig; ISA 206 VG adjuvant; immune protection

自 1991 年在加拿大首次发现断奶仔猪多系统衰弱综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 以来,断奶仔猪多系统衰弱综合征已在全球范围内发生和流行<sup>[1]</sup>。根据 PCV (porcine circovirus) 致病性、抗原性及核苷酸序列的差异性,将 PCV 划分为无致病性的 PCV-1 和有致病性的 PCV-2 两个基因型<sup>[2]</sup>。根据最新的研究结果,PCV-2 可以划分为 PCV-2a、PCV-2b、PCV-2c、PCV-2d 和 PCV-2e 五种基因亚群,其中 PCV-2a 和 PCV-2b 是主要类型<sup>[3]</sup>。PCV-2b 在当前的自然感染中流行,被认为具有较强的致病性<sup>[4]</sup>。PCV2 基因组大小为 1.7 kb<sup>[5]</sup>,PCV2 有 2 个相反方向的主要开放阅读框 (ORF),ORF1 和 ORF2<sup>[6]</sup>。ORF1 在所有的分离株中是高度保守的,编码蛋白大小为 35.7 ku,与病毒的复制有关<sup>[7]</sup>。ORF2 基因在 PCV2 分离株中的核苷酸相似性为 91%~100%,氨基酸相似性为 90%~100%,编码大小为 27.8 ku 的病毒衣壳蛋白,也是病毒的主要免疫原性蛋白<sup>[8-10]</sup>。

王一平等<sup>[11]</sup>就目前猪圆环病毒疫苗的研究作了综述,文章中指出猪圆环病毒疫苗的研究多数以 PCV2a 亚型为主,尽管这些疫苗对当前主要流行的 PCV2b 有一定的保护力,但保护力效果差异较大<sup>[12]</sup>。本室宋益等<sup>[13]</sup>依据 M. Fenaux 等<sup>[14]</sup>建立

的方法,利用国内分离的 PCV2b 分离株与无致病性的 PCV1 分离株成功构建了嵌合型猪圆环病毒 PCV1-2 的感染性 DNA 克隆,并对其细胞感染性和病毒颗粒的免疫原性做了相关研究。本文主要探讨不同免疫剂量的上述嵌合病毒灭活苗对商品猪的免疫保护效果,为疫苗的生产提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞、病毒和质粒

Dulac 细胞 (无 PCV1 污染) 和感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本室保存;本室构建的嵌合型 PCV1-2 感染性 DNA 克隆 pSK-dPCV1-2 质粒;细胞培养生长液为含 4% 胎牛血清的 DMEM,维持液为含 2% 胎牛血清的 DMEM;重组阳性质粒 T-easy-PCV2-MCV 由樊晶构建<sup>[15]</sup>;PCV2b/1B/Jiangsu/Jingjiang/2012/11/08 毒株由本实验室分离、传代和保存。

### 1.2 试剂

胎牛血清和 DMEM 均购自 Hyclone 公司;Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程股份有限公司;Proteinase K 购自 Sigma 公司;DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自 Axygen 公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司;法国赛比克公司 Montanide<sup>TM</sup> ISA 206 VG 佐

剂为扬州优邦生物制药有限公司馈赠;抗 PCV2 猪源阳性血清,购自 VMRD 公司;FITC 标记的兔抗猪荧光二抗,购自 Southern Biotech 公司;猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒,购自武汉科前动物生物制品有限公司;弗氏不完全佐剂(ICFA),钥孔血蓝蛋白(KLH),巯基乙酸培养基,均购自 Sigma 公司;其余常规试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.3 试验动物

从江苏省扬州市某养猪场筛选 22 头 42 日龄、体重 14 kg 左右的健康商品猪,商品猪进行外源病毒检测,PCV-2、PPV、PRV、PRRSV 和 CSFV 等核酸检测为阴性,用猪圆环病毒 II 型 ELISA 抗体检测试剂盒检测母源抗体为阴性,用间接免疫荧光法检测其 PCV2 母源抗体水平小于 1:10。

### 1.4 嵌合型 PCV1-2 病毒的拯救

将 8  $\mu\text{g}$  dPCV1-2 重组质粒在电压为 200 V、时间为 400  $\mu\text{s}$ 、脉冲数为 2 的电击条件下,转染 Dulac 细胞,具体操作步骤参照说明书。经连续传代之后获得能够感染细胞的嵌合型 PCV1-2 病毒,用商品化的抗 PCV2 猪源阳性血清作为一抗,FITC 标记的兔抗猪荧光抗体作为二抗,参照芦银华等<sup>[16]</sup>介绍的间接免疫荧光试验方法检测拯救病毒。

### 1.5 嵌合型 PCV1-2 病毒和 PCV2 分离毒的制备以及病毒 TCID<sub>50</sub> 的测定

长至 50%~60% 汇合度的 Dulac 细胞,接种 PCV1-2 病毒,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37 °C 吸附 1.5 h。之后,添加细胞生长液继续培养,待细胞长成单

层后换细胞维持液继续培养 48 h。将细胞瓶放 -70 °C 冰箱反复冻融 3 次后收取细胞培养物,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心后收集上清,于 -70 °C 保存备用。PCV2b/1B/Jiangsu/Jingjiang/2012/11/08 分离毒株的制备同上。应用间接免疫荧光方法测定所获病毒的 TCID<sub>50</sub> 并按 Reed 与 Muench 氏法计算病毒的 TCID<sub>50</sub><sup>[17]</sup>。

### 1.6 嵌合型 PCV1-2 灭活苗的制备及灭活效果的检测

收获的 PCV1-2 病毒用 Vivoflow 浓缩仪浓缩制备含 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> 抗原,病毒液(抗原)用 1:50 稀释的甲醛灭活处理,使甲醛的终浓度为 1/1 000,取少许灭活的病毒液接种 Dulac 细胞并培养 72 h 后用间接免疫荧光试验检测其是否被甲醛完全灭活。将灭活的病毒和 ISA 206 VG 佐剂都预热至 30 °C,按照佐剂:抗原=54:46(体积比)或者质量比为 1:1 的比例将抗原缓慢加入佐剂中,涡旋振荡 15 min,置 4 °C 冰箱降温,降温过程中每 5 min 涡旋振荡 1 次,待温度降到 20 °C 以下后,4 °C 保存。乳化好的制剂呈乳白色或淡粉红色均匀乳状液,吸取少许疫苗滴于清洁冷水表面,呈云雾状扩散,吸取疫苗 10 mL 加入离心管中,以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,水相析出不超过 0.5 mL 为宜。

### 1.7 商品猪的攻毒保护试验

将 22 头健康商品猪随机分为 5 组,免疫组以及攻毒对照组每组 5 头,健康对照组 2 头。试验中各组的免疫剂量、不同时间的处理以及攻毒方案见表 1。

表 1 试验分组及处理

Table 1 Grouping and treatment of experimental pigs

分组 (数量)	免疫剂量/ (TCID <sub>50</sub> ·头 <sup>-1</sup> );日龄	攻毒剂量/ (TCID <sub>50</sub> ·头 <sup>-1</sup> );日龄	KLH 免疫刺激剂量/ (mL·头 <sup>-1</sup> );日龄	巯基乙酸免疫刺激剂量/ (mL·头 <sup>-1</sup> );日龄
1(n=5)	10 <sup>4.0</sup> ;42,63	2×10 <sup>4.5</sup> ;78	4;82,85	10;82,85,89,92
2(n=5)	10 <sup>5.0</sup> ;42,63	2×10 <sup>4.5</sup> ;78	4;82,85	10;82,85,89,92
3(n=5)	10 <sup>6.0</sup> ;42,63	2×10 <sup>4.5</sup> ;78	4;82,85	10;82,85,89,92
4(n=5)	—	2×10 <sup>4.5</sup> ;78	4;82,85	10;82,85,89,92
5(n=2)	—	—	—	—

### 1.8 猪血清荧光抗体水平的检测

用间接免疫荧光方法检测血清中的荧光抗体滴度,具体操作参照芦银华等<sup>[16]</sup>介绍的间接免疫荧光试验方法。

### 1.9 猪血清中和抗体效价的测定

参照殷震等<sup>[18]</sup>介绍的中和抗体效价的测定方法,测定攻毒前试验猪血清中的中和抗体效价。

### 1.10 PCV2 病毒血症检测

参照 X. J. Liu 等<sup>[19]</sup>建立的 PCR 方法检测血清中病毒 PCV2 DNA。

### 1.11 实时荧光定量 PCR 检测血清和腹股沟淋巴结中 PCV2 DNA 拷贝数

参照樊晶<sup>[15]</sup>建立的猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法,检测所有试验猪

攻毒后血清和扑杀后腹股沟淋巴结中 PCV2 DNA 拷贝数。

### 1.12 临床症状、大体病变以及组织病变观察

通过临床症状的观察,以及各试验猪在攻毒后 21 d 剖检作大体和组织病理学观察,包括各脏器的病变、淋巴结肿大程度;采集肺、淋巴结、扁桃体、心脏、胸腺、肝、脾、肾等脏器固定后按常规方法制备石蜡切片,HE 染色后显微镜观察组织病理学变化;评价肺、淋巴结、肝等组织病变的严重程度。

## 2 结果

### 2.1 病毒 TCID<sub>50</sub> 的测定

用电转化的方法获得嵌合型病毒 PCV1-2,拯救的嵌合型 PCV1-2 具有感染性,可进行连续传代,嵌合病毒 PCV1-2 的滴度为  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>,攻毒用 PCV2b/1B/Jiangsu/Jingjiang/2012/11/08 病

毒的滴度为  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 疫苗灭活效果检测

将灭活的病毒液接种 Dulac 细胞,72 h 之后用间接免疫荧光测定,结果为阴性。

### 2.3 不同时间点试验猪血清荧光抗体滴度的动态变化

各免疫组猪的抗体水平在免疫前后和攻毒前后的消长情况见表 2、3。一免后 21 d,所有免疫组试验猪血清中都可检测到针对 PCV2 的抗体,荧光抗体的滴度最低为 1:100,最高为 1:1 600。二免后 14 d,该抗体滴度大部分都能达到 1:6 400。攻毒对照组在攻毒后第 7 天,5 头猪的血清都能检测到针对 PCV2 的抗体。健康对照组猪在整个试验过程中,都未检测到血清中有针对 PCV2 特异的抗体。不同组间血清中的平均荧光抗体滴度的变化趋势见图 1。

表 2 第 1~3 组试验猪血清中荧光抗体滴度变化情况

Table 2 Dynamics of IFA titers of antibody at different days in group 1-3

首免后 时间/d	第 1 组(免疫 $10^{4.0}$ TCID <sub>50</sub> PCV1-2)					第 2 组(免疫 $10^{5.0}$ TCID <sub>50</sub> PCV1-2)					第 3 组(免疫 $10^{6.0}$ TCID <sub>50</sub> PCV1-2)				
	≤1:10	1:100	1:400	1:1 600	≥1:6 400	≤1:10	1:100	1:400	1:1 600	≥1:6 400	≤1:10	1:100	1:400	1:1 600	≥1:6 400
-1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
7	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5
14	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5
21	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5
28	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5
35	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
42	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
49	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5
56	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5

表 3 第 4、5 组试验猪血清中荧光抗体滴度变化情况

Table 3 Dynamics of IFA titers of antibody at different days in group 4 and 5

首免后 时间/d	第 4 组(攻毒对照组)					第 5 组(健康对照组)				
	≤1:10	1:100	1:400	1:1 600	≥1:6 400	≤1:10	1:100	1:400	1:1 600	≥1:6 400
-1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
7	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
14	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
21	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
28	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
35	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
42	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
49	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
56	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

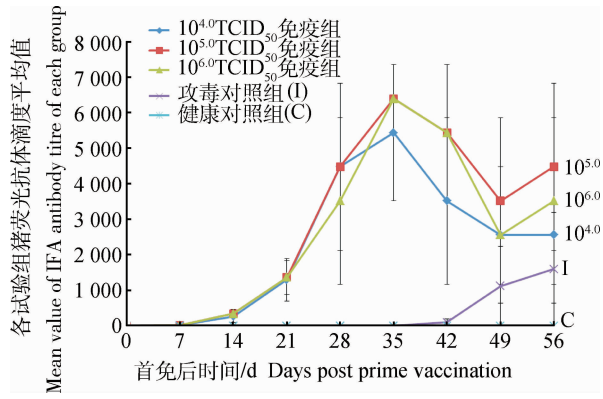


图 1 荧光抗体效价的变化趋势

Fig. 1 Dynamics of mean IFA titers of antibody at definite intervals in each group

2.4 血清中病毒血症的检测

病毒血症结果见表 4。结果表明,灭活的嵌合型

表 4 PCR 检测 PCV2 病毒血症的结果

Table 4 Results of PCV2 viremia detected by PCR

分组* Group	攻毒前各组猪病毒血症的检测结果 (首免后时间/d)						攻毒后各组猪病毒血症的检测结果 (攻毒后时间/d)		
	-1	7	14	21	28	35	7	14	21
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5
2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5
3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5
4	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	5/5	5/5
5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

\*. 与表 1 分组相同

\*. Group codes are the same as in Table 1

表 5 各组试验猪血清、腹股沟淋巴结中 PCV2 病毒载量(log<sub>10</sub>)检测结果

Table 5 log<sub>10</sub> Viral copy loads in sera and SILNs detected by real-time PCR

样品	血清和腹股沟浅表淋巴结中 PCV2 病毒载量(log <sub>10</sub> )检测结果(̄x±s)				
	第 1 组 (免疫 10 <sup>4.0</sup> TCID <sub>50</sub> PCV1-2)	第 2 组 (免疫 10 <sup>5.0</sup> TCID <sub>50</sub> PCV1-2)	第 3 组 (免疫 10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub> PCV1-2)	第 4 组 (攻毒对照组)	第 5 组 (健康对照组)
血清 7 d	4.486±0.159 <sup>a</sup>	4.429±0.390 <sup>a</sup>	3.901±0.512 <sup>b</sup>	5.229±1.076 <sup>a</sup>	3.728±0.018 <sup>b</sup>
血清 14 d	3.759±0.102 <sup>a</sup>	3.254±0.267 <sup>b</sup>	3.572±0.531 <sup>b</sup>	4.329±1.121 <sup>a</sup>	3.255±0.050 <sup>b</sup>
血清 21 d	4.101±0.171 <sup>a</sup>	3.846±0.164 <sup>b</sup>	3.785±0.405 <sup>b</sup>	4.457±0.435 <sup>a</sup>	3.556±0.025 <sup>b</sup>
淋巴结	4.469±1.023 <sup>a</sup>	4.434±0.716 <sup>b</sup>	3.521±0.958 <sup>c</sup>	5.566±0.432 <sup>a</sup>	2.711±0.015 <sup>c</sup>

同一行不同字母间的数值差异显著(P<0.05),同一行相同字母的数值差异不显著(P>0.05)

Different letters in the same row means significant difference between the treatments(P<0.05), same letter in the same row means not significant difference between treatments(P>0.05)

攻毒后 7、14、21 d,攻毒对照组血清中的 PCV2 病毒载量(log<sub>10</sub>)都比免疫组和健康对照组高。所有试验组在攻毒 14 d 时 PCV2 病毒载量(log<sub>10</sub>)都比 7 d 时有所下降,到 21 d 时又有所回升,但还是比 7 d

PCV1-2 病毒能够明显减少猪病毒血症的发生。

2.5 血清中和抗体效价

第 1、2、3 组中的试验猪在免疫后 35 d 的中和抗体效价分别为 1/15±0.005 9、1/18±0.005 8 和 1/20±0.006 3。经统计学分析,10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 免疫组与 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 免疫组和 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 免疫组之间差异显著(分别 P=0.009 1、P=0.008 1);但 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 免疫组和 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup> 免疫组之间差异不显著(P=0.317 5)。

2.6 定量 PCR 对猪血清和腹股沟淋巴结中 PCV2 DNA 拷贝数(log<sub>10</sub>)检测

用荧光定量 PCR 方法对攻毒后 7、14、21 d 所有试验猪的血清和攻毒后 21 d 腹股沟浅表淋巴结中 PCV2 DNA 含量进行检测。各组检测结果见表 5。

时低。PCV2 病毒载量(log<sub>10</sub>)在 5 个试验组间差异显著(P=0.010 9),在第 1、2、3、5 组间差异不显著(P=0.086 7),在 10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub>·mL<sup>-1</sup>、攻毒对照组间差异不显著(P=0.166 0),但在 10<sup>5.0</sup>

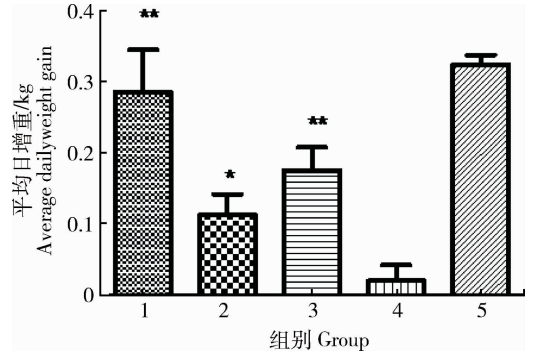
TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>、攻毒对照组, 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>、攻毒对照组, 健康对照组、攻毒对照组中差异显著(分别为  $P=0.0301$ 、 $P=0.0310$ 、 $P=0.0495$ )。在攻毒后 21 d, 所有试验猪的腹股沟淋巴结中均可以检测到 PCV2 病毒核酸。PCV2 病毒载量(log<sub>10</sub>) 在 5 个试验组间差异显著( $P=0.0063$ ), 在第 1、2、3、5 组间差异不显著( $P=0.1282$ ), 在 10<sup>4.0</sup> TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>、攻毒对照组间差异不显著( $P=0.0834$ ), 但在 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>、攻毒对照组, 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>、攻毒对照组, 健康对照组、攻毒对照组差异显著(分别为  $P=0.0267$ 、 $P=0.0046$ 、 $P=0.0005$ )。

2.7 体重的变化

为了评价疫苗对猪体的免疫保护效果, 分别在攻毒前及扑杀时对猪体进行称重, 计算猪的平均日增重。其中 1、2、3 和空白对照组的平均日增重分别为 0.2858±0.1336、0.1112±0.0592、0.1753±0.0640、0.3240±0.0198, 而攻毒对照组的平均日增重仅为 0.0190±0.0498。差异性检验表明免疫组和攻毒对照组之间平均日增重差异显著( $P<0.05$ )。结果见图 2。

2.8 组织病理学检查

健康对照组的试验猪未见明显的组织病理学变化。除健康对照组外, 其他试验猪的肺均出现不同程度的间质性支气管肺炎病变, 肺泡壁上皮细胞增生, 间质增生并有大量淋巴细胞浸润, 细支气管黏膜上皮细胞坏死脱落, 周围大量炎性细胞浸润, 支气管管腔内有少量炎性渗出物, 肺组织有轻度的淤血(图



分组同表 1; \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$   
Group codes are the same as in Table 1, \* means  $P<0.05$ ; \*\* means  $P<0.01$

图 2 试验猪平均日增重比较

Fig. 2 Comparison of average daily weight gain of piglets

3 A~E)。

在攻毒对照组猪的淋巴结中可观察到多核巨细胞以及散在分布的大量嗜酸性粒细胞, 肺门淋巴结和腹股沟淋巴结的淋巴小结结构模糊。第 1、2、3、4 组分别发现 2、1、1、4 头猪的淋巴小结内淋巴细胞数量减少, 淋巴小结周围可见数量不等的多核巨细胞, 淋巴小结内也有, 但数量不多。第 1、2 组各 1 头、第 4 组中 3 头猪可观察到淋巴结淋巴滤泡轻度至中等程度组织细胞浸润(图 3 F~I)。第 1、4 组分别有 2、3 头猪可观察到扁桃体淋巴滤泡内巨噬细胞增多和淋巴细胞数量减少。第 1、2 组各 1 头试验猪可观察到肾血管扩张, 充血。第 4 组 3 头试验猪表现局部间质性细胞浸润, 髓质部肾小管上皮细胞颗粒性变性。所有组织病变情况见表 6, 部分组织的病理学变化见图 3。

表 6 试验猪不同组织器官中组织损伤的分布情况

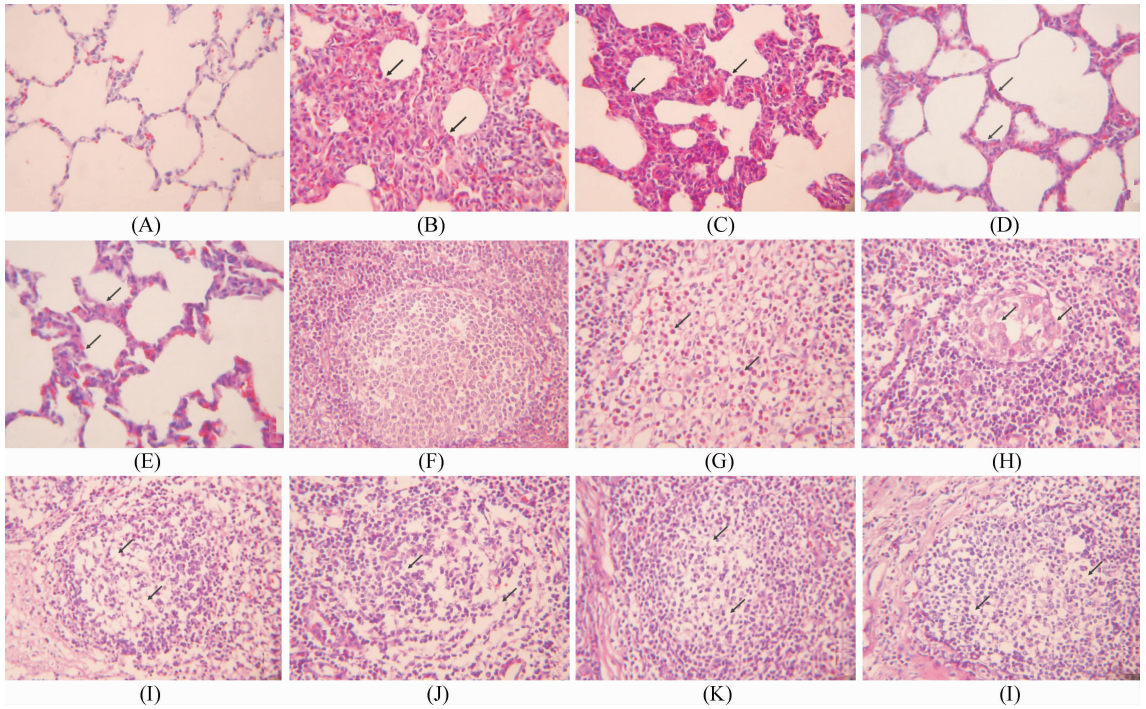
Table 6 Distribution of histological lesions in different tissues and organs from experimental pigs

分组* Group	出现组织损伤的猪数量/所有被检猪的数量										
	淋巴结		扁桃体		脾		肺	肝	肾	心脏	小肠
	LD	HR	LD	HR	LD	HR					
1	1/5	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	3/5	1/5	2/5	0/5	0/5
2	1/5	0/5	2/5	0/5	1/5	0/5	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5
3	1/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5
4	4/5	3/5	3/5	2/5	3/5	1/5	4/5	4/5	3/5	0/5	0/5
5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

\*. 与表 1 分组相同; LD. 淋巴组织损伤; HR. 淋巴滤泡组织细胞浸润

\*. Group codes are the same as in Table 1; LD means lymphoid tissue damage; HR means lymphoid follicle cells infiltration





A. 健康对照组猪肺中未观察到明显的组织学损伤;B. 攻毒对照组猪肺中可观察到严重的淋巴细胞浸润和间质性肺炎(箭头);C. 第1组免疫组猪肺中可观察到比较严重的淋巴细胞浸润和间质性肺炎(箭头);D. 第2组免疫组猪肺中可观察到轻度的淋巴细胞浸润和间质性肺炎(箭头);E. 第3组免疫组猪肺中可观察到轻微程度的淋巴细胞浸润和间质性肺炎(箭头);F. 健康对照组猪淋巴结中未观察到明显的组织学损伤;G. 攻毒对照组猪淋巴结中可观察到大量的嗜酸性粒细胞(箭头);H. 攻毒对照组猪淋巴结中可观察到多核巨细胞(箭头);I. 攻毒对照组猪淋巴结中可观察到严重的淋巴滤泡内淋巴细胞缺失(箭头);J. 第1组免疫组猪淋巴结中可观察到比较严重的淋巴滤泡内淋巴细胞缺失(箭头);K. 第2组免疫组猪淋巴结中可观察到轻度的淋巴滤泡内淋巴细胞缺失(箭头);L. 第3组免疫组猪淋巴结中可观察到轻微程度的淋巴滤泡内淋巴细胞缺失(箭头)

A. No significant histological lesions of lung in health control; B. Severe lymphoplasmacytic and histiocytic bronchointerstitial pneumonia of lung in challenge control (black arrow); C. Severe lymphoplasmacytic and histiocytic bronchointerstitial pneumonia of lung in group 1 (black arrow); D. Mild lymphoplasmacytic and histiocytic bronchointerstitial pneumonia of lung in group 2 (black arrow); E. Slight lymphoplasmacytic and histiocytic bronchointerstitial pneumonia of lung in group 3 (black arrow); F. No significant histological lesions of lymph nodes in health control; G. A large number of eosinophilia in lymph nodes in challenge control (black arrow); H. Multinucleated giant cells in lymph nodes in challenge control (black arrow); I. Severe LD of lymph node follicles in challenge control (black arrow); J. Severe LD of lymph node follicles in group 1 (black arrow); K. Mild LD of lymph node follicles in group 2 (black arrow); L. Slight LD of lymph node follicles in group 3 (black arrow)

图3 免疫攻毒后各组试验猪脏器的组织学变化

Fig. 3 Histological lesions in some tissues from experimental pigs

### 3 讨论

2003年M. Fenaux等<sup>[14]</sup>首次报道了嵌合型PCV1-2感染性DNA克隆的构建,且使用脂质体转染的方法成功地将其转染了PK-15细胞并得到了活的病毒颗粒。同时使用嵌合型PCV1-2感染性DNA克隆和活病毒免疫SPF猪,结果二者都能够诱导实验动物产生较高的针对PCV2 ORF2免疫原蛋白的抗体。本实验室宋益等<sup>[13]</sup>参照M. Fenaux等<sup>[14]</sup>的方法成功构建了嵌合型PCV1-2感染性DNA克隆,并且成功转染了Dulac细胞,获得了具

有感染性的活病毒粒子。X. J. Liu等<sup>[19]</sup>证实了PCV1-2病毒可以在Dulac细胞中稳定地扩增,当传至25代时测定病毒的荧光抗体滴度为 $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> · 0.1 mL<sup>-1</sup>。本试验参考S. Krakowka等<sup>[20]</sup>的方法,使用电转化的方法将嵌合型PCV1-2感染性DNA克隆转染Dulac细胞,成功获得了具有感染性的活病毒,而且,电转后的Dulac细胞在传代过程中,每3代测定其病毒的滴度以确定病毒的生长特性,到第7代时嵌合病毒PCV1-2的滴度已达到了 $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>,且随着传代次数的增加,病毒滴度也不断地上升。这与L. J. Guo等<sup>[21]</sup>

报道的结果一致。用此方法构建的嵌合型 PCV1-2 病毒,具有使 PCV2 毒株失去毒力而保留免疫原性的优势,因此本室参考 M. Fenaux 等<sup>[14]</sup>的构建方法,目的是应对猪圆环病毒 2 型基因亚群的变异,为研制针对流行毒株的疫苗奠定基础。

本实验室 X. J. Liu 等<sup>[19]</sup>已证实,剂量为  $6 \times 10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 的 PCV1-2 灭活病毒对试验猪有免疫保护作用。本文通过电转化的方法,获得了较高滴度的嵌合型病毒 PCV1-2,故选择了剂量分别为  $10^{4.0}$ 、 $10^{5.0}$ 、 $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 的 PCV1-2 灭活病毒作为免疫原与更容易乳化的 ISA 206 VG 佐剂制成的油乳剂免疫低 PCV2 母源抗体的商品猪。试验结果显示, $10^{5.0}$ 、 $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 的 PCV1-2 灭活疫苗表现出更好的免疫保护效果,且  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 比  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 的 PCV1-2 灭活疫苗的免疫保护效果好,但在血清及淋巴结病毒载量方面两者差异并不显著。这个结果与 T. Opriessnig 等<sup>[22]</sup>报道的 2 个剂量的商品化 PCV2 疫苗较免疫 1 个剂量的更能降低病毒血症发生的结果相近。

疫苗免疫接种是预防猪圆环病毒病 (porcine circovirus disease, PCVD) 的有效手段,国内外学者在 PCV2 疫苗的研究方面开展了大量的研究,取得了显著成就,目前研制成功的商品化疫苗主要有 7 种,这些疫苗为防控 PCV2 的感染发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。但是,目前商品化的疫苗主要以 PCV2a 为主,而当前 PCV2b 是主要的流行毒株,而且目前的商品化疫苗价格都比较高,给养猪户增加较高的养殖成本,有必要研究一种价格低廉、效果良好的 PCV2 疫苗<sup>[23]</sup>。尽管已经证实不同亚群 PCV2 之间有交叉保护力,但也有报道免疫失败的情况<sup>[24]</sup>。因此,在本研究中,作者选用国内目前流行的 PCV2b 为 Cap 蛋白的供体,以此作为生产用疫苗可能在防控 PCVD 中效果更好。并且 N. M. Beach 等<sup>[4]</sup>已证实使用 PCV2b 亚群的 Cap 蛋白基因构建的 PCV1-2 活病毒产生的免疫保护效果较 PCV2a 亚群的好。

本文选择 PCV2 母源抗体较低的商品猪 (ELISA 抗体检测试剂盒检测为阴性且荧光抗体效价  $\leq 1:10$ ) 进行试验,以尽量避免母源抗体对疫苗的干扰。有证据表明,高水平母源抗体的存在可干扰疫苗的免疫效果,而低水平母源抗体可允许猪体产生适度的抗体<sup>[25]</sup>。考虑到实际应用,猪场中猪群个体之间的母源抗体必然有高低,而高水平母源抗

体会干扰疫苗免疫的效果,作者推荐对免疫猪进行 2 次免疫,因为二次免疫可以对试验猪的抗体分泌产生显著的促进作用。这一点已经在本试验中得到证实。S. Krakowka 等<sup>[26]</sup>已报道了免疫刺激对 PMWS 的发生是至关重要的因素。王先炜等<sup>[27]</sup>选用商品化断奶仔猪进行免疫刺激,复制出了典型的 PMWS。故本文采用钥孔血蓝蛋白 (KLH) 和巯基乙酸培养基对试验猪进行免疫刺激,以获得更好的试验数据来评价疫苗的免疫保护效力。

本试验中,作者通过 PCV1-2 灭活疫苗免疫商品猪,免疫猪均产生了较高的体液免疫反应, $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup> 免疫组产生的血清抗体滴度最高。从病理学角度分析,免疫组较攻毒组均有不同程度的病变减轻现象,也说明该疫苗对防控 PCVD 有作用。平均日增重是评价 PCV2 疫苗对猪保护程度的重要指标。攻毒后,免疫组和健康对照组的猪体重都有所增加,而攻毒对照组的猪体重下降或只有较少的增加,且免疫组和攻毒对照组平均日增重差异显著 ( $P < 0.05$ ),说明该疫苗能保证免疫猪的正常增重。但是,在增重方面从图 2 可以看出第 2 组的增重小于第 1、3 组,这可能与试验过程中第 2 组试验猪出现不明原因的腹泻有关。病毒血症作为评价 PCV2 疫苗免疫保护效果的另一个重要指标,免疫组攻毒后 2 周内部分猪可检测到病毒血症,而在攻毒 21 d,所有免疫组均检测不到病毒血症,表明该疫苗能够有效阻止病毒在体内的复制。综上所述,用 PCV2b 的 Cap 蛋白基因和 PCV1 构建的重组嵌合型 PCV1-2 灭活疫苗能够有效诱导机体的体液免疫应答,对猪产生免疫保护作用,出于生产成本的考虑,我们推荐使用的免疫剂量为  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> · mL<sup>-1</sup>。

#### 参考文献:

- [1] BAEKBO P, KRISTENSEN C S, LARSEN L E. Porcine circovirus diseases: A review of PMWS[J]. *Trans-bound Emerg Dis*, 2012, 59(1): 60-67.
- [2] 刘金鑫, 孙梦娇, 陈磊, 等. 猪圆环病毒研究进展[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(2): 94-97.
- [3] OLVERA A, CORTEY M, SEGALÉS J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality [J]. *J Virol*, 2007, 7(2): 175-185.
- [4] BEACH N M, RAMAMOORTHY S, OPIRISSNIG T, et al. Novel chimeric porcine circovirus (PCV) with the capsid gene of the emerging PCV2b subtype



- cloned in the genomic backbone of the non-pathogenic PCV1 is attenuated in vivo and induces protective and cross-protective immunity against PCV2b and PCV2a subtypes in pigs[J]. *Vaccine*, 2010,29(2):221-232.
- [5] ALLAN G M, ELLIS J A. Porcine circoviruses: A review[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000,12(1):3-14.
- [6] MANKERTZ A, DOMINGO M, FOLCH J M, et al. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France[J]. *Virus Res*, 2000,66(1):65-77.
- [7] AWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. *Gen Virol*, 2000,81(Pt 9):2281-2287.
- [8] MANKERTZ A, MANKERTZ J, WOLF K, et al. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus[J]. *Gen Virol*, 1998, 79(Pt 2):381-384.
- [9] CHEUNG A K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2[J]. *J Virol*, 2003,313(2):452-459.
- [10] CHEUNG A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. *J Virol*, 2003,305(1):168-180.
- [11] 王一平,郭龙军,唐青海,等.猪圆环病毒 2 型疫苗的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报,2012, 43(9):1337-1345.
- [12] LYOO K, JOO H, CALDWELL B, et al. Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs[J]. *Vet J*, 2011,189(1):58-62.
- [13] 宋 益,朱丽娜,高 崧,等.嵌合型猪圆环病毒 2 型感染性 DNA 克隆的构建及其免疫原性研究[J]. 微生物学报,2008,48(9):1234-1240.
- [14] FENAUX M, OPRIESSNIG T, HALBUR P G, et al. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weaning pigs[J]. *J Virol*, 2003,77(20):11232-11243.
- [15] 樊 晶.猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立和嵌合型 PCV1-2 活病毒疫苗及其灭活制剂对 PCV2 低母源抗体猪的免疫保护研究[D].扬州:扬州大学,2009.
- [16] 芦银华,谭国蕾.应用间接免疫荧光试验检测猪圆环病毒抗体 [J]. 中国兽医科技,2002,32(8):19-20.
- [17] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. *Am J Epidemiol*, 1938,27(3):493-497.
- [18] 殷 震,刘景华.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1997:336-340.
- [19] LIU X J, WANG X B, SONG Y, et al. A candidate inactivated chimeric vaccine PCV1-2 evaluated in conventional pigs for its protective efficacy against PCV2 infection[J]. *Microbiol Immunol*, 2011, 55(4):254-266.
- [20] KRAKOWKA S, ALLAN G M, ELLIS J A, et al. A nine-base nucleotide sequence in the porcine circovirus type 2 (PCV2) nucleocapsid gene determines viral replication and virulence[J]. *Virus Res*, 2012,164(1-2):90-99.
- [21] GUO L J, LU Y H, HUANG L P, et al. First construction of infectious clone for newly emerging mutation porcine circovirus type 2 (PCV2) followed by comparison with PCV2a and PCV2b genotypes in biological characteristics in vitro[J]. *Virol J*, 2011, 8:291-301.
- [22] OPRIESSNIG T, PATTERSON A R, MADSON D M, et al. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination [J]. *Vaccine*, 2009, 27(7):1002-1007.
- [23] 徐 磊,宁蓬勃,郭抗抗,等.猪圆环病毒 2 型疫苗研究进展 [J]. 动物医学进展,2012,33(10):64-70.
- [24] XIAO C T, HALBUR F G, OPRIESSNIG T. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States[J]. *J Virol*, 2012,86(22):12469.
- [25] FORT M, SIBILA M, PEREZ E, et al. One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model[J]. *Vaccine*, 2009,27(30):4031-4037.
- [26] KRAKOWKA S, ELLIS J A, MCNEILLY F, et al. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2) [J]. *Vet Pathol*, 2001,38(1):31-42.
- [27] 王先炜,姜 平,韦显凯,等.免疫刺激商品断奶仔猪复制多系统衰竭综合征 (PMWS) [J]. 畜牧兽医学报,2008,39(1):66-71.