

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.05.06

小反刍兽疫活疫苗二次免疫效果评价

鲁立柱¹, 柏庆¹, 任国堂¹, 汪萍^{2*}, 王延^{2*}, 黄炯²

(1. 天康生物股份有限公司, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆畜牧科学院兽医研究所 新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心, 乌鲁木齐 830000)

[收稿日期] 2017-08-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 05-0038-04 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为研究已免疫小反刍兽疫(PPR)活疫苗的羊群经二次免疫后 PPR 抗体水平的变化趋势,对初免 21 d 羊群进行了第二次免疫,同时监测初免 21 d 及二免后 3 d、7 d、14 d、21 d 的血清中和抗体。结果显示,一次免疫羊 21 d PPR 中和抗体滴度平均可达 5.18 ± 2.87 ,阳性率为 84%;二次免疫后 3 d、7 d、14 d、21 d,PPR 抗体呈上升趋势,平均滴度分别为 5.65 ± 2.56 、 6.95 ± 1.82 、 7.28 ± 1.18 、 8.12 ± 1.31 ,阳性率分别为 90%、100%、100%、100%。一免试验组 21 d~323 d PPR 抗体阳性率为 83%,二免试验组在二次免疫 7 d PPR 抗体阳性率达到 100%,并且维持到 21 d。试验表明,活疫苗二次免疫增强了免疫效果,对已经有 PPR 抗体的羊进行二次免疫,可明显提升免疫抗体阳性率。

[关键词] 绵羊;小反刍兽疫活疫苗;二次免疫;效果评价

Evaluation of Secondary Immune Effects of Live Attenuated Peste des Petits Ruminants Vaccine

LU Li-zhu¹, BAI Qing¹, REN Guo-tang¹, WANG Ping^{2*}, WANG Yan^{2*}, HUANG Jiong²

(1. Tecon Biological Co., Ltd. Urumqi 830000, China; 2. The Veterinary Research Institute, Animal Science Academy of Xinjiang Animal Clinical Medicine Research Center, Animal Science Academy of Xinjiang, Urumqi 830000, China)

Corresponding authors: WANG Ping, E-mail:56307246@qq.com; WANG Yan, E-mail:137862640@qq.com

Abstract: In order to research the antibody change tendency of secondary immunization, the sheep were injected with live attenuated peste des petits ruminants (PPR) vaccine at the 21st day after primary immunization. The PPR antibody at the 21st day after primary immunization and at the 3rd, 7th, 14th, 21st day after secondary immunization were detected respectively. The results indicated that the PPR antibody at 21st day after primary immunization reached to 5.18 ± 2.87 and the positive rate was 84%. The PPR antibody level from the 3rd day to the 21st day after secondary immunization increased and the average titer were 5.65 ± 2.56 , 6.95 ± 1.82 , 7.28 ± 1.18 , 8.12 ± 1.31 respectively, positive rate was 90%, 100%, 100%, 100% respectively. The PPR antibody positive rate at primary immunization group from 21days to 323days was 83%, PPR antibody positive rate reached to 100% at the 7th day after secondary immunization and kept high level to the 21st day, which showed that secondary immunization could enhance the effect of vaccine, and increase the positive rate of immune antibodies.

Key words: sheep; live attenuated PPR vaccine; secondary immunization; evaluation of immune effects

作者简介: 鲁立柱, 硕士, 兽医师, 动物医学预防兽医。

通讯作者: 汪萍, E-mail: 56307246@qq.com; 王延, E-mail: 137862640@qq.com

小反刍兽疫(peste des petits ruminants, PPR) 又称“羊瘟”,是由小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus, PPRV)引起羊的高度接触性传染病。PPRV 可导致高达 100%的发病率和 90%的死亡率。山羊通常对 PPRV 的敏感性比绵羊高且康复率高于绵羊^[1-3]。该病是 OIE 法定报告动物疫病,也是全球计划根除的动物疫病,我国将其列为一类动物疫病^[4-5]。PPR 活疫苗被用于预防该病,鉴于该疫苗可产生长达 3 年的免疫持续期以及我国成功消灭牛瘟的经验,农业部印发了《全国小反刍兽疫消灭计划(2016—2020 年)》^[6-7]。

为切实做好 PPR 消灭工作,有效保障养羊业稳定健康发展,按照《中华人民共和国动物防疫法》和《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020 年)》的要求,免疫地区的养羊场(户)应做好羊群免疫工作,对新生羔羊和新补栏的羊要及时补免,并做好免疫记录,免疫抗体合格率应达到 70% 以上。但在基层免疫工作中,对一些免疫背景不清、新补栏羊进行补免时,二次免疫是否会中和动物已经产生的 PPR 抗体从而影响免疫效果,以及对初次免疫 PPR 活疫苗后不产生抗体的羊进行二次免疫能否产生 PPR 抗体存在疑问,鉴于此开展了 PPR 活疫苗的二次免疫试验研究。

1 材料与方法

1.1 供试疫苗 PPR 活疫苗 2016011-1 批,由天康生物股份有限公司生产。

1.2 主要试剂 PPR 标准阳性血清、PPR 标准阴性血清、PPRV Nigeria 75/1 株及 Vero 细胞均购自中国兽医药品监察所。

1.3 试验动物筛选 试验用绵羊由昌吉农胜商贸有限公司提供。采集 1 岁龄左右健康绵羊血 100 份,用病毒中和试验方法^[8]检测 PPR 中和抗体,选择 PPR 中和抗体效价小于 1:4 的绵羊 80 只用于试验。

1.4 试验分组及免疫接种 一次免疫组,绵羊 30

只,各颈部皮下注射 PPR 活疫苗 1 头份,监测免疫后 21~323 d PPR 抗体水平;二次免疫组,绵羊 50 只,各颈部皮下注射 PPR 活疫苗 1 头份。免疫后 21 d,在另一侧颈部皮下注射 PPR 活疫苗 1 头份,监测二免后 3~21 d PPR 抗体水平。

1.5 免疫抗体检测 将被检羊血清及对照血清 56 °C 水浴灭活 30 min。在 96 孔细胞培养板将血清进行 2 倍系列稀释,向所有血清孔中加入含 100 TCID₅₀/0.1mL 的 PPRV,37 °C 作用 1 h 后向所有孔中加入浓度为 2×10^5 /mL ~ 3×10^5 /mL 的 Vero 细胞悬液 0.1 mL。设立病毒回归对照,即将 100 TCID₅₀/0.1mL 病毒工作液用无血清 MEM 细胞培养液 10 倍系列稀释成 10 TCID₅₀/0.1mL、1 TCID₅₀/0.1mL、0.1 TCID₅₀/0.1mL,取病毒工作液和 3 个稀释度病毒液,每个病毒液接种 5 孔,每孔 0.1 mL。置 37 °C、5% CO₂ 中培养 6 d,期间每日观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。

1.6 中和抗体结果判定 100 TCID₅₀、10 TCID₅₀ 病毒对照及阴性血清对照孔均应出现 CPE,1 TCID₅₀ 病毒对照部分孔出现 CPE,0.1 TCID₅₀ 病毒对照及阳性血清对照 1:160 稀释度以下细胞孔和细胞对照孔应不出现 CPE。记录被检血清各稀释度 CPE 孔数,以 5 个试验孔均未出现 CPE 的血清最高稀释度为中和抗体滴度,中和抗体滴度不小于 1:10 判为阳性。

2 结果

2.1 PPR 活疫苗一次及二次免疫效果 PPR 活疫苗一次免疫后 21 d PPR 中和抗体滴度平均可达 5.18 ± 2.87 ,阳性率为 84%,一免后 180~323 d 每个月进行一次 PPR 抗体检测,PPR 抗体阳性率均为 83%。二次免疫后 3~21 d,抗体一直呈上升趋势,平均滴度分别为 5.65 ± 2.56 、 6.95 ± 1.82 、 7.28 ± 1.18 、 8.12 ± 1.31 ,阳性率分别为 90%、100%、100%、100% (表 1)。

表 1 二次免疫组 PPR 抗体检测结果

Tab 1 PPR antibody detection results of secondary immunization group

| 检测结果 Results | 一次免疫后 21 d 21days after primary immunization | 二次免疫后 3 d 3days after secondary immunization | 二次免疫后 7 d 7days after secondary immunization | 二次免疫后 14 d 14days after secondary immunization | 二次免疫后 21 d 21days after secondary immunization |
|------------------------|---|---|---|---|---|
| 抗体水平 Antibody level | 5.18±2.87 | 5.65±2.56 | 6.95±1.82 | 7.28±1.18 | 8.12±1.31 |
| 阳性率 Positive rate | 84% | 90% | 100% | 100% | 100% |

2.2 PPR 活疫苗持续期检测结果 PPR 活疫苗免疫持续期可以达到 3 年,通过本次 10 个多月的检

测,免疫后 323 d PPR 抗体滴度仍然维持在 6.59±1.24(图 1),阳性率为 83%。

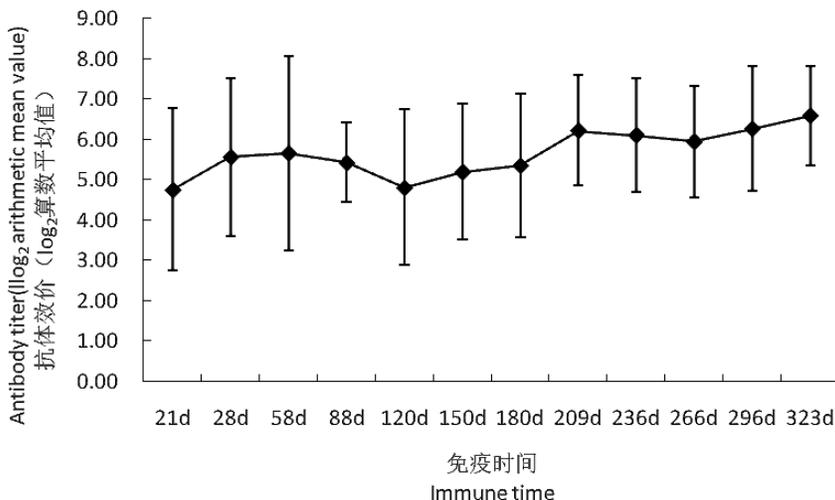


图 1 一次免疫组 PPR 抗体水平消长曲线图

Fig 1 Dynamic curves of PPR antibody levels in primary immunization group

3 讨论

PPR 活疫苗是一种通过 Vero 细胞培养的弱毒活疫苗,基于对原宿主失去致病力或致病力弱但仍具有免疫保护性的 Nigeria 75/1 株制成。PPR 活疫苗自 2007 年 10 月开始在我国应用,宋跃君、何利昆等人分别对 PPR 活疫苗的免疫效果进行了试验,结果证实疫苗在免疫场中应用半年后 PPR 抗体阳性率可达 83.2%,一年后达 90.3%^[9-10]。虽然免疫抗体合格率达到 70% 以上的要求,但由于羊个体敏感性差异及防疫人员免疫操作水平、疫苗保存条件等因素仍造成了部分羊未达到免疫保护标准。在疫病爆发时仍会造成养殖户的损失。通过

对 PPR 活疫苗的二次免疫试验证实,一次免疫后 21 d 抗体阴性率为 16%,二次免疫 7 d 后抗体阳性率为 100%,说明在一次免疫中没有产生抗体的羊经二次免疫抗体合格率能达到 100%,且对已经产生的 PPR 抗体不会产生中和抵消作用。

PPR 活疫苗免疫持续期可以达到 3 年,通过本次 10 个多月的检测,免疫后 323 d PPR 抗体滴度仍然维持在 6.59±1.24,阳性率为 83%。另外,不同品种的羊对该疫苗的免疫效果也有差异,徐雅萍等对免疫 PPR 活疫苗的湖羊进行检测表明湖羊在免疫该疫苗后 14 d 免疫合格率能达到 100%,7 个月

后免疫合格率降至 88.24%^[11]。因此,对免疫一段时间后部分羊 PPR 抗体降低的现象,还是推荐进行二次免疫。由于条件限制未对二次免疫羊群进行免疫持续期监测,但从抗体水平及阳性率考虑,其持续期应不低于一次免疫羊群。

疫苗在基层的应用中,可能遇到免疫背景不清的羊群,在不具备检测条件的情况下是否需要进行羊群免疫是基层工作者的疑虑。通过二次免疫试验证实,对已经有 PPR 抗体的羊进行再次免疫,羊群平均抗体水平未出现中和反应引起的抗体下降现象,相反,二免后 PPR 抗体阳性率明显提高至 100%。因此,养殖户可根据羊群的免疫情况及疫病的爆发情况,选择是否进行疫苗二次免疫。二次免疫试验结果可对 PPR 疫苗的免疫防控工作提供指导,在疫病爆发时对羊群可集中免疫,同时对免疫背景不清的羊群也应当进行免疫。

参考文献:

- [1] Naveen K, Sunil M, Sudhir K K, *et al.* Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: a comprehensive review [J]. *Viruses*, 2014, 6(6): 2287-2327.
- [2] Begum S S, Mahato G, Sharma P. Assessment of immune response to a lyophilized peste-des-petits-ruminants virus vaccine in three different breeds of goats[J]. *Vet World*, 2016, 9(6): 568-571.
- [3] Balamurugan V, Hemadri D, Gajendragad M R, *et al.* Diagnosis and control of peste des petits ruminants: a comprehensive review [J]. *Virus Disease*, 2014, 25(1): 39-56.
- [4] Satya P, Murali M, Eda A, *et al.* Emergence of PPR and its threat to Europe[J]. *Small Rumin Res*, 2016, 142: 16-21.
- [5] Parida S, Muniraju M, Mahapatra M, *et al.* Peste des petits ruminants[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 181(1/2): 90-106.
- [6] 吴锦艳,尚佑军,田宏,等. 2007-2014 年国内外小反刍兽疫流行现状及分析[J]. *中国兽医学报*, 2016, (4): 687-693.
- [7] 刘永宏,赵丽,曹胜波,等. 小反刍兽疫在中国的流行趋势及应对措施[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(1): 110-113.
Liu Y H, Zhao L, Cao S B, *et al.* Prevalent trends and countermeasures of peste des petits ruminants in China[J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2015, 36(1): 110-113.
- [8] 汪萍,尹传振,柏庆,等. 阻断 ELISA 与病毒中和试验检测 PPR 抗体的比较分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(8): 658-660.
Wang P, Yin C Z, Bai Q, *et al.* Comparison of ELISA with the virus neutralization test for detecting serum antibody to peste des petits ruminants [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(8): 658-660.
- [9] 宋跃君,徐玉,张远洲,等. 小反刍兽疫疫苗临床免疫效果试验[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(6): 77-79.
Song Y J, Xu Y, Zhang Y Z, *et al.* Clinical immune effect of peste des petits ruminants vaccine [J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2016, 37(6): 77-79.
- [10] 何利昆,段亚良,谷志大,等. 辽宁省小反刍兽疫疫苗临床免疫效果跟踪试验及抗体水平动态观察[J]. *现代畜牧兽医*, 2014, (8): 14-18.
He L K, Duan Y L, Gu Z D, *et al.* Immune efficacy and antibody level of Peste des petits ruminants vaccine in a immunological experiment in Liaoning province [J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2014, (8): 14-18.
- [11] 徐娅萍,邱寒峰,俞乾挺,等. 小反刍兽疫疫苗对不同日龄湖羊的免疫效果研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(8): 646-648.
Xu, Y P, Qiu H F, Yu H T, *et al.* The immunization effects on the antibody induced by vaccine of peste des petits ruminants in Hu sheep at different day-old [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(8): 646-648.

(编辑:李文平)