

# 不同伪狂犬病活疫苗免疫效力比较

陈娟,喻正军\*

(湖南中岸生物药业有限公司,长沙 410000)

[收稿日期]2016-07-29 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2017)01-0015-04 [中图分类号]S852.5

**[摘要]** 为临床科学选用疫苗,对来自三个生物制品厂的伪狂犬病活疫苗的免疫效力进行了评价。试验选取 35 日龄伪狂犬阴性猪 20 头,试验根据疫苗接种情况分为 5 组,分别为:免疫本公司 ST 细胞系增殖制备活疫苗组(A 组)、免疫本公司鸡胚成纤维细胞增殖制备活疫苗组(B 组)、免疫进口活疫苗组(C 组)、免疫国产活疫苗组(D 组)、免疫疫苗稀释液的对照组(E 组),然后进行免疫监测和效力评价,观察不同疫苗组仔猪的抗体水平后攻毒保护情况。结果显示:一次免疫后各组抗伪狂犬病毒抗体水平增长缓慢,进行二次免疫后,抗体水平迅速增加并保持较高水平。攻毒后,从身体耐受性、体温变化、体重下降率以及 gE 抗体水平来看,二组 C 疫苗组和四组 A 疫苗组耐受性较强,较快恢复健康,体重下降率较小且 gE 抗体水平较高。

**[关键词]** 伪狂犬病;活疫苗;免疫效力

## Comparison of Immune Efficacy of Pseudorabies Vaccines from Different Bio-factories

CHEN Juan, YU Zheng-jun\*

(Hunan Sinoland Biological Pharmaceutical Co. Ltd, Changsha 410000, China)

**Abstract:** Immune Efficacy of pseudorabies vaccine from three bio-factories was evaluated to provide data for the selection of this kind of vaccine in practice. Twenty 35-day pigs with both sero-negative and pathogen negative was selected and divided into five groups, A, B, C, D, E, with the intramuscular injection of ST origin vaccine from our factory, CEF origin vaccine from our factory, one kind of imported vaccine from a famous company, one kind of vaccine from a company in China, and blank control, individually. Antibody titres and immune efficacy was monitored at two time points. The data demonstrated antibody titres for the gB fragment of porcine pseudorabies rised slowly after the first inoculation, then this certain antibody titres for gB elevated rapidly and stably after the second vaccination. Furthermore, some clinic index, including body resistance, temperature fluctuation, weight loss, etc. and antibody levels for gE after poison attacking was comprehensively evaluated. The result showed that there were more tolerance, more recovery, higher gE antibody and less weight losing in group C and A.

**Key words:** pseudo rabies; live vaccine; immune efficacy

作者简介:陈娟,硕士,从事生物制品品质提升与研发工作。

通讯作者:喻正军。E-mail: yuzj@ringpu.com

伪狂犬病是由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的以发热, 奇痒, 脑脊髓炎为主要特征的一种烈性传染病。猪是伪狂犬病毒的自然宿主、贮存者和传播者。伪狂犬病对我国的养猪危害极大, 常在猪群中爆发流行。该病毒可感染各个年龄段的猪, 主要引起妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎, 哺乳仔猪高死亡率及种猪不育。于今伪狂犬病毒在我国广泛的存在, 尤其是变异株的出现, 给防治伪狂犬病带来新的困难, 严重威胁着我国猪群的健康, 并造成严重经济损失<sup>[1-2]</sup>。目前我国伪狂犬病活疫苗毒株以经典株 Bartha 株为主, 通过市场调研, 各个厂家疫苗效果不一<sup>[3-5]</sup>, 但目前并未发现有相关报道出现<sup>[6-8]</sup>。本试验筛选市场上免疫效果较好的几个厂家的伪狂犬病活疫苗进行免疫试验和攻毒试验, 比较了解不同厂家伪狂犬病活疫苗的免疫效果, 为进一步防治伪狂犬病提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞、疫苗、实验猪 细胞: 用于病毒增殖的 ST 细胞系由本公司保存, 鸡胚成纤维细胞为采用 10 日龄 SPF 鸡胚制备。疫苗: 活疫苗 A 采用 ST 细胞系增殖制备, 采用蔗糖牛奶保护剂, 疫苗批号 201504001; 活疫苗 B 由鸡胚成纤维细胞增殖制备, 采用蔗糖牛奶保护剂, 疫苗批号 201504004; 疫苗 C 为外购进口疫苗, 批号 L409725; 疫苗 D 为外购国产疫苗, 批号 140196901。实验仔猪: 本公司健康动物室提供, 由 2~3 胎经产母猪所产 35 日龄左右仔猪 20 头, 通过 IDEXX 抗体试剂盒检测证实伪狂犬病毒 gE 抗体均为阴性。采用法国 LSI 猪伪狂犬病病毒 gB 抗体检测试剂盒检测检测伪狂犬病毒 gB 抗体均为阴性。

1.1.2 试剂盒 检测伪狂犬野毒抗体 ELISA 诊断试剂盒: IDEXX PRV gPI(gE) 抗体 ELISA 鉴别诊断试剂盒, 购自北京爱德士元亨生物科技有限公司。检测伪狂犬病抗体水平 ELISA 检测试剂盒: 法国 LSI 猪伪狂犬病病毒 gB 抗体检测试剂盒。

1.1.3 仪器、耗材 酶标仪、离心机、恒温箱、移液枪及配套枪头、离心管架、1.5 mL 离心管、10 mL 一

次性注射器等。

1.1.4 攻毒毒株 攻毒所用伪狂犬强毒为实验室自行分离伪狂犬病毒变异株, gE 基因未缺失, 病毒含量为  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验动物的分组、免疫接种 本实验共需 35 日龄仔猪 20 头, 随机分为 5 组, 每组 4 头。第一组为对照组(E 组), 免疫疫苗稀释液 1 mL/头; 试验组各疫苗每头份病毒含量不同, 为便于进行比较分析, 选定测定结果最高的一组( $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/头份)为标准进行免疫试验。第二组免疫进口活疫苗组(C 组), 免疫剂量为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/头; 第三组免疫国产活疫苗组(D 组), 免疫剂量为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/头; 第四组为免疫本公司 ST 细胞系增殖制备活疫苗组(A 组), 免疫剂量为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/头; 第五组为免疫本公司鸡胚成纤维细胞增殖制备活疫苗组(B 组), 免疫剂量为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/头。免疫方式为颈部肌肉注射。首次免疫后 28 d, 对试验组进行二次免疫, 免疫剂量为  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/头, 免疫方式为颈部肌肉注射。

1.2.2 攻毒实验 首次免疫 4 周后, 为保证免疫效果和攻毒效果, 对试验组猪进行二次免疫, 根据猪伪狂犬病毒 gB 抗体水平上升情况, 二次免疫四周后, 从每组 4 头试验猪中随机抽选 2 头进行攻毒。

1.2.3 临床观察 在动物免疫前后和攻毒前后, 观察其采食和精神状态, 攻毒前及攻毒后一周分别对试验猪称重。攻毒后每天观察 2 次, 测量体温 2 次并记录临床症状(死亡的除外)。

1.2.4 实验血清采集 一次免疫后 7 d、14 d、21 d、28 d, 二免后 7 d、14 d、21 d、28 d, 攻毒前和攻毒后 7 d、14 d、21 d 对试验猪前腔静脉采血(攻毒死亡的除外)。采血后将血液连同注射器一起放 37 °C 环境 2~3 h, 等血清析出; 将析出的血清 5000 r/min 下离心 10 min, 取上清, 表明组号, 实验日期后, 放 -25 °C 保存待检。

1.2.5 病料检测 采用阻断 ELISA 法检测 PRV gE 和 PRV gB 抗体水平。通过计算样品(S)与阴性对照(N)的比例(S/N)来确定伪狂犬 gE 抗体的有无。S/N = 样品 OD<sub>650</sub> 值/阴性对照平均 OD<sub>650</sub> 值, 其中: S/N ≥

0.6,样品确定为阳性; $S/N > 0.7$ ,样品确定为阴性; $0.6 < S/N \leq 0.7$ ,样品为可疑。通过计算阻断率( $Inh\%$ ) =  $(ODm\ NC - ODm\ Sample) / ODm\ NC$  来检测样品 gB 抗体水平高低。其中  $Inh\% < 45\%$  为阴性,  $Inh\% > 50\%$  为阳性,  $45\% \leq Inh\% \leq 50\%$  为可疑。

## 2 结果与分析

**2.1 免疫试验结果** 试验组与对照组一免和二免后不同时间猪只血清抗伪狂犬病毒抗体水平检测结果见图 1。免疫一周后,与第一组对照组相比,4 种疫苗免疫组都产生了抗体,其中免疫二组疫苗后的猪只抗体产生速度最快,抗体水平最高,平均阻断率达到 75% 以上;其次是第四组疫苗免疫组,平均阻断率达到 70%,第三组和第五组一免一周后抗体水平最低,平均阻断率为 55%。一免后的四星期,四个免疫组的抗体水平逐渐升高,其中疫苗二组的抗体水平显著高于其他 3 组。一免后第四周进行二次免疫,二免后,4 组免疫组抗体水平迅速上升,平均阻断率均达到 95% 以上,二免后 3 周,抗体水平稳定,平均阻断率保持在 97% 的状态,第二、第三、第四免疫组疫苗之间免疫效果差异不明显,第五组疫苗的免疫效果略低于前三组。

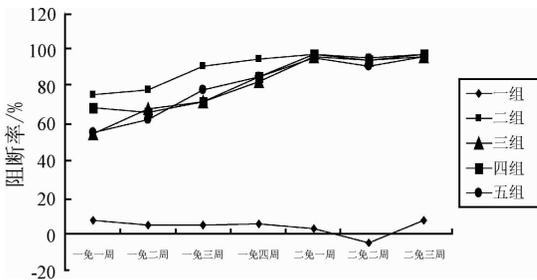


图 1 一免和二免后试验猪只 PR 抗体水平变化情况

**2.2 攻毒后个体耐受情况** 二免后第四周对五组猪只进行攻毒试验。攻毒后,对照组试验猪症状最明显,表现为震颤或卧地不起,食欲废绝,呼吸不畅并伴有喷嚏流涕现象,昏迷以至衰竭死亡。第二组和第四组试验猪开始出现精神沉郁,食欲减退以及轻微的呼吸症状。第三组和第五组试验猪伴有四肢行走不协调,叫声嘶哑无力,腹泻以及鼻炎。病猪身体瘦弱导致体重下降,病程持续 6~10 d,耐受过动物较快恢复健康。

**2.3 攻毒后体重变化** 攻毒后猪只体重变化结果如图 2 显示。攻毒后,试验仔猪体重明显下降,攻毒后一周试验组仔猪比攻毒前体重下降近 50% (对照组死亡)。其中第二组、第三组、第五组体重下降最为明显,分别为 52.55%、59.3% 和 55.45%,第四组攻毒前后体重下降 30.25%,相对较少。结果说明免疫第四组疫苗后,猪只对此株伪狂犬野毒的抵抗能力高于免疫其他三组疫苗。

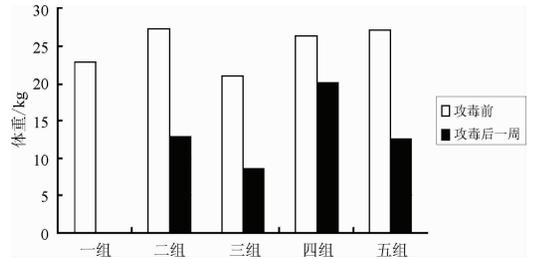


图 2 攻毒前后试验猪只体重变化情况

**2.4 攻毒后体温变化** 攻毒后猪只体温的变化情况如图 3 所示。攻毒后,免疫组猪只开始发热,体温上升至 40℃ 以上,最高达到 42℃。从攻毒后一天开始持续发热 3~4 d,耐受过后体温开始下降,慢慢恢复正常。对照组猪只攻毒后体温急剧下降至 30℃ 以下,而后体温开始升高至 40℃ 以上,攻毒后 4~5 d 死亡。各免疫组间猪只体温变化差异不显著,说明各免疫组猪只免疫伪狂犬病活疫苗后,对伪狂犬野毒均有一定的抵抗力。

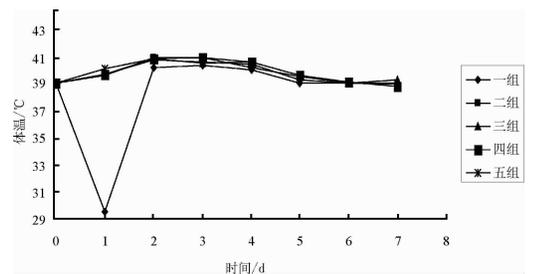


图 3 攻毒后各组试验猪体温变化情况

**2.5 攻毒后伪狂犬病毒 gE ELISA 抗体检测结果** 免疫组攻毒前后伪狂犬病毒抗体水平检测结果见图 4。攻毒前各免疫组猪只伪狂犬病毒 gE 抗体均为阴性 ( $S/N > 0.7$ ),攻毒后一周,第四组和第五组试验猪伪狂犬病毒 gE 抗体出现阳性 ( $S/N < 0.6$ ),

而第二组和第三组为可疑( $0.6 \leq S/N \leq 0.7$ )。攻毒后第三周,4组免疫组猪只伪狂犬病毒gE抗体均转为阳性( $S/N < 0.6$ )。图4显示,攻毒后第三周第二组S/N值最高,其次是第三组、第五组以及第四组,但各免疫组之间gE抗体水平差异不明显。

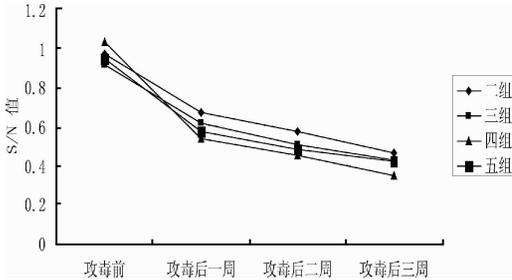


图4 攻毒前后各免疫组伪狂犬病毒gE抗体水平变化情况

### 3 讨论与小结

3.1 不同厂家伪狂犬病活疫苗免疫效果 本试验中,在不存在母源抗体的情况下,我们对不同厂家的伪狂犬病活疫苗的免疫效果进行比较。从免疫试验可以看出,一次免疫以后,各免疫组抗体水平上升较慢,二免后抗体水平迅速上升且各组平均阻断率保持在95%~98%,能较好的预防伪狂犬病的发生。随着伪狂犬病毒变异株出现,传统毒株疫苗难以保护的现状下,一次免疫后免疫效果并不理想,试验结果也验证了这一点,本试验中尝试在一次免疫后4周进行二次免疫,再进行攻毒,验证此免疫方法下的免疫效果较好。因此,在实际免疫过程中,我们可以在一免后2周进行二次免疫,能够得到较好的免疫保护效果。

3.2 不同厂家伪狂犬病活疫苗攻毒情况 为进一步比较不同疫苗的免疫效果,我们采用伪狂犬病毒变异株对五组猪只进行攻毒。试验结果显示,攻毒后,二组C疫苗组和四组A疫苗组耐受性较强,较

快恢复健康,体重下降率较小且gE抗体水平较高,整体上免疫效力优于三组D疫苗和五组B疫苗。攻毒后,对照组猪只全部死亡,说明免疫伪狂犬病活疫苗在一定期限内能够产生较强的免疫效果,抵御伪狂犬病毒变异株的侵害。但4个试验组的猪只体重下降都在30%以上,且对照组全部死亡,说明攻毒毒株毒力较强,但传统的经典毒株疫苗可以起到一定的保护效果。

通过本次试验,说明在无母源抗体存在的情况下,仔猪免疫伪狂犬病活疫苗有一定的保护作用。因毒株变异等原因,影响到传统毒株活疫苗免疫效果,可以在一次免疫后进行二次免疫,能够达到较好的保护。攻毒试验结果显示,第二组进口疫苗C的免疫效果较好,能够有效的抵御伪狂犬病野毒的侵袭,采用传代细胞制备的第四组疫苗的免疫效果跟第二组进口疫苗相当,同时从经济成本和免疫效果考虑,可以使用有效的国产疫苗。

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 中国兽用生物制品规程[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [2] 邓仕伟,汪勇,薛春芳. 我国伪狂犬病流行现状及新特点[J]. 动物医学进展,2006,27(9):105-107.
- [3] 袁章,郭万柱,余光勇,等. 猪伪狂犬病毒载体的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(6):1673-1674.
- [4] 杨毅,李文刚,饶宝,等. 猪伪狂犬病疫苗的研究进展[J]. 江西农业学报,2010,22(3):154-157.
- [5] 孙龙,古洪浪,谢杰雄,等. 猪伪狂犬病的防治及研究进展[J]. 广东饲料,2013,22(10):46-48.
- [6] 袁庆志,吴裕祥. 伪狂犬病流行及疫苗免疫概况[J]. 中国预防兽医学报,1986,27(2):65-67.
- [7] 孔令达. 我国伪狂犬病现状及伪狂犬病疫苗的应用[J]. 养猪,2000,1:39-40.
- [8] 董瑜,黎建雄,黄辉. 伪狂犬灭活疫苗及弱毒疫苗对商品仔猪免疫效果比较试验[J]. 现代农业科技,2008,(9):169-170.

(编辑:李文平)