

江兴华. 不同组合猪繁殖与呼吸综合征疫苗对仔猪的免疫效果研究 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (9): 1117–1125.

JIANG X H. Immune Effect of Different Vaccine Combinations of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome On Piglets [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (9): 1117–1125.

不同组合猪繁殖与呼吸综合征疫苗对仔猪的免疫效果研究

江兴华

[兆丰华生物科技(福州)有限公司, 福建 福州 350014]

摘要:【目的】设计猪繁殖与呼吸综合征 PRRS 活疫苗与灭活疫苗 4 种不同组合方式免疫仔猪, 最大限度地发挥其对仔猪的免疫效果, 为生产上制定 PRRS 的疫苗防控方案提供参考。【方法】制定 4 组不同组合的 PRRS 疫苗免疫方案, 筛选 25 头 28~35 d 仔猪, 随机分成 5 组。A 组为使用 PRRS 活疫苗 (CH-1R 株) A 进行一免, 每头注射 2 mL (含 1 头份), 间隔 14 d 使用 PRRS 灭活疫苗 (CH-1a 株) A 进行二免, 每头肌肉注射 2 mL; B 组免疫同 A 组, 只是一免用 PRRS 活疫苗 (CH-1R 株) B, 二免用 PRRS 灭活疫苗 (CH-1a 株) B; C 组为一免与二免均使用 PRRS 灭活疫苗 (CH-1a 株) A, 两次免疫间隔 14 d, 每次肌肉注射 2 mL; D 组为一免与二免均使用 PRRS 灭活疫苗 (CH-1a 株) B, 其他方法同 C 组; E 组为未免对照组。各组均于免疫前、一免后 1、3、5、7 d 进行采外周血检测细胞因子含量 ($IL-2$ 、 $IFN-\gamma$ 、 $IFN-\alpha$ 、 $TNF-\alpha$), 于一免前、一免后 14 d、二免后 7、14、21、28 d 进行采血检测免疫后抗体水平 (GP5 蛋白与 N 蛋白抗体), 各组于二免后 28 d 进行攻毒, 攻毒后 21 d 内观察体温变化, 21d 后进行剖检观察肺脏的病变。【结果】各免疫组一免后细胞因子含量发生不同的变化, 对照组 $IL-2$ 随日龄的增大有明显的下降, A、B 组在 3 d 时显著高于其他免疫组; C、D 组的 $IFN-\gamma$ 含量在 3、5、7 d 时均显著高于 A、B 组; B 组的 $IFN-\alpha$ 含量在一免后 3、5、7 d 时显著高于其他组, A 组的 $TNF-\alpha$ 含量在 7 d 时显著高于其他组。攻毒后对照组的体温上升快且高, 高温持续期长, B 组温度上升幅度小, 较快降至常温。免后不同时间抗体水平、抗体阳性率、攻毒保护率 B 组均最高。【结论】PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合在仔猪上的免疫效果优于 PRRS 疫苗组合组, B 厂家疫苗免疫组免疫效果优于 A 厂家免疫组。

关键词: 疫苗组合; PRRS 活疫苗; PRRS 灭活疫苗; 免疫效果

中图分类号: S 852

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 09-1117-09

Immune Effect of Different Vaccine Combinations of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome On Piglets

JIANG Xinghua

[JOFUNHWA Biotechnology (Fuzhou) Co., Ltd., Fuzhou, Fujian 350014, China]

Abstract: 【Objective】 Four combinations of Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine including live vaccine and inactivated vaccine were designed to improve the best immune effect for piglets, which would provide the reference for the formulation of PRRS vaccine prevention and control program. 【Methods】 A total of 25 piglets aged 28–35 days were randomly divided into 5 groups. In group A, piglets were firstly immunized with the live vaccine of PRRS (CH-1R strain) from manufacturer A and secondly immunized with the inactivated vaccine of PRRS (CH-1a strain) from manufacturer A at an interval of 14 days. In group B, they was firstly immunized with the live vaccine of PRRS (strain CH-1R) B and secondly inactivated with the inactivated vaccine of PRRS (CH-1a strain) from manufacturer B, respectively. In group C, they was immunized for two times with the inactivated vaccine of PRRS (CH-1a strain) from manufacturer A. The interval of two immunization was 14 days, and 2 mL vaccine was injected into each piglet muscle. In group D, they was immunized for two times with the inactivated vaccine of PRRS (CH-1a strain) from manufacturer B. Group E was the control. The levels of cytokines ($IL-2$,

收稿日期: 2022-08-02 初稿; 2022-09-02 修改稿

作者简介: 江兴华 (1975–), 男, 高级兽医师, 研究方向: 兽用生物制品的生产、管理与研发 (E-mail: jxhgreen@163.com)

基金项目: 福州市科技创新平台项目 (2021-P-036); 福建省科技重大专项 (2021NZ029008)

IFN- γ , *IFN- α* , *TNF- α*) in peripheral blood were detected before and 1, 3, 5, 7 days after immunization. Blood samples were collected before the first immunization, 14 days after the first immunization, and 7, 14, 21 and 28 days after the second immunization to detect the levels of antibodies anti-GP5 protein and N protein. All groups were challenged with PRRSV at the 28th day after the second immunization, and body temperature was detected for 21 days after PRRSV challenge, and necropsy was performed at the 21st day after the PRRSV challenge. 【Results】 The test results showed that the mRNA expression levels of cytokines in all groups showed different change trend in control group after first immunization, the *IL-2* expression levels decreased along with the increase of day age, but it in group A, B were significantly higher than those of group C, D, E at the 3rd day; the expression level of *IFN- γ* in groups C and D were significantly higher than those in groups A and B at 3rd day, 5th day and 7th day; the expression level of *IFN- α* in group B was significantly higher than that in other groups at the 3rd day, 5th day and 7th day, and the expression level of *TNF- α* in group A was significantly higher than those in other groups at the 7th day. After PRRSV wide strain challenge, the temperature of the control group rose quickly and high, and the duration of high temperature was long. The temperature of piglets in groups B increased less, and quickly returned to normal temperature. After immunization, the antibody level, antibody positive rate and challenge protection rate were the highest in group B. 【Conclusion】 The immune effect of live vaccine and inactivated vaccine of PRRS combination immunization is better than that of inactivated vaccine combination immunization, and the immune effect of vaccine from manufacturer B is better than that from manufacturer A.

Key words: different vaccine combinations; live vaccine of PRRS; inactivated vaccine of PRRS; immune effect

0 引言

【研究意义】猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS, 俗称猪蓝耳病) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的急性传染病。该病主要造成妊娠母猪流产、死胎等繁殖障碍和仔猪呼吸道疾病, 并导致仔猪死亡率升高, 生长发育受阻, 高死亡率, 既能垂直传播又能水平传播^[1-2]。2007 年前后我国各地陆续发生高致病性 PRRS。高致病性 PRRS 已成为困扰养猪业的最主要的疫病之一, 给养猪业造成了巨大的经济损失^[3]。PRRSV 主要感染猪的巨噬细胞, 主要损伤肺脏及其他免疫器官, 导致免疫力下降, 从而引起免疫抑制, 感染猪不仅引起免疫抑制, 还会影响其他疫苗免疫, 增加感染其他疾病的几率, 如容易感染猪流行性腹泻、非洲猪瘟及各种细菌性疾病等。

【前人研究进展】目前预防 PRRS 最有效的措施仍是疫苗免疫, 科学的免疫至关重要^[4-5]。我国市面上以 PRRS 活疫苗和灭活疫苗为主, 其中活疫苗毒株主要有 CH-1R 株、JXA1-R 株、VR2332 株等, 灭活疫苗毒株主要有 CH-1a 株, 还有些新型 PRRS 疫苗, 如活载体疫苗、亚单位疫苗等。PRRS 活疫苗可诱导体液免疫和细胞免疫, 免疫持续期长, 其免疫效果比灭活苗好。灭活疫苗需多次免疫、免疫剂量大、副作用较大, 不能快速激发产生细胞免疫反应, 产生体液免疫迟缓, 免疫持续期短, 因而单独使用 PRRS 灭活疫苗免疫仔猪群, 免疫效果差, 难以很好地防控 PRRS^[6]。早期市面上防控 PRRS 以免疫 PRRS 活疫苗为主, 但是 PRRS 活疫苗的不安全性仍然影响着猪群的稳定。近年来, 由于非洲猪瘟疫情的影响, 养猪

场更加重视蓝耳活疫苗可能对猪群不稳定的影响。故而许多厂家陆续推出安全性更高的蓝耳病灭活疫苗, 且也得到了一定的认可, 并取得了一定的效果, 但褒贬不一。【本研究切入点】目前有些厂家推荐使用 PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合的免疫方案, 至于 PRRS 活疫苗与灭活疫苗哪种组合免疫方案最佳, 有待深入研究。【拟解决的关键问题】本研究设计 PRRS 活疫苗与灭活疫苗 4 种不同组合方式免疫仔猪, 通过抗体水平、细胞因子水平以及攻毒保护试验, 对比不同组合的免疫效果, 以期为市场制定 PRRS 的疫苗防控方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试疫苗、强毒、稀释液 PRRS 活疫苗 (CH-1R 株) A 及稀释液, PRRS 灭活疫苗 (CH-1a 株) A, 由福州牧邦生物科技有限公司提供 (A 厂家); PRRS 活疫苗 (CH-1R 株) B 及稀释液, PRRS 灭活疫苗 (CH-1a 株) B, PRRS 强毒 (NVDC-JXA1 株), 由兆丰华生物科技 (福州) 有限公司提供 (B 厂家)。

1.1.2 主要检测试剂盒与试剂 PRRS GP5、M 蛋白抗体 ELISA 检测试剂盒购自海博莱动物保健品有限公司 (HIPRA 公司); PRRS N 蛋白抗体检测试剂盒购自爱德士生物科技股份有限公司 (EDXX); 血液 RNA 提取试剂盒购自 Bioteke 公司; 反转录试剂盒与实时荧光定量 PCR 试剂盒购自 Novoprotein 公司; tacoTM DNA/RNA Extraction Kit 购自金瑞鸿捷 (厦

门) 生物科技有限公司; AMV 反转录酶、HPRI、Random primer 和 dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹)、PMD-18T、EASY Dilution (for Real Time PCR) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; AceQ[®]Universal U⁺ probe Master Mix V2 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 引物由福州博尚生物技术有限公司合成。

1.1.3 试验用猪 28~35 日龄仔猪, 购自永泰桃园猪场。

1.2 试验方法

1.2.1 试验猪筛选及分组 选择同品种的 4~5 窝体重相近、饲养管理条件相同的 28~35 d 仔猪, 经 PRRSV、猪瘟病毒 (CSFV)、猪圆环病毒 2 型

(PCV-2)、猪伪狂犬病毒 (PRV) 抗原与抗体检测, 选以上病原抗原抗体均为阴性的仔猪 25 头, 免疫前将 25 头仔猪逐头做好编号, 并随机分为 5 个组, 分别为: 免疫组 A、B、C、D, E 组为空白对照组, 每组 5 头仔猪, 各组均饲养于单独的猪栏。攻毒前仔猪在正压猪舍隔离饲养, 攻毒时仔猪转至负压区猪舍进行隔离饲养。

1.2.2 试验猪免疫与攻毒 免疫: 仔猪购回后在动物房猪舍正压区饲养, 然后采血进行 PRRS 抗原抗体检测, 并观察 3 d, 精神、体况均正常后进行免疫接种。各组免疫信息见表 1。

表 1 各组免疫信息
Table 1 Information table of immune in each group

| 组别 Group | 数量 Total /头 | 第一次免疫 The first immunization | | | 第二次免疫 (一免后 14 d) Second immunization (14 days after the first immunization) | | |
|-------------|----------------|---------------------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | | 疫苗类型 Vaccines | 免疫方法 Immune type | 剂量 Dose/(mL·头 ⁻¹) | 疫苗类型 Vaccines | 免疫方法 Immune type | 剂量 Dose/(mL·头 ⁻¹) |
| A组 A Group | 5 | PRRS活疫苗 (A) | 肌注 | 2 | PRRS灭活疫苗 (A) | 肌注 | 2 |
| B组 B Group | 5 | PRRS活疫苗 (B) | 肌注 | 2 | PRRS灭活疫苗 (B) | 肌注 | 2 |
| C组 C Group | 5 | PRRS灭活疫苗 (A) | 肌注 | 2 | PRRS灭活疫苗 (A) | 肌注 | 2 |
| D组 D Group | 5 | PRRS灭活疫苗 (B) | 肌注 | 2 | PRRS灭活疫苗 (B) | 肌注 | 2 |
| E组 E Group | 5 | 灭菌生理盐水 | 肌注 | 2 | 灭菌生理盐水 | 肌注 | 2 |

攻毒: 各组分别于二免后 28 d 用 PRRS 强毒 (NVDC-JXA1 株) 进行攻毒, 每只滴鼻 2 mL (含 10^{5.2}TCID₅₀·头⁻¹), 攻毒后每日观察各组仔猪的体温变化、采食量以及是否有其他异常情况, 观察 21 d, 攻毒后 21 d, 对各组仔猪进行剖检, 并仔细观察脏器的病变情况。

1.2.3 血样采集与处理

1) 细胞因子检测血样采集。各组试验仔猪于免前、一免后 1、3、5、7 d 进行外周血抗凝采样, 每只采血 2 mL, 做好标记, 置于-20 ℃ 冰柜保存, 用于检测细胞因子 (*IL-2*、*IFN-γ*、*IFN-α*、*TNF-α*) 含量。

2) 抗体检测血样采集。各组试验仔猪于免前、二免后 7、14、21、28 d 进行采血, 并将所采血样于 37 ℃ 放置 2 h, 移至 4 ℃ 冰箱过夜, 然后 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上层血清, 保存于-20 ℃ 冰柜, 待检测血清中抗体用。

1.2.4 细胞因子检测 将各组用于检测细胞因子的血样用荧光定量 PCR 方法 (染料法) 检测各细胞因子含量。

1) 引物设计与合成。参照 GenBank 中登录的 *IL-2*、*IFN-γ*、*IFN-α*、*TNF-α* 基因序列, 通过 Primer Permier 5.0 和 Oligo 7.0 软件设计、合成 3 对特异性引物, 同时设计内参基因 (*GAPDH*)。引物由福州博尚生物技术有限公司合成。相关引物序列见表 2。

表 2 相关引物序列表
Table 2 Sequence table of related primers

| 引物名称 Primers names | 引物序列 (5'-3') Sequences (5'-3') |
|-----------------------|-----------------------------------|
| GAPDH-F | TATGATTCCACCCACGGCAAG |
| GAPDH-R | CCACAACATACGTAGCACCAG |
| <i>IL-2</i> -F | AAGATGCAGCTCTTGTGTTC |
| <i>IL-2</i> -R | TCAACAGCAGTTACTGTCTCA |
| <i>IFN-α</i> -F | AATCTCTCCCTTCTCCTGCCT |
| <i>IFN-α</i> -R | CAGGAGGAAGAATGGGCTTGT |
| <i>IFN-γ</i> -F | CAGAAGCTAACTCTCTCCGAA |
| <i>IFN-γ</i> -R | TCTGACTTCTCTTCCGCTTT |
| <i>TNF-α</i> -F | GAAGACACACCCCGAACAGG |
| <i>TNF-α</i> -R | CGGCACTGAGTCGATCATCC |

2) 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成。按照病毒 DNA/RNA 核酸提取试剂盒说明书提取总病毒核酸并进行反转录, 反转录体系: $5\times\text{AMV Buffer}$ $2\ \mu\text{L}$, dNTP Mix ($10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\ \mu\text{L}$, 随机引物 $1\ \mu\text{L}$, RNA $3.5\ \mu\text{L}$, AMV 酶 $1\ \mu\text{L}$, 反转录酶抑制剂 $0.5\ \mu\text{L}$, ddH_2O 补足至 $10\ \mu\text{L}$, $42\ ^\circ\text{C}$ 作用 $1\ \text{h}$, 进行反转录合成 cDNA, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

3) 细胞因子含量检测。以上述保存的 cDNA 为模板, 用所设计的特异性引物分别对 *IL-2*、*IFN- γ* 、*IFN- α* 、*TNF- α* 因子及 *GAPDH* 内参进行 qPCR 扩增, 反应体系 $20\ \mu\text{L}$: $\text{TBGreen}^{\text{®}}\text{Premix EX TaqTMII}$ ($2\times$) $10\ \mu\text{L}$ 、上下游引物 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 各 $0.4\ \mu\text{L}$ 、cDNA $2\ \mu\text{L}$ 、补充 ddH_2O 至终体积为 $20\ \mu\text{L}$ 。qPCR 反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$ $2\ \text{min}$; $95\ ^\circ\text{C}$ $15\ \text{s}$, $58\sim 60\ ^\circ\text{C}$ $15\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ $10\ \text{s}$, 40 个循环, 添加熔解曲线, 同时设置阴性对照。

1.2.5 蓝耳抗体检测 将各组血清样本按照一定比例进行稀释后加入到 96 孔 ELISA 检测板, $100\ \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 作用一段时间后, PBST 洗板, 拍干; 加入一定比例稀释的标记抗体, $100\ \mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 作用一段时间后, PBST 洗板, 拍干; 加入终止液进行读值。具体步骤参照试剂盒说明书。

1.2.6 体温观察 各组仔猪攻毒后 21 d 内每天上午检测体温, 并记录。

1.2.7 剖检及观察 将攻毒 21 d 后各组仔猪进行安乐死, 然后剖检, 并仔细观察肺脏病变情况。发病判定标准为攻毒后仔猪出现体温升高 ($\geq 40\ ^\circ\text{C}$), 至少持续 4 日, 食欲减退和明显呼吸道症状; 剖检观察仔猪的肺的心叶、间叶、隔叶等出现不同程度的花斑状肉样实变; 部分仔猪脾脏头部肿大、淋巴结中度到重度肿大。

1.3 数据统计方法

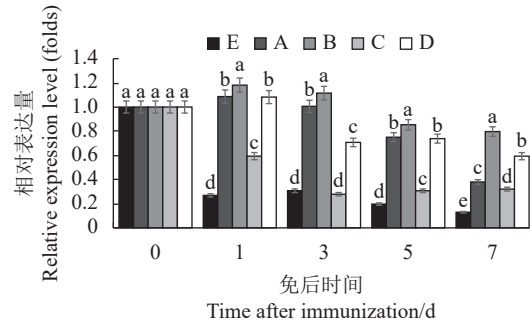
采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, 将免疫后各时间点的处理组各细胞因子含量数据进行 bonferroni 多重比较。

2 结果与分析

2.1 细胞因子含量检测结果与分析

2.1.1 *IL-2* 表达量 *IL-2* 在机体中具有抗病毒、抗肿瘤和增强机体免疫功能等作用, 是细胞免疫的一项评价指标。从图 1 可看出, 对照组与 C 组 *IL-2* 含量免疫后开始快速下降, 至 3 d 后保持较低的水平, 而 A、B、D 组免疫后先上升, 然后缓慢下降, 在 1、3、5 d 仍能保持较高的水平; 各时间点 B 组表达量均高于其他组。图 1 显示, 除了 3 d 的 C 组, 其他免疫组的各时间组的 *IL-2* 含量均显著高于对照组,

A、B、D 组在各时间点的 *IL-2* 含量均显著高于 C 组, A、B 组在 3 d 时又显著高于其他免疫组, B 组在各时间点均显著高于其他组。可见, 从 *IL-2* 表达水平上看 PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合处理的 A 组、B 组优于灭活苗组合组 C、D 组, B 厂家疫苗免疫组优于 A 厂家疫苗免疫组。



(1) 不同时间点各组比较用小写字母表示, 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$); (2) A、B、C、D、E 表示不同免疫组, 其免疫信息见表 1。图 2、3、4 同。

1) Comparisons between groups at different time points were represented by lowercase letters, with different letters representing significant differences ($P < 0.05$). 2) A, B, C, D and E represent different immune groups, and their immune information is shown in Table 1. The same as Fig. 2, 3, 4.

图 1 不同时间点各组 *IL-2* 含量变化

Fig. 1 Changes of *IL-2* content in each group at different time points

2.1.2 *IFN- γ* 表达量 *IFN- γ* 具有免疫调节作用, 可促进抗原呈递和提高巨噬细胞溶酶体活性, 还可以抑制 PRRSV 在巨噬细胞中的复制, 促进细胞免疫应答的效应因子。从图 2 可看出, 对照组与 A 组的 *IFN- γ* 含量免疫后基本保持较低的水平, B、C、D 组均免疫后先上升然后下降, 而后又上升, 在 7 d 时升至最高值, B 组的含量上升与下降幅度比 C、D 组小, C、D 两组为两次免疫灭活苗组变化曲线极为相近, 整体上升较高, 5 d、7 d 时上升特别高。图 2 显示, A 组在各时间点的 *IFN- γ* 含量均与对照组比差异不显著, 在免后 3 d、5 d、7 d 时 C、D 组的

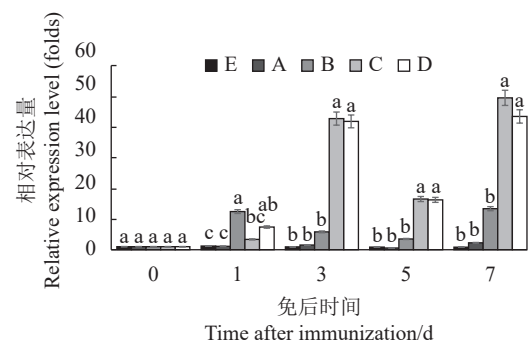


图 2 不同时间点各组 *IFN- γ* 含量变化

Fig. 2 Changes of *IFN- γ* content in each group at different time points

IFN-γ 含量均上升至较高水平，并与其他组比较差异显著。可见，从 *IFN-γ* 表达水平上看，灭活疫苗组合组 C、D 组优于活疫苗与灭活疫苗组合组 A、B 组，能更好地提高 *IFN-γ* 含量，可能与灭活疫苗抗原含量高有关。

2.1.3 *IFN-α* 表达量 *IFN-α* 在机体中主要参与响应病毒感染的先天性免疫，具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用。从图 3 可看出，对照组的 *IFN-α* 含量在免后呈显著下降趋势，均在低含量水平，而 B 组 *IFN-α* 的含量在免后基本呈快速上升趋势，在免后 7 d 达到极高的水平；A、C、D 组免后有所上升，然后上下波动，各时间点含量较低，但均高于对照组；图 3 显示，B 组在免后各时间点 *IFN-α* 含量显著高于其他各组，A、C 组在 7 d 时显著高于对照组和 D 组。可见，从 *IFN-α* 表达水平上看，活疫苗与灭活疫苗组合组 B 组优于其他组，能快速提高 *IFN-α* 含量。

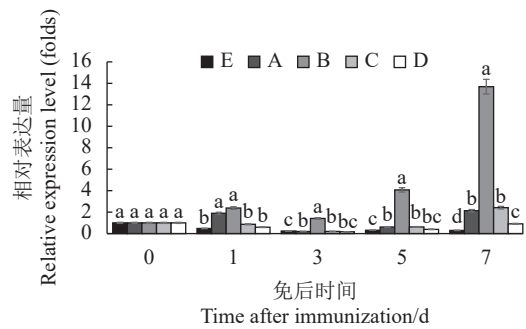


图 3 不同时间点各组 *IFN-α* 含量变化
Fig. 3 Changes of *IFN-α* content in each group at different time points

2.1.4 *TNF-α* 表达量 *TNF-α* 可促进细胞增殖分化、免疫调节、炎症介导、抗肿瘤等作用，可协同 *IFN-γ* 抵抗病毒感染。从图 4 可看出，对照组的 *TNF-α* 含量反复下降后又上升波动，整体含量不高，其他组各时间点的含量均高于对照组，只有 C 组不断上

升，其他组均有下降和上升的变化，其中 A 组在 7 d 时上升最高，均高于其他组；图 4 显示，除了 D 组免后 3 d 的 *TNF-α* 与对照组差异不显著，其他各组不同时间点的 *TNF-α* 含量均显著高于对照组，1 d 时 D 组显著高于其他各组，7 d 时 A 组显著高于其他各组，7 d 时 B、C、D 组又显著高于对照组。可见，各组的 *TNF-α* 含量在免后均有不同程度的上升和波动，没有特别的规律，B 厂家灭活疫苗组合组 D 组在一免后 1 d 时显著高于其他各组，A 厂家活疫苗与灭活疫苗组合组 A 组在 7 d 时显著高于其他各组，说明 B 厂家灭活苗产生的炎症反应较大。

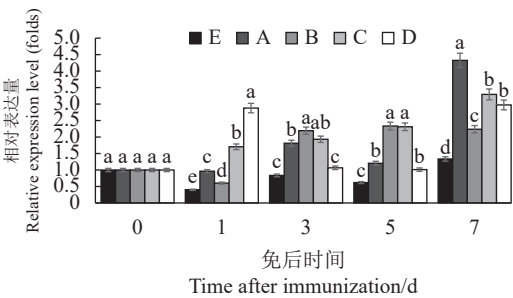


图 4 不同时间点各组 *TNF-α* 含量变化
Fig. 4 Changes of *TNF-α* content in each group at different time points

2.2 血清中抗体检测结果与分析

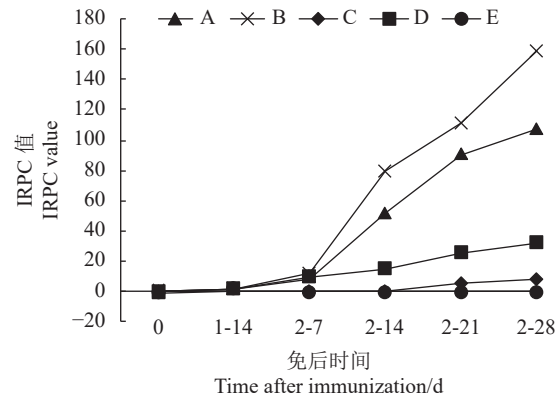
从表 3、表 4 中可以看出，活疫苗与灭活苗组合 A 组、B 组，较早出现抗体转阳，且阳性率较灭活疫苗组合组 C、D 组高；A、B 组中 B 厂家疫苗组整体阳性率高于 A 厂家疫苗组，C、D 组中 D 组 B 厂家的整体阳性率又高于 C 组 A 厂家的。从 GP5 蛋白抗体与 N 蛋白抗体来看，GP 蛋白抗体稍晚于 N 蛋白抗体产生，且整体阳性率也稍低于 N 蛋白抗体。可见，B 厂家活疫苗与灭活苗组合组 B 组的 GP5 与 N 蛋白抗体阳性率最高，免疫效果最好。

从图 5、图 6 可以看出，各组的抗体均从二免后 7 d 开始上升，活疫苗与灭活苗组合 A 组、B 组，

| 表 3 不同疫苗组免疫后 GP5 蛋白抗体阳性率 | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Table 3 Positive rates of antibodies against GP5 proteins after immunization in different groups (单位: %) | | | | | | |
| 组别 Group | 一免前 Before first immunization | 一免后 14 d 14 th d after first immunization | 二免后 7 d 7 th d after second immunization | 二免后 14 d 14 th d after second immunization | 二免后 21 d 21 th d after second immunization | 二免后 28 d 28 th d after second immunization |
| A 组 Group A | 0 | 0 | 20 | 60 | 80 | 100 |
| B 组 Group B | 0 | 0 | 20 | 80 | 100 | 100 |
| C 组 Group C | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| D 组 Group D | 0 | 0 | 20 | 20 | 40 | 60 |
| E 组 (对照) Group E (Control) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

表 4 不同疫苗组免疫后 N 蛋白抗体阳性率
Table 4 Positive rate of N protein antibody in different groups after immunization (单位: %)

| 组别 Group | 一免前 Before the first immunization | 一免后14 d 14 th d after the first immunization | 二免后7 d 7 th d after second immunization | 二免后14 d 14 th d after second immunization | 二免后21 d 21 th d after second immunization | 二免后28 d 28 th d after second immunization |
|---------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| A组 Group A | 0 | 0 | 40 | 60 | 100 | 100 |
| B组 Group B | 0 | 0 | 60 | 80 | 100 | 100 |
| C组 Group C | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 | 40 |
| D组 Group D | 0 | 0 | 20 | 40 | 60 | 60 |
| E组 (对照) Group E (Control) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



1-14 d 代表一免后 14 d, 2-7 d 代表二免后 7 d, 2-14 d, 代表二免后 14 d, 2-21 d, 代表二免后 21 d, 2-28 d 代表二免后 28 d。
1-14 d represents the 14th day after the first immunization, 2-7 d represents the 7th day after the second immunization, 2-14 d represents the 14th day after the second immunization, 2-21 d represents the 21st day after the second immunization, 2-28 d represents the 28th day after the second immunization.

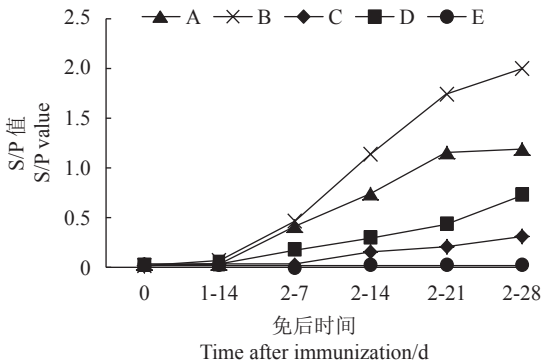
图 5 不同组免后 GP5 蛋白抗体水平

Fig. 5 GP5 protein antibody levels in different groups after immunization

二免后抗体快速上升, 至二免后 28 d 达到最高值。灭活疫苗组合组 C、D 组, 从二免后 7 d 开始缓慢上升, 至二免后 28 d 达到最高值, A、B 组的抗体水平高于 C、D 组, 同时可以看出, B 厂家活疫苗与灭活疫苗组合组及灭活疫苗组合组抗体水平均高于 A 厂家疫苗组合组。可见 B 厂家活疫苗与灭活疫苗组合组 B 组产生的 GP5 和 N 蛋白抗体水平均最高。

2.3 攻毒后体温变化与攻毒保护结果

从图 7 可以看出, 免疫组在攻毒后 7 d 内体温均上升, 升至 40 ℃ 左右, 并上下波动, 部分上升至 41 ℃, 7 d 后开始下降, 逐渐回到常温; 灭活疫苗组合组 C、D 组整体升温比活疫苗与灭活疫苗组合组 A、B 组高, C 组高温的在一周至两周之间持续保持 41 ℃ 的高温。对照组攻毒后体温开始上升, 前 3 d 在 40 ℃ 左右, 然后继续上升, 第 4 天开始升至 41 ℃



1-14 d 代表 1 免后 14 d, 2-7 d 代表 2 免后 7 d, 2-14 d, 代表 2 免后 14 d, 2-21 d, 代表 2 免后 21 d, 2-28 d 代表 2 免后 28 d
1-14 d represents the 14th day after the first immunization, 2-7 d represents the 7th day after the second immunization, 2-14 d represents the 14th day after the second immunization, 2-21 d represents the 21st day after the second immunization, 2-28 d represents the 28th day after the second immunization

图 6 不同组免后 N 蛋白抗体水平

Fig. 6 N protein antibody levels in different groups after immunization

以上, 持续高温, 大约到 13 d 后才下降至 40 ℃ 左右, 然后继续下降, 15 d 下降至接近常温。可见, 活疫苗与灭活疫苗组合 A 组、B 组相对灭活疫苗组合 C 组、D 组体温上升较小, 持续时间也短。B 疫苗厂家的活疫苗与灭活疫苗组合组 B 组体温上升幅度最小, 且最快降至正常体温。

刘义等^[7]研究中, NVDC-JXA1 强毒株攻毒后病变主要表现为肺部尖叶、膈叶明显实变或花斑状病变, 部分出现淋巴结肿大充血, 脾脏肿大。从表 5、图 8 可以看出, 对照攻毒组全部病变, 整个肺呈明显花斑状病变等典型的实变, A、B 组攻毒后的肺部病变较 C、D 组轻微, B 组中 5 头剖检肺部无明显病变, A 组中只有 1 头肺部出现明显病变, C 组中有 3 头肺部出现明显的花斑状病变, D 组中有 2 头出现肺部尖叶、膈叶明显实变或花斑状病变, 免疫组病变部位比对照组轻, 肺部局部出现肉变。可见, 不

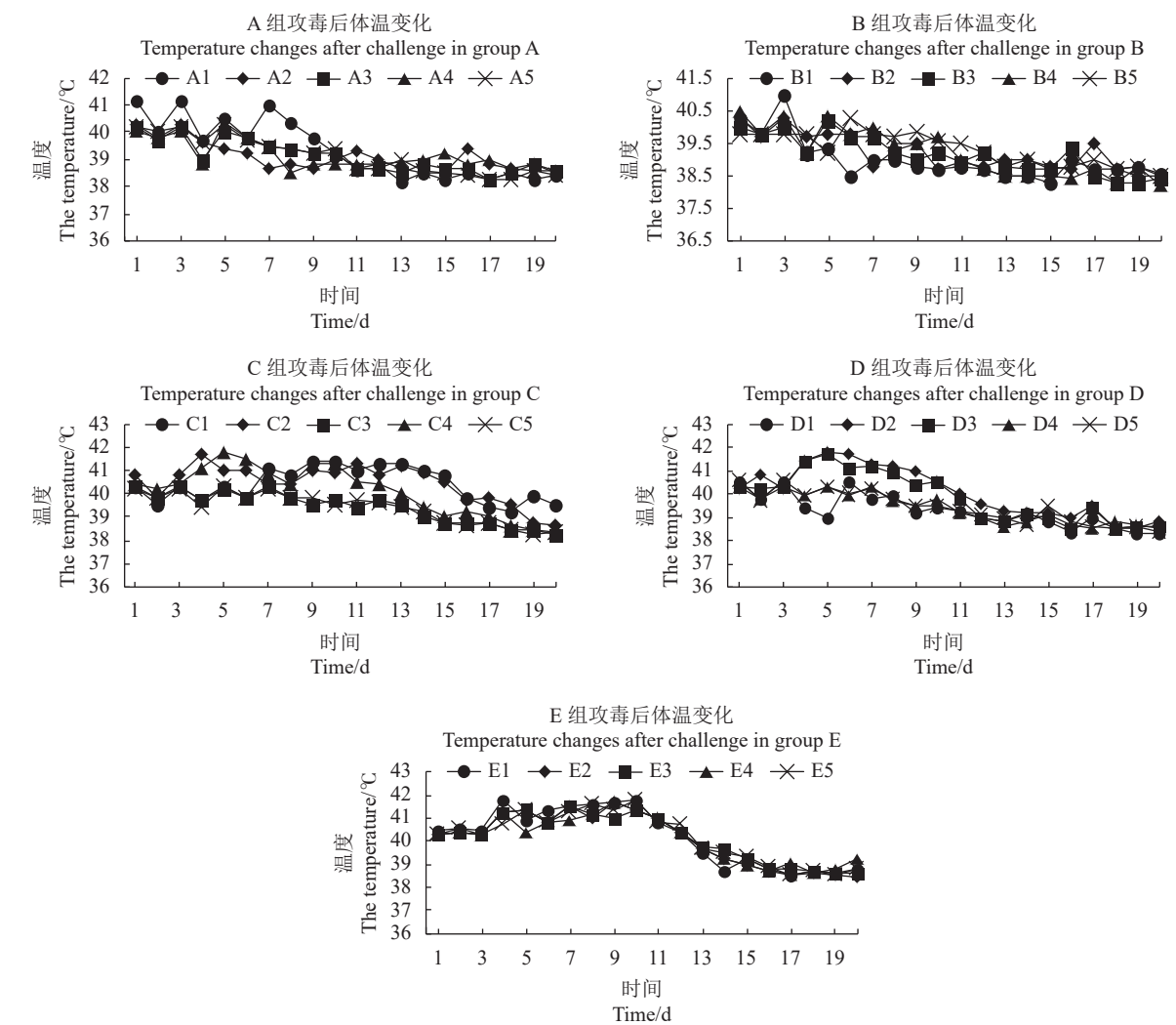


图 7 各组攻毒后体温变化曲线

Fig. 7 Body temperature change curve of each group after challenge

同疫苗组合进行攻毒有一定的保护效果，活疫苗与灭活疫苗组合组攻毒保护率高于灭活疫苗组合组，其中 B 疫苗厂家活疫苗与灭活疫苗组合组 B 组攻毒保护率最高，可达 100% 保护。

表 5 不同组攻毒保护率

Table 5 Challenge protection rate of different groups

| 组别 Group | 攻毒保护率 Challenge protection rate/% |
|-------------------------|--------------------------------------|
| A组 Group A | 80 |
| B组 Group B | 100 |
| C组 Group C | 40 |
| D组 Group D | 60 |
| E组（对照） Group E（control） | 0 |

3 讨论与结论

PRRS 疫苗的免疫保护主要是细胞免疫和体液免疫，活疫苗产生细胞免疫强，同时可产生体液免

疫，灭活疫苗主要以产生体液免疫为主^[8]。从本试验结果可看出，PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合与灭活疫苗组合组比可更早产生抗体，并产生更高的抗体水平，攻毒保护率也更高，这可能与活疫苗早期激活了机体的细胞免疫，并产生了免疫记忆有关，后面再免灭活疫苗时，机体能快速识别免疫记忆，从而快速产生抗体水平，并缩短抗体的空档期。刘海珍等^[9-10]试验结果表明，仔猪用猪繁殖与呼吸综合征活疫苗与灭活疫苗组合免疫，第一次使用活疫苗免疫，第二次使用灭活疫苗免疫，免疫后抗体阳性率和抗体水平均显著高于两次灭活疫苗组合免疫组，结果与本试验结果一致。

本试验结果表明不同厂家 PRRS 灭活疫苗产生抗体水平存在较大的差异，可能与不同厂家的生产工艺及使用的佐剂不同有关，对于 PRRS 灭活疫苗可能需要选择合适的佐剂来辅助提升抗体水平，从而提升免疫效果，所以近年来利用佐剂提高蓝耳疫苗的

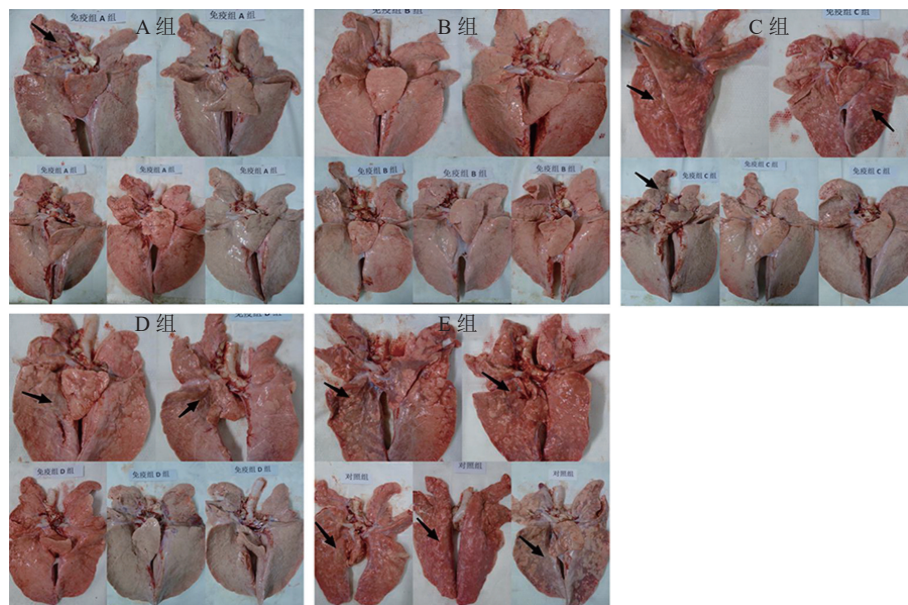


图 8 各组攻毒后肺脏病变情况

Fig. 8 Lung lesions in each group after challenge

免疫效果和交叉保护效果成为一大研究热点^[10]。

NVDC-JXA1 毒株在 PRRS 不同毒株中属于强毒株，仔猪攻毒后以升温并持续保持高温、呼吸困难、肺部典型的花斑状实变为主要特征，并以此特征作为攻毒后病变不保护的标准。JXA1 毒株虽然为强毒株，但对照组攻毒后仔猪也基本不出现死亡情况，只是体温上升持续高温，肺部出现典型的 PRRS 病变。

从各组攻毒后的体温变化可以看出，免 PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合组在攻毒后 7 d 内体温不会升至 41 ℃，而单独两次免灭活疫苗组在 7 d 内有不少体温升至 41 ℃ 以上，同时从整体攻毒的免疫保护率看，PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合组攻毒保护率比单独两次灭活疫苗组高，可能与接种活疫苗可较早产生细胞免疫、免疫力相对较强有关，也可能与活疫苗辅助使用了佐剂，产生一些非特异性免疫有关。

PRRSV 中含有中和表位蛋白 GP2、GP3、GP4、GP5 和 M 蛋白，其中 GP5 是产生中和抗体的主要靶蛋白，其含有 B 细胞表位和 T 细胞表位，可诱导中和抗体的产生^[11-12]，而 N 蛋白为核衣壳蛋白，不含中和表位，产生的 N 蛋白抗体为非中和抗体，N 蛋白抗体水平高低，并不能代表疫苗免疫的保护水平^[13]，本试验选用了两种抗体检测试剂盒，一种为检测 GP5 蛋白抗体，另一种为 N 蛋白抗体，对比了试验各组的两种抗体检测结果，可以看出，N 蛋白抗体的产生早于 GP5 蛋白抗体，免疫后同样的时间 N 蛋白抗体也相对更高。从本试验的 GP5 蛋白抗体和 N 蛋白抗体结果结合攻毒保护结果看，GP5 蛋白

抗体和 N 蛋白抗体越高攻毒保护率也越高，但本试验设计的最后一次检测 GP5 蛋白抗体和 N 蛋白抗体为二免后的 28 d，关于二免 28 d 后两种抗体的消长情况未知，所以 N 蛋白抗体水平高是否能代表疫苗的保护水平有待进一步研究。

在机体免疫反应中 *IL-2*、*IFN-γ*、*IFN-α*、*TNF-α* 细胞因子起着重要的作用，发挥着增强细胞免疫或体液免疫、抗病毒、抗肿瘤和增强机体免疫功能等作用。任向阳等^[14]研究表明疫苗免疫后产生细胞免疫早于体液免疫，从免疫猪瘟疫疫苗后 1~5 d 的攻毒结果看，3 d 就可以产生较好的保护，4 d 就可以产生 100% 保护，说明疫苗免疫后早期可以产生较强细胞免疫力。本试验检测细胞因子主要在于对比疫苗免疫早期的细胞因子含量变化。从试验结果可以看出，活疫苗与灭活疫苗组合组 A、B 组所产生的 *IL-2* 比灭活疫苗组合组 C、D 组高；灭活疫苗组合所产生的 *IFN-γ* 比活疫苗与灭活疫苗组合含量高，可能在免疫后的短时间内机体中灭活疫苗抗原含量比活疫苗高有关；B 厂家的活疫苗与灭活疫苗组合 B 组在 7 d 时 *IFN-α* 含量特别高，A 厂家的活疫苗与灭活疫苗组合 A 组在 7 d 产生的 *TNF-α* 量特别高，可能与不同厂家的疫苗效价及使用的稀释液有关。通过人工表达的 *IFN-α* 通过淋巴结注射，以及经肌肉注射，作为 PRRS 活疫苗的佐剂，均可增强 PRRS 弱毒疫苗诱导机体免疫反应的能力，产生的中和抗体和特异性抗体均明显升高^[10]，所以在制备蓝耳病疫苗时可考虑使用可提高 *IL-2*、*IFN-γ*、*IFN-α*、*TNF-α* 含量的佐剂，从而提高 PRRS 疫苗的免疫效果。

本试验对免后攻毒只监测体温的变化与肺脏的病变观察，对于攻毒的强毒在血液中及在肺脏中的能存活多久，具体不同时间的病毒载量未做检测和研究。William 等的试验结果表明疫苗接种可以有效减少攻毒猪的肺脏病毒含量^[15]。病毒载量的检测对于了解 PRRS 强毒在机体内的增殖与病毒衰减有着重要的意义，有待于进一步研究。

正确使用 PRRS 疫苗是 PRRS 免疫预防的关键，要根据弱毒活疫苗和灭活疫苗的不同使用特点应用不同的免疫方案^[16]。本试验表明，使用 PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合免疫效果优于使用灭活疫苗组合组，产生 IL-2 的含量高，更早产生抗体，并能产生更高的抗体，有更高的攻毒保护率。对于 PRRS 阳性场可参考使用蓝耳病活疫苗与灭活疫苗组合免疫，后期再长期使用灭活疫苗加强免疫，可达到较好的 PRRS 防控效果，并配合生物安全防控和严格的饲养管理可达到最终净化 PRRS 的目的。对于阴性仔猪、肥育猪场可以考虑 PRRS 活疫苗与灭活疫苗组合免疫方法，如果考虑保持猪场抗原阴性，也可以考虑使用灭活疫苗重复免疫的方法，对于阴性种猪场可以考虑使用灭活苗重复免疫的方法。

参考文献：

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 619-625.
- [2] 郭宝清, 蔡雪晖, 刘文兴, 等. 猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗的研制[J]. 中国预防兽医学报, 2000 (4): 259-262.
GUO B Q, CAI X H, LIU W X, et al. Development of oil emulsion inactivated vaccine of Porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2000 (4): 259-262. (in Chinese)
- [3] 李丽琴. 高致病性猪蓝耳病弱毒疫苗与灭活苗免疫特性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
LI L Q. Study on immune characteristics of attenuated vaccine and inactivated vaccine of highly pathogenic PRRS[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010. (in Chinese)
- [4] 梁皓仪. 不同蓝耳病疫苗的免疫效果—抗体效价分析[J]. 养猪, 2008 (4): 70-72.
LIANG H Y. Immune effect of different vaccines for blue ear disease-analysis of antibody titers[J]. *Swine Production*, 2008 (4): 70-72. (in Chinese)
- [5] 张书存, 王志鸿, 廖智慧. 高致病性猪蓝耳病的防控离不开弱毒疫苗免疫[J]. 中国猪业, 2012 (9): 29-34.
ZHANG S C, WANG Z H, LIAO Z H. The prevention and control of highly pathogenic porcine blue ear disease can not be separated from attenuated vaccine immunization[J]. *China Swine Industry*, 2012 (9): 29-34. (in Chinese)
- [6] 梁莹, 杨莉. 高致病性蓝耳病弱毒疫苗及灭活疫苗免疫效果的比较[J]. 中国动物检疫, 2012 (11): 57-58.
LIANG Y, YANG L. Comparison of immune effects between attenuated vaccine and inactivated vaccine against highly pathogenic blue ear disease[J]. *China Animal Health Inspection*, 2012 (11): 57-58. (in Chinese)
- [7] 刘义, 杨秀芬, 冯云飞, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒N蛋白基因工程亚单位疫苗免疫保护试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018 (5): 174-177, 267, 268.
LIU Y, YANG X F, FENG Y F, et al. Immune protection test of porcine reproductive and respiratory syndrome virus N protein gene engineering subunit vaccine[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018 (5): 174-177, 267, 268. (in Chinese)
- [8] 秦学远, 李金海, 罗毅, 等. 高致病性猪蓝耳病灭活疫苗和弱毒疫苗免疫效果试验[J]. 黑龙江畜牧兽医(下半月), 2014 (1): 61-63.
QIN X Y, LI J H, LUO Y, et al. Experimental study on immune effect of inactivated vaccine and attenuated vaccine against highly pathogenic PRRS[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014 (1): 61-63. (in Chinese)
- [9] 刘海珍, 张俊文. 不同猪蓝耳病疫苗对仔猪免疫效果对比试验[J]. 中国畜禽种业, 2013 (2): 42-43.
LIU H Z, ZHANG J W. Comparative experiment on immune effect of different porcine blue ear disease vaccines on piglets[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2013 (2): 42-43. (in Chinese)
- [10] 杨竹鸣. pVAX1-IFN- α 作为猪蓝耳病疫苗免疫佐剂的评价[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
YANG Z M. Evaluation of pVAX1-IFN- α as immune adjuvant of Porcine blue ear disease vaccine[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [11] GONIN P, PIRZADEH B, GAGNON C A, et al. Se- roneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein[J]. *J Vet Di- agn Invest*, 1999, 11 (1): 20-26.
- [12] 冯延, 郭嘉, 许瑞勤, 等. 针对不同形式猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5重组蛋白的抗体中和活性比较[J]. 畜牧兽医学报, 2018 (6): 1222-1230.
FENG Y, GUO J, XU R Q, et al. Comparison of neutralizing antibodies induced by PRRSV GP5 recombinant proteins in different forms of truncation[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2018 (6): 1222-1230. (in Chinese)
- [13] 邢刚. 猪蓝耳病病毒的结构与相关抗体的分析[J]. 中国牧业通讯, 2011 (12): 74.
XING G. Analysis of the structure and related antibodies of PRRSV[J]. *China Animal Husbandry Bulletin*, 2011 (12): 74. (in Chinese)
- [14] 任向阳, 吴文福, 岑小清, 等. 猪瘟活疫苗(传代细胞源)免疫产生期和免疫持续期试验[J]. 中国兽医杂志, 2017 (4): 92-94, 98.
REN X Y, WU W F, CEN X Q, et al. The onset time and maintenance phase of immunity protection for classical swine fever live vaccine(cell line origin)[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017 (4): 92-94, 98. (in Chinese)
- [15] WILLIAM L, MENGELING. The porcine reproductive and respiratory syndromequandary Part one Fact versus speculation[J]. *Journal of Swine Health and Production*, 2005, 13 (2): 91-95.
- [16] 严玉霖, 高洪. 猪繁殖与呼吸综合征诊断技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2008 (7): 81-85.
YAN Y L, GAO H. Advance in Diagnostic Techniques for Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008 (7): 81-85. (in Chinese)

(责任编辑: 林海清)