

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.07.02

# 不同佐剂制备的猪伪狂犬基因缺失标记灭活疫苗 免疫效果的比较研究

李晓艳,李超,王岩,乔煜婷,刘超,齐志涛,杨波,金鹰,李化生,陈坚\*,赵丽霞\*

(金宇保灵生物制品有限公司,呼和浩特 010100)

[收稿日期] 2022-12-01 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 07-0008-08 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 佐剂的剂型对疫苗稳定性、安全性及免疫效力均有一定的影响。为筛选优质佐剂以提高猪伪狂犬基因缺失标记灭活疫苗(JS2012 $\Delta$ gE株)的免疫效果,分别使用水包油包水佐剂(ISA206)、水包油佐剂(ISA28VG)、油包水佐剂(ISA70VG)及水佐剂(Gel02)制备疫苗,并检测各组疫苗理化特性、安全性及免疫效力。结果显示:4种佐剂制备的猪伪狂犬灭活疫苗的理化特性、安全性均达到质量标准;免疫效力比较中,ISA70VG组相比其他免疫组具有较高的抗体水平且持续时间较长,其次为ISA206组;攻毒后,ISA70VG组和ISA206组无任何临床症状及病变。综合安全性及免疫效力,ISA206佐剂及ISA70VG更适合作为制备猪伪狂犬基因缺失标记灭活疫苗(JS2012 $\Delta$ gE株)的佐剂。

**[关键词]** 佐剂;猪伪狂犬灭活疫苗;稳定性;安全性;免疫效力

## Comparative Study on the Immune Effect of Pig Pseudorabies Gene Deletion Marker Inactivated Vaccine Prepared with Different Adjuvants

LI Xiao-yan, LI Chao, WANG Yan, QIAO Yu-Ting, LIU Chao, QI Zhi-tao,

YANG Bo, JIN Ying, LI Hua-sheng, CHEN Jian\*, ZHAO Li-xia\*

(Jinyu Baoling Biopharmaceutical Co., Ltd., Hohhot 010100, China)

Corresponding authors: CHEN Jian, E-mail: chenjian@jinyu.com.cn; ZHAO Li-xia, E-mail: zhaolixia@jinyubaoling.com.cn

**Abstract:** The dosage form of adjuvant has a certain impact on the stability, safety and immune efficacy of vaccine. In order to select high-quality adjuvants to improve the immune effect of the pig pseudorabies gene deletion inactivated vaccine (JS2012 $\Delta$ gE strain), we prepared 4 kinds of vaccines with water in oil in water adjuvant (ISA206), Oil-in-water adjuvant (ISA28VG), water-in-oil adjuvant (ISA70VG) and water adjuvant (Gel02) respectively, and detected physical and chemical properties, safety and immune efficacy of the

**基金项目:** 内蒙古自治区科学技术厅重点研发项目“猪伪狂犬基因缺失标记灭活疫苗的开发”(2020GG0091)

**作者简介:** 李晓艳, 硕士, 中级兽医师, 从事兽用疫苗研发工作; 李超, 从事兽用疫苗研发工作。二人为共同第一作者。

**通讯作者:** 陈坚, E-mail: chenjian@jinyu.com.cn; 赵丽霞, E-mail: zhaolixia@jinyubaoling.com.cn

vaccine. The results showed that the physical and chemical properties and safety of 4 kinds of inactivated vaccines all reached the quality standard; in the comparison of immune efficacy, the ISA70VG group had higher antibody levels and longer duration compared to other immune groups, followed by the ISA206 group; after the challenge, the ISA70VG group and ISA206 group showed no clinical symptoms or lesions. Considering the safety and immune efficacy, ISA206 adjuvant and ISA70VG are more suitable as adjuvants for the preparation of porcine pseudorabies gene deletion marker inactivated vaccine (JS 2012 $\Delta$ gE strain).

**Key words:** ajuvant; pig pseudorabies inactivated vaccine; stability; safety; immune efficacy

伪狂犬病是由伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的多种家畜和野生动物的急性传染病。PRV 属于 A 型疱疹病毒亚科猪疱疹病毒 I 型,可感染除人和无尾猿以外的哺乳动物,猪是该病的主要宿主和传染来源。PRV 呈爆发性流行,引起妊娠母猪流产、死胎,公猪不育,新生仔猪的大量死亡,育肥猪呼吸困难、增长停滞等临床症状,是危害全球养猪业的重大传染病之一<sup>[1]</sup>。自 2011 年起,我国出现毒力增强的伪狂犬变异毒株,给中国生猪养殖产业带来极大的经济损失<sup>[2-3]</sup>。国内多家单位对变异 PRV 的单基因或多基因缺失疫苗进行大量的研究,这些基因缺失苗均可有效保护变异 PRV 对猪群的侵袭,但仍无法提供完全的保护,或存在安全性不足的问题。因此开发和制备安全性及免疫效果更好的猪伪狂犬基因缺失灭活疫苗,对于预防猪伪狂犬病和有效控制伪狂犬疫情具有重要意义。

毒株的选择是预防疾病的关键,优质的佐剂是疫苗质量稳定的保障,为提升疫苗免疫效果,本试验利用成功构建的 PRV 变异弱毒株(JS2012 $\Delta$ gE 株)开展了猪伪狂犬病灭活疫苗的研制工作,并对不同剂型佐剂进行了筛选研究。

## 1 材料

1.1 主要试验材料 PRV(JS-2012 $\Delta$ gE 株)灭活抗原液,批号 2022005,病毒含量  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/mL;用于做细胞中和试验的 PRV 病毒液(JS-2012 $\Delta$ gE 株),F7,批号 210709,病毒含量  $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL;BHK21 细胞(仓鼠肾细胞)、PRV 标准阳性血清和阴性血清,均由金宇保灵生物制品有限公司兽用疫苗国家

工程实验室制备保存;水包油包水佐剂(ISA206)、水包油佐剂(ISA28VG)、水佐剂(Gel02)和油包水佐剂(ISA70VG),购自法国 SEPPIC 公司;PRV gB ELISA 抗体检测试剂盒,购自 IDEXX 公司。

1.2 主要试验动物 30 日龄健康易感仔猪(PRV 血清中和抗体效价不高于 1:4 或血清 gB ELISA 抗体检测阴性,且 PRV 抗原检测阴性)25 头,购自呼和浩特市土默特左旗国营种猪场;3~5 周龄健康易感仔猪(PRV 血清中和抗体效价不高于 1:4 或血清 gB 抗体 ELISA 检测阴性,且 PRV 抗原检测阴性)共计 55 头,购自呼和浩特市土默特左旗国营种猪场。

## 2 方法

2.1 疫苗配制 取 PRV 纯化浓缩灭活抗原液 632 mL,平均分为 4 份,按照表 1 中组分含量分别称取 ISA206 佐剂、ISA28VG 佐剂、Gel02 佐剂、ISA70VG 佐剂,在 28℃ 环境下将 4 份水相分别缓慢加入 4 份佐剂中,ISA206、ISA28VG、Gel02 三组以 400 r/min 匀速搅拌 10 min,ISA70VG 组以 10000 r/min 匀速剪切 15 min,以上各组疫苗 2~8℃ 保存备用。

2.2 仔猪安全性检验 用 30 日龄健康易感仔猪(PRV 血清中和抗体效价不高于 1:4 或血清 gB ELISA 抗体检测阴性,且 PRV 抗原检测阴性)25 头,随机分为 5 组,每组 5 头,1~4 组分别耳后肌肉免疫 ISA206、ISA28VG、Gel02、ISA70VG 疫苗,单侧耳根后肌肉单点注射疫苗 6 mL,5 组为对照组不免疫,逐日观察 10 d 并监测体温,观察免疫猪是否出现伪狂犬症状或明显的局部和全身不良反应或因注射疫苗引起的死亡。

表 1 疫苗组别

Tab 1 Vaccine groups

组别	佐剂:水相量( <i>m:m</i> )	佐剂量	水相组成/mL		水相总量/mL	制备量/mL
			伪狂犬灭活抗原	PBS3		
ISA206 组	1:1	460g(540mL)	158	302	460	1002
ISA28VG 组	1:3	240g(282mL)	158	562	720	1000
Gel02 组	1:9	100g(100mL)	158	742	900	1000
ISA70VG 组	1.5:1	545g(641mL)	158	205	363	1004

2.3 中和抗体监测 用 3~5 周龄健康易感仔猪 (PRV 血清中和抗体效价不高于 1:4 或血清 gB ELISA 抗体检测阴性,且 PRV 抗原检测阴性)25 头,随机分为 5 组,每组 5 头,1~4 组分别耳后肌肉免疫 ISA206、ISA28VG、Gel02、ISA70VG 疫苗,2 mL 头,5 组为阴性对照组不免疫,一免后 21 d 以同样剂量、同样接种方法加强免疫一次,阴性对照组不免疫。分别于免前、一免 21 d、二免 28 d、二免 60 d、二免 90 d、二免 120 d 采血,进行细胞中和抗体监测。

2.4 仔猪攻毒保护试验 用 3~5 周龄健康易感仔猪 (PRV 血清中和抗体效价不高于 1:4 或血清 gB ELISA 抗体检测阴性,且 PRV 抗原检测阴性)30 头,随机分为 6 组,每组 5 头,1~4 组分别耳后肌肉免疫 ISA206、ISA28VG、Gel02、ISA70VG 疫苗,2 mL/头,5 组为感染对照组不免疫,6 组为阴性对照组不免疫不攻毒,一免后 21 d 以同样剂量、同样接种方法加强免疫一次,感染对照组及阴性对照组不免疫。二免后 7 d 连同感染对照组进行攻毒,每头猪滴鼻 JS2012 株检验毒 2 mL(病毒含量为  $10^{6.00}$

TCID<sub>50</sub>/mL),攻毒后连续观察 14 d,每日监测体温,并采集免疫组和对照组的鼻拭子和肛拭子监测排毒情况。

2.5 临床及组织病理变化观察 攻毒后观察试验猪食欲、精神状态,是否出现由猪伪狂犬病病毒引起咳嗽、喘气、张嘴呼吸、腹式呼吸等呼吸道症状以及共济失调、麻痹、四肢乱划、角弓反张等神经症状,同时对攻毒试验中发病死亡或试验结束迫杀的仔猪,进行病理剖检。取脑、肺脏、脾脏、肝脏等组织进行眼观病变观察并拍照。

### 3 结果与分析

3.1 理化检验结果 4 组伪狂犬灭活疫苗理化检验均符合质量标准:ISA206 组疫苗滴入水中,呈云雾状扩散现象,为水包油包水型;ISA28VG 组疫苗滴入水中,呈快速扩散现象,为水包油型;Gel02 组疫苗滴入水中,完全溶解于水中;ISA70VG 组疫苗滴入水中,呈油滴状不扩散,为油包水型;稳定性检测均未出现分层;黏度分别为 29.8 cP、13.6 cP、3.2 cP、42.7 cP,全部符合标准,详见表 2。

表 2 4 组伪狂犬灭活疫苗理化检验结果

Tab 2 The physical and chemical test results of 4 groups of PRV inactivated vaccines

检测指标	ISA206 组	ISA28VG 组	Gel02 组	ISA70VG 组
外观检查	均匀乳剂	均匀乳剂	均匀乳剂	均匀乳剂
剂型检查	水包油包水型	水包油型	-	油包水型
黏度检测/cP	29.8	13.6	3.2	42.7
稳定性检测	无水相析出	无水相析出	无水相析出	无水相析出
无菌检验	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
内毒素含量测定/ (EU·头份 <sup>-1</sup> )	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
总蛋白含量测定/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	98	87	94	90

3.2 仔猪安全性检验结果 本实验采用 3 倍免疫剂量(6 mL/头)对易感仔猪进行安全性检验,将制备的 4 组灭活疫苗肌肉注射仔猪,连同对照组观察 10 d 并监测体温。结果显示,ISA70VG 组免后 6 h 至免后第 2 d 体温升高至 41 °C,免后第 3 d 体温恢复至正常,ISA206 组免后 6 h 至免后第 1 d 体温升高至 40.5 °C,ISA28VG 组和 Gel02 组免后体温正

常,4 组疫苗均未见疫苗引起的全身或局部不良反应,注射部位均未见红、肿、热等反应,仔猪发育良好,精神和食欲均正常。由此可见,ISA70VG 因其油包水的剂型,刺激性稍大,引起短暂的体温升高,而 ISA28VG 和 Gel02 佐剂无免疫副反应,不引起体温升高,ISA206 佐剂仅引起较小的体温变化,隔日恢复正常,不影响采食活动。体温监测见图 1。

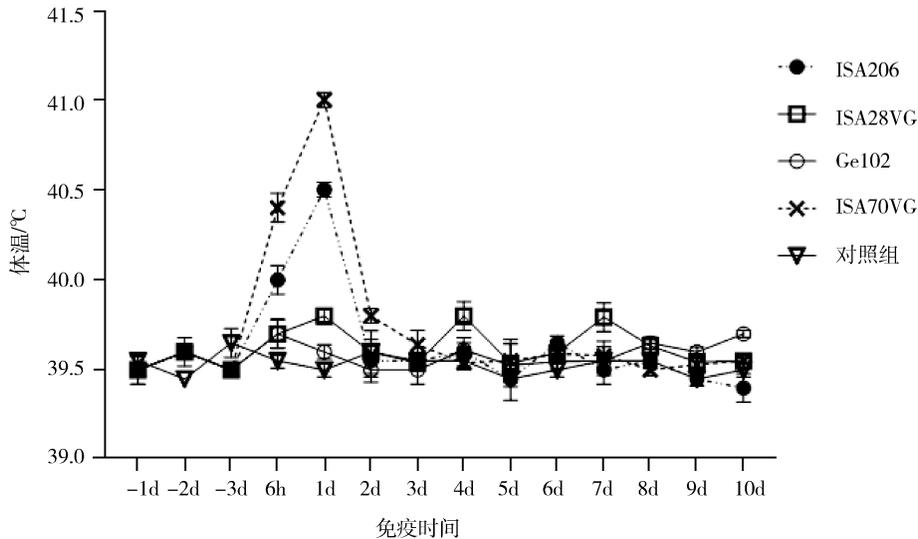


图 1 体温监测结果

Fig 1 Temperature monitoring results

3.3 仔猪中和抗体监测结果 将 4 种疫苗免疫仔猪后,于一免 21 d、二免 28 d、二免 60 d、二免 90 d、二免 120 d、二免 150 d 对试验动物采血并分离血清,用细胞中和试验测定中和抗体。阴性对照组中和抗体滴度 < 1:2<sup>1</sup>,免疫组抗体消长规律相似,一免 21 d 各免疫组抗体滴度无显著性差异,均 ≤ 1:2<sup>6.5</sup>,二免后呈现快速上升的趋势,二免 28 d 至二免 60 d 达到最高值,二免 90 d 各免疫组抗体开始缓慢下降,ISA70VG 组二免后各时间段中和抗体滴度显著高于其它免疫组 ( $P < 0.05, P < 0.001$ ),其最高值可达 1:2<sup>10</sup>,其次是 ISA206、ISA28VG、Gel02 组,抗体值分别为 1:2<sup>9</sup>、1:2<sup>9</sup>、1:2<sup>8</sup>,ISA70VG 组抗体下降速度最慢,二免 150 d,ISA70VG 组抗体维持在 1:2<sup>6</sup> ~ 1:2<sup>7.5</sup>,ISA206 组抗体维持在 1:2<sup>4.5</sup> ~ 1:2<sup>6</sup>,ISA28VG 组及 Gel02 组抗体下降至 1:2<sup>4.5</sup> 和 1:2<sup>3.5</sup>。试验结果提示:油包水型 (ISA70VG) 疫苗在体内的

缓释作用使抗体产生更高且持续期更长;水包油型 (ISA28VG) 疫苗及水佐剂型 (Gel02) 疫苗释放抗原快,抗体值较低且持续期短;水包油包水型 (ISA206) 疫苗缓释作用鉴于 ISA70VG 与 ISA28VG 之间。4 种疫苗免疫架子猪中和抗体检测结果见图 2。

3.4 仔猪攻毒保护结果 4 组疫苗连同感染对照组于二免第 7 d 攻毒。攻毒结果:感染对照组攻毒后第 2 d,5/5 头出现持续性体温升高,并伴有典型的猪伪狂犬临床症状,表现为精神沉郁、厌食、拉稀、呼吸困难,共济失调并伴随神经症状,同时在攻毒后第 6 d 与第 11 d 出现死亡病例,死亡率为 40%,免疫组除 Gel02 和 ISA28VG 各 3/5 头出现持续性体温升高的症状外,均未出现因猪伪狂犬病引起的临床症状,4 个免疫组均 100% 保护,存活率 100%。攻毒后体温与存活率见图 3、图 4。

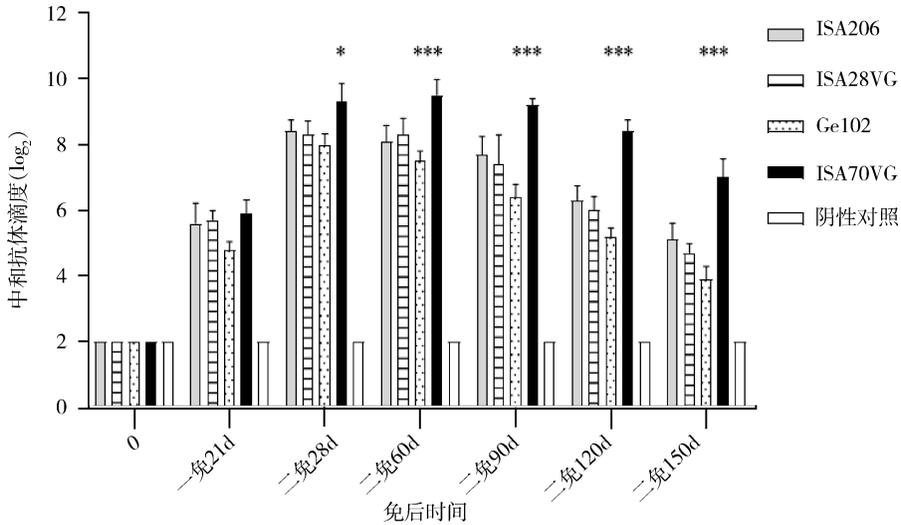


图 2 中和抗体结果

Fig 2 Neutralization antibody results

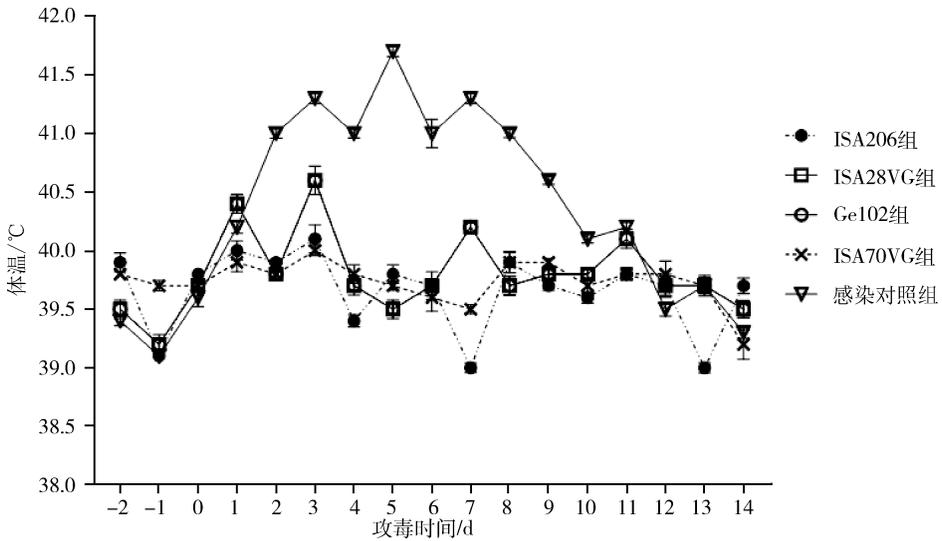


图 3 攻毒后体温监测结果

Fig 3 Temperature monitoring results after challenge

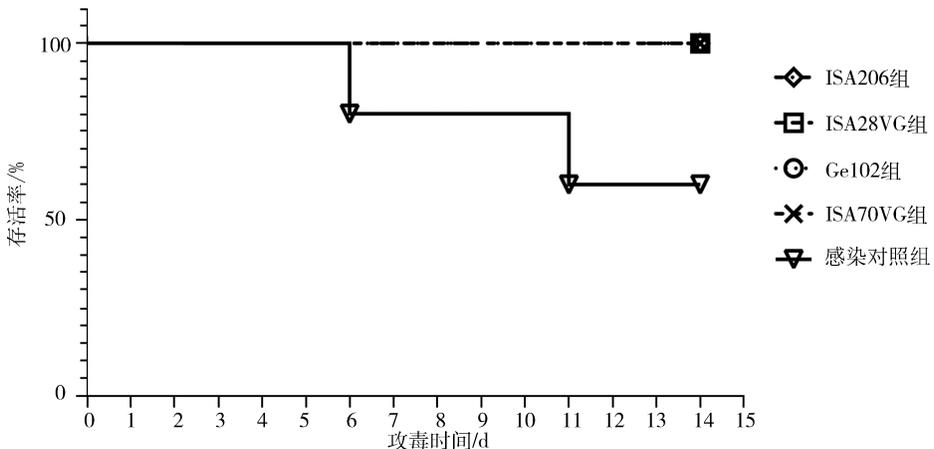


图 4 攻毒后各组猪存活情况

Fig 4 Survival of piglets post challenged

3.5 仔猪攻毒后排毒结果 攻毒后第 1 d 至第 14 d,检测各免疫组及对照组鼻拭子和肛拭子排毒结果,感染对照组 5/5 头持续排毒,排毒量最高,平均达  $10^6$  copies/mL,显著高于免疫组 ( $P < 0.001$ ),并于攻毒后第 4 ~ 7 d,达到峰值;各免疫组较对照组排毒时间短,排毒量少;其中排毒时间最长且排毒量较高的组别是 Ge102 组,累计排毒 10 d,平均排毒量为  $10^{4.1}$  copies/mL,ISA28VG 组次之,累计排毒 9 d,平均排毒量为  $10^{3.1}$  copies/mL,ISA206 组累

计排毒 7 d,平均排毒量为  $10^{2.2}$  copies/mL,ISA70VG 组累计排毒 4 d,平均排毒量达  $10^{2.0}$  copies/mL;攻毒后 14 d 内,感染对照组仔猪的排毒量及排毒时间比其他各免疫组仔猪的排毒量高且时间长,ISA206 组和 ISA70VG 组仔猪的排毒量相似且最低,ISA28VG 组及 Ge102 组仔猪的排毒时间及排毒量均高于前两组。进一步证明 ISA70VG 佐剂和 ISA206 佐剂能更好地抑制试验猪的排毒,降低 PRV 病毒感染风险。具体见图 5 和图 6。

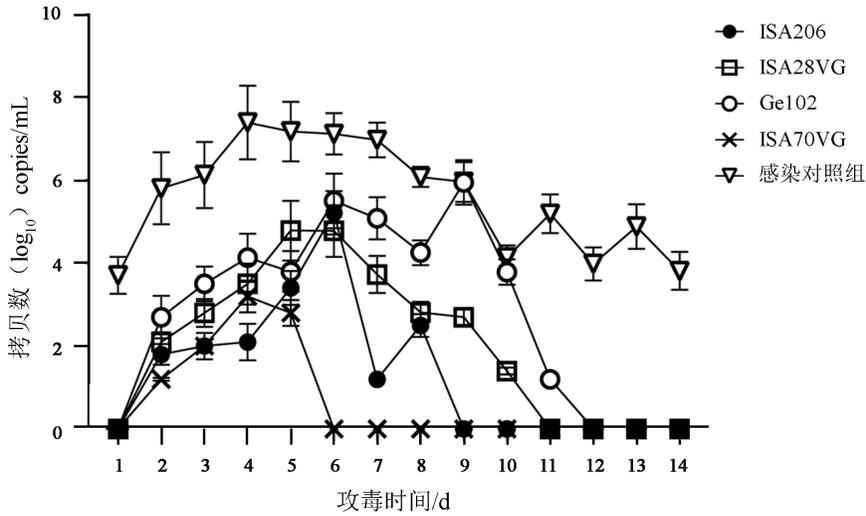


图 5 QPCR 检测鼻拭子排毒情况

Fig 5 QPCR detection of nasal swab detoxification result

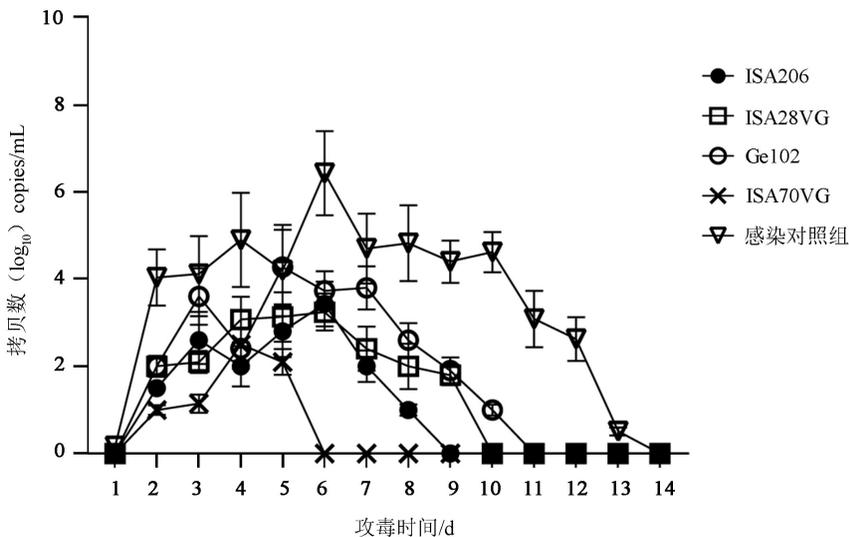


图 6 QPCR 检测肛拭子排毒情况

Fig 6 QPCR detection of anal swab detoxification result

3.6 临床及组织病理变化观察 对攻毒试验中发病死亡或试验结束迫杀的仔猪,进行病理剖检。取脑、肺脏、脾脏、肝脏等组织进行眼观病变观察并拍照。感染对照组病死或最终存活的仔猪大都体型消瘦且被毛粗乱,剖检见脑脊液明显增多,脑充血严重;肺部气肿,并伴有出血、坏死、肉实变等;脾脏可见针状出血点,坏死严重;肝脏边缘淤血坏死等症。ISA206 组和 ISA70VG 组剖检以上组织,均未见明显眼观病理变化;ISA28VG 组和 Gel02 组 2 头实验猪解剖后肺部出现轻微的实变和出血点,脾脏有轻微出血点,脑组织轻微充血,其他组织均未见明显眼观病理变化。从病理变化结果进一步证明 ISA70VG 佐剂组和 ISA206 佐剂组攻毒后无病理变化,优于其他两组。具本见图 7。

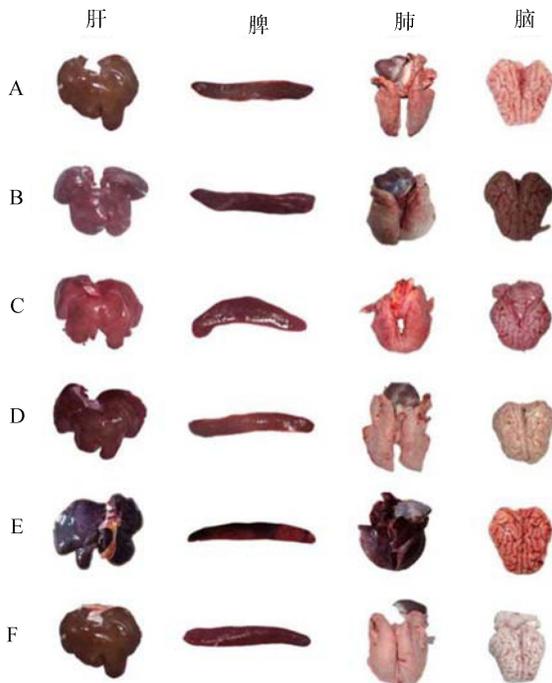


图 7 攻毒猪剖解的眼观病变

Fig 7 The autopsy lesions of piglets against poison

#### 4 讨论

目前,国内使用的猪伪狂犬疫苗主要有灭活苗、弱毒苗和基因缺失苗,这些疫苗对伪狂犬病的防控起到了一定作用。灭活苗在使用上较为安全,但也存在其抗原成分含量较低、接种剂量大和免疫

效率低的缺陷,弱毒苗的免疫效果较好,价格低廉,但是存在毒株毒力返强风险,甚至弱毒苗会引发猪群潜伏感染<sup>[4]</sup>,基因缺失疫苗不仅安全有效而且能够区分免疫接种猪和野毒感染猪,为该病的控制与净化提供了有效的手段。为了更好地提高猪伪狂犬病基因缺失灭活疫苗的免疫原性和稳定性,增强灭活疫苗对猪只的免疫效果<sup>[5-6]</sup>,本文筛选出 4 种有代表性的佐剂,制备猪伪狂犬基因缺失标记灭活疫苗(JS2012ΔgE 株),从疫苗的稳定性、黏度、安全性、效力、攻毒保护五个方面评价,筛选出 ISA70VG 及 ISA206 可作为制备猪伪狂犬基因缺失标记灭活疫苗(JS2012ΔgE 株)最理想的佐剂。

本研究筛选和评价佐剂的标准是:黏度低,易于注射;免疫刺激小,无不良反应;免疫效果好,攻毒保护率 100%,且免疫持续期长。按照该标准初步筛选到两款佐剂,为进一步研究猪伪狂犬灭活疫苗奠定基础。其中 ISA70VG 免疫效果最好,其次是 ISA206 佐剂,两种佐剂均为矿物油佐剂,前者为油包水剂型,后者是水包油包水剂型,两者共性是均能形成油包水乳液包裹抗原,保护抗原使其不被机体中的酶类物质快速分解,并且油包水乳液在注射部位贮存时间长,不能在短时间内全部吸收代谢,因此也能延长其包裹的抗原在机体内的贮存时间,持续刺激机体,促使巨噬细胞、淋巴细胞等的聚集和增殖,提升免疫效果,两者不同之处是 ISA70VG 全部形成油包水乳液,ISA206 佐剂有一半形成水包油乳液,该乳液与油包水乳液相比,因外层是水相,对机体的刺激作用明显减弱,因此,ISA206 佐剂在免疫效果上略逊色于 ISA70VG,其他理化及安全性结果两者相似。ISA28VG 及 Gel02 因其为水包油和水佐剂,外层均为水相,与油相相比,对机体的刺激效果较弱,且水相成分快速被机体中的酶类物质分解而降低了免疫持续期效果。

综合以上结果,筛选的 4 种不同佐剂制备的猪伪狂犬灭活疫苗(JS2012ΔgE 株)对断奶仔猪均能提供有效的保护,但 ISA 206 和 ISA70VG 更适合作为研制猪伪狂犬灭活疫苗(JS2012ΔgE 株)的佐剂。

## 参考文献:

- [1] Brittle Elizabeth E, Reynolds Ashley E, Enquist L W. Two modes of pseudorabies virusneuroinvasion and lethality in mice [J]. *Journal of virology*, 2004, 78(23): 12951 - 12963.
- [2] Sun Y, Luo Y Z, Wang C H, *et al.* Control of swine pseudorabies in china; opportunities and limitations [ J ]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 183: 119 - 124.
- [3] Luo Y Z, Li N, Cong X, *et al.* Pathogenicity and genomic characterization of a pseudorabies virus variant isolated from bartha - k61 - vaccinated swine population in china [ J ]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(1): 107 - 115.
- [4] 夏凤奎. 关于猪群免疫接种的分析和探讨[J]. *饲料博览*, 2018(09): 69.
- Xia F K. Analysis and discussion on immunization of pigs [J]. *Feed Expo*, 2018(09): 69.
- [5] 王晓娟, 廖雪雁. 疫苗佐剂的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2008(03): 96 - 98.
- Wang X J, Liao X Y. Research progress of vaccine adjuvants [J]. *Advances in Microbiology and Immunology*, 2008(03): 96 - 98.
- [6] 孙颖, 王雪莹, 梁婉, 等. 2018 年伪狂犬病病毒的流行特征及遗传变异分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(3): 584 - 593.
- Sun Y, Wang X Y, Liang W, *et al.* Epidemic characteristics and genetic variation analysis of pseudorabies virus in 2018 [J]. *Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(3): 584 - 593.

(编辑:李文平)