

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.02.05

猪繁殖与呼吸综合征对塞内卡病毒灭活苗免疫效果的影响

汤笑语, 张丽燕, 邱文英*, 陈奕帆, 马明昊

(华派生物技术(集团)股份有限公司, 成都 641423)

[收稿日期] 2023-09-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 02-0028-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为探究猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 对塞内卡病毒 (SVA) 灭活疫苗免疫效果的影响, 对 PRRS 阳性猪和 PRRS 阴性猪分别免疫相同批次、相同剂量的 SVA 灭活苗, 检测首次免疫后 7 d、14 d、21 d、28 d 血清中和抗体效价, 并在免疫后 28 d 对所有试验猪进行攻毒保护试验。结果显示, 所有 PRRS 阳性猪的 SVA 血清中和抗体效价均小于 1:4, 而 PRRS 阴性猪 SVA 血清中和抗体效价在二免后上升到较高水平。攻毒保护结果与中和抗体效价结果呈正相关, PRRS 阳性组 0/5 保护, 而 PRRS 阴性组试验猪达到 5/5 保护。这一研究表明 PRRS 会使 SVA 灭活疫苗免疫效果下降, 为 SVA 及 PRRS 疫苗的研发及猪场疾病的防控提供了参考。

[关键词] 塞内卡病毒; 猪繁殖与呼吸综合征; 免疫; 中和抗体

Effect of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome on Immunity of Inactivated Senecavirus A Vaccine

TANG Xiao-yu, ZHANG Li-yan, QIU Wen-ying*, CHEN Yi-fan, MA Ming-hao

(Huapai Biotechnology Group Co., LTD, Chengdu 641423, China)

Corresponding author: QIU Wen-ying, E-mail: wingsqiu@163.com

Abstract: In order to explore the effect of Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) on the immune effect of inactivated Senecavirus A (SVA) vaccine, the same batch and dose of inactivated SVA vaccine were immunized respectively in PRRS positive pigs and PRRS negative pigs in this experiment. Serum neutralizing antibody titers were detected at 7, 14, 21 and 28 days after the first immunization, and the challenge protection test was performed on all pigs at 28 days after immunization. The results showed that the titers of all serum neutralizing antibodies of the pigs with PRRS were less than 1:4, while the titers of serum neutralizing antibodies of PRRS negative pigs rose to a high level after the enhanced immunization. The results of challenge protection were positively correlated with the titer of neutralizing antibody. The inactivated SVA vaccine provided 0/5 protection for the PRRSV positive group and 5/5 protection for the PRRS negative group. This study shows that PRRS can reduce the immune effect of inactivated SVA vaccine, which provides a reference for the development

作者简介: 汤笑语, 硕士, 从事兽用病毒类生物制品研究工作。

通讯作者: 邱文英。E-mail: wingsqiu@163.com

of SVA vaccine and PRRS vaccine and the prevention and control of swine diseases.

Key words: Senecavirus A; Porcine reproductive and respiratory syndrome; immunity; neutralizing antibody

A 型塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 是一种小 RNA 病毒科 (Picornaviridae), 塞内卡病毒属 (Senecavirus) 的单股正链 RNA 病毒^[1]。SVA 能够感染不同年龄段猪, 引起猪的原发性水疱病, SVA 感染的临床症状与口蹄疫、水疱性口炎、猪水泡病相似, 主要表现为猪鼻部、口唇部、蹄部出现水泡病变甚至溃烂, 新生仔猪感染 SVA 还可能会导致死亡^[2-3]。2015 年广东省首次报道猪感染 SVA 后, 直至今日, SVA 已在我国广泛流行, 但目前还没有商品化疫苗用于该病的防控^[4-7]。猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又称蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 感染引起的一种免疫抑制性疾病, 该病传染性强, 发病率高, 严重危害了养猪业的发展^[8-10]。蓝耳病的免疫抑制作用不仅会导致感染猪继发其他细菌性疾病, 加重病程, 还会致使其它疫苗的免疫反应降低, 导致免疫效果降低或免疫失败^[11-13]。已有研究表明多种疾病疫苗的免疫效果都会受到蓝耳病的影响, 如猪瘟、猪口蹄疫等^[14-15]。本研究通过同时对 PRRS 阳性猪和 PRRS 阴性猪免疫塞内卡灭活苗, 检测其中和抗体效价及攻毒保护情况,

探究 PRRS 是否会影响 SVA 灭活苗的免疫效果, 为 SVA 和 PRRSV 的防控以及疫苗研发提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒 猪塞内卡病毒 (A/ZJ/2015 株), 由中国农业科学院兰州兽医研究所分离、鉴定, 由华派生物技术 (集团) 股份有限公司鉴定、保管及供应。仓鼠肾细胞 (BHK-21), 由华派生物技术 (集团) 股份有限公司质管部保存。

1.1.2 主要试剂 SVA 灭活疫苗由华派生物技术 (集团) 股份有限公司制备, MEM 培养基、胰蛋白酶购自 GIBCO; 新生牛血清购自内蒙古金源康生物工程材料有限公司; 高效率逆转录试剂盒购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司; 2 × Taq PCR 预混试剂购自天根生化科技 (北京) 有限公司; PBS 缓冲液由华派生物技术 (集团) 股份有限公司实验室配制。

1.1.3 引物 PRRSV 鉴定引物 PRRSV-F/PRRSV-R 及 SVA 鉴定引物 SVA-F/SVA-R 序列如表 1 所示, 所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限合成, 由华派生物技术 (集团) 股份有限公司保存。

表 1 引物的序列

Tab 1 Sequence of primers			
引物名称	序列 (5'-3')	产物大小/bp	目标片段
PRRSV-F	ACCTGAGACCATGAGGTGGGCAA	481	GP5
PRRSV-R	TAGCGCCAGGACATGCAGTTCTT		
SVA-F	ACTCTACCACCTGACTGCCACACA	974	VP1
SVA-R	GTTTTCCGCTTCAAGAAACTCCA		

1.2 方法

1.2.1 试验动物的筛选 35~42 日龄仔猪 5 头, SVA 抗原阴性、PRRSV 抗原阳性, SVA 抗体阴性 (中和抗体效价小于 1:4); 猪场半年内未免疫 PRRSV 活疫苗。35~42 日龄仔猪 10 头, SVA、PRRSV 抗原阴

性, SVA 抗体阴性 (中和抗体效价小于 1:4)。
1.2.2 试验动物分组及免疫方案 如表 2 所示, A 组为 PRRS 阳性组, B、C 组为 PRRS 阴性组; A、B 组免疫 SVA 灭活疫苗, 每头 2.0 mL, C 组为对照组, 免疫相同体积生理盐水, 间隔 2 周后以同样剂量加强免疫一次。

表 2 动物分组及免疫方案

Tab 2 Animal grouping and immunization program

试验分组	动物数量/头	疫苗	首次免疫剂量	加强免疫剂量	有效抗原含量
A	5	SVA 灭活疫苗	2.0 mL/头	2.0 mL/头	$10^{7.5}$ TCID ₅₀ /mL
B	5	SVA 灭活疫苗	2.0 mL/头	2.0 mL/头	$10^{7.5}$ TCID ₅₀ /mL
C	5	生理盐水	2.0 mL/头	2.0 mL/头	/

1.2.3 SVA 中和抗体效价检测 采集试验仔猪免疫后 7 d、14 d、21 d、28 d 的血液并分离血清,血清经 56 ℃、30 min 灭活后进行中和抗体效价测定。

将 2 倍系列稀释的待检血清加入 96 孔细胞培养板,每个血清样品平行做 4 孔,50 μL/孔,之后每孔加 50 μL 含 200 TCID₅₀ 的 SVA 病毒液,置于 37 ℃ 中和 1 h;每孔加 100 μL BHK-21 细胞悬液(2×10^5 /mL ~ 3×10^5 /mL),置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,72 ~ 96 h 判定结果。同时设阴、阳性血清对照,病毒对照和细胞对照;阴性血清与待检血清同倍稀释,阳性血清稀释至 32 倍中和抗体效价。当病毒对照组及阴性血清对照组均出现细胞病变 4/4 孔,细胞对照组及阳性血清对照组均出现细胞病变 0/4 孔时,试验成立。以能抑制 50% 以上细胞出现细胞病变的血清最高稀释度的倒数判定为该血清抗体效价的滴度。

1.2.4 攻毒保护试验 免疫后 28 d,用 SVA 病毒液(A/ZJ/2015 株,F10 代)进行攻毒,颈部肌肉注射,

4.0 mL/头($10^{8.8}$ TCID₅₀/mL)。试验猪攻毒后 10 d 内四蹄中任一蹄或鼻镜出现水疱或者溃疡均判为发病,部分试验猪可能伴有精神沉郁、食欲差等症状。试验猪攻毒后 10 d 内四蹄、鼻镜均未出现水疱或者溃疡,精神、食欲正常,如出现精神沉郁、食欲差等临床症状,应持续不超过 2 d,即判为保护。

2 结果与分析

2.1 试验动物的筛选 将初步筛选的仔猪采集全血,提核酸并反转录后采用 SVA 鉴定引物 SVA-F/SVA-R 及 PRRS 鉴定引物 PRRSV-F/PRRSV-R 对仔猪进行抗原检测。如图 1 所示,所有试验猪 SVA 阴性,A 组 5 头试验猪(泳道 19-23)PRRSV 全部阳性,其余全部 PRRSV 阴性,符合试验要求。将 A 组阳性血清样本 PCR 扩增测序后进行同源性分析,结果显示 A 组试验猪感染的 PRRSV(将其命名为 SC-PRRSV)与高致病性毒株 GXNN1409、JXA1 等亲缘关系较近(图 2),判定 A 组 PRRSV 阳性猪为高致病性野毒感染。

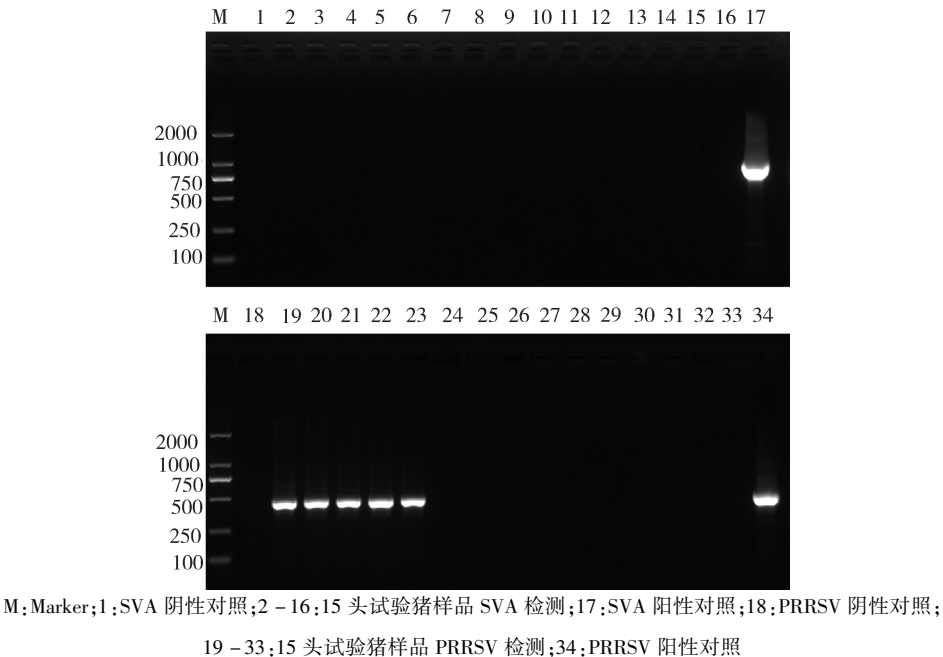


图 1 试验动物筛选 PCR 鉴定结果

Fig 1 PCR test result of experimental animal screening

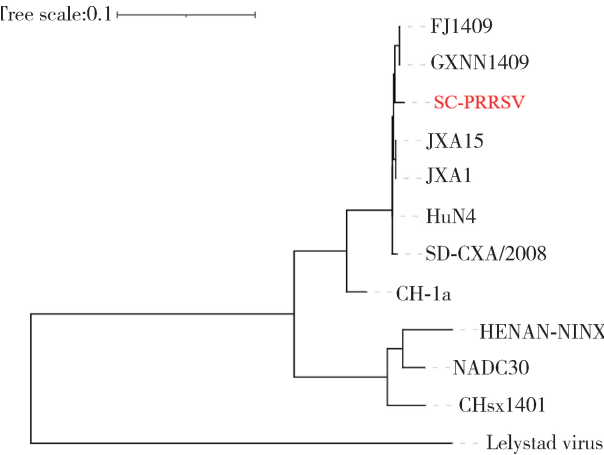


图2 SC-PRRSV 系统发育进化树分析

Fig 2 Phylogenetic tree analysis of SC-PRRSV

2.2 血清中和抗体效价 检测所有试验猪免疫后

7 d、14 d、21 d、28 d 的血清中和抗体效价,结果如表 3 所示,PRRS 阳性组(A 组)及对照组(C 组)仔猪免疫后血清中和抗体效价均 <1:4,而 PRRS 阴性组(B 组)仔猪免疫后 21 d 开始出现较高效价,最高可达 1:512,免疫后 28 d 抗体水平较免疫后 21 d 开始下降,但大多数也维持在较高水平(1:64~1:256)。

2.3 攻毒保护情况 免疫后 28 d 对所有试验猪进行攻毒,连续 10 d 观察试验猪临床症状。攻毒保护结果如表 4 所示,PRRS 阳性组(A 组)1 头仔猪攻毒后 4 d 蹄部开始出现水疱症状(图 3A),攻毒后 6 d 所有仔猪均发病;PRRS 阴性组仔猪攻毒后连续 10 d 都未出现临床症状(图 3B);对照组 2 头仔猪攻毒后 4 d 蹄部开始出现水疱(图 3C),攻毒后 6 d 全部发病。

表 3 试验猪血清中和抗体效价结果

Tab 3 Result of pig serum neutralizing antibody titer

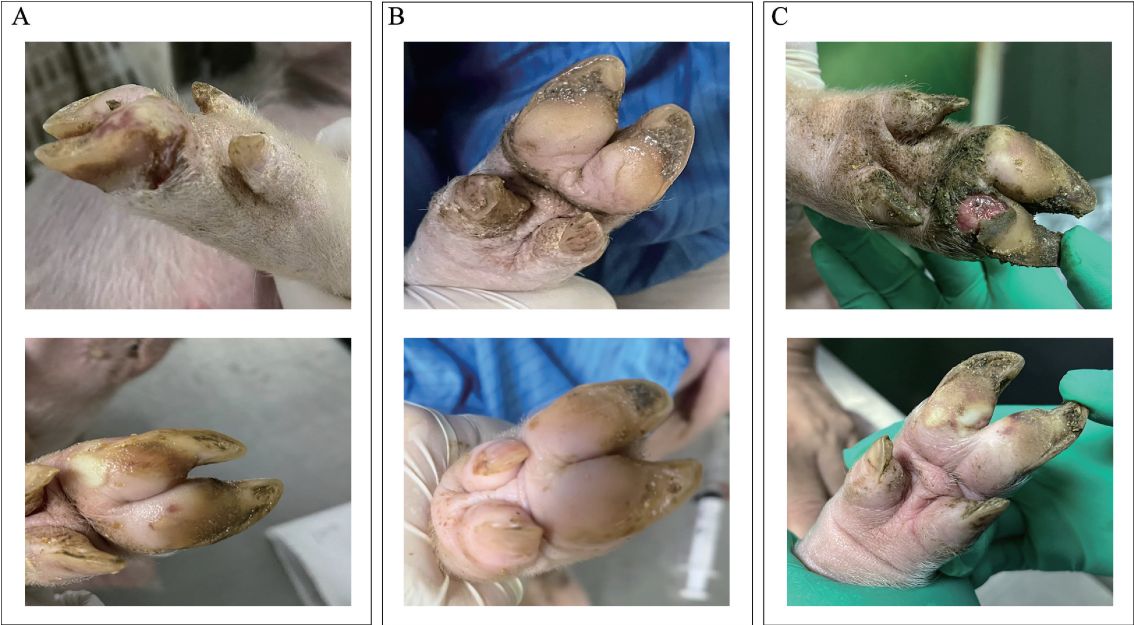
组别	编号	中和抗体效价				
		免前	免疫后 7 d	免疫后 14 d	免疫后 21 d	免疫后 28 d
A	74	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	75	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	77	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	89	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	94	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
B	503	<1:4	<1:4	<1:4	1:512	1:256
	512	<1:4	<1:4	<1:4	1:256	1:256
	514	<1:4	<1:4	<1:4	1:128	1:64
	519	<1:4	<1:4	1:4	1:128	1:128
	521	<1:4	<1:4	<1:4	1:512	1:256
C	504	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	505	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	509	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	510	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4
	511	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4	<1:4

表 4 试验猪攻毒保护结果

Tab 4 Result of protection against virus challenge

组别	编号	攻毒后观察天数/d										保护率
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	74	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0/5 保护
	75	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
	77	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	89	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	94	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
B	503	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5 保护
	512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	514	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	519	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	521	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	504	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	5/5 发病
	505	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	509	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	510	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
	511	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	

“ - ”表示四蹄、鼻镜均未出现水疱或者溃疡,精神、食欲正常;“ + ”表示四蹄中任一蹄或鼻镜出现水疱或者溃疡,精神沉郁、食欲差



A:PRRS 阳性组(A 组);B:PRRS 阴性组(B 组);C:对照组(C 组)

图 3 SVA 攻毒后蹄部病变图

Fig 3 Hoof lesion after SVA challenge

3 讨 论

疫苗免疫作为猪场防控各种病毒感染的有效手段之一备受重视,然而免疫失败的案例仍屡见不鲜。猪疫苗免疫失败的原因除了一些常见因素如疫苗本身免疫原性差、免疫方式错误、母源抗体影响、饲养管理不科学外,PRRS 等免疫抑制性疾病也是重要因素^[16-17]。本试验对 PRRS 阳性猪和 PRRS 阴性猪免疫了相同剂量的 SVA 灭活苗,分别于首次免疫后 7 d、14 d 及加强免疫后 7 d、14 d 采集血清检测中和抗体效价,结果显示免疫组 5 头 PRRS 阳性猪所有血清均无中和抗体效价,而 5 头 PRRS 阴性猪中有 1 头在首次免后 14 d 就开始出现效价,加强免疫后所有健康猪抗体效价上升到较高水平,最高可达 1:512。攻毒保护结果与中和抗体效价结果呈正相关,PRRS 阳性组及对照组 5 头试验猪全部发病,而 PRRS 阴性组试验猪达到 5/5 保护。PRRS 阴性组仔猪的中和抗体效价结果及攻毒保护结果表明了该 SVA 灭活苗有良好的免疫原性,能够对 SVA 感染提供免疫保护。PRRS 阳性组免疫与 PRRS 阴性组相同批次,相同剂量的塞内卡灭活苗时,所有试验猪中和抗体效价均小于 1:4,并

且不能产生免疫保护,表明 PRRS 影响了 SVA 的抗体应答。

本研究首次证明了 PRRS 会影响 SVA 灭活疫苗的免疫效果,有研究表明 PRRS 也会导致其它疫苗免疫效果的下降,如在陈鹏^[14]等人 2018 年的研究中,证明了 PRRS 会导致商品化猪 O 型口蹄疫浓缩苗免疫合格率下降;在张艳娜^[15]等人的研究中发现 PRRS 野毒感染会显著降低猪瘟兔化弱毒疫苗的免疫效果。PRRS 会降低其它疫苗的免疫效果对我们有很多启示。首先,我们对于 PRRS 的日常监控不可松懈,当猪场存在病情或监测到抗原时,应当加强饲养管理,采取药物等手段提高猪的免疫力后再进行疫苗免疫。其次,制定合理的免疫程序也至关重要,虽然有部分实验表明同时免疫猪瘟疫苗与 PRRSV 活疫苗时,免疫效力不会产生影响,甚至还具有诱导快速、增强和持久免疫反应的优势,但 PRRSV 活疫苗是否会对其他疫苗的免疫反应造成影响还不清楚^[18-19]。最后,从疫苗的研发来看,这也对研制出安全有效、不影响其它疫苗免疫效果的 PRRSV 活疫苗提出了挑战。

参考文献:

- [1] Segalés J, Barcellos D, Alfieri A, *et al.* Senecavirus A [J]. *Veterinary Pathology*, 2017, 54(1): 11–21.
- [2] Zhang X, Zhu Z, Yang F, *et al.* Review of Seneca Valley virus: A call for increased surveillance and research [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 940.
- [3] 包正玉, 牟春晓, 陈振海. 广西 A 型塞内卡病毒毒株分离鉴定与致病性分析[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2022, 43(01): 1–8.
Bao Z Y, Mou C X, Chen Z H. Isolation and pathogenicity analysis of Senecavirus A isolates from Guangxi province in China [J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2022, 43(01): 1–8.
- [4] Bai J, Fan H, Zhou E, *et al.* Pathogenesis of a senecavirus a isolate from swine in Shandong province, China [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 242: 108606.
- [5] Li Y, Zhang Y, Liao Y, *et al.* Preliminary evaluation of protective efficacy of inactivated Senecavirus A on pigs [J]. *Life (Basel, Switzerland)*, 2021, 11(2): 157.
- [6] 丁凯璐, 马雪青, 黄嘉馨, 等. 我国猪 A 型塞内卡病毒的流行现状及诊断技术的研究进展[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(05): 631–640.
Ding K L, Ma X Q, Huang J X, *et al.* Advances in epidemiology and diagnosis technologies of Senecavirus A in China [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(05): 631–640.
- [7] Zhu Z, Yang F, Chen P, *et al.* Emergence of novel Seneca Valley virus strains in China, 2017 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1024–1029.
- [8] Tian K, Yu X, Zhao T, *et al.* Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e526.
- [9] Cho J G, Dee S A. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Theriogenology*, 2006, 66(3): 655–662.
- [10] Albina E, Carrat C, Charley B. Interferon – alpha response to Swine arterivirus (PoAV), the Porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 1998, 18(7): 485–490.
- [11] An T Q, Li J N, Su C M, *et al.* Molecular and cellular mechanisms for PRRSV pathogenesis and host response to infection [J]. *Virus Research*, 2020, 286: 197980.
- [12] Molitor T W, Bautista E M, Choi C S. Immunity to PRRSV: double – edged sword [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 55(1–4): 265–276.
- [13] Baumann A, Mateu E, Murtaugh M P, *et al.* Impact of genotype 1 and 2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses on interferon – α responses by plasmacytoid dendritic cells [J]. *Vet Res*, 2013, 44(1): 33.
- [14] 陈鹏, 翁凡. 蓝耳病对猪 O 型口蹄疫浓缩苗免疫效果的影响[J]. *安徽农学通报*, 2018, 24(08): 103–104.
Chen P, Weng F. Effect of Porcine reproductive and respiratory syndrome on immunity of concentrated vaccine of Foot – and – mouth disease virus serotype O in pigs [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2018, 24(08): 103–104.
- [15] 张艳娜, 郑彬. 高致病性蓝耳 GDr180 株弱毒活疫苗及野毒感染对猪瘟兔化弱毒疫苗免疫抗体效果的影响[J]. *江西畜牧兽医杂志*, 2021(6): 31–33.
Zhang Y N, Zheng B. Effect of highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome virus GDr180 attenuated live vaccine and wild virus infection on the immune antibody effect of Classical swine fever vaccine [J]. *Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021(6): 31–33.
- [16] 续宝燕. 猪免疫失败原因及防控对策[J]. *畜牧兽医科学(电子版)*, 2022, (17): 120–122.
Xu B Y. Causes of pig immunity failure and prevention and control countermeasures [J]. *Graziery Veterinary Sciences (Electronic Version)*, 2022, (17): 120–122.
- [17] 陈浩. 动物免疫失败的原因和提升免疫应答的措施[J]. *养殖与饲料*, 2022, 21(11): 129–131.
Chen H. Causes of animal immune failure and measures to enhance immune response [J]. *Animals Breeding and Feed*, 2022, 21(11): 129–131.
- [18] Liu Z Y, Shan B Q, Ni C, *et al.* Optimized protocol for double vaccine immunization against Classical swine fever and Porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. *BMC Vet Res*, 2023, 19(1): 14.
- [19] 罗志忠, 周坤, 王艳. 高致病性猪蓝耳病 TJM – F92 株弱毒疫苗对猪瘟、口蹄疫免疫抗体水平的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2016(02): 103–104.
Luo Z Z, Zhou K, Wang Y. Effect of attenuated TJM – F92 strain of highly pathogenic Porcine reproductive and respiratory syndrome on the level of immune antibodies to Classical swine fever and Foot – and – mouth disease [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2016(02): 103–104.

(编辑:李文平)