

高地, 张永帅, 李爽, 等. 伪狂犬病病毒三基因缺失疫苗株、Bartha-K61 株对绵羊的安全性及其对变异毒株攻毒的保护作用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (6): 105-113.

GAO D, ZHANG Y S, LI S, et al. Safety and the protective function of a vaccine strain with three-virulence gene deletion and Bartha-K61 strain against variant pseudorabies virus challenge in sheep [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (6): 105-113.

## 伪狂犬病病毒三基因缺失疫苗株、Bartha-K61 株对绵羊的安全性及其对变异毒株攻毒的保护作用

高地<sup>1,2,3</sup>, 张永帅<sup>1,2,3</sup>, 李爽<sup>1,2,3</sup>, 王小波<sup>1,2,3</sup>, 高崧<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009;

2. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009;

3. 扬州大学农业科技发展研究院, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 旨在评价伪狂犬病病毒 (PRV) 三基因缺失疫苗株和 Bartha-K61 株对绵羊的安全性及其对变异毒株 vPRV/XJ5 攻毒的保护作用。使用实验室构建的 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 三基因缺失疫苗株和 Bartha-K61 疫苗株以不同剂量免疫 6 月龄的绵羊, 再以变异株 vPRV/XJ5 攻毒, 检测免疫后的抗体水平、攻毒后的体温变化、临床症状、排毒情况及各组织带毒量等指标, 探究其安全性和保护作用。结果: 1×10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/头份或 1×10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub>/头份的 Bartha-K61 和 1×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/头份的 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 三基因缺失疫苗株免疫绵羊后无不良反应, 攻毒后 2 周内体重保持增加, 而 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 免疫组和攻毒对照组攻毒后体重下降; 肛拭子和咽拭子的抗原检测表明, 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 或 Bartha-K61 免疫组攻毒后排毒量均低于 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 和 Bartha-K61 免疫组。综上, 对于目前流行的 PRV 变异毒株, 1×10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>/头份的 Bartha-K61 疫苗或 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 基因缺失疫苗均不能为羊提供抵抗 PRV 变异毒株致死性攻击的临床保护, 而 1×10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub>/头份的 Bartha-K61 疫苗和 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 基因缺失疫苗均能提供部分临床保护。

**关键词:** 伪狂犬病; 基因缺失疫苗; Bartha-K61; 绵羊; 保护力

中图分类号: S852.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)06-0105-09

## Safety and the protective function of a vaccine strain with three-virulence gene deletion and Bartha-K61 strain against variant pseudorabies virus challenge in sheep

GAO Di<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yongshuai<sup>1,2,3</sup>, LI Shuang<sup>1,2,3</sup>, WANG Xiaobo<sup>1,2,3</sup>, GAO Song<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China;

3. Institute of Agricultural Science and Technology Development, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the safety of the three-gene deletion vaccine strain in sheep and its protective effect against vPRV/XJ5 strain. In this study, the variant pseudorabies virus (vPRV) -XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> gene deleted vaccine strain constructed in the laboratory based on the vPRV/XJ5 strain and the Bartha-K61 strain were used in different doses to immunize 6-month-old sheep. These sheep were then challenged with the vPRV/XJ5 strain. Next, the antibody level after the immunization, rectal temperature after the challenge, clinical symptoms, viral shedding and viral load in tissue in each group were determined to evaluate both the safety and the protective effect of the vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> strain or the Bartha-K61 strain in sheep. The results showed that the sheep which were immunized with 1×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> or 1×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> Bartha-K61 and 1×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> gene-deleted vaccine had no adverse reaction and maintained weight gain within 2 weeks post-vaccination, suggesting either the Bartha-K61 vaccine and or the vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>

收稿日期: 2024-11-24; 修回日期: 2025-04-21

基金项目: 江苏省重点研发计划项目 (BE2020320); 江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD)

第一作者: 高地, 男, 硕士

\* 通信作者: 高崧, 博士, 教授, 主要从事重大动物疫病防控方面的研究, E-mail: gsong@yzu.edu.cn.

gene-deleted vaccine experienced an equal safety in sheep. The weight gain of the sheep in the  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> vaccine immunized group and the challenge control group decreased after the challenge. The viral shedding detection results of the rectal swabs and pharyngeal swabs showed that the viral shedding of the sheep in the  $10^6$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> or Bartha-K61 vaccine immunized groups was lower than that of the animals in the  $10^5$  TCID<sub>50</sub> vaccine immunized groups. For vPRV currently circulated in field, neither the  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61 vaccine nor the vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> gene-deleted vaccine provide clinical protection against the fatal challenge of vPRV in sheep. However, the  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61 vaccine or the vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> gene-deleted vaccine can provide partially clinical protection for sheep.

**Keywords:** pseudorabies; gene-deleted vaccine; Bartha-K61; sheep; protection

伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV) 是疱疹病毒科  $\alpha$  疱疹病毒亚科的一员<sup>[1]</sup>, 是伪狂犬病或称奥杰斯基病的病原体。PRV 感染可导致神经功能障碍、呼吸窘迫、体重减轻、仔猪死亡和流产<sup>[2]</sup>。2011 年以来, 国内许多猪场出现伪狂犬病, 遭受了巨大的经济损失, 此次流行已被证实是由一种变异的 PRV 毒株引起的。该变异株具有较高的毒力和抗原变异, 被认为是引起伪狂犬病发病的主要原因<sup>[3-4]</sup>。一些研究也表明, Bartha-K61 株疫苗不能提供针对新出现的 PRV 变异株的完全保护<sup>[5-7]</sup>, 养殖场迫切需要能够针对变异株的有效疫苗。

gE/gI 基因与 PRV 的体外复制和免疫原性有关, 缺失这 2 个基因的 Bartha-K61 株过去被证明是一种安全有效的疫苗株, 广泛应用于猪伪狂犬病疫苗的生产<sup>[8-9]</sup>。Qiu 等<sup>[10]</sup> 证明基于 TJ 株的 gE/gI 缺失型 PRV rPRVTJ-del gE/gI 能够导致绵羊发病和死亡, 这表明 rPRVTJ-del gE/gI 在某些动物中缺乏安全性。Kong 等<sup>[11]</sup> 发现绵羊中暴发的伪狂犬病是由一种减毒活疫苗 Bartha-K61 引起的, 这说明 gE 和 gI 基因的缺失可能不足以减弱 PRV 的致病性。因此, 为了更有效地控制伪狂犬病, 有必要开发一种更安全、更有效的疫苗。

20 世纪 80 年代 Kit 等<sup>[12]</sup> 和 Post 等<sup>[13]</sup> 发现胸苷激酶 (TK) 基因与潜伏病毒颗粒的长期潜伏和活化过程密切相关。敲除 TK 基因可导致 PRV 毒力显著降低, 同时在神经组织中的复制能力也大大降低, 但不影响免疫原性<sup>[14-15]</sup>。近年来, 一些研究者以变异株为基础研制出了几种候选疫苗株, 包括基于 SMX 毒株的 gE/gI/TK 缺失的 PRV<sup>[16]</sup> 和基于伪狂犬病 TJ 毒株的 gE/gI/TK 缺失的 PRV<sup>[8]</sup>。据报道, 这些疫苗能对受到 PRV 变异毒株攻击的猪提供有效保护, 对其他易感动物 (如小鼠和绵羊) 也具有安全性。相对于猪, 绵羊对 PRV 更为敏感, 在用半数组织培养感染量 (TCID<sub>50</sub>) 法进行的 PRV 对绵羊的致病力研究中, 发现  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/头份的 PRV 攻毒后的绵羊往往以死亡告终<sup>[17-18]</sup>。因此, 绵羊是评估伪狂犬病疫苗安全性、免疫效力较为理想的动物模型。

本研究所用的 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 是以 vPRV/XJ5 为亲本构建的 gE/gI/TK 基因缺失突变株。为评价其对易感动物的安全性和免疫保护力, 采用不同剂量的 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 基因缺失疫苗或 Bartha-k61 疫苗接种绵羊, 观察其临床症状、体液免疫反应、攻毒后的存活率、体重及病理变化, 比较 2 种疫苗在绵羊的安全性及其免疫效力, 探讨该基因缺失疫苗株作为一种候选疫苗毒株的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

PRV/XJ5 是本实验室于 2014 年从江苏省扬州市某猪场一例伪狂犬病例中分离到的一个变异毒株<sup>[18]</sup>。vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 是本实验室基于 vPRV/XJ5 毒株构建的基因缺失疫苗株。在 Vero 细胞 (美国典型培养物保藏中心编号 ATCC<sup>®</sup> CCL-81<sup>™</sup>) 中培养用于免疫和攻毒的病毒。用 Reed-Muench 法检测病毒在 Vero 细胞中滴度<sup>[19]</sup>。Bartha-K61 商品化疫苗购自梅里亚公司,  $1 \times 10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/头份, 使用前用 DMEM 稀释至  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/头份或  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/头份。vPRV/XJ5 株用同样方法稀释至  $2 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/头份。伪狂犬病特异性 gE 和 gB 抗体检测试剂盒购自爱德士公司。

### 1.2 动物和设施

6 月龄雌性绵羊购自江苏省泰州市海伦绵羊养殖场。该场无伪狂犬病和布鲁氏菌病病史。伪狂犬病的病原和抗体, 以及布鲁氏菌病原经检测均为阴性。试验前, 各组分别在单独的圈舍内进行 1 周的环境适应。

### 1.3 安全性和同居感染试验绵羊的分组

选取 14 只绵羊, 随机分为 4 组, 3 个试验组每组 4 只, 1 个对照组 2 只, 打耳标便于追踪。试验组每组 3 只羊分别肌肉注射  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/头份的 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>、 $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/头份的 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>、 $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/头份的 Bartha-K61 疫苗, 每组剩余 1 只不接种疫苗的同居羊, 作为哨兵动物; 阴性对照组的 2 只羊仅注射同剂

量的 DMEM。

#### 1.4 安全性和同居感染试验指标测定

免疫后 21 d 内，监测临床体征和直肠温度，每天 2 次。每周对每只绵羊进行称重。免疫后第 1 周内，第 1, 3, 5, 7 天采集每只绵羊的咽拭子和肛拭子，接种 Vero 细胞，每天在显微镜下检查和记录细胞病变 (CPE)，并通过 Reed-Muench 法测定每个样品的  $TCID_{50}$ <sup>[19]</sup>；免疫后每周采集每只绵羊的血液样本，按照试剂盒说明书检测伪狂犬病特异性 gB 和 gE 抗体，判定标准为： $S/N = \text{样品 } OD_{650} \text{ 值} / \text{阴性标准品 } OD_{650} \text{ 值}$ ， $S/N < 0.6$  为阳性， $0.6 \leq S/N \leq 0.7$  为可疑， $S/N > 0.7$  为阴性。免疫后 21 d 对绵羊进行扑杀并解剖，检测主要脏器的病毒载量。

#### 1.5 攻毒保护试验动物分组免疫和攻毒

16 只绵羊随机分为 6 组：4 个免疫组每组 3 只，1 个攻毒对照组 2 只，1 个空白对照组 2 只。每头羊根据试验分组打耳号： $10^6 TCID_{50}$  vPRV-XJ5  $gE^- / gI^- / TK^-$  免疫组耳号为 A1、A2、A3； $10^5 TCID_{50}$  vPRV-XJ5  $gE^- / gI^- / TK^-$  免疫组耳号为 B1、B2、B3； $10^6 TCID_{50}$  Bartha-K61 免疫组耳号为 C1、C2、C3； $10^5 TCID_{50}$  Bartha-K61 免疫组耳号为 D1、D2、D3；攻毒对照组耳号为 E1、E2；空白对照组耳号为 F1、F2。试验开始时，4 个试验组鼻内滴注： $1 \times 10^6 TCID_{50}$  和  $1 \times 10^5 TCID_{50}$ /头份的 vPRV-XJ5  $gI^- / gE^- / TK^-$ ， $1 \times 10^6 TCID_{50}$  和  $1 \times 10^5 TCID_{50}$ /头份的 Bartha-K61；3 周后，再按相同剂量肌注 1 次。在第 2 次免疫后第 15 天，用  $2 \times 10^6 TCID_{50}$ /头份的 vPRV/XJ5 对 4 个免疫组和攻毒对照组的所有绵羊经鼻腔攻毒。

#### 1.6 临床症状评估和抗体反应

攻毒后，每天测量每只绵羊的直肠温度。根据以下标准评估患羊的临床症状，按严重程度评 0~5 分：无临床症状为 0 分；体温升高至 40~41 °C 为 1 分；出现食欲减退为 2 分；出现瘙痒为 3 分；完全不食为 4 分；出现神经症状为 5 分<sup>[7]</sup>。在攻毒后第 15 天时，对所有存活的绵羊实施安乐死。观察主要组织的大体病变并按照严重程度打 0~3 分，0 分为无病变；1 分为轻微病变；2 分为中等病变；3 分为严重病变。攻毒后每周对每头绵羊采血，分离血清，检测特异性 gB 和 gE 抗体水平。

#### 1.7 绵羊攻毒后排毒情况的检测

在攻毒后 1~7 d 采集每只绵羊的口咽拭子和直肠拭子样品，参照 1.4 方法监测排毒情况。用 Reed-Muench 法测定每个样品的  $TCID_{50}$ 。

#### 1.8 攻毒后绵羊不同组织病毒载量的检测

攻毒后 15 d 剖检时，每只羊无菌采集脑、肺和扁桃体各 0.1 g 进行病毒载量检测。用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测不同组织的病毒载量，引物和探针如表 1<sup>[18]</sup>。PRV qPCR 反应体系： $10 \times \text{Champagne } Taq \text{ Buffer } 2 \mu\text{L}$ ， $dNTP \text{ Mix } (10 \text{ mmol/L}) 0.4 \mu\text{L}$ ， $\text{Champagne } Taq (2.5 \text{ U}/\mu\text{L}) 0.5 \mu\text{L}$ ， $gB94F 0.8 \mu\text{L}$ ， $gB94R 0.8 \mu\text{L}$ ， $gB \text{ probe } 0.2 \mu\text{L}$ ， $\text{Template DNA } 2 \mu\text{L}$ ， $ddH_2O$  加至  $20 \mu\text{L}$ 。反应条件： $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 10 min； $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s， $62 \text{ }^\circ\text{C}$  20 s，扩增 45 个循环。

表 1 qPCR 所用引物和探针

引物名称	序列 (5'→3')	扩增片段/bp
gB94F	ACAAGTCAAGGCCACATCTA	94
gB94R	GTCCGTGAACGGTTCGTGAT	
gB probe	FAM-ACGTCATCGTCAGACC	94

#### 1.9 数据统计与分析

数据均以“平均数 ± 标准差”表示，使用 GraphPad Prism 软件通过 Student's *t* 检验测量差异，以  $P < 0.05$  表示差异显著， $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

#### 2.1 绵羊免疫后的增重变化

免疫期间各组绵羊的体重保持增加，且疫苗免疫组绵羊、作为哨兵动物的同居绵羊和阴性对照组绵羊之间无显著差异 (图 1)。2 种疫苗的免疫均没有影响绵羊的生长性能。

#### 2.2 绵羊免疫后的抗体产生情况

在免疫后 3 周内，各组绵羊均为 gE 抗体阴性；所有接种过疫苗的绵羊在免疫后第 1 周均可检测到 gB 抗体，而各组作为哨兵动物的同居绵羊和阴性对照组绵羊血清中均未检测到 gB 抗体 (图 2)。表明用 vPRV-XJ5  $gI^- / gE^- / TK^-$  和 Bartha-K61 疫苗免疫的绵羊均产生了有效的抗体反应，并且免疫后无同居感染情况，2 种疫苗均具有安全性。

#### 2.3 绵羊免疫后的临床症状和排毒情况

免疫后 7 d 内每天测量 2 种疫苗免疫的绵羊和同居绵羊的体温，均未发现发热 (体温均在 40 °C 以下) 或其他临床症状 (表 2)。在第 1, 3, 5, 7 天采集咽拭子和肛拭子，用  $TCID_{50}$  方法检测，均未发现排毒现象，说明疫苗安全。

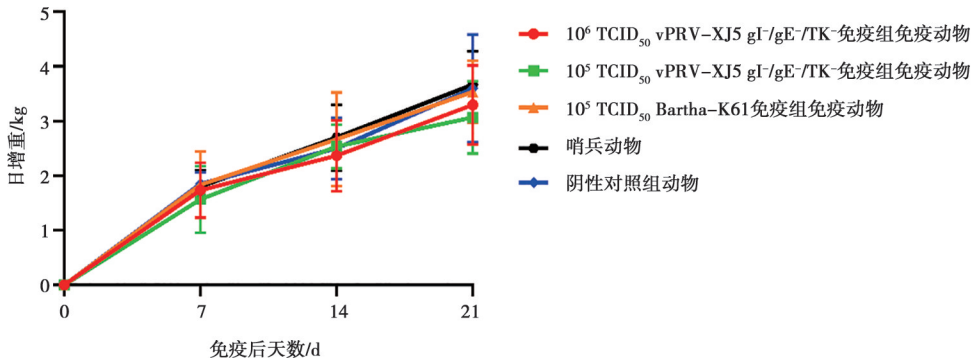


图 1 各组绵羊免疫后增重情况

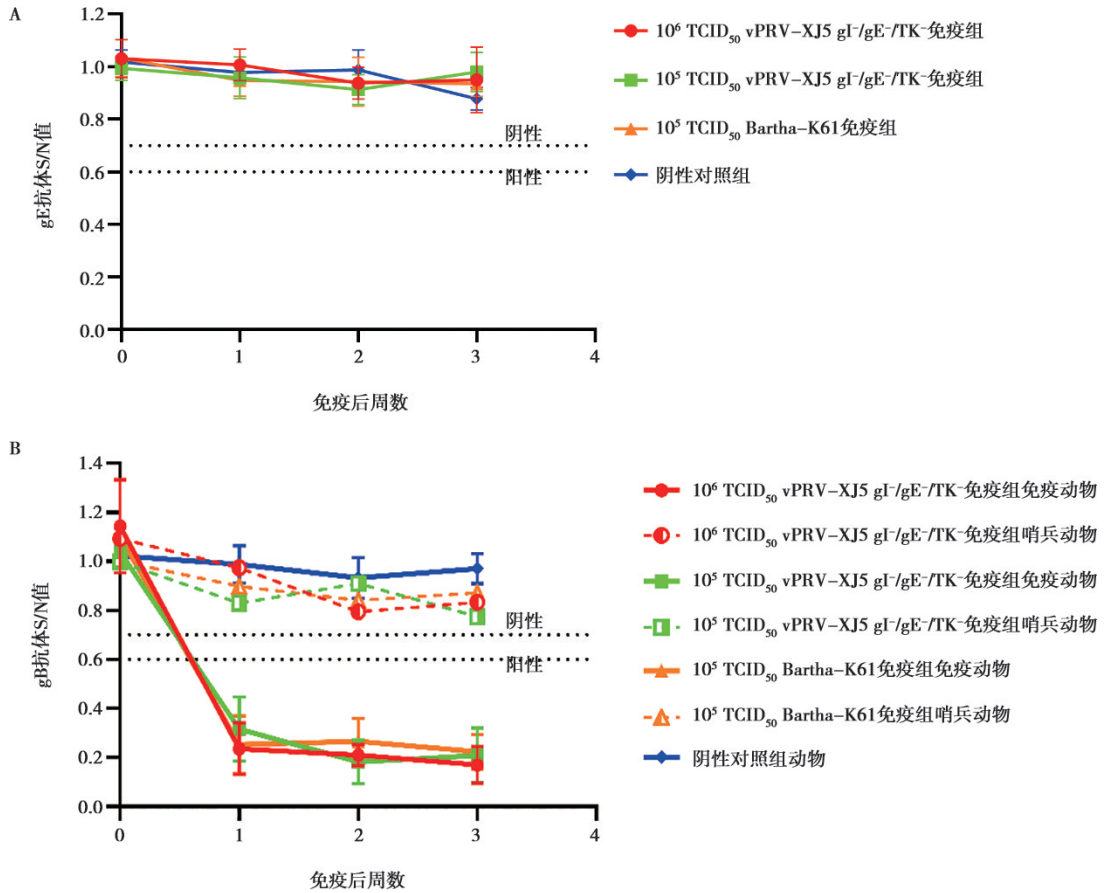


图 2 免疫后绵羊的血清 gE (A) 和 gB (B) 抗体水平

表 2 免疫后绵羊的临床症状和排毒情况

只

类别	样本总数量	发热数量	其他临床症状数量	咽拭子排毒数量	肛拭子排毒数量
10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫组免疫动物	3	0	0	0	0
10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫组哨兵动物	1	0	0	0	0
10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫组免疫动物	3	0	0	0	0
10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫组哨兵动物	1	0	0	0	0
10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> Bartha-K61 免疫组免疫动物	3	0	0	0	0
10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> Bartha-K61 免疫组哨兵动物	1	0	0	0	0
阴性对照组动物	2	0	0	0	0

## 2.4 免疫及攻毒后的绵羊的抗体反应

由图3可知,2种疫苗以 $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>和 $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>剂量接种2次均可诱导绵羊产生较高水平的特异性gB抗体。2种疫苗免疫组直到攻毒前均未检测到gE特异性抗体。4个免疫组经免疫接种后,第1周即可检测到gB特异性抗体,并一直保持到免疫后

第5周攻毒时。在攻毒后2周, $10^6$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组, $10^6$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组和 $10^5$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组所有攻毒后存活的绵羊均可检测到gE特异性抗体。而 $10^5$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组和攻毒对照组在攻毒后5 d内全部死亡,且至死亡时尚未检测到gE抗体转阳。

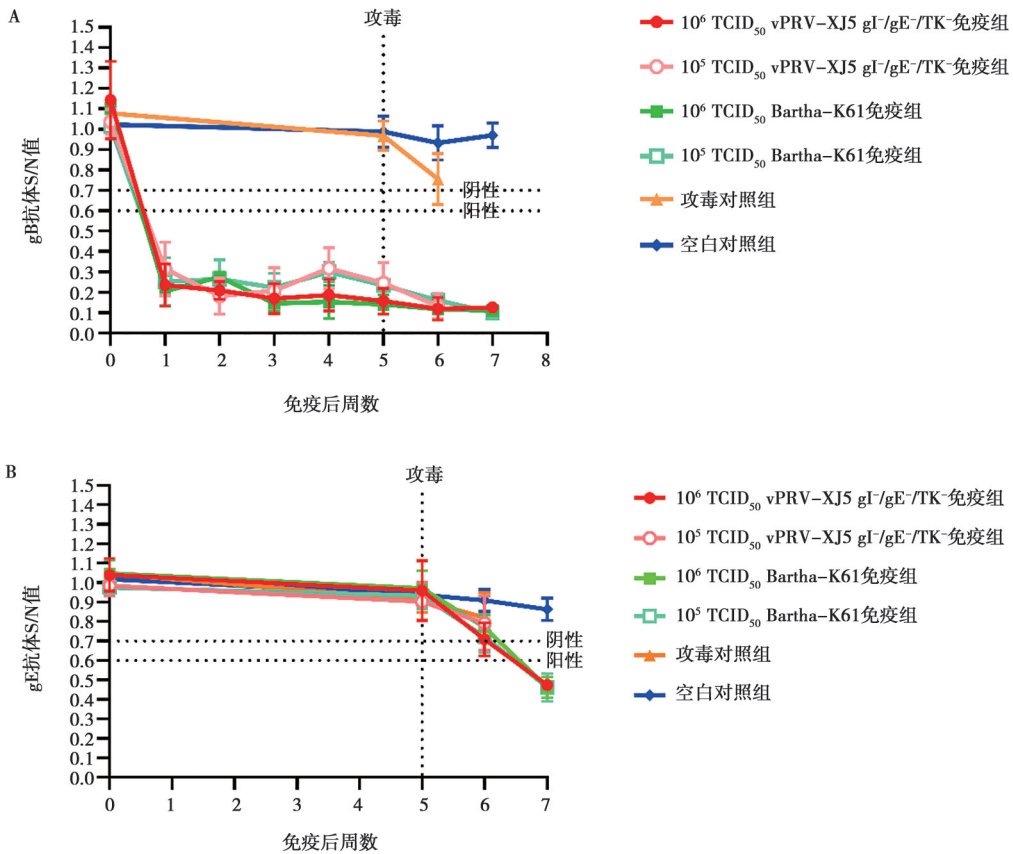


图3 血清学检测攻毒前后绵羊血清gB(A)和gE(B)抗体水平

## 2.5 攻毒后的临床症状、病理变化和死亡率

攻毒对照组和 $10^5$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组绵羊在攻毒后5 d内全部死亡; $10^5$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组存活率33.3%; $10^6$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组和 $10^6$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组存活率66.7%(图4A)。在攻毒对照组中,所有绵羊均出现了沉郁、共济失调、转圈、食欲不振等症状,剧烈瘙痒导致羊以头撞墙并磨蹭皮肤至破溃,该组羊在攻毒后4 d内全部死亡。Bartha-K61和vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组攻毒后存活的绵羊,从攻毒后第7天起开始恢复,没有再表现出明显的临床症状。各组的临床症状评分情况见图4B,攻毒对照组羊的脑、扁桃腺、肺、心、胃、淋巴结均有不同

程度的病变,但其他组织的肉眼病变并不明显。总体上,各免疫组的绵羊组织病变程度要轻于攻毒对照组。各组主要组织大体病变得分见表3。结果表明, $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/头份的Bartha-K61疫苗对绵羊的免疫效果优于vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>疫苗;而 $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/头份的2种疫苗对绵羊的免疫效果相当。

## 2.6 攻毒后绵羊增重的变化

攻毒后14 d, $10^6$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组、 $10^5$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组和 $10^6$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组的存活羊的增重与对空白对照组无显著差异。而 $10^5$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组和攻毒对照组羊的体重持续下降(图5),极显著低于空白对照组( $P < 0.001$ )。

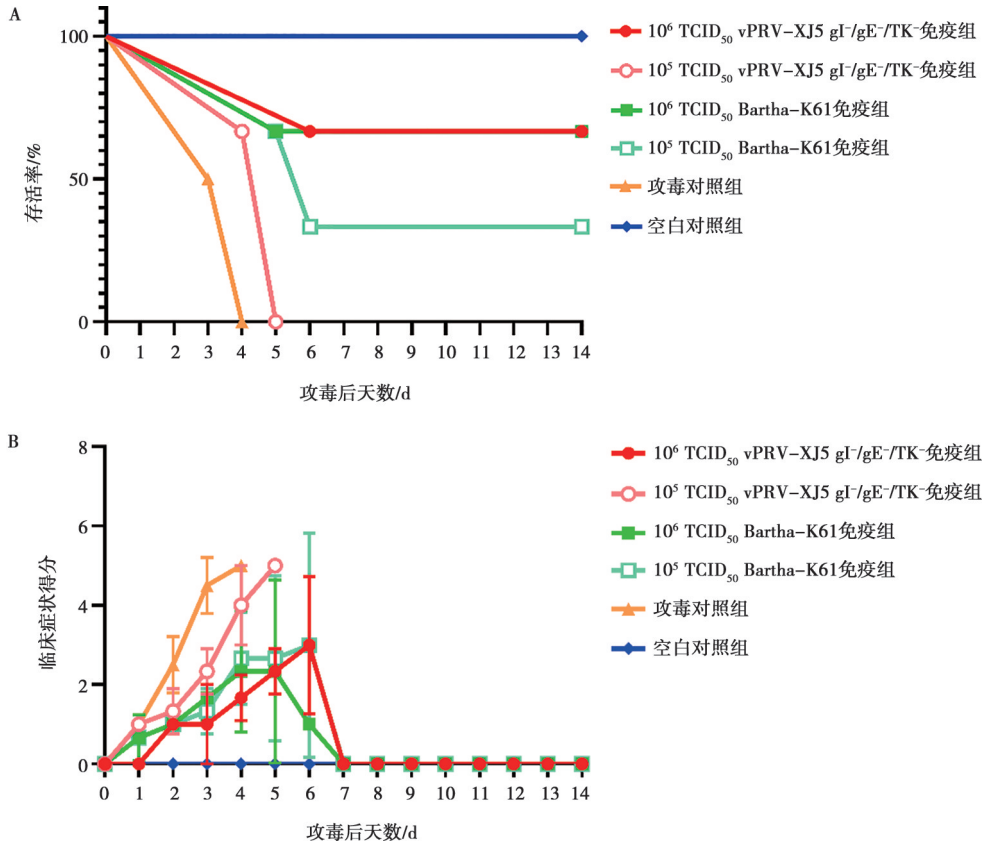
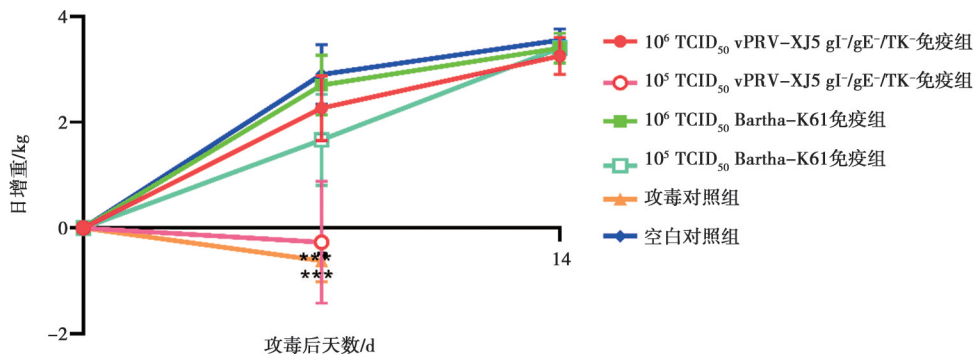


图 4 绵羊的存活率 (A) 和临床症状评分 (B)

表 3 各组绵羊攻毒后主要组织大体病变得分

组织	组别					
	10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV/XJ5 gI <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫	10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV/XJ5 gI <sup>-</sup> /gE <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫	10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> Bartha-K61 免疫	10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> Bartha-K61 免疫	攻毒对照	空白对照
脑	0.33±0.58	0.67±0.58	0	0.67±0.58	2.00±0.00	0
扁桃体	0.33±0.58	1.00±0.00	0.33±0.58	0.67±0.58	2.00±0.00	0
心	0.33±0.58	0.33±0.58	0	0.33±0.58	1.00±0.00	0
肺	1.33±0.58	2.00±0.00	1.33±0.58	2.00±0.00	3.00±0.00	0
胃	1.33±0.58	1.67±0.58	1.00±0.00	1.33±0.58	2.50±0.71	0
肾	0	0	0	0	0.50±0.71	0
淋巴结	0	0	0	0	0.50±0.71	0



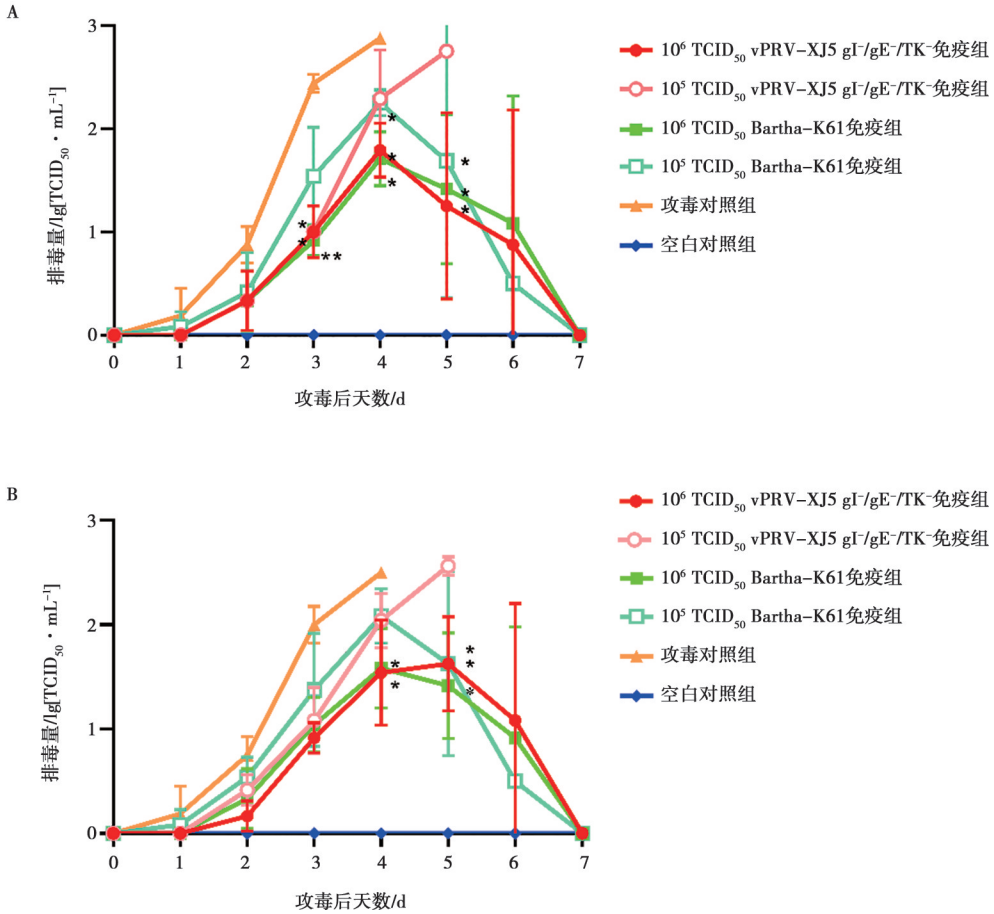
与空白对照组相比 \* \* \* 表示  $P < 0.001$ 。

图 5 攻毒后各组绵羊的增重变化

### 2.7 绵羊排毒情况

图6可知,绵羊攻毒后1~7 d内,咽拭子和直肠拭子中病毒载量变化趋势相似,所有攻毒羊均可监测到排毒,免疫组死亡绵羊的排毒规律与攻毒对照组相似,排毒量不断升高,在绵羊死亡时达到峰值。而攻毒后存活绵羊的排毒量在攻毒后第4天达到峰值,之后开始下降,到第7天时已检测不出排毒。以咽拭子为例,检测显示攻毒后第3天开始,免疫组和攻毒对照组的排毒量出现显著差异。第3天时,攻毒对照组的排毒量显著高于 $10^6$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>

免疫组和 $10^5$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组( $P<0.05$ ),极显著高于 $10^6$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组( $P<0.01$ )。第4天时, $10^6$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组( $P<0.05$ )和 $10^5$  TCID<sub>50</sub> Bartha-K61免疫组及 $10^6$  TCID<sub>50</sub> vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组( $P<0.05$ )的排毒量均显著低于攻毒对照组。这些结果说明接种疫苗有效降低了排毒量,而且,在相同剂量免疫后,Bartha-K61免疫组攻毒后的排毒量低于vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>免疫组。



A. 咽拭子; B. 肛拭子。与攻毒对照组相比 \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ 。

图6 攻毒后绵羊的排毒情况

### 2.8 攻毒后绵羊组织的病毒载量

剖检后,用qPCR检测组织中病毒载量。结果表明,采用vPRV-XJ5 gE<sup>-</sup>/gI<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>基因缺失苗和Bartha-K61,以 $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>或 $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>剂量进行免疫的绵羊,脑、肺、扁桃体的病毒载量与攻毒对照组相比,统计学差异均不显著( $P>0.05$ )。结合各组羊的临床症状和死亡情况,发现每组死亡绵羊的组织中的病毒载量高于存活绵羊(表4)。就各免疫组而言,存活绵羊脑组织中的病毒载量在 $10^{1.7} \sim 10^{2.1}$

copies/g之间,同组死亡绵羊可以达到 $10^{5.2} \sim 10^{5.6}$  copies/g。扁桃体组织中的病毒载量,存活绵羊在 $10^{2.1} \sim 10^{3.1}$  copies/g之间,同组死亡绵羊达到 $10^{7.2} \sim 10^{7.4}$  copies/g。肺组织中的病毒载量,存活绵羊在 $10^{1.3} \sim 10^{1.7}$  copies/g之间,同组死亡绵羊达到 $10^{4.4} \sim 10^{4.7}$  copies/g。而攻毒对照组在死亡时,脑、扁桃体、肺组织的病毒载量分别是 $10^{5.7} \sim 10^{6.4}$ 、 $10^{7.4} \sim 10^{7.8}$ 和 $10^{5.1} \sim 10^{5.3}$  copies/g。存活绵羊3种组织中的病毒载量均极显著低于死亡绵羊( $P<0.001$ )。

表 4 各组试验羊攻毒后的组织病毒载量

组别	耳号	组织病毒载量/lg (copies · g <sup>-1</sup> )		
		脑	扁桃体	肺
10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV-XJ5 gE <sup>-</sup> /gI <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫	A1	1.9	2.9	1.5
	A2	2.0	2.1	1.7
	A3	5.5	7.2	4.6
10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> vPRV-XJ5 gE <sup>-</sup> /gI <sup>-</sup> /TK <sup>-</sup> 免疫	B1	5.2	6.9	4.4
	B2	5.7	7.3	4.7
	B3	5.4	7.4	5.1
	C1	1.8	3.1	1.3
10 <sup>6</sup> TCID <sub>50</sub> Bartha-K61 免疫	C2	2.1	2.8	1.6
	C3	5.6	7.3	5.1
	D1	1.7	2.7	1.5
	D2	5.5	7.1	4.6
10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> Bartha-K61 免疫	D3	5.7	6.8	4.7
	E1	5.7	7.8	5.1
	E2	6.4	7.4	5.3
攻毒对照	F1	0	0	0
	F2	0	0	0

### 3 讨论

绵羊对 PRV 的敏感性较高, Cong 等<sup>[8]</sup>、田志军等<sup>[20]</sup>之前进行的 PRV 基因缺失株的安全性研究,发现 gE 或 gI 缺失株仍然可以造成绵羊的发病死亡,但缺失 TK 基因可以明显减弱毒力,免疫后的羊全部存活。在本研究的安全性评价中,免疫后的绵羊未出现体温升高或其他临床症状,剖检也未发现免疫后的绵羊器官出现大体或微观病理变化,而且免疫组的增重情况与阴性对照组并无显著差异,说明 Bartha-K61 疫苗和 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 基因缺失疫苗均对绵羊无致病作用,在临床上具有很好的安全性。血清学变化是反映健康动物病毒感染的重要指标,本研究与接种疫苗羊同舍饲养的同居羊 3 周内 gB 抗体保持阴性,说明疫苗毒株并未在同居动物中发生水平传播。同时,对免疫后的绵羊和同居绵羊的咽拭子、肛拭子的排毒检测,以及脏器病毒载量的检测均未发现排毒或器官带毒现象,说明 2 种缺失株疫苗在群体中不会出现散毒或潜伏感染的情况。以上结果均证明 2 种疫苗具有较好的安全性。

增重与养殖场的经济效益直接相关,是 PRV 疫苗免疫效力的直接反映。本研究显示,1×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> 或 1×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> 剂量的 Bartha-K61 和 1×10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> 的 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 疫苗免疫绵羊在攻毒后的 2 周内体重保持增加,且与空白对照组的增重无显著差

异;而 1×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> 的 vPRV-gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 疫苗免疫组和攻毒对照组攻毒后体重下降,极显著低于空白对照组,说明 Bartha-K61 疫苗对羊抵抗 vPRV 的致死性攻击可获得满意的增重结果,接种高低 2 种剂量该疫苗的羊攻毒后的增重均不受影响。然而,vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 疫苗免疫的羊攻毒后是否能保持增重与免疫剂量有关。同时,从免疫羊攻毒后的死亡率看,1×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> 的 Bartha-K61 疫苗的免疫效果优于 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 疫苗。

从血清学的检测结果来看,2 种疫苗免疫组攻毒后均发生了 gE 抗体转阳,说明对变异毒株 vPRV/XJ5 的攻毒,无论哪种疫苗均无法阻止其感染。能否减少排毒是评价 PRV 疫苗的另一重要指标。本研究结果表明,Bartha-K61 疫苗和 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 基因缺失疫苗均不能阻止攻毒后绵羊的排毒。但是,肛拭子和咽拭子的病毒检测结果表明,在相同剂量免疫后,Bartha-K61 免疫组的羊攻毒后的排毒水平平均低于 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 免疫组。综合免疫攻毒羊的死亡率、排毒、组织中的病毒载量等指标,对绵羊而言,1×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/头份的 Bartha-K61 疫苗的免疫效果优于 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> 基因缺失疫苗。攻毒后绵羊的临床症状非常明显,一些器官出现大体病变,免疫组和攻毒对照组在存活率上有显著差异。

综上,无论 Bartha-K61 疫苗,还是 vPRV-XJ5

gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>基因缺失疫苗, 免疫绵羊后均是安全的。面对变异株 vPRV/XJ5 的致死性攻击, 在较高免疫剂量下, 即  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/头份的 Bartha-K61 疫苗或 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>基因缺失疫苗免疫羊, 两者的保护效力相当; 在较低剂量, 即  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/头份时, Bartha-K61 疫苗免疫效果要优于 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>基因缺失疫苗, 但是这 2 种疫苗都不能提供对变异株的完全保护。这与 An 等<sup>[5]</sup>的研究结果相符, 他们发现接种 Bartha-K61 疫苗的绵羊在受到 PRV 经典毒株 SC 株的致死剂量攻击后可获得保护, 但接种 Bartha-K61 疫苗的绵羊在受到变异株 HeN1 攻击后只有 1/2 存活。在本实验室之前的研究中,  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> 的 Bartha-K61 疫苗或 vPRV-XJ5 gI<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup>基因缺失疫苗, 均可保护免疫猪抵御 vPRV/XJ5 的致死性攻击, 免疫猪全部存活<sup>[21]</sup>。然而上述剂量的 2 种疫苗免疫后, 免疫羊在 vPRV/XJ5 的致死性攻击后存活率只有 66.7%, 充分证明绵羊对 PRV 的敏感性高于猪。

## 参考文献:

[1] METTENLEITER T C. Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1991, 14 (2): 151-163.

[2] METTENLEITER T C. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's disease) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996, 54 (1/2/3/4): 221-229.

[3] YE C, ZHANG Q Z, TIAN Z J, et al. Genomic characterization of emergent pseudorabies virus in China reveals marked sequence divergence: evidence for the existence of two major genotypes [J]. *Virology*, 2015, 483 (1): 32-43.

[4] BO Z Y, LI X D. A review of pseudorabies virus variants: genomics, vaccination, transmission, and zoonotic potential [J]. *Viruses*, 2022, 14 (5): 1003.

[5] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19 (11): 1749-1755.

[6] 童武, 张青占, 郑浩, 等. 免疫后发病仔猪中伪狂犬病毒的分离和鉴定 [J]. *中国动物传染病学报*, 2013, 21 (3): 1-7.

[7] WANG C H, YUAN J, QIN H Y, et al. A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vacci-

nated swine population in China [J]. *Vaccine*, 2015, 32 (27): 3379-3385.

[8] CONG X, LEI J L, XIA S L, et al. Pathogenicity and immunogenicity of a gE/gI/TK gene-deleted pseudorabies virus variant in susceptible animals [J]. *Vet Microbiol*, 2016, 182 (1): 170-177.

[9] MCFERRAN J B, DOW C, MCCracken R M. Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1979, 2 (2/3): 327-334.

[10] METTENLEITER T C. Progress in the development of vaccines against Aujeszky's disease [J]. *Tierarztl Prax*, 1995, 23 (6): 570-574.

[11] KONG H, ZHANG K, LIU Y, et al. Attenuated live vaccine (Bartha-K16) caused pseudorabies (Aujeszky's disease) in sheep [J]. *Vet Res Commun*, 2013, 37 (4): 329-332.

[12] KIT S, KIT M, PIRTLE E C. Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus [J]. *Am J Vet Res*, 1985, 46 (6): 1359-1367.

[13] POST L E, THOMSEN D R, PETROVSKIS E A, et al. Genetic engineering of the pseudorabies virus genome to construct live vaccines [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1990, 41: 97-104.

[14] YOKOYAMA N, MAEDA K, KAWAGUCHI Y, et al. Construction of the recombinant feline herpesvirus type 1 deleted thymidine kinase gene [J]. *J Vet Med Sci*, 1995, 57 (4): 709-714.

[15] NUNBERG J H, WRIGHT D K, COLE G E, et al. Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs [J]. *J Virol*, 1989, 63 (8): 3240-3249.

[16] HU R M, ZHOU Q, SONG W B, et al. Novel pseudorabies virus variant with defects in TK, gE and gI protects growing pigs against lethal challenge [J]. *Vaccine*, 2015, 33 (43): 5733-5740.

[17] ROBERT J C, DAVID C V M. Viral diseases of the ruminant nervous system [J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2004, 20 (2): 327-362.

[18] ZHOU J Z, LI S, WANG X B, et al. Bartha-k61 vaccine protects growing pigs against challenge with an emerging variant pseudorabies virus [J]. *Vaccine*, 2017, 35 (8): 1161-1166.

[19] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [J]. *Am J Epidemiol*, 1938, 27 (3): 493-497.

[20] 田志军, 彭金美. 一株通过细胞低温传代和药物筛选致弱的猪伪狂犬病毒基因缺失弱毒疫苗株及其应用: 中国, ZL201610629865.3 [P]. 2017-08-01.

[21] 任庆海. Bartha-K61 和变异株疫苗对猪伪狂犬病毒变异株的免疫保护与猪伪狂犬病综合防控措施的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.