

## 特邀综述

# 新型猪瘟疫疫苗研究进展

王春花, 孙元, 仇华吉

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001

王春花, 孙元, 仇华吉. 新型猪瘟疫疫苗研究进展. 生物工程学报, 2013, 29(7): 880-890.

Wang CH, Sun Y, Qiu HJ. Progress in new-type vaccines against classical swine fever. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 880-890.

**摘要:** 猪瘟是由猪瘟病毒引起猪的一种急性、热性和高度接触性传染病。该病呈世界性分布, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失。目前, 疫苗接种仍然是防控猪瘟的主要手段。虽然传统的猪瘟弱毒疫苗(如C株)安全有效, 但猪瘟的临床表现发生了很大变化, 呈现典型猪瘟和非典型猪瘟共存、隐性感染和持续感染并现, 免疫失败的现象时有发生, 且不能区分野毒感染和免疫接种。因此, 研制安全、高效、能区分野毒感染和疫苗免疫动物(DIVA)的新型猪瘟疫疫苗极为必要。文中就近年来开发的核酸疫苗、病毒活载体疫苗、基于蛋白/肽的疫苗、基因缺失疫苗、嵌合瘟病毒疫苗等新型DIVA猪瘟疫疫苗作一综述。

**关键词:** 猪瘟, 新型疫苗, DIVA疫苗, 综述

## Progress in new-type vaccines against classical swine fever

Chunhua Wang, Yuan Sun, and Huaji Qiu

State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, Heilongjiang, China

**Abstract:** Classical swine fever (CSF), an acute and highly contagious disease of swine, is caused by classical swine fever virus. CSF is one of the most devastating diseases to the pig industry worldwide and results in serious economic losses. Currently prophylactic vaccination is still an important strategy for the control of CSF. Live attenuated vaccines (such as C-strain) are safe and effective. However, there are significant changes in the clinical features of CSF, displaying concurrent typical and atypical CSF, and simultaneous inapparent and persistent infections. Immunization failure has been reported frequently and it is difficult to distinguish between wild-type infected and vaccinated animals (DIVA). So there is

**Received:** January 26, 2013; **Accepted:** March 21, 2013

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA10A208), National Natural Science Foundation of China (No. 31200690).

**Corresponding author:** Huaji Qiu. Tel: +86-18946066041; E-mail: huajiqu@hvri.ac.cn

国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2011AA10A208), 国家自然科学基金(No. 31200690)资助。

网络出版时间: 2013-05-23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130523.2026.004.html>

an urgent need to develop more effective and safer DIVA or marker vaccines for the control of CSF. In this review, some of the most recent advances in new-type vaccines against CSF, including DNA vaccines, live virus-vectored vaccines, protein or peptide-based vaccines, gene-deleted vaccines and chimeric pestivirus-based vaccines, are reviewed and discussed.

**Keywords:** classical swine fever, new-type vaccines, DIVA vaccines, review

猪瘟疫 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟疫病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起猪的一种高度接触性、致死性的传染病, 临床上以发病急、高热稽留、全身泛发性点状出血和脾梗死为主要特征, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失。世界动物卫生组织 (OIE) 将其列入 OIE 疫病名录 (OIE-listed diseases), 为须申报的 (Notifiable) 动物传染病, 我国也将其列为一类动物传染病。

猪瘟疫病毒为黄病毒科瘟病毒属成员, 病毒粒子呈球形, 核衣壳为二十面体对称, 是有囊膜的单股正链 RNA 病毒。基因组全长 12.3 kb, 含有一个大的开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 该阅读框编码一个含 3 898 个氨基酸的多聚蛋白, 此多聚蛋白在宿主细胞和病毒自身蛋白酶作用下, 加工形成 4 个结构蛋白 (C、E<sup>ms</sup>、E1 和 E2) 和 8 个非结构蛋白 (N<sup>pro</sup>、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)。其中囊膜糖蛋白 E2 是主要保护性抗原蛋白, 可以诱导抗猪瘟疫的保护性免疫。

近年来, 猪瘟疫在亚洲、欧洲、南美洲等地区呈现复发的趋势, 一些宣布已消灭猪瘟疫的国家 (如法国、荷兰、德国、比利时等) 又见猪瘟疫复发的报道<sup>[1]</sup>。并且, 猪瘟疫的流行趋势发生了很大变化, 呈现典型猪瘟疫和非典型猪瘟疫共存, 隐性感染和持续感染并现, 且免疫失败的现象时有发生。这种新的流行形式给全世界养猪业提出了新的

挑战。目前, 疫苗接种仍然是防制猪瘟疫的重要措施, 但传统疫苗不能区分感染和免疫动物 (Differentiating Infected from Vaccinated Animals, DIVA), 不能满足防制猪瘟疫的需求。因此, 研制安全、高效且具有 DIVA 特性的新型猪瘟疫疫苗对于预防和控制该病具有重要意义。现将近年来研制的猪瘟疫新型疫苗综述如下。

## 1 核酸疫苗

### 1.1 DNA 疫苗

DNA 疫苗是近年发展起来的一种新型疫苗, 其本质是编码免疫原或与免疫原相关的真核表达质粒 DNA (有时也可是 RNA)。此类疫苗是以装配有原核复制组件和真核表达调控组件的质粒为载体, 将编码免疫原的基因克隆至该质粒中构建而成。将构建的质粒 DNA 接种动物后, 可使外源基因在动物体内表达, 表达的抗原随后激活动物机体的免疫系统, 从而诱导特异性的免疫反应, 并对接种动物提供免疫保护。

猪瘟疫 DNA 疫苗免疫是指将表达猪瘟疫病毒主要保护性抗原 E2 蛋白的重组质粒直接免疫动物, 使 E2 蛋白在免疫动物体内瞬时表达, 并刺激机体产生免疫保护。研究显示, 用含有信号肽序列及全长 CSFV E2 基因的真核表达质粒 pcDSW 接种小鼠后, 可诱导小鼠产生抗 CSFV 的特异性免疫反应, 该质粒在猪体上亦可诱导保护性免疫反应<sup>[2]</sup>。用表达 CSFV E2 蛋白的重组质

粒 pcDNA3.1/E2 免疫猪只,在未检测到中和抗体的情况下,该质粒能够诱导产生 MHC II 类限制性 T 细胞免疫应答。并且在攻毒后,可刺激机体快速产生与免疫保护相关的高水平的中和抗体<sup>[3]</sup>。在随后的研究中也发现, Tarradas 等用 DNA-E2 疫苗免疫猪,在没有检测到中和抗体的情况下,也诱导了特异性的辅助 T 淋巴细胞免疫应答。并且在 CSFV 攻毒初期及攻毒 7 d 后,猪体内检测到了恒定水平的特异性 IFN- $\gamma$  和坚强的细胞免疫应答,对 CSFV 的攻击提供了免疫保护,并于中和抗体产生之前控制了 CSFV 的复制<sup>[4]</sup>。此类研究表明,也可以通过诱导 Th 应答的策略来设计新型的标记疫苗。

DNA 疫苗具有许多优点,如能高效诱导特异性体液免疫与细胞免疫应答<sup>[5]</sup>;其制备不需要特定的病原微生物,重组质粒可通过发酵培养方式大量制备,且稳定性较好;将多种质粒 DNA 简单混合,就可将生化特性类似的抗原(如来源于相同病原菌的不同菌株)或一种病原体的多种不同抗原结合在一起,构成多价疫苗,从而使一种 DNA 疫苗能够诱导产生针对多个抗原表位的免疫保护作用<sup>[6]</sup>。若同时将编码细胞因子的基因克隆到质粒上,不但可以增强免疫应答,而且可以调整应答从 Th1 型向 Th2 型过渡。这样不但可以产生终身免疫,还可以调控免疫反应的类型,大大增加了 DNA 疫苗生产的灵活性。但 DNA 疫苗也有不足之处,如外源基因的表达水平低;诱导产生抗体的速率慢;接种剂量大;有整合和转化染色体的潜在危险<sup>[7]</sup>。因此,将其用于开发 CSFV 标记疫苗,还需做进一步的改进与深入的研究。

## 1.2 甲病毒复制子载体 DNA 疫苗

甲病毒复制子载体 DNA 疫苗是一种基于 RNA 复制子的新型疫苗。近年来,甲病毒(Alphaviruses)尤其是塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus, SFV)和辛德比斯病毒(Sindbis virus, SINV)衍生的 DNA/RNA 载体被广泛用于外源基因的表达。在此类载体中,甲病毒 RNA 首先翻译产生病毒复制酶复合物,由其催化从 RNA 到 RNA 的复制。这种复制过程是在宿主细胞的细胞浆中进行的,效率极高,所以由其介导的重组 RNA 就可在细胞浆内得到大量复制,从而使外源基因获得高效表达。这种载体在研制新型复制型 DNA 疫苗上取得了很大的成功。本研究小组利用 SFV 复制子载体构建了表达 CSFV E2 蛋白的 DNA 疫苗(pSFV1CS-E2),将 pSFV1CS-E2 以每头猪 600  $\mu\text{g}$  的剂量肌肉注射途径免疫 3 次(每次间隔 3 周),结果显示,尽管在攻毒前疫苗诱导的抗体水平较低,但免疫猪可以抵抗猪瘟强毒的攻击。随后又对该疫苗的免疫效果作了进一步的评价,以 100  $\mu\text{g}$  的剂量免疫两次(间隔 3 周),虽然检测的抗体水平很低,但免疫猪仍然能够抵抗猪瘟强毒的致死性攻击<sup>[8-9]</sup>。后来,本研究小组利用基于 CFSE 染色来评价淋巴细胞增殖的方法,在小鼠模型上证实该甲病毒复制子载体猪瘟疫苗 pSFV1CS-E2 能够诱导高水平的细胞免疫应答,而且猪伪狂犬病病毒(PRV) UL49 基因编码的 VP22 转导蛋白可以显著增强其免疫应答<sup>[10]</sup>。

甲病毒复制子载体是衍生于 RNA 病毒基因组并能自主复制的 RNA 分子,具有安全、操作方便、表达外源基因效率高、应用范围广等优点,广泛应用于基因免疫和基因治疗当中<sup>[7,11]</sup>。这种

基于复制子的 DNA 疫苗在免疫效力上要明显优于常规 DNA 疫苗。邓瑶等将等量的 SFV 载体和常规 DNA 载体同等效率转染细胞后,复制型载体表达水平比非复制型载体高约 3 倍;以不同剂量的 SFV 载体和常规 DNA 载体分别转染 BHK21 细胞,复制型载体所有剂量组载体的表达量均高于非复制型载体<sup>[12]</sup>。复制子载体疫苗免疫效果佳的原因,一方面是表达外源抗原的量增多;另一方面是此类疫苗转染细胞后,其 RNA 复制酶合成大量双链 RNA 复制中间体,激活 RNaseL 和 RNA 依赖的蛋白激酶 (PKR),导致被转染细胞的凋亡,从而进一步提高疫苗的免疫效果。因此,复制子载体疫苗也被称为“自杀性”DNA 疫苗<sup>[13]</sup>。然而,复制子载体疫苗的免疫剂量可以影响细胞凋亡的程度,高剂量免疫能够影响抗原的表达和处理,进而影响疫苗免疫效果。本研究小组就证实了这种情况,我们在较低的免疫剂量和较少的免疫次数情况下,仍可使免疫猪只获得完全的临床保护<sup>[11]</sup>。因此这种复制子载体疫苗有望开发为防制猪瘟的新型候选疫苗。但该复制型 DNA 载体转染细胞发生的凋亡(尽管只是局部和瞬时的)可能会带来另外的安全问题,需要进一步进行安全评估。

## 2 病毒活载体疫苗

### 2.1 重组载体疫苗

重组载体疫苗是利用基因工程的方法将病毒复制非必需区克隆出来,经体外改造后将异源性病毒的保护性抗原基因及启动子调控序列等插入其中,通过体外同源重组技术获得的一种疫苗。所谓病毒的复制非必需区是指当病毒基因组的某一核苷酸序列被敲除、突变或在该区域内插

入外源基因片段后,不影响病毒复制的区域<sup>[14]</sup>。在病毒复制非必需区插入外源基因构建成的重组载体疫苗既可诱导机体产生针对异源性病毒的特异性免疫反应,又能使宿主获得抵抗载体病毒相应毒株攻击的免疫力。如果在载体病毒复制非必需区中同时插入多个异源性病毒的保护性抗原基因,还可以达到一针防多病的目的。猪瘟疫病毒重组载体疫苗是指将猪瘟疫病毒的免疫原性基因克隆到活病毒载体中而制备的一种疫苗。目前,常利用痘病毒、猪伪狂犬病病毒、腺病毒、杆状病毒等作为载体表达猪瘟疫病毒 E2 或和 E<sup>ns</sup> 结构蛋白来构建重组载体疫苗<sup>[15]</sup>。

痘病毒、猪伪狂犬病病毒等复制型病毒载体具有稳定表达外源基因、外源基因表达水平高等优点。已有研究表明,将 CSFV E2 基因插入猪痘病毒的 TK 基因中,成功获得了能表达 E2 蛋白的重组猪痘病毒 (rSPV/CSFV-E2)<sup>[16]</sup>。将 rSPV/CSFV-E2 免疫猪只,可获得免疫保护<sup>[17]</sup>。也有利用副痘病毒属的口疮病毒构建猪瘟疫疫苗 (ORFV VrV-E2) 的报道,将此重组体免疫动物,在致死性猪瘟疫病毒攻击的早期,免疫动物机体产生了猪瘟疫特异性 IFN- $\gamma$  和高水平的中和抗体<sup>[18]</sup>。另外,将 CSFV 的 E2 基因插入猪伪狂犬病病毒的 gD 基因位点,可使伪狂犬病病毒丧失感染性,使病毒不会从免疫动物传播到其他动物,安全性大大提高并且可对猪伪狂犬病和猪瘟疫提供双重保护<sup>[19]</sup>。

除复制型病毒载体外,腺病毒、杆状病毒等非复制型病毒载体因具有安全、高效、转移和表达外源基因能力强等优点,被广泛用于动物疫苗开发和人类基因治疗。本研究小组先前利用人 5 型复制缺陷性腺病毒载体,构建了多株表达猪瘟疫

病毒 E2 基因的重组腺病毒, 用这些重组腺病毒免疫猪只后, 能够诱导高水平的 CSFV 特异性中和抗体, 并且对致死性猪瘟病毒的攻击提供完全免疫保护<sup>[20-21]</sup>。杆状病毒属于昆虫细胞系的病毒, 对人和动植物都无害, 对宿主的专一性强, 展现了乐观的应用前景。本研究小组利用杆状病毒表达系统构建了表达猪瘟病毒 E2 基因的重组 BacMam 病毒, 研究证实该重组病毒免疫小鼠后能够诱导有效的免疫应答<sup>[22]</sup>。

虽然重组载体疫苗具有很大的开发应用潜力, 但目前由于人类至今还不完全了解病毒的自然发生及变异机制, 无法确定是否会产生携有外源基因的强毒突变株, 也无法控制该类病毒的未来走向, 对此还需要做深入细致的研究。

## 2.2 嵌合病毒载体疫苗

所谓嵌合病毒载体是将两种载体以某种方式嵌合到一起, 将各自的优点集成到一起, 并且具有叠加和放大效应。本研究小组利用高递送效率的人 5 型复制缺陷性腺病毒载体和高表达效率的甲病毒复制子载体, 构建了表达猪瘟病毒 E2 基因的腺病毒/甲病毒复制子嵌合载体猪瘟疫苗 (rAdV-SFV-E2)。这种疫苗既能发挥腺病毒载体的高效转移外源基因的能力, 又能发挥甲病毒复制子载体自我复制后高效表达外源基因及其诱导强大细胞免疫应答的优势。研究表明, 在家兔模型上, rAdV-SFV-E2 以  $10^6$  TCID<sub>50</sub> 剂量接种 1 次, 最早可于接种后第 9 天就产生猪瘟特异性抗体, 高水平的抗体可持续 180 d 以上, 免疫家兔能够完全抵抗猪瘟病毒 C 株的攻击; 在猪体上, rAdV-SFV-E2 以  $10^7$  TCID<sub>50</sub> 剂量接种猪只两次, 免疫猪可产生强烈的、均衡的体液免疫和细

胞免疫应答。免疫应答水平明显高于表达猪瘟 E2 蛋白的重组腺病毒 (rAdV-E2) 和甲病毒复制子载体猪瘟疫苗 (pSFV1CS-E2), 并且免疫猪从临床上和病毒学上能完全抵抗致死性猪瘟强毒的攻击 (不表现临床症状、病理变化和病毒血症)<sup>[23]</sup>。进一步研究证实, 该疫苗对靶动物和非靶动物安全; 以  $6.25 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> 剂量免疫两次或以  $10^7$  TCID<sub>50</sub> 剂量免疫 1 次, 可完全抵抗猪瘟强毒的攻击; 能够突破猪瘟母源抗体的干扰; 与猪蓝耳病活疫苗和猪伪狂犬病活疫苗同时免疫互不干扰; 几乎不诱导抗腺病毒载体抗体的产生, 对腺病毒载体疫苗的再次免疫无抑制作用<sup>[24]</sup>; 最早于免疫后 3 周提供完全保护, 免疫保护可持续半年 (待发表)。这是首例基于单一抗原基因的猪瘟基因工程疫苗提供消除性免疫 (Sterile immunity) 的报道。这种疫苗将两种载体的优点集于一身, 显著提高了疫苗的免疫效力, 这种策略对于其他动物疫苗的研发都有重要借鉴价值。目前, 该疫苗正在进行转基因微生物安全评价及生产工艺的研究。

## 3 基于蛋白/肽的疫苗

近年来, 基于蛋白/肽的疫苗主要有亚单位疫苗和合成肽疫苗。亚单位疫苗仅含有病毒的一种或几种保护性抗原, 不含有病毒粒子的其他遗传信息, 因而具有安全性好、稳定性强和无需灭活的优点。现今, 最有效的 CSFV 亚单位疫苗是基于 CSFV 主要保护性抗原 E2 糖蛋白而研制的, 且其中免疫原性最强的一个为表达缺少跨膜区的重组 E2 糖蛋白。Hulst 等利用 E2 基因与杆状病毒重组后导入昆虫细胞中进行表达, 获得了一系

列的重组 E2 糖蛋白。其试验结果显示,用 20~100  $\mu\text{g}$  表达的 E2 糖蛋白免疫猪,可抵抗 100 LD<sub>50</sub> 的致死性猪瘟强毒的攻击,并且其诱导产生的中和抗体水平远高于弱毒疫苗免疫产生的水平<sup>[25]</sup>。de Smit 等研究表明,猪瘟 E2 亚单位疫苗一次免疫就能够使免疫猪抵抗猪瘟强毒攻击,获得长达 13 个月持续性的免疫保护<sup>[26]</sup>。已有实验证实,经酵母系统表达的猪瘟病毒 E2 亚单位疫苗能对哨兵猪提供完全免疫保护并能阻止猪瘟病毒的水平传播<sup>[27]</sup>。然而也有报道,虽然猪瘟 E2 亚单位疫苗对猪有良好的保护作用,且能通过检测抗 E<sup>ms</sup> 蛋白的抗体将疫苗免疫猪与自然感染猪区分开来,但是该疫苗不能有效地防止猪瘟病毒的水平传播和垂直传播<sup>[28-30]</sup>,而且亚单位疫苗的免疫原性通常较低,需要与佐剂合用,或偶联到适当的载体上应用。这种疫苗阻止病毒水平传播的差异可能与疫苗质量、免疫程序、攻毒用毒株、攻毒的途径等方面的不同有关。

肽疫苗包括抗原表位疫苗和树状肽疫苗,是指利用重组 DNA 技术根据猪瘟病毒基因组的核苷酸序列,推导出猪瘟病毒蛋白质的氨基酸序列,然后利用人工合成方法制备相应的寡肽,再与佐剂偶联制成的疫苗<sup>[31]</sup>。猪瘟病毒主要的免疫原 E2 糖蛋白具有 A、B、C 三个抗原区,其中 A 抗原区高度保守。经对抗原表位疫苗的研究发现,仅含有 E2 蛋白 A 抗原区的突变体就能对致死性猪瘟病毒的攻击提供完全保护<sup>[32]</sup>。覆盖 A 抗原区的 6 个重叠肽 (A1~A6) 疫苗中,A2 和 A6 多肽疫苗包含了 E2 蛋白的主要线性中和抗原表位,能诱导免疫猪产生坚强的免疫力。对 E2 糖蛋白的 B、C 抗原区研究发现,覆盖 B/C 抗原区的 5 个重叠肽 (BC1-BC5) 疫苗可以诱导肽特

异性中和抗体。其中 BC1 多肽疫苗包含了 E2 蛋白的主要线性中和抗原表位,能诱导最强的免疫保护活性,其次为 BC4 多肽疫苗,含有 E2 蛋白的次要线性中和抗原表位。猪瘟树状肽疫苗是通过赖氨酸树将源于猪瘟病毒 E2 糖蛋白的 B 细胞表位的 4 个拷贝与源于猪瘟病毒 NS3 蛋白的 T 细胞表位连接起来构建的肽疫苗。Tarradas 等利用这种方法构建了 3 种树状肽猪瘟疫苗,免疫攻毒试验结果显示,树状肽疫苗能使免疫动物获得部分保护<sup>[33]</sup>。因此,基于蛋白/肽的疫苗也是一种很有发展潜力的新型标记猪瘟疫苗。

## 4 基于瘟病毒的疫苗

### 4.1 猪瘟病毒基因缺失弱毒疫苗

病毒基因缺失弱毒疫苗是利用基因工程技术,使某些与病毒复制无关的毒力基因缺失、突变,以致病毒毒力明显减弱或丧失,但病毒的复制能力并不丧失,同时还保持着良好的免疫原性,由此获得基因缺失弱毒疫苗株。

对于猪瘟病毒缺失弱毒疫苗,主要通过缺失 CSFV E<sup>ms</sup> 和 E2 基因来研制<sup>[34]</sup>。有研究者在猪瘟病毒 C 株感染性克隆 FLc2 的基础上,构建了 CSFV E<sup>ms</sup> 基因全部缺失或部分缺失的突变株 FLc22 和 FLc23。这些缺失突变株能够在组成性表达 E<sup>ms</sup> 的 SK6 细胞系中复制传代,装配的子代病毒由于缺失了囊膜蛋白 E<sup>ms</sup> 而丧失了感染性<sup>[35]</sup>,从而不会在免疫动物机体中扩散,亦不能传播给接触动物<sup>[36]</sup>,安全性较高。动物试验结果显示,接种缺失突变株 Flc22 和 Flc23 的猪均能抵抗 CSFV 强毒株 Brescia 的致死性攻击,并且由于这种突变株的基因组编码 E2 蛋白,但不编码缺失的 E<sup>ms</sup> 蛋白,故可用于鉴别疫苗免疫的猪

和野毒感染的猪。后来,又有研究者按照这种方法构建了 CSFV *E2* 基因全部 (Flc47) 或部分 (Flc4、Flc48) 缺失突变株,这些缺失病毒均可以在组成性表达 *E2* 蛋白的细胞系中感染和复制,但同样不产生具有感染性的子代病毒<sup>[37]</sup>。这表明 *E2* 蛋白的每一个抗原区 (A/B/C 抗原区) 对猪瘟病毒的复制都是必需的。将这些缺失突变株接种猪后, Flc4 免疫猪能抵抗致死性猪瘟强毒的攻击,其他两个突变株可提供部分免疫保护。此外,这些病毒突变株还能通过血清学试验区别于正常毒株<sup>[38]</sup>。

#### 4.2 嵌合瘟病毒疫苗

猪瘟病毒/牛病毒性腹泻病毒 (CSFV/BVDV) 嵌合病毒疫苗是通过反向遗传技术,用 BVDV 的保护性抗原基因替换 CSFV 弱毒株上相应的保护性抗原基因而制备成的嵌合瘟病毒疫苗。van Gennip 等在 CSFV C 株感染性克隆的基础上,构建了 3 个 CSFV/BVDV 全长 DNA 拷贝,以 BVDV 5250 株的 *E2*、或 *E<sup>ms</sup>*、或 *E2* 和 *E<sup>ms</sup>* 基因分别取代 CSFV 的 *E2*、或 *E<sup>ms</sup>*、或 *E2* 和 *E<sup>ms</sup>* 的相应序列区域,构成重组的嵌合病毒株 Flc9、Flc11 和 Flc2<sup>[39]</sup>。其研究结果显示,两种瘟病毒抗原区的替换并没有改变感染细胞的嗜性,并且 Flc9、Flc11 这两种病毒分别诱导产生了抗 *E2* 和 *E<sup>ms</sup>* 的抗体,且能与野毒感染产生的抗体区分开来。而且这些经改造后的嵌合病毒能对 CSFV 的致死性攻击提供完全免疫保护。反之,将 CSFV 疫苗株的 *E2* 和 *E<sup>ms</sup>* 部分序列分别用 BVDV 相应区段替换后构建两个嵌合病毒 (Flc2、Flc3),该嵌合病毒在免疫接种 1~2 周后,即可对猪产生较好的免疫保护作用<sup>[40]</sup>。

目前,研究延续性较强且很有开发前景的一种新型猪瘟疫苗是 CP7\_E2alf,该疫苗研究至今已有十余年,目前正在欧盟注册。这种疫苗是以 BVDV CP7 株为骨架,将其 *E2* 基因用 CSFV Alfort 株基因组的 *E2* 基因取代,该嵌合病毒能在猪源细胞上有效生长<sup>[41]</sup>。在将近 10 年的时间里,用该疫苗相继进行了家猪与野猪免疫效力试验、不同免疫途径试验、不同免疫剂量试验、对靶动物及非靶动物安全性试验、与其他猪瘟疫苗 (包括猪瘟弱毒疫苗 C 株) 比较试验、免疫持续期试验等。研究结果证实,该疫苗一次免疫后 14 d (肌肉) 和 21 d (口服) 能够对猪瘟病毒的攻击提供完全保护<sup>[42]</sup>;一次口服免疫能对早期猪瘟病毒攻击提供部分保护并干扰猪瘟病毒发病机理相关的细胞因子应答反应<sup>[43]</sup>;对靶动物 (家猪、野猪) 及非靶动物 (牛、羊、兔) 安全<sup>[44-45]</sup>;免疫效果与 C 株相当,且具有标记特征<sup>[46]</sup>;  $10^{5.25}$  TCID<sub>50</sub> 免疫剂量能够提供完全保护;该疫苗在猪体上的免疫持续期可达 6 个月之久<sup>[47]</sup>。用 CP7\_E2alf 疫苗肌肉免疫 5 和 8 周龄仔猪,并于免疫后 2 周攻猪瘟强毒,结果显示,CP7\_E2alf 疫苗能对带有 C 株母源抗体的仔猪提供有效的免疫保护<sup>[48]</sup>。从免疫保护和标记特性看,CP7\_E2alf 疫苗是较理想的候选猪瘟标记弱毒活疫苗<sup>[49]</sup>。

## 5 问题与展望

迄今为止,猪瘟疫苗仍然是预防、控制及净化我国猪瘟的有效手段之一。传统的猪瘟兔化弱毒疫苗已不能满足防控和根除猪瘟的要求。因此,许多研究者开始致力于研制新型猪瘟疫苗。

虽然近年来研制的新型猪瘟疫苗具有各自的优势,但也存在一定的缺陷(表1)。DNA疫苗易于制备,具有相对较好的稳定性,能同时诱导体液免疫与细胞免疫应答,但其诱导产生抗体的速度慢,接种剂量大,有整合和转化染色体的潜在危险;病毒活载体疫苗能稳定表达外源基因,但人类至今还不完全了解病毒的自然发生及变异机制,无法控制该类病毒的未来走向;亚单位疫苗安全,不含有感染性病毒成分,无致病性也无需灭活,但其免疫原性通常要比完整的病毒抗原差,需要多次免疫并配合佐剂才能提供有效保护;树状肽疫苗联合多个抗原表位,却仅能诱导部分免疫保护;基因缺失弱毒疫苗因其毒力基因被人为地删除,往往不可能完全自行修复,故不

会发生返祖现象,但弱毒疫苗的长期使用可能会改变猪瘟病毒原有的生态环境和病毒群落,使猪瘟流行毒株向远离疫苗毒的方向演化,这将给猪瘟的控制带来新的挑战。

相比而言,腺病毒/甲病毒复制子嵌合载体猪瘟疫苗 rAdV-SFV-E2 和嵌合瘟病毒 CP7\_E2alf 疫苗是很有希望的新型猪瘟标记疫苗,这两种疫苗在免疫效力上与猪瘟免化弱毒疫苗相当,且均具有 DIVA 特性,而且 rAdV-SFV-E2 还不受猪瘟母源抗体干扰及与其他疫苗同时免疫互不影响,且非常安全。这两种疫苗有望进入临床应用,不过需经过转基因微生物安全性评价。相信在不久的将来,安全有效的新型猪瘟疫苗将会用于猪瘟的防控和净化之中。

表1 不同类型猪瘟疫苗的特点比较

Table 1 Comparison of different types of vaccines against CSF

Vaccines	Safety	Efficacy	Interference by maternally-derived anti-CSF antibodies	Influenced by co-administered PRV or PRRS live vaccine	Influenced by anti-BVDV antibodies	Meeting DIVA principle	Cost of production
C-strain	High	Perfect	Yes	Yes	Yes	No	Low
rAdV-SFV-E2	High	Excellent	No	No	No	Yes	Low
CP7_E2alf	Moderate	Excellent	Yes	Uncertain	Yes	Yes	Low
E2 subunit vaccine	High	Good	No	No	No	Yes	High
DNA vaccine	High	Good/Fair	No	No	No	Yes	High
PRV/swinepox vectored vaccine	Moderate	Good	Yes	Yes	No	Yes	Low

## REFERENCES

- [1] Tu CC. Epidemiological status of classical swine fever in China and its control measures[D]. Beijing: China Agricultural University, 2004 (in Chinese). 涂长春. 中国猪瘟流行病学现状与防制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [2] Yu XL, Tu CC, Li HW, et al. Construction of eukaryotic expression plasmids of CSFV E2 gene and the study on DNA vaccine. *Virology*, 2000, 15(3): 264-271.
- [3] Ganges L, Barrera M, Núñez JI, et al. A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime



- for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine*, 2005, 23(28): 3741–3752.
- [4] Tarradas J, Argilaguuet JM, Rosell R, et al. Interferon-gamma induction correlates with protection by DNA vaccine expressing E2 glycoprotein against classical swine fever virus infection in domestic pigs. *Vet Microbiol*, 2010, 142(1/2): 51–58.
- [5] Li N, Sun Y, Qiu HJ. Progress in DNA vaccines against classical swine fever: a review. *Chin J Biotech*, 2010, 26(3): 281–289 (in Chinese).  
李娜, 孙元, 仇华吉. 猪瘟疫 DNA 疫苗研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(3): 281–289.
- [6] Yu XL, Tu CC, Li HW, et al. DNA-mediated protection against classical swine fever virus. *Vaccine*, 2001, 19(11/12): 1520–1525.
- [7] Li N, Qiu HJ, Li GX, et al. A Semliki Forest virus RNA replicon-based DNA plasmid encoding classical swine fever virus E2 gene induces antibody response in mice. *China Biotechnol*, 2005, 25(1): 53–58 (in Chinese).  
李娜, 仇华吉, 李国新, 等. 基于 Semliki Forest 病毒 RNA 复制子的猪瘟疫 RNA 疫苗的初步研究. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(1): 53–58.
- [8] Li N, Qiu HJ, Zhao JJ, et al. A Semliki Forest virus replicon vectored DNA vaccine expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus protects pigs from lethal challenge. *Vaccine*, 2007, 25(15): 2907–2912.
- [9] Li N, Zhao JJ, Zhao HP, et al. Protection of pigs from lethal challenge by a DNA vaccine based on an alphavirus replicon expressing the E2 glycoprotein of classical swine fever virus. *J Virol Methods*, 2007, 144(1/2): 73–78.
- [10] Zhao HP, Sun JF, Li N, et al. Assessment of the cell-mediated immunity induced by alphavirus replicon-vectored DNA vaccines against classical swine fever in mouse model. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 129(1/2): 57–65.
- [11] Li N, Zhao JJ, Zhao HP, et al. Alphavirus replicon-vectored plasmid DNA-based vaccine elicits protective immunity against classical swine fever virus. *Chin J Biotech*, 2007, 23(3): 434–439 (in Chinese).  
李娜, 赵建军, 赵和平, 等. 基于甲病毒复制子载体的猪瘟疫 DNA 疫苗的免疫效力评价. *生物工程学报*, 2007, 23(3): 434–439.
- [12] Deng Y, Meng X, Xu HL, et al. A comparative study on SFV-based DNA vaccine and the conventional DNA vaccine. *Chin J Virol*, 2002, 18(4): 325–331 (in Chinese).  
邓瑶, 孟昕, 许洪林, 等. Semliki 森林病毒衍生的 DNA 疫苗与常规 DNA 疫苗的比较. *病毒学报*, 2002, 18(4): 325–331.
- [13] Berglund P, Smerdou C, Fleeton MN, et al. Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6): 562–565.
- [14] Xie Y, Bai H. Advance in new kind of vaccine for classical swine fever. *Prog Vet Med*, 2008, 29(2): 79–82 (in Chinese).  
谢运, 白华. 新型猪瘟疫疫苗研究进展. *动物医学进展*, 2008, 29(2): 79–82.
- [15] Wang Q, Hu JH, Zheng SL, et al. Advance in live-vector vaccine of CSFV E2 gene. *Prog Vet Med*, 2010, 31(7): 98–102 (in Chinese).  
王青, 胡建和, 郑素玲, 等. 猪瘟疫病毒 E2 基因活载体疫苗研究进展. *动物医学进展*, 2010, 31(7): 98–102.
- [16] Hahn J, Park SH, Song JY, et al. Construction of recombinant swinepox viruses and expression of the classical swine fever virus E2 protein. *J Virol Methods*, 2001, 93(1/2): 49–56.
- [17] Ganges L, Núñez JI, Sobrino F, et al. Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: cellular responses also play a role in protection. *Vet J*, 2008, 177(2): 169–177.
- [18] Voigt H, Merant C, Wienhold D, et al. Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine*, 2007, 25(31): 5915–5926.
- [19] Peeters B, Bienkowska-Szewczyk K, Hulst M, et

- al. Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. *J Gen Virol*, 1997, 78(12): 3311–3315.
- [20] Sun Y, Liu DF, Wang YF, et al. Generation and efficacy evaluation of a recombinant adenovirus expressing the E2 protein of classical swine fever virus. *Res Vet Sci*, 2010, 88(1): 77–82.
- [21] Sun Y, Li HY, Zhang XJ, et al. Comparison of the protective efficacy of recombinant adenoviruses against classical swine fever. *Immunol Lett*, 2011, 135(1-2): 43–49.
- [22] Li M, Wang YF, Wang Y, et al. Immune responses induced by a BacMam virus expressing the E2 protein of classical swine fever virus in mice. *Immunol Lett*, 2009, 125(2): 145–150.
- [23] Sun Y, Li HY, Tian DY, et al. A novel alphavirus replicon-vectored vaccine delivered by adenovirus induces sterile immunity against classical swine fever. *Vaccine*, 2011, 29(46): 8364–8372.
- [24] Sun Y, Tian DY, Li S, et al. Comprehensive evaluation of the adenovirus/alphavirus-replicon chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever. *Vaccine*, 2013, 31(3): 538–544.
- [25] Hulst MM, Himes G, Newbigin E, et al. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 1994, 200(2): 558–565.
- [26] de Smit AJ, Bouma A, de Kluijver EP, et al. Duration of the protection of an E2 subunit marker vaccine against classical swine fever after a single vaccination. *Vet Microbiol*, 2001, 78(4): 307–317.
- [27] Lin GJ, Deng MC, Chen ZW, et al. Yeast expressed classical swine fever E2 subunit vaccine candidate provides complete protection against lethal challenge infection and prevents horizontal virus transmission. *Vaccine*, 2012, 30(13): 2336–2341.
- [28] Dewulf J, Laevens H, Koenen F, et al. An E2 sub-unit marker vaccine does not prevent horizontal or vertical transmission of classical swine fever virus. *Vaccine*, 2001, 20(1/2): 86–91.
- [29] Dortmans JC, Loeffen WL, Weerdmeester K, et al. Efficacy of intradermally administered E2 subunit vaccines in reducing horizontal transmission of classical swine fever virus. *Vaccine*, 2008, 26(9): 1235–1242.
- [30] Dewulf J, Laevens H, Koenen F, et al. Efficacy of E2-sub-unit marker and C-strain vaccines in reducing horizontal transmission of classical swine fever virus in weaner pigs. *Prev Vet Med*, 2004, 65(3/4): 121–133.
- [31] Liu XT. Advance in new kind of technology vaccines against CSF. *Today Animal Husbandry Vet Med*, 2010, 29(5): 13–14 (in Chinese). 刘湘涛. 猪瘟新技术疫苗研究进展. *今日畜牧兽医*, 2010, 29(5): 13–14.
- [32] Dong XN, Qi Y, Ying J, et al. Candidate peptide-vaccine induced potent protection against CSFV and identified a principal sequential neutralizing determinant on E2. *Vaccine*, 2006, 24(4): 426–434.
- [33] Tarradas J, Monsó M, Muñoz M, et al. Partial protection against classical swine fever virus elicited by dendrimeric vaccine-candidate peptides in domestic pigs. *Vaccine*, 2011, 29(26): 4422–4429.
- [34] Dong XN, Chen YH. Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine*, 2007, 25(2): 205–230.
- [35] Widjoatmodjo MN, van Gennip HG, Bouma A, et al. Classical swine fever virus Erns deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *J Virol*, 2000, 74(7): 2973–2980.
- [36] Frey CF, Bauhofer O, Ruggli N, et al. Classical swine fever virus replicon particles lacking the Erns gene: a potential marker vaccine for intradermal application. *Vet Res*, 2006, 37(5): 655–670.
- [37] van Gennip HG, Bouma A, van Rijn PA, et al. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of Erns or E2 of CSFV.

- Vaccine, 2002, 20(11/12): 1544–1556.
- [38] Maurer R, Stettler P, Ruggli N, et al. Oronasal vaccination with classical swine fever virus (CSFV) replicon particles with either partial or complete deletion of the E2 gene induces partial protection against lethal challenge with highly virulent CSFV. *Vaccine*, 2005, 23(25): 3318–3328.
- [39] van Gennip HG, van Rijn PA, Widjojoatmodjo MN, et al. Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein Erns or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine*, 2000, 19(4/5): 447–459.
- [40] de Smit AJ. Laboratory diagnosis, epizootiology, and efficacy of marker vaccines in classical swine fever: a review. *Vet Q*, 2000, 22(4): 182–188.
- [41] Reimann I, Depner K, Trapp S, et al. An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus. *Virology*, 2004, 322(1): 143–157.
- [42] Leifer I, Lange E, Reimann I, et al. Modified live marker vaccine candidate CP7\_E2alf provides early onset of protection against lethal challenge infection with classical swine fever virus after both intramuscular and oral immunization. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6522–6529.
- [43] Renson P, Dimna M, Keranflec HA, et al. CP7\_E2alf oral vaccination confers partial protection against early classical swine fever virus challenge and interferes with pathogeny-related cytokine responses. *Vet Res*, 2013, 44(1): 9.
- [44] Koenig P, Lange E, Reimann I, et al. CP7\_E2alf: A safe and efficient marker vaccine strain for oral immunisation of wild boar against Classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine*, 2007, 25(17): 3391–3399.
- [45] König P, Blome S, Gabriel C, et al. Innocuousness and safety of classical swine fever marker vaccine candidate CP7\_E2alf in non-target and target species. *Vaccine*, 2011, 30(1): 5–8.
- [46] Blome S, Aebischer A, Lange E. Comparative evaluation of live marker vaccine candidates “CP7\_E2alf” and “flc11” along with C-strain “Riems” after oral vaccination. *Vet Microbiol*, 2012, 158(1/2): 42–59.
- [47] Gabriel C, Blome S, Urniza A, et al. Towards licensing of CP7\_E2alf as marker vaccine against classical swine fever-Duration of immunity. *Vaccine*, 2012, 30(19): 2928–2936.
- [48] Rangelova D, Nielsen J, Strandbygaard B, et al. Efficacy of marker vaccine candidate CP7\_E2alf in piglets with maternally derived C-strain antibodies. *Vaccine*, 2012, 30(45): 6376–6381.
- [49] Eblé PL, Geurts Y, Quak S, et al. Efficacy of chimeric Pestivirus vaccine candidates against classical swine fever: protection and DIVA characteristics. *Vet Microbiol*, 2013, 162(2/4): 437–446.

(本文责编 陈宏宇)