

**外 文 资 料 翻 译**

姓 名 侯世豪

学 号 210420206

指导教师 陈玉明

专 业 动物医学

学 院 生命科学与食品工程学院

2025年4月1日

**母源中和抗体降低针对猪繁殖与呼吸综合征病毒感染的疫苗效力**

Patricia Renson, Christelle Fablet, Mathieu Andraud, Valérie Normand,

Arnaud Lebret, Frédéric Paboeuf, Nicolas Rose, Olivier Bourry

要 点：母源中和抗体损害了仔猪对PRRS疫苗接种的免疫反应。母源中和抗体降低仔猪PRRS疫苗的效力。IFNa可能也会干扰PRRS疫苗接种。

关键词：猪繁殖与呼吸综合征病毒、改良活疫苗、母源抗体、中和抗体、IFNa、干扰素

摘要：改良活病毒（MLV）疫苗常用于降低猪繁殖与呼吸综合征（PRRS）的影响，但在现场条件下效果有限。在此，我们评估了母源中和抗体（MDNAs）在感染猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）后对疫苗效力的作用。来自商业猪群的仔猪，其MDNA水平低（A−）或高（A+），被转移到实验设施中，在3周龄（woa）时接种（V+）或不接种（V−）PRRSV−1MLV疫苗。由于疫苗接种后（pv）A−V+仔猪疫苗检测低于预期，所有V+仔猪在4woa时接受了第二次疫苗接种。在疫苗接种后5周（W5），仔猪接种了PRRSV−1野毒株以评估疫苗保护作用，并在24小时后与类似免疫状态的未接种仔猪混合，以评估病毒传播。疫苗毒株在W2pv时在A−V+和A+V+仔猪中的检测率分别为69%和6%，在W5pv时分别为50%和25%。在W5pv时，A−V+和A+V+仔猪的血清转化率分别为94%和44%，仅在A−V+组中诱导了显著的IFNg反应。感染后10天，与V−接种组相比，A−V+组的病毒血症降低了100倍，而A+V+仔猪的病毒血症没有显著降低。估计A−V+组的传播率较低：0.15[0.07–0.29]与A+V+组的0.44[0.18–1.76]和V−组的0.32[0.14–0.68]分别相比。关于首次疫苗接种后低疫苗株检测的调查表明，IFNa水平与A−V+仔猪的疫苗株检测之间存在关联。我们表明，MDNAs在接种和接触仔猪中均损害了PRRSV疫苗的效力，可能通过降低疫苗复制。IFNa也可能干扰PRRSV疫苗接种。这些新数据有助于改进疫苗接种方案。

## 1 引言

猪繁殖与呼吸综合征（PRRS），由小RNA病毒引起，属于动脉病毒科成员，是全球养猪业中危害最高的疾病之一。在欧洲西部，PRRS病毒1（PRRSV-1）是主要循环的PRRSV种类。PRRSV感染以母猪流产、仔猪呼吸系统疾病、生长迟缓和死亡率增加为特征。PRRSV使猪易感于猪呼吸道疾病综合征相关的继发性感染。为了限制PRRS的传播，通常在后备母猪、母猪和仔猪中使用基于细胞培养的减毒PRRSV活疫苗，但全面控制PRRS仍然是一个挑战。仅能实现部分保护，主要用于控制临床症状和病变。然而，在实验条件下，这些疫苗对感染PRRSV的仔猪提供良好的保护，控制感染猪血液中病毒的数量并减少对接触猪的传播。与实验条件不同，在现实情况下，接种疫苗的仔猪通常是由感染、暴露于PRRSV或接种疫苗的母猪所生，因为它们通常接种疫苗以防止产房内PRRSV的传播并提高产仔率。因此，在断奶时接种疫苗的仔猪中，经常检测到高水平的针对PRRSV的母源抗体（MDAs）。在这些MDAs中，母源中和抗体（MDNAs）可以在仔猪出生后的前几周内保护哺乳仔猪免受PRRSV感染并防止断奶仔猪发生病毒血症。然而，我们最近证明，MDNAs对3周龄（woa）的仔猪接种PRRSV疫苗有负面影响。在本研究中，MDAs水平高的仔猪在接种疫苗后4周（pv）内疫苗株复制受损，PRRSV抗体和IFNg分泌细胞产生均受到抑制。MDNAs与疫苗接种后免疫反应的干扰表明，在高MDNA水平下接种疫苗的仔猪对PRRSV感染的免疫能力较弱，这可以解释现场观察到的疫苗效力较低。先前的研究报告称，在MDA水平较高的仔猪中接种疫苗对疫苗效力没有影响，但并未考虑中和抗体（NAs）。在本研究中，仔猪在低或高MDNA水平下接种疫苗，并进一步用野生型PRRSV-1进行挑战，以评估MDNAs对PRRSV-1MLV疫苗接种效力的影响。

## 2 材料和方法

**动物选择与实验设计：**实验使用56头（大白猪×兰德瑞猪）\*皮埃蒙特仔猪，这些仔猪来自一个传统繁殖至出栏的猪群，该猪群在生长猪和母猪中无PRRSV循环，但维持母猪PRRS-1 MLV Porcilis PRRS（MSD，Beaucouzé，法国）疫苗接种，以保持猪群有一定的免疫力，防止PRRSV重复引入。在开始研究之前，通过ELISA检查了肥育期末猪的PRRSV感染情况，并通过PCR检查了断奶仔猪的样本池（5头猪）的情况。本研究中使用的仔猪来自4头PRRSV NA效价高的母猪和5头PRRSV NA效价低的母猪。在1周龄时，从仔猪中采集血液，以根据其PRRSV特异性MDNA水平进行分配：A+（高水平，平均NA效价201±73）和A−（低水平，平均NA效价10±5）。在3周龄时，研究仔猪断奶，转移到Ploufragan的Anses 3级生物安全设施，并根据A+/A−状态、体重和性别随机分配（每组8头仔猪）。3周龄仔猪PRRSV感染缺失通过RT-PCR检测5头动物样本池得到确认。随后，MDA的衰减在3周龄后分别评估（A+：平均NA滴度10±5；A−：NA不再可检测）。仔猪在3和4周龄时分别接种疫苗（V+）或不接种疫苗（V−），使用1剂Porcilis PRRS疫苗（MSD，Beaucouzé，法国），通过颈部肌肉注射，使用0.6\*25mm的注射器和针头（疫苗批号A208DB01）。首次疫苗接种后5周（W5pv），一半的仔猪通过鼻腔接种5·105TCID50/头PRRSV-1 Finistere菌株（PRRS-FR-2005-29-24-1），使用无针注射器（每个鼻孔2.5mL）。第二天，相同免疫状态的未接种接触（C）仔猪与接种（I）仔猪在同一栏中混合（每栏2C和2I仔猪）。8头未接种疫苗且未接种的仔猪（4A+和4A−）被分配到对照组。由于MDNA的衰减，在PRRSV接种时，V−和对照组的A+仔猪PRRS抗体水平不可检测（VNT和ELISA测试，数据未显示）。A+和A-之间的相同免疫状态使我们能够将V-组和对照组的A+和A-仔猪的接种后期的结果合并。

血液样本每周从颈静脉采集一次，持续5周，以单独检测病毒血症并监测体液和细胞免疫反应。挑战后，每日记录临床体征，每周采集两次血液，直到动物在第42天接种后（D42pi）安乐死，以单独量化Finistere菌株的病毒血症并评估免疫反应。所有实验均获得法国研究部（项目编号APAFIS#3694-2016012009236491\_v5）授权和国家伦理委员会编号16的批准。

**病毒中和试验：**PRRSV特异性NAs在血清中通过针对疫苗株的MARC145细胞进行量化，如前所述。

**RT-PCR：**在接种PRRSV前，使用Adiavet™PRRS实时RT-PCR试剂盒（Adiagene，Saint-Brieuc，法国）检测了疫苗株基因组。在挑战后，根据Rose等人所述，通过qRT-PCR评估了对Finistere株基因组的特异性检测。

**ELISPOT：**PRRSV特异性IFNγ分泌细胞（IFNγ-SCs）的定量方法如前所述，使用16小时PRRSV刺激4×105PBMCs，感染复数为0.2，无论是疫苗株还是Finistere株。每孔斑点数使用ImmunoSpot S5 UV分析仪（CTL，ShakerHeights，OH，美国）进行计数。

**ELISA：**猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）抗体在血清中通过PRRS X3 Ab ELISA测试（IDEXX 实验室，瑞士利贝费尔德）被检测到。样本与阳性（S/P）比值等于或大于0.4被视为阳性。

**统计分析：**所有数据及曲线下面积（AUCs）在组间使用Kruskal-Wallis检验进行比较（p < 0.05）。随后，使用Holm检验进行事后成对比较，以调整这些比较的p值，根据所进行的测试数量（p < 0.05）。在挑战后随访期间，所有接种动物的血液基因组病毒载量与IFNg-SCs数量之间的关系通过Spearman相关检验进行评估（p < 0.05）。

基于SEIR模型估计传播参数，其中每个个体根据病毒学结果被考虑为易感（未感染）、暴露（未排毒感染）、传染（排毒感染）或清除（保护，不参与传染过程）。潜伏期持续时间和病毒传播率通过贝叶斯推断使用Metropolis-Hastings算法进行估计，如前所述 。通过视觉检查和诊断测试（Gelman-Rubin，autocorrelation，Heidelberger）评估收敛性。

## 3 结果

**MDNAs降低疫苗接种仔猪的PRRS免疫效果：**在W1pv时，疫苗株仅在16只A−V+仔猪中的2只（Fig.2A）中被检测到。因此，在相同条件下，W1pv时进行了第二次疫苗接种。在W2pv时，16只A−V+仔猪中有11只（69%）出现病毒血症，而A+V+仔猪中只有1只（6%）出现病毒血症。A+V+与A−V+之间的差异一直持续到W5pv，A+V+仔猪中病毒血症仔猪的数量比A−V+仔猪少一半（Fig.2A）。在W3pv和W5pv时，A−V+仔猪观察到显著的IFNg反应，而A+V+组中，IFNg-SCs的数量仅在W3pv时显著增加（Fig.2B）。关于血清转化，除了1只之外的所有A−V+仔猪在W5pv时血清中均显示出可检测到的PRRSV抗体水平（Fig.2D），同时，只有16只A+V+仔猪中的7只是血清阳性的（Fig.2C）。

**MDNAs降低挑战性仔猪的PRRS疫苗效力：**PRRSV挑战后，观察到非常轻微的临床症状。未接种疫苗的接种猪（V-I）在挑战后第3、8和9天直肠温度显著升高，与未受挑战的对照组猪相比，但在生长性能方面没有观察到统计学差异（SupplementaryFig.1）。在接种疫苗的接种猪中，无论其MDNA状态（A+V+I和A−V+I），与V-I组相比，直肠温度和生长性能均无显著差异。与V−I动物相比，A−V+I仔猪检测到较低的Finistere 病毒载量（AUC=21.8log10当量TCID50/mL\*周±7.8和53.0log10当量TCID50/mL\*周±4.7，分别；p=0.003），在D10pi时降低100倍（p=0.019）（Fig.3A）。A+V+I组和V−I组之间，或疫苗接种组之间没有观察到差异。平均病毒血症持续时间从V−I的21±6天或A+V+I的21±7天缩短到A−V+I动物的16±9天，但差异不显著。疫苗接种在D7pi时诱导了对Finistere株的早期IFNg反应，两组A−V+和A+V+的小猪均如此（Fig.3B）。尽管在A−V+I小猪中检测到的IFNg-SCs比A+V+I小猪多，但差异并不显著。有趣的是，在D7-D15pi期间考虑所有接种的小猪，可以建立IFNg-SC数量与血清中Finistere株基因组负荷之间的负相关（r=−0.55；p<0.05）。从D30pi开始在小猪中检测到NAs。在D42pi时，6只A−V+I小猪中有8只的NAs滴度可量化（>10），而A+V+I组中有3只，V-I动物中有1只（Supplementary Fig.2）。

**MDNAs损害PRRSV传播的疫苗效力：**在A−V+C接触猪中观察到病毒载量降低，与V-C仔猪相比（AUC=30.3log10当量TCID50/mL\*周±15.5和56.9log10当量TCID50/mL\*周±10.3，分别；p=0.002），但在A+V+C仔猪中并未观察到（Fig.3C）。在D7pi时，Finistere菌株在A−V+C仔猪中尚未检测到，而其他接触组中的首次阳性仔猪在D4pi时被识别（Fig.3D）。与A+V+C组和V–C组相比，A−V+C组的平均病毒载量持续时间缩短至6±3天，分别为12±6天和19±6天。Finistere菌株在所有未接种疫苗的仔猪中都被检测到。在接种疫苗的组中，所有接触动物都感染了病毒，除了一个A+V+C仔猪（Fig.3D）。A+V+C未感染的小猪在疫苗接种后发生了血清转换。将这只异常动物视为对PRRSV感染具有免疫力且在传播过程中不起作用，A+V+组的传播率估计与V−组相当（A+V+组为0.44[0.18;1.76]，V−组为0.32[0.14;0.68]；Table1）。对于A−V+组，估计的传播率降低到0.15[0.07;0.29]。

**首次疫苗接种时存在高IFNa水平：**为了理解在首次疫苗接种后A-仔猪检测到的意外低疫苗病毒血症，本研究（实验B）在W0pv期间收集的血清样本中评估了IFNa水平，并将其与之前研究中（实验A）同一时间收集的样本进行了比较，在之前的研究中，大多数A-动物在疫苗接种后检测到疫苗病毒血症。结果显示，实验B中仔猪的IFNa水平显著高于实验A（Fig.4A）。因此，可以假设疫苗接种时检测到的高IFNa水平与随后低疫苗株检测之间存在关系（Fig.4B）。

## 4讨论

疫苗接种计划几乎无法根除养殖场中PRRSV的传播，而PRRS MLV在实验条件下对仔猪控制PRRSV传播表现出良好的疗效。在先前的研究中，我们证明了MDNAs在疫苗接种后4周内对免疫反应诱导的干扰，表明MDNAs对仔猪疫苗效力的负面影响。为了验证这一假设，对含有低或高MDNA水平的PRRSV-1MLV疫苗接种仔猪进行了野生PRRSV-1菌株的接种。

尽管在本研究中动物需要接种两次疫苗，但在W2pv时，仅在一只A+V+仔猪中检测到疫苗病毒血症，而在11只A−V+仔猪中检测到，这与我们之前的数据一致，并证实了MDNAs对疫苗病毒血症的干扰。这项实验还表明，在MDNAs水平较低的仔猪中，疫苗接种诱导了显著的疫苗接种后体液和细胞免疫反应，这也证实了我们的先前结果。

在本研究中，我们观察到MDNAs对疫苗接种后免疫反应的干扰低于Fablet之前报道的，后者在4周pv期间观察到完全的干扰。这种减少的干扰可能归因于需要给小猪进行两次疫苗接种以及第二次疫苗接种时MDNAs水平的降低。在首次疫苗接种时（3woa），MDNA水平的降低已经很高，但本研究中的平均NA滴度（10±5）与Fablet的研究中的（20±15）相当。尽管在本研究中观察到A+V+和A−V+之间的疫苗接种后差异略有减少，但挑战后的结果首次表明，PRRSV疫苗接种仅在MDNAs水平低的小猪中有效。用于挑战动物的PRRSV-1菌株的低致病性限制了疫苗效力的评估，仅限于病毒学参数。我们先前证明，Porcilis PRRS疫苗可以保护SPF仔猪（无MDA）免受同种低毒力菌株的挑战，降低接种仔猪的病毒血症，显著减少Finistere菌株向仔猪的接触传播。在本研究中，与未接种疫苗的仔猪相比，仅A−V+接种和接触仔猪的挑战菌株病毒载量显著降低。在另一项未发表的研究中，我们也表明，与A+V+动物相比，感染PRRSV菌株的病毒血症在接种后前3周显著降低（Supplementary Fig.3）。在本研究中，疫苗接种后的病毒血症仅在12只A−V+仔猪中的1只检测到，但挑战前未进行第二次疫苗接种，这表明即使在没有疫苗接种病毒血症的情况下，以及在实际应用中实施的常规单次疫苗接种方案下，MDNAs对PRRS疫苗效力的负面影响也发生了。

采用密切相关的方法，Jeong等人评估了PRRSV-2MLV疫苗在1日龄仔猪（具有母源抗体MDAs）中的有效性，但未观察到MDAs的影响。在Jeong的研究中，所有仔猪在疫苗接种时均为MDA+（未包括MDA-组）因此这阻碍了明确评估MDAs对疫苗有效性的影响。同样，Balasch等人最近表明，在MDAs存在的情况下，使用新的PRRSV-1MLV对1日龄仔猪进行疫苗接种可诱导对67天pv的挑战产生部分保护。在Balasch的研究中，在疫苗接种时对仔猪中的NAs进行了量化，但在这里，与未接种MDNAs的仔猪的比较缺失也限制了研究的结论。

MDAs对疫苗效力的干扰在许多其他猪病中已有前例。使用针对猪圆环病毒2型的灭活疫苗，一项比较低或高MDA水平仔猪疫苗效力的类似研究显示，在挑战后22天，与A+V+组相比，A−V+组的PCR阳性动物百分比显著降低。使用针对经典猪瘟的MLV，接种疫苗时MDNA水平高的仔猪在10周大时，有83%死于实验，而所有MDNA水平低的仔猪均从挑战中存活下来。

此外，考虑到接触动物，我们的结果还表明MDNAs降低了PRRS疫苗在病毒传播中的效力。在本研究中，与V-组相比，A−V+仔猪的PRRS疫苗接种将Finistere菌株的传播率降低了两倍。这种效应的大小远低于我们之前在接种疫苗的SPF猪中发现的结果，其传播率降低了十倍，且非MDA。这种差异的一个可能解释是我们之前工作中用于疫苗接种的皮内注射途径（ID）。之前的研究表明，与肌内注射（IM）相比，这种免疫途径在PRRSV暴露后可诱导增强的细胞介导免疫反应，并降低呼吸道的临床评分。皮内免疫后引发的更好免疫反应，尤其是在粘膜部位，可能限制了呼吸道中的病毒复制，从而减少了病毒的排泄和传播。

在Fablet等人研究中，W2pv时在60%的A−V+仔猪中检测到疫苗病毒血症，而本研究中在首次疫苗接种后，只有12.5%的A−V+仔猪检测到。为了探索这些意外结果，我们试图调查在3woa疫苗接种后A−V+仔猪中显示的低疫苗复制率的原因。对疫苗株进行了滴定，但没有发现问题。由于最近研究表明IFNa强烈抑制2型PRRS MLV的复制，我们假设这种细胞因子可能是我们A−V+仔猪中疫苗复制抑制的原因。确实，本研究中在3woa时检测到的仔猪中IFNa的水平远高于我们之前的研究，并且与能够完全抑制PRRS MLV复制的浓度范围相同。为了得出一些初步结论，似乎在野外条件下，IFNa浓度可能会干扰PRRS MLV复制。在没有合适的样本（不是正确的类型或不是在正确的时间收集）进行进一步探索的情况下，我们无法确定这些增加的IFNa水平的原因。然而，这种细胞因子已知是在许多病毒感染（如猪流感或猪呼吸道冠状病毒，）的刺激下产生的，这些病毒感染可能在断奶时感染仔猪，那时它们经常接种PRRSV疫苗。因此，这种潜在的病毒对PRRSMLV疫苗的干扰可能是观察到的PRRS MLV疫苗在野外有限效力的另一个可能解释。

## 结论

我们的研究结果证实，MDNAs会损害PRRS疫苗株的复制和疫苗接种后的免疫反应。此外，我们首次证明，这种受损的免疫反应导致疫苗接种效果降低，这是基于对低致病性PRRSV试验后病毒学参数的评价。使用更具致病性的菌株对动物进行试验可能会进一步引发有关MDNAs高水平存在时疫苗效果降低的临床争议。出人意料的是，我们还发现其他因素，如IFNa，可能会干扰PRRS MLV疫苗接种。需要进一步研究以探索PRRS MLV疫苗可能存在的病毒干扰现象。最后，因此，观察到的PRRS疫苗接种低效可能是由内源性（MDAs）以及外源性（病毒感染）因素共同导致的。

## 致谢

作者感谢VirginieDorenlor、EricEveno和FlorentEono在猪采样中的参与。我们还要感谢SophieMahé和MireilleLeDimna对样本分析的贡献。我们感谢YannBailly和GeraldLeDiguerher在动物护理方面的帮助，以及JenniferRichardson（来自Anses-Inra-ENVA病毒学实验室）提供便利的Elispot阅读器。本研究得到了2015年欧洲PRRS研究奖、“布列塔尼大区委员会”和“布列塔尼肉类生产者集团联合会”的支持。

## 作者贡献

PR分析了样本，解读了结果并起草了手稿。CF参与了实验设计，协调了农场的研究，并进行了统计分析。MA开发了数学模型并参与了数据分析。VN和AL确定了研究农场。FP协调了动物实验。NR参与了研究设计。OB设计了研究，监督了分析，并解读了数据。所有合著者修订了手稿并批准了最终提交版本。

|  |  |
| --- | --- |
| 指导教师  评 语 |  |
| 指导教师（签字）  年 月 日 | |