

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

豬繁殖與呼吸道症候群及假性狂犬病複合疫苗之開發(三)

Development of PRRS and PR Virus Chimeric Vaccine(III)

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-200

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：國立台灣大學獸醫系 賴秀穗 教授

一、中文摘要

本計畫繼續進行已構築完成的 PR-PRRS-ORF3 及 PR-PRRS-ORF5(假性狂犬病-豬繁殖及呼吸道症候群-ORF3 及 ORF5)複合病毒的豬隻免疫效力試驗。本實驗共用 27 頭 5 週齡無 PR 及 PRRS 抗體的仔豬，分成 6 組，前 3 組每組 6 頭分別注射 PR-PRRS-ORF3、PR-PRRS-ORF5 及 PR-PRRS-ORF3 +PR-PRRS-ORF5 各 2ml 的活複合病毒(病毒力價 10^5 TCID₅₀)，其餘 3 組每組有 3 頭分別注射一劑量商用 PR 及 PRRS 活毒疫苗，另外一組 3 頭做為不打疫苗的對照組。所有試驗豬隻在疫苗施打後 4 週，以 PRRS-F1 強毒株($10^{5.5}$ TCID₅₀)以鼻腔接種方式攻擊後，每日記錄體溫變化及觀察臨床症狀。在打疫苗前及後 2、4 週，強毒攻毒前及攻毒後 2、4 週各採取血液供 PRRS 及 PR 的中和抗體測定。試驗結果發現；所有試驗豬在施打複合病毒或商用疫苗後，無任何不正常臨床症狀，而在以 PRRS 強毒攻毒後 PR-PRRS-ORF5 組及 PR-PRRS-ORF3+ PR-PRRS-ORF5 的試驗豬 12 頭均無任何不正常臨床反應，PR-PRRS-ORF3 在攻毒後第 5 天 6 頭中僅有 2 頭的體溫上升到攝氏 40.2-40.5，商用疫苗 PRRS 及 PR 注射組，每組 3 頭中在攻毒後第 6 天各有一頭體溫分別在攝氏 40.1-40.2，而對照組 3 頭中有 2 頭體溫上升到攝氏 40.3-40.5。PR 試驗組 3 頭在攻毒後第 8 天有一頭斃死，經解剖觀察斃死原因應與 PRRS 的攻毒無關。在抗體測定方面，PR 及 PRRS 抗體係以血清中和抗體方法來測定，在施打疫苗前各試驗組豬隻的血清中和抗體力價均小於 2，在施打疫苗後 2 週，不

論是複合病毒試驗組或商用疫苗 PR 及 PRRS 及對照組所測的中和抗體力價均在 2 倍以下。但在施打後 4 週，強毒攻毒前的 PR-PRRS-ORF5、PR-PRRS-ORF3+ PR-PRRS-ORF5 及 PRRS 組的試驗前者 6 頭有 2 頭的抗體均為 2 倍，而 PRRS 組 3 頭有 2 頭的抗體出現 2 倍，另一頭則小於 2 倍。其餘豬隻的 PRRS 抗體均小於 2 倍。但在強毒攻毒後 2 週的 PRRS 的抗體，在 PR-PRRS-ORF5、PR-PRRS-ORF3+ PR-PRRS-ORF5 及 PRRS 組的 PRRS 病毒血清中和抗體力價則有顯著的上升，這三組的試驗豬均可檢測到 PRRS 抗體，其力價介於 2 至 8 倍間，其他組的試驗豬雖在攻毒後 2 週亦無法檢測到 PRRS 的中和抗體。至於 PR 的病毒血清中和抗體在施打疫苗後 2 週，各組的試驗豬均檢測不到 PR 的中和抗體，但在免疫 4 週後，PR-PRRS-ORF3、PR-PRRS-ORF5 及 PR-PRRS-ORF3+ PR-PRRS-ORF5 三組每組 6 頭中各有 2 頭可檢測到 2 倍的抗體。而 PR 商用疫苗免疫組 3 頭中均可檢測到 2-4 倍的抗體，PRRS 注射及對照組的豬隻則無 PR 的抗體，在 PRRS 強毒攻毒後的 PR 抗體並無顯著改變。

Abstract

Constructed chimeric viruses, PR-PRRS-ORF3, PR-PRRS-ORF5, PR-PRRS-ORF3 + PR-PRRS-ORF5 and commercial PR (pseudorabies) and PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome) vaccines were used to vaccinate piglets to test their immunogenicity against PRRS virus. Totally 27 piglets at 5 weeks of age without PR and PRRS

antibody were divided into 6 groups; The first three groups, 6 for each were inoculated with PR-PRRS-ORF3, PR-PRRS-ORF5 and PR-PRRS-ORF3 + PR-PRRS-ORF5 chimeric viruses (10^5 TCID₅₀/ml) respectively. The rest three groups, 3 for each were inoculated with commercial PR and PRRS and PBS respectively, served as positive and negative control group. All piglets were challenged intra nasally with virulent PRRS-F1 virus ($10^{5.5}$ TCID₅₀/ml) at 4 weeks after vaccination. Clinical manifestations and rectal temperature were daily recorded. Blood samples were collected before and 2, 4 weeks after vaccination, before and 2, and 4 weeks after challenge. Clinically all experimental pigs did not show any abnormal signs after vaccination with either constructed chimeric virus or commercial PR and PRRS vaccines. In temperature response, 2 out of 6 of PR-PRRS-ORF3 vaccinated group showed rise in temperature 40.2-40.5 °C at 5 days after challenge. Commercial PR and PRRS vaccines vaccinated group, 1 for each group showed rise in temperature 40.1-40.2 °C at the day 6 after challenge. In negative control group, 2 of 3 had temperature 40.3-40.5 °C. Serologically, all sera collected at pre-vaccinated and 2 weeks after vaccination showed antibody titer less than 2X against PR and PRRS. In PR-PRRS-ORF5, PR-PRRS-ORF3 + PR-PRRS-ORF5 and commercial PRRS vaccine vaccinated groups, 2 out of 6, 2 out of 6 and 2 out of 3 respectively showed antibody titer 2X against PRRS. However, the rest of piglets still showed no antibody activity. Among PR-PRRS-ORF5, PR-PRRS-ORF3 + PR-PRRS-ORF5 and commercial PRRS vaccine vaccinated groups showed significantly rise in antibody titers ranging from 2X to 8X at 2 weeks after challenge with PRRS-F1 virus. Pigs in the rest groups showed no rise in antibody titer at 2 weeks after challenge. In the aspect of PR antibody response, all pigs showed no antibody titer

against PR at 2 weeks after vaccination. However, 2 out of 6 in each group of PR-PRRS-ORF3, PR-PRRS-ORF5 and PR-PRRS-ORF3 + PR-PRRS-ORF5 vaccinated pigs had antibody titer 2X against PR at 4 weeks after vaccination. For the commercial PR vaccine vaccinated pigs, 2 out of 3 had antibody titers 2X-4X against PR at 4 weeks after vaccination. Antibody titers against PR of all vaccinated pigs did not show any significant rise thereafter.

二、緒言

豬生殖與呼吸症候群(porcine reproductive and respiratory syndrome)為一病毒性豬隻傳染病(Wensvoort *et al.*,1991 ; Terpstra *et al.*,1991) , 對於所有年齡的豬隻皆有感受性,本實驗室於1993年從病豬分離到的病毒命名為FI株,並將7個ORF的核酸序列定序,並與美洲與歐洲分離株比較結果發現,本省分離株的核酸序列與美洲株之相似度較高.(Lee, 1996)近年來的研究指出, ORF5 基因所轉譯出的蛋白除了是依賴抗體增強作用(antibody-dependent enhancement, ADE)中主要存在之蛋白(Yoon *et al.*,1995) 外,亦是與中和抗體產生最有關的病毒蛋白(Yoon *et al.*,1995) , 所以 PRRSV 中重要的抗原決定位都與ORF5 基因轉譯之蛋白有關。另外,在比較PRRSV 各分離株間ORF5胺基酸序列之同源性時發現,台灣分離株FI與美國分離株ATCC VR-2332 之ORF5 胺基酸序列同源性雖可達94% , 但與歐洲分離株19% 比較,則同源性僅為56% , 就連與台灣另% 分離株MD-001 比較,同源性也只有82% (李,1996),顯示 PRRSV 各分離株間之抗原性確實是存有差異的,因此會有國外發展之疫苗並不一定適用於台灣的情形出現。在88年度國科會補助計畫中,對台灣分離株FI 之ORF5基因進行表現及轉譯的蛋白做進一步抗原性的研究。該實驗將嘗試以體外轉譯蛋白進行免疫及直接DNA 免疫兩種方式,探討PRRSV 之ORF5 基因轉譯蛋白是否具有誘發宿主產生中和抗體的能力,藉以了解ORF5 基因轉譯之蛋白在台灣分離株FI 抗原性中所扮演的角色,試驗結果FI

株 ORF5 基因表現蛋白及以 ORF5DNA 免疫 BALB/c 鼠後,ORF5 表現蛋白誘發的中和抗體力價很低,而以 ORF5DNA 所誘發者較強。PPRRS 之 ORF3 基因表現的蛋白特性及功能尚未有人報告,本實驗以選殖及表現 ORF5 的模式來分析 ORF3 表現蛋白的特性,瞭解後擬以構築一個 PR 病毒為載體帶有 PRRS,ORF5 及 ORF3 基因的 chimeric virus 以供研製複合病毒疫苗之材料。在本計畫中成功的構築 PR-PPRS-ORF3 及 PR-PPRS-ORF5 的複合病毒,並以雞及韓鼠做免疫試驗發現 PR-PPRS-ORF5 對雞可激發抗 PRRS 病毒的中和抗體,而在韓鼠則未檢測到,因此,本試驗擬進一步在 PRRS 病毒的宿主豬做進一步的免疫效力試驗。

三、材料與方法

本實驗構築的 PR-PPRS-ORF3、PR-PPRS-ORF5 及商用 PRRS 及 PR 疫苗做為免疫用疫苗。本實驗共用 27 頭 5 週齡無 PR 及 PRRS 抗體的仔豬,分成 6 組,前 3 組每組 6 頭分別注射 PR-PPRS-ORF3、PR-PPRS-ORF5 及 PR-PPRS-ORF3+PR-PPRS-ORF5 各 2ml 的活複合病毒(病毒力價 10^5 TCID₅₀),其餘 3 組每組有 3 頭分別注射一劑量商用 PR 及 PRRS 活毒疫苗,另外一組 3 頭做為不打疫苗的對照組。所有試驗豬隻在疫苗施打後 4 週,以 PRRS-F1 強毒株($10^{5.5}$ TCID₅₀)以鼻腔接種方式攻擊後每日記錄體溫變化及觀察臨床症狀。在打疫苗前及後 2、4 週,強毒攻毒前及攻毒後 2、4 週各採取血液供 PRRS 及 PR 的中和血清抗體測定。

四、結果與討論

試驗結果發現;所有試驗豬在施打複合病毒或商用疫苗後,無任何不正常臨床症狀,而在以 PRRS 強毒攻毒後 PR-PPRS-ORF5 組及 PR-PPRS-ORF3+PR-PPRS-ORF5 的試驗豬 12 頭均無任何不正常臨床反應,PR-PPRS-ORF3 在攻毒後第 5 天 6 頭中僅有 2 頭的體溫上升到攝氏 40.2-40.5,商用疫苗 PRRS 及 PR 注射組,每組 3 頭中在攻毒後第 6 天各有一頭體溫分別在攝氏 40.1-40.2,而對照組 3 頭中有 2 頭體溫上升到攝氏 40.3-40.5。PR 試驗組 3 頭在攻毒後第 8 天有一頭斃死,經解剖觀察斃死原因應與

PPRS 的攻毒無關。在抗體測定方面,PR 及 PRRS 抗體係以血清中和抗體方法來測定,在施打疫苗前各試驗組豬隻的血清中和抗體力價均小於 2,亦即無 PR 的 PRRS 的抗體。在施打疫苗後 2 週,不論是複合病毒試驗組或商用疫苗 PR 及 PRRS 及對照組所測的中和抗體力價均在 2 倍以下,換句話說尚測不到中和抗體。但在施打後 4 週,強毒攻毒前的 PR-PPRS-ORF5 及 PRRS 組的試驗前者 6 頭有 2 頭的抗體均為 2 倍,而 PRRS 組 3 頭大亦有 2 頭的抗體出現 2 倍,另一頭則小於 2 倍。其餘豬隻的 PRRS 抗體均小於 2 倍。但在強毒攻毒後 2 週的 PRRS 的抗體,在 PR-PPRS-ORF5 及 PRRS 組的 PRRS 病毒血清中和抗體力價則有顯著的上升,這二組的試驗豬均可檢測到 PRRS 抗體,其力價介於 2 至 8 倍間,其他組的試驗豬雖在攻毒後 2 週亦無法檢測到 PRRS 的中和抗體。至於 PR 的病毒血清中和抗體在施打疫苗後 2 週,各組的試驗豬均檢測不到 PR 的中和抗體,但在免疫 4 週後,PR-PPRS-ORF3、PR-PPRS-ORF5 及 PR-PPRS-ORF3+PR-PPRS-ORF5 三組每組 6 頭中各有 2 頭可檢測到 2 倍的抗體。而 PR 商用疫苗免疫組 3 頭中均可檢測到 2-4 倍的抗體,PPRS 注射及對照組的豬隻則無 PR 的抗體,在 PRRS 強毒攻毒後的 PR 抗體並無顯著改變。

從試驗結果發現,PR 與 PRRS ORF5 構築複合病毒在豬體內方可激發抗 PRRS 病毒的中和抗體,而 PR 與 PRRS ORF3 則否。而 PR-PPRS-ORF3 加上 PR-PPRS-ORF5 對豬的免疫力與單豬施打 PR-PPRS-ORF5 的相較,並無加強作用。因此 PRRS 的 ORF5 基因表現的蛋白確可激發保護作用的中和抗體。在試驗中發現 PRRS 及 PR 的血清中和抗體力價均很低,是該二種病毒的特性。從本試驗結果,PR-PPRS-ORF5 的複合病毒,可以進一步做豬的田間免疫試驗,有發展成商用疫苗可能性。

五、參考文獻

- [1] 李麗芬. 1996. 豬繁殖與呼吸道症候群病毒結構蛋白的定序與分析. 台大獸醫系碩士論文.
- [2] Bohm W, Mer tens T, Schirmbeck R, Reimann J. 1998. Routes of plasmid DNA vaccination

that prime murine humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 16:949-954.

[3] Bourne N, Stanberry LR, Bernstein DI. 1996. DNA immunization against experimental genital herpes simplex virus. *J Infect Dis* 173:800-807.

[4] Galina L, Pijoan C, Sitjar M, Christianson WT, Rossow K, Collins JE. 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* 134:60-64.

[5] Piradeh B, Dea S. 1997. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol* 78:1867-1873.

[6] Pizadeh B, Dea S. 1998b. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 79:989-999.

[7] Suarez P, Doaz-Guerrea M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Neito A, Ortin J. 1996. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 70:2876-2882.

[8] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, ter Laak EA, Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C,

3

van Buiten L, den Besten A, Wagenaar F, Broekhuijsen JM, Moonen PLJM, Zetstra T, de Boer EA, Tibben HJ, de Jong MF, van

Veld P, Groenland GJR, van Genneep JA, Voets MT, Verheijden JHM, Braamskamp J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Quar t* 13:121-130

[9] Yoon KJ, Zimmerman JJ, Swenson SL, McGinley MJ, Eernisse KA, Brevik A, Rhinehart LL, Frey ML, Hill HT, Platt KB. 1995. Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest* 7:305-312.