



第十二章 猪病免疫防制

第一节 猪瘟

猪瘟是由猪瘟病毒引起的一种猪的急性接触性传染病，其特征是高热稽留和细胞血管变性引起的广泛出血，梗塞和坏死等病变。

一、病况与病原概述

本病于1833年首先在美国等地发现，此后遍及世界各大洲。迄今，除芬兰、南非、丹麦、瑞典、冰岛、新西兰、北爱尔兰、澳大利亚、美国 and 英国等20余个国家宣布消灭外，很多国家都存在。在我国，几乎大部分地区均有程度不同的流行，仍是当前猪三大传染病之一。然而，从近年来世界各地猪瘟的流行病学资料分析，本病的流行形式已由频发的大流行变为周期性、波浪式的区域性散发流行；为数甚多的病例表现“温和型”、“非典型”猪瘟症状，死亡率降低，病理变化不典型，以及出现持续感染、胎盘感染、初生仔猪先天性震颤和母猪繁殖障碍等现象。因此，对目前的猪瘟在诊断上必须依赖于实验室检查才能确诊，在免疫预防上必须考虑免疫失败的问题。看来，消灭猪瘟仍然需要实施综合防制措施方能达到目的。

猪瘟病毒，属披盖病毒科、瘟病毒属，直径38~44nm，为一种小RNA病毒。对脂溶剂稳定。胰蛋白酶和磷脂酶等能降低其感染性。脱纤血内的病毒在pH5.0~5.5时最稳定，二甲基亚砷可提高其稳定性。病毒对外界环境较稳定，在-25℃可存活一年以上，在腐败尸体中存活2~3天，在气温较高的环境中经2~3周才丧失感染力。含毒材料在含0.5%石炭酸和50%甘油中在冰箱内可保存数月。对热和干燥抵抗力不强，50℃经3天、37℃经7~15天死亡。生石灰、



草木灰、烧碱、漂白粉和来苏儿等一般消毒药液均能很快杀死。

病毒能在猪肾、脾、骨髓、睾丸、淋巴结、胚胎皮肤细胞和白细胞等原代细胞增殖，除少数毒株外一般不产生细胞病变，往往在细胞连续传代后可减低对猪瘟的毒力，从而培育弱毒株。病毒也可在 PK₁₅ 细胞株复制。

猪瘟病毒在自然条件下不能使其他动物发病。通过家兔连续传代后能适应和增殖，并引起典型热反应，对猪的毒力明显减弱而保有良好的免疫原性。有些国家的猪瘟兔化弱毒株就是通过兔传代致弱培育的，我国育成的兔化弱毒株 C 株（又称 K 株，即中国株）还能在羊肾、牛睾丸等原代细胞增殖，但不产生明显的细胞病变。

病毒存在于病猪的全身组织与体液内，在淋巴结、脾和血液中含有最高，每克（毫升）含有数百万个猪感染量，并自唾液、鼻和眼分泌物、粪、尿排毒。

猪瘟病毒为单一血清型，但用血清中和试验等方法检查出一些血清学变异株。这些血清学变异株毒力较低，主要引起慢性型或非典型猪瘟，对胚胎、胎儿、仔猪最敏感，如美国的 331 毒株。自温和型猪瘟病例分离的毒株毒力比较低，但在回传猪后数代可增强毒力。据美国兽医局的资料，自 1965—1976 年分离的 135 株猪瘟野毒株接种 SPF 猪的结果为：高毒力株占 45%、低毒力株占 27%、无毒力株占 22%，引起持续感染和免疫耐受的占 6%。

猪瘟病毒与牛病毒性腹泻病毒（BVDV）存在共同抗原，猪能感染 BVDV，且可利用抗 BVDV 抗血清中和，为弱毒株，仅能引起慢性型猪瘟；H 群为强毒株，不能被 BVDV 抗血清所中和。以 BVDV 免疫的猪能抗 B 群猪瘟病毒株的攻击，但对 H 群猪瘟病毒株的攻击无保护力。据报道，在日本新分离的 23 株猪瘟病毒中，有 5 株属 H 群；15 株属 B 群；2 株能被猪瘟抗血清和 BVDV 抗血清中和，1 株对两种抗血清反应都很低。由此指出，猪瘟自然毒株的血清学特性是多样的，在血清学检查时应特别慎重。

二、疫苗与免疫

自然康复猪可获坚强免疫力，几乎可以保持终生，其免疫力与中和抗体相一致，以体液免疫为主。免疫母猪可通过初乳将抗体输给仔猪，并使其获得一定的被动免疫力，且可持续 1.5~2 个月。母源抗体对弱毒苗的免疫有一定干扰，7 日龄无母源抗体的仔猪免疫后可获得坚强免疫力，6 个月后攻毒可获 100% 保护；而有母源抗体的仔猪，于 7、30、45 日龄时免疫后 6 个月攻毒，其保护率仅为 50%~75%。



(一) 猪瘟结晶紫疫苗 1948 年 Cole 创造, 1950 年我国加以改进后生产使用。猪皮下注射 1 ml 可获得 80% 以上的保护率, 免疫期 3 ~ 12 个月。注苗后 10 天开始产生免疫, 14 天后就有坚强免疫力, 但抗体产生较缓, 3 周后才达保护性效价, 至 6 周达到最高峰, 重复免疫能产生较高滴度的抗体, 并保持 1 年以上。免疫 3 次以上的母猪, 其后代保护期可达 13 周。

毒种: 猪瘟毒种用猪继代保存, 每继代 2 次后应作 1 次毒力检查。其方法为: 接种 25 ~ 53 kg 敏感猪 3 头, 于 24 ~ 72h 发病, 并有 2 头以上于 16 日内呈急性猪瘟死亡。符合标准者用作制苗种毒。

制造要点: ①选择体重 40 ~ 80kg 健康猪, 皮下注射血毒 1 ml, 隔离饲养观察 6 ~ 8 天。接毒猪应在 24 ~ 72h 出现体温升高并稽留 2 天以上, 以及出现严重的猪瘟临床症状; ②分别无菌采取抗凝血液和有明显猪瘟病变的淋巴结和脾脏, 并用作无菌检验; ③将血液毒按 4: 1 比例加入 0. 25% 结晶紫甘油液 (于 121℃ 45 min 高压灭菌的甘油 100ml, 加入 0. 25g 结晶紫充分溶解), 充分混匀后于 37℃ 作用 120h, 每日振摇 2 次制成血毒灭活苗; ④将淋巴结和脾脏用 5% 石炭酸溶解浸泡 10 ~ 15 min 后用灭菌水冲洗 2 ~ 3 次, 称重后加入适量 PBS 液制成匀浆, 再补加 PBS 液成 25% 浓度, 过滤去除沉渣后以 4: 1 容积比加入 0. 25% 结晶紫甘油液, 37℃ 作用 20h 制成脾淋灭活苗。

质量标准: 除按《成品检验的有关规定》进行检验外, 应作下列检验。

安全检验: 用体重 25 ~ 35 kg 的猪 2 头, 各皮下注射疫苗 3ml, 鸽 1 只肌肉注射 2ml, 小白鼠 2 只各皮下注射 0. 2 ml, 观察 10 天均应健活。

效力检验: 用同一起来源的体重 25 ~ 35 kg 猪 7 头, 4 头注射疫苗 1ml, 免疫后 14 ~ 21 天连同其余 3 头对照猪各注射血毒 1ml, 观察 16 天。依照下列标准进行规定: ①免疫组全部健活, 或仅死亡 1 头, 而其余 3 头 12 ~ 16 天内完全康复, 对照组至少有 2 头死亡, 判为合格; ②免疫组死亡 2 头, 其余 16 天内康复, 或对照死亡 1 头, 可重检 1 次后判定; ③免疫组死亡 3 头以上, 或重检仍不合格者, 可改用皮下注射 3ml 再重检 1 次后判定; ④皮下注射 3ml 重检时, 免疫组死亡 2 头, 其余猪于 16 天内康复; 或对照组死亡 1 头, 可用皮下注射 3ml 再重检 1 次; ⑤皮下注射 3 ml 重检时, 免疫组死亡 3 头以上, 或按④重检时仍不合格时, 判为不合格。

保存与使用: 于 2 ~ 15℃ 保存有效期 1. 5 年。使用时, 用 1 ml 剂量检验合格的疫苗, 对断奶后的猪均可适用, 免疫剂量为皮下注射 2ml 或皮内 1 ml; 对哺



乳期的仔猪间隔 21 天免疫 2 次，或 1 次注射加倍剂量。用 3ml 剂量检验合格的疫苗，仅适用于断奶的猪，使用剂量为 5ml。

(二) 弱毒疫苗 自 1946 年后，很多国家进行了猪瘟弱毒疫苗的研究，并通过动物或细胞培养途径，育成了多种无毒或弱毒疫苗毒株，如 SFA 系兔化弱毒（英国）、GPE-弱毒（日本）、IFA/A₂₂系弱毒（法国）（适应于兔肾细胞的 SFA 系兔化毒）、Viruman 系弱毒（法国）、CL 系弱毒（法国）、适应羔羊肾细胞的中国系兔化弱毒及中国系兔化弱毒（又称 C 系或 K 系兔化弱毒）等，其中中国系兔化弱毒株性状稳定，无残余毒力、不带毒、不排毒、不返强，已被公认为一种比较理想的疫苗毒株。

1. 猪瘟兔化弱毒冻干疫苗

(1) 种毒 猪瘟兔化弱毒株 350 代以上的定型热反应兔的脾淋毒，标准为：

①对兔的最小感染量不低于 10 000 倍稀释 1 ml；②对猪的最小免疫量 1 ml；③仅对家兔产生热反应，不致死家兔；④50 倍稀释 1ml 对健康敏感猪须安全；⑤无菌；⑥湿毒 0~4℃ 保存，不得超过 14 天，-15℃ 以下保存不得超过 6 个月，冻干毒 0~4℃ 保存期 6 个月，-15℃ 以下保存期 2 年，-30℃~-36℃ 可保存 5 年；⑦选用体重 1.5~3 kg、观察 1 个月以上证明体液正常、健康的家兔继代，传代方法与制苗同。

(2) 制苗要点 ①选择经测温、观察表明健康的 1.5~3kg 体重家兔。用 20~50 倍生理盐水稀释的脾乳剂，脾淋乳剂或冻干种毒，静脉注射 1 ml，定期测定体温，选择定型热反应兔（潜伏期 24~48h）体温上升呈明显曲线，超过常温 1℃ 以上至少有 3 个温次并稽留 8~36 h 和轻热反应兔（潜伏期 24~72 h，体温上升有一定曲线、超过常温 0.5℃ 以上至少有 2 个温次，稽留 12~36h），并在其体温下降到常温后 24h 内剖杀；②在无菌条件下采取脾脏和淋巴结供制造脾淋苗用。采取脾、淋巴结、肝、肺（有严重病变者不能采集），去除脂肪、结缔组织韧带、血管、肥囊及病灶部，供生产混合苗用；③制造混合苗时，肝脏用量不超过淋脾重量的 2 倍，将组织称重后剪碎，加入适量 5% 蔗糖脱脂乳保护剂，混合研磨后去除残渣，按实际滤过的组织液计算稀释倍数加入余量保护剂为原苗。每毫升原苗可加青、链霉素各 500~1 000IU，摇匀后置 4℃ 作用一定时间后即可分装、冻干。

(3) 质量标准 疫苗除应按《成品检验的有关规定》进行检验外，尚需作安全检验和效力检验。



安全检验：①用10倍稀释疫苗，皮下注射18~22g小白鼠2只，各0.2 ml；肌肉注射豚鼠（350~400g）2只，各1 ml，观察10天，应全部健活，并无严重局部反应为合格。如有个别死亡或有严重局部反应，可重检1次，若仍不安全时，判为不合格；②用猪作检验时，选择健康敏感猪4头，经5~7天临床观察和每日2次体温测定，体温、精神、及食欲均应正常。用10倍稀释的疫苗肌肉注射5 ml/只，注苗后每日测体温2次，观察21天，体温、精神、食欲与注苗前相比无明显变化；或体温升高超过0.5℃，但不超过1℃，稽留不超过2天；或减食不超过1天时，疫苗可判为合格；如有1头猪的反应超过上述标准，或出现可疑的其他体温反应和其他异常现象，可重检1次。重检的猪仍出现同样反应，则判为不合格。有条件者也可在猪高温期采血复检猪2头，每头肌肉注射可疑猪原血5 ml，如均无反应，可判为合格。如第1次检验结果已确证疫苗不安全则不应进行重检。

效力检验：用兔作效检，按组织量稀释10 000倍或5 000倍，耳静脉接种家兔2只，1 ml/只，接种后除2只均呈定型热反应或1只定型热反应、1只轻热反应可判为合格外，其余情况均应在注苗后7~10天攻毒（用淋脾毒），并加对照兔2只，攻毒剂量为50~100倍乳剂，每兔耳静脉注射1 ml。

用猪效检，将疫苗作5 000和10 000倍两个稀释度，分别用2头健康敏感猪肌肉注射，1 ml/头，10~14天连同对照猪3头，注射血毒1 ml，观察16天。对照猪至少有2头死亡于猪瘟，免疫猪健活，或略有体温反应，但无猪瘟临床症状者判为合格。免疫猪死一头，则该稀释度判为不合格。

保存与使用：于-15℃保存期一年，0~8℃保存期6个月。使用时大小猪一律肌肉或皮下注射1 ml，注苗后4天，即可产生坚强的免疫力，断奶仔猪免疫期1.5年。未断奶乳猪必须在断奶后再免疫一次，怀孕母猪也可使用。

2. 猪瘟兔化弱毒乳兔组织冻干苗 自20世纪60年代中期研制成功，一直沿用至今。

（1）种毒 同猪瘟兔化弱毒冻干苗。

（2）制苗要点 选择3~5日龄营养良好的健康乳兔；用20~40倍稀释的新鲜兔种毒脾乳剂，每侧臂部肌肉注射各1 ml，36~40h后冻死；将乳兔体表冲洗后，于5%石炭酸液中浸泡15~20min，然后在无菌下采取心、肝（剔除胆囊）、脾、肾、肌肉（带骨髓）等含毒组织，用5%蔗糖脱脂乳制成混悬液，滤去残渣后按实际组织滤液量补足保护剂，加入青、链霉素各800~1 000 μg/ml充分混



匀，放 0~4℃ 处理一定时间后分装冻干。

(3) 质量标准 同猪瘟兔化冻干弱毒苗，使用时疫苗的毒价和对猪的最小免疫量约为 10^{-4} /ml，按每头份不少于 150 个最小免疫量，即比猪瘟兔化弱毒冻干苗增加 50% 的含量组织的剂量使用。

3. 猪瘟兔化弱毒牛体反应冻干疫苗

(1) 种毒 同猪瘟兔化弱毒冻干苗。

(2) 制苗要点 选择 1~2 岁健康小牛；用 10 倍稀释的新鲜淋脾种毒，静脉注射，10~20ml/头；观察 5~6 天，应无明显体温反应及临床症状。于接种后第 3 天，静脉采取抗凝血，作 10 000 倍稀释后静脉接种家兔 2~3 只，1 ml/只，应有 1 只以上兔产生定型热反应，或 2 只以上轻热反应；于接种后 5~6 天，无菌采取全身淋巴结及脾脏，并作无菌检验，-15℃ 保存；按 1 份脾淋组织加 5 份 5% 蔗糖脱乳制成混悬再加入青、链霉素各 500~1 000 μg/ml，混匀后分装冻干。

(3) 质量标准、保存与使用：同猪瘟兔化弱毒冻干苗。

4. 猪瘟兔化弱毒细胞冻干疫苗 1973 年，我国曾将猪瘟弱毒种适应于仔猪肾原代细胞制成猪瘟兔化弱毒细胞培养苗，并投入生产使用。由于兔化毒在肾原代细胞不断复制后稀释至培养液中，而不致细胞病变，故可连续收获至细胞衰老，从而提高了产量、质量和降低了成本。然而猪肾原代细胞苗也存在着隐性带毒的危险。20 世纪 80 年代初，我国又相继研制成功了猪瘟兔化弱毒绵羊肾细胞苗、奶山羊肾细胞苗及犊牛睾丸细胞苗。其中犊牛睾丸细胞培养兔化弱毒，收毒 6~7 次，毒价仍可达 10 万倍。

(1) 猪瘟兔化弱毒猪肾细胞冻干疫苗

种毒：同猪瘟兔化弱毒冻干苗

制造要点：①制备仔猪肾原代细胞，用 14 日龄健康仔猪，放血致死后无菌取出肾脏（同时取出脾脏制成混合乳剂供中间检验用），剪碎后用 0.25% 胰酶消化分散细胞，加入营养液适量（含 10% 犊牛血清及青、链霉素各 100 μg 的水解乳蛋白，pH7.2），使每毫升细胞数约为 80 万~100 万，置 6~8r/h（或 12.5 r/h）转速的转瓶机上进行转瓶培养（在分装转瓶的同时，将细胞悬液分装于装有盖玻片的细胞培养瓶中，静止培养，供荧光抗体检验用），一般 72~96h 即可形成致密单层；②接毒、收获、换液。于形成细胞单层瓶内换入维持液（含 8%~10% 马血清或 5%~10% 小牛血清及 10% TPB 的水解乳蛋白或 MEM 营养液，pH7.4），然后接在 1:50 000 以上的 1% 脾种毒（或 3%~4% 毒价达 1:



50 000 以上的细胞毒或毒价均在 1: 50 000 以上的 1% 脾毒和 3% 细胞毒), 并设空白对照, 37℃ 培养 (作中间荧光抗体检测的细胞瓶接毒同前), 每隔四天, 收获液 1 次, 共收获 4~5 次 (空白细胞仅收集 2 次, 供中间检测用), 单独保存, 并作无菌检验和毒价测定; ③配苗、分装和冻干。将毒价达 1: 50 000 以上的无菌病毒液与 5% 蔗糖脱脂乳按 1: 4 比例混合, 加入青、链霉素各 500~100 μg/ml, 充分摇匀后分装、冻干。

质量标准: ①中间监测: a. 血清中 BVDV 抗体检测 (中和试验): 取被检血清与 10^{-1} ~ 10^{-8} 倍梯度稀释的 BVDV 抗原, 37℃ 作用 1 h 后接种于牛甲骨二倍体细胞 (BT) 或牛肾原代 (次代) 细胞单层, 37℃ 吸附 2h 后加入维持液 (含 5%~10% 小牛血清和 10% 的 TPB 的 MEM 液), 并设阴阳对照, 37℃ 培养 6 天, 观察 CPE。阴性血清对照应全部出现 CPE, 阳性血清对照瓶应全部无 CPE。被检血清原液能中和 50% 以上细胞培养物不出现 CPE 为 BVDV 阳性。细胞培养用血清 BVDV 应阴性。b. 细胞外源毒污染检测, 空白细胞应无 CPE; 用 0.5% 豚鼠红细胞试验应为阴性; 细胞培养物接种 Vero 细胞单层, 37℃ 14 天, 应不出现 CPE; 10 倍稀释的仔猪脾混合乳剂和空白细胞 2 次收获液分别肌肉注射 2 只兔, 4ml/只, 测温观察 7~10 天再静脉攻击 50~100 倍新鲜兔脾毒 (1 ml/只), 至少有 1 只兔出现定型热反应为合格; 荧光抗体检验, 将细胞盖玻片洗涤凉干, 封片镜检, 胞浆胞核内应无黄绿色荧光。c. 配苗用病毒培养液检验, 无菌检验应无细菌、霉形体和支原体; 安全检验, 将各批次病毒液混合后肌肉注射健康敏感断奶猪 2 头, 5 ml/头, 其观察时间和判定标准同猪瘟兔化弱毒苗安全检验; 效力检验, 将各收次毒液样品混合用灭菌生理盐水稀释至 5 和 10 万倍, 肌肉注射体重 1.5~2kg 健康敏感家兔, 1 ml/只, 测温观察 3 天, 健康者再静脉注射攻毒, 并按猪瘟兔化弱毒苗效力检验判定标准进行判定, 合格者即可配苗; ②疫苗检验: 除按《成品检验的有关规定》外, 需进行安全检验和效力检验, 其方法同猪瘟兔化弱毒苗。

保存与使用: 同猪瘟兔化弱毒苗。注射疫苗时应注意; 注射疫苗前后 1 周, 应避免任何变化和应激因素的影响, 如断奶、运输等, 以免影响免疫力的形成。种公猪配种前 3 周、母猪配种前 2 周和产仔前 4 周及产仔后 1 周暂时不注射疫苗。免疫母猪所产仔猪哺乳期和断奶后 1 周均不注苗。

(2) 猪瘟兔化弱毒犍牛睾丸细胞冻干疫苗

种毒: 同猪瘟兔化弱毒冻干苗。



制苗要点：①犊牛睾丸细胞单层的制备：选择非猪瘟疫区的和无口蹄疫的1~2日龄小公牛、剖杀后消毒睾丸组织体表，无菌手术采取睾丸并放入含1000 μ g/ml青、链霉素的Hank's液中浸泡30~40min，去除被膜和附睾，将睾丸剪碎后加入Hank's液反复洗涤，再用5~8倍量0.25%胰酶液消化处理（37℃50min，每隔10min轻摇1次）。消化完毕后去除胰酶，加入少量水解乳蛋白营养液，吹打分散细胞，再加入适量营养液混匀，用两层纱布过滤，收取细胞悬液，分装于培养瓶中内，37℃转瓶培养，转速12r/h，72~120h细胞即可长成致密单层。为提高疫苗产量，减少制苗用材料，可用胰酶-EDTA液消化转代2次，2次传代间隔时间为4~5天，并留取次代细胞供中间监测用（于加盖玻片的培养瓶中静止培养）；②接毒、收获、换液：同猪瘟兔化弱毒猪肾细胞冻干苗。但收获次数可达6~7次；③配苗、分装、冻干：同猪瘟兔化弱毒猪肾细胞冻干苗。

质量标准：保存与使用：同猪瘟兔化弱毒猪肾细胞冻干苗。

三、治疗与抗病血清

发病早期使用抗猪瘟血清具有良好的治疗效果，也可用于紧急预防。

抗猪瘟血清制造要点如下。

（一）免疫 ①选择体重60kg以上健康猪，使用前隔离观察7天以上；②先用猪瘟疫苗作基础免疫，10~20天后进行高度免疫；③免疫程序：第1次肌肉注射猪瘟强毒血毒抗原100ml，10天后2次注射血毒抗原200ml，10天后第3次肌肉注射血毒抗原300ml，分别再过9~11天和12~16天后按每公斤体重采血10~11ml和8~10ml测定抗体效价，第2次采血后2~3天再注射血毒抗原300ml，再经10天左右重复间隔采血，注射抗原1次，如不剖杀放血，可定期采血，并注射抗原（1.5~2ml/kg体重），但从免疫完成到最后放血以不超过12个月为宜。此外，也可将猪瘟康复猪注射血毒抗原后10~14天、或经基础免疫后7~10天猪再大剂量注射猪瘟病猪组抗原（5ml/kg体重）后16天采血；④分离血清，加入0.5%石炭酸防腐，分装后冷藏保存。

（二）质量标准 除按《成品检验的有关规定》进行检验外，需进行如下检验，①安全检验：2只18~22g小白鼠，皮下注射0.5ml/只；1只家兔，皮下注射10ml；1只豚鼠，皮下注射3ml，观察10天均应健活；②效力检验：体重25~40kg无母源抗体猪7头2组，第1组4头，注射血清0.5ml/kg体重，同时注射猪瘟血清1ml，第2组3头注射血毒，1ml/头，24~72h后第2组猪发病，并于16天内2头以上死亡，而第1组猪10~16天内至少健活3头时，血清判为



合格。如第1组死亡2头或2组不死亡或仅死亡1头时应重检。第1组死亡3头时判为不合格。

(三) 保存与使用 2~15℃保存期3年。使用时, 预防剂量为: 8kg以下小猪15ml, 8~15kg猪15~20ml, 16~30kg猪20~30ml, 30~45kg猪30~45ml, 45~60kg猪45~60ml, 60~80kg猪60~75ml, 80kg以上猪75~100ml; 治疗量加倍。

第二节 伪狂犬病

一、病况与病原概述

猪伪狂犬病又名奥叶兹基病, 是伪狂犬病毒引起的多种家畜、禽类及野生动物感染的一种急性传染病, 其特征为发热、奇痒及脑脊髓炎的症状。猪常为隐性感染, 可有流产、死胎及呼吸系统症状, 新生仔猪除神经症状外还可侵害消化系统。

伪狂犬病病毒属疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科猪疱疹病毒I型。直径150~180nm, 正20面体对称, 有囊膜, 核酸为线状双股DNA。仅有一个血清型, 不同毒株存在着毒力差异, 表现在对胰蛋白酶的抵抗力和形成多核巨细胞的能力不同。在抗原性上, 补体结合反应与人疱疹病毒I型、马疱疹病毒I型有交叉, 在荧光抗体反应中与人疱疹病毒I型、禽疱疹病毒II型有交叉。

病毒能在鸡胚CAM上生长, 并产生白色斑和出血, 鸡胚于接种后第4天死亡, 也可经卵黄囊或鸡胚脑内接种感染。病毒可在鸡胚成纤维细胞, 猪、绵羊、牛、兔、犬、猫、猴和马等肾原代细胞, 猪、牛睾丸原代细胞以及Hela、Hep₂、PK₁₅、BHK₂₁等传代细胞上增殖。猪、兔、犬肾细胞和鸡胚成纤维细胞最敏感, 感染后细胞出现以变圆和形成多核巨细胞为特征的细胞病变, 并可出现蚀斑, 毒力低的毒株产生较大的蚀斑, 此外, 还可以形成核内包涵体。

病毒60℃可存活30min、70℃可存活10~15min、80℃存活3min, 100℃迅速死亡。在干草中夏季存活30天, 冬季存活40天。冻干毒可存活2年。脾脏组织冻存可达160天左右, 在0.5%石炭酸作用下, 在32天内仍能保持毒力。0.1%升汞能立即杀死病毒。在0.5%盐酸或硫酸中能存活3min, 3%来苏儿溶液中存活30min, 20%甲醛中能存活20min, 纯乙醇中存活30min, 紫外线照射1



min 可灭活，在 50% 甘油中可存活 154 天而不损失毒价。

自 Aujesky (1902 年) 首先发现伪狂犬病以来，本病在世界 44 个国家发生，在前苏联、美国、法国、西德、丹麦和日本国家有人曾使用灭活苗、弱毒苗后仍不能消灭。在我国，刘永纯 (1948) 首次报道猫伪狂犬病以来，已在 18 个省发生过，近几年来疫情还在不断扩大。台湾于 1971 年发现，目前也未能控制，在进出口贸易中每年因该病损失达 40 亿元。袁庆志 (1986) 等发现妊娠母猪感染后常发生死胎和流产，成年猪感染后多呈一过性而耐过，但体内长期带毒和排毒，成为本病的主要传染源。牛、羊、犬、猫和驯养野生动物感染多是由于与病猪直接或间接接触或喂饲病死猪的残体引起的。幼龄哺乳仔猪、牛、羊最易感染，发病率和死亡率都很高。

该病的暴发流行与啮齿类活动有密切关系，鼠类很容易但常呈隐性感染而成为传播媒介。猪可通过消化道、呼吸道和皮肤创伤而感染。本病毒宿主谱非常广，包括鸟类在内的所有恒温动物均可感染，人也偶有感染的报道。

二、疫苗与免疫

猪口腔或鼻腔感染病毒后 18h 即可出现在嗅上皮和扁桃体，随后沿脑神经传递，24h 出现在嗅球和桥脑，随后病毒扩到大脑的各个中枢。病毒主要沿神经传递，血液也可起转移病毒作用。有明显临床症状时，病毒主要存在于大脑、小脑、延髓、颈部脊髓、视神经、嗅球、三叉神经，此外，鼻甲骨、扁桃体、肺、咽淋巴结及唾液腺亦有病毒。隐性感染的猪可在外周传导神经节和中枢神经系统的神经原中终生带毒。Sabo 等 (1976) 证明，人工感染猪在接毒后 160 天和 180 天，可通过组织培养分离法由扁桃体、颈淋巴结、鼻黏膜和三叉神经节中分离到病毒。

据 Bavies (1980) 报道，隐性感染猪在恶劣条件可发生潜伏病毒的再活化，向外排毒，虽然血清中和抗体关系不大。用弱毒冻干苗免疫绵羊，在有效免疫期不论血清中和抗体有无，均能抵抗 1 000 个以内致死量强毒的攻击。由此可见，在本病免疫中，体液免疫和细胞免疫可能兼而有之，且均很重要。

用于免疫预防的疫苗有灭活苗、弱毒苗和亚单位苗，而且在野外试验中取得了较好的效果。在初发地区的猪场效果较好，但应用后并不能阻止排毒传染。

(一) 伪狂犬病细胞培养灭活疫苗 自 Solomkin 等 (1955) 报道灭活苗具有良好效果以来，曾用甲醛、戊二醛、氯丙环、乙烯亚胺和 β 丙内脂等灭活剂制血灭活苗。国内用 闵 A 株伪狂犬病强毒接种鸡胚成纤维细胞制造的灭活苗也具



有良好的免疫效果，现介绍如下。

种毒：闵 A 株，在地鼠肾、兔肾细胞培养毒价（ $TCID_{50}$ ）应不低于 10^{-6} ，对家兔或山羊的 LD_{50} 应不低于 10^{-6} 。

疫苗制造：种毒 1：100 稀释后接种鸡胚纤维细胞或地鼠肾原代细胞单层， 37°C 培养 24 ~ 48h，CPE 达 75% 以上收获病毒液。按 2 份病毒液加入 5 份 2% 氢氧化铝磷酸盐缓冲液（pH7.2 ~ 7.4）的比例混匀，用 20% 氢氧化钠液调 pH 至 7.2 ~ 7.4 加入 0.15% 福尔马林，摇匀，置 $4 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 灭活 7 天，其间振摇数次，即成疫苗。

质量标准：除按《成品检验的有关规定》进行检验外，应作安全检验。

安全检验：取 1.5 ~ 2.0kg 健康家兔 2 只，每只臀部皮下注射 5ml，观察 15 天均应健活。

保存与使用：疫苗 $2 \sim 15^{\circ}\text{C}$ 冷暗保存，有效期 2 年。使用时，均为颈部皮下注射，成年牛 10ml，犊牛 8ml，山羊 5 ml。牛的免疫期 1 年，山羊为 6 个月。

（二）伪狂犬病活疫苗 目前育成的弱毒株很多，如匈牙利的 Barth- k_{61} 株，罗马尼亚的布加勒斯特株，捷克等国自布勒斯株育成的 Tk₂₀₀ 株、Buk 株和 Tk₉₀₀ 株，北爱尔兰的 NIA₄ 株，保加利亚的 MIK₂₅ 株，原苏联的 VGNKLI 株，法国的 Alfort₂₆ 株，南斯拉夫的 B-kal₆₈ 株和 Govacc 株等。Barth- k_{61} 株和布加勒斯特株已在欧美国家作为疫苗株生产疫苗应用。就毒力而言，Barth- k_{61} 株比布加勒斯特株毒力弱，但两者均有良好的免疫效果，无明显差别。我国利用引进的 Barth- k_{61} 弱毒株已研制成伪狂犬病弱毒冻干苗，现简介如下。

种毒：Barth- k_{61} 弱毒株，首先在乳兔肾原代细胞培养 1 ~ 2 代复壮，挑选 1 ~ 2 mm 小蚀斑病毒培养物用作制苗种子液。

疫苗制造：种毒按 1：100 接种鸡胚成纤维细胞单层， 37°C 培养 24 ~ 48h，CPE 达 75% 以上时收获病毒液。取鸡胚成纤维细胞病毒液 7 份加保护剂（40g 蔗糖、8g 明胶加入 10ml 去离子水）1 份，混匀后分装冻干制成冻干疫苗。用鸡胚成纤维细胞测定疫苗毒价应 $\geq 10^4 TCID_{50}/\text{ml}$ 。

质量标准：除按《成品检验的有关规定》进行检验外，应作如下检验。

安全检验：将冻干苗用中性 PBS7 倍稀释，肌肉注射 6 ~ 18 月龄血清阴性的绵羊 2 只，每只 5 ml，观察 2 周应健活。

效力检验：冻干苗用 PBS 溶化后稀释成 10^{-3} ，肌肉注射 6 ~ 18 月龄血清阴性的绵羊 3 只，每只 1 ml，观察 2 周后，与同源对照绵羊 3 只同时攻击 1 000 个



致死量的强毒。注射疫苗羊应全保护，对照羊应全死亡或2/3发病死亡。

保存与使用：疫苗4℃保存。使用时，用PBS稀释，肌肉乳猪注射。乳猪第1次注射0.5 ml，断奶后再注射1.0 ml，3月龄以上仔猪和架子猪注射1.0 ml，成年猪和妊娠母猪（产前1个月）注射2.0 ml。本苗在注射后6天产生免疫力，免疫期1年。仅限用于疫区和受威胁地区。

第三节 口 蹄 疫

一、病况与病原概述

本病是由口蹄疫病毒所引起偶蹄类哺乳动物（包括野生动物）的急性、高接触性传染病。其特征是发热、皮肤黏膜形成水泡，特别以口唇和蹄部的水泡病变最为明显而得名。该病传播方式为接触传染，或经空气传播，呼吸道和消化道是重要的侵入门户。处于潜伏期患牛的乳汁和精液中就有病毒存在。病变处含有大量病毒，随着水泡的破裂而污染环境。此外，可混于唾液、呼出的气中形成飞沫而传播，因此，风速和风向是确定空气传播速度的重要因素。

口蹄疫是典型国际流行病，常常是通过家畜、畜产品（肉、乳、毛皮等）为媒介而引起国际间的流行。

1897年德国学者Loeffler和Froch证明口蹄疫的病原体为滤过性病毒。该病毒分类为微核糖核酸病毒科，口蹄疫病毒属。病毒粒子近似球形，直径20~25 nm，衣壳为20面体对称，由32个壳粒组成，无囊膜，中心为单股正RNA。口蹄疫病毒有4种主要的衣壳多肽，即VP₁、VP₂、VP₃和VP₄，其分子量依次为34、30、26、8kD。此外，还有多肽VP₀，分子量是40kD，认为是VP₂和VP₄的前体。VP₁、VP₂和VP₃组成衣壳蛋白亚单位。一个蛋白亚单位构成病毒粒子20面体的一面。VP₄与RNA紧密结合，是病毒粒子的内部成分。在4种衣壳多肽中，惟有VP₁能使动物产生中和抗体。在同一细胞培养物中常有4种颗粒：①完整成熟的病毒粒子，有核糖核酸和蛋白质衣壳，沉降系数140S，具有感染性、抗原性、型特异性和免疫原性，亦能诱发中和、沉淀等抗体；②中空的病毒粒子，没有核酸，只有完整的蛋白质衣壳，沉降系数75S，没有致病力，但有抗原性、型特异性和免疫原性，亦能诱发中和、沉淀等抗体；③衣壳微体，系蛋白质衣壳裂解形成的，沉降系数12S，无核酸，无致病力，具有抗原性；④病毒感染



相关抗原，沉淀系数 4.5S，是由于病毒感染动物机体或细胞培养物而形成的一种非结构性的病毒特异性蛋白质，是病毒的一种不具活性的 RNA 聚合酶，能诱发 VIA 抗体，无型的特异性，VIA 抗原对各型口蹄疫病毒的抗体都呈现反应。过去认为只有活病毒感染后，才能产生 VIA 抗体，注射灭活苗不产生 VIA 抗体，故以 VIA 琼脂扩散试验当做口蹄疫检疫的重要手段。但 Sanger (1966) 发现接种灭活苗血清中亦可检出 VIA 抗体，只是其量甚微。

口蹄疫病毒有 O、A、C、SAT₁、SAT₂、SAT₃ 和 Asia-I 型等 7 个主型，共包括 65 个亚型。

口蹄疫病毒极易发生变异，因此，几乎每年都有新的亚型报道。口蹄疫病毒各主型之间不能交叉免疫，同一主型内的各亚型间交叉免疫力也较微弱。

病毒对热敏感，70℃ 加热 15 s 被灭活；对酸也敏感，pH6.5 以下易灭活，pH3.0 时瞬间死亡，因此，对于乳、肉类可使其微量产酸而自身杀毒；碱类也能将其迅速杀灭。病毒耐低温、干燥，可长期保持感染力。

口蹄疫病毒能在乳鼠、乳地鼠、大鼠、家兔、猫、豚鼠、鸡胚以及组织培养物中繁殖。

二、疫苗与免疫

动物感染口蹄疫耐过后，可产生坚强免疫力，初期抗体为 IgM，开始出现于感染后的第 9 天；IgG 抗体出现于感染后 10~14 天。这两种免疫球蛋白都有明显的中和及抗感染作用。在实验情况下，一次免疫后，免疫力持续 6~8 个月，有人报道，最长为 18 个月。抗体可以通过初乳给仔畜。

人工免疫包括弱毒疫苗和灭活苗两种。疫苗接种对牛具有较好的保护力，但猪的免疫力的产生远比牛困难。用于猪的口蹄疫疫苗，特别是灭活苗中的含毒量必须比牛大 3~10 倍，且应加有佐剂。

由于口蹄疫流行所造成的巨大经济损失和防治中存在的问题，多年来，一直促使人们研究安全性好、免疫力高的疫苗。国内外有大量的研制疫苗的资料。过去按疫苗所含病毒（抗原）的死活，分为灭活苗和活毒（弱毒）苗两类。如按制苗材料的来源则可区分为动物组织苗和细胞苗。结合现在发展起来的疫苗制造技术水平，有学者将其划分为 4 个发展阶段，也就是四代疫苗。第一代疫苗即宿主动物病损组织苗，第二代疫苗是实验动物含毒组织苗，第三代疫苗是组织培养——细胞苗，第四代疫苗是病毒蛋白亚单位或基因工程苗。



(一) 第一代疫苗 制苗材料采用人工接种发病牛的舌水疱皮, 最早是与抗血清共同注射。1926 年 Waldmann 和 Koke 在德国首创甲醛溶液灭活苗。1938 年 Schmidt 加佐剂氢氧化铝胶做成吸附疫苗, 提高了疫苗的效力, 20 世纪 30 ~ 40 年代曾广泛用于欧洲, 常称 Waldmann Schmidt 疫苗。1948 年法国 Girard 等在疫苗中加入 20% 甘油, 使其在 -15°C 中不致结冻受损, 将疫苗质量又提高了一步。

(二) 第二代疫苗 是将病毒接种于敏感的实验动物, 主要是吮乳幼鼠或乳兔, 采其含毒组织来制造灭活苗。我国程绍迥等也曾于 20 世纪 70 年代初研制出乳兔组织 AEI (乙酰基乙烯亚胺) 灭活苗。不少学者则是通过实验动物的连续继代, 将其毒力减弱制备弱毒疫苗。如 Negel (1937) 将病毒接种于成年鼠脑内, 证明可以致弱。Rohrer 和 Hofmann (1944) 用嗜神经毒株通过豚鼠致弱, 对猪产生免疫力。1966 年我国用一株鼠化弱毒 (A 型) 通过成鼠脑内 100 余代后, 对犊牛和架子猪仅引起较轻反应并产生免疫力。1948 年 Traub 和 Schneider 将豚鼠毒转接于鸡胚, Gillespie (1954) 和 Komorov (1957) 将牛源毒适应于鸡胚和 1 日龄雏鸡, 曾发表致弱株的初步应用报告。1959 年 Cunha 和 Eichhorn 也在兔体传代获得成功。

我国在 20 世纪 50 年代, 陈家庆等用吮乳幼鼠继代牛源强毒, 育成了 O 型弱毒株; 龚成润等育成了 A 型弱毒株, 并再适应于吮乳幼兔, 制成乳兔组织弱毒疫苗; 赖天才等则研制成了 LB 型 (即亚洲 1 型) 弱毒疫苗。20 世纪 70 年代龚成润和程文运等研究了 A 型和 O 型鸡胚化弱毒株; 陆仿舆等研究了猪 O 型雏鸡化弱毒株; 郑锦兰等研究了猪 O 型鼠化弱毒鸭胚反应苗。

第二次世界大战后, 不少病毒性弱毒疫苗的研制成功, 掀起了口蹄疫弱毒苗研究的热潮, 国内外兽医工作者在猫、犬、仓鼠、大鼠、犏狓等动物中都进行过人工感染。1959 年的第 16 届国际兽医会议上发表的论文, 大约有 20 株口蹄疫弱毒方面的研制成功报道。但是, 口蹄疫的多型性、易变性, 往往导致所研制的弱毒疫苗对一种宿主动物表现为弱毒, 而对另一种宿主动物却可以引起发病, 甚至对不同应激状态的同种动物, 反应程度也差异悬殊, 致使弱毒苗在使用中常常出现一些严重反应或死亡。苏丹曾用弱毒苗试验对动物没有反应但能免疫, 但是 1965 年以色列用这种疫苗却造成口蹄疫的暴发, 并使高产奶牛广泛发生病毒性乳腺炎而报废; 肯尼亚用此苗则引起小牛发生心肌炎而导致死亡。巴西用 C 型弱毒苗对牛安全有效, 但对猪则反应重、死亡率高, 且免疫牛排毒并能感染猪。1964 年欧洲口蹄疫防治委员会决定, 欧洲国家不用弱毒苗免疫, 且对使用弱毒



苗的国家限制其易感家畜的进口。1979 年国际兽疫局 (OIE) 30 届大会限定使用活苗的国家只能向使用活苗免疫的国家出口易感家畜。

弱毒苗的优点是价廉, 便于制造, 其弱点是难以获得一株对各种动物均致弱安全, 且对亚型也具保护力的毒株。加之注射弱毒苗引起动物的病毒血症, 使之长期带毒、排毒, 因而存在病毒返祖的潜伏危险。且培育弱毒制苗其研制时间约需 3 年, 如野毒毒型发生变化, 又得耗时重新培育, 而灭活苗用异型毒株, 数月即可制出疫苗, 故 20 世纪 60 年代以来各国都致力于灭活苗的研究。

(三) 第三代疫苗 即采用体外组织培养繁殖病毒制苗, 其真正发展在于用抗生素来控制污染之后。早期, 1947 年丹麦 Frenkel 首创用牛舌上皮碎片培养病毒, 制成灭活苗, 在丹麦广泛使用。Calloway (英国)、Uberfini (意大利) 等都曾研究此种疫苗。但牛舌上皮并未增殖, 严格说这还不是真正的组织培养。真正的组织培养始于 20 世纪 60 年代初, 欧洲一些国家培养大量细胞繁殖病毒作为制苗材料, 开始都用牛肾、猪肾原代单层细胞静止或旋转瓶培养。1962 年 Pirbright 动物病毒研究所的 Mowat 和 Chapman 发现 BHK21 (仓鼠肾) 传代细胞系是口蹄疫病毒的敏感细胞, 灭活苗才真正步入现代工业化生产水平。细胞培养技术也从单层培养发展到大罐悬浮培养。20 世纪 80 年代还发展了微载体悬浮培养, 增加了细胞和病毒的产量。所用传代细胞系除 BHK21 外, 还有 IBRS2、IFFA3 等细胞系。

20 世纪 60 年代以来, 欧洲大陆牛口蹄疫减少, 而猪口蹄疫 (主要是 C 型) 剧增, 而原来的疫苗对牛、羊有效, 对猪则无效或效力甚微。据意大利 (1964)、荷兰 (1967) 报道, 将牛舌上皮或牛肾细胞培养苗用于猪, 其含毒量要比用于牛的毒量高 4 ~ 10 倍才有效。匈牙利 (1970) 报道, 浓缩皂素明矾吸附苗, 猪的剂量须为牛的 3 倍; 保加利亚 (1970) 报道则为 5 ~ 10 倍。从而迫使人们寻求新的方法, 导致了灭活方法和佐剂的研究高潮。1967 年 Mckercher 和 Giordano 首先报道了用于猪的不完全弗氏佐剂灭活苗。灭活剂方面有羟胺、缩水甘油醛、 β -丙酸内脂和乙烯亚胺的各种衍生物, 如 AEI、BEI、CEI、EEI、API、CEEI、EI 等。20 世纪 60 年代末至 70 年代初, 欧美各国大量试验报告, 不乏成功的先例。

我国在细胞苗研究方面同样取得很大进展, 现概述于后。

1. 弱毒疫苗 1966 年韩福祥等用 A 型乳兔化弱毒 183 代毒, 适应于猪肾上皮细胞后又适应到仓鼠肾上皮细胞培养制苗, 并用乳兔接种制造反应苗。1974