

猪繁殖与呼吸综合征活疫苗（R98 株）

Zhu Fanzhiyuhuxizonghezheng Huoyimiao（R98 Zhu）

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine, Live（Strain R98）

本品系用猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）弱毒 R98 株接种 MARC145 细胞培养，收获细胞培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪繁殖与呼吸综合征（猪蓝耳病）。

【性状】 海绵状疏松团块，易于瓶壁脱离，加生理盐水后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录 3306 进行检验，应无菌生长。

【支原体检验】 按现行《中国兽药典》附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

【外源病毒检验】 按现行《中国兽药典》附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

【鉴别检验】 按瓶签注明头份，将疫苗用生理盐水稀释为每毫升含 1 头份，接种于 96 孔细胞板 Marc145 细胞，2 孔/样品，100 μ l/孔，37℃吸附 1 小时，加入含 4%犊牛血清的 DMEM 细胞维持液，同时设定空白细胞对照，在 5%CO₂ 温箱 37℃培养 24 小时；弃去营养液，用 PBS 缓冲液（0.01M pH7.0）洗涤细胞 3 次；加入冷丙酮（80%丙酮，20%双蒸水），200 μ l/孔，4℃30 分钟；弃丙酮，在室温下干燥，用 PBS 缓冲液洗涤 1 次；加入 1:500 稀释的美洲型 PRRSV 单克隆抗体，50 μ l/孔，37℃1 小时；移去孔内液体，用 PBS 缓冲液洗涤 5 次；加入 1:100 稀释的 FITC 标记羊抗鼠 IgG，50 μ l/孔，37℃1 小时；移去孔内液体，用 PBS 缓冲液洗涤 5 次，于荧光显微镜下观察。细胞对照孔细胞浆内应无荧光物质着染，而病毒接种细胞孔细胞浆内应有大量绿色荧光物质着染。

【安全检验】 按瓶签注明头份，将疫苗用生理盐水稀释为每毫升含 10 头份，肌肉注射 7 日龄 PRRSV 抗体阴性健康仔猪（附注 1）3 头，每头 1ml，观察 14 日，应无异常临床反应。

【效力检验】 下列方法任择其一。

（1）病毒含量测定 将 MARC145 细胞培养于细胞瓶中，每隔 2 日用含 8%~10%DMEM 营养液按 1:2 扩大培养；测定疫苗病毒含量前 48 小时，将该细胞传代接种于 96 孔培养板，置于 5%CO₂ 温箱 37℃培养 2 日，形成细胞单层；按瓶签注明头份，将疫苗用生理盐水稀释为每毫升含 1 头份，用细胞维持液做 10 倍系列稀释，取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 3 个稀释度病毒液接种于 96 孔培养板 MARC145 细胞单层，每个稀释度重复 4 孔，0.2 ml/孔；然后将细胞板放置于 5%CO₂ 温箱 37℃培养 5 日，无须换液；接种病毒后培养 5 日；观察细胞病变（CPE），根据 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。每头份病毒含量应 $\geq$ 不低于 10^{5.0}TCID₅₀。

（2）免疫攻毒 用 28~30 日龄 PRRSV 抗体阴性健康仔猪 5 头，每头颈部肌肉注射或滴鼻疫苗 1 头份，同时设同龄 PRRSV 抗体阴性健康仔猪 3 头作为对照，接种后 30 日，用 PRRSV-S1 株（10^{5.0}TCID₅₀/ml）攻击，滴鼻 2.0 ml/头，连续观察 4 周，根据临床症状和病毒血症检测结果进行判定（见附注 2、3）。对照猪至少应有 2 头发病，免疫猪应至少保护 4 头。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录 3204 进行测定，应符合规定。

【真空度测定】 按现行《中国兽药典》附录 3103 进行测定，应符合规定。

【作用与用途】 用于预防猪繁殖与呼吸综合征（猪蓝耳病），适用于 7 日龄以上健康猪。接种后 7~14 日产生免疫力，免疫期为 4 个月。

【用法与用量】 按瓶签注明头份，用灭菌生理盐水将疫苗稀释为每头份 1.0 ml。7 日龄以上仔猪肌肉注射或滴鼻，1.0 ml/头；后备母猪和配种前母猪肌肉注射，2.0 ml/头。

【注意事项】 （1）本品不宜用于 PRRS 阴性猪场及怀孕 30 日内母猪和种公猪；发生本病时可进行紧急预防注射；对体质瘦弱和患有其他疾病的猪不应使用。

（2）目前尚未进行该疫苗对高致病性猪繁殖与呼吸综合征的免疫效力试验，故尚不能确定该疫苗对高致病性猪繁殖与呼吸综合征的免疫效果。

（3）本品稀释后应放置于冷暗处，限 1 小时内用完。

（4）用过的疫苗瓶、器具和未用完的疫苗等应进行无害化处理。

（5）本品在 8℃ 以下的冷藏条件下运输。

【规格】 （1）10 头份/瓶 （2）20 头份/瓶 （3）50 头份/瓶。

【贮藏与有效期】 -20℃ 以下保存，有效期为 15 个月。

附注：

1 猪 PRRSV 抗体阴性标准 用 PRRSV-ELISA 抗体检测试剂盒，按其操作说明，检测猪抗 PRRSV 血清抗体。S/P 值 ≥ 0.4 为 PRRSV 抗体阳性，S/P 值 < 0.3 为 PRRSV 抗体阴性。

~~**2. 中和抗体效价测定方法** 根据 PRRSV-R98 株毒价，用细胞维持液将病毒稀释成 200 TCID₅₀。将被检血清 56℃ 处理 30 分钟，用细胞维持液将血清做 2 倍梯度稀释至 2⁻⁸。取倍比稀释的血清 0.5 ml 与等体积 200 TCID₅₀ 病毒液混合，37℃ 作用 1 小时，分别接种于生长良好的 Marc145 细胞单层的 96 孔细胞培养板上（接种前弃去生长液），每个血清稀释度接种 4 个孔，200 μl/孔，同时设正常细胞对照、病毒对照和阴、阳性血清对照。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 5 日，观察细胞病变（CPE）。以能够完全抑制 CPE 的血清最大稀释度作为该血清的中和抗体效价。~~

3.2. 仔猪发病标准

3.2.1 临床症状 仔猪体温升高（ $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ），持续 2~3 日；食欲减退，精神沉郁。

3.2.2 病毒血症 攻毒后用 RT-PCR 检测仔猪血清，PRRSV 病毒血症至少持续 28 日。

符合 3.2.1 和 3.2.2 中的任 1 项，即可判为发病。

4.3. RT-PCR 检测 PRRSV-S1 株

4.3.1 引物 上游引物 5'-ACGTTGAAAGTGCCGCACGG-3'，下游引物 5'-TCTTTCCCGTCCCTTGCCT-3'。~~由南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室设计并由上海生物工程有限公司合成。~~

4.3.2 病毒 RNA 提取 取血清样品，用 TRIZOL 试剂（Invitrogen 公司）提取 RNA，按试剂盒说明书进行。即取血清 200 μl，加入 1ml TRIZOL 试剂，室温孵育 5 分钟；加入 0.2ml 氯仿，充分晃动离心管约 15 秒，室温孵育 2~3 分钟；4℃ 12000g 离心 15 分钟；取上清液，加入 0.5ml 异丙醇，充分晃动，室温放置 10 分钟；4℃ 12000g 离心 10 分钟；弃上清液，加入 75%酒精 1ml，震荡；4℃ 8000g 离心 5 分钟；弃上清液，干燥沉淀物；加入 40 μl DEPC

水溶解沉淀。

4.3.3 反转录 按 cDNA 合成试剂盒 (Promega 公司) 说明书进行。反应总体积 20 μ l: 25mmol/L Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 1.0 μ l、10mM dNTPs 0.5 μ l、5 $\times$ 反转录缓冲液 4.0 μ l、RNA 7.0 μ l、双蒸水 6.5 μ l。将上述反应物混合均匀后, 65 $^{\circ}$ C 作用 10 分钟, 然后加入 M-MLV 反转录酶 (50U/ μ l) 1.0 μ l, 42 $^{\circ}$ C 作用 60 分钟, 再于 95 $^{\circ}$ C 作用 5 分钟。制备的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.3.4 PCR 反应体系 25 μ l, 含 cDNA 2.0 μ l、25 pmol/L 上下游引物各 0.5 μ l、10 mM dNTPs 1.0 μ l、10 $\times$ PCR 缓冲液 (无 Mg^{2+}) 2.5 μ l、25 mM Mg^{2+} 3.0 μ l、Taq DNA 聚合酶 (5U/ μ l) 1.0 μ l 和双蒸水 14.5 μ l, 同时设定阴性和阳性对照。将上述反应物混合均匀后, 放置于 PCR 仪反应, PCR 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 加热 4 分钟, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 63 $^{\circ}$ C 复性 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 秒, 共进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

4.3.5 电泳与观察 取 5~10 μ l PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶用溴化乙啶染色, 紫外线透射观察, 扩增产物长度为 300 bp。

5 怀孕母猪发病判定标准

5.1 临床症状——母猪出现体温升高 ($\geq 40^{\circ}\text{C}$), 持续 2~3 日, 食欲减退; 临产前 1~2 周发生早产, 或出现死胎和弱仔 ($\geq 20\%$)。—

5.2 病理变化——死胎和新生弱仔脐带部分和全部出现, 肺组织呈间质性肺炎, 部分猪的脾脏和淋巴结肿大; 组织学病变为局部坏死性脐动脉炎, 动脉血管壁和血管周围出血。—

5.3 病毒检测——用 RT-PCR 检测肺脏和淋巴结组织, 应检测到 PRRSV。—

6 Mac145 细胞质控标准

6.1 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。—

6.2 支原体检验——按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无支原体生长。—

6.3 外源病毒检验——按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无外源病毒污染。—

6.4 生长活性——将 Mac145 细胞培养于细胞瓶中, 每隔 2 日用含 10%DMEM 营养液按 1:2 扩大培养, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 日, 形成细胞单层。细胞形态之一, 细胞膜清晰。细胞传代次数暂定为 50 次。—

6.5 病毒适应性——取 Mac145 细胞单层, 接种 10^3 TCID₅₀ PRRSV-R98 株种毒液, 37 $^{\circ}$ C 培养 2~3 日出现明显 CPE; 培养 3 日收获病毒, 病毒含量应为 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 以上。—

6.6 裸鼠成瘤试验——取 Mac145 细胞及 C6 细胞的对数生长期的细胞, 分别经 0.25% 胰酶消化、计数, 用 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L pH 值为 7.0) 洗涤后稀释成 5×10^7 /ml 和 5×10^6 /ml 浓度, 分别背部皮下注射裸鼠 3 只, 200 μ l/只, 另取裸鼠 3 只背部皮下注射 DMEM 细胞营养液作为对照, 隔离饲养观察 21 日, 接种 C6 细胞组裸鼠颈背形成肿瘤, 而接种 Mac145 细胞组和 DMEM 细胞营养液的裸鼠应不形成肿瘤。—

7 40%蔗糖明胶保护剂配制——用蒸馏水配制 40%蔗糖和 8%明胶, 充分溶解后于 116 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 30~40 分钟, 冷却后进行无菌检验, 合格者 2~8 $^{\circ}$ C 保存备用。—