

# 伪狂犬病疫苗的研究

◆ 曾智勇<sup>1</sup> 汤德元<sup>1</sup> 郭万柱<sup>2</sup>

**摘要：**疫苗免疫接种是防制和控制乃至根除伪狂犬病的根本措施，许多国家在发展和改进现有常规疫苗的同时，纷纷探索利用生物技术研制和开发安全有效的新型疫苗。为此，本文就伪狂犬病疫苗的研究做一综述，以供参考。

伪狂犬病 (Pseudorabies, PR), 又称 Aujeszky 氏病, 是由猪疱疹病毒 I 型所引起的猪、牛、羊等多种家畜、家禽和野生动物的一种以发热、奇痒 (除猪外) 及脑脊髓炎为主症的一种急性传染病 (殷震等, 1995)。本病是典型的自然疫源性疾病, 猪是该病最主要的储存宿主和传染源。据报道, 全世界已有 40 多个国家和地区发生过该病的流行, 中国自 1947 年首次发现本病以来, 现已蔓延到 21 个省 (自治区、直辖市), 给畜牧业尤其是集约化养殖业和毛皮动物生产造成了巨大的经济损失。

疫苗免疫接种是防制和控制乃至根除伪狂犬病的根本措施。早期的疫苗大多为弱毒苗和灭活苗, 弱毒苗和灭活苗在预防控制伪狂犬病方面虽然能起一定的作用, 但是弱毒苗不能防止病毒在动物体内的复制和排出, 即存在着毒力返强和散毒的危险; 而灭活苗虽然安全性较好, 但其免疫效率却较低, 免疫时用量较大、有时还可能致注射部位肿胀, 出现过敏反应。因此, 随着对伪狂犬病病毒分子生物学研究的不断深入, 基因工程疫苗的研制成为新的热点, 先后有多株基因缺失疫苗问世, 使最终根除伪狂犬病成为可能。在美国和欧共体等发达国家已明确规定仅能使用伪狂犬病 gE 基因缺失疫苗。在国内, 四川农业大学动物生物技术中心以 PRV Fa 株为起始材料, 率先系统开展了伪狂犬病病毒分子生物学研究; 通过缺失、重组等基因操作方法, 去掉其主要毒力基因和具有潜伏感染性的基因 gl (gE)、gp63 (gI) 和 TK, 在国内首次构建了 PRV Fa 株 TK、PRV Fa gl/gp63、PRV Fa gl/gp63/LacZ<sup>+</sup>和 PRV Fa TK/gl/gp63/LacZ<sup>+</sup>基因缺失株; 研制出了中国第一株伪狂犬病三基因缺失活疫苗 (SA215)。该疫苗于 2003 年荣获国家第一个动物病毒基因工程疫苗《新兽药证书》(2003 新兽药字 37 号), 成为中国第一株动物病毒基因工程疫苗

, 从而开创了我国动物病毒基因工程疫苗实用化的先河, 为我国猪伪狂犬病的预防控制以及猪场对该病的净化 and 根除创造了条件。

## 一、灭活疫苗

将分离的伪狂犬病病毒强毒用 BHK-21 细胞或 IBRS-2 等传代细胞培养, 当病毒的增殖滴度达到要求时收获病毒灭活后加入油乳剂而制成灭活疫苗。灭活疫苗由于病毒已被灭活, 因而其安全性好, 不存在潜伏感染的问题, 因而在各养猪场, 尤其是种猪场以及未污染的养猪场得到广泛使用。值得注意的是灭活苗虽然安全, 但由于抗原成分含量不高及灭活过程中主要抗原决定簇的丢失, 且由于不能给免疫系统提供内源性蛋白抗原, 而不能诱生细胞毒 T 细胞反应 (CTL), 少量接种往往不能诱生足够的免疫反应, 因而具有免疫效力不佳、接种剂量大的缺点, 常常需要多次重复接种, 给防疫工作带来麻烦。

## 二、自然弱毒疫苗

自然弱毒疫苗是通过非猪源细胞或鸡胚的反复传代, 或在某些诱 (突) 变剂的存在下, 用高于通常的培养温度在细胞培养物上反复继代获得, 其基因组的内部存在着多处的点突变以及一些基因的缺失, 它是一种天然的基因缺失疫苗。在 20 世纪 60 年代后, 许多国家用不同的方法培育了不少伪狂犬病弱毒疫苗株, 其中应用较为广泛的主要是匈牙利的 Bartha 株、罗马尼亚的 Bucharest 株和 BUK 株等。

Bartha 弱毒株是由匈牙利学者 Bartha 于 1961 年分离, 并经猪肾、鸡胚反复传代致弱的一个疫苗株。该疫苗株基因组中存在多个突变, 在 US 区存在涉及整个 gE 基因和

11K 及部分 gI 和 28K 片段的一个大缺失 (Van Zijl 等, 1990), 在 UL 区 gC 基因信号序列存在点突变, UL21 有 8 个点突变 (gM 基因) (Dijkstra 等, 1997)。由于该疫苗株基因组中主要毒力基因 TK 没有缺失, 因此与其他毒株相比, 还存在着一定的毒力。

Bucharest 株系罗马尼亚布加勒斯特兽医所通过将伪狂犬病强毒株在鸡胚尿囊膜上培养至 200 代后, 获得的弱毒株。用鸡胚培养后制成的冻干苗, 仅适用于 9 日龄以上的仔猪和妊娠 2 月龄的母猪, 对兔、豚鼠和小鼠尚有较强的毒力; 将 Bucharest 株通过鸡胚和鸡胚成纤维细胞继代 800 代以上后, 获得的一个疫苗株 (即 BuK 株), 其在 Kpn 的第 4、5、6、7 酶切片段和 BamH 第 7、12 片段与强毒株有差异, 其 US 区存在 gE 基因的缺失, 与强毒株相比其毒力已大大减弱, 对妊娠母猪和仔猪都有一定的免疫作用 (Kit 等, 1985)。

值得注意的是, 自然弱毒疫苗虽然有着较强的免疫效果, 但因其主要毒力基因 (TK) 没有缺失, 其毒力有很大返强的可能性, 可能会导致疾病的流行, 而且未经充分致弱或过度致弱的疫苗株不仅不能诱导满意的免疫保护反应, 而且还有可能引起疾病及免疫抑制; 弱毒疫苗还可建立潜伏感染, 并存在散毒的可能, 在部分接种猪血清中虽然存在中和抗体, 但其排毒期却可持续数年。因此, 许多国家已禁止使用弱毒疫苗, 取而代之的则是以缺失 TK 基因的基因缺失疫苗。

### 三、基因缺失疫苗

伪狂犬病毒基因缺失疫苗的研制始于 20 世纪 80 年代初期, 即是利用基因工程技术在 PRV 基因组中插入或缺失一段序列致使 PRV 的某些基因不能表达, 从而致弱 PRV, 同时又保持其较强的免疫原性, 而其中缺失的基因主要是伪狂犬病毒的毒力基因胸苷激酶 (TK)、蛋白激酶 (PK)、核苷还原酶 (RR) 和脱氧尿苷三磷酸激酶 (dUTPase) 基因以及一些具有免疫原性的糖蛋白 gG、gE、gC、gD 基因等。目前据此已成功构建了以缺失主要毒力基因——TK 基因为代表的单基因缺失、双基因缺失和多基因缺失疫苗。

1. 伪狂犬病毒 TK 单基因缺失疫苗 伪狂犬病毒的 TK 基因是主要的毒力基因, 对其进行缺失便成为 TK 单基因缺失疫苗。这种 TK 缺失的疫苗与以前在有致突变剂存在下在细胞上筛选到的弱毒疫苗有一个最显著的特点, 就是不存在毒力返强, 因而更加安全。

第一个基因缺失疫苗株 BUK-d13 是 Kit (1985) 等最早在 1984 年报道, 以 PRV BUK 株为起始材料, 将在 TK 基因内缺失 148bp 的质粒与 BuK 疫苗株的 DNA 共转染细胞, 然后在阿拉伯糖胸苷存在下筛选获得的 TK 缺失突变株。该疫苗株是稳定的 TK<sup>-</sup>变种, 即使在选择培养基中也不回复为 TK<sup>+</sup>。对鼠和兔毒力大为减退, 并能引起鼠、兔和猪的坚强保护力, 能抵抗 TK<sup>+</sup> BUK 株或其他 PRV 强毒

的攻击, 并减少攻击用强毒株的排出。该毒株于 1986 年被美国批准为上市的第一个基因工程疫苗。

四川农业大学生物技术中心, 在国内率先系统地 PRV 的分子生物学进行了研究, 并在国内首次构建了 PRV Fa 株 TK 基因缺失疫苗株, 并对其免疫原性和保护力等进行了研究。王琴等 (1996) 采用切除缺失法对已克隆于 PBR322 中包含伪狂犬病病毒胸苷激酶基因的 BamH - 11 片段 (pFA11) 进行改建, 经筛选获得 4 株 TK 基因缺失重组质粒 (pDTK3-1、pDTK3-6、pDTK3-8 和 pDTK5-6), 对其进行酶切鉴定和 Southern 印迹杂交, 结果其 11 片段迁移率均发生改变, 缺失的碱基数分别约 1 250、1 100、1 250 和 200bp。用 PRV Fa-DNA 或 PRV Fa 细胞毒与重组质粒 pDTK3-6DNA 和 pDTK5-6DNA 通过磷酸钙法和脂质体法转染 TK-143 细胞, 增殖后经 5'-溴脱氧尿嘧啶 (5'-BUDR) 筛选得到 PRV Fa TK 缺失株 pDTK3-6、pDTK5-6、pDTKL3-6、pDTKL5-6。以斑点杂交技术和胸腺嘧啶核苷斑放射自显影法检测, 证明这些缺失株均无 TK 活性。免疫小鼠以 ELISA 检测其免疫血清, 抗体滴度可高达 1 64。对 PRV Fa 强毒攻击有一定保护率。

方六荣等 (2001) 以分离鉴定的猪伪狂犬病病毒鄂 A 株为亲本, LacZ 基因插入到 TK 基因中构建了 TK-/LacZ 突变株。LacZ 基因作为一个报告基因, 为 TK-/LacZ 突变毒株的筛选提供了显而易见的标记。其以地高辛标记的含 TK 基因的 BamH /Kpn 片段为探针, 通过 Southern 杂交确定伪狂犬病病毒鄂 A 株基因组中一大约 5.9kb 的 Kpn 片段中含有 TK 基因, 回收该片段并克隆于 pUC18 的 Kpn 位点。然后进一步克隆其中含 TK 基因的 Pst /Kpn 片段, 并将 LacZ 表达盒插入到该片段中的 BanH 位点, 构建转移质粒 pUEKPZ。将该质粒与伪狂犬病病毒鄂 A 株基因组共转染 PK-15 细胞, 待完全病变后在 X-gal 存在下筛选蓝斑, 蓝斑纯化 3 次后, 经 PCR 扩增、Southern 杂交证实获得的病毒为伪狂犬病病毒鄂 A 株 TK-/LacZ 突变株, 为基因缺失标志疫苗株的构建打下了基础。

2. 伪狂犬病毒双基因缺失疫苗 伪狂犬病毒双基因缺失疫苗是在 TK 缺失疫苗的基础上发展起来的, 它比仅有 TK 单基因缺失的疫苗更优越。由于 TK 基因属于酶蛋白基因, 在体内不能产生其相应的抗体, 因此原来的 TK 单基因缺失株只能采用核酸杂交, 限制性内切酶指纹图谱, 空斑放射自显影同野毒株相区别。若要用血清学方法区别开免疫接种猪与自然感染猪, 就必须缺失相应的糖蛋白基因。据此, 伪狂犬病毒双基因缺失疫苗株除了在 TK 基因引入了 1 个缺失外, 在编码非必需糖蛋白的基因内引入了 1 个新的缺失, 或再插入 1 个报告基因, 这样得到的突变株就不能产生被缺失的糖蛋白, 因而免疫动物就不能产生相应的抗体, 从而可以通过血清学方法将免疫接种猪与自然感染野毒猪相区别。这也是伪狂犬病毒双基因缺失疫苗的显著特点。同时, 某些糖蛋白的缺失也可进一步降低其

毒力。

TK/gC 疫苗株：该疫苗株是由 Kit 等 (1987) 为克服 TK 单基因缺失的不足，在 PRV BUK-d13 株的基础上，通过缺失 gC 基因序列的 1 100bp，构建出的缺失了 TK、gC 基因的 PRV TK/gC 疫苗株。该疫苗株除了 TK、gC 两个基因缺失外，在该缺失株的 gE 基因也存在缺失，该疫苗株在 30-39 范围内在培养细胞上均能增殖到高的滴度。动物实验表明，用该缺失疫苗接种的动物不能产生抗 gC 的抗体，用 gC-ELISA 可将接种动物与自然感染动物区分开。值得一提的是，该基因缺失疫苗株还不能产生 gE，因此，gE-ELISA 也可以作为区分接种动物和自然感染动物的一个标志。

TK/gG 疫苗株：Marchidi 等 (1987) 利用一株碘脱氧尿苷抗性突变株 HR (TK<sup>-</sup>) 作为亲本构建了 TK/gG 双基因缺失株。用 PRV TK/gG 制备的疫苗接种动物，结果表明它对小鼠、猪、绵羊无毒性，对牛有中等毒性，对犬有较强的毒性；小鼠、猪被免疫接种后，能抵抗强毒的攻击；结合 gG-ELISA 可以区分疫苗接种动物与野毒感染动物。

TK/gE 疫苗株：利用 NIA-3 和 NIA-4 做亲本，Quint 等 (1987) 和 Van Oirschot 等 (1990) 分别构建了 TK/gE 双基因缺失株并建立了血清学鉴别诊断方法 gE-ELISA。该疫苗对猪、牛、羊均安全，不产生潜伏感染，用它接种的猪能抵抗 PRV 强毒的攻击。因不表达 gE，同样也可用 gE-ELISA 将疫苗接种动物与自然感染动物相区别。

以上是三种使用较广的双基因缺失标志疫苗，除此以外，由于 RR、gl、gE 等基因缺失也可降低病毒毒力，因而也有关于 RR/gE、gl/gp63 (gl/gE) 等糖蛋白基因缺失疫苗株构建的相关报道。颜其贵等 (1997) 成功构建了缺失了 gl 和部分 gp63 基因的重组质粒 PPB7-1，并以蚀斑法得到纯化重组病毒株 (PFDI/D63)，小鼠试验证实该缺失株对小鼠具有一定的免疫原性。在此基础上通过引入报告基因，进一步构建了 PRV Fa gl/gp63/LacZ 基因缺失株。姜焱等 (2003) 在构建了含伪狂犬病病毒上海株 gl 基因和 gE 基因克隆鉴定的基础上，采用酶切的方法构建了载体 pgEI，然后用限制性内切酶 BamH 和 Bstp 缺失掉 gE 基因 5' 端 363bp，同时把绿色荧光蛋白 (GFP) 基因表达盒插入到缺失部分，并在下游引入一个多克隆位点，构建了缺失转移载体 pgEI-GFP。用 DOTAP 转染试剂盒将 pgEI-GFP 转染了感染 PRV-SH 的 BHK-21 细胞，待出现 80% 病变后收获病毒，并以蚀斑法得到纯化的缺失了 gE/gI 重组病毒株，小鼠试验证实缺失株的毒力有所下降。

3. 伪狂犬病毒多基因缺失疫苗 TK、gE、gp63 均是 PRV 重要的毒力或免疫原性基因。通过对 TK 基因的缺失，获得 TK 单基因缺失疫苗株。在此基础上，进一步缺失 1 个如 gC、gG、gE、gl (gp63) 等糖蛋白基因，或仅缺失某 2 个糖蛋白基因而主要毒力基因 TK 基因并未缺

失，获得伪狂犬病毒的双基因缺失疫苗株。为结合单基因缺失疫苗和双基因缺失疫苗以及插入报告基因的优点，四川农业大学动物生物技术中心于 1999 年在国内首次成功构建了 PRV TK/gI/gp63/LacZ 三基因缺失株，并在此基础上自行研制出了中国第一株动物病毒基因工程疫苗，即伪狂犬病三基因缺失活疫苗 (SA215) (郭万柱等，2000)。试验表明，SA215 安全可靠，免疫效果优于常规疫苗，抗体维持时间长，且在抗潜伏感染方面效果独特，可以有效防止动物伪狂犬病的发生。与国内应用的伪狂犬病常规疫苗相比：该基因缺失活疫苗在安全性、免疫原性、检测区分疫苗接种阳性动物和野毒感染阳性动物、控制伪狂犬病病毒潜伏感染等方面具有无可替代的优势；同时具有实用动物范围更广、生产工艺简单和生产成本低廉等优点。与国内主要进口的同类疫苗相比：在疫苗的安全性上优于进口的同类疫苗，免疫效果相近，但在抗潜伏感染方面效果更独特；成本大大低于进口疫苗，更具有市场竞争力，可以完全取代同类进口疫苗。

除以上介绍的各类伪狂犬病毒基因缺失疫苗外，国内外还有许多其他如 RR、PK、dUTPase、gM 等单基因，以及如 gE/PK、TK/gG/gE、gG/gE/gI/gC 多基因组合缺失疫苗的报道，限于篇幅不予赘述。

4. 伪狂犬病毒基因缺失疫苗的突出特点 多种 PRV 缺失弱毒株的成功构建，为开发研制伪狂犬病基因工程疫苗奠定了坚实的基础，Metterleiter 等 (1994) 关于 PRV gG/gD/gE/gI 四基因缺失株的成功构建，为研制伪狂犬病基因缺失疫苗拓宽了思路。它们具有如下优点：由于 PRV 缺失弱毒株都缺失了目的基因的几百甚至几千个碱基，缺失区域明确，所以它们返祖的可能性极小。PRV 缺失株都缺失 1 个或几个影响病毒毒力的基因，所以大多数的 PRV 缺失株对鼠、猪无毒力或仅有相当低的毒力。但是仅缺失 TK 基因的弱毒株对犊牛还有较低的毒力，而对猫、犬毒力较强，若同时再缺失 gC 或 gE 基因，则几乎不表现毒力。大多数的 PRV 缺失株都有较强的免疫原性，免疫动物都获得了较强的保护力。强毒攻击猪只不出现临床症状和增重受阻，猪只排毒时间大大缩短，排毒量大大降低。大多数 PRV 缺失疫苗株都不能侵入中枢神经系统复制或这方面的能力大大减弱，但能在三叉神经节处复制，与强毒株相比，已大大减弱，难以潜伏感染。已证实，PRV 弱毒株在三叉神经节的定殖，能阻止强毒侵入中枢神经组织，也使强毒很难在中枢神经组织潜伏。可以通过缺失基因蛋白作为标志蛋白，然后建立敏感而特异的血清学检测方法，通过检测特异性抗体，将缺失疫苗免疫动物与野毒株感染或其他疫苗免疫动物区别开来，以便对野毒感染动物采取针对性的防控措施。被用作标志蛋白的有 gC、gE、gG，大多数把 gE 作为标志蛋白。现在建立的检测方法主要是 gE-ELISA、gC-ELISA、gG-ELISA。

gE 基因缺失疫苗结合鉴别性诊断能力现在已成为在美国和各欧共体成员国及中国台湾省推广的规章化的伪狂

犬病消除计划的理论基础。gE 基因缺失疫苗是在欧共体成员国和北美地区唯一被允许使用的修饰活疫苗。据报道,在瑞典通过接种 Begonia (gE/TK<sup>-</sup>) 株基因缺失疫苗结合 gE-ELISA 检测淘汰野毒感染阳性猪消除了伪狂犬病。另据报道,每年分 3 次用 783 株或 Begonia 株疫苗预防接种母猪群,伪狂犬病的再生率(由一头感染性母猪引起继发感染的平均数)明显小于 1,从而得出结论:伪狂犬病在母猪群可由预防接种得到清除。在美国和欧洲的应用实践表明,伪狂犬病基因缺失疫苗的应用对于伪狂犬病的控制和消除是一个突破。没有缺失疫苗伪狂犬病的消除计划是不可行的,尤其是现有疫苗在未能阻止野毒感染和潜伏感染的建立时,gE 缺失株疫苗及消除策略更显得重要。

#### 四、发展中的疫苗

1. 伪狂犬病病毒亚单位疫苗 亚单位疫苗(廖筱萍等,2002)是指用 PRV 保护性抗原基因在原核或真核系统中表达所获得的产物所制成的疫苗。它有许多优点:安全性好。疫苗中不含病原微生物,接种后不会发生急性、持续或潜伏感染,可用于不宜使用活疫苗的某些情况,如妊娠动物。可以减少或消除常规活疫苗或灭活疫苗难以避免的热原、变应原、免疫抑制原和其他有害的反应原。

疫苗稳定性好,便于保存和运输。产生的免疫应答可以与野毒感染所产生的应答能相区别,有利于疫病的控制和消灭计划。可以大量生产。但是这种亚单位疫苗的产品研发费用非常昂贵,且免疫原性差,目前仍处在探索阶段。

2. 以伪狂犬病毒为载体的多价疫苗 伪狂犬病毒为双链 DNA 病毒,在长约 150kb 基因组上具有许多复制非必需区,能插入 1 种或多种重要传染病病原保护性基因,构建多联(价)重组 PRV 活疫苗,有助于真正实现兽医工作者“一针预防多病”的梦想。

Van Zijl 等(1990,1991)最早实现了病原保护性的抗原基因在伪狂犬病毒中的表达。他们将猪瘟病毒囊膜蛋白基因 E1 融合到 gG 启动子的下游,构建了几株以 PRV783 为亲本,表达 E1 的重组伪狂犬病毒;将这些重组病毒进行动物试验,结果接种重组病毒的猪均能产生对 HCV、PRV 高滴度中和抗体,并可以保护猪免受 PRV、HCV 的强毒攻击。继而同一实验室又构建了 HCV E1 分别由 gD、gE、DMV 的启动子控制下的四株重组伪狂犬病毒 M401、M402、403、M404,并将这些重组病毒与 Van Zijl 等构建的重组病毒 M205 进行了动物试验。结果将人巨细胞(CMV)立即早期启动子控制下的 E1 插入 PRV 基因组 gE 基因的重组病毒和将 gG 启动子控制下的 E1 插入 PRV 基因组 gE 基因的重组病毒均能使猪免受 PRV、HCV 的攻击。

国内徐志文(2003)采用磷酸钙转染系统,将构建的含有 HCV E2 基因的转移重组质粒 PP63LacZE2 与伪狂犬病三基因缺失疫苗 SA215 株 DNA 共转染 Vero 细胞,经系列鉴定证实共获得 12 株阳性重组病毒。重组病毒 SA215 (A) 免疫 21 日龄健康仔猪后,分别在接种后 28d

用  $10^6$  PFU 的 PRV Fa 强毒株进行滴鼻攻毒,42d 用猪瘟强毒 SM 株血清 1mL 肌肉注射攻击。结果表明,接种猪能抵御 2 次病毒的攻击,而同条件下对照结果成立。试验结果说明,重组病毒 SA215 (A) 是一株优秀的猪瘟、伪狂犬病二价疫苗候选株。

除以上猪瘟伪狂犬重组疫苗外,尚有大量关于以腺病毒、痘苗病毒、传染性支气管炎病毒以及猪痘病毒为载体的重组伪狂犬疫苗研究的报道,但对于报道的这些重组病毒能否用于控制伪狂犬病,目前还不能作出肯定的回答,仍有待于作进一步的研究分析。

PRV 作为载体是实验研究和发展的有力工具,构建 PRV 转移表达载体系统并将之用于畜牧业以预防畜禽乃至人类传染病将成为现实。但值得注意的是,伪狂犬病毒属于潜伏感染力很高的病毒,因此,用其活病毒作为载体在实际应用中也要考虑到病毒基因发生重组、返强、扩毒、散毒等安全性问题,建议对此应保持慎重态度。

3. 伪狂犬病毒核酸疫苗 核酸疫苗,也称 DNA 疫苗,是将外源基因克隆到表达质粒上,直接注入到动物体内,使外源基因在活体内表达,产生抗原从而激活免疫力。与主要刺激体液免疫应答反应的灭活疫苗或亚单位疫苗相比,DNA 疫苗表达的抗原是通过刺激类 MHC 分子和类 MHC 分子进行抗原呈递的,能高效诱导体液免疫与细胞免疫应答,并能有效地诱导专一性 T 杀伤细胞的能力而没有副作用,但还需要大量的基础性研究加以证实。

Gredts 等(1997、1999)、Haagmans 等(1999)、Takeda 等(1999)的研究也都表明含 PRV 糖蛋白 B、C、D、E 基因的 DNA 疫苗的免疫效果并不确切,仍然需要大量的研究来进一步探讨。但由于该技术具有常规疫苗接种方法无法比拟的优点,仍然具有较大的研究价值。

#### 五、小结

综上所述,PRV 疫苗已在弱毒苗、灭活苗、基因缺失疫苗、亚单位疫苗、重组病毒活载体疫苗及核酸疫苗等几个层次上进行了大量的研究,取得了许多令人鼓舞的阶段性成果。基因工程缺失疫苗已经在世界上一些国家推广应用,对预防伪狂犬病流行起了关键作用。但现行使用的各种 PRV 疫苗仍存在着不能预防野毒感染后的病毒分泌,不能防止潜伏感染状态的建立,以及疫苗的效力和安全性不甚理想等亟待解决的问题。由于 PRV 毒力受多基因控制,病毒毒力的致弱往往伴有疫苗免疫保护效果的降低。因此,在进一步揭示 PRV 基因组结构和功能、基因表达调控及其诱导机体免疫应答机理的基础上,构建新缺失突变株疫苗和发展双价或多价载体疫苗将是今后 PRV 基因工程疫苗发展的主要方向。随着分子生物学的进展和基因工程技术的广泛应用,PRV 基因工程疫苗的研究可望在不久会有更新的突破。

作者单位: <sup>1</sup> 贵州大学动物科学院动物医学系

<sup>2</sup> 四川农业大学动物生物技术中心