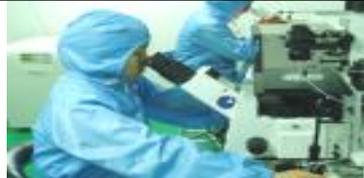


猪瘟E2基因工程亚单位疫苗的研究和临床应用

刘迦慧

天康生物股份有限公司

Tecon Biology CO. Ltd



猪瘟防控-新阶段，新目标，新要求

中国猪场的严重威胁

- 母猪带毒和仔猪先天性感染普遍
- 猪群免疫保护力低下
- 生物安全条件受限

与其它疾病共同感染(如PRRS, PCV2)，使疾病复杂化,经济损失严重

国家猪瘟净化计划

《国家中长期动物疫病防治规划（2012-2020年）》

- 《国家猪瘟防治指导意见（2017-2020年）》
- 2020年底，全国所有种猪场达到猪瘟净化标准
- 弱毒疫苗的长期应用，净化具备条件
- 现有的弱毒疫苗不能区分野毒感染与疫苗免疫

农业部文件

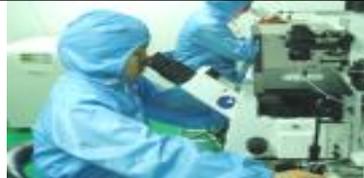
农医发[2017]10号

农业部关于印发《国家高致病性猪蓝耳病防治指导意见(2017-2020年)》《国家猪瘟防治指导意见(2017-2020年)》的通知

各省、自治区、直辖市及计划单列市畜牧兽医(农牧、农业)厅(局、委、办),新疆生产建设兵团畜牧兽医局,部属有关事业单位,各有关单位:

根据《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020年)》要求,为有效控制和消灭高致病性猪蓝耳病、猪瘟,我部组织制定了《国家高致病性猪蓝耳病防治指导意见(2017-2020年)》和《国家猪瘟防治指导意见(2017-2020年)》。现印发给你们,请遵照执行。

农业部
2017年3月20日



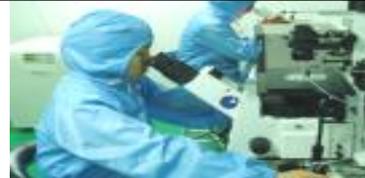
猪瘟疫苗的现状

猪瘟疫化弱毒苗（C株）

- 脾淋苗
- 牛辜丸细胞苗
- ST传代细胞苗

猪瘟疫E2基因工程疫苗

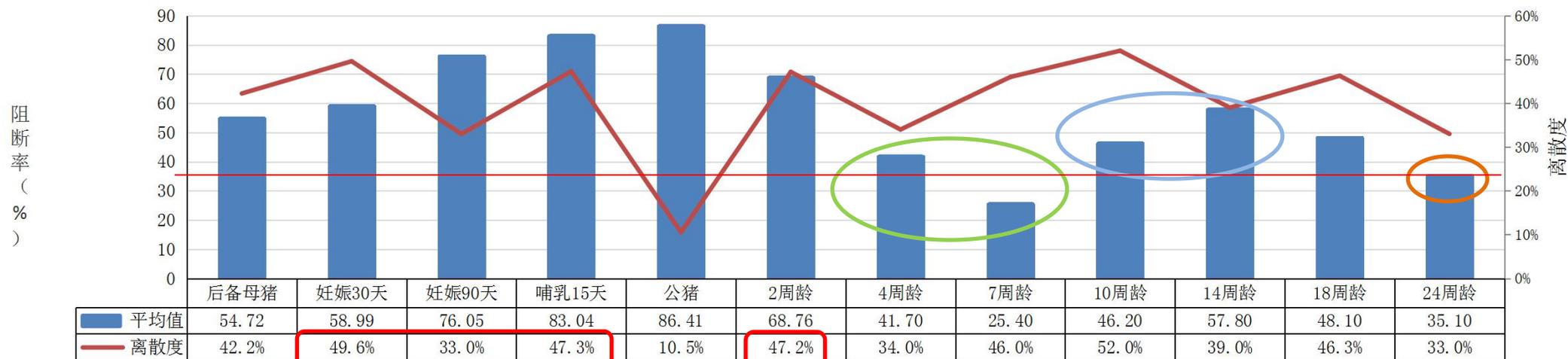
- Bayovac® CSF-E2（拜耳）Bayer
- Porcilis® Pesti（英特威）MSD
- 国内多家疫苗公司已进入临床试验阶段



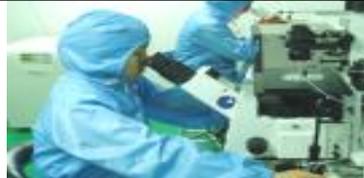
猪瘟免疫的问题

- ❑ 母猪群抗体水平离散度大，仔猪母源抗体水平高低不齐。
- ❑ 商品猪首免后抗体转阳率低，易出现保护空白期。
- ❑ 商品猪二免后抗体持续期短，无法保护到出栏。
- ❑ 不能区分野毒感染抗体和疫苗免疫抗体。

CSFV抗体平均值及离散度



注：母猪普免，4次/年；商品猪，21天首免，55天二免。红线以上为阳性。



猪瘟免疫失败的原因

疫苗质量不稳定

- **BVDV污染**，批次不稳定，运输保存

免疫程序不合理

- 活苗受**母源抗体干扰**，超剂量免疫

猪群免疫耐受

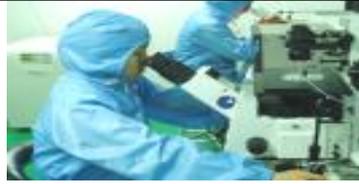
- 仔猪先天性感染猪瘟

- 母猪带毒综合征

免疫抑制

- 霉菌毒素，免疫抑制疾病





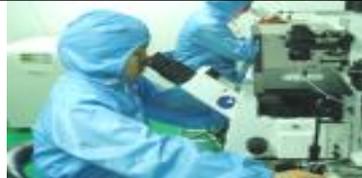
猪瘟疫苗的BVDV污染

- 10个厂家随机抽检23个批次，BVDV阳性批次为5个，**污染率为21.74%**，污染BVDV为BVDV I型。

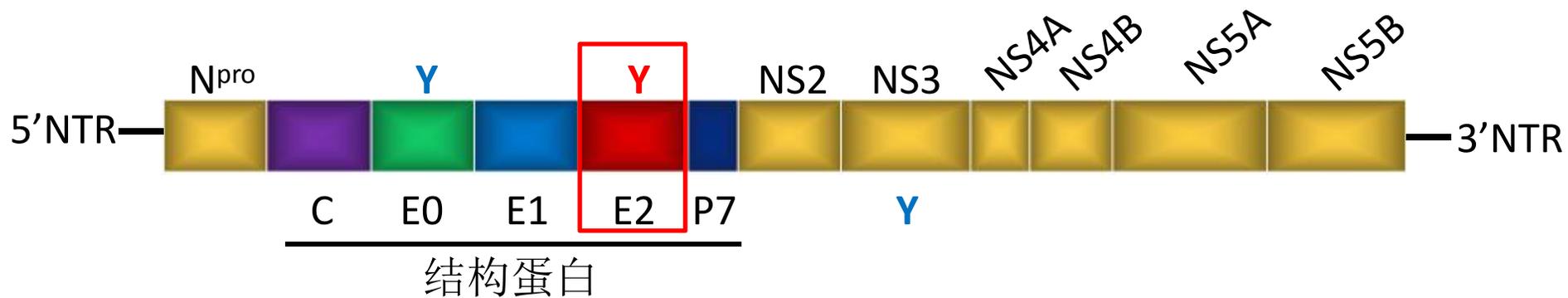
—范学政，王琴等，《中国兽医杂志》，2010年
- 湖南省，10个厂家48个批次，BVDV阳性厂家为5个，BVDV阳性批次为9个，**厂家污染率为50%，批次污染率为18.75%**。

—范仲鑫，张朝阳等，《畜牧与兽医》，2011年
- 全国14个省份，猪瘟疫苗中3个批次为BVDV阳性，同源性分析显示：**疫苗中BVDV污染毒株与牛群中BVDV血清型分布类似，提示这些疫苗中的BVDV污染可能来自牛血清中的持续性感染所致。**

—张志，李晓成等，《中国动物检疫》，2015年

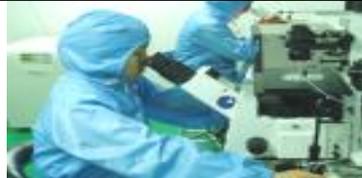


猪瘟病毒基因组示意图

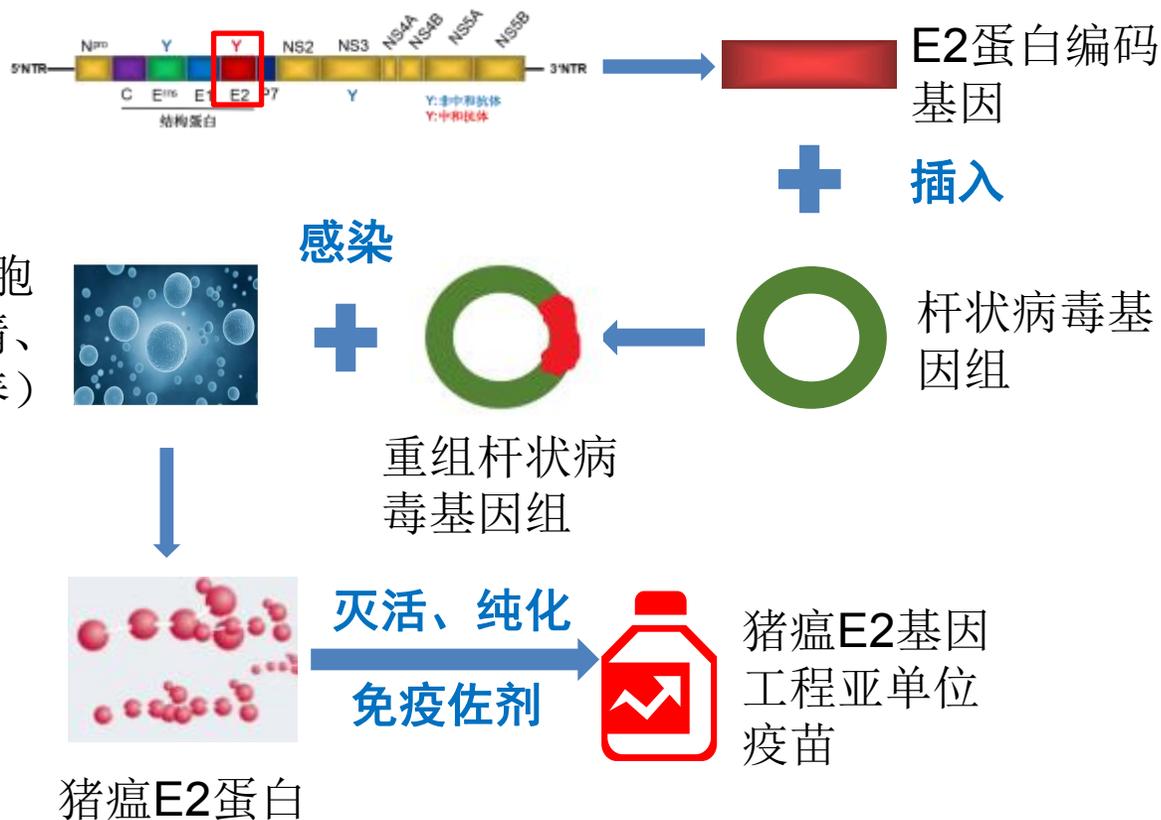


Y: 非中和抗体

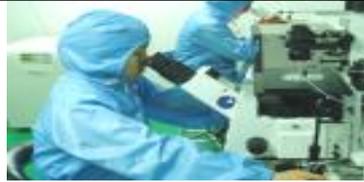
Y: 中和抗体



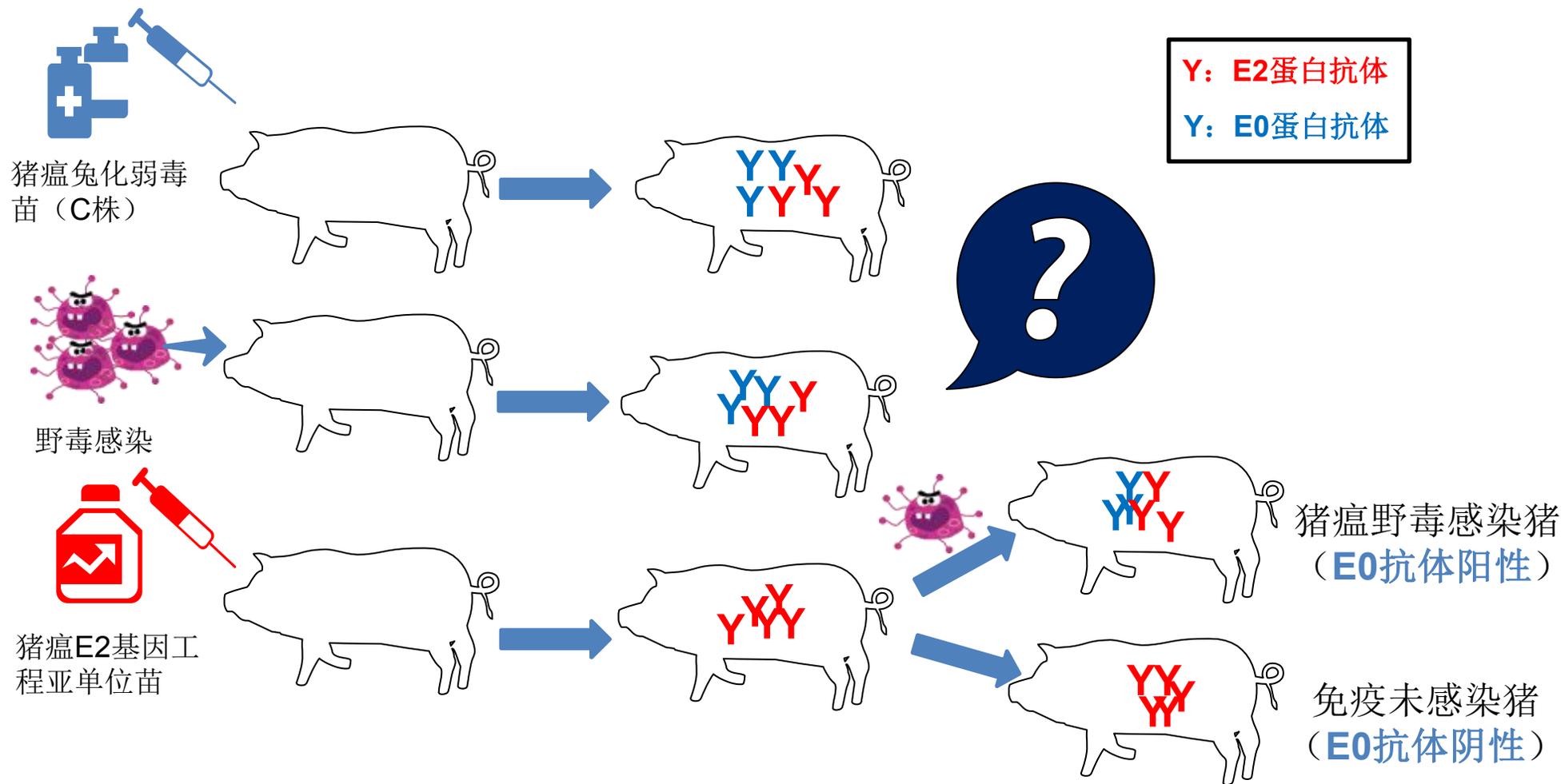
猪瘟E2基因工程亚单位疫苗工艺

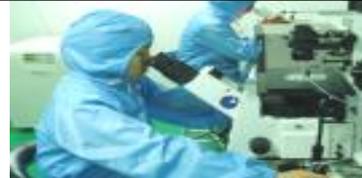


- ◆无血清昆虫细胞悬浮培养技术-无BVDV污染，免疫应激小
- ◆分泌型E2糖蛋白-E2蛋白含量高，杂蛋白含量少，诱导的抗体水平更加整齐。
- ◆植物油佐剂-免疫原性高，副反应小



鉴别诊断-区分免疫猪和感染猪

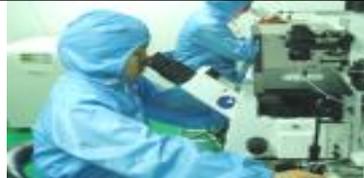




1、安全性研究

1.1 试验设计

单位名称	单剂量（重复）安全性试验		超剂量安全性试验	
	仔猪	妊娠母猪	仔猪	妊娠母猪
临床试验A养殖场	120头	120头	120头	120头
临床试验B养殖场	120头	120头	120头	120头
临床试验C养殖场	120头	120头	120头	120头
临床试验D养殖场	120头	120头	120头	120头



1、安全性研究

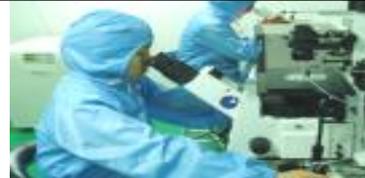
1.2 试验结果-单剂量安全性试验

- 对仔猪安全，无副反应

组别	头数	疫苗吸收	局部炎症	采食饮水	临床反应
免疫组	100	100/100吸收	100/100无炎症	100/100正常	100/100无不良反应
对照组	20	-	20/20无炎症	20/20正常	20/20无不良反应

- 仔猪增重与对照组无差异

组别	免疫前	免疫后2周	免疫后4周	免疫后8周
	30日龄 (kg)	44日龄 (kg)	58日龄 (kg)	86日龄 (kg)
免疫组	8.96±0.73	14.62±0.89	22.49±1.49	42.83±2.13
对照组	9.01±0.75	14.69±0.93	22.53±1.51	42.93±2.28

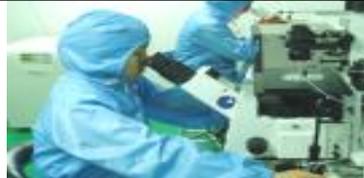


1、安全性研究

1.2 试验结果-单剂量安全性试验

- 对妊娠母猪安全，无副反应。
- 免疫组平均产仔数和健活率与对照组没有差异。

组别	头数	局部炎症	采食饮水	临床反应	平均产仔数	健活率
免疫组	100	100/100无炎症	100/100正常	100/100无不良反应	10.5	91.24%
对照组	20	20/20无炎症	20/20正常	20/20无不良反应	10.6	90.38%



1、安全性研究

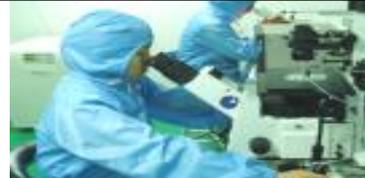
1.2 试验结果-单剂量重复安全性试验

- 对仔猪安全，无副反应

组别	头数	疫苗吸收	局部炎症	采食饮水	临床反应
免疫组	100	100/100吸收	100/100无炎症	100/100正常	100/100无不良反应
对照组	20	-	20/20无炎症	20/20正常	20/20无不良反应

- 对妊娠母猪安全，无副反应。
- 免疫组平均产仔数和健活率与对照组没有差异。

组别	头数	局部炎症	采食饮水	临床反应	平均产仔数	健活率
免疫组	100	100/100无炎症	100/100正常	100/100无不良反应	10.5	91.05%
对照组	20	20/20无炎症	20/20正常	20/20无不良反应	10.4	91.35%



1、安全性研究

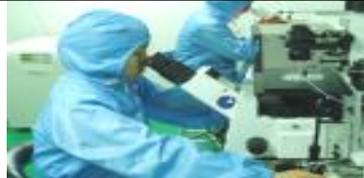
1.2 试验结果-超剂量安全性试验

- 对仔猪安全，无副反应

组别	头数	疫苗吸收	局部炎症	采食饮水	临床反应
免疫组	100	100/100吸收	100/100无炎症	100/100正常	100/100无不良反应
对照组	20	-	20/20无炎症	20/20正常	20/20无不良反应

- 对妊娠母猪安全，无副反应。
- 免疫组平均产仔数和健活率与对照组没有差异。

组别	头数	局部炎症	采食饮水	临床反应	平均产仔数	健活率
免疫组	100	100/100无炎症	100/100正常	100/100无不良反应	10.7	90.19%
对照组	20	20/20无炎症	20/20正常	20/20无不良反应	10.6	90.75%

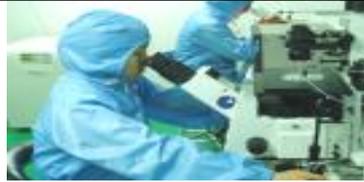


1、安全性研究

1.3 结论

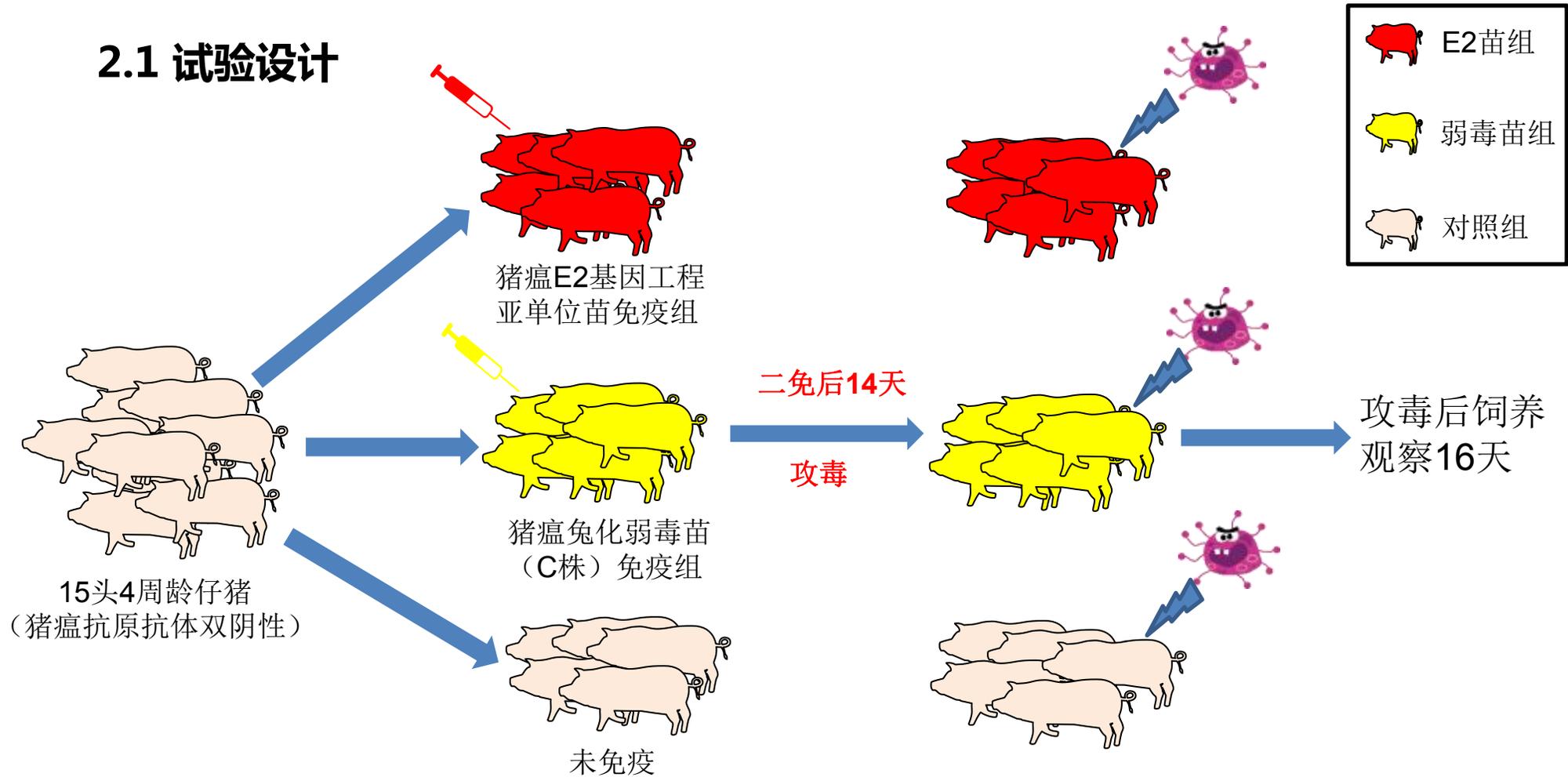
在4个猪场，共计1920头仔猪和妊娠母猪完成安全性研究，

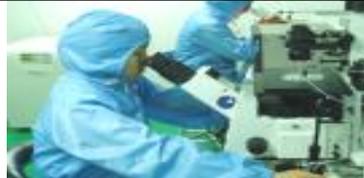
结果标明：猪瘟E2基因工程亚单位疫苗**安全性有足够保障。**



2、效力检验-攻毒试验

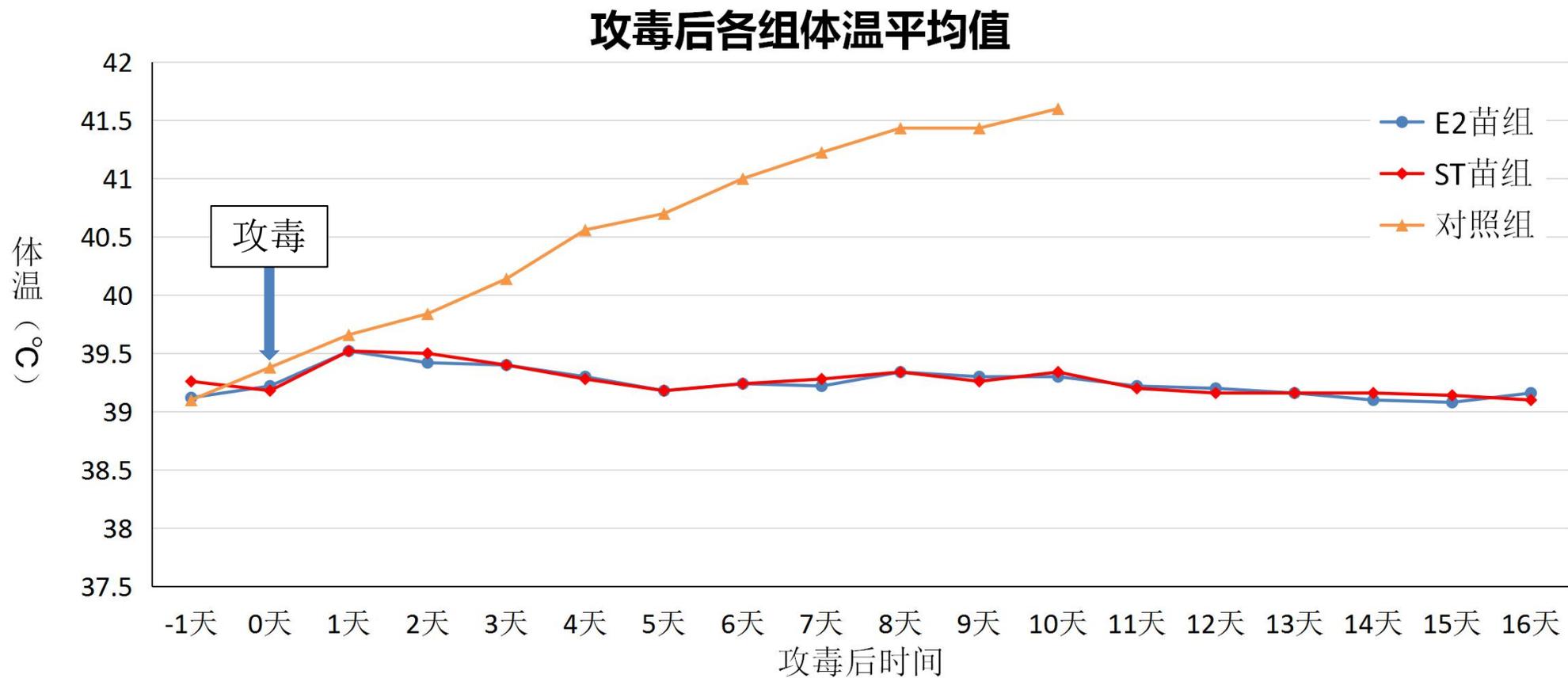
2.1 试验设计

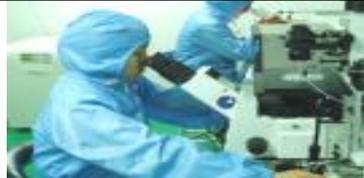




2、效力检验-攻毒后体温正常

2.2 攻毒后体温监测结果：





2、效力检验-攻毒后无临床表现

2.3 攻毒后临床观察结果：

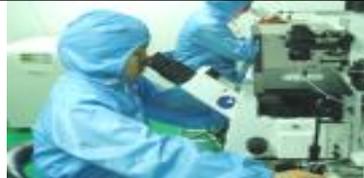


对照组猪



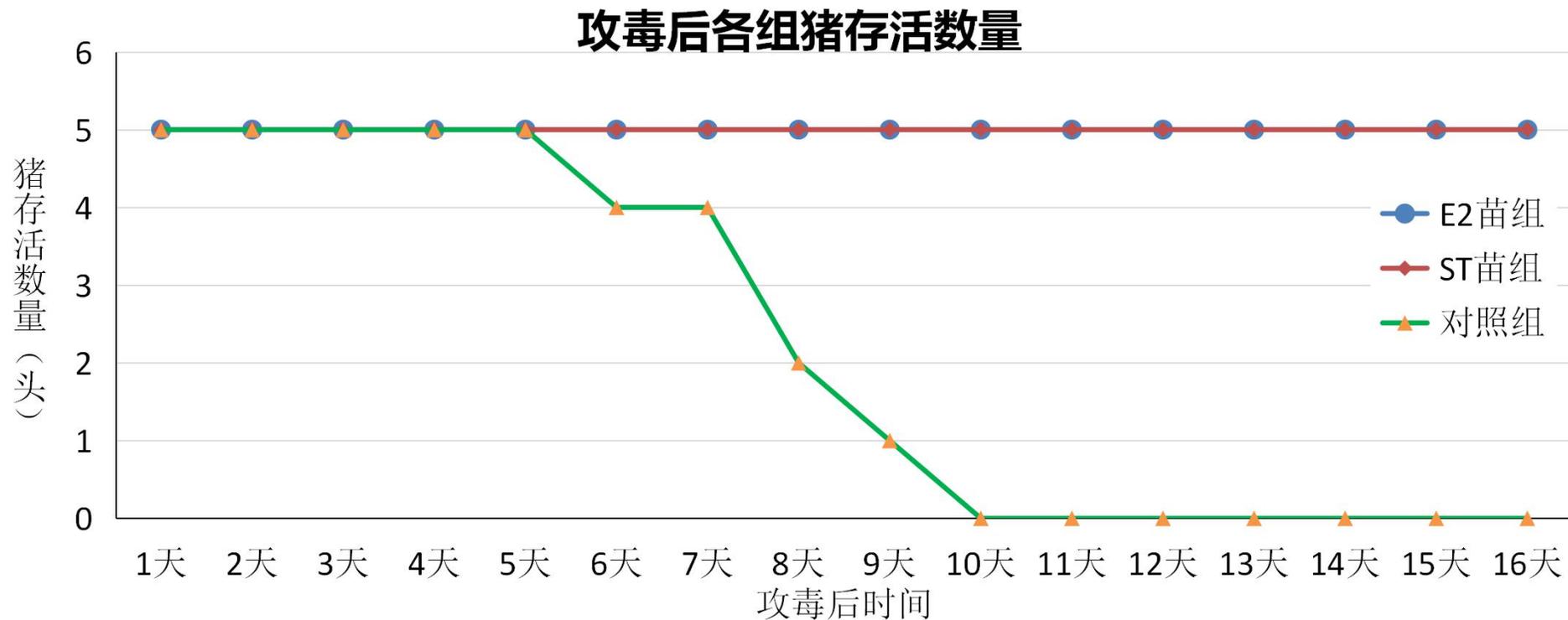
免疫组猪

- 对照组攻毒后，体温升高，3日后出现典型猪瘟症状，如皮肤出血斑；便秘与腹泻交替发生；结膜充血、出血等。
- 免疫组无临床症状。

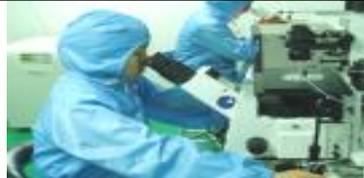


2、效力检验-攻毒保护与C株相媲美

2.4 攻毒保护结果：

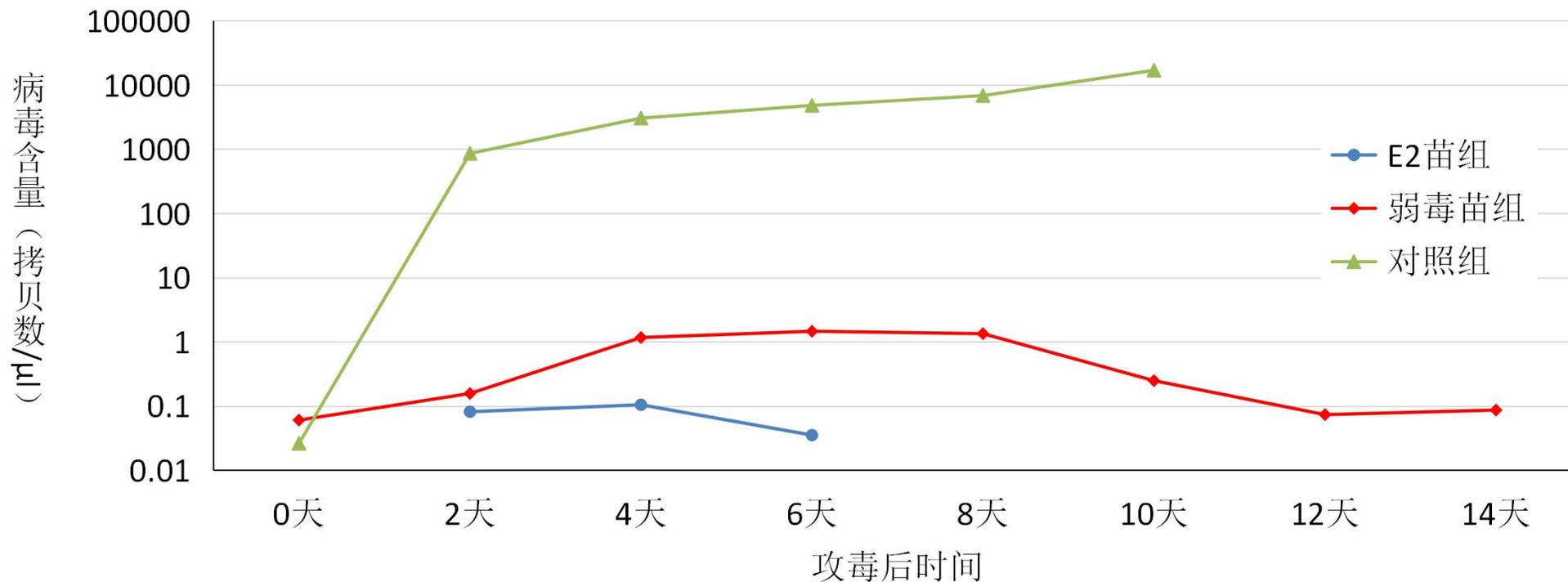


- 猪瘟石门系标准强毒株攻毒后第6~10日，**对照组5/5死亡**；
- 免疫组仅部分猪体温稍有升高，但均无异常临床反应，**免疫组均得到100%（5/5）保护**。

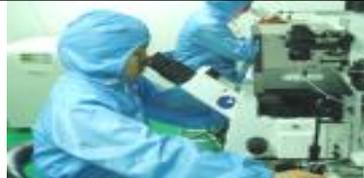


2、效力检验-攻毒后可快速清除病毒

2.5 血液病毒含量Real-time RT-PCR检测结果：

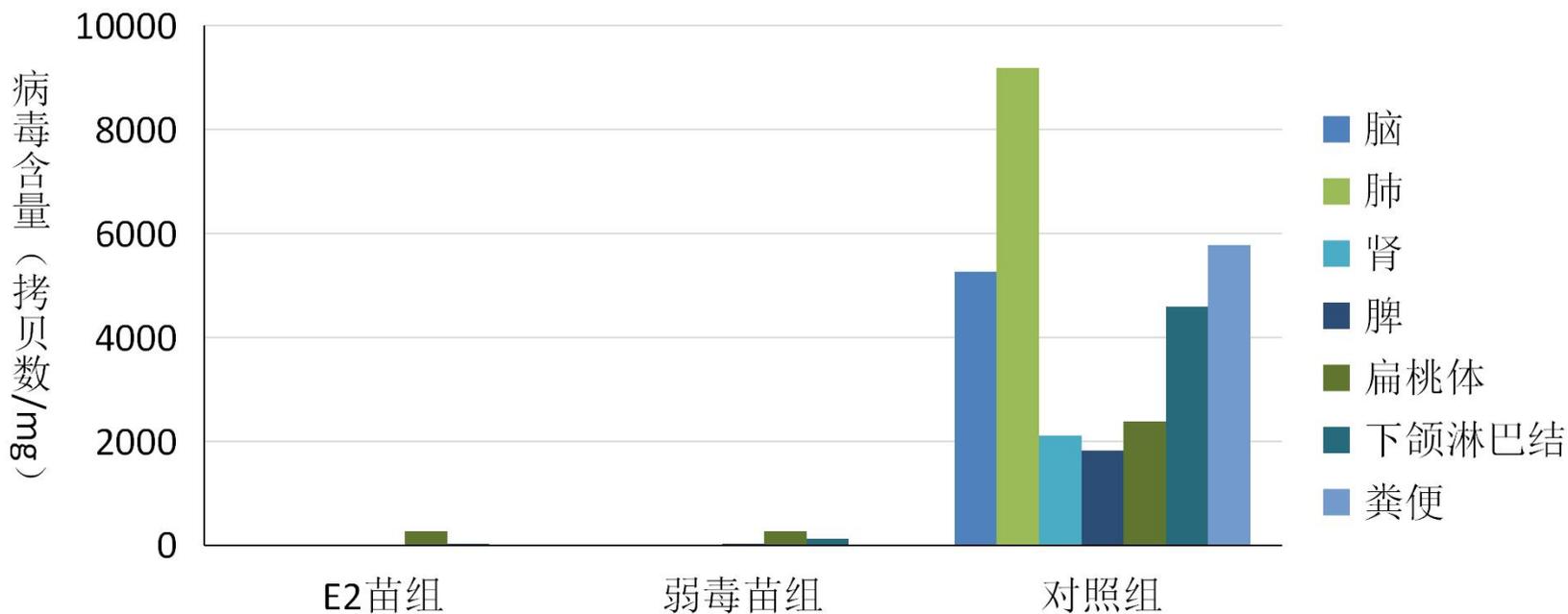


- ① 猪瘟E2基因工程亚单位苗免疫组攻毒6天后血液中检测不到猪瘟病毒；
- ② 兔化弱毒苗（C株）组在每个监测点均能检出病毒，但含量不高于10拷贝/ μl ；
- ③ 对照组攻毒后第2天即可在血液中检测到病毒，血液中病毒含量最高可达16902拷贝/ μl 。

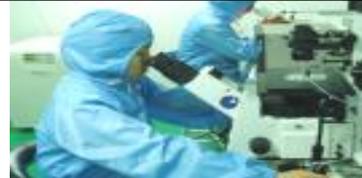


2、效力检验-攻毒后可阻止感染

2.6 组织样品病毒含量Real-time RT-PCR检测结果：

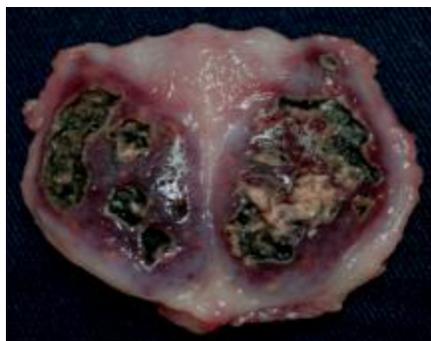


- ① E2苗组、弱毒苗组在肺脏、肾脏、脾脏、脑、血液、粪便中均未检测到病毒，
- ② E2苗组、弱毒苗组部分猪在扁桃体和下颌淋巴结中检出极低的病毒拷贝；
- ③ 对照组所检7种组织中都检出较高的病毒拷贝数，肺脏中病毒含量最高。



2、效力检验-对照组攻毒后典型猪瘟病变

2.7 对照组组织病变：



扁桃体溃疡



淋巴结出血、肿大



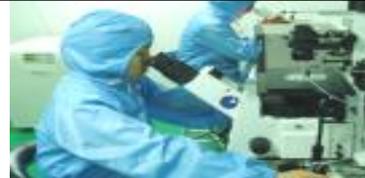
肾脏针尖状出血



膀胱出血



脾边缘梗死

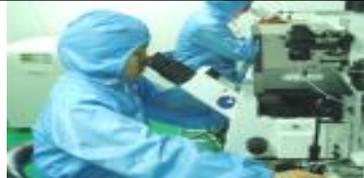


2、效力检验-E2苗组攻毒后无病变

2.8 猪瘟E2基因工程亚单位苗免疫组组织：



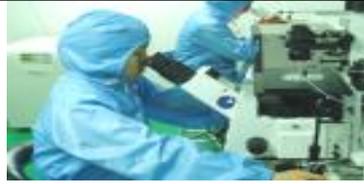
组织、器官无出血、无坏死、无病变



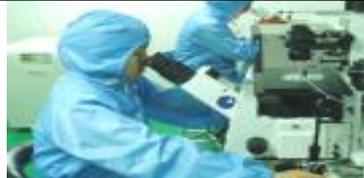
2、效力检验-攻毒试验

2.10 结论

猪瘟E2基因工程亚单位疫苗免疫后，猪瘟强毒攻毒，猪不表现临床症状且体内病毒快速清除，产生可靠的临床保护和病原学保护，完全抵御猪瘟野毒感染，攻毒保护效力与C株无差异。







NO _____ Date _____

Ev: 2-5144 ✓ ST
 : 7-6253 ✓ 29-6047 ✓
 4-6147 ✓ 24-A8978 ✓
 6-6032 ✓ 27-J027 ✓
 13-J059 ✓ 22-6144 ✓
 5-6141 ✓ 30-6146 ✓
 12-431 ✓ 23-6046 ✓
 16-4432 ✓ 28-6145 ✓
 8-549 ✓ 25-6100 ✓
 17-6148 ✓ 26-A0395 ✓
 11-6281 ✓ 21-572 ✓
 14-555 ✓ 32-6289 ✓
 15-6179 ✓ 33-A0374 ✓
 3-6025 ✓ 35-540 ✓
 -A8791 ✓ 36-3227 ✓
 9-J016 ✓ 34-363 ✓
 10-6295 ✓ 37-J036 ✓
 1441 ✓ 38-J004 ✓
 20-6138 ✓ #43
 -568 ✓
 39-4439 ✓

产仔数与胎重统计记录表 E2

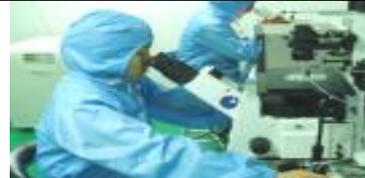
胎次	胎重	胎长	胎重	胎长	胎重	胎长
1	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7
2	1.3	1.6	1.9	2.2	2.5	2.8
3	1.4	1.7	2.0	2.3	2.6	2.9
4	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0
5	1.6	1.9	2.2	2.5	2.8	3.1
6	1.7	2.0	2.3	2.6	2.9	3.2
7	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3
8	1.9	2.2	2.5	2.8	3.1	3.4
9	2.0	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5
10	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6
11	2.2	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7
12	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8
13	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9
14	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0
15	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1
16	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2
17	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0	4.3
18	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4
19	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5
20	3.1	3.4	3.7	4.0	4.3	4.6
21	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7
22	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8
23	3.4	3.7	4.0	4.3	4.6	4.9
24	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0
25	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8	5.1
26	3.7	4.0	4.3	4.6	4.9	5.2
27	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3
28	3.9	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4
29	4.0	4.3	4.6	4.9	5.2	5.5
30	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3	5.6
31	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7
32	4.3	4.6	4.9	5.2	5.5	5.8
33	4.4	4.7	5.0	5.3	5.6	5.9
34	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7	6.0
35	4.6	4.9	5.2	5.5	5.8	6.1
36	4.7	5.0	5.3	5.6	5.9	6.2
37	4.8	5.1	5.4	5.7	6.0	6.3
38	4.9	5.2	5.5	5.8	6.1	6.4
39	5.0	5.3	5.6	5.9	6.2	6.5
40	5.1	5.4	5.7	6.0	6.3	6.6
41	5.2	5.5	5.8	6.1	6.4	6.7
42	5.3	5.6	5.9	6.2	6.5	6.8
43	5.4	5.7	6.0	6.3	6.6	6.9
44	5.5	5.8	6.1	6.4	6.7	7.0
45	5.6	5.9	6.2	6.5	6.8	7.1
46	5.7	6.0	6.3	6.6	6.9	7.2
47	5.8	6.1	6.4	6.7	7.0	7.3
48	5.9	6.2	6.5	6.8	7.1	7.4
49	6.0	6.3	6.6	6.9	7.2	7.5
50	6.1	6.4	6.7	7.0	7.3	7.6

产仔数与胎重统计记录表 ST

胎次	胎重	胎长	胎重	胎长	胎重	胎长
1	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7
2	1.3	1.6	1.9	2.2	2.5	2.8
3	1.4	1.7	2.0	2.3	2.6	2.9
4	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0
5	1.6	1.9	2.2	2.5	2.8	3.1
6	1.7	2.0	2.3	2.6	2.9	3.2
7	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3
8	1.9	2.2	2.5	2.8	3.1	3.4
9	2.0	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5
10	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6
11	2.2	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7
12	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8
13	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9
14	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0
15	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1
16	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2
17	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0	4.3
18	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4
19	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5
20	3.1	3.4	3.7	4.0	4.3	4.6
21	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7
22	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8
23	3.4	3.7	4.0	4.3	4.6	4.9
24	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0
25	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8	5.1
26	3.7	4.0	4.3	4.6	4.9	5.2
27	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3
28	3.9	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4
29	4.0	4.3	4.6	4.9	5.2	5.5
30	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3	5.6
31	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7
32	4.3	4.6	4.9	5.2	5.5	5.8
33	4.4	4.7	5.0	5.3	5.6	5.9
34	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7	6.0
35	4.6	4.9	5.2	5.5	5.8	6.1
36	4.7	5.0	5.3	5.6	5.9	6.2
37	4.8	5.1	5.4	5.7	6.0	6.3
38	4.9	5.2	5.5	5.8	6.1	6.4
39	5.0	5.3	5.6	5.9	6.2	6.5
40	5.1	5.4	5.7	6.0	6.3	6.6
41	5.2	5.5	5.8	6.1	6.4	6.7
42	5.3	5.6	5.9	6.2	6.5	6.8
43	5.4	5.7	6.0	6.3	6.6	6.9
44	5.5	5.8	6.1	6.4	6.7	7.0
45	5.6	5.9	6.2	6.5	6.8	7.1
46	5.7	6.0	6.3	6.6	6.9	7.2
47	5.8	6.1	6.4	6.7	7.0	7.3
48	5.9	6.2	6.5	6.8	7.1	7.4
49	6.0	6.3	6.6	6.9	7.2	7.5
50	6.1	6.4	6.7	7.0	7.3	7.6

动物标识喷雾剂
Animal Marker Spray

体验组 (E2)
 2016.12.12 首免
 2017.1.12 二免采血
 2017.2.12 二免回后采血



临床应用案例-对比流程

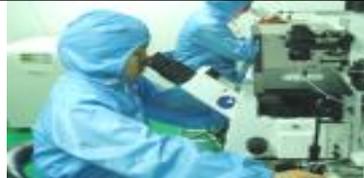
母猪：

组别	疫苗	动物数量	剂量	免疫程序	采血节点
妊娠A组	猪瘟E2基因工程苗	30头妊娠 56天母猪	1头份/头/次	间隔4周连续免疫两次	一免后4周、二免后4周
妊娠B组	猪瘟弱毒苗	30头妊娠 56天母猪	1头份/头/次	间隔4周连续免疫两次	一免后4周、二免后4周

商品猪：

组别	疫苗	动物	剂量	免疫程序	采血节点
A组	猪瘟E2基因工程苗	妊娠A组所产商品猪	1头份/头/次	28天首免，60天二免	2周龄、3周龄、6周龄、10周龄
B组	猪瘟弱毒苗	妊娠B组所产商品猪	1头份/头/次	28天首免，60天二免	2周龄、3周龄、6周龄、10周龄
C组	无	A组20头 B组20头	无	无	2周龄、3周龄、6周龄、10周龄

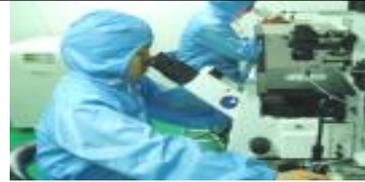
注：商品猪在10周龄后全部出售，抗体监测结束。



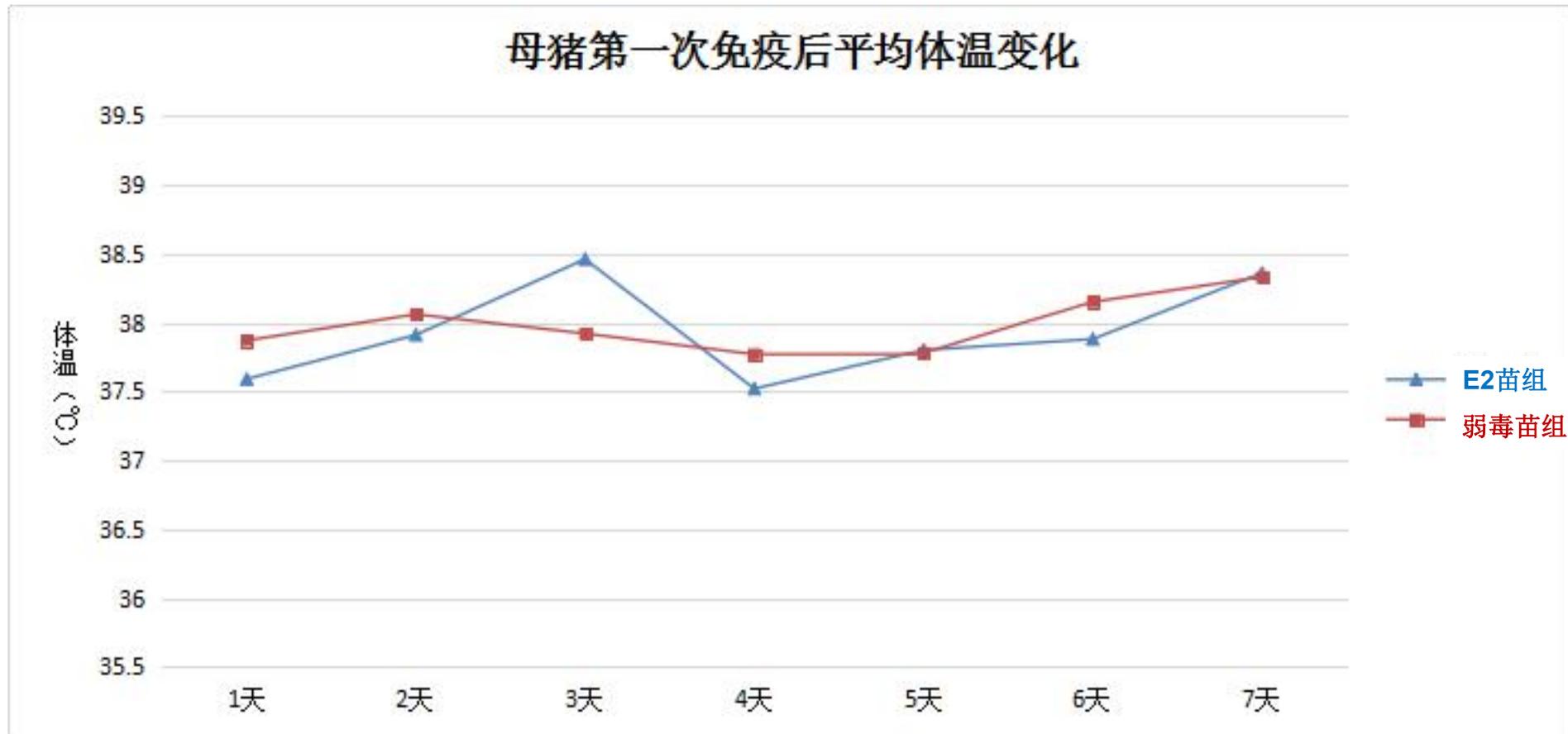
临床应用案例-对比参数

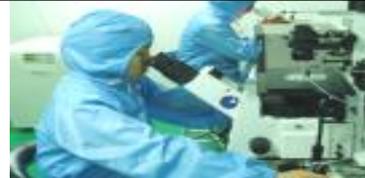
➤ 体温

➤ ELISA抗体（韩国金诺，集团内部检测）

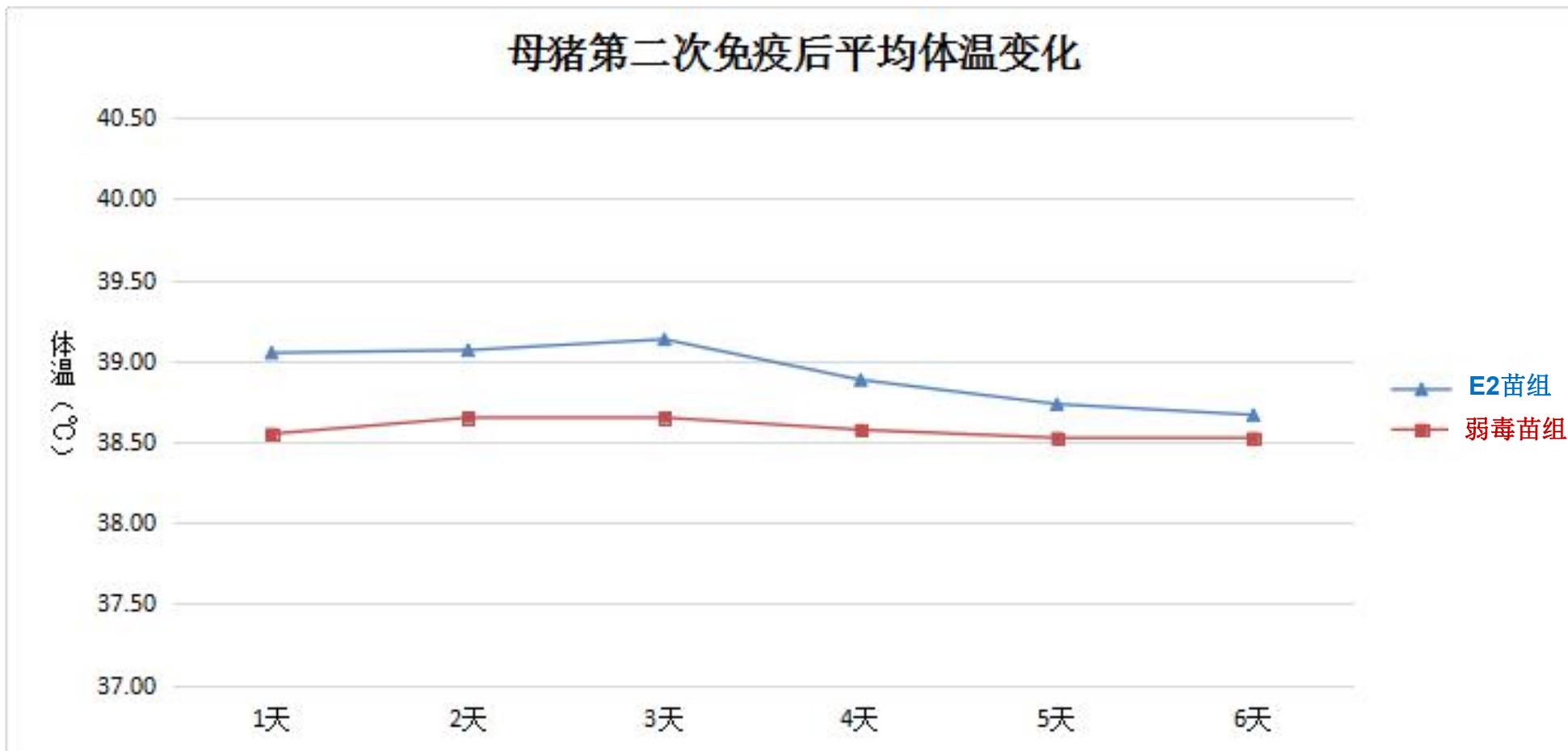


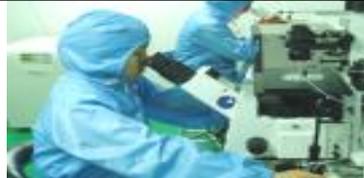
临床应用案例-体温监测结果





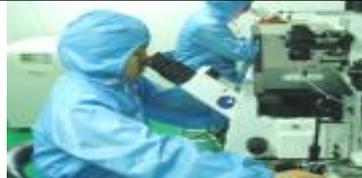
临床应用案例-体温监测结果



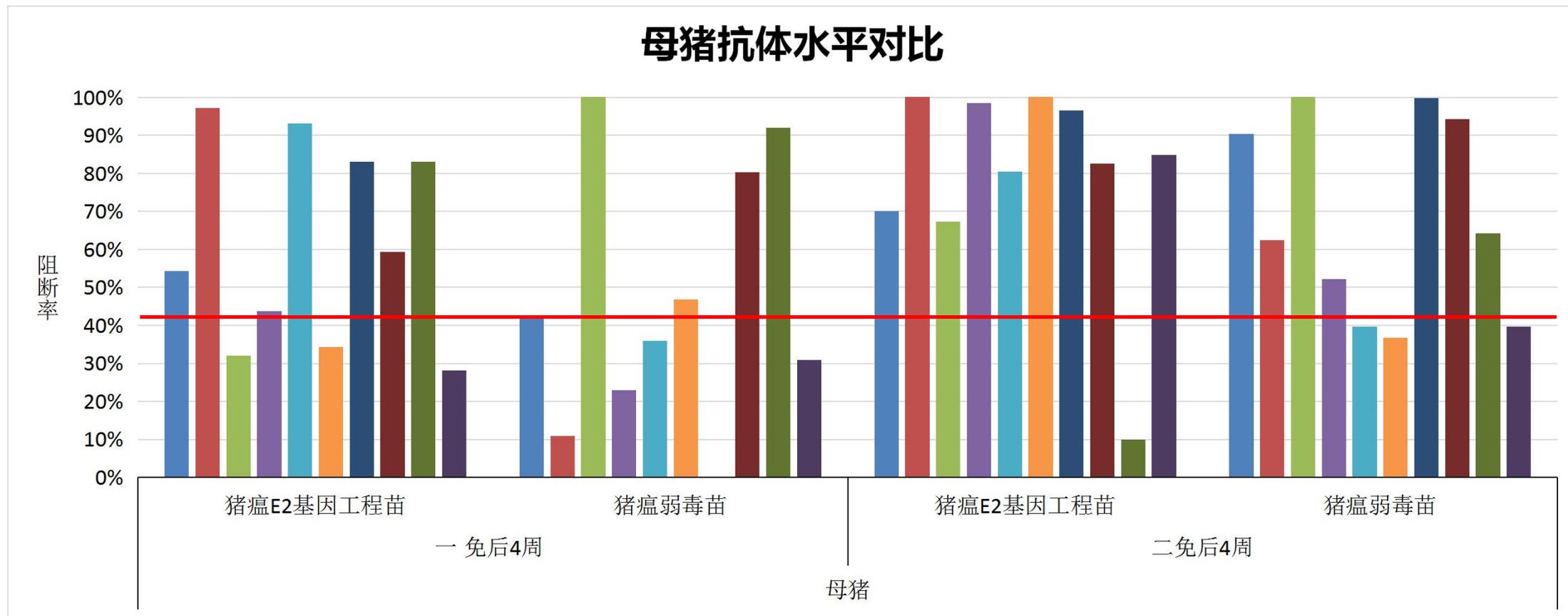


临床应用案例-体温监测结果小结

- 母猪群第1次免后7天内，两个免疫组猪的体温都表现正常，未发现体温升高，提示本次免疫应激小，疫苗安全性好。
- 母猪群第2次免疫后第1天，猪瘟E2基因工程苗免疫组1头母猪体温稍微升高，之后持续下降，第4天体温恢复正常；其他母猪体温未发现体温升高，提示本次免疫应激小，疫苗安全性好。



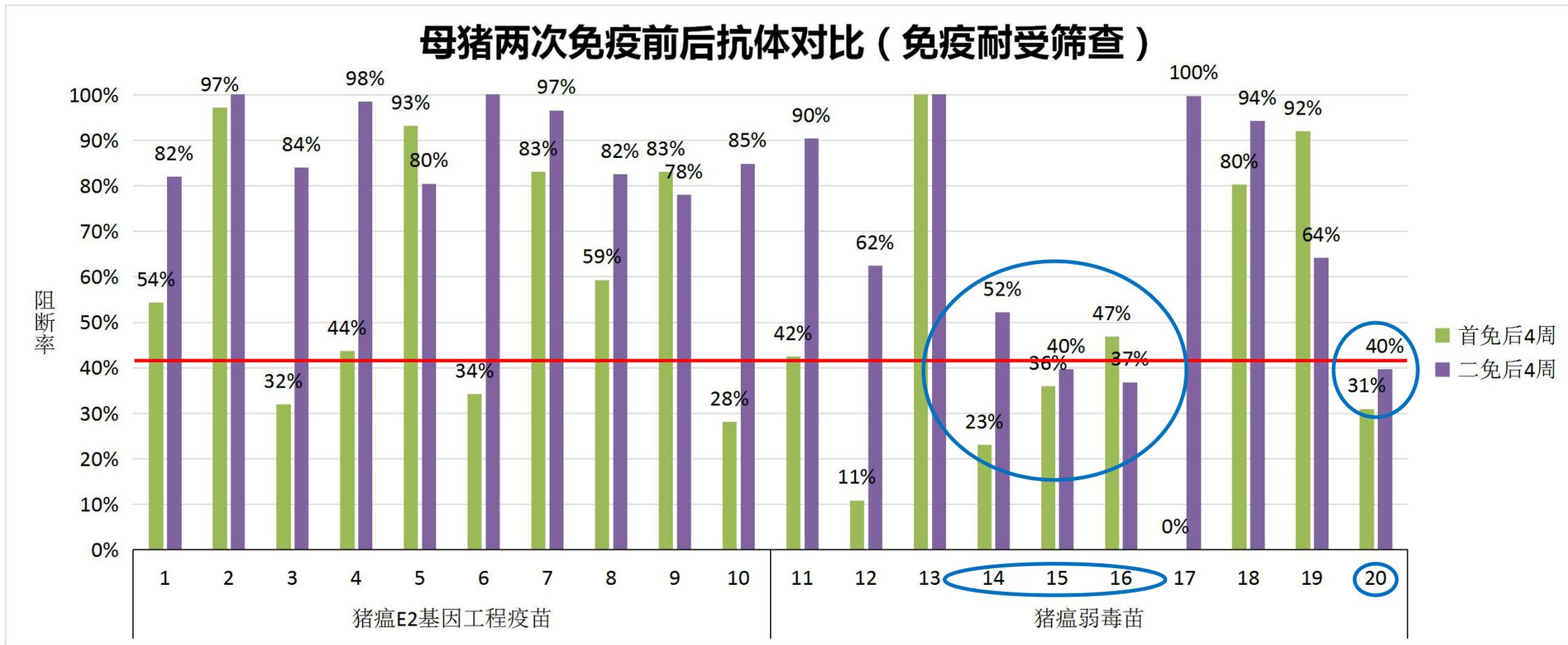
临床应用案例-母猪抗体监测结果



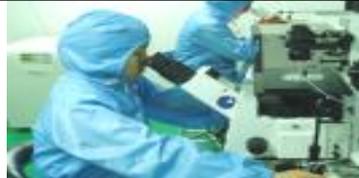
注：红线以上为阳性。



临床应用案例-免疫耐受筛查

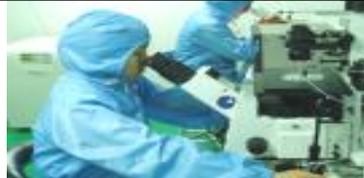


注：红线以上为阳性。



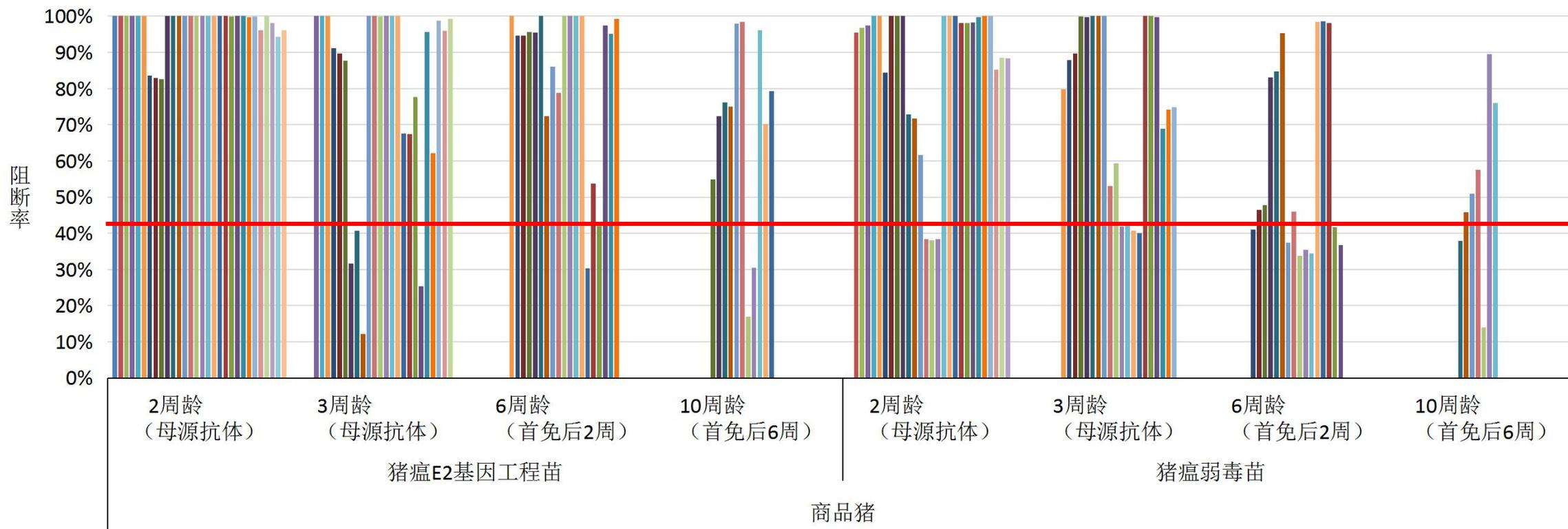
临床应用案例-免疫耐受筛查小结

- 间隔4周连续免疫两次，猪瘟弱毒苗免疫组中14号、15号、16号和20号母猪的抗体阻断率始终徘徊40%左右，抗体水平没有上升，提示这4头猪可能对猪瘟兔化弱毒苗（C株）免疫耐受。
- 猪瘟E2基因工程苗免疫组未发现免疫耐受现象。

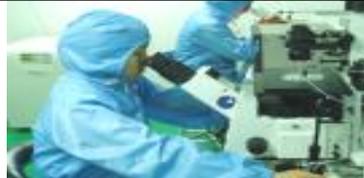


临床应用案例-商品猪首免无母源抗体干扰

商品猪抗体水平对比

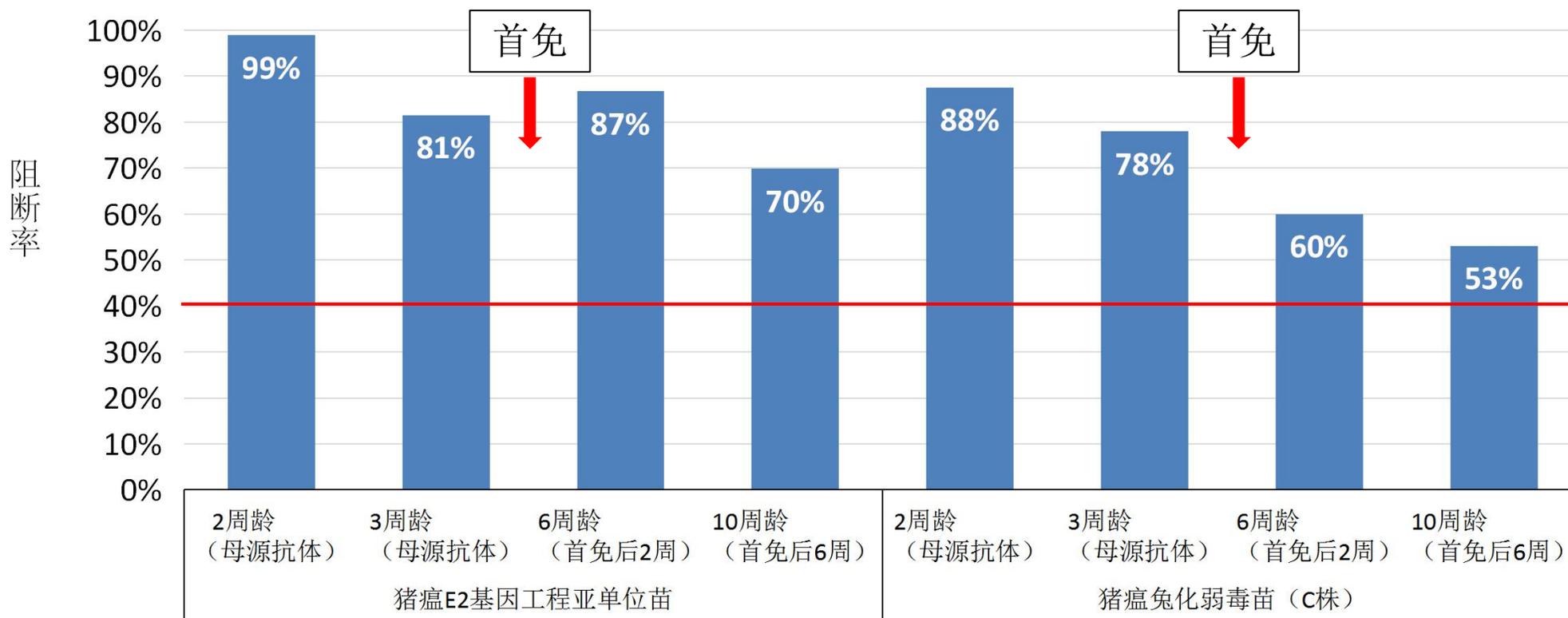


注：红线以上为阳性。28天首免，60天二免

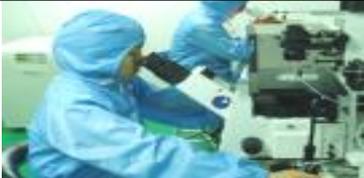


临床应用案例-商品猪首免无母源抗体干扰

商品猪猪瘟抗体阻断率平均值

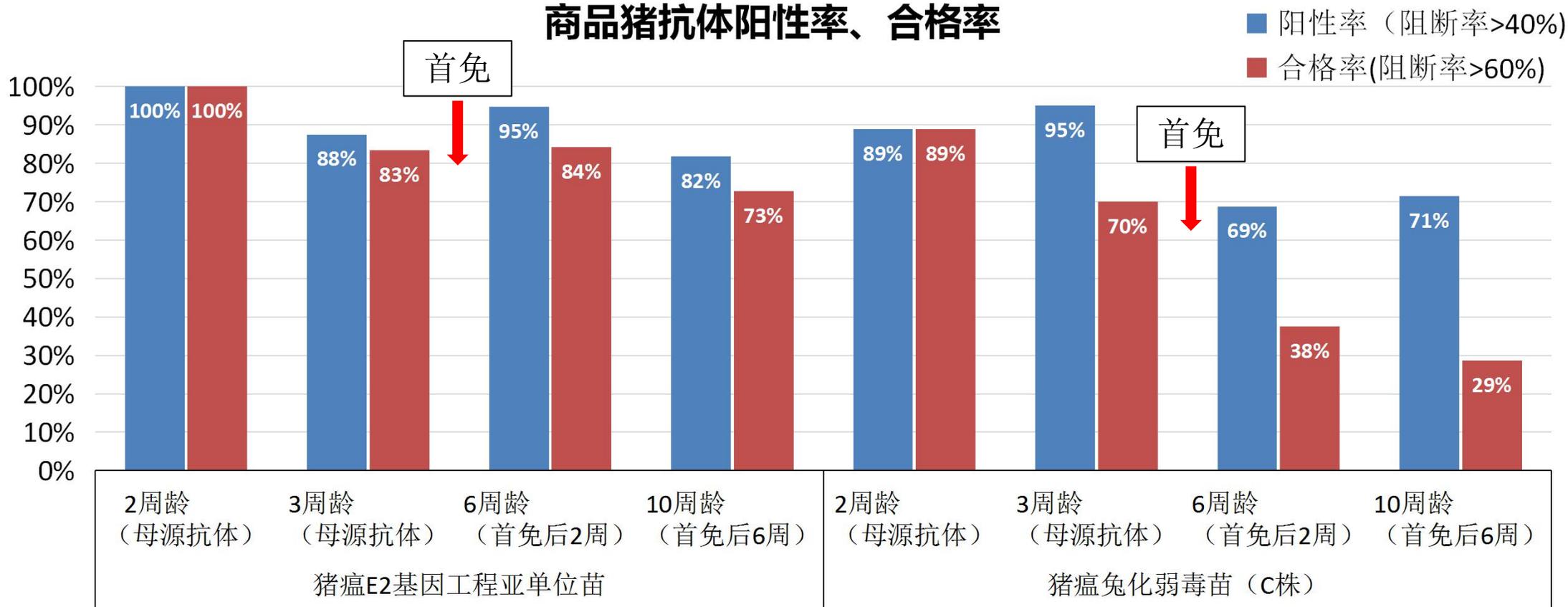


注：红线以上为阳性。28天首免，60天二免

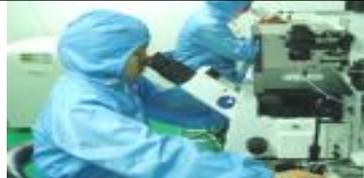


临床应用案例-商品猪首免无母源抗体干扰

商品猪抗体阳性率、合格率

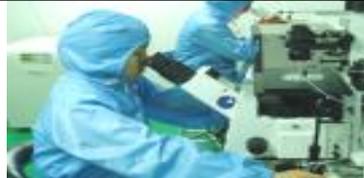


注：阻断率>40%为阳性，阻断率>60%为合格。



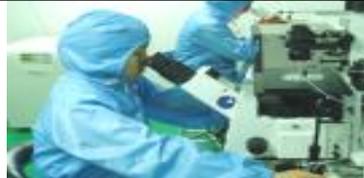
临床应用案例-母源抗体干扰小结

- 猪瘟E2基因工程亚单位苗免疫组**未发现母源抗体干扰现象。**
- 猪瘟兔化弱毒苗（C株）免疫组**首免时受母源抗体干扰严重，猪群出现保护空白期，易感猪瘟。**



上一阶段临床应用总结

- 30万头份，**“0” 副反应。**
- 在猪群抗体对比中，**猪瘟E2基因工程亚单位疫苗明显好于C株。**
- 猪瘟E2基因工程亚单位苗**可以解决猪瘟免疫现有的4个问题。**



总结

猪瘟E2基因工程亚单位疫苗的特点

- 1、安全性有足够保障。
- 2、全面的临床保护和病原学保护，完全抵御猪瘟野毒感染。
- 3、母猪免后抗体水平高而整齐，**不存在免疫耐受**。
- 4、**避免母源抗体干扰**，商品猪首免后抗体阳性率高。
- 5、可区别免疫抗体和野毒感染抗体，**实现猪瘟净化**。

Thank you!

E2 未来，我们一起见证