

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.10.02

# 猪丹毒丝菌生产用菌种 CVCC43005 株 最高扩繁代次的确定及疫苗佐剂的筛选

张媛, 魏财文, 李建, 张一帜, 辛凌翔, 王秀丽, 彭国瑞, 刘博, 蒋玉文\*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2019-08-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 10-0007-08 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 为研究猪丹毒丝菌 CVCC43005 株作为生产用菌种的最高扩繁代次以及新型佐剂对该菌种免疫原性的影响, 在对猪丹毒丝菌 CVCC43005 株形态、生化特性、培养特性、纯粹性、血清学特性、真空度、剩余水分含量、毒力及免疫原性等研究的基础上, 建立了猪丹毒丝菌 CVCC43005 株种子批。将 CVCC43005 株(1986 年冻干)用培养基进行了 20 次传代(F1~F20), 并对其中的 F5、F10、F15、F20 代进行冻干并抽检测定。结果显示: 抽检的各代次菌种均纯粹, 形态、生化特性、培养特性均符合猪丹毒丝菌的特性, 血清型为 2 型, 真空度检查均呈现白色、粉色或紫色辉光, 剩余水分含量均 <3.0%, 9~10 CFU 活菌皮下注射体重 18~22 g 小白鼠, 均于 7 日内 5/5 死亡。将抽检的各代次菌种制成铝胶佐剂灭活疫苗, 免疫 16~18 g 小白鼠后均能产生 10/10 保护。以 F5 代菌株制备菌液, 甲醛灭活后, 分别用铝胶佐剂、矿物质白油佐剂、洛阳赛威公司的水溶性佐剂、水性复合免疫佐剂以及法国赛比克公司的 MONTANIDE™IMS1313VGNST、GEL01PR 6 种佐剂制备灭活疫苗, 经无菌及安全检查合格后进行 16~18 g 小白鼠免疫效果对比实验, 最终确定猪丹毒丝菌 CVCC43005 株基础种子代数为 F1~F10 代, 生产用菌种的最高扩繁代次宜控制在 5 代以内, 法国赛比克公司的 GEL01PR 佐剂为猪丹毒灭活疫苗的最佳佐剂。该菌种作为生产用菌种最高扩繁代次的确定及疫苗佐剂的筛选, 为修订菌种检定依据奠定了基础。

**[关键词]** CVCC43005 株; 种子批; 建立; 佐剂

## Determination of the Highest Expansion Generation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Strain CVCC43005 for Production and Screening of Vaccine Adjuvant

ZHANG Yuan, WEI Cai-wen, LI Jian, ZHANG Yi-zhi, XIN Ling-xiang,  
WANG Xiu-li, PENG Guo-rui, LIU Bo, JIANG Yu-wen\*

**作者简介:** 张媛, 副研究员, 从事需氧菌类生物制品的检测工作; 魏财文, 副研究员, 从事细菌类兽用生物制品的检验及管理工作, 为共同第一作者。

**通讯作者:** 蒋玉文。E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Yu-wen, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

**Abstract:** The CVCC43005 strain was conducted experiments of morphology, biochemical characteristics, culture characteristics, purity, serological characteristics, vacuum degree, residual moisture content, virulence and immunogenicity. A seed batch of *E. rhusiopathiae* was established. The CVCC43005 strain (lyophilized in 1986) was subjected to passage for 20 times (F1 to F20), and the F5, F10, F15 and F20 generations were lyophilized. All the results of the four batches freeze-dried strains were satisfied. Each batch freeze-dried strains were pure, and the morphology, biochemical characteristics and culture characteristics were consistent with the characteristics of *E. rhusiopathiae*. The serotype was type 2, and the vacuum test was white, pink or purple glow, residual water content were below 3.0%, 9~10 CFU live bacteria subcutaneous injection of 18~22 g mice, 5/5 died within 7 days. The samples of each generation were made into inactivated vaccines with aluminum gel adjuvant, which could 10/10 protect 16~18 g mice after challenge. Prepare the bacterial solution with F5 generation strain, after inactivation with formaldehyde, respectively using aluminum glue adjuvant, mineral white oil adjuvant, water-soluble adjuvant (Luoyang Saiwei), water-based compound adjuvant (Luoyang Saiwei), MONTANIDE™ IMS1313VGNST (Seppic) and GEL01PR (Seppic) to prepare inactivated vaccines. After sterility and safety test, the immune effect compared experiments were conducted. It is finally determined that the basic seed number of *E. rhusiopathiae* strain CVCC43005 is F1~F10 generation, and the highest expansion for production strain is 5 generations; the GEL01PR(Seppic) is the best *E. rhusiopathiae* inactivated vaccine adjuvant. The determination of the strain as the highest expansion of production strains and the screening of vaccine adjuvants provided the foundation for the revision of the strains.

**Key words:** CVCC43005; bacteria seed lot; establish; adjuvant

猪丹毒是由丹毒丝菌引起的一种严重威胁养猪业的重要传染病,其临床特征为高热、急性败血症、皮肤疹块、慢性心内膜炎,或皮肤坏死与多发性非化脓性关节炎,临床上常与猪圆环病毒、猪细小病毒、猪肺炎支原体等病原混合感染,同时丹毒也是一种人和其它多种动物都能感染的共患病。接种猪丹毒疫苗是预防猪丹毒的一种重要手段,丹毒丝菌 CVCC43005 株是猪丹毒灭活疫苗的生产用菌株,由中国兽医药品监察所负责检定、保管和供应,具有自主知识产权,该菌种毒力稳定、免疫原性好,是一株优良的疫苗株<sup>[1]</sup>。该菌种现有检定依据为《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇年版,第5次修订)<sup>[2]</sup>,该标准执行至今已近20年,其明确了 CVCC43005 株菌种基础种子代数,但没

有明确生产种子最高扩繁代数,且菌种免疫原性是其制备为氢氧化铝胶佐剂疫苗后通过小鼠的免疫攻毒实验予以评价。近20年来市场上已经出现多种新型佐剂,这些佐剂对菌种免疫原性是否有所影响不得而知。为研究该菌种作为生产用菌种的最高扩繁代数以及新型佐剂对该菌种免疫原性的影响,建立了猪丹毒丝菌 CVCC43005 株的种子批,并对不同佐剂进行筛选,为修订菌种检定依据奠定了基础。

## 1 材料与方法

1.1 菌株 CVCC43005 株 F5、F10、F15、F20 代冻干菌种,检验用 CVCC43008 株、CVCC43006 株菌种,均由中国兽医药品监察所冻干、保存。

1.2 培养基及试剂 猪丹毒培养基、革兰氏染色

液,购自购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。TSA 培养基,购自 BD 公司。TG 培养基、TSB 培养基、5% 蔗糖脱脂牛奶,购自北京中海动物保健科技公司。马血清,购自 Gbico 公司。细菌鉴定试剂盒,购自 Biomerieux 公司。裂解血细胞全血、猪丹毒分型血清、猪丹毒抗体阳性血清、猪丹毒抗体阴性血清、矿物质白油、氢氧化铝胶、40% 氢氧化铝胶生理盐水,由中国兽医药品监察所细菌制品检测室提供。MONTANIDE™IMS1313VGNST 佐剂、GEL01PR 佐剂,购自法国赛比克公司。水溶性佐剂、水性复合免疫佐剂由洛阳赛威公司赠送。

1.3 实验动物 16 ~ 18 g ICR 小白鼠、18 ~ 22 g ICR 小白鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.4 种子批的建立 以具有良好毒力、免疫原性、繁殖特性和纯净性的 1986 年冻干的 CVCC43005 菌株为原始种子,将原始种子用含 4% 马血清及 0.1% 裂解血细胞全血 TSA 培养基连续传代,每代于 37 °C 培养 24 h,各代命名为 F1 ~ F20。将生长纯粹的 F5、F10、F15、F20 代菌分别用 5% 蔗糖脱脂牛奶洗下后分装安瓿,冻干,抽真空后融封,用于后续检定,依据检定结果建立种子批。

1.5 形态 取菌种培养物进行革兰氏染色,镜检。

1.6 生化特性 参照试剂的使用说明书检定。

1.7 培养特性 菌种接种含 4% 马血清及 0.1% 裂解血细胞全血 TSA 平板,37 °C 培养 48 h,观察细菌生长特性。

1.8 血清学特性 参照试剂的使用说明书检定。

1.9 纯粹 按《中国兽药典》2015 年版要求进行检定<sup>[3]</sup>。

1.10 真空度 按《中国兽药典》2015 年版要求进行检定<sup>[3]</sup>。

1.11 剩余水分 按《中国兽药典》2015 年版要求进行检定<sup>[3]</sup>。

1.12 毒力 参照《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版<sup>[2]</sup>用小鼠进行最小致死剂量测定。将 F5、F10、F15 和 F20 代菌种分别用猪丹毒

培养基制备成菌液后,皮下注射体重 18 ~ 22 g 小白鼠,根据菌液预数结果,将菌液稀释为 1、3、5、7、9、11、13、15 CFU/0.2 mL,每个剂量组注射 5 只小鼠,每只小鼠注射 0.2 mL,同时对菌液进行复数,根据复数结果计算每个剂量组小鼠实际注射的活菌数。7 个观察日内记录小鼠死亡情况,结合每只小鼠实际注射的活菌数判定各代次菌种对于小鼠的毒力。

1.13 免疫原性 用小鼠进行免疫原性检定。将 F5、F10、F15、F20 代菌种参照《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版<sup>[2]</sup>分别制备成氢氧化铝胶灭活抗原。取 100 只 16 ~ 18 g 小白鼠分为 12 组。第 1、2、3、4 组,每组 10 只,分别皮下注射 F5、F10、F15、F20 代灭活抗原 0.1 mL;第 5、6、7、8 组,每组 10 只,分别皮下注射 F5、F10、F15、F20 代灭活抗原 40% 氢氧化铝胶生理盐水 4 倍稀释液 0.2 mL;第 9、10、11、12 组,每组 5 只,不注射疫苗,作为对照组。免疫 21 d 后,每个免疫组各取 5 只小鼠,连同对照小鼠 5 只各注射 1000 MLD(最小致死量,Minimum Lethal Dose) CVCC43008 强毒菌液,另取 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43008 强毒菌液;每个免疫组剩余 5 只小鼠,连同对照小鼠 5 只各注射 1000 MLD CVCC43006 强毒菌液,另取 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43006 强毒菌液。攻毒后观察 10 d,统计保护率。

1.14 小鼠最小免疫剂量测定 将 F5 代菌株制备的菌液活菌计数后,经甲醛灭活,取灭活菌液 40 mL,与 8 mL 氢氧化铝胶充分混匀后置 2 ~ 8 °C 静置 2 d 后弃去上清 28 mL,其作为抗原原液。用 40% 氢氧化铝胶生理盐水将抗原原液进行 4 倍、8 倍、16 倍稀释,取各稀释度抗原免疫 16 ~ 18 g 小白鼠,每个剂量免疫 10 只小鼠。免疫 21 d 后,每个免疫组各取 5 只小鼠,连同对照小鼠 5 只各注射 1000 MLD CVCC43008 强毒菌液,另取 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43008 强毒菌液;每个免疫组剩余 5 只小鼠,连同对照小鼠 5 只各注射 1000 MLD CVCC43006 强毒菌液,另取 5 只对照小鼠注射

1 MLD CVCC43006 强毒菌液。攻毒后观察 10 d, 统计保护率。

1.15 不同佐剂疫苗的制备 分别将 F5 代菌株制备的甲醛灭活菌液用铝胶佐剂、矿物质白油佐剂、洛阳赛威公司的水溶性佐剂、水性复合免疫佐剂以及法国赛比克公司的 MONTANIDE™ IMS1313VGNST、GEL01PR 6 种佐剂按各自使用说明制备猪丹毒灭活疫苗。然后参照《中国兽药典》2015 年版要求进行性状和无菌检验<sup>[3]</sup>。

1.15.1 铝胶佐剂疫苗的制备 灭活菌液 5 份加灭菌的氢氧化铝胶 1 份, 充分混合均匀后, 静置沉淀 3 日, 弃去上清, 浓缩至全量的 2/5, 充分混合。用 40% 氢氧化铝胶生理盐水进行 8 倍、16 倍、32 倍稀释, 分别标记铝 1、铝 2、铝 3。

1.15.2 白油佐剂疫苗的制备 灭活菌液 5 份加灭菌的氢氧化铝胶 1 份, 充分混合均匀后, 静置沉淀 3 日, 弃去上清, 浓缩至全量的 2/5, 充分混合。用 40% 氢氧化铝胶生理盐水进行 4 倍、8 倍、16 倍稀释, 取稀释后的抗原分别与吐温-80 混匀作为水相, 再分别与等量的油相进行乳化, 乳化后分别标记油 1、油 2、油 3。

1.15.3 水溶性佐剂疫苗的制备 灭活菌液 5 份加灭菌的氢氧化铝胶 1 份, 充分混合均匀后, 静置沉淀 3 日, 弃去上清, 浓缩至全量的 2/5, 充分混合。用 40% 氢氧化铝胶生理盐水进行 4 倍、8 倍、16 倍稀释, 取稀释后的抗原分别与等量的水溶性佐剂混匀, 分别标记水 1、水 2、水 3。

1.15.4 水性复合免疫佐剂疫苗的制备 灭活菌液 5 份加灭菌的氢氧化铝胶 1 份, 充分混合均匀后, 静置沉淀 3 日, 弃去上清, 浓缩至全量的 2/5, 充分混合。用 40% 氢氧化铝胶生理盐水进行 4 倍、8 倍、16 倍稀释, 取稀释后的抗原分别与等量的水性复合免疫佐剂混匀, 分别标记复 1、复 2、复 3。

1.15.5 IMS1313VGNST 佐剂疫苗的制备 灭活菌液 5 份加灭菌的氢氧化铝胶 1 份, 充分混合均匀后, 静置沉淀 3 日, 弃去上清, 浓缩至全量的 2/5, 充分混合。用 40% 氢氧化铝胶生理盐水进行 4 倍、

8 倍、16 倍稀释, 取稀释后的抗原分别与等量的 IMS1313VGNST 佐剂混匀, 分别标记 IMS1、IMS2、IMS3。

1.15.6 GEL01PR 佐剂疫苗的制备 灭活菌液用 PBS 进行 4 倍、8 倍、16 倍稀释, 取稀释后的抗原分别与 GEL01PR 佐剂按 9:1 的比例混匀, 分别标记 GEL1、GEL2、GEL3。

1.16 疫苗安全检验 取 180 只 18~22 g 小白鼠, 随机分成 18 组, 每组 10 只, 分别于背部皮下注射标记为铝 1、铝 2、铝 3、油 1、油 2、油 3、水 1、水 2、水 3、复 1、复 2、复 3、IMS1、IMS2、IMS3、GEL1、GEL2、GEL3 的灭活疫苗 0.3 mL/只, 观察 10 日。

1.17 疫苗效力检验 取 200 只 16~18 g 小白鼠, 随机分成 22 组。其中 1~18 组, 每组 10 只, 分别于背部皮下注射标记为铝 1、铝 2、铝 3、油 1、油 2、油 3、水 1、水 2、水 3、复 1、复 2、复 3、IMS1、IMS2、IMS3、GEL1、GEL2、GEL3 的灭活疫苗 0.1 mL/只; 第 19、20、21、22 组, 每组 5 只, 不注射疫苗, 作为对照组。免疫 21 d 后, 每个免疫组各取 5 只小鼠, 连同对照小鼠 5 只各注射 1000 MLD CVCC43008 强毒菌液, 另取 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43008 强毒菌液; 每个免疫组剩余 5 只小鼠, 连同对照小鼠 5 只各注射 1000 MLD CVCC43006 强毒菌液, 另取 5 只对照小鼠注射 1 MLD CVCC43006 强毒菌液。攻毒后观察 10 d, 统计保护率。

## 2 结果与分析

2.1 形态 经染色观察, F5、F10、F15、F20 代菌种均为革兰氏阳性纤细小杆菌。

2.2 生化特性 F5、F10、F15、F20 代菌种的生化特性均符合猪丹毒丝菌的特性。

2.3 培养特性 F5、F10、F15、F20 代菌种在含 4% 马血清及 0.1% 裂解血细胞全血 TSA 平板上均生长为形态完整的呈微蓝灰色露珠状小菌落, 在低倍显微镜下观察, 菌落可呈光滑型或粗糙型, 菌落中部含有黄褐色点状颗粒。

2.4 血清学特性 F5、F10、F15、F20 代菌种的血清型均为 2 型。

2.5 纯粹 F5、F10、F15、F20 代菌种均纯粹,没有杂菌生长。

2.6 真空度 将失真空的 F5、F10、F15、F20 代菌株淘汰,保留的菌株真空度检查均呈现白色、粉色或紫色辉光。

2.7 剩余水分 F5、F10、F15、F20 代菌株剩余水分测定结果见表 1,各代次冻干菌株剩余水分含量均 <3.0%。

2.8 毒力 F5、F10、F15、F20 代菌株对小鼠最小致死剂量测定结果见表 2,9~10 CFU 活菌皮下注射体重 18~22 g 小白鼠,均于 7 日内 5/5 死亡。

2.9 免疫原性 F5、F10、F15、F20 代菌株对小鼠免疫原性测定结果见表 3,各代次菌株制备成灭活抗原后,按两个剂量组免疫小鼠,每只小鼠分别免疫灭活抗原 0.1 mL 及灭活抗原 4 倍稀释液 0.2 mL。免疫小鼠攻击 1000 MLD 强毒菌液全部健活,对照小鼠攻击 1000 MLD 强毒菌液全部死亡,攻击

1 MLD 强毒菌液 C43-6 株 5/5 死亡,C43-8 株 4/5 死亡。各代次菌株免疫原性没有变化,较为稳定。

表 1 不同代次菌株剩余水分含量

Tab 1 The residual water content of different generations of strains

菌株代次	剩余水分含量
F5	1.0%、0.7%、0.4%、1.3%
F10	0.6%、0.8%、0.9%、0.6%
F15	1.3%、0.6%、0.6%、0.8%
F20	0.9%、1.0%、0.6%、0.8%

表 2 不同代次菌株对小鼠的最小致死剂量

Tab 2 The MLD to mice of different generations of strains

菌株代次	最小致死剂量/(CFU·0.2 mL <sup>-1</sup> )
F5	10
F10	9
F15	10
F20	9

表 3 不同代次菌株对小鼠的免疫原性

Tab 3 The immunogenicity to mice of different generations of strains

菌株代次	攻击 CVCC 43006 组健活只数/注射只数				攻击 CVCC 43008 组健活只数/注射只数			
	免疫组		1000MLD 对照组	1MLD 对照组	免疫组		1000MLD 对照组	1MLD 对照组
	剂量 1*	剂量 2*			剂量 1*	剂量 2*		
F5	5/5	5/5			5/5	5/5		
F10	5/5	5/5			5/5	5/5		
F15	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	1/5
F20	5/5	5/5			5/5	5/5		

剂量 1 为每只小鼠皮下注射灭活抗原 0.1 mL; 剂量 2 为每只小鼠皮下注射灭活抗原 40% 氢氧化铝胶生理盐水 4 倍稀释液 0.2 mL

2.10 小鼠最小免疫剂量 F5 代菌株制备的氢氧化铝佐剂灭活疫苗对小鼠最小免疫剂量为 2.1 × 10<sup>8</sup> CFU/只 (灭活前菌液含有的活菌数), 攻击 1000 MLD CVCC43006 及 CVCC43008 株免疫组小

鼠均全部健活,对照组小鼠攻击 1000 MLD 组均 5/5 死亡,攻击 1MLD 组均 4/5 死亡。结果见表 4。

2.11 疫苗性状及无菌检验 6 种疫苗均无菌生长,其性状检验结果见表 5。

表 4 F5 代菌株制备的氢氧化铝胶佐剂灭活疫苗对小鼠的最小免疫剂量

Tab 4 The minimum immune dose to mice of the inactivated aluminum hydroxide colloid vaccine prepared by F5 generation strain

免疫剂量	抗原含量 /(10 <sup>8</sup> CFU·只 <sup>-1</sup> )	攻击 CVCC 43006 组健活只数/注射只数			攻击 CVCC 43008 组健活只数/注射只数		
		免疫组	1000MLD 对照组	1MLD 对照组	免疫组	1000MLD 对照组	1MLD 对照组
原液皮下 0.1 mL	34	5/5			5/5		
原液皮下 0.05 mL	17	5/5			5/5		
4 倍稀释液皮下 0.2 mL	17	5/5			5/5		
4 倍稀释液皮下 0.1 mL	8.5	5/5			5/5		
4 倍稀释液皮下 0.05 mL	4.2	5/5	0/5	1/5	5/5	0/5	1/5
8 倍稀释液皮下 0.1 mL	4.2	5/5			5/5		
8 倍稀释液皮下 0.05 mL	2.1	5/5			5/5		
16 倍稀释液皮下 0.1 mL	2.1	5/5			5/5		
16 倍稀释液皮下 0.05 mL	1.1	5/5			4/5		

表 5 不同佐剂疫苗性状检验

Tab 5 The appearance of the vaccines prepared by different adjuvants

佐剂	性状
铝胶佐剂	静置后,上层为澄清液体,下层有少量沉淀,振摇后呈均匀混悬液。
矿物质白油佐剂	均匀乳剂。
水溶性佐剂	静置后,上层为澄清液体,下层有少量沉淀,振摇后呈均匀混悬液。
水性复合免疫佐剂	静置后,上层为澄清液体,下层有少量沉淀,振摇后呈均匀混悬液。
IMS1313VGNST 佐剂	均匀乳剂,静置后下层有少量沉淀。
GEL01PR 佐剂	静置后,上层为澄清液体,下层有少量沉淀,振摇后呈均匀混悬液。

2.12 疫苗安全检验 6 种疫苗 18 个组注射的 180 只小鼠于 10 个观察日内精神、采食均正常,但氢氧化铝胶佐剂疫苗、IMS1313VGNST 佐剂疫苗及矿物质白油佐剂疫苗注射的小鼠,注射部位会出现

肿胀、硬结、破溃等不良反应,结果见表 6 及图 1。

2.13 疫苗效力检验 6 种疫苗效力检验结果表明使用 GEL01PR 佐剂、铝胶佐剂、矿物质白油佐剂制备的疫苗免疫效果最好(表 7)。

表 6 不同佐剂疫苗注射局部反应

Tab 6 The local reactions after injection of the vaccines prepared by different adjuvants

组别	注射抗原含量 /(10 <sup>8</sup> CFU·只 <sup>-1</sup> )	不良反应只数 /注射只数	组别	注射抗原含量 /(10 <sup>8</sup> CFU·只 <sup>-1</sup> )	不良反应只数 /注射只数	组别	注射抗原含量 /(10 <sup>8</sup> CFU·只 <sup>-1</sup> )	不良反应只数 /注射只数
铝 1	12.6	10/10	水 1	12.6	0/10	IMS1	12.6	10/10
铝 2	6.3	10/10	水 2	6.3	0/10	IMS2	6.3	10/10
铝 3	3.2	10/10	水 3	3.2	0/10	IMS3	3.2	10/10
油 1	12.3	10/10	复 1	12.6	0/10	GEL1	13.1	0/10
油 2	6.2	10/10	复 2	6.3	0/10	GEL2	6.6	0/10
油 3	3.1	10/10	复 3	3.2	0/10	GEL3	3.3	0/10



图 1 小鼠注射局部不良反应

Fig 1 The local adverse reactions to mice after injection

表 7 不同佐剂疫苗效力检验

Tab 7 The effectiveness test of the vaccines prepared by different adjuvants

组别	抗原含量 /(10 <sup>8</sup> CFU·只 <sup>-1</sup> )	攻击 CVCC 43006 组健活只数/注射只数			攻击 CVCC 43008 组健活只数/注射只数		
		免疫组	1000MLD 对照组	1MLD 对照组	免疫组	1000MLD 对照组	1MLD 对照组
铝 1	4.2	5/5			5/5		
铝 2	2.1	5/5			5/5		
铝 3	1.0	4/5			4/5		
油 1	4.1	5/5			5/5		
油 2	2.0	5/5			5/5		
油 3	1.0	3/5			4/5		
水 1	4.2	4/5			5/5		
水 2	2.1	4/5			5/5		
水 3	1.0	5/5			3/5		
复 1	4.2	5/5	0/5	1/5	5/5	0/5	1/5
复 2	2.1	5/5			4/5		
复 3	1.0	4/5			5/5		
IMS1	4.2	5/5			4/5		
IMS2	2.1	5/5			4/5		
IMS3	1.0	5/5			3/5		
GEL1	4.4	5/5			5/5		
GEL2	2.2	5/5			5/5		
GEL3	1.1	5/5			4/5		

### 3 讨论与结论

小鼠对丹毒丝菌的毒力及免疫原性的反应是与猪的反应呈正相关的,目前国内市场上现有的猪丹毒产品均用小鼠来评价疫苗的安全性及效力,国外研究学者也是用小鼠来评价丹毒丝菌保护性抗原的免疫效果<sup>[4-6]</sup>,用耗费资源更少的小鼠替代猪进行菌株毒力、免疫原性以及疫苗安全性和效力的评价,是遵循动物实验 3R 原则的体现。

经一定途径在一定时间内能使一组实验动物全部致死的最小微生物剂量为 1 MLD,但在实际操作过程中由于动物个体反应及菌液混合均匀度、注射剂量准确性等不确定因素的影响,有时注射 1 MLD 的对照动物组无法达到 100% 死亡,目前市场上现有的猪丹毒产品对于攻击 1 MLD 强毒菌液对照组小鼠要求 2/3 死亡(即死亡率为 66.7%)。本试验中不论最小免疫剂量的测定、菌种免疫原性的测定还是疫苗效力检验,攻击 1 MLD 强毒菌液对照组小鼠的死亡率均达到了 80% 以上,对照成立。

通过对 CVCC43005 株各代次冻干菌种的生化特性、培养特性、毒力、免疫原性等鉴定证明,各代次菌种传代稳定;形态、生化特性、培养特性均符合丹毒丝菌的特性;冻干菌种纯粹,没有杂菌污染;真空度及剩余水分含量符合冻干菌种要求;各代次菌株毒力没有明显变化,9~10 CFU 活菌可于 7 日内致死小鼠;各代次菌株制成灭活疫苗免疫小鼠后,均能够产生完全的攻毒保护,以此为依据,建立了菌种的种子批,确定猪丹毒丝菌 CVCC43005 株基础种子代数 F1~F10 代;生产用菌种的最高扩繁代次宜控制在 5 代以内<sup>[7]</sup>。

疫苗的安全高效和副作用小是评价疫苗质量的重要指标,而适当的佐剂选择对于疫苗安全性和效力至关重要。当 18~22 g 小白鼠背部皮下注射 6 种佐剂疫苗 0.3 mL/只时,小鼠精神、食欲均无异常反应,但只有水溶性佐剂疫苗、水性复合免疫佐剂疫苗、GEL01PR 佐剂疫苗注射的小鼠,注射部位没有出现肿胀、硬结、破溃等不良反应,表明此三种佐剂具有良好的安全性。免疫 16~18 g 小白鼠,使用

GEL01PR 佐剂、铝胶佐剂、矿物质白油佐剂制备的疫苗组表现最突出,皮下注射抗原含量  $2.0 \times 10^8 \sim 2.2 \times 10^8$  CFU 的疫苗即可获得对小鼠 100% 的免疫保护;水性复合免疫佐剂次之,需皮下注射抗原含量为  $4.2 \times 10^8$  CFU 的疫苗才可获得对小鼠 100% 的免疫保护;MONTANIDE™ IMS1313VGNST 佐剂及水溶性佐剂最为不理想,即使皮下注射抗原含量为  $4.2 \times 10^8$  CFU 的疫苗,也只能获得对小鼠 90% 的免疫保护。综合评价疫苗的安全性及效力,GEL01PR 佐剂为猪丹毒灭活疫苗的最佳佐剂。

本试验种子批的建立、CVCC43005 株作为生产用菌种最高扩繁代次的确定及疫苗免疫佐剂的筛选,为修订菌种检定依据奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 中国兽医药品监察所. 中国兽医菌种目录[M]. 2 版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 67.  
China Institute of Veterinary Drugs Control. China veterinary species catalogue [M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press, 2002: 67.
- [2] 中华人民共和国兽用生物制品规程二〇〇〇年版[S].  
Veterinary biological products regulations of People's Republic of China (2000) [S].
- [3] 中华人民共和国药典二〇一五年版三部[S].  
Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China (volume III, 2015) [S].
- [4] Groschup M H, Cussler K, Weiss R, et al. Characterization of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J].  
Epidemiol Infect, 1991, 107: 637-649.
- [5] Ho To, Shinya Nagai. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J].  
Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(7): 813-820.
- [6] Makino S, Yamamoto K, Murakami S, et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J].  
Microb Pathog, 1998, 25: 101-109.
- [7] 夏业才, 陈光华, 丁家波, 等. 兽医生物制品学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2018: 108.  
Xia Y C, Chen G H, Ding J B. Science of veterinary biologicals [M]. 2nd ed. Beijing: China Agricultural Press, 2018: 108.

(编辑:李文平)