

仔猪红黄痢疫苗的最小免疫剂量、 免疫持续期和保存期试验

刘泽文 袁芳艳 刘 威 周丹娜 杨克礼 郭 锐 段正赢 田永祥

农业农村部畜禽细菌病防治制剂创制重点实验室/湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430064

摘要 用大肠杆菌 K88、K99、987P 菌株和 C 型产气荚膜梭菌制备成仔猪大肠杆菌病、C 型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗(仔猪红黄痢疫苗),以不同剂量的疫苗免疫怀孕母猪,然后对其所产仔猪用发病剂量的相应菌株进行攻毒,同时将连续 3 批疫苗置 2~8℃ 保存,分别于保存后的不同时间取样进行保存期试验。结果发现,用 1.6 mL 以上剂量疫苗免疫组仔猪的攻毒保护率均在 80% 以上。通过对免疫母猪所产的 1、4、7 和 10 日龄仔猪进行攻毒,仔猪的攻毒保护率均不低于 80%,说明疫苗免疫产生期为仔猪吸食初乳后 24 h 内,仔猪被动免疫持续期为 7 d 以上。疫苗保存期检测结果显示,疫苗保存 27 个月后,疫苗的性状检验合格,对怀孕母猪安全,疫苗免疫母猪所产仔猪攻毒保护率均不低于 80%。因此,确定疫苗的最小免疫剂量为 1.6 mL,仔猪被动免疫持续期为 7 d 以上,疫苗保存期为 2~8℃ 保存 24 个月。

关键词 疫苗; 最小免疫剂量; 免疫持续期; 保存期

中图分类号 S 855.1⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)02-0088-06

仔猪大肠杆菌病(仔猪黄痢)、C 型产气荚膜梭菌病(仔猪红痢)是初生仔猪的 2 种细菌病,常引起 1 周内的新生仔猪发生腹泻,它们的发病特点表现为发病急、死亡率高,发病后治疗效果不佳^[1]。目前这 2 种病的最好防控办法是给怀孕母猪接种疫苗,新生仔猪通过吸食初乳而产生免疫力。国内已获批准的新生仔猪大肠杆菌病疫苗有 K88、K99 双价基因工程苗和仔猪大肠杆菌病三价灭活疫苗,C 型产气荚膜梭菌病疫苗有仔猪红痢灭活疫苗^[2]。在实际应用过程中,由于这些疫苗需要多次注射,而且注射剂量大,给猪群带来较大应激反应,且增加了养殖人员的工作量,因此,我们开展了这 2 种疫病的二联疫苗研究。

将大肠杆菌 K88、K99、987P 菌株和 C 型产气荚膜梭菌分别接种适宜培养基,提取大肠杆菌纤毛和 C 型产气荚膜梭菌毒素,灭活和脱毒后,按适当比例混合,制备成仔猪大肠杆菌病、C 型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗(仔猪红黄痢疫苗),前期试验结果证明,该疫苗对怀孕母猪安全,并有较好的免疫效

力^[3]。为了完善疫苗的实验数据,申报新兽药注册证书,我们进行了疫苗的最小免疫剂量、免疫持续期和保存期试验,结果如下。

1 材料与方 法

1.1 试验疫苗、疫苗参照品和试验动物

仔猪大肠杆菌病、C 型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗,批号为 200901、200902、200903;疫苗参照品,批号为 CK8-1、CK9-1 和 CKP-1,均由武汉中博生物股份有限公司制备、检验和保存。

供试动物为 70 头怀孕 69~74 d 母猪,购于湖北省农业科学院畜牧兽医研究所原种猪育种场。供试母猪大肠杆菌 K88、K99、987P 纤毛抗体间接血凝效价不高于 1:16,C 型产气荚膜梭菌毒素中和抗体阴性。

1.2 攻毒菌株或毒素

大肠杆菌 C83549(K88)、C83644(K99)、C83710(987P)冻干菌株和 C 型产气荚膜梭菌冻干毒素,由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所制备、鉴定和保存。

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0500600);湖北省农业科技创新中心项目(2016-620-000-001-026);湖北省技术创新专项重大项目(2016ABA124)

刘泽文,副研究员。研究方向:家畜疾病诊断与预防。E-mail: liuzwen2004@sina.com

通信作者: 田永祥,研究员。研究方向:家畜传染病。E-mail: tyxanbit@163.com

1.3 最小免疫剂量的确定

将20头供试母猪随机分为5组,分别为4个免疫组和1个对照组。将试验疫苗随机取样,用疫苗稀释液稀释成2 mL/头份,平衡至室温后使用,采用肌肉注射接种途径,分别采用2.4、2.0、1.6和1.2 mL免疫剂量对怀孕母猪进行免疫,于产前40~45 d和15~20 d各免疫1次。母猪产仔后,在各免疫组和对照组随机选取采食初乳24 h内仔猪5头,分别用发病剂量的大肠杆菌C83549、C83644、C83710菌株进行口服攻毒和致死剂量的C型产气荚膜梭菌C59-2毒素对各免疫组进行攻毒。攻毒后连续观察14 d。记录各试验组哺乳仔猪出现腹泻或死亡的情况。根据仔猪攻毒后的临床表现统计各试验组的发病情况。

1.4 疫苗免疫期的确定

将20头供试母猪随机分为2组,1个免疫组和1个对照组。免疫组母猪于产前40~45 d和15~20 d各免疫1次,每次每头肌肉注射疫苗2 mL。对照组母猪不免疫(正常饲养)。母猪产仔后,在各免疫组母猪所产仔猪采食初乳24 h内(1日龄)、4日龄、7日龄和10日龄时分别随机选取20头,分为4组,每组5头,分别用发病剂量的大肠杆菌C83549、C83644、C83710菌液和致死剂量的C型产气荚膜梭菌C59-2毒素进行攻毒。同样,在对照组母猪所产仔猪24 h内(1日龄)、4日龄、7日龄和10日龄时用相同方法分组和攻毒。攻毒后连续观察14 d,记录各试验组哺乳仔猪出现腹泻或死亡状况。根据仔猪攻毒后的临床表现统计各试验组的发病情况。

1.5 疫苗保存期的确定

将3批疫苗置2~8℃保存,分别于保存后第1个月末、第6个月末、第12个月末、第18个月末、第24个月末和第27个月末随机抽样,按疫苗研制组制定的《仔猪大肠杆菌病、C型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗制造及检验试行规程(草案)》进行疫苗的性状检验、无菌检验、安全检验和效力检验。

2 结果与分析

2.1 最小免疫剂量试验结果

分别用大肠杆菌C83549、C83644、C83710和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素对免疫组和对照组母猪所产仔猪攻毒。大肠杆菌攻毒对照组猪发病症状出现在攻毒后2~3 d,主要症状为拉黄褐色稀粪,精神

沉郁,部分仔猪因脱水严重导致死亡;C型产气荚膜梭菌毒素攻毒对照组仔猪在攻毒后24 h内全部死亡。试验结果显示,1.6 mL以上剂量免疫组所产仔猪对大肠杆菌C83549、C83644、C83710和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素攻毒后的保护率均在80%以上;1.2 mL剂量免疫组所产仔猪对大肠杆菌C83549、C83644、C83710和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素攻毒后的保护率均不到80%;对照组仔猪经大肠杆菌C83549、C83644、C83710菌株和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素攻毒后的发病率均为100%(表1)。

2.2 免疫持续期试验结果

分别用大肠杆菌C83549、C83644、C83710和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素对免疫组和对照组母猪所产1、4、7和10 d仔猪攻毒。试验结果显示,所有免疫组所产仔猪对大肠杆菌C83549、C83644、C83710和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素攻毒后的保护率均在80%以上;1、4和7日龄对照组仔猪经大肠杆菌C83549、C83644、C83710和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素攻毒后的发病率均为100%;10日龄对照仔猪经大肠杆菌C83549、C83644、C83710和C型产气荚膜梭菌C59-2毒素攻毒后的发病率分别为80%、80%、80%和100%(表2)。

2.3 保存期试验结果

1)疫苗性状检验。分别将2~8℃保存不同时间的3批疫苗取出,进行物理性状检验,均为类白色海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解,未发现变质现象,符合该疫苗的性状特征。

2)疫苗无菌检验。将3批疫苗分别在2~8℃保存不同时间后取样进行无菌检验,结果均无菌生长,无菌检验合格。

3)安全性检验。将3批疫苗分别在2~8℃保存不同时间后取样,用疫苗稀释液稀释后,每批疫苗接种21~28 d健康仔猪5头,每头仔猪各肌肉注射2倍免疫剂量疫苗,连续观察14 d,仔猪精神良好、食欲正常,注射部位无肿胀及局部炎症,疫苗对仔猪安全性良好。

4)疫苗纤毛抗原含量测定。3批疫苗在不同保存时间,用反向间接血凝检测方法^[4]检测大肠杆菌纤毛抗原效价,结果与相应参照品相比,均满足RP值 ≥ 1.0 (表3),表明疫苗大肠杆菌纤毛抗原置2~8℃保存27个月的稳定性良好。

表 1 最小免疫剂量试验仔猪攻毒结果

Table 1 The minimum immune dose test result of infection in piglets

组别 Group	免疫剂量/mL Immune dose	攻毒类别 Attacking category	攻毒数量 Attacking number	保护数量 Protection number	保护率/% Protection rate	发病率/% Morbidity
免疫组 Immune group	2.4	C83549	5	5	100	0
		C83644	5	4	80	20
		C83710	5	5	100	0
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	5	100	0
	2.0	C83549	5	4	80	20
		C83644	5	4	80	20
		C83710	5	5	100	0
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	5	100	0
	1.6	C83549	5	4	80	20
		C83644	5	4	80	20
		C83710	5	4	80	20
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	5	100	0
	1.2	C83549	5	3	60	40
		C83644	5	3	60	40
		C83710	5	2	40	60
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	3	60	40
对照组 Control group	0.0	C83549	5	5	/	100
		C83644	5	5	/	100
		C83710	5	5	/	100
		C59-2 毒素	5	5	/	100
		C59-2 exotoxin	5	5	/	100

表 2 免疫持续期试验仔猪攻毒结果

Table 2 The immunization duration test result of infection in piglets

组别 Group	仔猪日龄 Age of piglets	攻毒类别 Attacking category	攻毒仔猪数量 Attacking number	发病数量 Morbidity number	保护率/% Protection rate	发病率/% Morbidity
免疫组 Immune group	1 日龄 1-day	C83549	5	0	100	0
		C83644	5	0	100	0
		C83710	5	0	100	0
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	0	100	0
	4 日龄 4-day	C83549	5	0	100	0
		C83644	5	1	80	20
		C83710	5	0	100	0
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	0	100	0
	7 日龄 7-day	C83549	5	0	100	0
		C83644	5	1	80	20
		C83710	5	0	100	0
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	1	80	20
	10 日龄 10-day	C83549	5	0	100	0
		C83644	5	0	100	0
		C83710	5	0	100	0
		C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	5	1	80	20

续表 2 Continued Table 2

组别 Group	仔猪日龄 Age of piglets	攻毒类别 Attacking category	攻毒仔猪数量 Attacking number	发病数量 Morbidity number	保护率/% Protection rate	发病率/% Morbidity
对照组 Control group	1 日龄 1-day	C83549	5	5	/	100
		C83644	5	5	/	100
		C83710	5	5	/	100
		C59-2 毒素	5	5	/	100
		C59-2 exotoxin				
	4 日龄 4-day	C83549	5	5	/	100
		C83644	5	5	/	100
		C83710	5	5	/	100
		C59-2 毒素	5	5	/	100
		C59-2 exotoxin				
	7 日龄 7-day	C83549	5	5	/	100
		C83644	5	5	/	100
		C83710	5	5	/	100
		C59-2 毒素	5	5	/	100
		C59-2 exotoxin				
10 日龄 10-day	C83549	5	4	/	80	
	C83644	5	4	/	80	
	C83710	5	4	/	80	
	C59-2 毒素	5	5	/	100	
	C59-2 exotoxin					

表 3 不同保存时间的疫苗纤毛抗原含量

Table 3 The *E. coli* pili content of different storage time

保存时间 Storage time	疫苗批号 Batch number	检测结果(RP 值) RIHA result(RP value)		
		K88	K99	987P
		1 个月 1 month	200901	1.0
1 个月 1 month	200902	1.2	1.2	1.0
	200903	1.2	1.0	1.1
	200901	1.2	1.0	1.0
6 个月 6 months	200902	1.2	1.0	1.1
	200903	1.0	1.0	1.1
	200901	1.2	1.0	1.1
12 个月 12 months	200902	1.0	1.2	1.0
	200903	1.2	1.0	1.0
	200901	1.0	1.2	1.1
18 个月 18 months	200902	1.0	1.0	1.0
	200903	1.2	1.0	1.0
	200901	1.0	1.0	1.0
24 个月 24 months	200902	1.2	1.0	1.1
	200903	1.0	1.0	1.1
	200901	1.0	1.2	1.1
27 个月 27 months	200902	1.2	1.0	1.0
	200903	1.0	1.2	1.0

5) 免疫家兔血清中和试验结果。3 批不同保存时间的疫苗免疫家兔的血清与 C 型产气荚膜梭菌毒素中和后, 中和小鼠全部保护, 对照小鼠全部死亡(表 4)。

6) 免疫母猪所产仔猪攻毒试验结果。将 3 批疫

苗分别在 2~8 °C 保存不同时间后取出, 用疫苗稀释液稀释成 2 mL/头份, 每批疫苗免疫怀孕 69~74 d 母猪 10 头, 各肌肉注射疫苗 2 mL, 于怀孕 15~20 d 以相同方式二免, 对母猪所产仔猪进行攻毒, 根据仔猪发病判定标准进行判定, 统计仔猪发病情况。结果表明, 免疫母猪所产仔猪攻毒保护率均不低于 80%, 对照母猪所产仔猪发病率均为 100%(表 5), 表明按本工艺制备的疫苗在 2~8 °C 保存 27 个月内, 其免疫效力没有降低, 疫苗质量稳定。

3 讨论

新生仔猪大肠杆菌病和 C 型产气荚膜梭菌病是新生仔猪的 2 种主要细菌性传染病。新生仔猪大肠杆菌病是由 K88、K99 和 987P 等血清型的大肠杆菌引起, 主要发生于 1 周龄以内仔猪, 以 1~3 日龄最为多见^[5]。仔猪 C 型产气荚膜梭菌病是由 C 型产气荚膜梭菌引起的初生仔猪的急性传染病, 该病主要发生于 3 日龄以内的新生仔猪^[6]。这 2 种病的共同特点是发病仔猪以腹泻为主要临床症状, 而且发病急剧, 病程短促, 发病率和死亡率均较高, 注射疫苗是预防该病发生的最有效手段。目前国内对这 2 种疫病的预防主要采用单苗对怀孕母猪进行免疫接种^[7-8], 其所产仔猪通过吸食初乳而获得免疫力。单苗由于免疫剂量大、免疫次数多, 在实际应用

表 4 不同保存时间的疫苗免疫家兔血清中和试验结果

Table 4 Potency test result of the C-type *Clostridium perfringens*

组别 Group	疫苗批号 Batch number	小鼠健活数/攻毒数 Health number/ Total number					
		1 个月 1 month	6 个月 6 months	12 个月 12 months	18 个月 18 months	24 个月 24 months	27 个月 27 months
免疫组 Immune group	200901	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	200902	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	200903	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
对照组* Control group*	/	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

注: * 3 批疫苗在 1、6、12、18、24、27 个月,血清中和试验对照小鼠均 0/2 健活。Note: * All the control group mice of 1, 6, 12, 18, 24 and 27-month were all 0/2 healthy.

表 5 不同保存时间的疫苗对仔猪大肠杆菌攻毒保护结果

Table 5 Result of *E. coli* infection in piglets

保存时间 Storage time	攻毒类别 Attacking category	免疫组保护率/% Protection rate of immune group			对照组发病率/% Morbidity of control group
		200901	200902	200903	
1 个月 1 month	C83549	100	100	100	100
	C83644	100	80	100	100
	C83710	100	100	100	100
	C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	80	100	100	100
18 个月 18 months	C83549	100	100	80	100
	C83644	100	80	80	100
	C83710	80	100	100	100
	C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	100	100	80	100
24 个月 24 months	C83549	100	80	80	100
	C83644	100	80	80	100
	C83710	80	80	100	100
	C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	100	80	80	100
27 个月 27 months	C83549	100	80	100	100
	C83644	100	100	80	100
	C83710	80	100	100	100
	C59-2 毒素 C59-2 exotoxin	100	80	100	100

过程中存在免疫剂量不足、个别猪漏免等致使这 2 种疫苗不能产生完全的免疫效力。因此,我们开展了这 2 种疫苗的二联苗研究,试验结果证明该二联疫苗具有良好的免疫原性,免疫母猪所产仔猪能抵抗相应血清型的大肠杆菌和 C 型产气荚膜梭菌的攻击,保护率均在 93% 以上,均不低于同类单苗^[9]。

分别采用不同免疫剂量的二联疫苗免疫怀孕母猪,通过对母猪所产并采食初乳 24 h 内仔猪进行攻毒,试验结果表明,不同抗原含量与攻毒保护率具有良好的平行关系,1.6 mL 及以上剂量免疫组对大肠杆菌 C83549、C83644、C83710 和 C 型产气荚膜梭菌毒素的攻毒保护率均不低于 80%,对照组攻毒发病率为 100%。确定了该疫苗的最小免疫剂量为 1.6 mL,为了确保疫苗的质量,将该疫苗的免疫剂

量规定为 2 mL。

仔猪大肠杆菌病、C 型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗 2 次免疫怀孕母猪后,母猪所产仔猪吸食初乳 24 h 内,用发病剂量的大肠杆菌 K88、K99、987P 菌株和 C 型产气荚膜梭菌毒素进行攻毒,免疫母猪所产仔猪全部保护,对照组仔猪全部发病,因此,可判定二联苗接种后出现良好免疫力(免疫产生期)的时间为仔猪吸食初乳后 24 h 内。通过对免疫母猪所产的 1、4、7 和 10 日龄仔猪进行攻毒,仔猪的攻毒保护率均不低于 80%,确定仔猪被动免疫力持续时间为 7 d。对照组仔猪在 1、4、7 日龄的攻毒发病率均为 100%,10 日龄对照仔猪没有全部发病,其原因是仔猪黄痢大肠杆菌主要致 7 日龄以内的仔猪发病,因此,仔猪大肠杆菌病、C 型产气荚膜梭菌病二

联灭活疫苗能够满足该病防治需要。

将连续3批仔猪大肠杆菌病、C型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗置2~8℃保存,分别于不同保存时间后取样检测,进行疫苗性状检验、无菌检验、安全性检验和效力试验,结果表明,疫苗在2~8℃保存27个月,各项检验结果均合格,对小鼠和仔猪的安全性均良好,免疫怀孕母猪,分别用大肠杆菌和C型产气荚膜梭菌毒素攻击所产哺乳仔猪,保护率均不低于80%。考虑到疫苗在实际运输和保存过程中温差变化的影响,为了确保疫苗的质量,我们将仔猪大肠杆菌病、C型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗的保存方式定为2~8℃保存、有效期为24个月。

参 考 文 献

[1] JEFFERY J Z, LOCKE A K, ALEJANDRO R, et al. 猪病学

[M]. 10版. 赵德明, 张中秋, 周向梅, 等, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2014: 739-783.

[2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.

[3] 刘泽文, 袁芳艳, 刘威, 等. 仔猪大肠杆菌病、C型产气荚膜梭菌病二联灭活疫苗的研制与应用[J]. 动物医学进展, 2018, 37(6): 24-28.

[4] 刘泽文, 田永祥, 袁芳艳, 等. 仔猪大肠杆菌菌毛抗原反向间接血凝检测方法的建立与应用[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(3): 69-73.

[5] 房海. 大肠埃希氏菌[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1997.

[6] 姜平, 郭爱珍, 邵国青, 等. 兽医全攻略. 猪病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 164-167.

[7] 胡小伟. 猪大肠杆菌病的分类与防治[J]. 畜牧兽医科技信息, 2017(9): 103-104.

[8] 范万福. 仔猪红痢的综合防治措施[J]. 甘肃畜牧兽医, 2016, 46(6): 54-55.

[9] 陈晓锋, 楼平儿, 华坚青, 等. 两种仔猪大肠杆菌疫苗免疫效果试验[J]. 浙江畜牧兽医, 2003(2): 5.

Minimum immune dose, duration and preservation period of *Escherichia coli* and C-type *Clostridium perfringens* vaccine for piglet

LIU Zewen YUAN Fangyan LIU Wei ZHOU Danna YANG Keli
GUO Rui DUAN Zhengying TIAN Yongxiang

*Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Sciences/
Key Laboratory of Prevention and Control Agents for Animal Bacteriosis,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430064, China*

Abstract The *Escherichia coli* K88, K99, 987P strains and C type *Clostridium perfringens* were used to prepare piglets colibacillosis. Pregnant sows were immunized with different doses of vaccine, and then their piglets were challenged with the corresponding pathogenic strains and doses. The results showed that the protection rate of the piglets was above 80% when the vaccine doses was 1.6 mL or more. The protection rate of piglets against bacteria was not less than 80% when piglets aged 1, 4, 7 and 10 d were challenged, which indicated that the immunization period was within 24 h after colostrum feeding and the duration of passive immunization was more than 7 d. Three batches of vaccines were kept at 2-8℃ and tested at different times during preservation. The results showed that the vaccine was safe for pregnant sows after 27 months of preservation and the protective rate of piglets produced by the vaccine immunized sows was no less than 80%. Therefore, the minimum immune dose of the vaccine was 1.6 mL, the passive immunization duration of piglets was more than 7 d, and the vaccine storage period was 24 months at 2-8℃.

Keywords vaccine; minimum immune dose; immunization duration; preservation period