



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104096222 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201310119733.2

(22)申请日 2013.04.08

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104096222 A

(43)申请公布日 2014.10.15

(83)生物保藏信息

CCTCC No: M2012230 2012.06.13

CCTCC No: M2011172 2011.05.18

CCTCC No: M2011173 2011.05.18

(73)专利权人 普莱柯生物工程股份有限公司

地址 471000 河南省洛阳市高新区凌波路5号

(72)发明人 张许科 孙进忠 白朝勇

(74)专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理
事务所(普通合伙) 11017

代理人 韩登营

(51)Int.Cl.

A61K 39/295(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1942204A ,2007.04.04,

CN 1652817A ,2005.08.10,

查红波.猪呼吸道病综合症.《中国畜牧报》
.2004,第19-21页.

审查员 程婷

权利要求书1页 说明书25页

(54)发明名称

一种疫苗组合物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明提供了一种疫苗组合物,该疫苗组合物包括免疫量的猪肺炎支原体抗原、免疫量的副猪嗜血杆菌抗原以及免疫量的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原。该疫苗组合物在二免后14日用猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌感染,可以保护80%以上的猪,抗原之间不会出现相互干扰,取得令人满意的免疫效果。

1. 一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包括免疫量的猪肺炎支原体抗原、免疫量的副猪嗜血杆菌抗原以及免疫量的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原;其中,所述猪肺炎支原体抗原为灭活的猪肺炎支原体全病原抗原,所述副猪嗜血杆菌抗原为灭活的副猪嗜血杆菌全菌抗原,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为减毒的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原;其中,所述猪肺炎支原体抗原为灭活的猪肺炎支原体HN0613株;所述副猪嗜血杆菌抗原为灭活的血清4型JS株和血清5型ZJ株。

2. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其中,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为NVDC-JXA1-R毒株。

3. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其中,所述疫苗组合物灭活疫苗部分进一步包括佐剂,所述佐剂包括纳米化氢氧化铝胶、矿物油、卡波姆、MONTANIDE GEL ST、蜂胶、细胞因子、免疫刺激复合物、含CpC脱氧寡核苷酸、纳米化ISA206、ISA760VG、纳米化磷酸铝、皂苷、山梨聚糖、植物油、油酸乙酯、二辛酸丙二醇酯、二癸酸丙二醇酯、三辛酸甘油酯、三癸酸甘油酯、二油酸丙二醇酯、异硬脂酸酯、二缩甘露醇、甘油、聚甘油、丙二醇、油酸、异硬脂酸、蓖麻油酸、羟基硬脂酸酯、聚氧丙烯、聚氧乙烯嵌段共聚物、丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物、顺丁烯二酸酐与烯基衍生物共聚物、糖或多元醇的聚烯基醚交联的丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的疫苗组合物,其中,所述猪肺炎支原体抗原 $10^8 \sim 10^{10}$ MHDCE/头份;所述副猪嗜血杆菌抗原为 $5 \times 10^8 \sim 8 \times 10^9$ CFU/头份;所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为 $10^{4.5} \sim 10^{7.0}$ TCID₅₀/头份。

5. 一种制备权利要求1所述疫苗组合物的方法,所述方法包括:

- 1) 培养增殖猪肺炎支原体,灭活;
- 2) 培养增殖副猪嗜血杆菌,灭活;
- 3) 培养增殖猪繁殖与呼吸综合征病毒;

4) 将所述灭活猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原按比例混合,并与所述猪繁殖与呼吸综合征活病毒抗原分开保藏。

6. 根据权利要求1~4任一项所述的疫苗组合物在制备预防猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌以及猪繁殖与呼吸综合征病毒感染相关疾病的药物中的应用,其中,所述应用包括用免疫量的猪肺炎支原体抗原和免疫量的副猪嗜血杆菌抗原免疫猪,然后用免疫量的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原、猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原二免所述猪。

7. 根据权利要求6所述的应用,其中,所述猪首次免疫时为3~4周龄,所述二免与所述首次免疫时间间隔21天。

8. 一种免疫试剂盒,其中,所述试剂盒包括含猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原的抗原组合物、以及猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原,其中,所述猪肺炎支原体抗原、副猪嗜血杆菌的抗原为灭活全菌抗原,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为活的全病毒抗原,所述猪肺炎支原体抗原为灭活的猪肺炎支原体HN0613株;所述副猪嗜血杆菌抗原为灭活的血清4型JS株和血清5型ZJ株,含所述猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原的抗原组合物与所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原分开保藏。

一种疫苗组合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种疫苗组合物,该疫苗组合物用于预防和治疗猪呼吸道疾病综合征。

背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS),又称猪蓝耳病,是由单股正链RNA猪繁殖和呼吸障碍综合征病毒引起,以妊娠母猪的繁殖障碍如流产、死胎、木乃伊胎等及各种年龄猪特别是仔猪的呼吸道疾病为特征,现已成为规模化猪场的主要疫病之一。2006年我国部分地区爆发的高致病性猪蓝耳病是由猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒变异株引起的一种急性高致死性疫病,属于国家二类动物疫病。该病在我国出现新的流行特点,病毒发生变异,致病力增强,在部分地区出现大规模爆发流行。临床以高热、皮肤发绀、眼结膜炎、呼吸系统症状、神经症状及死亡为主,表现为发病快、症状严重、病变明显,死亡率高,给我国养猪业带来了巨大的经济损失。直至今日,疫病形势依然严峻,同其他病毒性疾病一样,目前尚无有效的治疗性药物用于蓝耳病的治疗,疫苗免疫接种是防制该病的最有效方法。

[0003] 副猪嗜血杆菌病是副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)引起的猪的多发性浆膜炎和关节炎,该病又称为猪革拉泽氏病(Glasser's Disease)。副猪嗜血杆菌可以影响从2周龄到4月龄的青年猪,主要在断奶后和保育阶段发病,通常见于5~8周龄的猪,发病率可达40%,死亡率可达50%。主要临床症状表现为咳嗽、呼吸困难、消瘦、跛行和被毛粗乱;主要剖检病变表现为纤维素性胸膜炎、心包炎、腹膜炎、关节炎和脑膜炎等。此外,副猪嗜血杆菌还可引起败血症,并且在急性感染后可能留下后遗症,即母猪流产、公猪慢性跛行。在大量分离副猪嗜血杆菌的基础上,发现该菌的血清型复杂多样,按KieIetein-Rapp-Gabriedson(KRG)琼脂扩散血清分型方法,至少可将副猪嗜血杆菌分为15个血清型;根据我国血清流行病学调查和分离菌株的鉴定,以4、5型最为流行。近年来,由于我国目前饲养技术的调整进行不当,以及突发新的呼吸道综合征,使得该病日趋流行,危害日渐严重。

[0004] 猪支原体肺炎(*Mycoplasma pneumonia* of swine, MPS)是由猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)引起的一种慢性、接触性传染病,是一种重要的免疫抑制性疾病,也是猪呼吸道疾病综合征(Porcine respiratory disease complex, PRDC)的重要病原之一。该病长期危害养猪业,并广泛分布于世界各国。该病主要危害育肥猪,尤其是14~20周龄的猪生长率降低,使其饲料转化率降低,还可出现食欲减退、发热、咳嗽、呼吸困难等症状。该病易发生继发感染,如继发猪巴氏杆菌病、猪圆环病毒病、猪流感、猪繁殖与呼吸综合征、猪胸膜肺炎等,出现呼吸困难,发热等临床症状,甚至死亡。本病一旦传入猪群,很难彻底清除,并且会造成其他疾病的免疫失败,对于混合感染的PRDC的防控带来了挑战。

[0005] 临床PRDC中,上述三种病原即猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌常常以混合感染形式出现,临床症状表现为结膜炎、眼睛分泌物增多、发热、食欲下降或无食欲、呼吸困难、喘气、腹式呼吸、咳嗽、生长缓慢、消瘦、死亡率升高。母猪流产前体温

升高,厌食,尤其第一胎的母猪更为常见。死亡猪剖检呈现心包炎、胸膜炎、腹膜炎和关节炎,肺部炎症,淋巴结出血、肿大。而目前针对这三种病原的感染的疫苗仅有猪繁殖与呼吸综合征、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌单苗,无法实现一种疫苗免疫抵抗这三种病原引起的混合感染。

[0006] 随着病原流行株和混合感染已经使现有疫苗很难达到预期的免疫效果,现在存在的问题是如果猪感染或接种了猪繁殖与呼吸综合征病毒,那么猪支原体肺炎疫苗的免疫效果会明显降低,杨汉春(“猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策”,中国畜牧兽医,2004,31(5): 41-43)、万遂如(“防控猪免疫抑制的主要技术措施”,养猪,2009,1:42-46)等研究发现猪繁殖与呼吸综合征是一种免疫抑制性疾病;庞海洋(“猪繁殖与呼吸综合征研究进展”,第三届猪病防控学术研讨会会议论文集,第262-265页,2008年)等研究发现猪繁殖与呼吸综合征病毒感染会降低猪的免疫力(如,通过破坏肺泡巨噬细胞的正常功能)并引发免疫抑制。因此,当免疫猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗时,会降低与其共同免疫的其他猪疫苗的免疫效果。所以即使将猪繁殖与呼吸综合征病毒疫苗与其他疫苗联合免疫,也难以实现与单苗免疫相当的效果。

[0007] 现有的免疫程序是首先用猪繁殖与呼吸综合征疫苗接种,但是等到活的猪繁殖与呼吸综合征从猪体内消失,再接种猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌疫苗,至少需2~3周时间,且猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌疫苗产生抗体还需要2~3周,不能很好的对仔猪产生保护。而且目前市售商品疫苗需多次免疫,成本较高,对猪只的应激较大;另外同时针对控制猪繁殖与呼吸综合征、猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌病疫苗,国内外也还是空白。

[0008] 然而,本发明人在一项重现PRDC时发现,当猪群中只感染猪肺炎支原体及副猪嗜血杆菌时,并不会引发疾病,只有当猪群中存在猪繁殖与呼吸综合征病毒的情况下,才会引发严重的PRDC。表明这些症状的病猪是由这三种病原体协同作用引起,并且,一旦继发感染副猪嗜血杆菌,各种抗菌药物均难以奏效。因此,需要提供猪繁殖与呼吸综合征、猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌病疫苗以解决上述问题。

[0009] 与单一疫苗相比,联合疫苗不仅方便、多效、低成本,还可以减少疫苗接种次数,避免因漏种而不能得到全程免疫;另外,疫苗大多不耐热,其生产、运输、存贮、销售乃至全部使用过程均需在较低温度下进行,即所谓的“冷链”,这种环环相扣的冷链运作,费用极高,使疫苗成本居高不下,而使用联合疫苗,则可以大大降低冷链运作的费用,因此具有显著的优越性。

发明内容

[0010] 本发明人在重现PRDC时还意外的发现,如果首先用猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌病灭活疫苗首免,用猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌病灭活疫苗二免,可以产生对猪繁殖与呼吸综合征、猪支原体肺炎和副猪嗜血杆菌感染造成的猪呼吸道综合征产生良好的免疫保护。

[0011] 因此,为解决现有技术的不足,本发明的主要目的在于提供一种疫苗组合物,所述疫苗组合物包括免疫量的猪肺炎支原体抗原、免疫量的副猪嗜血杆菌抗原以及免疫量的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原。

[0012] 优选地,所述猪肺炎支原体抗原为灭活的猪肺炎支原体全病原抗原、减毒的猪肺

炎支原体抗原、猪肺炎支原体亚单位抗原、猪肺炎支原体重组活载体抗原和猪肺炎支原体DNA载体的抗原；所述副猪嗜血杆菌抗原为灭活的副猪嗜血杆菌全菌抗原、减毒的副猪嗜血杆菌抗原、副猪嗜血杆菌亚单位抗原、副猪嗜血杆菌重组活载体抗原和副猪嗜血杆菌DNA载体的抗原；所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为灭活的猪繁殖与呼吸综合征病毒全病毒抗原、减毒的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原、猪繁殖与呼吸综合征病毒亚单位抗原、猪繁殖与呼吸综合征病毒重组活载体抗原和猪繁殖与呼吸综合征病毒DNA载体的抗原。

[0013] 所述“猪繁殖与呼吸综合征抗原”是指含有至少一种抗原的任何组合物，所述抗原当对猪给药时，可诱导、刺激或增强抵抗猪繁殖与呼吸综合征病毒感染的免疫应答。优选地，本发明所述疫苗组合物中，猪繁殖与呼吸综合征抗原为全病毒抗原，包括本领域技术人员熟知的临床分离的野毒株，优选为灭活形式的猪繁殖与呼吸综合征全病毒，改良的猪繁殖与呼吸综合征活病毒或减毒的猪繁殖与呼吸综合征病毒，含有至少猪繁殖与呼吸综合征病毒的免疫原性氨基酸序列的嵌合病毒，任何其它含至少猪繁殖与呼吸综合征病毒的免疫原性氨基酸序列的多肽、亚单位或其他成分，猪繁殖与呼吸综合征抗原还可以包含以下组合物的任一种抗原：如勃林格殷格翰动物保健(美国)有限公司生产的猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(**Ingelvac®**PRRS MLV)；中牧实业股份有限公司成都药械厂、齐鲁动物保健品有限公司等多家公司生产的猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗(NVDC-JXA1株)和哈尔滨维科生物技术开发公司生产的猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗(CH-1a株)；哈尔滨维科生物技术开发公司生产的猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(CH-1R株)；广东大华农动物保健品股份有限公司等生产的高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R株)；江苏南农高科技股份有限公司等生产的猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(R98)；哈药集团生物疫苗有限公司等生产的高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(HuN4-F112株)；新疆天康畜牧生物技术股份有限公司生产的高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(TJM-F92株)。

[0014] 所述“副猪嗜血杆菌抗原”是指包含至少一种抗原的任何组合物，所述副猪嗜血杆菌抗原在对猪给药后可诱导、刺激或增强抗副猪嗜血杆菌感染的免疫应答。优选地，所述副猪嗜血杆菌抗原是完整的副猪嗜血杆菌全菌，包括本领域技术人员熟知的临床分离的野菌株，优选为灭活形式的副猪嗜血杆菌全菌，改良的副猪嗜血杆菌活菌或减毒的副猪嗜血杆菌，含有至少副猪嗜血杆菌的免疫原性氨基酸序列的嵌合菌株，任何其它含至少副猪嗜血杆菌的免疫原性氨基酸序列的多肽、亚单位或其他成分，副猪嗜血杆菌抗原还可以包含以下组合物的任一种抗原：如勃林格殷格翰动物保健(美国)有限公司生产的副猪嗜血杆菌病灭活疫苗(Z-1517株)，西班牙海博莱生物大药厂生产的副猪嗜血杆菌病灭活疫苗(血清1型SV1+血清6型SV6)，华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司、中牧实业股份有限公司生产的副猪嗜血杆菌病灭活疫苗(血清4型MD0322+血清5型SH0165)，山东省农业科学院畜牧兽医研究所的副猪嗜血杆菌病灭活疫苗(血清1型LC株+血清5型LZ株)。

[0015] 本发明中术语“猪肺炎支原体抗原”是指含有灭活的猪肺炎支原体抗原，所述抗原接种猪后可诱导、刺激或增强抵抗猪肺炎支原体感染的免疫应答。猪肺炎支原体包括本领域技术人员熟知的临床分离的野毒株。优选地，所述猪肺炎支原体抗原是完整的猪肺炎支原体，优选为灭活形式。猪肺炎支原体抗原还可以包含以下组合物的任一种猪肺炎支原体抗原，如法国梅里亚的BQ14株(猪克喘)、美国先灵葆雅(英特威)的J株(安百克)、西班牙海博莱生物大药厂的J株(喜可舒)、美国辉瑞(富道)的瑞富特、哈药集团生物疫苗有限公司的

P-5722-3株(瑞倍适/瑞倍适-旺)、美国普泰克的P株以及P株复合佐剂灭活苗(喘泰克)以及勃林格殷格翰的J株(茵格发);国内生产的168株活疫苗。

[0016] 更优选地,所述猪肺炎支原体抗原为灭活的猪肺炎支原体HN0613株;所述副猪嗜血杆菌抗原为灭活的血清4型JS株和血清5型ZJ株;所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为NVDC-JXA1-R毒株;或者,所述猪肺炎支原体抗原为灭活的猪肺炎支原体J株;所述副猪嗜血杆菌抗原为灭活的血清4型MD0322株和血清5型SH0165株;所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为HuN4-F112毒株。

[0017] 猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae* strain HN0613)HN0613,已在中国典型培养物保藏中心进行保藏,保藏日期:2012年6月13日,保藏号为CCTCC No.M2012230。

[0018] 副猪嗜血杆菌血清4型(*Haemophilus Parasuis* Serotype4,Strain JS)JS株,已在中国典型培养物保藏中心进行保藏,保藏日期:2011年5月18日,保藏号为CCTCC No.M2011172。

[0019] 副猪嗜血杆菌血清5型(*Haemophilus Parasuis* Serotype5,Strain ZJ)ZJ株,已在中国典型培养物保藏中心进行保藏,保藏日期:2011年5月18日,保藏号为CCTCC No.M2011173。

[0020] 猪繁殖与呼吸综合征病毒株NVDC-JXA1-R毒株,该毒株公开于中国专利CN101307305A,以保藏号CGMCC No.2467保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0021] 猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*,Mhp)J株,保藏于美国菌种保藏中心ATCC25934。

[0022] 副猪嗜血杆菌血清4型菌株MD0322株和血清5型菌株SH0165株公开于专利申请CN102329746A。

[0023] 副猪嗜血杆菌血清4型(*Haemophilus Parasuis*,HPs)菌株MD0322株,已在中国典型培养物保藏中心进行保藏,保藏日期:2011年8

[0024] 月9日,保藏号为CCTCC No.M2011283。

[0025] 副猪嗜血杆菌血清5型(*Haemophilus Parasuis*,HPs)菌株SH0165株,已在中国典型培养物保藏中心进行保藏,保藏日期:2011年8月9日,保藏号为CCTCC No.M2011284。

[0026] 猪繁殖与呼吸综合征病毒株HuN4-F112毒株,该毒株公开于中国专利申请CN101280292,以保藏号CGMCC No.2484保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0027] 优选地,所述疫苗组合物灭活疫苗部分进一步包括佐剂,所述佐剂包括纳米化氢氧化铝胶、矿物油、卡波姆、MONTANIDE GEL ST、蜂胶、细胞因子、脂质体、免疫刺激复合物、含CpC脱氧寡核苷酸、纳米化ISA206、ISA760VG、纳米化磷酸铝、皂苷、山梨聚糖、植物油、油酸乙酯、二(辛酸/癩酸)丙二醇酯、三(辛酸/癩酸)甘油酯、二油酸丙二醇酯、异硬脂酸酯、山梨聚糖、二缩甘露醇、甘油、聚甘油、丙二醇、油酸、异硬脂酸、蓖麻油酸、羟基硬脂酸酯、聚氧丙烯、聚氧乙烯嵌段共聚物、丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物、顺丁烯二酸酐与烯基衍生物共聚物、糖或多元醇的聚烯基醚交联的丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物的一种或几种。

[0028] 优选地,所述猪肺炎支原体抗原 $10^8 \sim 10^{10}$ MHDCE/头份;所述副猪嗜血杆菌抗原为 $5 \times 10^8 \sim 8 \times 10^9$ CFU/头份;所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为 $10^{4.5} \sim 10^{7.0}$ TCID₅₀。

[0029] 更优选地,所述NVDC-JXA1-R全病毒疫苗为每头份病毒含量 $10^{4.5} \sim 10^{7.0}$ TCID₅₀;更优选地,所述全病毒抗原为每头份病毒含量 $10^{4.5} \sim 10^{6.5}$ TCID₅₀;再优选地,所述全病毒抗原为每头份病毒含量 $10^{5.0}$ TCID₅₀。

[0030] 更优选地,所述血清4型副猪嗜血杆菌JS株灭活前含量为 $5 \times 10^8 \sim 8 \times 10^9$ CFU/头份;更优选地,所述副猪嗜血杆菌JS株灭活前含量为 $2 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ CFU/头份。

[0031] 所述血清5型副猪嗜血杆菌ZJ株灭活前含量为 $5 \times 10^8 \sim 8 \times 10^9$ CFU/头份;更优选地,所述副猪嗜血杆菌ZJ株灭活前含量为 $2 \times 10^9 \sim 4 \times 10^9$ CFU/头份。

[0032] 优选地,本发明疫苗组合物中,猪肺炎支原体HN0613株抗原灭活前 $10^8 \sim 10^{10}$ MHDCE/头份;更优选地,本发明疫苗组合物中,猪肺炎支原体HN0613株抗原含量为灭活前 $1 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ MHDCE/头份。(MHDCE=猪肺炎支原体DNA细胞等同物,即1MHDCE相当于1个猪肺炎支原体)。

[0033] 优选地,所述疫苗组合物灭活疫苗部分进一步包括猪大肠杆菌抗原、猪巴氏杆菌抗原、猪传染性胸膜肺炎放线杆菌抗原、猪链球菌抗原、猪霍乱沙门氏菌抗原、猪波氏杆菌抗原、猪红斑丹毒丝菌抗原;所述疫苗组合物活疫苗部分进一步包括猪瘟病毒抗原、猪细小病毒抗原、猪圆环病毒抗原、猪乙脑病毒抗原、猪伪狂犬病病毒抗原、猪流感病毒抗原、猪传染性胃肠炎病毒抗原。

[0034] 本发明的另一目的在于提供一种制备所述疫苗组合物的方法,所述方法包括:1)培养增殖猪肺炎支原体,灭活;2)培养增殖副猪嗜血杆菌,灭活;3)培养增殖猪繁殖与呼吸综合征病毒;4)将所述灭活猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原按比例混合,并与所述猪繁殖与呼吸综合征活病毒抗原分开保藏。

[0035] 本发明的再一目的在于提供所述的疫苗组合物在预防和治疗猪呼吸道疾病综合征中的应用,其中,所述应用包括用免疫量的猪肺炎支原体抗原和免疫量的副猪嗜血杆菌抗原免疫猪,然后用免疫量的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原、猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原二免所述猪。

[0036] 优选地,所述猪首次免疫时为3~4周龄,所述二免与所述首次免疫时间间隔21天。

[0037] 本发明的又一目的在于提供一种免疫试剂盒,其中,所述试剂盒包括含所述猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原的抗原组合物、以及所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原,其中,含所述猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原的抗原组合物与所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原分开保藏。

[0038] 优选地,所述猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原的抗原为灭活全菌抗原,所述猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为活的全菌抗原。

[0039] 本发明所述的疫苗组合物对3~4周龄猪免疫副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗,21日后用猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗组合物二免,二免后14日用猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌感染,可以保护80%以上的猪,抗原之间不会出现相互干扰,取得令人满意的免疫效果。

具体实施方式

[0040] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员

应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0041] 本发明实施例中用猪繁殖与呼吸综合征病毒NVDC-JXA1-R毒株、副猪嗜血杆菌血清4型JS株、血清5型ZJ株、猪肺炎支原体HN0613株为例说明本发明。

[0042] 菌株(毒株)的来源

[0043] 所选用的猪繁殖与呼吸综合征病毒株为NVDC-JXA1-R毒株以保藏号No.2467保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。

[0044] 所选用的血清4型副猪嗜血杆菌(*Haemophilus Parasuis*,HPs)菌株JS株,保藏号为CCTCC No.M2011172。

[0045] 所选用的血清5型副猪嗜血杆菌(*Haemophilus Parasuis*,HPs)菌株ZJ株,保藏号为CCTCC No.M2011173。

[0046] 所选用的猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*,Mhp)HN0613株,保藏号为CCTCC No.M2012230。

[0047] 所选用的猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*,Mhp)J株,保藏于美国菌种保藏中心ATCC25934。

[0048] 所选用的副猪嗜血杆菌血清4型(*Haemophilus Parasuis*,HPs)菌株MD0322株,保藏号为CCTCC No.M2011283。

[0049] 所选用的副猪嗜血杆菌血清5型(*Haemophilus Parasuis*,HPs)菌株SH0165株,保藏号为CCTCC No.M2011284。

[0050] 所选用的猪繁殖与呼吸综合征病毒株HuN4-F112毒株,保藏号为CGMCC No.2484。

[0051] 本发明实施例中肺病变指数评分标准:根据7个肺叶病变程度进行评定,最大得分为28分。特异性损伤的肺叶面积为0时,记为0分,1%~25%记为1分,26%~50%记为2分,51%~75%记为3分,大于75%为4分。

[0052] 本发明实施例统计分析方法为:统计7个肺叶的肺病变指数,确定病变程度。用SPSS计算机软件进行ANOVA分析,比较各组间差异,确定病变差异的有效性。

[0053] 本实施例中的疫苗组合物、三联疫苗或联苗均指预防或治疗猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体感染的疫苗组合物,即至少包含猪繁殖与呼吸综合征抗原、猪肺炎支原体抗原和副猪嗜血杆菌抗原的疫苗组合物。

[0054] 本发明中所用的pH7.2的PBS液配方为:1000mL蒸馏水中加入NaCl9g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g,本发明中所用到的化学试剂均为分析纯,购自国药集团。

[0055] 实施例1猪繁殖与呼吸综合征病毒活疫苗的制备

[0056] 本实施例中用转瓶培养法。用细胞生长液(含5%牛血清MEM培养基,pH值为7.25)利用转瓶扩增培养Marc-145细胞。细胞培养至第5天,按M.O.I.为0.001接种蓝耳病病毒。培养至接毒后第3天即收获病毒液-20℃保存。按照高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R株)检验规程进行。测定病毒含量为 $10^{8.0}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

[0057] 将检验合格的病毒液,混合于同一容器中,按1:1(V/V)加入2%明胶、5%糊精、10%海藻糖、2%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、2%牛血清白蛋白、0.164%磷酸二氢钾、0.052%磷酸氢二钠和水组成的耐热保护剂组分,充分混匀,定量分装;分装后迅速进行冷冻真空干燥后即得成品(每头份病毒含量为 $10^{6.5}\text{TCID}_{50}$)。

[0058] 在本实施例中,猪繁殖与呼吸综合征病毒猪还可以采用其他毒株(比如HuN4-F112株,TJM-F92株),并不局限于实施例中给出的毒株。

[0059] 实施例2副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗制备

[0060] 副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗,由已经灭活、浓缩并且安检合格副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株抗原和猪肺炎支原体HN0613株抗原,与Montanide GEL ST佐剂混合配制得到,混合抗原占疫苗总体积的75%~90%,佐剂含量为10%~25%。

[0061] 1.副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体种子的制备

[0062] 1.1副猪嗜血杆菌种子的制备

[0063] 副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株冻干菌种,分别划线接种于含有琼脂粉的本实验室优选的副猪嗜血杆菌培养基(MHPs)平板上,置37℃培养18~24小时,选取符合要求的菌落,接种于MHPs液体培养基中,37℃培养12~16小时,作为一级种子。取一级种子的培养物,按1%的量加入MHPs液体培养基中,37℃培养12~16小时,经检验纯粹后作为二级种子。

[0064] 副猪嗜血杆菌培养基配方(MHPs):多聚蛋白胨(5g/L)、酵母抽提物(5g/L)、谷氨酸钠(5g/L)、水解乳蛋白(2.5g/L)、氯化钠(2.5g/L)、磷酸氢二钾(2.0g/L)、葡萄糖(1.0g/L),用NaOH调pH值至7.2,116℃灭菌30min,再加入猪血清(50mI/L)、1%的NADH(10mI/L),制备固体培养基时在灭菌前加入琼脂粉(12g/L)。

[0065] 1.2猪肺炎支原体种子的制备

[0066] 冻干菌种,用液体培养基稀释,划线接种于固体培养基平皿上,置37℃培养7~10d,选择生长良好的菌落,接种于固体培养基斜面上,37℃培养7~10d,作为一级种子。取少量液体培养基洗一级种子的斜面培养物,接种于液体培养基大管中,置37℃培养4~7d,经检验纯粹后作为二级种子。

[0067] 液体培养基的配方(按1065mI计):牛心浸出液300mI,ddH₂O360mI,校正pH值到7.4,121℃灭菌15分钟。再加入下列过滤除菌的成份:Hank's平衡盐溶液(10×)40mI,0.25%酚红10mI猪血清200mI,5%水解乳蛋白100mI,25%酵母浸出液20mI,10000IU/mI青霉素10mI,1%醋酸铊溶液25mI。

[0068] 固体培养基的配方:在液体培养基中加入15g Noble Agar即可。

[0069] 2制苗用菌液的培养

[0070] 2.1副猪嗜血杆菌菌液的制备在MHPs培养基中,将副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株菌液分别按2%(V/V)接种量加入培养基中分别培养,混匀后置37℃培养16~18小时,当菌液的浓度OD₆₀₀达到2.5以上、DO值开始上升、pH值降低到6.5以下时停止培养。培养结束后,分别从制苗的菌液中取样,根据《中华人民共和国兽药典(二〇一〇年版)》附录进行纯粹检验,应纯粹。

[0071] 2.2猪肺炎支原体菌液的制备:将液体培养基培养的猪肺炎支原体种子液以1:10(容积比)接种于液体培养基中。37℃下培养3~6日,培养物下降0.5个pH值以上,纯粹检验合格后,再以同样的方式扩大培养(继代次不超过6代)。培养结束后,取样,根据《中华人民共和国兽药典(二〇一〇年版)》中细菌类活疫苗纯粹检验方法进行纯粹检验,猪肺炎支原体菌液为纯粹。

[0072] 3含量测定

[0073] 3.1副猪嗜血杆菌活菌计数

[0074] 分别从制苗菌液中取样,按照《中华人民共和国兽药典(二〇一〇年版)》附录用MHPs平板培养进行活菌计数以确定培养的菌数。

[0075] 3.2猪肺炎支原体菌体含量测定

[0076] 用PCR方法对培养物进行计数。10倍倍比稀释所检培养物,然后做PCR,PCR检出的最低限量为 $3 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ (相当于1000左右个菌体),按稀释的倍数算出菌体数(沈青春,谭青松,王琴,等.PCR方法测定Mhp培养物菌数[J].中国预防兽医学报,2006,28(1):55-57)。培养物含量应为 $1 \times 10^9 - 2 \times 10^9 \text{MHDCE}/\text{mI}$ (MHDCE=猪肺炎支原体DNA细胞等同物,即1MHDCE相当于1个猪肺炎支原体)。

[0077] 4灭活及检验

[0078] 4.1副猪嗜血杆菌菌液灭活及检验向上述副猪嗜血杆菌菌液中,按总量的0.2%(V/V)分别加入甲醛溶液,放置于37℃灭活24小时,期间搅拌3~5次。

[0079] 取已经灭活的2种副猪嗜血杆菌菌液分别5mL接种于100mL MHPs培养基中,37℃培养24小时,再移植于上述100mL培养基中37℃培养24小时;取灭活的2种副猪嗜血杆菌菌液0.5mL划线接种于MHPs平板培养基,37℃培养24小时。两种方法培养后,均应无菌生长。

[0080] 4.2猪肺炎支原体菌液的灭活及检验将检验合格的猪肺炎支原体菌液,按菌液体积总量缓慢加入终浓度为0.2%的甲醛溶液(V/V),放37℃灭活,其间每隔4小时搅拌一次,24小时后取出,进行灭活检验。

[0081] 取灭活后菌液10mL接种于100mL液体培养基中37℃培养4-7天,再按相同比例移植于上述培养基100mL中37℃培养4-7天;另外,取灭活后菌液0.5mL接种于固体培养基,37℃培养7-10天。上述两种方法培养的结果均无菌生长。

[0082] 5浓缩

[0083] 5.1将2种副猪嗜血杆菌菌液用密理博(Millipore公司)膜包(分子截留量为300Kda道尔顿)进行浓缩。浓缩后含量为 $10^{11} \text{CFU}/\text{mI}$ 。

[0084] 5.2将猪肺炎支原体培养液用密理博(Millipore公司)膜包(分子截留量为300Kda道尔顿)进行浓缩。浓缩后含量为 $10^{11} \text{MHDCE}/\text{mI}$ 。

[0085] 6安检

[0086] 取上述三种已灭活浓缩的菌液分别静脉注射18~22g的BaIb/C小鼠5只,每只0.2mL,三天内5/5健活,方为灭活彻底。

[0087] 7.疫苗的配制:具体成分配比见表1:

[0088] 表1疫苗具体成分配比

[0089]

组 分	体积百分比% v/v
副猪嗜血杆菌 4 型 JS 株抗原灭活	1%

[0090]

前含量 10^{11} CFU/ml	
副猪嗜血杆菌 5 型 ZJ 株抗原灭活 前含量 10^{11} CFU/ml	1%
猪肺炎支原体 HN0613 株抗原灭 活前含量 10^{11} MHDCE/ml	1%
Montanide GEL ST	10%
1%的硫柳汞水溶液 (w/v) 和 7% 的 EDTA (w/v)	0.9%
无菌 PBS 缓冲溶液	86.1%
总计	100%

[0091] 8分装

[0092] 1头份/瓶,分装,盖上瓶盖,并压铝盖。副猪嗜血杆菌抗原含量为灭活前副猪嗜血杆菌血清4型和5型活菌数均为 2.0×10^9 CFU/头份,猪肺炎支原体含量为 2×10^9 MHDCE/头份。

[0093] 在本实施例中,还可以采用其他致病性副猪嗜血杆菌血清型菌株(比如血清1型、血清2型、血清6型、血清13型等),其他致病性的猪肺炎支原体(比如BQ14株、J株),并不局限于实施例2中采用的菌株。灭活的方式也可以采用 β -丙内酯(BPL)、缩水甘油醛(GDA)、 ^{60}Co 照射和加热等其他灭活方法。佐剂也可以为纳米化氢氧化铝胶、卡波姆、Montanide™GeI ST、蜂胶、细胞因子、脂质体、免疫刺激复合物、含CpC脱氧寡核苷酸、纳米化磷酸铝、皂苷、山梨聚糖、二缩甘露醇、丙二醇、聚氧丙烯、聚氧乙烯嵌段共聚物、丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物、顺丁烯二酸酐与烯基衍生物共聚物、糖或多元醇的聚烯基醚交联的丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物的一种或几种组合物。

[0094] 实施例3猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗相关检验

[0095] 1、物理性状检测、无菌检验

[0096] 猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗1批(批号120701),经物理性状检测、无菌检验合格,详细结果见表2:

[0097] 表2疫苗物理性状检验及无菌检验

[0098]

疫苗批号	外观		无菌检验		
	活疫苗部分	灭活苗部分	T.G	G.A	G.P
120701	淡黄色海绵状疏松团块, 加稀释液迅速溶解	灰白色均匀混悬液	-	-	-

[0099] 注:T.G表示硫乙醇酸盐培养基,G.A表示酪胨琼脂培养基,G.P葡萄糖蛋白胨培养基;“-”表示无菌生长。

[0100] 2安全性试验

[0101] 用3~4周龄的猪繁殖与呼吸综合征病毒和副猪嗜血杆菌抗原、猪肺炎支原体抗体阴性仔猪5头,各肌肉接种以2头份灭活疫苗稀释的10头份活疫苗部分的待检样品。连续观察21日,应不出现局部或全身性的异常反应且全部健活。检验结果如下表3:

[0102] 表3疫苗安全性试验结果

[0103]

疫苗批次	注射头数	死亡头数	局部或全身反应异常猪头数	合格率
120701	5	0	0	5/5
对照组	5	0	0	5/5

[0104] 3疫苗相容性检验

[0105] 各取2瓶活疫苗部分,分别用副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗部分(待检稀释液)和参考稀释液(无菌注射用水),按照使用说明(活疫苗部分1头份/瓶,灭活疫苗部分1头份(2mL)/瓶)复原。 $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 放置2h,依照猪繁殖与呼吸综合征活疫苗滴定方法检验。通过与参考稀释液比较,评估待检稀释液对病毒活性组分的影响,病毒组分的滴定结果如表4,差值均不超过0.7log10。

[0106] 表4疫苗相容性检验结果

[0107]

疫苗批次	灭活疫苗稀释 (TCID ₅₀)	参考稀释液稀释 (TCID ₅₀)	差值(log10)
120701	10 ^{6.0}	10 ^{6.5}	0.5

[0108] 4效力试验(在本公司试验动物房进行试验)

[0109] 每组疫苗各用3~4周龄的猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌抗原、抗体阴性健康易感猪20头,首免用副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗,每头

肌肉注射2mI,21天后,用猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗组合物每头肌肉注射2mI,二免后14天,将注射了每种疫苗的免疫试验猪随机分为四组,分别用所述副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株、猪肺炎支原体强毒HN0613株、猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株各自攻毒。对照猪20头,分4组,分别用所述副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株、猪肺炎支原体强毒HN0613株、猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株攻毒。

[0110] 副猪嗜血杆菌血清4型JS株:选取免疫猪各5头,连同条件相同的对照猪5头,腹腔注射 7.0×10^9 CFU的血清4型JS株菌液2mI,观察14天,免疫猪应4/5以上保护,对照猪应4/5以上发病。

[0111] 副猪嗜血杆菌血清5型ZJ株:选取免疫猪5头,连同条件相同的对照猪5头,腹腔注射 5.0×10^9 CFU的血清5型ZJ株菌液,观察14天,免疫猪应4/5以上保护,对照猪应4/5以上发病。

[0112] 猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株:选取免疫猪5头,连同条件相同的对照猪5头,肌肉注射NVDC-JXA1株强毒培养液($10^{4.5}$ TCID₅₀)3mI,观察21天,免疫猪应4/5以上保护,对照猪5/5均应发病,且至少2头死亡。

[0113] 猪肺炎支原体强毒CVCC354株:选取免疫猪5头,连同条件相同的对照猪5头,气管内注射 1.0×10^8 MHDCE的猪肺炎支原体强毒HN0613株菌液,观察14天,免疫组应4/5以上保护,免疫猪肺病变程度评分较攻毒对照组差异显著。

[0114] 检验结果如表5、表6所示。

[0115] 表5疫苗效力检验结果

[0116]

攻毒菌株 疫苗批次	JS 株		ZJ 株		NVDC-JXA1 株			HN0613 株
	免疫组	对照组	免疫组	对照组	免疫组	对照组		免疫组
120701	5/5 保护	5/5 发病	4/5 保护	5/5 发病	5/5 保护	5/5 发病	4/5 保护	4/5 保护

[0117] 注:副猪嗜血杆菌病发病标准:发病猪死亡或出现发热(体温 40.5°C 以上,持续1~5日)、精神萎靡,咳嗽、呼吸困难、消瘦、跛行和被毛粗乱等临床症状。对濒死猪剖检,可见多发性浆膜炎(胸膜炎、心包炎、腹膜炎)、关节炎和脑膜炎等病变,各浆膜面(关节囊、心包膜、胸膜和腹膜)出现浆液性或纤维素性渗出物;

[0118] 猪繁殖与呼吸综合征发病标准:至少3日体温在 41°C 以上,或精神、食欲下降,眼结膜炎,咳嗽、喘等呼吸道症状,或大体剖检,肺部出现片状实变。

[0119] 表6疫苗效力检验猪肺炎支原体病变结果

[0120]

攻毒菌株 疫苗批次	平均肺病变 评分 (%)	标准差	P 值
120701	6.1	8.2	0.041
攻毒对照	14.1	16	/
空白对照	0.7	1.9	/

[0121] 注:P值来自于免疫组与攻毒对照组的比较

[0122] 攻毒对照组的平均肺病变是14.1%,免疫组的平均肺病变是6.1%,疫苗免疫组和对照组之间差异显著($P=0.041$),这表明:免疫猪能抵抗猪肺炎支原体的攻击,免疫效果良好。

[0123] 实施例4疫苗对比试验

[0124] 1、副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体和猪繁殖与呼吸综合征人工感染试验

[0125] 用40头副猪嗜血杆菌抗体阴性的7~8周龄仔猪,第1组用副猪嗜血杆菌血清4型JS株感染5头,每头滴鼻菌液2mI(2×10^6 CFU);第2组用副猪嗜血杆菌血清5型ZJ株感染5头,每头滴鼻菌液2mI(1×10^6 CFU);第3组用4型JS株和5型ZJ株混合感染;第4组用猪肺炎支原体HN0613株感染5头,每头滴鼻菌液2mI(1.0×10^6 MHDCE);第5组用副猪4型JS株、副猪5型ZJ株和猪肺炎支原体HN0613株感染5头;第6组用猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株感染($10^{4.5}$ TCID₅₀);第7组用副猪4型JS株、副猪5型ZJ株和蓝耳强毒NVDC-JXA1株混合感染;第8组用猪肺炎支原体HN0613株和蓝耳强毒NVDC-JXA1株混合感染5头;第9组用副猪4型JS株、副猪5型ZJ株、猪肺炎支原体HN0613株和蓝耳强毒NVDC-JXA1株混合感染(见表7),进行感染病例的研究,第10组为对照组,不进行任何攻毒,攻毒后连续观察14日,剖杀所有猪进行病理变化、细菌(病毒)分离PCR鉴定,结果见表8。

[0126] 表7攻毒仔猪的分组及攻毒剂量

[0127]

组别	仔猪头数	攻毒菌（毒）种	攻毒剂量
1	5	HPs JS 株	2×10^6 CFU
2	5	HPs ZJ 株	1×10^6 CFU
3	5	HPs JS 株+ HPs ZJ 株	2×10^6 CFU + 1×10^6 CFU
4	5	M.hyo HN0613 株	1.0×10^6 MHDCE
5	5	HPs JS 株+ HPs ZJ 株 + M.hyo HN0613 株	2×10^6 CFU + 1×10^6 CFU + 1.0×10^6 MHDCE
6	5	NVDC-JXA1	$10^{4.5}$ TCID ₅₀
7	5	HPs JS 株+ HPs ZJ 株 + NVDC-JXA1	2×10^6 CFU + 1×10^6 CFU + $10^{4.5}$ TCID ₅₀
8	5	M.hyo HN0613 株+	1.0×10^6 MHDCE + $10^{4.5}$ TCID ₅₀

[0128]

		NVDC-JXA1	
9	5	HPs JS 株+ HPs ZJ 株 + M.hyo HN0613 株+ NVDC-JXA1	2×10^6 CFU + 1×10^6 CFU + 1.0×10^6 MHDCE + $10^{4.5}$ TCID ₅₀
10	5	-	-

[0129] 表8攻毒后仔猪临床症状及剖检病变结果

[0130]

组别	仔猪头数	体温 ≥41℃ 3天 以上猪头数	精神萎靡、厌食	咳嗽、耳朵四肢发紫	剖检胸膜炎、心包炎	剖检肺部实变	剖检腹膜炎	剖检淋巴结肿大、出血	损伤部位抗原检测
1	5	0	0	0	0	0	0	0	无
2	5	0	0	0	0	0	0	0	无
3	5	0	0	0	0	0	0	0	无
4	5	3	4	4	0	3	0	3	检测到M.hyo
5	5	4	4	3	3	4	4	4	检测到M.hyo
6	5	3	5	5	4	5	5	4	检测到PRRS
7	5	3	5	5	4	5	3	4	检测到PRRS
8	5	4	5	5	4	5	4	4	检测到M.hyo 和 PRRS
9	5	5	5	5	5	5	5	5	检测到M.hyo 和

[0131]

									PRRS
10	5	0	0	0	0	0	0	0	-

[0132] 通过试验意外发现,从表8的结果可以看出,仅用低剂量的副猪嗜血杆菌滴鼻感染,猪体不会发病,也无组织损伤情况出现,进行细菌分离鉴定未能检测到抗原;用低剂量肺炎支原体攻毒,有轻微症状,可以分离到相应病原;用低剂量肺炎支原体和猪繁殖与呼吸综合征感染,有临床症状且能分离到相应病原;而用低剂量的副猪嗜血杆菌滴鼻感染及低

剂量的肺炎支原体感染,并同时感染猪繁殖与呼吸综合征病毒有严重的PRDC症状,要比第8组症状严重的多,会出现体温升高、食欲降低、呼吸困难,死亡猪四肢、耳朵发紫,剖检可见间质性肺炎、心包积液、腹膜器官表面大量纤维性渗出物、肠管和腹腔壁粘连、关节肿大并有积液和淋巴结肿大的呼吸系统疾病,并且要比仅用相同剂量的猪繁殖与呼吸综合征病毒感染时要有严重的组织损伤;在这些组织损伤中,可以分离检测到大量的猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪肺炎支原体,但在这些相同的组织损伤中检测不到副猪嗜血杆菌抗原的存在。对照组也未观察到肉眼可见的或组织学的损伤。因此,似乎只有猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌和繁殖与呼吸综合征病毒这种组合可重现这种严重的呼吸系统疾病。本发明所制备的疫苗组合物针对猪这种混合感染引发的呼吸系统疾病,在临床上极具诊断意义。

[0133] 2、疫苗免疫猪攻毒保护试验

[0134] 随机抽取检验合格的猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗批号为120701的疫苗若干瓶和市场上出售的由武汉科前生物公司生产的副猪嗜血杆菌病灭活疫苗(4型+5型)批号为100409、上海海利生产的高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R株)批号为10080,分别用3~4周龄的猪繁殖与呼吸综合征病毒和副猪嗜血杆菌抗原、抗体阴性健康易感仔猪进行免疫猪攻毒保护对比试验,试验如下表9:按照疫苗的使用说明,武汉科前生物公司副猪嗜血杆菌病灭活疫苗(HPs)肌肉注射疫苗1头份(抗原含量为灭活前4型和5型各均不少于 4×10^9 CFU/头份),间隔3周后以相同剂量和途径二免;上海海利公司的高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(PRRS)肌肉注射1头份(每头份病毒含量 $\geq 10^{5.0}$ TCID₅₀);本实验室制备的猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗(M.hyo+HPs+PRRS)肌肉注射1头份。

[0135] 表9疫苗免疫仔猪

[0136]

组别	免疫疫苗批号	仔猪头数	在2周大时第一次接种	在5周大时第二次接种	攻毒
1	100409	10	HPs	HPs	在7周大时用副猪嗜血杆菌4型JS株、5型ZJ株
2	120701	10	M.hyo+ HPs	M.hyo+ HPs+ PRRS	
3	-	10	PRRS	M.hyo+ HPs+ PRRS	
4	-	10	-	-	
5	10080	5	-	PRRS	在7周大时用NVDC-JXA1株
6	120701	5	M.hyo+ HPs	M.hyo+ HPs+ PRRS	
7	-	5	-	-	
8	100806	5	M.hyo	M.hyo	在7周大时用HN0613株
9	120701	5	M.hyo+ HPs	M.hyo+ HPs+ PRRS	
10	-	5	PRRS	M.hyo+ HPs+ PRRS	
11	-	5	-	-	
12	-	5	-	-	-

[0137] 疫苗免疫后,第1组有1头猪注射部位出现红肿、体温升高等症状,其它组的猪均正常。

[0138] 免疫仔猪在7周大时攻毒,4型JS株和5型ZJ株攻毒保护结果见表10:副猪嗜血杆菌血清4型JS株腹腔注射菌液2mI(含活菌数 7.0×10^9 CFU),结果第1组、第2组免疫猪攻毒100%保护,第3组免疫猪攻毒40%保护,对照组80%发病。副猪嗜血杆菌血清5型ZJ株腹腔注射菌液2mI(含活菌数 5.0×10^9 CFU),第1组免疫猪攻毒100%保护,第2组免疫猪攻毒100%保护,第3组免疫猪保护20%,对照猪100%发病。

[0139] 表10免疫仔猪4型JS株和5型ZJ株攻毒保护试验结果

[0140]

攻毒菌株 组别	JS 株			ZJ 株		
	仔猪头数	发病头数	保护率 (%)	仔猪头数	发病头数	保护率
1	5	0	100% (5/5)	5	0	100% (5/5)
2	5	0	100% (5/5)	5	0	100% (5/5)
3	5	3	40% (2/5)	5	4	20% (1/5)
4	5	4	-	5	5	-

[0141] 注:副猪嗜血杆菌病发病标准:发病猪死亡或出现发热(体温40.5℃以上,持续1~5日)、精神萎靡,咳嗽、呼吸困难、消瘦、跛行和被毛粗乱等临床症状。对濒死猪剖检,可见多发性浆膜炎(胸膜炎、心包炎、腹膜炎)、关节炎和脑膜炎等病变,各浆膜面(关节囊、心包膜、胸膜和腹膜)出现浆液性或纤维素性渗出物。

[0142] 免疫仔猪在7周大时攻毒,NVDC-JXA1株攻毒保护结果见表11:肌肉注射猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株培养液3mI($10^{4.5}$ TCID₅₀),第5组HPs免疫猪攻毒100%保护,第6组PRRS免疫猪攻毒100%保护,对照组100%发病,且有4头死亡。

[0143] 表11免疫仔猪NVDC-JXA1株攻毒保护试验结果

[0144]

攻毒菌株 组别	NVDC-JXA1 株			
	仔猪头数	发病头数	死亡头数	保护率
5	5	0	0	100% (5/5)
6	5	0	0	100% (5/5)
7	5	5	4	-

[0145] 注:猪繁殖与呼吸综合征发病标准:至少3日体温在41℃以上,或精神、食欲下降,眼结膜炎,咳嗽、喘等呼吸道症状,或大体剖检,肺部出现片状实变。

[0146] 免疫仔猪在7周大时攻毒,猪肺炎支原体强毒HN0613株攻毒保护结果见表12、表13:选取免疫猪5头,连同条件相同的对照猪5头,气管内注射 1.0×10^8 MHDCE的猪肺炎支原体强毒HN0613株菌液,结果第8组、第9组免疫猪攻毒100%保护,第10组免疫猪攻毒20%保护,免疫猪肺病变程度评分较攻毒对照组差异显著。

[0147] 表12免疫仔猪猪肺炎支原体强毒HN0613株攻毒保护试验结果

[0148]

	仔猪头数	在 2 周大时第一次接种	在 5 周大时第二次接种	攻毒保护率
8	5	M.hyo	M.hyo	100% (5/5)
9	5	M.hyo+ HPs	M.hyo+ HPs+ PRRS	100% (5/5)
10	5	PRRS	M.hyo+ HPs+ PRRS	20% (1/5)

[0149] 表13疫苗免疫后猪肺炎支原体攻毒病变结果

[0150]

组别	平均肺病变评分 (%)	标准差	P 值
8	3.6	7.6	0.0215
9	4.2	8.1	0.031
10	14.1	16	/
11	14.6	20	/
12	1.8	1.8	/

[0151] 注:P值来自于接种组与对照组的比较

[0152] 对照组的平均肺病变是14.6%,M.hyo疫苗免疫猪攻毒的平均肺病变是3.6%,M.hyo+HPs疫苗首免,M.hyo+HPs+PRRS二免,免疫猪攻毒的平均肺病变是4.2%。M.hyo疫苗免疫组和对照组之间差异显著($P=0.0215$),M.hyo+HPs疫苗首免,M.hyo+HPs+PRRS二免组与对照组之间亦差异显著($P=0.031$),两者相当。

[0153] 根据表12、表13试验结果,对3~4周龄猪免疫副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗,21日后用猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗组合物二免,二免后14日用猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌感染,可以保护80%以上的猪,抗原之间不会出现相互干扰,取得令人满意的免疫效果。

[0154] 实施例5制备猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫

苗

[0155] 1、疫苗按照实施例1用转瓶生产猪繁殖与呼吸综合征病毒,并用实施例1的耐热冻干保护剂配方制备猪繁殖与呼吸综合征活疫苗;按照实施例2猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗的制备方法及步骤,由已经灭活、超滤并且安检合格的副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株抗原,按照不同抗原含量与Montanide GEL ST佐剂混合配制得到,疫苗成品抗原含量为含灭活前猪肺炎支原体、血清4型JS株、5型ZJ株活菌数见表14。

[0156] 表14不同抗原含量疫苗

[0157]

疫苗	灭活疫苗部分			活疫苗部分
	每头份含灭活前副猪嗜血杆菌菌液活菌数 (CFU)	每头份含灭活前支原体肺炎菌液活菌数 (MHDCE)	每头份佐剂含量	每头份活疫苗病毒含量 (TCID ₅₀)
1	4型JS株 5.0×10^8 5型ZJ株 5.0×10^8	1.0×10^8	10%	$10^{4.5}$
2	4型JS株 2.0×10^9 5型ZJ株 2.0×10^9	1.0×10^9	15%	$10^{5.0}$
3	4型JS株 4.0×10^9 5型ZJ株 4.0×10^9	2.0×10^9	20%	$10^{6.0}$
4	4型JS株 8.0×10^9 5型ZJ株 8.0×10^9	1.0×10^{10}	25%	$10^{7.0}$

[0158] 2、效力检验

[0159] 每组疫苗各用3~4周龄的猪繁殖与呼吸综合征病毒和副猪嗜血杆菌抗原、抗体阴

性健康易感猪20头,每头肌肉注射2mI,28天后,将注射了每种疫苗的免疫试验猪随机分为四组,分别用猪肺炎支原体HN0613株、副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株、猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株各自攻毒。对照猪20头,分4组,分别用上述猪肺炎支原体HN0613株、副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株、猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株攻毒。

[0160] 猪肺炎支原体HN0613株:选取免疫猪各5头,连同条件相同的对照猪5头,气管内注射 1.0×10^8 MHDCE的猪肺炎支原体强毒HN0613株菌液,观察14天,免疫猪应4/5以上保护,对照猪应4/5以上发病。

[0161] 副猪嗜血杆菌血清4型JS株:选取免疫猪各5头,连同条件相同的对照猪5头,腹腔注射 7.0×10^9 CFU的血清4型JS株菌液2mI,观察14天,免疫猪应4/5以上保护,对照猪应4/5以上发病。

[0162] 副猪嗜血杆菌血清5型ZJ株:选取免疫猪5头,连同条件相同的对照猪5头,腹腔注射 5.0×10^9 CFU的血清5型ZJ株菌液,观察14天,免疫猪应4/5以上保护,对照猪应4/5以上发病。

[0163] 猪繁殖与呼吸综合征病毒强毒NVDC-JXA1株:选取免疫猪5头,连同条件相同的对照猪5头,肌肉注射NVDC-JXA1株强毒培养液 $10^{4.5}$ TCID₅₀/3mI,观察21天,免疫猪应4/5以上保护,对照猪5/5均应发病,且至少2头死亡。

[0164] 检验结果如表15所示,各组疫苗均能达到4/5以上保护,免疫效果良好。

[0165] 表15疫苗效力检验结果

[0166]

攻毒 菌株 疫苗	HN0613 株		JS 株		ZJ 株		NVDC-JXA1 株		
	免疫组	对 照 组	免疫 组	对 照 组	免 疫 组	对 照 组	免疫组	对照组	
1	4/5 保护	4/5 发 病	4/5 保护	5/5 发 病	4/5 保 护	5/5 发病	4/5 保护	5/5 发 病	3/5 死 亡
2	4/5 保护	4/5 发 病	5/5 保护	5/5 发 病	5/5 保护	4/5 发病	5/5 保 护	5/5 发 病	3/5 死 亡
3	5/5 保护	4/5 发 病	5/5 保护	4/5 发病	5/5 保护	5/5 发病	5/5 保 护	5/5 发 病	4/5 死亡

[0167]

4	5/5 保护	5/5 发 病	5/5 保护	5/5 发 病	5/5 保 护	5/5 发病	5/5 保护	5/5 发 病	3/5 死 亡
---	--------	------------	-----------	------------	------------	-----------	--------	------------	------------

[0168] 注:副猪嗜血杆菌病发病标准:发病猪死亡或出现发热(体温40.5℃以上,持续1~5日)、精神萎靡,咳嗽、呼吸困难、消瘦、跛行和被毛粗乱等临床症状。对濒死猪剖检,可见多

发性浆膜炎(胸膜炎、心包炎、腹膜炎)、关节炎和脑膜炎等病变,各浆膜面(关节囊、心包膜、胸膜和腹膜)出现浆液性或纤维素性渗出物;

[0169] 猪繁殖与呼吸综合征发病标准:至少3日体温在41℃以上,或精神、食欲下降,眼结膜炎,咳嗽、喘等呼吸道症状,或大体剖检,肺部出现片状实变。

[0170] 根据试验结果可以看出,用水性佐剂Montanide GEL ST为佐剂制成的猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗和猪繁殖与呼吸综合征活疫苗作为组合物联合使用,不仅注射方便、安全,而且能预防猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌和猪繁殖与呼吸综合征引起的猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病和猪繁殖与呼吸综合征及其混合感染,具有很好的预防效果。

[0171] 本发明采用国内流行副猪嗜血杆菌血清4型JS株、5型ZJ株、猪肺炎支原体HN0613株和猪繁殖与呼吸综合征JXA1-R株,毒株免疫效果良好,能够有效预防由副猪嗜血杆菌引起的副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体引起的猪喘气病和猪繁殖与呼吸综合征引起的猪蓝耳病及其三者的混合感染;本发明灭活疫苗部分采用了水溶性聚合物类佐剂和适宜的配苗技术制备了副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗,用其作为稀释剂可以稀释猪繁殖与呼吸综合征活疫苗,二者作为组合物联合使用安全、质量可控,免疫效果良好,攻毒保护率达到80%~100%,可以满足不同用户的要求。使用时用副猪嗜血杆菌病、猪肺炎支原体灭活疫苗首免,21日后用猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗组合物二免,可以取得令人满意的免疫效果。

[0172] 1)含有两种或两种以上抗原、可以预防两种或两种以上疾病的联合疫苗以其方便、多效、低成本成为新一代疫苗研究的特点。与单一疫苗相比,联合疫苗可以减少疫苗的接种次数,避免因漏种而不能得到全程免疫;另外,疫苗大多不耐热,其生产、运输、储存乃至全部使用过程均需在较低温度下进行,即所谓的“冷链”,这种环环相扣的冷链运作,费用极高,使疫苗成本居高不下,而使用联合疫苗,则可以大大降低冷链运作的费用,因此具有显著的优越性。

[0173] 2)本发明的猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体抗原组合物及使用该组合物制备的预防和治疗猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体感染的三联疫苗,意外的发现采用先免疫副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体二联灭活疫苗,再免疫猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体三联疫苗,取得了令人满意的免疫效果,能有效地消除抗原之间的干扰现象,而这出乎本领域普通技术人员预料的。

[0174] 3)解决了现有技术的困难,改变了人们对猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体同时感染时的认识偏见,首次将猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体抗原按照合适的比例联合使用,而在本发明之前,一直没有人认为三种病可以同时进行预防进而这三种疫苗可以联合使用。

[0175] 4)本发明的猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体抗原组合物及使用该组合物制备的预防和治疗猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体感染的三联疫苗,在预防和治疗PRDC混合感染的应用,可以有效的防止PRDC混合感染,遏制病情的蔓延。

[0176] 5)此外,本发明预防和治疗猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体相关疾病的三联疫苗,制备方法简单,疫苗的效价含量高,免疫方便快捷,与现有技术中的多次免疫,至少需要打3针才能防治以上三种疾病的疫苗及其免疫方法相比,本发明仅

免疫2次就能够预防猪繁殖与呼吸综合征病毒、副猪嗜血杆菌和猪肺炎支原体三种病原感染,降低了免疫成本,节约了免疫程序,更加经济可靠。

[0177] 实施例6同类毒株制备猪繁殖与呼吸综合征活疫苗-猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗

[0178] 按照实施例1方法用转瓶生产猪繁殖与呼吸综合征病毒(HuN4-F112株),并用实施例1的耐热冻干保护剂配方制备猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(HuN4-F112株);按照实施例2方法制备猪肺炎支原体(J株)、副猪嗜血杆菌病灭活疫苗(血清4型MD0322+血清5型SH0165)。使用时按照使用说明(活疫苗部分1头份/瓶,灭活疫苗部分1头份(2mI)/瓶)复原(批号:120801)。

[0179] 实施例7本发明疫苗在猪繁殖与呼吸综合征相关PRDC中的治疗中的功效

[0180] 此实验中包括1275头商品猪,将这些猪按照体重、以及是否一窝所生区分开,随机分3组,即疫苗120701免疫组(430头猪)A、疫苗120801免疫组(425头猪)B、对照组(420头猪)C。

[0181] A组:在实验当天,对约28日龄的猪进行单次肌肉接种本发明的猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌灭活疫苗免疫猪,2mI/头,2周后进行单次肌肉接种本发明的疫苗组合物(猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌灭活疫苗三联苗)二免。

[0182] B组:在实验当天,对约28日龄的猪进行单次肌肉接种本发明的猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌灭活疫苗免疫猪,2mI/头,2周后进行单次肌肉接种本发明的疫苗组合物(猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌灭活疫苗三联苗)二免。

[0183] C组:对照组为未经治疗的猪。

[0184] 在肥育结束时(实验第180日)终止实验。

[0185] 所记录的参数

[0186] 参数记录如下:

[0187] (1)个体体重(所有动物)

[0188] (2)僵猪率(所有动物)

[0189] (3)临床表现(所有动物)

[0190] (4)死亡率(所有动物)

[0191] (6)尸检(若可能,每一只死亡或处死动物)

[0192] 养猪场发病情况

[0193] 根据饲养及肥育农场的发病史,动物自肥育中期开始经历与猪呼吸道疾病综合征(PRDC)相关的呼吸道症状。这些症状伴有肥育期间的体重增加程度降低(ADWG550-700g)及死亡率增加(6.5-7.8%)。此时被认为涉及PRDC的病原体为猪繁殖与呼吸综合征、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀巴斯德氏菌、支气管败血性波氏菌,有时还涉及SIV。有趣的是,此实验的结果表明,PRRSV和猪肺炎支原体的感染在副猪嗜血杆菌发作的约2-4周前出现,可能是猪群中存在前2种免疫抑制性感染疾病造成的。

[0194] 结果

[0195] 体重、体重增加、平均每日体重增加(ADWG)

[0196] 在实验起始时免疫组和对照组体重相当。在实验第150日龄及第180日龄,120701疫苗、120801疫苗接种组的体重显著高于对照组的体重($p < 0.0001$)。

[0197] 自实验起始至第180日龄,120701疫苗接种组动物比对照组动物多增重4.92kg,120801疫苗接种组动物比对照组动物多增重3.31kg。此对应于,从28日龄至第150日龄时120701疫苗接种组动物的ADWG较对照高12.59g/d,120801疫苗接种组动物的ADWG较对照高14.55g/d;至第180日龄时120701疫苗接种组动物的ADWG较对照高76.33g/d,120801疫苗接种组动物的ADWG较对照高66.33g/d。对于整个肥育期(第63-180日龄)而言,120701疫苗接种组ADWG可从对照组动物的702.6g/d增加至疫苗接种组动物的741.02g/d;120801疫苗接种组ADWG可从对照组动物的702.6g/d增加至疫苗接种组动物的728.03g/d,具体情况见表16、17。

[0198] 表16接种120701疫苗对动物体重增长的影响

[0199]

监测指标	实验 日龄	对照组 (平均 值)	免疫组 (平均 值)	差值	P 值*
------	----------	------------------	------------------	----	------

[0200]

活体重(kg)	28	6.46	6.61	0.15	0.1021 ns
	63	24.75	25.18	0.43	0.3943 ns
	90	49.26	49.8	0.54	0.8936 ns
	120	64.89	65.68	0.79	0.0008***
	150	74.53	76.21	1.68	<0.0005***
	180	106.96	111.88	4.92	<0.0006***
体重增加 (kg)	28-150	68.07	69.6	1.53	<0.0001***
	28-180	100.5	105.19	4.69	<0.0001***
ADWG(g/d)	28-150	557.9	570.49	12.59	<0.0002***
	28-180	615.7	692.03	76.33	<0.0001***
	63-180	702.6	741.02	38.42	<0.0001***

[0201] 表17接种120801疫苗对动物体重增长的影响

[0202]

监测指标	实验周数	对照组 (平均值)	免疫组 (平均值)	差值	P 值*
活体重(kg)	28	6.46	6.6	0.14	0.1664 ns
	63	24.75	25.09	0.34	0.3936 ns
	90	49.26	49.79	0.53	0.9125 ns
	120	64.89	65.33	0.44	0.0009***
	150	74.53	76.44	1.91	<0.0001***
	180	106.96	110.27	3.31	<0.0008***
体重增加 (kg)	28-150	68.07	69.84	1.77	<0.0006***
	28-180	100.5	103.67	3.17	<0.0001***
ADWG(g/d)	28-150	557.9	572.45	14.55	<0.0003***
	28-180	615.7	682.03	66.33	<0.0001***
	63-180	702.6	728.03	25.43	<0.0001***

[0203] 僵猪率

[0204] 在任一称重时间点,未在疫苗接种组与对照组之间观测到僵猪率 的显著差异。免疫组和对照组的僵猪率都较低(1.8%~3.7%)。

[0205] 临床表现

[0206] 对照组和免疫组有类似的临床表现,跛行、腹泻(在5%~8%的动物中)。这些表现在对照组和免疫组中出现频率相等。对死亡动物进行尸检且随后进行微生物学检验发现,猪链球菌可能是引起跛行的感染性病原体,溶血性大肠杆菌可能是腹泻的原因。此外,对照组在35日龄至150日龄呼吸道症状明显(在15~20%的动物中),咳嗽、呼吸困难,严重的猪只呈犬坐呼吸,对症状严重濒死猪只处死后,解剖进行微生物检验发现,呼吸道症状可能是由猪繁殖与呼吸综合征、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌混合感染引起的。与对照组相比,疫苗免疫组猪只中咳嗽及呼吸困难的频率分别降低28%及40.8%。表明免疫组对呼吸道综合症有较好防治效果。

[0207] 死亡率

[0208] 整个试验过程中,对照组猪具有比疫苗接种组动物显著较高的死亡率(疫苗接种组动物:2.01%,安慰剂处理组动物:5.37%, $p=0.0165$)。疫苗接种组猪的死亡率比对照组猪只下降57.6%。

[0209] 本实施例在肥育后期有典型PRDC症状的农场进行。猪在63日龄~150日龄时发展出呼吸道症状、死亡率增加、且体重增加幅度减小。通过血清学及微生物学筛查发现,猪繁殖与呼吸综合征、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、猪鼻支原体及多杀巴斯德氏菌都可能参与此

种疾病综合征。

[0210] 与对照组相比,疫苗接种组的以下统计学显著表现值得注意:

[0211] -增重损失减小

[0212] -死亡率降低

[0213] -咳嗽及呼吸困难减少

[0214] 如所预期,僵猪率未观测到统计学显著差异,因为僵猪的出现并非PRDC的典型表现。

[0215] 将这些表现汇总能得出以下结论:

[0216] 1、本实验在肥育中受PRDC影响的畜群中进行。猪繁殖与呼吸综合征、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌参与此种疾病综合征,观测到呼吸道症状、增重损失及死亡率增加。

[0217] 2、本发明疫苗组合物对动物进行疫苗接种可降低或甚至防止与猪繁殖与呼吸综合征、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌混合感染引起的PRDC。

[0218] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种疫苗组合物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN104096222B	公开(公告)日	2016-09-14
申请号	CN201310119733.2	申请日	2013-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	普莱柯生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	普莱柯生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	普莱柯生物工程股份有限公司		
[标]发明人	张许科 孙进忠 白朝勇		
发明人	张许科 孙进忠 白朝勇		
IPC分类号	A61K39/295 G01N33/53 A61P11/00		
审查员(译)	程婷		
其他公开文献	CN104096222A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种疫苗组合物，该疫苗组合物包括免疫量的猪肺炎支原体抗原、免疫量的副猪嗜血杆菌抗原以及免疫量的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原。该疫苗组合物在二免后14日用猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪肺炎支原体和副猪嗜血杆菌感染，可以保护80%以上的猪，抗原之间不会出现相互干扰，取得令人满意的免疫效果。

组分	体积百分比% v/v
副猪嗜血杆菌4型JS株抗原灭活	1%