



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103800901 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201410039969. X

(22) 申请日 2014. 01. 27

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8533 2013. 12. 09

CGMCC No. 8534 2013. 12. 09

CGMCC No. 8535 2013. 12. 09

(73) 专利权人 内蒙古华希生物科技有限公司  
地址 010010 内蒙古自治区呼和浩特市工业  
开发区如意南区

(72) 发明人 孙艺萍 王林叶 孙治华 王欢  
李敏 段跃强 杨鹏辉 尚炜

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限  
公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

A61K 39/09(2006. 01)

A61P 15/14(2006. 01)

A61P 37/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101991847 A, 2011. 03. 30, 权利要求书.

CN 102294026 A, 2011. 12. 28, 权利要求书.

CN 1895666 A, 2007. 01. 17, 权利要求书.

CN 101991847 A, 2011. 03. 30, 权利要求书.

CN 1895666 A, 2007. 01. 17, 权利要求书.  
CN 102294026 A, 2011. 12. 28, 权利要求书.  
WO 2010/124154 A1, 2010. 10. 28, 全文.  
张捷等. 奶牛乳房炎多联苗抗原配比  
及抗人工感染试验的研究. 《黑龙江畜牧兽  
医》. 2010, (第 2 期), 131-133.  
张捷等. 奶牛乳房炎多联苗抗原配比  
及抗人工感染试验的研究. 《黑龙江畜牧兽  
医》. 2010, (第 2 期), 131-133.  
Michael C. Fontaine, et al. Immunisation  
of dairy cattle with recombinant  
Streptococcus uberis GapC or a chimeric  
CAMP antigen confers protection against  
heterologous bacterial challenge.  
《Vaccine》. 2002, 第 20 卷 (第 17-18  
期), 2278-2286.

Pamela Ruegg, et al. Evaluating the  
effectiveness of Mastitis Vaccines. 《Milk  
Money》. 2005, 22-28.

冯万新. 奶牛乳房炎主要病原菌分离鉴定及  
其多联苗抗体检测研究. 《中国优秀学位论文论  
全文数据库》. 2010, 全文.

审查员 曲凯

权利要求书1页 说明书20页  
序列表2页

(54) 发明名称

链球菌以及将其灭活得到的奶牛乳房炎疫苗

(57) 摘要

本发明公开了链球菌以及将其灭活得到的奶  
牛乳房炎疫苗。本发明保护一种奶牛乳房炎疫苗，  
其活性成分为灭活后的菌株 SAWR-6、灭活后的菌  
株 SDTR-9 和灭活后的菌株 SURF-5。本发明还保  
护一种奶牛乳房炎疫苗，其活性成分为灭活后的  
菌株和荚膜多糖；灭活后的菌株为灭活后的菌株  
SAWR-6、灭活后的菌株 SDTR-9 和灭活后的菌株  
SURF-5；荚膜多糖为菌株 SAWR-6 的荚膜多糖、菌  
株 SDTR-9 的荚膜多糖和菌株 SURF-5 的荚膜多糖。  
本发明提供的疫苗具有高效、通用、安全、稳定、剂  
型多样等优点，本发明为安全、高效、全面有效预

防链球菌感染性奶牛乳房炎提供了有力保证，将  
是奶牛链球菌乳房炎疫苗发展的新里程碑。

CN 103800901 B

1. 菌株 SAWR-6、菌株 SDTR-9 和菌株 SURF-5 在制备奶牛乳房炎疫苗中的应用；所述菌株 SAWR-6 为无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)SAWR-6CGMCC No. 8533；所述菌株 SDTR-9 为停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)SDTR-9CGMCC No. 8534；所述菌株 SURF-5 为乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)SURF-5CGMCC No. 8535。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于：所述奶牛乳房炎为链球菌引起的奶牛乳房炎。

3. 一种奶牛乳房炎疫苗，其活性成分为灭活后的菌株；所述灭活后的菌株为灭活后的菌株 SAWR-6、灭活后的菌株 SDTR-9 和灭活后的菌株 SURF-5；所述菌株 SAWR-6 为无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)SAWR-6CGMCC No. 8533；所述菌株 SDTR-9 为停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)SDTR-9CGMCC No. 8534；所述菌株 SURF-5 为乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)SURF-5CGMCC No. 8535。

4. 如权利要求 3 所述的疫苗，其特征在于：所述疫苗中，所述灭活后的菌株 SAWR-6、所述灭活后的菌株 SDTR-9 和所述灭活后的菌株 SURF-5 的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌 /mL。

5. 一种奶牛乳房炎疫苗，其活性成分为灭活后的菌株和荚膜多糖；所述灭活后的菌株为灭活后的菌株 SAWR-6、灭活后的菌株 SDTR-9 和灭活后的菌株 SURF-5；所述荚膜多糖为所述菌株 SAWR-6 的荚膜多糖、所述菌株 SDTR-9 的荚膜多糖和所述菌株 SURF-5 的荚膜多糖；所述菌株 SAWR-6 为无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)SAWR-6CGMCC No. 8533；所述菌株 SDTR-9 为停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)SDTR-9CGMCC No. 8534；所述菌株 SURF-5 为乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)SURF-5CGMCC No. 8535。

6. 如权利要求 5 所述的疫苗，其特征在于：所述疫苗中，所述灭活后的菌株 SAWR-6、所述灭活后的菌株 SDTR-9 和所述灭活后的菌株 SURF-5 的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌 /mL，所述菌株 SAWR-6 的荚膜多糖、所述菌株 SDTR-9 的荚膜多糖和所述菌株 SURF-5 的荚膜多糖的浓度均为  $40 \mu\text{g/ml}$ 。

7. 如权利要求 5 所述的疫苗，其特征在于：所述疫苗还包括佐剂。

8. 如权利要求 7 所述的疫苗，其特征在于：所述佐剂为 SP01 佐剂、铝佐剂或白花油佐剂。

9. 如权利要求 3 至 8 中任一所述的疫苗，其特征在于：所述奶牛乳房炎为链球菌引起的奶牛乳房炎。

10. 菌株 SAWR-6 和 / 或菌株 SDTR-9 和 / 或菌株 SURF-5；所述菌株 SAWR-6 为无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)SAWR-6CGMCC No. 8533；所述菌株 SDTR-9 为停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)SDTR-9CGMCC No. 8534；所述菌株 SURF-5 为乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)SURF-5CGMCC No. 8535。

## 链球菌以及将其灭活得到的奶牛乳房炎疫苗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及链球菌以及将其灭活得到的奶牛乳房炎疫苗。

### 背景技术

[0002] 奶牛乳房炎(Bovine Mastitis)是危害畜牧业发展、食品安全的重大传染病,特别是近年来,随着环境的改变、抗生素的滥用,产生了多种耐药菌甚至出现了超级细菌,由细菌感染引发的奶牛乳房炎发病率和死亡率逐年攀升,严重危害了畜牧业发展和食品安全,进而危害了人类健康。因奶牛乳房炎造成的经济损失,美国每年达 30 亿美元、英国 4 亿美元,我国 35 亿元以上。奶牛乳房炎分为临床型和隐性型。临床型的症状为:乳区发热、肿痛,泌乳量减少,乳汁性状发生改变,细菌数增多、体细胞增加,重者并发多器官衰竭甚至死亡。隐性型没有特异的临床表现,通过体细胞、产奶量及质量检测才能检出,但奶牛罹患率比临床型高得多,造成病原微生物的进一步播散,在一定条件下会转化成临床型,实际损失比临床型高得多。

[0003] 引发奶牛乳房炎的病原菌均达 140 余种。据临床流行病学资料显示,我国奶牛乳房炎的病原菌以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌为主,占细菌感染的 91.4%,其中链球菌占 40%,且以无乳链球菌、停乳链球菌、乳房链球菌为主(三者占链球菌感染的 92% 以上),与当前国际报道感染菌种、血清型及流行趋势一致。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供链球菌以及将其灭活得到的奶牛乳房炎疫苗。

[0005] 本发明保护菌株 SAWR-6、菌株 SDTR-9 和菌株 SURF-5 在制备奶牛乳房炎疫苗中的应用。所述奶牛乳房炎可为链球菌引起的奶牛乳房炎。所述链球菌可为无乳链球菌、停乳链球菌或乳房链球菌。所述链球菌具体可为菌株 SAWR-6、菌株 SDTR-9、菌株 SURF-5、无乳链球菌 ATCC51487、停乳链球菌 ATCC43078、乳房链球菌 ATCC19436、奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株、奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株或奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株。

[0006] 本发明还保护一种奶牛乳房炎疫苗,其活性成分为灭活后的菌株;所述灭活后的菌株为灭活后的菌株 SAWR-6、灭活后的菌株 SDTR-9 和灭活后的菌株 SURF-5。具体来说,所述疫苗中,所述灭活后的菌株 SAWR-6、所述灭活后的菌株 SDTR-9 和所述灭活后的菌株 SURF-5 的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌/mL。所述疫苗还可包括佐剂。所述佐剂为 SP01 佐剂、铝佐剂或白花油佐剂。所述疫苗的剂型为乳头管注射剂型、皮下注射剂型或肌肉注射剂型。所述奶牛乳房炎可为链球菌引起的奶牛乳房炎。所述链球菌可为无乳链球菌、停乳链球菌或乳房链球菌。所述链球菌具体可为菌株 SAWR-6、菌株 SDTR-9、菌株 SURF-5、无乳链球菌 ATCC51487、停乳链球菌 ATCC43078、乳房链球菌 ATCC19436、奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株、奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株或奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株。

[0007] 本发明还保护一种奶牛乳房炎疫苗,其活性成分为灭活后的菌株和荚膜多糖;所述灭活后的菌株为灭活后的菌株 SAWR-6、灭活后的菌株 SDTR-9 和灭活后的菌株 SURF-5;

所述荚膜多糖为所述菌株 SAWR-6 的荚膜多糖、所述菌株 SDTR-9 的荚膜多糖和所述菌株 SURF-5 的荚膜多糖。具体来说,所述疫苗中,所述灭活后的菌株 SAWR-6、所述灭活后的菌株 SDTR-9 和所述灭活后的菌株 SURF-5 的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌 /mL,所述菌株 SAWR-6 的荚膜多糖、所述菌株 SDTR-9 的荚膜多糖和所述菌株 SURF-5 的荚膜多糖的浓度均为  $40 \mu\text{g/ml}$ 。所述疫苗还可包括佐剂。所述佐剂为 SP01 佐剂、铝佐剂或白花油佐剂。所述疫苗的剂型为乳头管注射剂型、皮下注射剂型或肌肉注射剂型。所述奶牛乳房炎可为链球菌引起的奶牛乳房炎。所述链球菌可为无乳链球菌、停乳链球菌或乳房链球菌。所述链球菌具体可为菌株 SAWR-6、菌株 SDTR-9、菌株 SURF-5、无乳链球菌 ATCC51487、停乳链球菌 ATCC43078、乳房链球菌 ATCC19436、奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株、奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株或奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株。

[0008] 所述“灭活后的菌株”可通过将所述菌株进行甲醛灭活得到。所述“灭活后的菌株”具体通过如下方法得到:取菌株,用 PBS 缓冲液重悬,然后加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),  $37^\circ\text{C}$ 、150rpm 振荡孵育 36-48h,离心(离心参数具体可为:5000r/min, 20min)收集菌体,用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的 PBS 缓冲液悬浮菌体,得到“灭活后的菌株”(含  $1 \times 10^{10}$  个细菌 /mL)。

[0009] 所述荚膜多糖的制备方法具体如下:

[0010] (1) 取菌株,接种于 BHI 培养基,  $37^\circ\text{C}$ 、150rpm 振荡培养 18h。

[0011] (2) 取步骤(1)得到的菌液,接种至 BHI 培养基,在发酵罐中  $37^\circ\text{C}$  发酵(发酵初始时刻,菌株的菌浓度为  $2 \times 10^8$  个 /ml, 发酵罐温度为  $37^\circ\text{C}$ , 发酵罐的初始转速为 198r/min, 罐压保持在 0.05MPa,用 8%NaOH 水溶液或 5% 盐酸水溶液调节发酵体系的 pH 为 7.0-7.2,通过增加发酵罐转速和 / 或增加通气量维持发酵体系的溶氧量为 25-35%,发酵体系的溶氧量高于 35% 时停止发酵);

[0012] (3)取步骤(2)得到的发酵体系,加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),  $25^\circ\text{C}$ 、150rpm 振荡孵育 24h,然后  $4^\circ\text{C}$ 、3000rpm 离心 15min,收集上清液;

[0013] (4) 取步骤(3)得到的上清液,加入十六烷基三甲基溴化铵并使其浓度为 1g/100ml,室温、120rpm 振荡孵育 1 小时,然后  $4^\circ\text{C}$  静置 16 小时,然后 10000rpm 离心 30min,收集沉淀(复合多糖);

[0014] (5)取步骤(4)得到的沉淀,溶于 2M 氯化钙水溶液(沉淀与氯化钙水溶液的配比为 0.2-0.5g :ml),研磨,然后加入与 2M 氯化钙水溶液等体积的水,室温、120rpm 振荡孵育 1h,然后加入乙醇并使其浓度为 25% (体积比),  $4^\circ\text{C}$  静置 3h,然后  $4^\circ\text{C}$ 、5000rpm 离心 30min,收集上清液;

[0015] (6)取步骤(5)得到的上清液,加入乙醇并使其浓度为 80% (体积比),  $4^\circ\text{C}$  静置 3h,然后  $4^\circ\text{C}$ 、10000rpm 离心 15min,收集沉淀,依次用乙醇和丙酮洗涤,干燥,得到干物质(粗糖);

[0016] (7) 取步骤(6)得到的干物质,溶于 10g/100mL 乙酸钠水溶液(干物质与乙酸钠水溶液的配比为 10-20mg :ml),加入 2 倍于乙酸钠水溶液体积的酚溶液(100g 结晶酚溶于 40ml 110g/100mL 乙酸钠水溶液),  $4^\circ\text{C}$ 、120rpm 振荡 20-30min,然后  $4^\circ\text{C}$ 、10000rpm、离心 20min,取最上层液相;

[0017] (8) 取步骤(7)得到的液相,加入 2 倍体积的酚溶液(100g 结晶酚溶于

40ml10g/100mL 乙酸钠水溶液),4℃、120rpm 振荡 20-30min, 然后 4℃、10000rpm、离心 20min,取最上层液相;

[0018] (9) 取步骤(8)得到的液相,在 0.1M 氯化钙水溶液中透析;

[0019] (10) 取步骤(9)得到的溶液,加入乙醇并使其浓度为 75% (体积比),4℃静置 3h, 然后 4℃、10000rpm 离心 20min,收集沉淀,依次用乙醇和丙酮洗涤,干燥,得到干物质(荚膜多糖)。

[0020] 所述 SP01 佐剂具体如下:溶剂为水,含 2g/100mL 角鲨烯、0.1g/100mL 聚氧乙烯蓖麻油和 0.1g/100mL 聚醚多元醇。

[0021] 所述铝佐剂具体可为氢氧化铝。

[0022] 所述疫苗具体可为实施例 3 中制备的疫苗 - I、疫苗 - II、疫苗 - III、疫苗 - IV、疫苗 - V、疫苗 - VI、疫苗 VII、疫苗 VIII、疫苗 IX、疫苗 X、疫苗 XI 或疫苗 XII。

[0023] 以上任一所述奶牛具体可为中国荷斯坦奶牛。

[0024] 本发明还保护菌株 SAWR-6 和 / 或菌株 SDTR-9 和 / 或菌株 SURF-5。当以上三种菌株之间为“和”的关系时,三个菌株的数量比具体可为 1:1:1。

[0025] 本发明提供的无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)SAWR-6, 简称菌株 SAWR-6,已于 2013 年 12 月 09 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址为:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号),保藏号为 CGMCC No. 8533。

[0026] 本发明提供的停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*)SDTR-9, 简称菌株 SDTR-9,已于 2013 年 12 月 09 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址为:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号),保藏号为 CGMCC No. 8534。

[0027] 本发明提供的乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*)SURF-5, 简称菌株 SURF-5,已于 2013 年 12 月 09 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址为:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号),保藏号为 CGMCC No. 8535。

[0028] 对于奶牛乳房炎来说,最理想的防控手段为通过接种疫苗,其目的就是增强机体免疫应答反应,特别是乳腺组织的免疫应答反应来阻止、中和、杀灭外界进入的病原微生物,但由于乳房本身的生理特点给有效免疫力的产生带来了了一系列特殊的挑战。第一,乳腺中的牛奶会稀释抗感染的嗜中性粒细胞的浓度,而且牛奶中的一些成分,像脂肪和酪蛋白能降低抗感染嗜中性粒细胞的杀菌能力。第二,奶牛饲养有大量可引起乳房炎的微生物的环境中,而且奶汁本身给病原菌生长提供了温床。因此,使奶牛乳腺产生有效的免疫力,降低乳房炎的发生率,需要攻克的难题较多,给奶牛乳房炎疫苗研发提出比其它传染病疫苗更高的要求。

[0029] 疫苗是通过增强机体免疫系统的功能从而使机体获得天然的抗病能力,并且疫苗具有安全、稳定、有效等特点,因此研制安全、有效的奶牛乳房炎疫苗成为防控乳房炎的必由选择。研发适宜本国流行代表菌株和环境的疫苗势在必行。

[0030] 本发明提供的疫苗具有高效、通用、安全、稳定、剂型多样等优点,本发明为安全、高效、全面有效预防链球菌感染性奶牛乳房炎提供了有力保证,将是奶牛链球菌乳房炎疫苗发展的新里程碑。

## 具体实施方式

[0031] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。实施例中的 PBS 缓冲液,如无特殊说明均为 pH7.2、0.01M 的无热源 PBS 缓冲液。

[0032] 奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株、奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株、奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株均记载于如下文献:奶牛链球菌乳房炎灭活疫苗及其制备方法(专利申请号为 201010547036.3,申请公开号为 CN102294026A)。

[0033] 角鲨烯:购于 SIGMA 公司,目录号为 442785。聚氧乙烯蓖麻油(密度 1.05g/ml at 25°C,粘度 850cP):购于 SIGMA 公司,目录号为 C5135。聚醚多元醇(密度 1.05g/ml at 25°C,粘度 850cP):购于 SIGMA 公司,目录号为 435449。SP01 佐剂:溶剂为水,含 2g/100mL 角鲨烯、0.1g/100mL 聚氧乙烯蓖麻油和 0.1g/100mL 聚醚多元醇。白花油佐剂:购自法国 Esso 公司,批号 122735。Ba1b/C 小鼠:购自军事医学科学院实验动物中心。奶牛(中国荷斯坦奶牛):购于内蒙古赤峰丰裕奶牛养殖场。

[0034] 实施例 1、菌株的获得和保藏

[0035] 一、菌株的筛选

[0036] 从内蒙古、重庆、广州、黑龙江、兰州、河北、山东等 30 个省市地的 90 个中大型奶牛场采集 3 万份奶牛乳样。奶牛乳样的采集方法:选取出现乳房炎临床症状(或者怀疑为亚临床型乳房炎)的奶牛,先用温水擦洗乳房,再用 0.2% 新洁尔灭擦洗乳房,最后用 70% 酒精擦拭乳头,采样者同时用 70% 酒精擦拭手指消毒,每个乳室先挤去头 2-3 把奶,以排除污染的杂菌,每头奶牛取乳样至少 5mL 于无菌乳样杯中。

[0037] 从乳样中分离纯化链球菌菌株。链球菌的菌落形态特征(37°C,培养 24-72h):(1)普通琼脂平板,未见到菌落;(2)鲜血琼脂平板上长有灰白色、半透明表面光滑圆形隆起的小菌落,出现溶血现象,如果是  $\beta$  溶血则疑为无乳链球菌,如果为  $\alpha$  溶血疑为停乳链球菌或乳房链球菌,如为  $\gamma$  溶血疑为乳房链球菌;(3)血清肉汤中生长初呈均匀浑浊,管底出现絮状沉淀,上清变得透明;(4)挑取典型菌落涂片、染色、镜检,如呈球状、短链状或者长链状排列,无芽胞,革兰氏染色阳性则疑为链球菌。链球菌的生理生化特征:(1)触酶试验阴性;(2)若细菌 CAMP 试验阳性,水解七叶苷和马尿酸钠,能够利用葡萄糖、乳糖、棉子糖、水杨甘,不能利用山梨醇、海藻糖和甘露醇,七叶苷、胆汁七叶苷实验为阴性,高盐肉汤实验为阴性,即鉴定为无乳链球菌;(3)若细菌 CAMP 试验阴性,不水解七叶苷和马尿酸钠,能够利用葡萄糖、乳糖、棉子糖、海藻糖,不能利用山梨醇、水杨甘和甘露醇,七叶苷、胆汁七叶苷实验为阴性,高盐肉汤实验为阴性,即鉴定为停乳链球菌;(4)若细菌 CAMP 试验阴性,水解七叶苷和马尿酸钠,能够利用葡萄糖、乳糖、棉子糖,不能利用山梨醇和甘露醇,七叶苷、胆汁七叶苷实验为阴性,高盐肉汤实验为阴性,即鉴定为乳房链球菌。链球菌的 16Sr RNA 的编码基因的保守片段如序列列表的序列 1 所示。将分离得到的链球菌分别进行全基因组测序,全基因组测序结果相同的菌株为同一菌株。三株链球菌分别存在于 23584、25486 和 22135 份乳样中,表明该链球菌为我国的流行优势株,将分别命名为菌株 1、菌株 2 和菌株 3。

[0038] 二、菌株的扩大培养

[0039] 1、将菌株 1、菌株 2 或菌株 3 (原代菌株)分别划线接种至 BHI 培养基平板,37°C 静置培养 20-24 小时,然后用 5g/100ml 的脱脂奶粉水溶液冲洗并收集平板上的菌落,分装于

冻存管(定义为P1代), -70℃以下保存。

[0040] 2、取步骤1得到的冻存管, 室温解冻, 然后接种至液体BHI培养基, 37℃、150rpm振荡培养20-24小时, 每100毫升加入5g脱脂奶粉, 分装于冻存管(定义为P2代), -70℃以下保存。

[0041] 3、取步骤2得到的冻存管, 室温解冻, 然后接种至液体BHI培养基, 37℃、150rpm振荡培养20-24小时, 加入等体积甘油, 分装于冻存管(定义为P3代), -70℃以下保存。

[0042] 三、菌株的血清型鉴定和致病性鉴定

[0043] 将P3代菌株1、P3代菌株2和P3代菌株3分别进行玻片凝集试验(无乳链球菌ATCC51487、停乳链球菌ATCC43078、乳房链球菌ATCC19436; 制备血清的方法为: 将链球菌灭活后免疫BALB/c小鼠, 然后收获血清)。结果表明菌株1为无乳链球菌(因此命名为菌株SAWR-6), 菌株2为停乳链球菌(因此命名为菌株SDTR-9), 菌株3为乳房链球菌(因此命名为菌株SURF-5)。

[0044] 将P3代菌株SAWR-6分别注射给6-8周龄BALB/c小鼠(每只通过腹腔注射 $2 \times 10^8$ CFU)、1.5-2岁家兔(每只通过腹腔注射 $8 \times 10^8$ CFU)和2-3岁奶牛(每只通过乳导管注射1000CFU)。观察表征发现菌株SAWR-6可使BALB/c小鼠和家兔发病, 有些动物甚至在1周内死亡; 菌株SAWR-6可引起奶牛发生乳房炎。分别取发病小鼠的肝脏、发病家兔的肝脏、发病奶牛的乳房, 进行病原菌重分离, 将重分离得到的菌株进行全基因组测序, 均与菌株SAWR-6的测序结果一致。

[0045] 将P3代菌株SDTR-9分别注射给6-8周龄BALB/c小鼠(每只通过腹腔注射 $2 \times 10^8$ CFU)、1.5-2岁家兔(每只通过腹腔注射 $8 \times 10^8$ CFU)和2-3岁奶牛(每只通过乳导管注射1000CFU)。观察表征发现菌株SDTR-9可使BALB/c小鼠和家兔发病, 有些动物甚至在1周内死亡; 菌株SDTR-9可引起奶牛发生乳房炎。分别取发病小鼠的肝脏、发病家兔的肝脏、发病奶牛的乳房, 进行病原菌重分离, 将重分离得到的菌株进行全基因组测序, 均与菌株SDTR-9的测序结果一致。

[0046] 将P3代菌株SURF-5分别注射给6-8周龄BALB/c小鼠(每只通过腹腔注射 $2 \times 10^8$ CFU)、1.5-2岁家兔(每只通过腹腔注射 $8 \times 10^8$ CFU)和2-3岁奶牛(每只通过乳导管注射1000CFU)。观察表征发现菌株SURF-5可使BALB/c小鼠和家兔发病, 有些动物甚至在1周内死亡; 菌株SURF-5可引起奶牛发生乳房炎。分别取发病小鼠的肝脏、发病家兔的肝脏、发病奶牛的乳房, 进行病原菌重分离, 将重分离得到的菌株进行全基因组测序, 均与菌株SURF-5的测序结果一致。

[0047] 四、菌株的保藏

[0048] 菌株SAWR-6全称为无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)SAWR-6。P3代菌株SAWR-6已于2013年12月09日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC, 地址为: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号), 保藏号为CGMCC No. 8533。

[0049] 菌株SDTR-9全称为停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)SDTR-9。P3代菌株SDTR-9已于2013年12月09日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC, 地址为: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号), 保藏号为CGMCC No. 8534。

[0050] 菌株SURF-5全称为乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)SURF-5。P3代菌株SURF-5已于2013年12月09日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心

(简称 CGMCC,地址为 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号),保藏号为 CGMCC No. 8535。

[0051] 实施例 2、菌株的特性

[0052] 将实施例 1 的步骤二的 3 得到的冻存管室温解冻,将 P3 代菌株进行如下步骤:

[0053] 一、菌株的免疫原性

[0054] 将 P3 代菌株 SAWR-6 免疫家兔(单次免疫,每只通过皮下注射  $5 \times 10^7$ CFU/ml,每只注射 1 毫升),21 天后心脏取血,分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(用 PBST 缓冲液梯度稀释,得到血清稀释液;将 P3 代菌株 SAWR-6 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌/ml;采用羊抗兔 IgG 酶标二抗;设置阴性对照,即用 PBST 缓冲液代替血清稀释液;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性),为 1:4800。

[0055] 将 P3 代菌株 SDTR-9 免疫家兔(单次免疫,每只通过皮下注射  $5 \times 10^7$ CFU/ml,每只注射 1 毫升),21 天后心脏取血,分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(用 PBST 缓冲液梯度稀释,得到血清稀释液;将 P3 代菌株 SDTR-9 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌/ml;采用羊抗兔 IgG 酶标二抗;设置阴性对照,即用 PBST 缓冲液代替血清稀释液;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性),为 1:4800。

[0056] 将 P3 代菌株 SURF-5 免疫家兔(单次免疫,每只通过皮下注射  $5 \times 10^7$ CFU/ml,每只注射 1 毫升),21 天后心脏取血,分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(用 PBST 缓冲液梯度稀释,得到血清稀释液;将 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌/ml;采用羊抗兔 IgG 酶标二抗;设置阴性对照,即用 PBST 缓冲液代替血清稀释液;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性),为 1:6000。

[0057] 二、其它对比菌株的免疫原性

[0058] 将奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株代替 P3 代菌株 SAWR-6,按照步骤一的方法进行检测(检测哪个菌株的免疫原性即采用哪个菌株作为包被原,其它同步骤一),血清的效价为 1:1200。

[0059] 将奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株代替 P3 代菌株 SDTR-9,按照步骤一的方法进行检测(检测哪个菌株的免疫原性即采用哪个菌株作为包被原,其它同步骤一),血清的效价为 1:1200。

[0060] 将奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株代替 P3 代菌株 SURF-5,按照步骤一的方法进行检测(检测哪个菌株的免疫原性即采用哪个菌株作为包被原,其它同步骤一),血清的效价为 1:1200。

[0061] 将无乳链球菌无乳链球菌 ATCC51487 代替 P3 代菌株 SAWR-6,按照步骤一的方法进行检测(检测哪个菌株的免疫原性即采用哪个菌株作为包被原,其它同步骤一),血清的效价为 1:1200。

[0062] 将停乳链球菌 ATCC43078 代替 P3 代菌株 SDTR-9,按照步骤一的方法进行检测(检测哪个菌株的免疫原性即采用哪个菌株作为包被原,其它同步骤一),血清的效价为 1:1200。

[0063] 将乳房链球菌 ATCC19436 代替 P3 代菌株 SURF-5,按照步骤一的方法进行检测(检测哪个菌株的免疫原性即采用哪个菌株作为包被原,其它同步骤一),血清的效价为 1:1200。

[0064] 三、菌株免疫后得到的血清对链球菌的普适性



[0065] 将 P3 代菌株 SAWR-6 免疫家兔(方式同步骤一), 21 天后心脏取血, 分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(采用待测菌代替 P3 代菌株 SAWR-6 作为包被原, 其他同步步骤一)。待测菌为无乳链球菌 ATCC51487 或奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株。血清对待测菌的效价均为 1 :4800。

[0066] 将 P3 代菌株 SDTR-9 免疫家兔(方式同步骤一), 21 天后心脏取血, 分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(采用待测菌代替 P3 代菌株 SDTR-9 作为包被原, 其他同步步骤一)。待测菌为停乳链球菌 ATCC43078 或奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株。血清对待测菌的效价为 1 :4800。

[0067] 将 P3 代菌株 SURF-5 免疫家兔(方式同步骤一), 21 天后心脏取血, 分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(采用待测菌代替 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原, 其他同步步骤一)。待测菌为乳房链球菌 ATCC19436 或奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株。血清对待测菌的效价为 1 :4800。

[0068] 四、重组菌的稳定性

[0069] 取 P3 代菌株 SAWR-6, 接种至液体 BHI 培养基, 37℃、150rpm 振荡培养 20-24 小时, 得到 P4 代菌株。采用上述方法进行连续传代, 传至 P30 代。分别将 P3 代、P5 代、P10 代、P15 代、P20 代、P25 代和 P30 代菌株进行全基因组测序, 测序结果均一致, 表明本发明提供的菌株 SAWR-6 非常稳定。

[0070] 取 P3 代菌株 SDTR-9, 接种至液体 BHI 培养基, 37℃、150rpm 振荡培养 20-24 小时, 得到 P4 代菌株。采用上述方法进行连续传代, 传至 P30 代。分别将 P3 代、P5 代、P10 代、P15 代、P20 代、P25 代和 P30 代菌株进行全基因组测序, 测序结果均一致, 表明本发明提供的菌株 SDTR-9 非常稳定。

[0071] 取 P3 代菌株 SURF-5, 接种至液体 BHI 培养基, 37℃、150rpm 振荡培养 20-24 小时, 得到 P4 代菌株。采用上述方法进行连续传代, 传至 P30 代。分别将 P3 代、P5 代、P10 代、P15 代、P20 代、P25 代和 P30 代菌株进行全基因组测序, 测序结果均一致, 表明本发明提供的菌株 SURF-5 非常稳定。

[0072] 实施例 3、疫苗的制备

[0073] 一、制备荚膜多糖

[0074] 将实施例 1 的步骤二的 3 得到的冻存管室温解冻, 将 P3 代菌株进行如下步骤:

[0075] 1、取 3-5 个菌株 SAWR-6 的典型菌落, 接种于 BHI 培养基, 37℃、150rpm 振荡培养 18h。

[0076] 2、取 2 体积份步骤 1 得到的菌液, 接种至 100 体积份 BHI 培养基, 在发酵罐中 37℃ 发酵(发酵初始时刻, 菌株 SACP5-9 的菌浓度为  $2 \times 10^8$  个 /ml, 发酵罐温度为 37℃, 发酵罐的初始转速为 198r/min, 罐压保持在 0.05MPa, 用 8%NaOH 水溶液或 5% 盐酸水溶液调节发酵体系的 pH 为 7.0-7.2, 通过增加发酵罐转速和 / 或增加通气量维持发酵体系的溶氧量为 25-35%, 发酵体系的溶氧量高于 35% 时停止发酵)。

[0077] 3、取步骤 2 得到的发酵体系, 加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比), 25℃、150rpm 振荡孵育 24h, 然后 4℃、3000rpm 离心 15min, 收集上清液。

[0078] 4、取步骤 3 得到的上清液, 加入十六烷基三甲基溴化铵并使其浓度为 1g/100ml, 室温、120rpm 振荡孵育 1 小时, 然后 4℃ 静置 16 小时, 然后 10000rpm 离心 30min, 收集沉淀

(复合多糖)。

[0079] 5、取步骤4得到的沉淀,溶于2M氯化钙水溶液(沉淀与氯化钙水溶液的配比为0.2-0.5g:ml),充分研磨,然后加入与2M氯化钙水溶液等体积的水,室温、120rpm振荡孵育1h,然后加入乙醇并使其浓度为25%(体积比),4℃静置3h,然后4℃、5000rpm离心30min,收集上清液。

[0080] 6、取步骤5得到的上清液,加入乙醇并使其浓度为80%(体积比),充分振荡后4℃静置3h,然后4℃、10000rpm离心15min,收集沉淀,用乙醇洗涤两次再用丙酮洗涤两次,充分干燥,得到干物质(粗糖)。

[0081] 7、取步骤6得到的干物质,溶于10g/100mL乙酸钠水溶液(干物质与乙酸钠水溶液的配比为10-20mg:ml),加入2倍于乙酸钠水溶液体积的酚溶液(100g结晶酚溶于40ml10g/100mL乙酸钠水溶液),4℃、120rpm振荡20-30min,然后4℃、10000rpm、离心20min,自上之下分为三层(自上至下依次为上清层、蛋白层和苯酚层;其中上清层含有目的多糖),取上清层。

[0082] 8、取步骤7得到的上清层,加入2倍体积的酚溶液(100g结晶酚溶于40ml10g/100mL乙酸钠水溶液),4℃、120rpm振荡20-30min,然后4℃、10000rpm、离心20min,自上之下分为三层(自上至下依次为含上清层、蛋白层和苯酚层;其中上清层含有目的多糖),取上清层。

[0083] 9、取步骤8得到的上清层,装入透析袋,在0.1M氯化钙水溶液中4℃透析12小时。

[0084] 10、完成步骤9后,取出透析袋中的溶液,加入乙醇并使其浓度为75%(体积比),充分振荡后,4℃静置3h,然后4℃、10000rpm离心20min,收集沉淀,用乙醇洗涤两次再用丙酮洗涤两次,充分干燥,得到干物质(菌株SAWR-6荚膜多糖)。

[0085] 将菌株SDTR-9代替菌株SAWR-6进行上述步骤,得到菌株SDTR-9荚膜多糖。

[0086] 将菌株SURF-5代替菌株SAWR-6进行上述步骤,得到菌株SURF-5荚膜多糖。

[0087] 用无热原的0.1M氯化钙水溶液溶解菌株SAWR-6荚膜多糖、SDTR-9荚膜多糖或菌株SURF-5荚膜多糖,过滤除菌后进行无菌试验、血清学试验及各生化测定。按照药典(中华人民共和国药典,二〇一〇版)的方法分别鉴定荚膜多糖的质量(包括固体总量、蛋白质含量、核酸含量、O-乙酰基含量、磷含量、多糖分子量大小、无菌等)。结果表明,各个荚膜多糖均符合各项指标的要求,纯度均达到95%以上,且呈单一各血清型荚膜多糖抗原成分、无外源因子。

[0088] 二、疫苗的制备

[0089] 将实施例1的步骤二的3得到的冻存管室温解冻,将P3代菌株进行如下步骤:

[0090] 1、取P3代菌株SAWR-6,用PBS缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入37-40%甲醛溶液并使甲醛浓度为0.4%(体积比),37℃、150rpm振荡孵育36h(实际应用中36h-48h均可),然后4℃、6500rpm离心15min收集菌体,用灭菌后的PBS缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的PBS缓冲液悬浮菌体。

[0091] 2、取P3代菌株SDTR-9,用PBS缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入37-40%甲醛溶液并使甲醛浓度为0.4%(体积比),37℃、150rpm振荡孵育36h(实际应用中36h-48h均可),然后4℃、6500rpm离心15min收集菌体,用灭菌后的PBS缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的PBS缓冲液悬浮菌体。

[0092] 3、取P3代菌株 SURF-5,用PBS缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入37-40%甲醛溶液并使甲醛浓度为0.4% (体积比),37℃、150rpm振荡孵育36h (实际应用中36h-48h均可),然后4℃、6500rpm离心15min收集菌体,用灭菌后的PBS缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的PBS缓冲液悬浮菌体。

[0093] 4、将步骤1得到的菌悬液、步骤2得到的菌悬液、步骤3得到的菌悬液和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到疫苗-I (疫苗-I中,菌株SAWR-6、菌株SDTR-9和菌株SURF-5的浓度均为 $1 \times 10^{10}$ 个细菌/mL)。

[0094] 5、将步骤一得到的菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到疫苗-II (疫苗-II中,菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖的浓度均为40  $\mu$ g/ml)。

[0095] 6、用步骤1得到的菌悬液、步骤2得到的菌悬液、步骤3得到的菌悬液、步骤一得到的菌株SAWR-6荚膜多糖、步骤一得到的菌株SDTR-9荚膜多糖、步骤一得到的菌株SURF-5荚膜多糖和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到疫苗-III (疫苗-III中,菌株SAWR-6、菌株SDTR-9和菌株SURF-5的浓度均为 $1 \times 10^{10}$ 个细菌/mL,菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖的浓度均为40  $\mu$ g/ml)。

[0096] 7、取疫苗-I,加入氢氧化铝并使其浓度为0.5mg/ml,得到疫苗-IV。

[0097] 8、取疫苗-II,加入氢氧化铝并使其浓度为0.5mg/ml,得到疫苗-V。

[0098] 9、取疫苗-III,加入氢氧化铝并使其浓度为0.5mg/ml,得到疫苗-VI。

[0099] 10、将步骤1得到的菌悬液、步骤2得到的菌悬液、步骤3得到的菌悬液和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的SP01佐剂,得到疫苗VII (疫苗VII中,菌株SAWR-6、菌株SDTR-9和菌株SURF-5的浓度均为 $1 \times 10^{10}$ 个细菌/mL)。

[0100] 11、将步骤一得到的菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的SP01佐剂,得到疫苗VIII (疫苗VIII中,菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖的浓度均为40  $\mu$ g/ml)。

[0101] 12、将步骤1得到的菌悬液、步骤2得到的菌悬液、步骤3得到的菌悬液、步骤一得到的菌株SAWR-6荚膜多糖、步骤一得到的菌株SDTR-9荚膜多糖、步骤一得到的菌株SURF-5荚膜多糖和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的SP01佐剂,得到疫苗-IX (疫苗-IX中,菌株SAWR-6、菌株SDTR-9和菌株SURF-5的浓度均为 $1 \times 10^{10}$ 个细菌/mL,菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖的浓度均为40  $\mu$ g/ml)。

[0102] 13、将步骤1得到的菌悬液、步骤2得到的菌悬液、步骤3得到的菌悬液和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的白花油佐剂,得到疫苗X (疫苗X中,菌株SAWR-6、菌株SDTR-9和菌株SURF-5的浓度均为 $1 \times 10^{10}$ 个细菌/mL)。

[0103] 14、将步骤一得到的菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖和灭菌后的PBS缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的白花油佐剂,得到疫苗XI (疫苗XI中,菌株SAWR-6荚膜多糖、菌株SDTR-9荚膜多糖和菌株SURF-5荚膜多糖的浓度均为40  $\mu$ g/ml)。

[0104] 15、将步骤1得到的菌悬液、步骤2得到的菌悬液、步骤3得到的菌悬液、步骤一得

到的菌株 SAWR-6 荚膜多糖、步骤一得到的菌株 SDTR-9 荚膜多糖、步骤一得到的菌株 SURF-5 荚膜多糖和灭菌后的 PBS 缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的白花油佐剂,得到疫苗 - XII (疫苗 - XII 中,菌株 SAWR-6、菌株 SDTR-9 和菌株 SURF-5 的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌 /mL,菌株 SAWR-6 荚膜多糖、菌株 SDTR-9 荚膜多糖和菌株 SURF-5 荚膜多糖的浓度均为  $40 \mu\text{g/ml}$ )。

[0105] 将各个疫苗置于  $2-8^{\circ}\text{C}$  保存备用。

[0106] 实施例 4、疫苗的效果

[0107] 一、小鼠实验

[0108] 6-8 周 Balb/C 小鼠,分成 7 组,每组 10 只,分组免疫如下(皮下注射):

[0109] 第一组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - I,每次免疫 0.25 毫升;

[0110] 第二组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - II,每次免疫 0.25 毫升;

[0111] 第三组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - III,每次免疫 0.25 毫升;

[0112] 第四组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - IV,每次免疫 0.25 毫升;

[0113] 第五组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - V,每次免疫 0.25 毫升;

[0114] 第六组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - VI,每次免疫 0.25 毫升;

[0115] 第七组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - VII,每次免疫 0.25 毫升;

[0116] 第八组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - VIII,每次免疫 0.25 毫升;

[0117] 第九组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - IX,每次免疫 0.25 毫升;

[0118] 第十组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - X,每次免疫 0.25 毫升;

[0119] 第十一组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - XI,每次免疫 0.25 毫升;

[0120] 第十二组:实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次疫苗 - XII,每次免疫 0.25 毫升;

[0121] 第十三组(阴性对照):实验第 1 天和实验第 15 天各免疫一次 PBS 缓冲液,每次免疫 0.25 毫升。

[0122] 实验第 29 天,尾静脉取血并分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(用 PBST 缓冲液梯度稀释,得到血清稀释液;分别将 P3 代菌株 SAWR-6、P3 代菌株 SDTR-9 和 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌 /ml;采用兔抗鼠 IgG 酶标二抗;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性)。采用以上三种包被原第一组实验动物得到的血清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第二组实验动物得到的血清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第三组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第四组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第五组实验动物得到的血清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第六组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第七组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第八组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第九组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第十组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第十一组实验动物得到的血清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第十二组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400。结果表明:菌体 + 荚膜多糖的效果优于菌体的效果优于荚膜多糖的效果,添加佐剂的效果优于不添加佐剂,添加 SP01 佐剂的效果优于添加铝盐佐剂(氢氧化铝)或白花油佐剂。

## [0123] 二、奶牛实验

[0124] 2-5 岁即将进入泌乳期(即产前 25d, 怀孕 8 个月 20d) 的健康奶牛, 分成 37 组, 每组 100 头, 分组免疫如下:

[0125] 第一组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - I, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0126] 第二组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - II, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0127] 第三组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - III, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0128] 第四组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - IV, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0129] 第五组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - V, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0130] 第六组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - VI, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0131] 第七组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - VII, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0132] 第八组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - VIII, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0133] 第九组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - IX, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0134] 第十组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - X, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0135] 第十一组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - XI, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0136] 第十二组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - XII, 每次免疫 5 毫升(乳头管单点注射);

[0137] 第十三组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - I, 每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0138] 第十四组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - II, 每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0139] 第十五组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - III, 每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0140] 第十六组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - IV, 每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0141] 第十七组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - V, 每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0142] 第十八组: 实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天) 各免疫一次疫苗 - VI, 每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

- [0143] 第十九组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - VII,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);
- [0144] 第二十组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - VIII,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);
- [0145] 第二十一组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - IX,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);
- [0146] 第二十二组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - X,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);
- [0147] 第二十三组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - XI,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);
- [0148] 第二十四组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - XII,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);
- [0149] 第二十五组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - I,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0150] 第二十六组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - II,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0151] 第二十七组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - III,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0152] 第二十八组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - IV,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0153] 第二十九组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - V,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0154] 第三十组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - VI,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0155] 第三十一组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - VII,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0156] 第三十二组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - VIII,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0157] 第三十三组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - IX,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0158] 第三十四组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - X,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0159] 第三十五组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - XI,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0160] 第三十六组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次疫苗 - XII,每次免疫 5 毫升(颈部肌肉单点注射);
- [0161] 第三十七组(阴性对照):实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次 PBS 缓冲液,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射)。
- [0162] 实验第 71 天,颈部静脉取血并分离血清。通过 ELISA 检测血清的 IgG 抗体效价(用

PBST 缓冲液梯度稀释,得到血清稀释液;分别将 P3 代菌株 SAWR-6、P3 代菌株 SDTR-9 和 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌/ml;采用羊抗牛 IgG 酶标二抗;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性)。实验第 71 天,取乳清。通过 ELISA 检测乳清的 sIgA 抗体效价(用 PBST 缓冲液梯度稀释,得到乳清稀释液;分别将 P3 代菌株 SAWR-6、P3 代菌株 SDTR-9 和 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌/ml;采用羊抗牛 sIgA 酶标二抗;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性)。

[0163] 采用以上三种包被原第一组实验动物得到的血清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第二组实验动物得到的血清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第三组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第四组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第五组实验动物得到的血清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第六组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第七组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第八组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第九组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第十组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第十一组实验动物得到的血清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第十二组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400。

[0164] 采用以上三种包被原第十三组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第十四组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第十五组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第十六组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第十七组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第十八组实验动物得到的血清的效价均为 1:409600,采用以上三种包被原第十九组实验动物得到的血清的效价均为 1:409600,采用以上三种包被原第二十组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第二十一组实验动物得到的血清的效价均为 1:819200,采用以上三种包被原第二十二组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第二十三组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第二十四组实验动物得到的血清的效价均为 1:409600。

[0165] 采用以上三种包被原第二十五组实验动物得到的血清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第二十六组实验动物得到的血清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第二十七组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第二十八组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第二十九组实验动物得到的血清的效价均为 1:51600,采用以上三种包被原第三十组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第三十一组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800,采用以上三种包被原第三十二组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第三十三组实验动物得到的血清的效价均为 1:409600,采用以上三种包被原第三十四组实验动物得到的血清的效价均为 1:102400,采用以上三种包被原第三十五组实验动物得到的血清的效价均为 1:51600,采用以上三种包被原第三十六组实验动物得到的血清的效价均为 1:204800。

[0166] 采用以上三种包被原第一组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第二组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第三组实验动物得到的乳清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第四组实验动物得到的乳清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第五组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第六组动物得到的乳清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第七组实验动物得到的乳清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第八组实验动物得到的乳清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第九组动物得到的乳清的效价均为 1:51200,采用以上三种包被原第十组实验动物得到的乳清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第十一组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第十二组动物得到的乳清的效价均为 1:25600。

[0167] 采用以上三种包被原第十三组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第十四组实验动物得到的乳清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第十五组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第十六组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第十七组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第十八组动物得到的乳清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第十九组实验动物得到的乳清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第二十组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第二十一组动物得到的乳清的效价均为 1:25600,采用以上三种包被原第二十二组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第二十三组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第二十四组动物得到的乳清的效价均为 1:12800。

[0168] 采用以上三种包被原第二十五组实验动物得到的乳清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第二十六组实验动物得到的乳清的效价均为 1:800,采用以上三种包被原第二十七组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第二十八组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第二十九组实验动物得到的乳清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第三十组动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第三十一组实验动物得到的乳清的效价均为 1:6400,采用以上三种包被原第三十二组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第三十三组动物得到的乳清的效价均为 1:12800,采用以上三种包被原第三十四组实验动物得到的乳清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第三十五组实验动物得到的乳清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第三十六组动物得到的乳清的效价均为 1:6400。

[0169] 实验第 71 天,取血后,用无乳链球菌 ATCC51487、停乳链球菌 ATCC43078 和乳房链球菌 ATCC19436 进行攻毒(使用乳针将 600CFU 无乳链球菌 ATCC51487、600CFU 停乳链球菌 ATCC43078 和 600CFU 乳房链球菌 ATCC19436 注入乳房内),实验第 72 天 - 实验第 85 天为结果评判期。

[0170] 结果评判期中,只要满足如下(a)、(b)、(c)和(d)四项中的两项或两项以上,则判断为乳房炎发病个体:(a)相对阴性对照组的平均体温,体温高 1.5-2.5℃;(b)乳清内有凝块和 / 或血液和 / 或脓液;(c)奶牛乳房出现红和 / 或肿和 / 或发热的症状;(d)相对阴性对照组的平均泌乳量,泌乳量降低。保护率=(该组奶牛总个体数量 - 该组奶牛乳房炎发病个体数量 / 该组奶牛总个体数量) × 100%。



[0171] 第一组实验动物的保护率为 92%，第二组实验动物的保护率为 91%，第三组实验动物的保护率为 93%，第四组实验动物的保护率为 93%，第五组实验动物的保护率为 92%，第六组实验动物的保护率为 94%，第七组实验动物的保护率为 94%，第八组实验动物的保护率为 93%，第九组实验动物的保护率为 95%，第十组实验动物的保护率为 93%，第十一组实验动物的保护率为 92%，第十二组实验动物的保护率为 94%。

[0172] 第十三组实验动物的保护率为 94%，第十四组实验动物的保护率为 93%，第十五组实验动物的保护率为 95%，第十六组实验动物的保护率为 95%，第十七组实验动物的保护率为 94%，第十八组实验动物的保护率为 96%，第十九组实验动物的保护率为 96%，第二十组实验动物的保护率为 95%，第二十一组实验动物的保护率为 97%，第二十二组实验动物的保护率为 95%，第二十三组实验动物的保护率为 94%，第二十四组实验动物的保护率为 96%。

[0173] 第二十五组实验动物的保护率为 93%，第二十六组实验动物的保护率为 92%，第二十七组实验动物的保护率为 94%，第二十八组实验动物的保护率为 94%，第二十九组实验动物的保护率为 93%，第三十组实验动物的保护率为 95%，第三十一组实验动物的保护率为 95%，第三十二组实验动物的保护率为 94%，第三十三组实验动物的保护率为 96%，第三十四组实验动物的保护率为 94%，第三十五组实验动物的保护率为 93%，第三十六组实验动物的保护率为 95%。

[0174] 第三十七组实验动物的保护率为 0%。

[0175] 结果表明：添加佐剂的效果优于不添加佐剂，添加 SP01 佐剂的效果优于添加铝盐佐剂（氢氧化铝）或白花油佐剂。

[0176] 三、长效免疫保护效果（自然发病）

[0177] 2-5 岁即将进入泌乳期（即产前 25d，怀孕 8 个月 20d）的健康奶牛，分成 37 组，每组 100 只，分组免疫如下：实验第 1 天、实验第 29 天、实验第 57 天（即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天）和实验第 368 天各免疫一次疫苗，免疫分组方式、单次免疫剂量和免疫方式均同步骤二。实验第 700 天 - 实验第 714 天为结果评判 1 期，实验第 1070 天 - 实验第 1083 天为结果评判 2 期。结果评判方法同步骤二。

[0178] 结果评判 1 期：第一组实验动物的保护率为 89%，第二组实验动物的保护率为 88%，第三组实验动物的保护率为 90%，第四组实验动物的保护率为 90%，第五组实验动物的保护率为 89%，第六组实验动物的保护率为 91%，第七组实验动物的保护率为 91%，第八组实验动物的保护率为 90%，第九组实验动物的保护率为 92%，第十组实验动物的保护率为 90%，第十一组实验动物的保护率为 89%，第十二组实验动物的保护率为 91%；第十三组实验动物的保护率为 91%，第十四组实验动物的保护率为 90%，第十五组实验动物的保护率为 92%，第十六组实验动物的保护率为 92%，第十七组实验动物的保护率为 91%，第十八组实验动物的保护率为 93%，第十九组实验动物的保护率为 93%，第二十组实验动物的保护率为 92%，第二十一组实验动物的保护率为 94%，第二十二组实验动物的保护率为 92%，第二十三组实验动物的保护率为 91%，第二十四组实验动物的保护率为 93%；第二十五组实验动物的保护率为 90%，第二十六组实验动物的保护率为 89%，第二十七组实验动物的保护率为 91%，第二十八组实验动物的保护率为 91%，第二十九组实验动物的保护率为 90%，第三十组实验动物的保护率为 92%，第三十一组实验动物的保护率为 92%，第三十二组实验动物的保护率为 91%，第三十三组实验动物的保护率为 93%，第三十四组实验动物的保护率为 91%，第三十五

组实验动物的保护率为 90%，第三十六组实验动物的保护率为 92%；第三十七组实验动物的保护率为 38%。

[0179] 结果评判 2 期：第一组实验动物的保护率为 88%，第二组实验动物的保护率为 87%，第三组实验动物的保护率为 89%，第四组实验动物的保护率为 89%，第五组实验动物的保护率为 88%，第六组实验动物的保护率为 90%，第七组实验动物的保护率为 90%，第八组实验动物的保护率为 89%，第九组实验动物的保护率为 91%，第十组实验动物的保护率为 89%，第十一组实验动物的保护率为 88%，第十二组实验动物的保护率为 90%；第十三组实验动物的保护率为 90%，第十四组实验动物的保护率为 89%，第十五组实验动物的保护率为 91%，第十六组实验动物的保护率为 91%，第十七组实验动物的保护率为 90%，第十八组实验动物的保护率为 92%，第十九组实验动物的保护率为 92%，第二十组实验动物的保护率为 91%，第二十一组实验动物的保护率为 93%，第二十二组实验动物的保护率为 91%，第二十三组实验动物的保护率为 90%，第二十四组实验动物的保护率为 92%；第二十五组实验动物的保护率为 89%，第二十六组实验动物的保护率为 88%，第二十七组实验动物的保护率为 90%，第二十八组实验动物的保护率为 90%，第二十九组实验动物的保护率为 89%，第三十组实验动物的保护率为 91%，第三十一组实验动物的保护率为 91%，第三十二组实验动物的保护率为 90%，第三十三组实验动物的保护率为 92%，第三十四组实验动物的保护率为 90%，第三十五组实验动物的保护率为 89%，第三十六组实验动物的保护率为 91%；第三十七组实验动物的保护率为 33%。

[0180] 结果表明，本发明提供的疫苗具有长效保护的作用。

[0181] 实施例 5、疫苗的性能

[0182] 一、疫苗的安全性(无菌、支原体试验)

[0183] 1、将实施例 3 制备的各个疫苗分别接种至硫乙醇酸盐培养基(流式)，37℃ 培养 3 日。

[0184] 2、吸取步骤 1 得到的培养物，分别接种至 2 支 TG 小管(一支 37℃ 培养，一支置 25℃ 培养)、2 支 GA 斜面(一支 37℃ 培养，一支置 25℃ 培养)和 1 支 GP 小管(25℃ 培养)，连续观察 7 天，均未观察到细菌生长。

[0185] 3、将实施例 3 制备的各个疫苗分别接种至 TSA 培养基(半固态)，37℃ 培养，初代培养 21 天，次代培养 21 天，均未观察到支原体生长。

[0186] 二、溶血性试验

[0187] 1、取体重为 350g 左右的豚鼠，采集新鲜血液 1ml，分离血细胞。

[0188] 2、用 PBS 缓冲液洗涤血细胞，然后用 PBS 缓冲液制备细胞悬液(血细胞与 PBS 缓冲液的体积比为 2:98)。

[0189] 3、用 PBS 缓冲液分别制备实施例 3 制备的各个疫苗的 2 倍稀释液、4 倍稀释液和 8 倍稀释液。

[0190] 4、将 1 体积份步骤 2 得到的细胞悬液和 1 体积份步骤 3 得到的疫苗稀释液混合，室温静置 8 小时，然后进行判定(完全溶血：溶液澄明、红色、管底无细胞残留；部分溶血：溶液澄明、红色或棕色、管底有部分红细胞残留；无溶血：红细胞完全沉淀，上层液体颜色澄明)。结果显示：均未发生血球破裂，无溶血现象。

[0191] 三、急性毒性试验

[0192] 体重为 12 ~ 18g Balb/C 小鼠 : 单次腹腔注射实施例 3 制备的各个疫苗, 每只小鼠 0.5ml, 连续 2 周观察小鼠的活动状态、体重变化和存活率, 14 天后处死进行解剖检查 ; 小鼠全部存活, 没有出现竖毛、精神萎靡、行动迟缓等不良症状, 体重呈现增加, 未见脏器有病理改变。

[0193] 体重为 8 ~ 10kg 的 Beagle 狗 : 单次肌肉注射实施例 3 制备的各个疫苗, 每只狗 15ml, 连续 2 周观察行为、体重和存活率, 14 天后处死进行解剖检查 ; 狗未见毒性反应, 行为正常, 没有死亡, 体重有所增加, 未见脏器有明显的病理改变。

#### [0194] 四、过敏试验

[0195] 体重为 250 ~ 350g Hartley 豚鼠 : 实验第 1 天、实验第 3 天和实验第 5 天各皮下接种一次实施例 3 制备的各个疫苗 (每次接种 0.5ml), 实验第 26 天, 耳静脉接种一次实施例 3 制备的各个疫苗 (接种 0.5ml), 连续 3 天持续观察动物 ; 豚鼠无死亡, 且无鼻痒、喷嚏、烦躁不安、呼吸困难、休克、痉挛等过敏症状。

#### [0196] 五、兔热源质试验

[0197] 体重为 2 ~ 3kg 家兔 : 测量 2 次体温, 间隔 30 分钟, 要求 2 次温差不大于 0.2℃, 家兔 2 次平均温度 38.6-39.5℃。第 2 次测温后 15 分钟内, 自耳边静脉注入实施例 3 制备的各个疫苗, 注射后每隔 30 分钟测量体温 1 次, 连测 6 次, 家兔个体升温未超过 0.2℃。

#### [0198] 六、免疫病理损伤试验

[0199] 小鼠、家兔和奶牛 : 免疫实施例 3 制备的各个疫苗, 外周血抗体亚型、趋化因子、炎性因子、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、嗜碱性细胞及气管、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏等检测, Th2/Th1 免疫应答趋于平衡, 没有免疫器官损伤的迹象。

#### [0200] 七、疫苗的稳定性

[0201] 取实施例 3 制备的各个疫苗, 2-8℃ 放置 24 个月、37℃ 放置 1 个月或 25℃ 放置 3 个月。

[0202] 无变色分层等现象, PH 值在 7.0—7.2 之间, 电镜观察粒径大小保持一致。

[0203] 将各个放置处理后的疫苗进行实施例 4 的步骤二, 结果均与实施例 2 的步骤二的结果一致。

[0204] 对比例、

#### [0205] 一、制备荚膜多糖

[0206] 将奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株代替菌株 SAWR-6 进行实施例 3 的步骤一, 得到奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株荚膜多糖。

[0207] 将奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株代替菌株 SAWR-6 进行实施例 3 的步骤一, 得到奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株荚膜多糖。

[0208] 将奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株代替菌株 SAWR-6 进行实施例 3 的步骤一, 得到奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株荚膜多糖。

[0209] 将无乳链球菌 ATCC51487 代替菌株 SAWR-6 进行实施例 3 的步骤一, 得到无乳链球菌 ATCC51487 荚膜多糖。

[0210] 将停乳链球菌 ATCC43078 代替菌株 SAWR-6 进行实施例 3 的步骤一, 得到停乳链球菌 ATCC43078 荚膜多糖。

[0211] 将乳房链球菌 ATCC19436 代替菌株 SAWR-6 进行实施例 3 的步骤一, 得到乳房链球

菌 ATCC19436 荚膜多糖。

## [0212] 二、疫苗的制备

[0213] 1、取奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株,用 PBS 缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),37℃、150rpm 振荡孵育 36h (实际应用中 36h-48h 均可),然后 4℃、6500rpm 离心 15min 收集菌体,用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的 PBS 缓冲液悬浮菌体。

[0214] 2、取奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株,用 PBS 缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),37℃、150rpm 振荡孵育 36h (实际应用中 36h-48h 均可),然后 4℃、6500rpm 离心 15min 收集菌体,用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的 PBS 缓冲液悬浮菌体。

[0215] 3、取奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株,用 PBS 缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),37℃、150rpm 振荡孵育 36h (实际应用中 36h-48h 均可),然后 4℃、6500rpm 离心 15min 收集菌体,用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的 PBS 缓冲液悬浮菌体。

[0216] 4、取无乳链球菌 ATCC51487,用 PBS 缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),37℃、150rpm 振荡孵育 36h (实际应用中 36h-48h 均可),然后 4℃、6500rpm 离心 15min 收集菌体,用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的 PBS 缓冲液悬浮菌体。

[0217] 5、取停乳链球菌 ATCC43078,用 PBS 缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),37℃、150rpm 振荡孵育 36h (实际应用中 36h-48h 均可),然后 4℃、6500rpm 离心 15min 收集菌体,用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的 PBS 缓冲液悬浮菌体。

[0218] 6、取乳房链球菌 ATCC19436,用 PBS 缓冲液作为溶剂,得到菌液;取菌液,加入 37-40% 甲醛溶液并使甲醛浓度为 0.4% (体积比),37℃、150rpm 振荡孵育 36h (实际应用中 36h-48h 均可),然后 4℃、6500rpm 离心 15min 收集菌体,用灭菌后的 PBS 缓冲液洗涤菌体,然后用灭菌后的 PBS 缓冲液悬浮菌体。

[0219] 7、将步骤 1 得到的菌悬液、步骤 2 得到的菌悬液、步骤 3 得到的菌悬液和灭菌后的 PBS 缓冲液混合,得到对照疫苗甲(对照疫苗甲中,奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株、奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株和奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌/mL)。

[0220] 8、将步骤 1 得到的菌悬液、步骤 2 得到的菌悬液、步骤 3 得到的菌悬液、步骤一得到的奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株荚膜多糖、步骤一得到的奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株荚膜多糖、步骤一得到的奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株荚膜多糖和灭菌后的 PBS 缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的 SP01 佐剂,得到对照疫苗乙(对照疫苗乙中,奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株、奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株和奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌/mL,奶牛乳房炎无乳链球菌流行优势株荚膜多糖、奶牛乳房炎停乳链球菌流行优势株荚膜多糖和奶牛乳房炎乳房链球菌流行优势株荚膜多糖的浓度均为 40  $\mu$ g/ml)。

[0221] 9、将步骤 4 得到的菌悬液、步骤 5 得到的菌悬液、步骤 6 得到的菌悬液和灭菌后

的 PBS 缓冲液混合,得到对照疫苗丙(对照疫苗丙中,无乳链球菌 ATCC51487、停乳链球菌 ATCC43078 和乳房链球菌 ATCC19436 的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌 /mL)。

[0222] 10、将步骤 4 得到的菌悬液、步骤 5 得到的菌悬液、步骤 6 得到的菌悬液、步骤一得到的无乳链球菌 ATCC51487 荚膜多糖、步骤一得到的停乳链球菌 ATCC43078 荚膜多糖、步骤一得到的乳房链球菌 ATCC19436 和灭菌后的 PBS 缓冲液混合,得到混合液,然后加入与混合液等体积的 SP01 佐剂,得到对照疫苗丁(对照疫苗丁中,无乳链球菌 ATCC51487、停乳链球菌 ATCC43078 和乳房链球菌 ATCC19436 的浓度均为  $1 \times 10^{10}$  个细菌 /mL,无乳链球菌 ATCC51487 荚膜多糖、停乳链球菌 ATCC43078 荚膜多糖和乳房链球菌 ATCC19436 荚膜多糖的浓度均为  $40 \mu\text{g/ml}$ )。

[0223] 将各个疫苗置于  $2-8^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### [0224] 三、小鼠实验

[0225] 6-8 周 Balb/C 小鼠,分成 5 组,每组 10 只,分组免疫如下(皮下注射):

[0226] 第一组:实验第 1 天和实验第 28 天各免疫一次对照疫苗甲,每次免疫 0.25 毫升;

[0227] 第二组:实验第 1 天和实验第 28 天各免疫一次对照疫苗乙,每次免疫 0.25 毫升;

[0228] 第三组:实验第 1 天和实验第 28 天各免疫一次对照疫苗丙,每次免疫 0.25 毫升;

[0229] 第四组:实验第 1 天和实验第 28 天各免疫一次对照疫苗丁,每次免疫 0.25 毫升;

[0230] 第五组(阴性对照):实验第 1 天和实验第 28 天各免疫一次 PBS 缓冲液,每次免疫 0.25 毫升。

[0231] 实验第 42 天,尾静脉取血并分离血清。通过 ELISA 检测血清的  $I_gG$  抗体效价(用 PBST 缓冲液梯度稀释,得到血清稀释液;分别将 P3 代菌株 SAWR-6、P3 代菌株 SDTR-9 和 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌 /ml;采用兔抗鼠  $I_gG$  酶标二抗;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性)。采用以上三种包被原第一组实验动物得到的血清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第二组实验动物得到的血清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第三组实验动物得到的血清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第四组实验动物得到的血清的效价均为 1:3200。

### [0232] 四、奶牛实验

[0233] 2-5 岁即将进入泌乳期(即产前 25d,怀孕 8 个月 20d)的健康奶牛,分成五组,每组 100 头,分组免疫如下:

[0234] 第一组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次对照疫苗甲,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0235] 第二组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次对照疫苗乙,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0236] 第三组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次对照疫苗丙,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0237] 第四组:实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次对照疫苗丁,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射);

[0238] 第五组(阴性对照):实验第 1 天、实验第 29 天和实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)各免疫一次 PBS 缓冲液,每次免疫 5 毫升(颈部双侧皮下注射)。

[0239] 实验第 71 天,颈部静脉取血并分离血清。通过 ELISA 检测血清的  $I_gG$  抗体效价(用

PBST 缓冲液梯度稀释,得到血清稀释液;分别将 P3 代菌株 SAWR-6、P3 代菌株 SDTR-9 和 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌 /ml;采用羊抗牛 IgG 酶标二抗;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性)。实验第 71 天,取乳清。通过 ELISA 检测乳清的 sIgA 抗体效价(用 PBST 缓冲液梯度稀释,得到乳清稀释液;分别将 P3 代菌株 SAWR-6、P3 代菌株 SDTR-9 和 P3 代菌株 SURF-5 作为包被原,包被浓度为  $1 \times 10^9$  个菌 /ml;采用羊抗牛 sIgA 酶标二抗;检测 450nm 的吸光值;吸光值为阴性对照的 2.1 倍以上判断为阳性)。

[0240] 采用以上三种包被原第一组实验动物得到的血清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第二组实验动物得到的血清的效价均为 1:3200,采用以上三种包被原第三组实验动物得到的血清的效价均为 1:1600,采用以上三种包被原第四组实验动物得到的血清的效价均为 1:3200。

[0241] 采用以上三种包被原第一组实验动物得到的乳清的效价均为 1:100,采用以上三种包被原第二组实验动物得到的乳清的效价均为 1:200,采用以上三种包被原第三组实验动物得到的乳清的效价均为 1:100,采用以上三种包被原第四组实验动物得到的乳清的效价均为 1:200。

[0242] 实验第 71 天,取血后,用无乳链球菌 ATCC51487、停乳链球菌 ATCC43078 和乳房链球菌 ATCC19436 进行攻毒(使用乳针将 600CFU 无乳链球菌 ATCC51487、600CFU 停乳链球菌 ATCC43078 和 600CFU 乳房链球菌 ATCC19436 注入乳房内),实验第 72 天 - 实验第 85 天为结果评判期。结果评判方法同实施例 4 的步骤二。

[0243] 第一组实验动物的保护率为 78%,第二组实验动物的保护率为 79%,第三组实验动物的保护率均为 77%,第四组实验动物的保护率均为 78%,第五组实验动物的保护率为 0%。

[0244] 五、长效免疫保护效果

[0245] 2-5 岁即将进入泌乳期(即产前 25d,怀孕 8 个月 20d)的健康奶牛,分成 5 组,每组 100 只,分组免疫如下:实验第 1 天、实验第 29 天、实验第 57 天(即产前 25 天、产后 3 天、产后 31 天)和实验第 368 天各免疫一次疫苗,免疫分组方式、单次免疫剂量和免疫方式均同步骤三。实验第 700 天 - 实验第 714 天为结果评判 1 期,实验第 1070 天 - 实验第 1083 天为结果评判 2 期。结果评判方法同实施例 4 的步骤二。

[0246] 结果评判 1 期:第一组实验动物的保护率为 77%,第二组实验动物的保护率为 78%,第三组实验动物的保护率为 76%,第四组实验动物的保护率均为 77%,第五组实验动物的保护率为 37%。

[0247] 结果评判 2 期:第一组实验动物的保护率为 76%,第二组实验动物的保护率为 77%,第三组实验动物的保护率为 75%,第四组实验动物的保护率为 76%,第五组实验动物的保护率为 32%。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 内蒙古华希生物科技有限公司

&lt;120&gt; 链球菌以及将其灭活得到的奶牛乳房炎疫苗

&lt;130&gt; CGGNAY142113

&lt;160&gt; 1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1442

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 链球菌

&lt;400&gt; 1

|  |     |
|--|-----|
| gaggactggt gctgcaactgt cctaaaggag ttgcgaacgg gtgagtaacg cgtaggtagg | 60  |
| taaccgcata gcgggggata actattggaa acgatagcta ataccgcatg acaatagtta  | 120 |
| caccatgtac cctattttaa aggggcaaat gcttcactat gagatggacc tacgttgtat  | 180 |
| tagctagttg gtaaggtaac ggcttaccaa ggcgacgata catagccgac ctgagagggt  | 240 |
| gatcggccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtagggaa  | 300 |
| tctteggcaa tggggggaac cctgaccgag caacgcgcg tgagtgaaga aggttttcgg   | 360 |
| atcgtaaagc tctgtttgta gagaagaacg gtaatgggag tggaaaatec attacgtgac  | 420 |
| ggtaactaac cagaaaggga eggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtc  | 480 |
| ccgagcgttg tccggattta ttggcgtaa agcgagcgca ggcggttga taagtctgaa    | 540 |
| gttaaaggct gtggcttaac cataglacgc tttggaaact gtcaaaactg agtgcagaag  | 600 |
| gggagagtgg aattccatgt gtagcggatg aatgcgtaga tataatggagg aacaccggtg | 660 |
| gcgaaagcgg ctctctggte tgtaactgac gctgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca  | 720 |
| ggattagata ccctggtagt ccacgccgta aacgatgagt gctaggtgtt aggccctttc  | 780 |
| cggggccttag tgccggagct aacgeattaa gcactccgce tggggagtac gaccgcaagg | 840 |
| ttgaaactca aaggaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg  | 900 |
| aagcaaaccg agaaccttac ccaggtcttg acatcccgat gcccgcteta gagatagagc  | 960 |

[0002]

|   |      |
|---|------|
| tttacttcgg tacatcggtg acaggiggtg catggttgtc gtcagetcgt gtcgtgagat | 1020 |
| gttgggttaa gtcccgcaac gagegcaacc cctattgta gttgceatec ttaagttggg  | 1080 |
| cactctageg agactgcegg taataaacg gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatec  | 1140 |
| tgccccitat gacctgggct acacacgtgc tacaatggtt ggtacaacga gtcgcaagec | 1200 |
| ggtgacggca agctaatec ttaaagecaa tctcagttcg gattgtagc tgcaactcgc   | 1260 |
| ctacatgaag tcggaatec tagtaatec ggatcagcac gccgcggtga atacgttccc   | 1320 |
| gggccttgta cacacegcc gtcacaccac gagagtttgt aacacecgaa gtcggtgagg  | 1380 |
| taaccttlla ggagccagcc gcclaaggtg ggalagatga ttggggtgaa gtcgtaacaa | 1440 |
| gg  | 1442 |