

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610152519.7

[51] Int. Cl.

*C12N 1/20 (2006.01)*  
*A61K 39/02 (2006.01)*  
*A61K 35/74 (2006.01)*  
*A61P 31/04 (2006.01)*  
*A61P 11/06 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2008 年 9 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 100419073C

[22] 申请日 2006.9.28

[21] 申请号 200610152519.7

[73] 专利权人 中国兽医药品监察所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街  
8 号

[72] 发明人 宁宜宝 沈青春 李继庚 王桂敏  
丁庆猷 丁 芳 覃青松

[56] 参考文献

JP3187419B2 2001.7.11

CN86108515A 1987.10.28

WO2005112995A1 2005.12.1

CN1244580A 2000.2.16

US20050037027A1 2005.2.17

猪肺炎支原体的培养和保存. 张顺风等.  
生物学杂志, 第 69 期. 1996

猪肺炎支原体培养技术研究. 还红华等.  
中国人兽共患病杂志, 第 17 卷第 3 期. 2001  
审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 北京君智知识产权代理事务所  
代理人 向 华

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称

猪喘气病活疫苗及其生产方法

[57] 摘要

本发明涉及一种猪喘气病活疫苗及其生产方法。这种活疫苗是用一株适应在本发明所设计的一种猪肺炎支原体 Lps 培养基上生长的猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) RM48 株经培养后加入冻干保护剂经真空冷冻干燥制成活疫苗。该菌 P97 基因的 R1 (AAKPV/E) 重复序列为 17 个这一分子生物学特性可用于区别其他菌株。本活疫苗安全有效, 既可以用胸腔注射, 也可用鼻腔喷雾接种法免疫猪。

- 1 一株用于生产猪喘气病活疫苗的猪肺炎支原体菌株，其特征在于该株猪肺炎支原体保留了猪肺炎支原体 R659 株的各项特征，且该菌 P97 基因的 R1 重复序列与 R790 株同样为 17 个，命名为 MR48 株，本菌株已于 2006 年 9 月 19 日送交北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号：CGMCC No.1816。
- 2 一种猪喘气病活疫苗，其特征在于该活疫苗含有保藏号为 CGMCC No.1816 的 MR48 株猪肺炎支原体和冻干保护剂。
- 3 如权利要求 2 所述的一种猪喘气病活疫苗，其特征在于该活疫苗用胸腔注射或用鼻腔喷雾接种法免疫猪。
- 4 一种猪喘气病活疫苗的生产方法，其特征在于：
  - 1) 该疫苗的制苗菌株是保藏号为 CGMCC No.1816 的猪肺炎支原体 MR48 株；
  - 2) 制苗用培养基为 Lps 液体培养基，其配方按 1000ml 计为：PPLO 10.0~25.0g、NaCl 2.0~5.0g、KCl 0.2~1.0g、MgSO<sub>4</sub> 0.1~0.4g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2~0.6g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 2.0~8.0g、葡萄糖 5.0~10.0g、水解乳蛋白 1.0~5.0g、2.5%乙酸铈 5~10ml、25%酵母浸出液 100~200ml、10×MEM 10~50ml、牛心汤或肺汤 100~200ml、FeSO<sub>4</sub> 0.001~0.01g、1%酚红 0.5~2.0ml，补加蒸馏水至 800ml，过滤除菌后加入新鲜猪血清 100ml 和新鲜马血清 100ml，调 pH 至 7.3~7.6；
  - 3) 菌种子液按容积比以 1:10 接种于 Lps 液体培养基中，于 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，再以同样的方式扩大培养，一直到制苗所需的量，等比例加入冻干保护剂，充分混合，按规定头份定量分装，含活菌不少于 10<sup>8</sup>CCU / ml，经冷冻真空干燥后而成猪喘气病活疫苗。

## 猪喘气病活疫苗及其生产方法

**技术领域** 本发明涉及一种猪的传染病预防用活疫苗，属兽用生物制品领域。

**背景技术** 猪喘气病又称猪支原体肺炎或猪地方性流行性肺炎，是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 引起的一种接触性慢性呼吸道传染病，普遍存在于世界各地。患病猪主要表现为咳嗽和气喘，生长迟缓，饲料转化率低，体温基本正常。解剖时以肺部病变为主，尤以两肺心叶，中间叶和尖叶出现膜样变和肉样变为其特征。发病率高，死亡率低。近年的研究发现，猪肺炎支原体与猪繁殖呼吸综合症病毒和其它病原混合感染，使其感染的重要性进一步提高。到目前为止，该病仍是造成养猪经济损失最重要的疾病之一。

猪肺炎支原体对培养基的营养条件要求非常苛刻，在一般的培养基中很难生长，是动物支原体中较难培养的一种。

猪喘气病是养猪业面临的一个世界性难题，疫苗免疫是预防控制该病最有效的途径。然而，疫苗的研究虽然已在上世纪 60 年代就开始了，但直到 90 年代才开始出现希望，虽然中国兽医药品监察所将猪肺炎支原体强毒株在乳兔体内连续传代 700 多代，使其减毒，培育出了一株毒力低，免疫原性良好的猪肺炎支原体兔化弱毒株（中国发明专利 ZL 86108515，猪肺炎霉形体弱毒疫苗的生产），但是，由于该菌株长期在乳兔体内传代，几乎失去了在培养基中生长的能力，无法适应工厂化条件下规模化的疫苗生产。

### 发明内容

本发明的目的是通过使用不同的培养基和不同的分离培养方法使原已失去了在培养基中生长能力的猪肺炎支原体弱毒疫苗制苗菌株 R790 株能在培养基中生长并保持良好的免疫原性，以工厂化生产方法生产出预防猪喘气病活疫苗（又称猪肺炎支原体活疫苗）。

本发明是将我所培育的猪肺炎支原体兔化弱毒疫苗生产菌株 R790 株（中国发明专利 ZL 86108515，猪肺炎霉形体弱毒疫苗的生产）适应培养基获得了培养基适应菌株，对该菌株进行了一系列鉴定，经生长特性，血清学特性鉴定结果表明：该菌株符合猪肺炎支原体的各项特征，确定为猪肺炎支原体，并将其定名为猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) MR48 株（本菌株已于 2006 年 9 月 19 日送交北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏号：CGMCCNo.1816）。

### 具体实施方案

#### 1 菌种培育

将我所培育的猪肺炎支原体兔化弱毒 R790 株（中国发明专利 ZL 86108515，猪肺炎霉形体弱毒疫苗的生产）通过在 Lps 培养基反复传代，获得培养基适应株，命名为猪肺炎支原体

(*Mycoplasma hyopneumoniae*) MR48 株 (本菌株已于 2006 年 9 月 19 日送交北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号: CGMCCNo.1816)。

## 2 猪肺炎支原体 MR48 弱毒株的特性。

2.1 形态和生化特性 为环状、球状、丝状、杆状和点状多形态微生物, 无细胞壁, 革兰氏染色阴性, 血清学与生化特性应符合细菌分类学中该菌的特性。

2.2 培养特性 在液体培养基中呈现良好的生长, 37℃培养 4~10 日后培养基下降 0.5 个 pH 值以上, 呈现轻度混浊。培养物中猪肺炎支原体活菌滴度可以达到  $10^8 \sim 10^9$ CCU/ml (CCU—颜色变化单位) 之间。接种 Lps 固体培养基, 37℃培养 7~14 日后, 可见油煎蛋样菌落。

Lps 液体培养基配方 (按 1000ml 计): PPLO 10.0~25.0g、NaCl 2.0~5.0g、KCl 0.2~1.0g、MgSO<sub>4</sub> 0.1~0.4g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2~0.6g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*12H<sub>2</sub>O 2.0~8.0g、葡萄糖 5.0~10.0g、水解乳蛋白 1.0~5.0g、2.5%乙酸铈 5~10ml、25%酵母浸出液 100~200ml、10×MEM 10~50ml、牛心汤或肺汤 100~200ml、FeSO<sub>4</sub> 0.001~0.01g、酚红 1% 0.5~2.0ml, 补加蒸馏水至 800ml, 过滤除菌后加入新鲜猪血清 100ml 和新鲜马血清 100ml, 调 pH 至 7.3~7.6 备用; 液体培养基中加入 1.5%的琼脂成为 Lps 固体培养基。

## 2.3 血清学特性

2.3.1 用代谢抑制试验鉴定 在加有猪肺炎支原体抗血清的液体培养基中, 经 37℃恒温培养 15 日, pH 值不下降, 呈现特异的葡萄糖代谢抑制。

2.3.2 用生长抑制试验鉴定 在加有猪肺炎支原体抗血清的固体培养基表面, 经 37℃恒温培养 10~20 日, 无菌落出现, 呈现特异的猪肺炎支原体生长抑制。

## 2.4 安全性检验

2.4.1 小鼠安检 取菌种用生理盐水稀释成  $10^7$ CCU / ml, 皮下注射体重为 18~22g 清洁级小鼠 3 只, 0.4ml / 只, 观察 10 日, 均全部健活。

2.4.2 猪安全检验 每批培养物以 10 倍的免疫剂量 ( $5 \times 10^6$ CCU), 分别胸腔接种 30~50 日龄健康易感猪 3 头, 设空白对照 3 头, 观察 20 日。试验猪均无临床症状, 剖检后观察猪肺部正常, 无猪喘气病病理变化。

2.5 免疫原性检验 免疫方式 (鼻腔喷雾和肺内注射) 等共分为 9 个组进行免疫, 同时设未免疫对照组。免疫后 55 日, 采用猪肺炎支原体强毒 F65 株连同对照猪共计 30 头一起进行攻毒, 攻毒后 30 日全部宰杀, 检查肺部病变。试验结果显示胸腔肺内注射途径和鼻内喷雾免疫接种猪的保护效分别为 90%和 55%。

2.6 分子生物学鉴定 (P97 基因序列的测定) 按照丁芳等人的方法 (《畜牧兽医学报》2004.Vol.35 No6. 698-701) 对该菌株 P97 基因序列进行测定, 结果表明, 猪肺炎支原体

(*Mycoplasma hyopneumoniae*) MR48 株保留了猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) R659 株的特性, 即: MR48 株和 R659 株的 P97 基因的 R1 (AAKPV/E) 重复序列同样为 17 个, 明显的区别于其他菌株。

3. 疫苗制备 将 Lps 液体培养基培养的猪肺炎支原体 MR48 株菌种子液以 1:10 (容积比) 接种于 Lps 液体培养基中。存 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。一直到制苗所需的量 (继代次不超过 6 代), 等比例加入冻干保护剂, 充分混合, 按规定头份定量分装, 含活菌不少于  $10^8$ CCU/ml, 经冷冻真空干燥后而成猪喘气病活疫苗。

#### 4 猪肺炎支原体活疫苗 (MR48 株) 的质量标准

4.1 颜色变化单位 (CCU) 测定 按 CCU 测定方法测定, 冻干苗每头份菌数  $\geq 5 \times 10^6$ CCU。

##### 4.2 安全检验

4.2.1 小鼠 用体重 18~22g 的小鼠 3 只, 用生理盐水将疫苗恢复到原体积, 各皮下接种 0.4ml, 观察 10 日。应全部健活。

4.2.2 猪 每批培养物以 10 倍的免疫剂量, 即取 15 瓶 (2 头份/瓶) 疫苗用生理盐水稀释成总体积 15ml, 分别胸腔接种 30~50 日龄健康易感猪 3 头, 每头 3ml, 同时设空白对照 3 头, 观察 20 日。安检猪应无任何临床症状。否则, 应重检一次。

4.3 效力检验 (兔体免疫反应) 用体重 1.5~2.0kg 的大耳白兔 5 只, 取 3 瓶疫苗 (2 头份/瓶) 疫苗用生理盐水稀释成总体积 12ml, 每只大耳白兔各肺内注射 2ml, 第 30 日采血, 用间接血凝方法检查血清凝集抗体, 应至少 4 只为阳性 (血凝价  $\geq 10^{++}$ ), 否则, 应重检 1 次。

4.4 免疫期 为 6 个月。

4.5 用法与用量 右胸腔注射或鼻内喷雾, 每头猪接种 1 头份。

本发明的优点:

本发明所涉及的一株猪肺炎支原体 RM48 株是由猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 兔化弱毒 R790 株经在本发明所设计的一种猪肺炎支原体疫苗培养基上反复传代而适应, 并能进行工业化的活疫苗生产, 该支原体菌株保留了原菌株的免疫原性和安全性, 其该菌 P97 基因的 R1 (AAKPV/E) 重复序列为 17 个这一分子生物学特性可用于区别其他菌株。本菌株生产的猪肺炎支原体活疫苗既可以用胸腔注射, 也可用鼻腔喷雾接种法免疫猪。