微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn

Sep. 20, 2017, 44(9): 2137−2144
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.170082

研究报告

两种不同保护剂冻干的仔猪副伤寒活疫苗质量比较

朱良全[1] 孙晔[1,2] 孙翠丽[1,3] 程汝佳[1,3] 彭永[1] 叶俊贤[1] 刘郁夫[1] 高强[1] 丁家波[1*]

(1. 中国兽医药品监察所 北京 100081)
(2. 北京中海生物科技公司 北京 100081)
(3. 山东农业大学动物科技学院 山东 泰安 271018)

摘 要：【目的】系统比较两种不同保护剂冻干的仔猪副伤寒活疫苗(耐热苗和常规苗)质量指标，为科学评价两种疫苗质量提供参考。【方法】制备耐热苗和常规苗各 3 批，分别进行物理性状、纯粹性、活菌计数、安全性、剩余水分、真空度和保存期等参数测定和比较，同时比较冻干前后的活菌存活率及耐老化性能。任选耐热苗与常规苗 1 批，按 3×10^9 CFU 分别口服与肌肉注射仔猪各 5 头，设相同条件下不免疫对照 5 头，30 d 后静脉注射致死量猪霍乱沙门氏菌，临床观察 30 d 后评估疫苗的效力。【结果】耐热苗及常规苗的物理性状、纯粹性、活菌计数、安全性、剩余水分、真空度均符合现行《中国兽药典》的要求。3 批耐热苗冻干菌存活率分别为 88.2%、83.1%和 86.4%，耐老化试验后的活菌存活率为 83.6%、82.9%和 88.8%; 然而 3 批常规苗冻干菌存活率分别为 52.3%、56.2%和 61.4%，耐老化活菌存活率分别为 58.5%、60.2%和 54.7%。经 37 °C、7 d 耐老化试验结果显示，耐热苗物理性状良好，而常规苗原有团块表面凹陷 1/4−1/2。保存期结果表明耐热苗 4 °C 有效期可达 24 个月，常规苗仅为 9 个月。仔猪免疫攻毒结果表明，耐热苗肌肉注射及口服免疫均达 100% (5/5)保护；常规苗肌肉注射达 80% (4/5)保护，口服达 100% (5/5)保护，不免疫对照 0 保护 (5/5 死亡)。【结论】耐热苗具有较高的冻干菌存活率和良好的耐老化性能，4 °C 可长期保存且不影响其免疫效力。

关键词：仔猪副伤寒活疫苗，同类产品，比较

Comparison of swine paratyphoid live vaccines lyophilized with two different stabilizers

ZHU Liang-Quan[1] SUN Ye[1,2] SUN Cui-Li[1,3] CHENG Ru-Jia[1,3] PENG Yong[1]
YE Jun-Xian[1] LIU Yu-Fu[1] GAO Qiang[1] DING Jia-Bo[1*]

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)
(2. Beijing Zhonghai Biotec Co. Ltd., Beijing 100081, China)
(3. College of Animal Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: [Objective] To systematically compare the physical, chemical and biological properties of

Foundation item: National Key R&D Program of China (No. 2016YFD0500902); Enterprises Promotion Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission (No. Z121102002812080)
***Corresponding author:** Tel: 86-10-61255327; E-mail: dingjiabo@126.com
Received: January 30, 2017; **Accepted:** May 08, 2017; **Published online** (www.cnki.net)**:** June 06, 2017
基金项目：国家重点研发计划项目(No. 2016YFD0500902)；北京市科委企业提升计划项目(No. Z121102002812080)
*通讯作者：Tel：86-10-61255327；E-mail：dingjiabo@126.com
收稿日期：2017-01-30；接受日期：2017-05-08；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2017-06-06

the swine paratyphoid thermo-stable live vaccine (TS vaccine) and the traditional swine paratyphoid live vaccine (traditional vaccine), and provide references for evaluation of live vaccine prepared with thermo-tolerant stabilizer. **[Methods]** Three batches of TS vaccine and traditional vaccine were prepared. The vaccine physical properties, pureness, viable bacterial counts, safety, residual moisture, vacuity and storage period were measured according to the standard methods in Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China. The survival ratio of the vaccines after lyophilization and the thermo-stabilities after storage at 37 °C for 7 days was compared. One batch of TS vaccine and traditional vaccine were selected for further protective efficacy study. Twenty-five piglets were randomly divided into five groups. With the exception of the non-vaccinated control, the other four groups were immunized orally (p.o.) or intramuscularly (i.m.) with 1 dose of TS or traditional vaccine. After thirty days, all piglets were challenged intravenously with 1 minimum lethal dose (MLD) of virulent *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. The protective efficacy of two vaccines were observed for 30 days post challenge. **[Results]** The physical properties, pureness, viable bacterial counts, safety, residual moisture and vacuity of two vaccines met the requirements of Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China. The bacterial survival ratio after lyophilization of the TS vaccine was 88.2%, 83.1%, 86.4%, respectively, compared to the 52.3%, 56.2%, 61.4% for the traditional vaccine, respectively. After stored at 37 °C for 7 days, the survival ratio of the TS vaccine was 83.6%, 82.9%, 88.8%, respectively, compared to the 58.5%, 60.2%, 54.7% of the traditional vaccine, respectively. After stored at 37 °C for 7 days, the TS vaccine showed good properties, while the traditional vaccine had surface concave of 1/4−1/2. The storage period at 4 °C of the TS vaccine lasted 24 months, compared to the only 9 months for the traditional vaccine. The protective efficacy of the TS vaccine was 100% for oral or intramuscular immunization route. For the traditional vaccine, the protective efficacy was 100% for oral route and 80% for intramuscular route. **[Conclusion]** The TS vaccine had higher survival ratio after lyophilization and better thermo-stability. The TS vaccine could be stored at 4 °C for long-term and had good protective efficacy.

Keywords: Swine paratyphoid live vaccine, Similar products, Comparison

肠道沙门氏菌(Salmonella)是最常见的人畜共患病原菌，由其引起的食物中毒病例占世界第一位或第二位[1]。根据其对宿主适应性或嗜性不同，可分为 3 个群，其中一群为特定动物的偏嗜性沙门氏菌，如猪霍乱沙门氏菌等[2]。猪霍乱沙门氏菌是我国感染猪的主要致病性沙门氏菌之一，该菌高度适应猪，主要引起幼猪和架子猪的败血症及肠炎，但近几年由该菌导致的食物中毒频有发生，引起国内外高度关注[3-9]。

疫苗免疫是预防和控制猪霍乱沙门氏菌病的有效途径[2,9]。20 世纪 60 年代，房晓文等[10]选用抗原性良好的猪霍乱沙门氏菌强毒株 C78-1 在含有醋酸铊的普通肉汤中传代培养 500 代后，筛选出一株遗传稳定、免疫原性好的弱毒株 C500 (现称 CVCC79500)，并制备了仔猪副伤寒活疫苗(简称“常规苗”，下同)，其毒力稳定、安全，对仔猪有坚强免疫力，已在我国应用 40 余年，现每年生产约 1.5 亿头份，免疫效力确实[10-13]。但该疫苗在生产中一直沿用 1.5%明胶和 5%蔗糖作为冻干保护剂，需要−15 °C 保存，存在冻干存活率低、在较高温度下保护功能较差的缺点[12]。另外，低温(−15 °C)保存给边远地区疫苗储运和使用带来困难[13]。2007 年，本课题组根据保护剂基质与猪霍乱沙门氏菌菌体相容性特点，研制出以 PVP、水溶性明胶、山梨醇、199 培养基、L-谷氨酸钠等为主要成分的耐热保护剂及配套冻干工艺，为破解疫苗生产工艺难题提供了解决方案[14]。2015 年本课题组在 2007 年的研究基础上，研制出仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗(简称“耐热苗”，下同)并获得国家新兽药注册证书，至今已有 3 家公司获得农业部批准文号并实现

产品上市[15-16]。现将试制的 3 批耐热苗与传统苗按现行《中国兽药典》中的质量标准项进行系统检定[17]，并对结果进行全面比较，为科学评价两种疫苗的质量提供参考。

1 材料

1.1 菌种

生产用菌种：猪霍乱沙门氏菌(CVCC79500 株)(编号 SC200808，2008.11.6 冻干，2 mL/瓶)；检验用菌种(CVCC79102 株) (编号 JY200808，2008.11.13 冻干，2 mL/瓶)，均由北京中海生物科技有限公司科研部制备。

1.2 主要试剂和培养基

普通琼脂(又称营养琼脂，批号：20100102)、普通肉汤培养基(又称营养肉汤，批号：20100102)、1.5%明胶和 5%蔗糖冻干保护剂、20%铝胶生理盐水(批号：20100102)、纯粹检验用硫乙醇酸盐培养基(TG)、酪胨琼脂(GA)和葡萄糖蛋白胨汤(GP)(批号：20100102)，均由中国兽医药品监察所培养基组按《中华人民共和国兽用生物制品规程(2000 版)》(以下简称《规程》[12])配制及供应。

仔猪副伤寒活疫苗合成培养基(主要成分为胰酪蛋白胨、酵母粉等，批号为 201001)[14,18]及仔猪副伤寒活疫苗耐热保护剂(主要成分为聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone，简称 PVP)、水溶性明胶、山梨醇、199 培养基、L-谷氨酸钠等，批号为 201011)[18]，均由北京中海生物科技有限公司配制及提供。

1.3 动物

兔：体重 1.5−2.0 kg，普通级；仔猪：体重 12–15 kg，猪霍乱沙门氏菌抗体阴性，断乳健康。动物均由中国兽医药品监察所实验动物组采购并提供。

1.4 主要仪器

30 L 发酵罐，上海高机生物工程有限公司；高速离心机，日立公司；冻干机，Edwards 公司；水分测定仪，METTLER TOLEDO 公司；76-1 型高频电火花真空度测定仪，华西科创(北京)科技有限公司。

2 方法

2.1 仔猪副伤寒耐热苗及常规苗的制备

2.1.1 种子繁殖及发酵培养：种子液按《规程》[12]进行繁殖和制备。将种子液按 2% (体积比)接种于合成培养基(30 L 发酵罐盛装培养基 20 L)中，按文献[18]报道的发酵工艺及参数培养 18 h，培养过程中根据 pH 值变化用灭菌的 50%葡萄糖溶液控制 pH 值为 7.5−7.6。

2.1.2 配苗、分装及冻干：培养结束后，以 3 500 r/min 离心 20 min，弃去上清。然后用保护剂(耐热保护剂或者 1.5%明胶 5%蔗糖)悬浮至菌液终浓度 3×10^{10}–5×10^{10} CFU/mL，即为制苗用菌液。按《规程》[12]取样并经半成品检验(活菌计数及纯粹检验)合格后，定量分装(3 mL/瓶)，分别按各自的冻干曲线进行冻干，各冻干 3 批，每批冻干约 200 瓶。其中耐热苗(批号为 1001、1002、1003)采用文献[14]报道中的冻干曲线，常规苗(批号为 1011、1012、1013)采用《规程》[12]中冻干曲线。取冻干前后样品各 3 瓶，按现行《中国兽药典》[17]要求进行活菌计数，计算冻干前后活菌存活率(冻干菌存活率)，详见公式(1)。

冻干菌存活率(%)=冻干后每头份(或 mL)活菌数/冻干前每头份(或 mL)活菌数×100% (1)

2.2 疫苗检验及比较试验

选取 3 批耐热苗及 3 批常规苗，每批各 30 瓶，按现行《中国兽药典》[17]进行 2.2.1−2.2.6 项检验。

2.2.1 物理性状检验：随机取待检疫苗(5 瓶/批)，重点检查冻干团块表面有无结晶和塌陷，合格疫苗其冻干团块表面应无结晶和塌陷。

2.2.2 纯粹性检验：随机取待检疫苗(3 瓶/批)，用 5 mL 普通肉汤混合溶解后，每瓶样品分别接种 TG 小管、GA 斜面各 2 支，每支 0.2 mL，1 支置 37 °C 培养，1 支置 25 °C 培养，另接种 1 支 GP 小管，置 25 °C 培养，观察 7 d。若 37 °C 及 25 °C 接种 TG 小管呈均匀混浊，革兰氏染色均为红色、无杂菌且 37 °C 及 25 °C 接种 GA 斜面肉眼观察菌落生长纯

粹，经革兰氏染色均为阴性小杆菌，则说明无其他厌氧和需氧性菌生长；若 25 °C 接种 GP 小管呈均匀混浊，革兰氏染色均为红色、无杂菌，则表明无霉菌和腐生菌生长。如果 TP、GA 及 GP 均无杂菌，则判为纯粹检验合格；否则，判为纯粹检验不合格[12,17]。

2.2.3 活菌计数：任取疫苗 3 瓶，每瓶疫苗分别加入适量蛋白胨水稀释成 0.5 头份/mL，然后 10 倍倍比稀释至 10^{-7}，取最后一支稀释度试管菌液，接种 3 个普通琼脂平板，每个平板接种 0.1 mL，使菌液均匀散开，置 37 °C 培养箱晾干后，翻转平板。待接菌平板 37 °C 培养 24 h，肉眼观察菌落，并在平板底面点数，算出每瓶 3 个平板的平均菌落数。所得平均菌落数乘以稀释倍数，即为总活菌数。

2.2.4 安全性：每批疫苗取 3 瓶，用生理盐水混合稀释至 2 头份/mL，皮下注射家兔 2 只，1.0 mL/只，临床观察 21 d，记录存活情况。如果 2 只兔均健活，说明疫苗安全；如果 1 只健活、1 只非特异性死亡(剖检的心、肝、脾、肺、肾等脏器未分离到猪霍乱沙门氏菌)，则需加倍量(4 只兔)重检一次，如果全部健活，则说明疫苗安全，否则判定疫苗安全性检验不合格[12,17]。

2.2.5 剩余水分：每批抽样 4 瓶，每瓶疫苗称量好(瓶重+样重)，然后减去瓶重，获得样品干前重量。随后将样品移入无水氯化钙的干燥罐中，称量获得样重；并运用真空干燥箱，将瓶在 2.67 kPa (20 mmHg)以下，以 66 °C 干燥 3 h，通入经过无水氯化钙吸水的干燥空气，待室温后称取瓶重。干燥失重=(干前瓶重+样重)−(干后瓶重+样重)。疫苗水分含量按公式(2)计算，应不超过 4%。

水分含量(%)=干燥失重/样品干前重量×100% (2)

2.2.6 真空度：开启高频火花真空测定器；将火花接近冻干制品瓶外壁，瓶内腔处出现白色、粉色或紫色辉光者则真空度为合格，不出现光亮者则真空度为不合格。

2.2.7 耐老化试验：取疫苗 5 瓶，置 37 °C 保存 7 d，任选 3 瓶分别进行活菌计数，按公式(3)计算放置前后每头份疫苗的活菌存活率。

活菌存活率(%)=耐老化试验后每头份(或 mL)活菌数/耐老化试验前每头份(或 mL)活菌数×100% (3)

2.2.8 保存期试验：取耐热苗 3 批(批号为 1001、1002、1003)与常规苗 3 批(批号为 1011、1012、1013)，每批各 40 瓶，分别置 4 °C 保存，于冻干后第 1 天及保存后第 3、6、12、18、24 和 27 个月，分别取样 3 瓶，按现行《中国兽药典》[17]进行活菌计数并按公式(4)计算其活菌存活率。

活菌存活率(%)=保存不同时间后每头份(或 mL)活菌数/保存前每头份(或 mL)活菌数×100% (4)

2.2.9 效力试验：从 4 °C 保存 9 个月的 3 批耐热苗和常规苗中，各任选一批。随机抽取该批疫苗 3 瓶，按瓶签注明头份，用 20%铝胶生理盐水将耐热苗和常规苗进行稀释以肌肉注射(Intramuscularly，i.m.)途径免疫仔猪；用生理盐水将耐热苗和常规苗进行稀释以口服途径(Orally，p.o.)免疫仔猪。其中注射组：用 20%铝胶生理盐水混合稀释成 1 头份/mL；口服(灌服)组：用生理盐水混合稀释成 1 头份/2 mL；肌肉注射和灌服仔猪各 5 头，1 头份/头，30 d 后，连同条件相同的不接种对照仔猪 5 头，各静脉注射经肉肝胃(膜)消化汤培养 2 代的猪霍乱沙门氏菌(CVCC79102 株)菌液 1.0 mL [含 1 个最小致死剂量(MLD)的活菌]，临床观察 30 d，记录仔猪死亡及存活情况。

2.2.10 统计分析：耐热苗和常规苗的稳定性通过活菌存活率来表征，结果以平均数±标准差表示。SPSS 统计学分析软件的 *t*-检验方法用于分析耐热苗和常规苗的稳定性差异，$P<0.05$ 表示差异显著；$P\geq0.05$ 表示差异不显著。

3 结果与分析

3.1 耐热苗和常规苗检定结果

耐热苗及常规苗按《中国兽药典》标准项检定结果见表 1。表 1 结果显示，3 批耐热苗及常规苗纯粹性、物理性状、剩余水分、真空度、安全检验均符合现行《中国兽药典》[17]要求。不过，耐热苗的水分含量普遍低于常规苗，其真空度优于常规苗。

表 1 3 批仔猪副伤寒耐热苗和常规苗检定结果
Table 1 The verification results of the TS vaccine and traditional vaccine

疫苗 Vaccine	批号 Batch No.	物理性状 Physical properties	纯粹检验 Pureness test 37 °C TG	37 °C GA	25 °C TG	25 °C GA	25 °C GP	剩余水分 Residual moisture (%)	真空度 Vacuity	活菌计数 (×10⁸CFU/头份) Viable bacterial counts (×10⁸ CFU/dose)	安全检验* Safety*
耐热苗 TS vaccine	1001	均为白色海绵状疏松团块	−	均纯粹生长	−	均纯粹生长	−	1.99 1.89 1.92 1.93	均为白色辉光	45.2	2/2 兔健活
	1002		−		−		−	1.87 1.86 1.91 1.94		52.2	2/2 兔健活
	1003		−		−		−	1.75 1.86 1.81 1.84		47.6	2/2 兔健活
常规苗 Traditional vaccine	1101	均为白色海绵状疏松团块	−	均纯粹生长	−	均纯粹生长	−	2.79 2.88 2.95 2.93	均为白色辉光	47.2	2/2 兔健活
	1102		−		−		−	2.75 2.86 2.81 3.01		46.4	2/2 兔健活
	1103		−		−		−	3.05 2.96 2.81 2.88		50.4	2/2 兔健活

注：−：均匀混浊，革兰氏染色均为红色，无杂菌；*：分母为免疫接种兔数量，分子为健活兔数量.
Note: −: Uniform turbidity, Gram stain red, no contaminated bacterium; *: The denominator was the number of vaccinated rabbits and the numerator was the number of health rabbits.

3.2 耐热苗和常规苗冻干菌存活率及耐老化试验结果

耐热苗和常规苗冻干菌存活率及耐老化试验结果见表 2。表 2 显示，耐热苗的冻干菌存活率为 83.1%−88.2%，常规疫苗为 52.3%−61.4%；37 °C 保存 7 d，耐热苗的活菌存活率为 82.9%−88.8%，常规苗为 54.7%−60.2%。冻干后无论耐热苗还是常规苗物理性状均良好，冻干物质均为白色海绵状疏松团块，经 37 °C 保存 7 d 耐老化试验后，耐热苗物理性状仍良好，而常规苗干缩 1/4−1/2。

3.3 耐热苗和常规苗保存期试验结果

耐热苗和常规苗保存期试验结果见图 1。图 1 显示，3 批耐热苗 4 °C 保存 27 个月菌存率达 91.1%−93.4%。常规疫苗 4 °C 保存 12 个月菌存率仅为 57.6%−64.6%。当常规苗 4 °C 保存超过 12 个月时，其计算出的活菌数已达不到现行《中国兽药典》[17]规定的 30×10^8 CFU/头份标准。因此，为确保疫苗质量，确定耐热苗 4 °C 有效保存期为 24 个月，常规苗 4 °C 有效保存期为 9 个月。

3.4 耐热苗和常规苗效力试验比较结果

耐热苗和常规苗效力试验比较结果见图 2。如图 2 所示，仔猪以 1 头份最小标准剂量(3×10^9 CFU 活菌)免疫后，以 1 MLD 猪霍乱沙门氏菌强毒攻毒，耐热苗无论口服还是肌肉注射免疫均为 100%保护，常规苗口服免疫达 100%保护，而肌肉注射免疫为 80%保护(攻毒后第 9 d 死亡 1 只)，不免疫攻

表 2 3 批仔猪副伤寒耐热苗与常规苗的物理性状、冻干菌存活率及耐老化试验比较结果

Table 2 The physical characteristic and survival ratio of the TS vaccine and traditional vaccine after lyophilization and stored at 37 °C for 7 days

疫苗 Vaccine	批号 Batch No.	冻干前活菌数 (×10^8 CFU/头份) Viable bacteria counts before lyophilization (×10^8 CFU/dose)	冻干后 After lyophilization		37 °C 7 d 37 °C for 7 days	
			物理性状 Physical properties	冻干菌存活率 Survival ratio (%)	物理性状 Physical properties	活菌存活率 Survival ratio (%)
热苗 TS vaccine	1001	56.0	均为白色海绵状疏松团块	88.2	均为白色海绵状疏松团块	83.6
	1002	58.5		83.1		82.9
	1003	59.1		86.4		88.8
常规苗 Traditional vaccine	1101	90.8	均为白色海绵状疏松团块	52.3	均为白色海绵状疏松团块	58.5
	1102	99.1		56.2		60.2
	1103	81.7		61.4		54.7

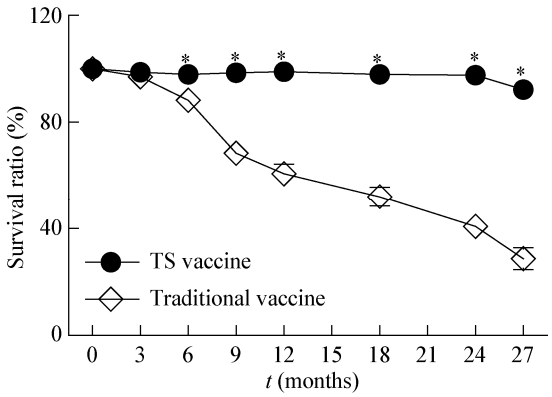

图 1 疫苗在 4 °C 保存不同时间后活菌菌存率

Figure 1 The bacteria survival ratio of two vaccines after stored at 4 °C

Note: *: $P<0.05$.

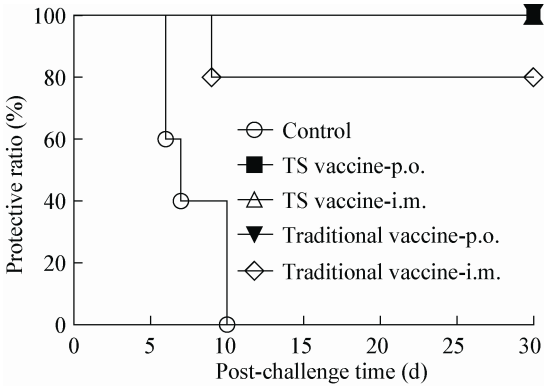

图 2 两种疫苗在仔猪中对强毒猪霍乱沙门氏菌的免疫保护率

Figure 2 The protective ratio of two vaccine against virulent challenge in piglets

毒对照仔猪均 100%死亡(攻毒后 6 d 死亡 2 只，7 d 死亡 1 只，10 d 死亡 2 只)。所有死亡仔猪均呈明显败血症状，其剖检后在肝、脾、肺、肾等组织均可分离到猪霍乱沙门氏菌。可见，两种疫苗免疫保护效力确实，耐热苗肌肉注射免疫保护率略优于常规苗，口服免疫两者保护率一致。

4 结论与讨论

(1) 仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗相较于传统保护剂冻干的仔猪副伤寒活疫苗，具有冻干菌存活率高、耐老化性能好、可实现 4 °C 长期保存的优点。两种疫苗安全性良好、免疫效力确实，这与以往兽用病毒类疫苗的研究结论一致。由耐热保护剂及其冻干工艺研制的仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗实现了我国现有兽用细菌活疫苗工艺和技术上的革新。目前除该耐热苗外，《中国兽药典》收载的 17 种细菌类活疫苗，还未有其他既能保持良好耐老化性能又能提高冻干菌存活率的疫苗获国家认可[14,17]。

(2) 冷冻会对细菌产生一定的破坏作用，其机理非常复杂，目前尚无统一的理论，但普遍认为是由机械效应和溶质效应引起的[19–20]。如果无保护剂，细菌在经历低温后很难存活下来。由于不同细

菌的菌体特点及组成有差别，比如革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌，其保护剂理论上是有差异的。传统保护剂(如 1.5%明胶和 5%蔗糖，5%脱脂牛奶和 10%蔗糖等)系通用的保护剂配方，因此制成的仔猪副伤寒活疫苗存在冻干菌存活率整体偏低、有效保存期较短、实际应用效果差的缺点[12,17]。

(3) 耐热保护剂相对传统保护剂而言，含有多成分的大分子物质和小分子物质，以及传统保护剂所没有的抗氧化剂[14]。其大分子物质(如 PVP、水溶性明胶、199 培养基等)在冻干过程中组成耐热性构架，阻断热源对构架内细菌热传导性和热辐射性杀伤；其小分子物质(如山梨醇、谷氨酸钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等)与菌液形成均匀悬液，直接保护细菌以防止干燥过程中的最终水分含量过低；其抗氧化剂可阻止细菌在干燥状态下与氧接触，降低新陈代谢引起死亡[21-23]。另外，耐热保护剂中含有的 PVP 可抑制磷酸盐的结晶，从而避免系统 pH 值降低[24]；采用 PVP 与其他赋形剂(如甘露醇等)联合使用，其抗断裂的强度可提高 3–25 倍，保证了冻干物料的颜色和质地均匀，在相对高温下使制品不收缩[25]。

(4) 耐热苗水分含量普遍比传统苗低，主要在于保护剂和冻干曲线的不同。耐热保护剂中含有抗氧化剂成分，水分含量低可有效阻止与氧接触，降低新陈代谢引起死亡[14,21-23]；其次，耐热苗二次干燥阶段维持时间长，如耐热苗在 25–30 °C 维持 6–8 h 以上，而常规苗在 25–28 °C 仅保持 3 h 以内[12,14]。此外，据报道残余水分质量分数为 1%–3%时菌体的相对存活率较高，而高于 5%时菌体存活率明显降低、贮存期缩短[26]。

(5) 对于试验中耐热苗肌肉注射攻毒结果优于常规苗，可能是因为耐热保护剂成分中含有佐剂的缓释功能，不过该结论仍需大量临床试验进行进一步验证。

参 考 文 献

[1] Manzano M, Cocolin L, Astori G, et al. Development of a PCR microplate-capture hybridization method for simple, fast and sensitive detection of *Salmonella* serovars in food[J]. Molecular and Cellular Probes, 1998, 12(4): 227-234

[2] Lu CP. Veterinary Microbiology[M]. 4th Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 107-113 (in Chinese)
陆承平. 兽医微生物学[M]. 第 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2010: 107-113

[3] Li HY. An investigation report of food poisoning caused by *Salmonella enterica*[J]. Guide of China Medicine, 2008, 6(5): 86-87 (in Chinese)
李怀玉. 一起猪霍乱沙门氏菌引起食物中毒的调查报告[J]. 中国医药指南, 2008, 6(5): 86-87

[4] Wang JZ, Zhong DM. One strain of *Salmonella choleraesuis* isolated from pus in the upper arm[J]. The Medical Journal of Industrial Enterprise, 2005, 18(3): 48 (in Chinese)
王俊智, 仲冬梅. 从上臂脓液中分离 1 株猪霍乱沙门氏菌[J]. 工企医刊, 2005, 18(3): 48

[5] Guan P, Zhang DD, Chen YG, et al. One case from human *Salmonella choleraesuis septicemia*[J]. Chinese Journal of Convalescent Medicine, 2008, 17(4): 244-245 (in Chinese)
关平, 张大东, 陈跃光, 等. 人猪霍乱沙门氏菌败血症 1 例[J]. 中国疗养医学, 2008, 17(4): 244-245

[6] Ku YW, McDonough SP, Palaniappan RUM, et al. Novel attenuated *Salmonella enterica* serovar *Choleraesuis* strains as live vaccine candidates generated by signature-tagged mutagenesis[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(12): 8194-8203

[7] Chiu CH, Su LH, Chu C. *Salmonella enterica* serotype choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2004, 17(2): 311-322

[8] Hsueh PR, Teng LJ, Tseng SP, et al. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica Typhimurium and Choleraesuis* from pigs to humans, Taiwan[J]. Emerging Infectious Diseases, 2004, 10(1): 60-68

[9] Liu QF, Cui SJ. Swine salmonella disease etiology, epidemiology, diagnosis and treatment progress[J]. Swine Industry Science, 2009, 26(12): 24-28 (in Chinese)
刘芹防, 崔尚金. 猪沙门氏菌病病原学、流行病学、诊断及防治进展[J]. 猪业科学, 2009, 26(12): 24-28

[10] Fang XW, Li YL, Huang CB, et al. Live vaccine against swine paratyphoid from the attenuated smooth strain C500 of *Salmonella cholerae-suis*[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 1981, 12(2): 99-106 (in Chinese)
房晓文, 李扬陇, 黄昌炳, 等. 仔猪副伤寒弱毒菌苗的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1981, 12(2): 99-106

[11] Huang CB, Feng WD, Xue MQ, et al. Oral administration of the live vaccine against swine paratyphoid[J]. Scinentia Agricultura Sinica, 1981, 14(6): 89-94 (in Chinese)
黄昌炳, 冯文达, 薛民权, 等. 仔猪副伤寒弱毒通气培养冻干苗口服免疫研究[J]. 中国农业科学, 1981, 14(6): 89-94

[12] The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Veterinary Biological Product Rule 2000, People's Republic of China[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000 (in Chinese)

中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程 2000 版[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000

[13] Su DP, Zhang YP, He DS. Research progress of swine *Salmonella* vaccine[J]. Swine Industry Science, 2009, 26(12): 42-44 (in Chinese)
苏丹萍, 张艳萍, 贺东生. 猪沙门氏菌病疫苗研究进展[J]. 猪业科学, 2009, 26(12): 42-44

[14] Zhu LQ, Wang D, Sun Y, et al. Method for producing paratyphus living vaccine for piglets: China, CN101912608B[P]. 2012-08-22 (in Chinese)
朱良全, 王栋, 孙晔, 等. 一种仔猪副伤寒活疫苗的生产方法: 中国, CN101912608B[P]. 2012-08-22

[15] Zhu LQ, Sun Y, Jiang H, et al. Study of the application parameters for thermo-stabilizer in the manufacture of swine paratyphoid live vaccine[J]. Microbiology China, 2017, 44(9): 2128-2136 (in Chinese)
朱良全, 孙晔, 蒋卉, 等. 仔猪副伤寒活疫苗中耐热保护剂应用相关参数的研究[J]. 微生物学通报, 2017, 44(9): 2128-2136

[16] Zhu LQ, Sun Y, Wang D, et al. Paratyphus Thermo-stable Vaccine for Piglets, Live (CVCC79500 Strain). People's Republic of China new veterinary drug registration certificate (Three), No: (2015) a new veterinary drug certificate No. 07[S]. 2015-01-21 (in Chinese)
朱良全, 孙晔, 王栋, 等. 仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗(CVCC79500 株). 中华人民共和国新兽药注册证书(三类), 证号: (2015)新兽药证字 07 号[S]. 2015-01-21

[17] China Veterinary Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia (2015Edition) Three[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2016 (in Chinese)
中国兽药典委员会. 《中华人民共和国兽药典》2015 版(三部)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016

[18] Zhu LQ, Sun Y, Liu YT, et al. Study on the application on the fermentation process for production of paratyphoid live vaccine in synthetic medium[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(3): 16-20 (in Chinese)
朱良全, 孙晔, 刘延亭, 等. 仔猪副伤寒活疫苗合成培养基发酵工艺应用研究[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(3): 16-20

[19] Hua ZZ. Freeze Drying Technology[M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese)
华泽钊. 冷冻干燥新技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006

[20] Zhao HG, Lin XC. Freeze Drying Technology[M]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 1990: 174-175 (in Chinese)
赵鹤皋, 林秀诚. 冷冻干燥技术[M]. 武汉: 华中理工大学出版社, 1990: 174-175

[21] Wang D, Wang LY, Xu ZQ. The freeze drying protective agent for live vaccine of livestock and poultry[J]. Agricultural Market Weekly, 2004(23): 9-10 (in Chinese)
王栋, 王利永, 徐中清. 畜禽活疫苗耐热冻干保护剂[J]. 农产品市场周刊, 2004(23): 9-10

[22] Zhao Y, Yu ZJ. A brief talk on the types and mechanism of heat protection agent for animal vaccine[J]. China Swine Industry, 2016(2): 38-42 (in Chinese)
赵燕, 喻正军. 浅谈动物疫苗耐热保护剂的种类及作用机理[J]. 中国猪业, 2016(2): 38-42

[23] Tan CJ, Meng YH. Research progress of heat resistant freeze drying protective agent for veterinary vaccine[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2011, 7(6): 16-18 (in Chinese)
谭长江, 孟宇航. 兽用疫苗耐热冻干保护剂的研究进展[J]. 中国畜禽种业, 2011, 7(6): 16-18

[24] Anchordoquy TJ, Carpenter JF. Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996, 332(2): 231-238

[25] Jennings TA. Lyophilization: Introduction and Basic Principles[M]. Denver, Colorado: Interpharm Press, 1999

[26] Li GW, Zheng CY, Tang B. Cryobiology[M] Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1998 (in Chinese)
李广武, 郑从义, 唐兵. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998