

研究报告

基于响应面法的高抗原活性禽多杀性巴氏杆菌疫苗培养基的研制与效果评价

刘翔^{#1,2}, 万强^{#3}, 苗森^{1,2}, 牛得权^{1,2}, 张阳阳², 蒋富凤³, 曲晓莹³, 张菊梅², 蔡芷荷³, 陈博³, 吴清平^{*1,2}

1 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东 广州 510070

3 广东环凯生物科技有限公司, 广东 肇庆 526238

刘翔, 万强, 苗森, 牛得权, 张阳阳, 蒋富凤, 曲晓莹, 张菊梅, 蔡芷荷, 陈博, 吴清平. 基于响应面法的高抗原活性禽多杀性巴氏杆菌疫苗培养基的研制与效果评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3515-3525.

LIU Xiang, WAN Qiang, MIAO Sen, NIU Dequan, ZHANG Yangyang, JIANG Fufeng, QU Xiaoying, ZHANG Jumei, CAI Zhihe, CHEN Bo, WU Qingping. Development and effect evaluation of the medium for a *Pasteurella multocida* vaccine with high antigenic activity based on response surface methodology[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3515-3525.

摘要:【背景】禽多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)引发的禽霍乱疫情造成了巨大的危害, 而现有培养基存在培养菌密度较低的问题。【目的】研制高抗原活性的禽多杀性巴氏杆菌疫苗培养基。【方法】通过单因素试验、Plackett-Burman 试验和响应面分析方法对禽多杀性巴氏杆菌培养基的成分进行调整, 并对不同发酵阶段的菌体进行免疫原性测定。最后使用该培养基培养细菌后制备疫苗并通过动物攻毒试验评价其保护效果。【结果】使用研制的培养基培养禽多杀性巴氏杆菌, 活菌密度能够在 6 h 达到约 1.84×10^{10} CFU/mL, 增菌效果是对照培养基的 2.6 倍; 免疫原性测定结果显示在生长平台期菌体的抗原活性最高; 攻毒试验表明制备的疫苗能够很好地抵抗禽多杀性巴氏杆菌的侵袭。【结论】研制出了高抗原活性的禽多杀性巴氏杆菌疫苗培养基, 为疫苗的生产奠定了基础。

关键词: 禽多杀性巴氏杆菌; 高抗原活性; 疫苗培养基; 响应面法

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFF1100700); 广东省重点研发计划(2022B1111070006); 广东省科学院创新发展专项(2020GDASYL-20200103031)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Key Research and Development Project of China (2022YFF1100700), the Guangdong Province Key Research and Development Project (2022B1111070006), and the Special Project for Innovation and Development of Guangdong Academy of Sciences (2020GDASYL-20200103031).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: wuqp203@163.com

Received: 2023-03-10; Accepted: 2023-04-16; Published online: 2023-05-18

Development and effect evaluation of the medium for a *Pasteurella multocida* vaccine with high antigenic activity based on response surface methodology

LIU Xiang^{#1,2}, WAN Qiang^{#3}, MIAO Sen^{1,2}, NIU Dequan^{1,2}, ZHANG Yangyang², JIANG Fufeng³, QU Xiaoying³, ZHANG Jumei², CAI Zhihe³, CHEN Bo³, WU Qingping^{*1,2}

1 School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, Anhui, China

2 Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Limited Company, Zhaoqing 526238, Guangdong, China

Abstract: **[Background]** The fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* causes great harm to the production, while the existing culture medium has the problem of low bacterial density. **[Objective]** To develop the medium for the preparation of a *P. multocida* vaccine with high antigenic activity. **[Methods]** Single factor experiment, Plackett-Burman design, and response surface methodology were employed to optimize the medium composition of *P. multocida*. Next, the immunogenicity of the bacteria in different fermentation phases was determined. Finally, the bacteria cultured in this medium were used to prepare the vaccine, the protective effect of which was evaluated by an animal challenge test. **[Results]** When the developed medium was used for the culture of *P. multocida*, the maximum viable count reached 1.84×10^{10} CFU/mL in 6 h, which was 2.6 times that of the control medium. The antigenic activity of the fermented product was the highest in the stationary phase. Challenge test showed that the vaccine prepared with this culture medium well resisted the infection of *P. multocida*. **[Conclusion]** We developed the medium for preparing a *P. multocida* vaccine with high antigenic activity, laying a foundation for vaccine production.

Keywords: *Pasteurella multocida*; high antigenic activity; vaccine medium; response surface methodology

家禽业是保障食品安全和居民生活的重要民生产业, 关乎着食品安全和人类健康。禽霍乱是由禽多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)引发的一种接触性传染病^[1], 受感染的禽类常呈现败血性症状, 发病率和死亡率很高, 给全球家禽业造成了重大的损失^[2-4]。长久以来, 抗生素治疗是防治家禽感染细菌性疾病的最主要方式, 但是此方法会导致病原菌对常用药物敏感性降低, 其体内的抗生素残留也会对人类健康

构成挑战^[5-7]。

接种疫苗已成为目前最安全有效的疾病防控手段^[8-9], 在保护动物的同时减少了抗生素的使用, 降低了产生超级细菌的安全隐患^[10-11], 但依旧存在成本高、保护效果参差不齐等问题。本试验通过单因素试验和响应面分析方法对培养基中各组分添加量进行调整^[12-13], 得到最適禽多杀性巴氏杆菌生长的培养基; 通过测定菌体生长过程中的抗原活性变化, 并以抗原活性

最高的菌体制备疫苗;最后通过攻毒试验评价了该疫苗的保护效果,以期为该培养基在制备禽多杀性巴氏杆菌疫苗上的使用提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

禽多杀性巴氏杆菌 C48-2 株由广东环凯生物科技有限公司提供;试验动物为 4-6 周龄、体重 18-25 g 的 BALB/c 雌性小鼠,购自广东斯嘉景达生物科技有限公司,广东省科学院微生物研究所伦理委员会伦理编号为 GT-IACUC202208101。

BHI 肉汤、马丁肉汤液体培养基、TSB 培养基、TSA 培养基、PBS 缓冲液、促生长肽由广东环凯生物科技有限公司提供;商品化疫苗购自辽宁益康生物公司;TMB 显色液、TMB 显色终止液购自上海碧云天生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、脱脂奶粉、BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;ELISA 包被液购自北京索莱宝科技有限公司。

振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;电热恒温培养箱,广东环凯生物科技有限公司;酶标仪,赛默飞世尔上海仪器有限公司;电子天平,常熟市双杰测试仪器厂;生物反应器,上海启为生物科技有限公司;II 级生物安全柜,北京东联哈尔仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种的保藏与复苏

在冻干菌株中加入灭菌生理盐水溶解后,用接种环取一环在 TSA 平板上划线,置于 37 °C 培养箱培养 16-20 h。挑取单菌落接入 10 mL BHI 肉汤中,37 °C、150 r/min 摇床中培养 6 h 后与 50%甘油 1:1 (体积比)混匀后装至冻存管于 -20 °C 保存。

挑取 TSA 平板上的单菌落接入 BHI 肉汤,

37 °C、150 r/min 摇床中培养 6 h 后作为试验用种子液。

1.2.2 初始培养基的确定

由于菌体生长主要受到碳源、氮源以及缓冲体系的影响,因此针对以上体系进行设计组合,使用设计的多种初始培养基分别培养菌株,比较其增菌效果,择优选择出初始培养基。

1.2.3 培养基单因素试验

以初筛后的培养基配方作为基础进行后续试验,对基础配方中的细菌学蛋白胨(A)、促生长肽(B)、酵母浸粉(C)、葡萄糖(D)、氯化钠(E)、磷酸氢二钾(F)、pH(G)、接种量(H)进行单因素试验。使用酶标仪的中速振荡模式测生长曲线:96 孔板中每孔加入 200 μL 混匀菌液,每组设置 3 个平行;37 °C 恒温培养,每小时测一次 OD₆₀₀ 值,连续振荡培养 10 h 以上,绘制不同条件下的细菌生长曲线。

1.2.4 Plackett-Burman (PB)试验筛选显著因素

采用 PB 试验设计方法对培养基各组分取高、低两水平来进行分析,通过比较各组分两水平之间的差异与整体的差异来确定各组分的显著性^[14]。根据单因素试验结果,选择细菌学蛋白胨(A)、促生长肽(B)、酵母浸粉(C)、葡萄糖(D)、氯化钠(E)和磷酸氢二钾(F)的添加量来设计 PB 试验,从中筛选出对菌体生长有显著性影响的因素。

1.2.5 最陡爬坡试验

为确定最佳响应值区域,需对 PB 试验筛选出的显著影响因素做最陡爬坡试验,设计各显著因素的爬坡方向及步长,试验结果可作为响应面分析的中心参考。

1.2.6 Box-Behnken (BB)响应面设计

响应面分析法研究多因素间的交互作用,预测该模型的最大响应值及其对应的条件^[15]。本试验结合 PB 试验中筛选出的显著因素以及

最陡爬坡试验确定的中心点,用 Design-Expert 8.0 软件进行设计分析,预测最适禽多杀性巴氏杆菌生长的培养基各组分添加量。

1.2.7 发酵验证

用 10 L 发酵罐模拟疫苗生产过程,分别对研制的禽多杀性疫苗培养基和对照马丁肉汤液体培养基进行发酵试验,每小时取发酵液测定 OD_{600} 并且使用涂布平板法统计活菌密度,计数平板选择 TSA 培养基,涂布后置于 37 °C 培养箱培养 16 h 后计数。试验共重复 3 个批次,结果取平均值。

1.2.8 不同生长阶段菌体抗原蛋白抗原性的测定

用 10 L 发酵罐发酵 C48-2 菌株,自发酵 3 h 起,每隔 1 h 取发酵液 100 mL,经 4 000 r/min 离心 10 min 后重悬,利用超声破碎仪在 300 W、37%功率的条件下,破碎 30 min (工作 5 s,间歇 10 s),收集上清蛋白用 BCA 法蛋白质浓度测定试剂盒测定浓度后,统一用包被液稀释至 10 μ g/L,设立 3 个平行,用免疫血清通过 ELISA 法测定其免疫反应的强弱来评估不同发酵阶段培养物的抗原性^[16]。

1.2.9 动物免疫保护试验

用研制的培养基培养菌株 C48-2,选取抗原活性最强时的细菌灭活制成疫苗^[17]。使用该疫苗进行动物免疫保护试验,并与市售商品化疫苗进行比较^[18-19]。选取适龄 BALB/c 小鼠,随机分成 4 组(每组 16 只):灭活疫苗组(PM)、商品化灭活疫苗组(SP)、攻毒对照组(PBS)、空白对照组,进行 2 次免疫,免疫后第 14 天每组任选 3 只采血用 ELISA 法测免疫效价,利用 SPSS 软件分析显著性。二次免疫后第 14 天对疫苗组和攻毒组小鼠分别注射 4 LD_{50} C48-2 活菌(2.19×10^3 CFU/只,预试验中用改良寇氏法测得),观察记录 7 d 内小鼠的临床症状和死亡情况^[20]。

1.3 统计与分析

本文中的试验数据均为 3 次平行取均值,利用 GraphPad Prism 9.1 进行单因素试验数据分析,Design-Expert 8.0 软件进行 PB 试验和响应面分析试验,SPSS 26.0 软件分析数据显著性。

2 结果与分析

2.1 初始培养基配方

经过多次重复试验,最终选择的初始培养基配方为细菌学蛋白胨 10 g/L、促生长肽 5 g/L、酵母浸粉 10 g/L、葡萄糖 4 g/L、氯化钠 5 g/L、磷酸氢二钾 2 g/L,并以此为基础开展后续试验。

2.2 单因素试验结果

结果如图 1 所示,禽多杀性巴氏杆菌的菌体密度分别在 pH 值 7.4,细菌学蛋白胨、促生长肽、酵母浸粉、葡萄糖、氯化钠、磷酸氢二钾的添加量分别为 10、5、15、3、7 和 2 g/L 时达到最高。接种量不影响禽多杀性巴氏杆菌的生长量(图 1H),但接种量太低会导致生长到稳定期的时间延后,综合考虑后选择接种量为 3% (体积分数)。

2.3 PB 试验筛选结果

根据单因素试验结果,用 Design-Expert 软件设计 PB 试验,对细菌学蛋白胨(A)、促生长肽(B)、酵母浸粉(C)、葡萄糖(D)、氯化钠(E)和磷酸氢二钾(F)这 6 个因素设置高低 2 个水平,用于筛选出对禽多杀性巴氏杆菌生长影响显著的因素。试验设计的因素及水平见表 1,设计的 PB 试验组合 1-12 如表 2 所示。根据表 2 对培养基进行配制、接种,在酶标仪中速振荡模式下测定生长曲线,设立 3 个平行,以菌体密度 OD_{600} 的均值作为响应值,对数据进行分析,结果如表 3 所示。

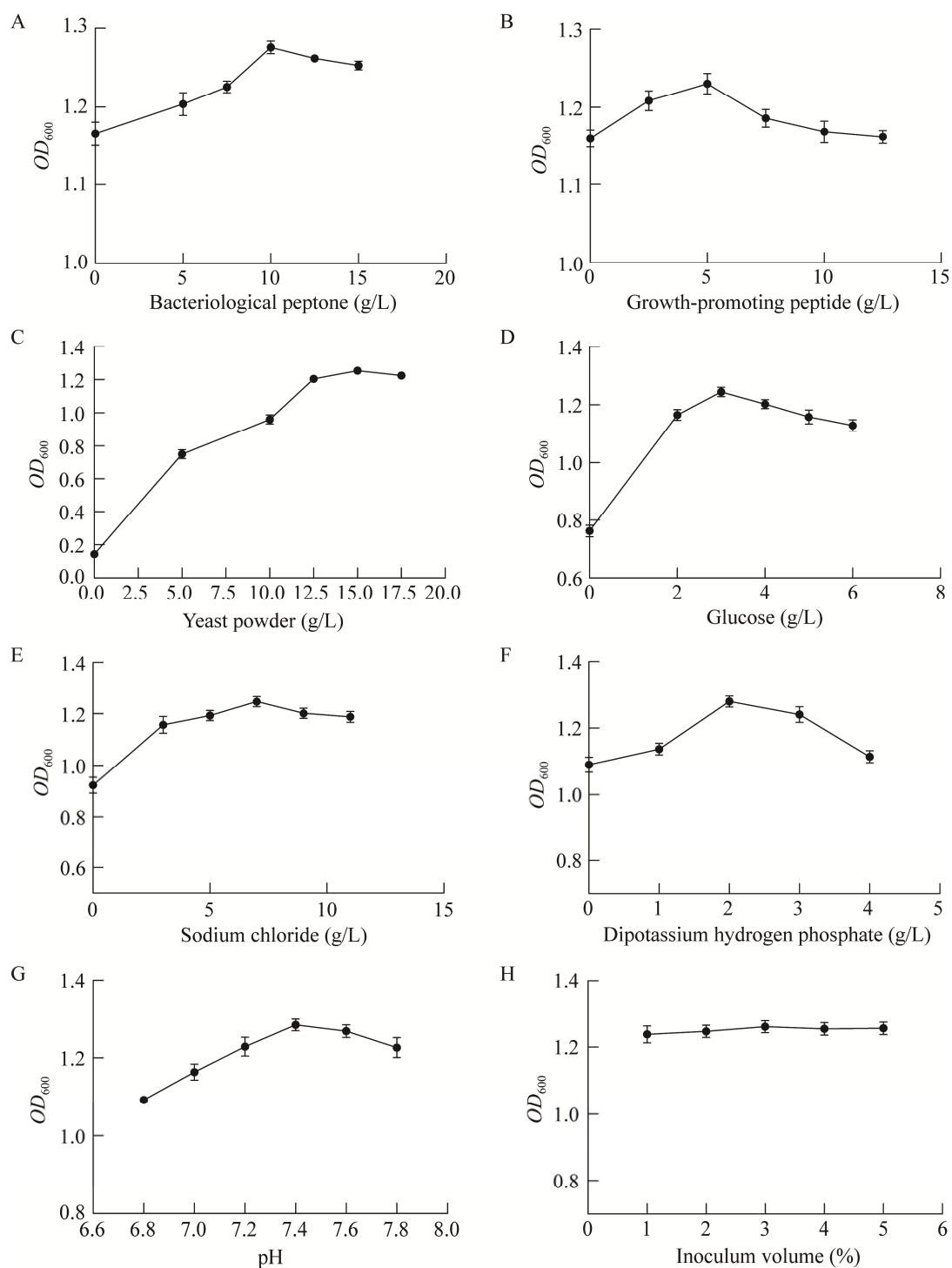


图 1 单因素试验结果 A: 细菌学蛋白胨. B: 促生长肽. C: 酵母浸粉. D: 葡萄糖. E: 氯化钠. F: 磷酸氢二钾. G: pH. H: 接种量

Figure 1 Results of single factor experiment. A: Bacteriological peptone. B: Growth-promoting peptide. C: Yeast powder. D: Glucose. E: Sodium chloride. F: Dipotassium hydrogen phosphate. G: pH. H: Inoculum volume.

表 1 PB 试验设计的因素水平

Table 1 Factor level of Plackett-Burman design

因素 Factors	水平 Level (g/L)	
	-1	1
A	10	12.50
B	5	6.25
C	15	18.75
D	3	3.75
E	7	8.75
F	2	2.50

A: 细菌学蛋白胨; B: 促生长肽; C: 酵母浸粉; D: 葡萄糖; E: 氯化钠; F: 磷酸氢二钾. 下同

A: Bacteriological peptone; B: Growth-promoting peptide; C: Yeast powder; D: Glucose; E: Sodium chloride; F: Dipotassium hydrogen phosphate. The same below.

表 2 PB 试验设计结果

Table 2 Results of Plackett-Burman design

Run	A	B	C	D	E	F	Result (OD_{600})
1	-1	1	1	1	-1	-1	1.272
2	1	1	-1	-1	-1	1	1.191
3	-1	-1	1	-1	1	1	1.136
4	-1	1	-1	1	1	-1	1.238
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.155
6	-1	1	1	-1	1	1	1.195
7	1	-1	1	1	-1	1	1.212
8	1	1	-1	1	1	1	1.217
9	1	-1	-1	-1	1	-1	1.136
10	1	-1	1	1	1	-1	1.274
11	1	1	1	-1	-1	-1	1.219
12	-1	-1	-1	1	-1	1	1.121

表 3 PB 试验的结果分析

Table 3 Analysis of variance for the Plackett-Burman experiment

Item	SS	MS	F	P	系数估计 Estimate of coefficient
Model	0.026 0	0.004 3	6.08	0.033 2	0.033 2
A	0.001 5	0.001 5	2.05	0.211 6	0.211 6
B	0.007 4	0.007 4	10.50	0.023 1	0.023 1
C	0.005 2	0.005 2	7.40	0.042 2	0.042 2
D	0.007 6	0.007 6	10.80	0.022 1	0.022 1
E	0.000 1	0.000 1	0.10	0.789 2	0.789 2
F	0.004 1	0.004 1	5.80	0.061 0	0.061 0

由分析结果可知, 该模型有意义($F=6.28$, $P<0.05$)。其中的促生长肽、酵母浸粉、葡萄糖对禽多杀性巴氏杆菌的生长具有显著影响($P<0.05$), 且系数估计都为正值说明均为正相关。因此选择促生长肽(X_1)、酵母浸粉(X_2)和葡萄糖(X_3)这 3 个因素进行后续的最陡爬坡试验和响应面试验。其余因素差异不显著($P>0.05$), 在后续试验中保持其原有水平。

2.4 最陡爬坡试验

根据 PB 试验结果可知, 促生长肽(X_1)、酵母浸粉(X_2)和葡萄糖(X_3)的添加量与菌体密度呈正相关作用, 所以爬坡方向均为上, 据此设计的最陡爬坡试验组合 1-6 与试验结果见表 4。比较响应值的大小, 发现编号 4 组合的响应值最高, 选择编号 4 的添加量作为后续响应面试验的中心。

2.5 BBD 响应面试验设计及结果

根据 PB 试验和最陡爬坡试验结果, 使用 Design-Expert 8.0 软件进行响应面设计与分析, 其中低、中、高值如表 5 所示, 设计的方案组合 1-17 及试验结果如表 6 所示。分析所得菌体密度响应值(Y)与促生长肽(X_1)、酵母浸粉(X_2)和葡萄糖(X_3)添加量的关系如方程所示: $Y=1.33-0.006X_1+0.031X_2-0.050X_3+0.002X_1X_2+0.012X_1X_3+0.024X_2X_3-0.096X_1^2-0.083X_2^2-0.079X_3^2$ 。响应面拟合回归方程的方差分析结果见表 7。

表 4 最陡爬坡试验设计结果

Table 4 Design of the steepest ascent experiment and the results

No.	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3 (g/L)	Result (OD_{600})
1	3	14.75	2.75	1.182
2	4	16.75	3.25	1.151
3	5	18.75	3.75	1.236
4	6	20.75	4.25	1.288
5	7	22.75	4.75	1.195
6	8	24.75	5.25	1.121

表 5 响应面设计因素和水平表

Table 5 Factor of response surface design and level table

因素 Factor	水平 Level (g/L)		
	-1	0	1
X_1	5.00	6.00	7.00
X_2	18.75	20.75	22.75
X_3	3.25	4.25	5.25

表 6 响应面设计及结果

Table 6 Response surface design and the results

Run	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3 (g/L)	Result (OD_{600})
1	1	-1	0	1.123
2	-1	-1	0	1.131
3	0	0	0	1.342
4	-1	0	1	1.091
5	0	1	-1	1.223
6	0	0	0	1.323
7	0	-1	-1	1.199
8	1	0	1	1.103
9	-1	0	-1	1.234
10	-1	1	0	1.187
11	0	0	0	1.334
12	0	-1	1	1.070
13	0	0	0	1.326
14	1	0	-1	1.199
15	0	0	0	1.334
16	0	1	1	1.190
17	1	1	0	1.170

表 7 响应面试验的方差分析

Table 7 Analysis of variance for response surface experiment

项 Item	SS	DF	MS	F	P
Model	0.140 0	9	0.015 0	89.59	<0.000 1
X_1	0.000 3	1	0.000 3	1.61	0.244 4
X_2	0.007 6	1	0.007 6	45.18	0.000 3
X_3	0.020 0	1	0.020 0	119.14	<0.000 1
X_1X_2	0.000 1	1	0.000 1	0.12	0.741 5
X_1X_3	0.000 6	1	0.000 6	3.38	0.108 4
X_2X_3	0.002 3	1	0.002 3	13.42	0.008 0
X_1^2	0.039 0	1	0.039 0	232.42	<0.000 1
X_2^2	0.029 0	1	0.029 0	170.50	<0.000 1
X_3^2	0.026 0	1	0.026 0	155.55	<0.000 1
残差 Residual	0.001 2	7	0.000 2		
失拟项 Lack of fit	0.001 0	3	0.000 3	5.63	0.064 1

由表 7 方差分析结果可知: 对于单个因素来说, 酵母浸粉、葡萄糖对菌体生长的影响均极显著($P<0.01$), 各因素的影响程度为 $X_3>X_2>X_1$; 对于两个因素间的交互作用来说, 酵母浸粉和葡萄糖的交互作用对菌体生长的影响极显著($P<0.01$), 其他则为不显著($P>0.05$); 对于模型的二次项来说, 这 3 个因素的作用均极显著($P<0.01$)。

不同因素之间的交互作用以等高线和等高图呈现, Design-Expert 8.0 绘制的结果见图 2-图 4,

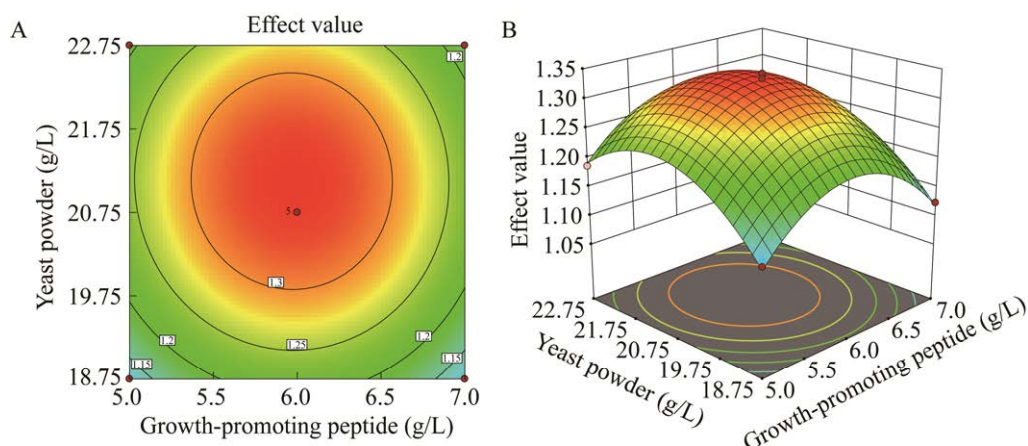


图 2 促生长肽与酵母浸粉交互作用对菌生长的影响

Figure 2 Effect of interaction between growth promoting peptide and yeast powder on bacterial growth. A: Contour. B: 3D surface.

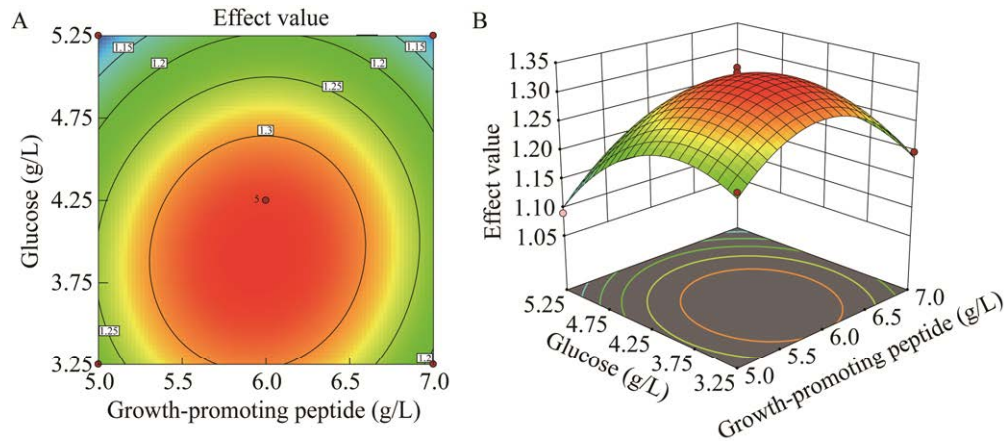


图3 促生长肽与葡萄糖交互作用对菌生长的影响

Figure 3 Effect of interaction between growth promoting peptide and glucose on bacterial growth. A: Contour. B: 3D surface.

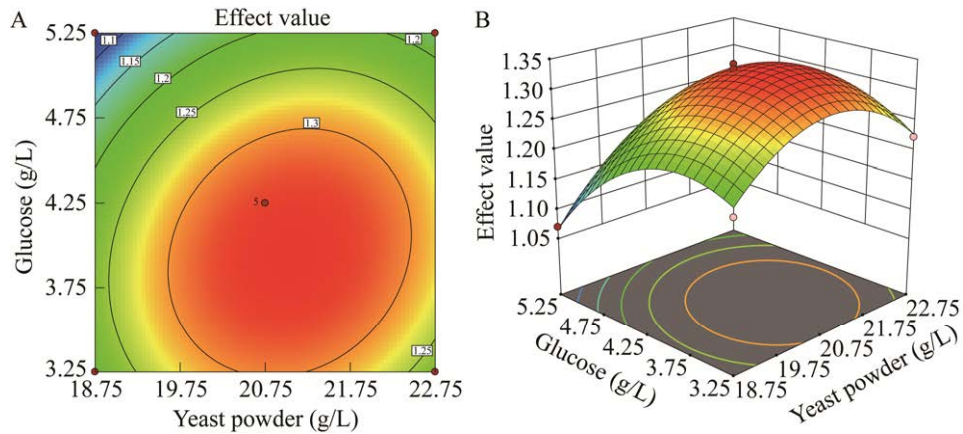


图4 酵母浸粉与葡萄糖交互作用对菌生长的影响

Figure 4 Effect of interaction between yeast powder and glucose on bacterial growth. A: Contour. B: 3D surface.

等高线越近似椭圆，则交互作用越显著^[14]。由于图2-图4中的响应面图均为开口向下，因此响应值应存在最大值^[15]。通过对禽多杀性巴氏杆菌菌体密度回归方程求一阶偏导数可得最大值，得到的最佳条件为：促生长肽添加量为5.95 g/L，酵母浸粉添加量为21.04 g/L，葡萄糖添加量为3.95 g/L。在此条件下模型预测的 OD_{600} 为1.341。经过多次试验重复验证后得到的结果为1.334，

与预测值接近。因此该模型可以准确地预测禽多杀性巴氏杆菌的生长情况。

2.6 发酵罐验证

经过多次发酵试验后，发现在发酵前3 h内通气量为2 L/min、转速150 r/min，以及3 h后通气量增加为5 L/min、转速为250 r/min时菌体的生长效果最好。在此发酵条件下对研制的疫苗培养基和对照培养基进行比较分析，结

果如表 8 所示。结果显示: 开始发酵后, 菌体密度快速增加, 进入对数生长期, 疫苗培养基发酵 6 h 左右到达稳定期, 活菌数最高为 1.84×10^{10} CFU/mL; 对照培养基发酵 7 h 左右到达稳定期, 活菌数最高为 7.05×10^9 CFU/mL。表明研制的疫苗培养基到达稳定期的时间要早于对照培养基, 其增菌效果也优于对照培养基, 为对照培养基的 2.6 倍。

2.7 不同生长阶段菌体抗原蛋白抗原性的测定结果

测得不同发酵阶段的抗原结果如图 5 所示, 结果显示在对数生长期时, 菌体抗原蛋白的抗原性相对较弱, 到稳定期后, 菌体抗原蛋白的抗原性达到最高, 且与对数生长期差异显著 ($P < 0.05$), 并在后续阶段基本保持稳定。因此, 在使用该培养基制备禽多杀性巴氏杆菌疫苗时, 达到稳定期即接种培养 6 h 后可收菌, 此时的抗原性和菌体密度都达到顶峰, 制备的疫苗保护效果好且成本低。

表 8 疫苗培养基与对照培养基发酵结果

Table 8 Fermentation results of vaccine medium and control medium

Time (h)	Vaccine medium		Control medium	
	OD_{600}	菌体密度 Cell density (CFU/mL)	OD_{600}	菌体密度 Cell density (CFU/mL)
0	0.103	2.28×10^8 ^f	0.123	2.25×10^8 ^h
2	0.487	2.21×10^9 ^e	0.387	1.33×10^9 ^g
3	0.880	6.70×10^9 ^d	0.598	3.35×10^9 ^f
4	1.055	1.17×10^{10} ^c	0.684	4.05×10^9 ^e
5	1.123	1.49×10^{10} ^b	0.931	5.25×10^9 ^d
6	1.265	1.84×10^{10} ^a	0.979	5.85×10^9 ^c
7	1.290	1.75×10^{10} ^a	1.124	7.05×10^9 ^a
8	1.329	1.55×10^{10} ^b	1.121	6.55×10^9 ^b
9	1.326	1.28×10^{10} ^c	1.143	6.45×10^9 ^b

表中数据为 3 批次发酵数据的平均值, 不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

The data in the table is the average of the three batches of data, different lowercase indicate significant difference.

2.8 动物免疫保护试验结果

两次免疫分别测得的效价结果如图 6 所示, 发现疫苗培养基组(PM)的血清效价显著高于市售疫苗组(SP) ($P < 0.05$)。免疫后的攻毒保护率如表 9 所示, 发现疫苗培养基组(PM)的攻毒保护率优于市售疫苗组(SP)。

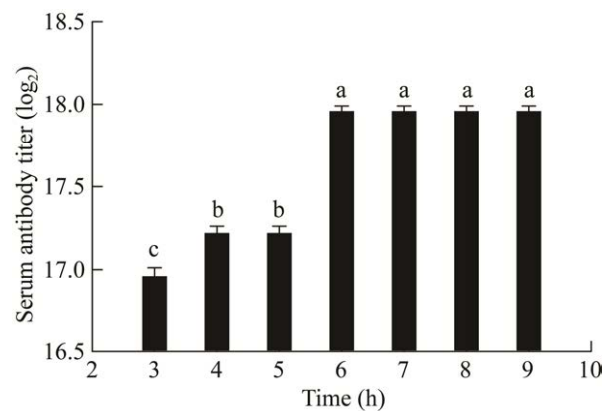


图 5 不同生长阶段菌体抗原蛋白抗原性的测定结果 不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 5 Results of immunogenicity of thallus antigen proteins at different growth stages. Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

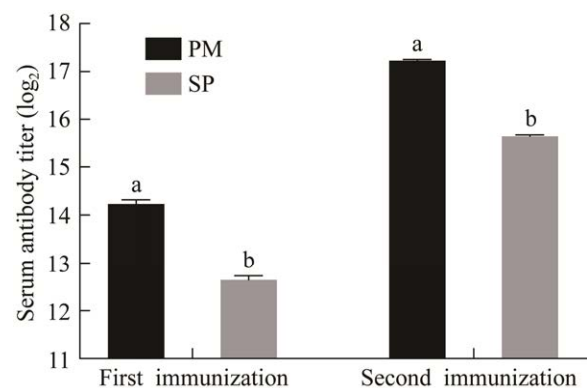


图 6 小鼠血清 IgG 抗体效价的测定结果 不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 6 The results of IgG antibody titer in mice serum. Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

表 9 疫苗攻毒保护试验结果

Table 9 Test results of vaccination immunization challenge protection

Groups	存活数 Survival number	免疫保护率 Immune protective rate (%)
PM	8/8	100
SP	6/8	75
PBS	0/8	0

3 讨论与结论

为了缓解病原菌的耐药性问题^[21],降低抗生素带来的风险,接种疫苗已经成了目前最经济有效的防控手段^[22]。在疫苗的生产过程中,一个合适的培养基能够极大地提高制苗菌的发酵密度,因此,研制能高密度培养菌株的疫苗培养基就成了降低疫苗成本的关键。本试验通过单因素试验、PB 试验和响应面分析方法对培养基的各组分进行调整优化,得到最适禽多杀性巴氏杆菌生长的培养基组分为:细菌学蛋白胨 10 g/L,促生长肽 5.95 g/L,酵母浸粉 21.04 g/L,葡萄糖 3.95 g/L,氯化钠 7 g/L,磷酸氢二钾 2 g/L。发酵试验证明用研制的疫苗培养基发酵禽多杀性巴氏杆菌,菌体密度能够在 6 h 达到约 1.84×10^{10} CFU/mL,是对照培养基的增菌效果的 2.6 倍,极大地提高了菌体密度,降低了疫苗生产成本。

目前,疫苗的种类已有多种形式,但灭活疫苗依旧是最方便有效的一种方式^[23],制苗企业在制备灭活疫苗时为降低生产成本,一般选择菌体密度到达峰值时收集菌体。然而有研究表明,病原菌在生长的不同阶段所表达的抗原蛋白种类及表达量均有所不同^[24],这就导致了在不同发酵阶段制备的疫苗产品保护效果也会有所差别。因此在疫苗生产过程中需要对制苗菌株不同生长阶段的抗原性进行探究,确保在菌株抗原活性最强时制备疫苗,提高疫苗的保护效果。本试验测定了禽多杀性巴氏杆菌不同生长阶段的抗原活性,发现在生长平台期时,

菌体的抗原活性达到最高,用此时的菌体制成疫苗后,通过动物免疫试验确定了用该培养基制成的疫苗能抵抗病原菌的侵袭,说明此时制备的疫苗经济效益高、抗原活性好,能够为后续疫苗生产提供指导。

REFERENCES

- [1] ASFAW YT, AMENI G, MEDHIN G, GUMI B, HAGOS Y, WIELAND B. Poultry disease occurrences and their impacts in Ethiopia[J]. *Tropical Animal Health and Production*, 2021, 53(1): 54.
- [2] OMALEKI L, BLACKALL PJ, CUDDIHY T, BEATSON SA, FORDE BM, TURNI C. Using genomics to understand inter-and intra-outbreak diversity of *Pasteurella multocida* isolates associated with fowl cholera in meat chickens[J]. *Microbial Genomics*, 2020, 6(3): e000346.
- [3] 高家登, 扎西达瓦, 曲久, 强巴贡桑. 多杀性巴氏杆菌病的研究[J]. *中国畜禽种业*, 2017, 13(9): 35-37. GAO JD, ZHA XDW, QU J, QIANG BGS. Study on *Pasteurella multocida*[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2017, 13(9): 35-37 (in Chinese).
- [4] LI P, HE F, WU CL, ZHAO GF, HARDWIDGE PR, LI NZ, PENG YY. Transcriptomic analysis of chicken lungs infected with avian and bovine *Pasteurella multocida* serotype A[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 452.
- [5] CASTRO-VARGAS RE, HERRERA-SÁNCHEZ MP, RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ R, RONDÓN-BARRAGÁN IS. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: a global overview[J]. *Veterinary World*, 2020, 13(10): 2070-2084.
- [6] JIAN ZH, ZENG L, XU TJ, SUN S, YAN SX, YANG L, HUANG Y, JIA JJ, DOU TF. Antibiotic resistance genes in bacteria: occurrence, spread, and control[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(12): 1049-1070.
- [7] 严专强, 麦凯杰, 罗翠芬, 周祺, 杨德鸿, 申翰钦, 周庆丰. 我国部分地区禽多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药情况分析[J]. *家禽科学*, 2021(11): 45-49. YAN ZQ, MAI KJ, LUO CF, ZHOU Q, YANG DH, SHEN HQ, ZHOU QF. Identification and drug resistance of *Pasteurella multocida* in China[J]. *Poultry Science*, 2021(11): 45-49 (in Chinese).
- [8] 周成利. 鸡巴氏杆菌病的流行病学、临床特征、诊断和防控措施[J]. *现代畜牧科技*, 2021(9): 159-160. ZHOU CL. Epidemiology, clinical characteristics, diagnosis and control measures of chicken

- Pasteurellosis*[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2021(9): 159-160 (in Chinese).
- [9] MONTANER-TARBES S, FRAILE L, MONTOYA M, del PORTILLO H. Exosome-based vaccines: pros and cons in the world of animal health[J]. Viruses, 2021, 13(8): 1499.
- [10] 田宇杰, 李婷, 代国滔, 蒲龄, 张亚楠, 袁超, 杨茂生, 陈强, 李美娟, 徐景峨. A: L1 型鸭源多杀性巴氏杆菌灭活疫苗制备及免疫效力研究[J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49(7): 2716-2724.
- TIAN YJ, LI T, DAI GT, PU L, ZHANG YN, YUAN C, YANG MS, CHEN Q, LI MJ, XU JING'E. Preparation and immunological study of inactivated vaccine of type A: L1 *Pasteurella multocida* from ducks[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(7): 2716-2724 (in Chinese).
- [11] PEGU H, TAMULY S, SHARMA RK, BORAH P, NATH R. Immunopotential of *Pasteurella multocida* bivalent outer membrane protein-based vaccine entrapped in aluminum hydroxide nanoparticles[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2022, 53(4): 2299-2307.
- [12] OSLAN SNH, TAN JS, YUSOFF AH, SULAIMAN AZ, AWANG MA, LAZIM AM, LIM SJ, OSLAN SN, SAAD MZ, ARIFF AB. *Pasteurellosis* vaccine commercialization: physiochemical factors for optimum production[J]. Processes, 2022, 10(7): 1248.
- [13] YU HS, LEE NK, KIM WJ, LEE DU, KIM JH, PAIK HD. Optimization of an industrial medium and culture conditions for probiotic *Weissella cibaria* JW15 biomass using the plackett-burman design and response surface methodology[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2022, 32(5): 630-637.
- [14] DU RP, PEI FY, KANG J, ZHANG W, PING WX, LING HZ, GE JP. Optimization of cultivation strategy and medium for bacteriocin activity of *Enterococcus faecium* HDX-2[J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022, 52(7): 762-769.
- [15] FENG T, ZHAO J, CHU J, WANG YH, ZHUANG YP. Statistical optimizing of medium for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* using response surface methodology[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(12): 3936-3948.
- [16] QASIM MT, MAHDI MOHAMMED ALAKKAM E, MAHDI MOHAMMED M, HACHIM SK, SABAH JABR H, EMAD IZZAT S, MOHAMMED K, HAMOOD SA, SHNAIN ALI M, NAJD OBAID F, MOHSIN AL-DHALEMI D. Ovine pasteurellosis vaccine: assessment of the protective antibody titer and recognition of the prevailing serotypes[J]. Archives of Razi Institute, 2022, 77(3): 1207-1210.
- [17] MOSTAAN S, GHASEMZADEH A, SARDARI S, SHOKRGOZAR MA, NIKBAKHT BRUJENI G, ABOLHASSANI M, EHSANI P, ASADI KARAM MR. *Pasteurella multocida* vaccine candidates: a systematic review[J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2020, 12(3): 140-147.
- [18] 刘吉山, 沈志强, 王艳, 林初文, 李峰, 赵蕾, 刘万成. 应用小白鼠代替鸡对禽霍乱蜂胶灭活疫苗进行效检的研究[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(6): 7-9.
- LIU JS, SHEN ZQ, WANG Y, LIN CW, LI F, ZHAO L, LIU WC. Studies on the efficacy of inactivated propolis fowl cholera vaccines with mice instead of chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2004, 38(6): 7-9 (in Chinese).
- [19] 牛明福, 宫强, 秦翠丽, 孙晓菲, 王帅涛, 程铭. 禽多杀性巴氏杆菌 ompa DNA 疫苗在小鼠体内免疫效果试验[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(6): 799-803.
- NIU MF, GONG Q, QIN CL, SUN XF, WANG ST, CHENG M. Immune efficacy of ompa DNA vaccine from avian *Pasteurella multocida* in mice[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(6): 799-803 (in Chinese).
- [20] 祝可心, 于栋, 安家慧, 李玉峰. 副猪嗜血杆菌抗原抗体复合物疫苗对小鼠免疫保护效果的评价[J]. 中国兽医科学, 2021, 51(8): 1015-1022.
- ZHU KX, YU D, AN JH, LI YF. Evaluation of immune protection effect of *Haemophilus parasuis* antigen-antibody complex vaccine in mice[J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(8): 1015-1022 (in Chinese).
- [21] 程兆康, 杨金山, 吕敏, 罗小三. 我国畜禽养殖业抗生素的使用特征及其环境与健康风险[J]. 农业资源与环境学报, 2022, 39(6): 1253-1262.
- CHENG ZK, YANG JS, LÜ M, LUO XS. Antibiotics used in livestock and poultry breeding and its environmental and health risks in China: a review[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2022, 39(6): 1253-1262 (in Chinese).
- [22] GABUTTI G. Available evidence and potential for vaccines for reduction in antibiotic prescriptions[J]. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 2022, 18(7): 2151291.
- [23] GHADIMIPOUR R, GHORBANPOOR M, GHARIBI D, MAYAHI M, JABBARY AR. Effects of selected adjuvants on immunogenicity and protectivity of *Pasteurella multocida* bacterin vaccine in chickens[J]. Archives of Razi Institute, 2021, 76(4): 741-749.
- [24] ENANY S, ATO M, MATSUMOTO S. Differential protein expression in exponential and stationary growth phases of *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis 104[J]. Molecules, 2021, 26(2): 305.