

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.01.009

邹安龙, 吕红, 吴婵玉, 等. 伪结核棒状杆菌灭活苗对山羊的免疫效果评价 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(1): 104-111.

伪结核棒状杆菌灭活苗对山羊的免疫效果评价

邹安龙, 吕红, 吴婵玉, 李鑫灿,
宋艳, 钱虹宇, 王芝英, 周作勇

西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 伪结核棒状杆菌(Cp)是羊体表脓肿及干酪样淋巴结炎(CLA)的重要病原, 接种疫苗是防控 Cp 感染致病最有效的手段之一。以 Cp 万州株(WZ)作为疫苗株, 甲醛为灭活剂, ISA 201 VG 为佐剂制备灭活苗, 对山羊进行免疫, 首免后 28 d 进行二免, 二免后 30 d 以 WZ 株攻毒, 连续观察 65 d。通过检测免疫和攻毒山羊的增质量、体温、血常规、血清免疫球蛋白 G(IgG)水平、淋巴结肿大数量及载菌量等, 综合评价 Cp 灭活苗的免疫保护效果。结果显示: 与对照组相比, 受免山羊血清 IgG 抗体在首免后第 3、4 周和二免后第 2~4 周均显著升高, 且二免 IgG 抗体明显高于首免。攻毒发现, 对照组山羊体温在攻毒后 7 d 内均高于免疫组, 攻毒后 1~8 周内对照组山羊增质量均低于免疫组, 且免疫组山羊脓肿数量及 Cp 数均明显少于对照组, 提示该灭活苗免疫可缓解因 Cp 感染引起的山羊体质量下降及体温升高, 减少 Cp 攻毒引起的脓肿数量和淋巴结 Cp 载菌量。综合表明: 所制备 Cp 灭活苗可提高山羊的免疫水平, 对该病原感染具有较好的保护作用。

关键词: 伪结核棒状杆菌; 灭活苗; 山羊; 免疫效果

中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2025)01-0104-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Evaluation of Immune Effect of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Inactivated Vaccine on Goats

ZOU Anlong, LYU Hong, WU Chanyu, LI Xincan,
SONG Yan, QIAN Hongyu, WANG Zhiying, ZHOU Zuoyong

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Cp) is an important pathogen responsible for surface abscesses and caseous lymphadenitis (CLA) of goats, and vaccination is one of the most effective methods to prevent and control Cp infection. In this study, Cp Wanzhou strain (WZ) was used as the vaccine candidate, formaldehyde as the inactivating agent, and ISA 201 VG as the adjuvant to prepare an inactivated

收稿日期: 2023-11-09

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2021jcyj-msxmX0884); 重庆市技术创新与应用示范项目(cstc2018jscx-msybX0216)。

作者简介: 邹安龙, 硕士研究生, 主要从事兽医传染病防治研究。

通信作者: 周作勇, 博士, 副教授。

vaccine. The goats were immunized with Cp vaccine for twice with 28 d interval, and were challenged with Cp WZ at 30th days after the second immunization. The goats were continuously observed for 65 d. The immunoprotective effect were evaluate by detecting the weight gain, temperature, routine blood, serum IgG levels, the number of lymph node abscesses and the bacterial load in the goats. The results showed that compared with the control group, the serum IgG antibodies of the immunized goats significantly increased at the 3rd and 4th weeks after the first immunization and 2—4 weeks after the 2nd immunization, and the IgG antibodies of the 2nd immunization were significantly higher than those of the 1st immunization. The temperature of goats in control was higher than that of the immuned goats within 7 days after the challenge. The weight gain of goats in control was lower than that of the immuned ones within 1—8 weeks, and the number of abscesses and Cp in the immuned goat group were significantly lower than that of the control. The above results suggested that inactivated vaccine immunization could alleviate the weight loss and the body temperature increase caused by Cp infection in goats, reduce the number of abscesses and Cp bacterial load in lymph node caused by Cp infection. In summary, the prepared Cp inactivated vaccine could improve the immune level of goats and had a good protective effect against Cp infection.

Key words: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; inactivated vaccine; goats; immune effect

伪结核棒状杆菌(*Corynebacterium pseudotuberculosis*, Cp)感染可引起小反刍动物山羊和绵羊干酪样淋巴结炎(CLA)和体表淋巴结脓肿,这是世界范围内引起养羊业经济损失的一种重要慢性传染病^[1]。Cp 感染山羊和绵羊不易直接造成死亡,危害具有隐蔽性,易被养殖者忽视,这些危害主要包括:生产性能下降、体表或内脏器官形成脓肿及干酪样病变,以及作为人畜共患病病原具有传播给人的潜在风险等。近年来,我国关于山羊和绵羊受 Cp 感染的报道不断增多,重庆^[2]、四川^[3]、云南^[4]、陕西^[5-6]、甘肃^[6]、湖南^[7]、福建^[8]等多个省市均有该病原感染的报道,所检测脓肿样本中 Cp 分离率有的高达 100%,因此,在羊场中急需探索一种有效防控 Cp 的方法,以降低或消除其感染造成的经济损失。在防治 Cp 感染致病的方法中,因手术排脓治疗过程繁琐且易造成污染,而抗生素等化学药物治疗存在药物不易进入脓肿部位、疗效差等问题,因此接种疫苗成为防控该病原感染的最佳手段^[1]。本研究以前期筛选出 Cp 万州株(WZ)为制苗菌株^[9],以 ISA 201 VG 为佐剂制备灭活苗,对山羊进行免疫接种及攻毒评价试验,旨在为 Cp 疫苗研究提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株、试验动物及主要试剂

Cp 万州株(WZ)由西南大学动物传染病防控技术研究室分离鉴定和保存。4 月龄雄性大足黑山羊,重庆市大足区腾达牧业有限公司;ISA 201 VG 佐剂,Seppic;ELISA 包被液,索莱宝科技有限公司;过氧化酶标记兔抗山羊抗体,Proteintech;改良马丁液体培养基,青岛高科园海博生物技术有限公司;胎牛血清(FBS),Biological Industries。

1.2 Cp 灭活苗的制备与检验

挑取 Cp 万州株(WZ)单菌落加入含 10% FBS 的马丁肉汤中培养 24 h,按 1:20 扩培至 300 mL 马丁肉汤(含 0.5%吐温 80 和 10% FBS),培养 24 h。稀释涂板计数后,将菌液用 0.4%的甲醛灭活,4 500 r/min 离心 15 min,取培养上清用真空冷冻干燥机冻干浓缩,并与菌体混合,使菌体浓度达到 1×10^{10} CFU/mL。将灭菌的 ISA 201 VG 佐剂与菌液按体积比 54:46(油相:水相)配制乳化,制备 Cp 灭活苗备用。

1.3 山羊分组、免疫及攻毒处理

将 Cp 感染抗体检测阴性的 6 头黑山羊随机分为 2 组,每组 3 头。采取颈背部皮下注射免疫方法进行 2 次免疫,首免(1 mL/头)后 28 d 二免(2 mL/头),对照组在同样位置注射灭菌生理盐水。二免后 30 d 进行攻毒,连续观察 65 d。免疫期间及攻毒后每周称体质量、首免及攻毒后 7 d 每天连续测量肛温,每周静脉采血检测血清抗体水平,二免后 21、28 d 和攻毒后 7、14 d 采血测血常规。

1.4 免疫山羊血常规及血清抗体水平检测

利用全自动血液细胞分析仪测量山羊的血常规。参照文献[9-10],准备 ELISA 包被用的 Cp 菌体和重组磷脂酶 D 蛋白(rPLD),将待检血清稀释 512 倍后,分别以 Cp 菌体和 rPLD 包被 ELISA 板,采用间接 ELISA 方法测定山羊血清 IgG 抗体水平以及抗 PLD 抗体水平。

1.5 免疫山羊攻毒保护评价

二免后 30 d,每只山羊以 Cp 万州株(WZ)进行皮下攻毒(4×10^6 CFU/ mL,不含菌液上清),在左侧前、后肢皮下 2 个不同部位分别注射 0.5 mL。攻毒后每天观察山羊的精神状态,7 d 内每天测量肛温,然后每周测量肛温并称体质量。攻毒后 65 d 处死山羊,解剖观察各个脏器及浅表淋巴结(下颌淋巴结、颈浅淋巴结、髂下淋巴结、膈淋巴结、髻淋巴结、腹股沟淋巴结、肠系膜淋巴结)大体病变及脓肿情况。分别采集淋巴结(除髻淋巴结及膈淋巴结分别取 0.05 g 及 0.1 g 外,其余每个部位的淋巴结取 0.25 g)、内脏器官(肝脏、脾脏、肾脏、肺脏取 1.5 g)和攻毒部位脓肿(取 0.1 g)加入 1.5 mL 灭菌生理盐水中,匀浆后涂布于 5% 鲜兔血琼脂平板,37 °C 培养 48 h 进行活菌计数。

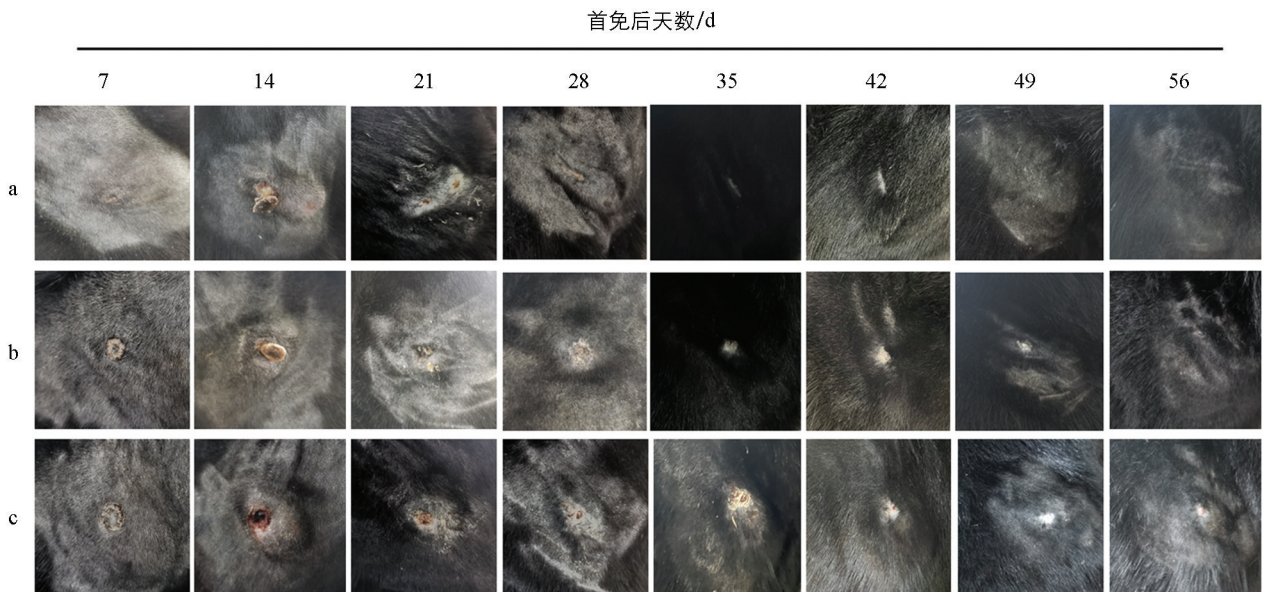
1.6 数据分析

所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad Prism 8.0.1 分析数据,采用 *t* 检验分析差异的显著性, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 皮下注射 Cp 灭活苗对注射部位的影响

对山羊皮下注射含 ISA 201 VG 佐剂的 Cp 灭活苗,在注射后第 7 d 发现注射部位有皮肤破溃的迹象,在注射疫苗后 14 d,发现注射部位有明显的皮肤破溃,在注射后 21 d,注射部位破溃有明显恢复,到注射疫苗后第 49~56 d,基本上完全恢复(图 1),而对照组注射部位无明显变化。

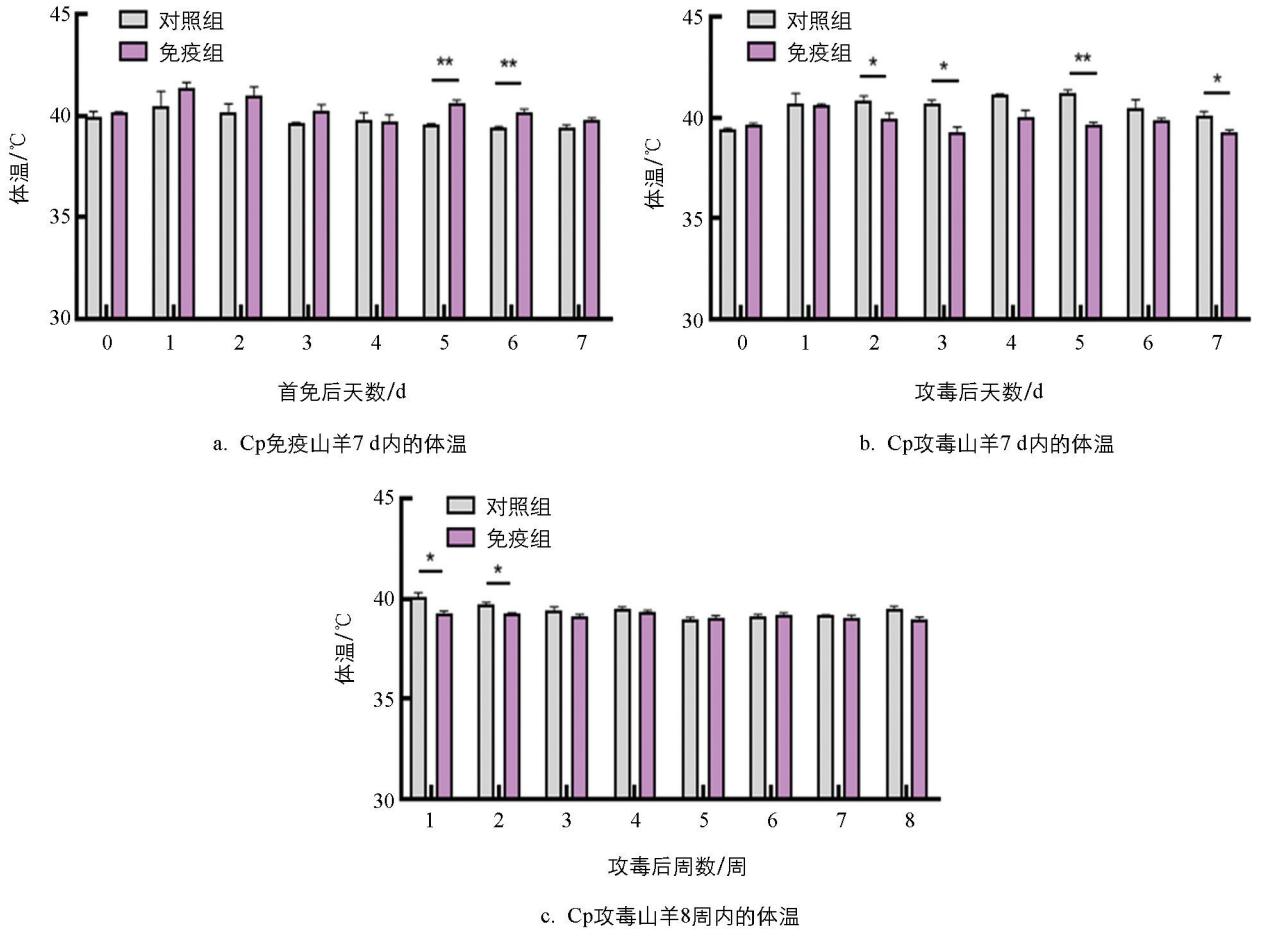


a、b、c 为免疫组 3 只羊。

图 1 Cp 灭活苗免疫山羊注射部位的皮肤观察结果

2.2 Cp 灭活苗免疫和攻毒对山羊体温的影响

首免后第 5、6 d 免疫组山羊平均体温分别为 40.60 ± 0.24 °C、 40.20 ± 0.16 °C,显著高于对照组 39.57 ± 0.05 °C 和 39.43 ± 0.05 °C,第 7 d 差异无统计学意义(图 2a)。Cp 攻毒后,对照组山羊体温连续 7 d 平均温度为 40.71 ± 0.37 °C,最高达 41.23 ± 0.19 °C,均高于免疫组 39.82 ± 0.33 °C,其中在第 2、3、5、7 d 达到显著水平(图 2b),且第 2 周对照组山羊体温 39.70 ± 0.16 °C 仍显著高于免疫组山羊体温 39.27 ± 0.05 °C(图 2c)。

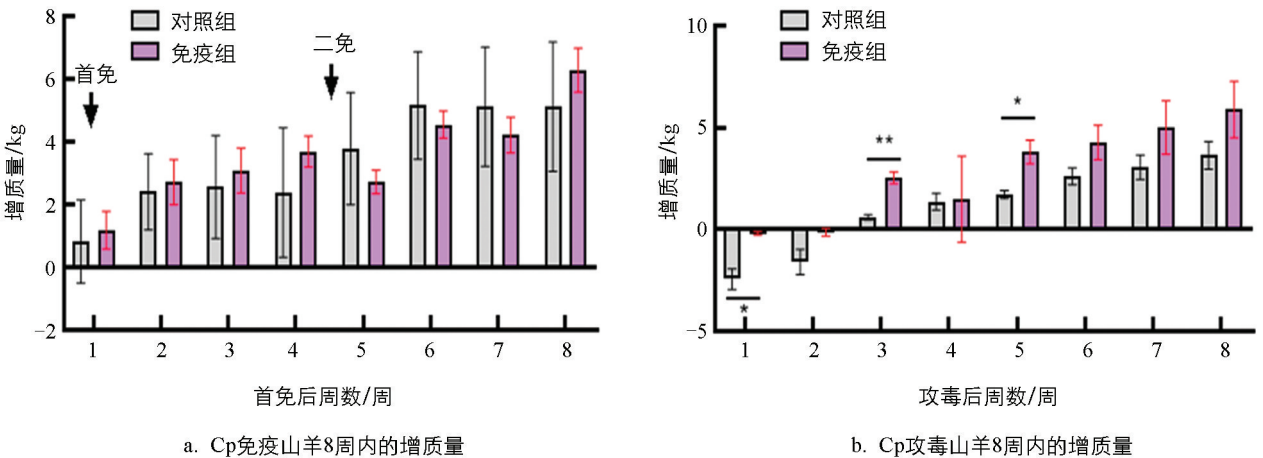


* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

图 2 Cp 灭活苗免疫及免疫后攻毒山羊体温变化情况

2.3 Cp 灭活苗免疫和攻毒对山羊增质量的影响

首免后 1~4 周, 免疫组山羊增质量均高于对照组(图 3a), 而二免后 1~3 周对照组增质量高于免疫组, 到第 4 周则免疫组增质量高于对照组, 差异无统计学意义($p > 0.05$)。Cp 攻毒后第 1~8 周, 对照组山羊增质量均低于免疫组, 其中第 1、3、5 周差异有统计学意义($p < 0.05$), 且在攻毒后第 1、2 周出现负增质量现象(图 3b)。



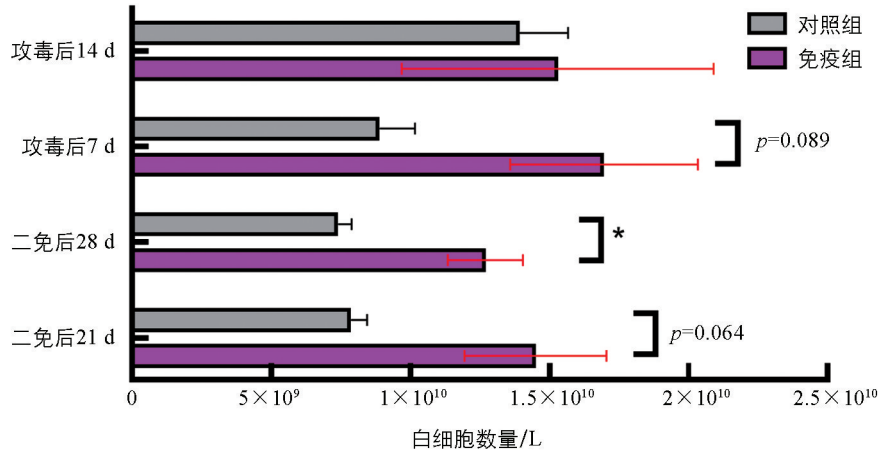
* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

图 3 Cp 灭活苗免疫及免疫后攻毒山羊增质量情况

2.4 Cp 灭活苗免疫和攻毒对

山羊血常规的影响

对 Cp 灭活苗免疫及免疫攻毒后山羊血常规进行检测,发现免疫组山羊的白细胞数量高于对照组,其中二免后 28 d 差异有统计学意义($p < 0.05$),而攻毒后 14 d,免疫组和对照组白细胞数量几乎相当(图 4),其他血常规指标差异无统计学意义($p > 0.05$)。



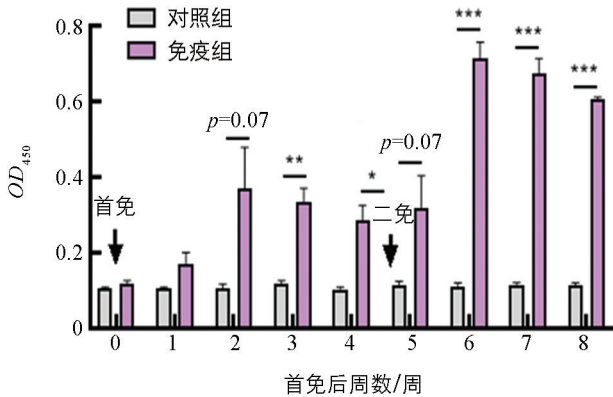
* 表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 4 Cp 灭活苗免疫及免疫攻毒后山羊白细胞数量

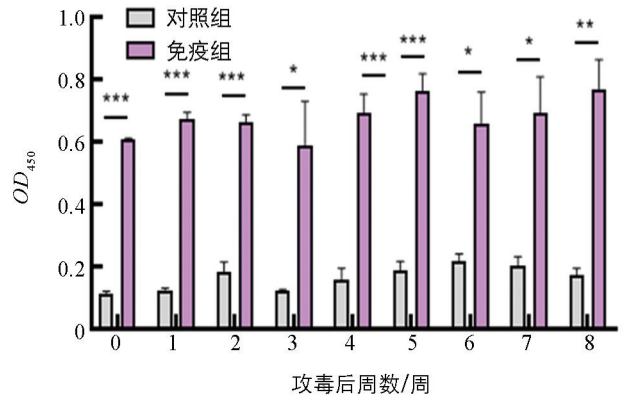
2.5 Cp 灭活苗免疫和攻毒对

山羊 IgG 抗体的影响

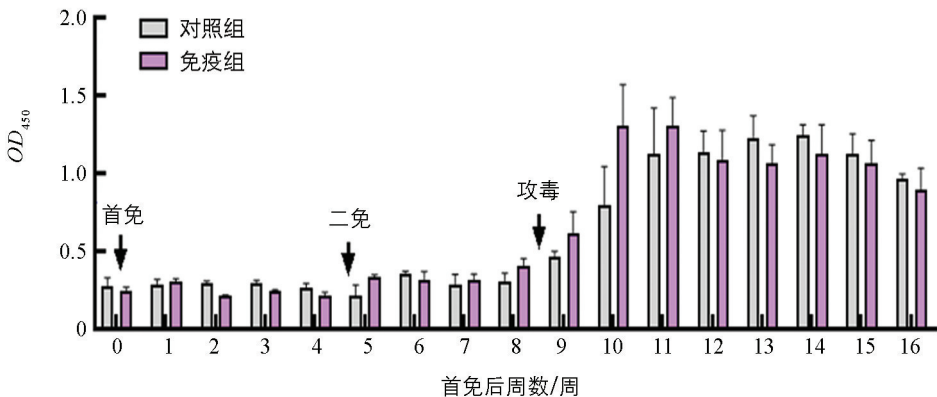
以 Cp 菌体作为包被抗原,检测发现免疫组山羊 IgG 抗体均高于对照组,且首免后第 3、4 周和二免后第 2~4 周差异有统计学意义($p < 0.05$),二免后山羊血清 IgG 抗体明显高于首免(图 5a)。攻毒后,免疫组山羊 IgG 抗体均显著高于对照组(图 5b)。此外,Cp 灭活苗免疫后免疫组山羊抗 PLD 抗体水平与对照组差异无统计学意义($p > 0.05$),而 Cp 攻毒后,免疫组和对照组山羊抗 PLD 抗体水平均明显上升(图 5c)。



a. Cp 免疫后抗体水平(菌体包被)



b. Cp 攻毒后抗体水平(菌体包被)



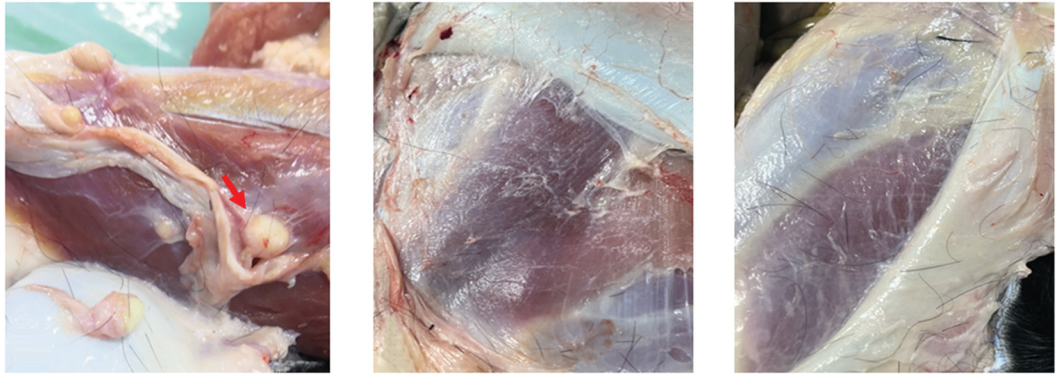
c. Cp 免疫后抗体水平(rPLD 包被)

* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, *** 表示 $p < 0.001$, 差异有统计学意义。

图 5 Cp 灭活苗免疫及免疫后攻毒山羊血清 IgG 的测定结果

2.6 Cp 灭活苗免疫山羊攻毒后各脏器及淋巴结脓肿结果

在整个攻毒试验期内没有山羊出现死亡。攻毒后 65 d 对山羊进行剖检, 发现免疫组仅有 1 只山羊的后肢攻毒部位皮下出现脓肿(数量为 5 个, 直径 0.2~1 cm), 而对照组 3 只山羊均在后肢攻毒部位皮下发现了脓肿, 脓肿数量分别为 15 个(直径 1.4~2.4 cm)、13 个(0.5~2 cm)和 7 个(0.5~2 cm)(图 6)。此外, 在对照组山羊的下颌淋巴结及髂下淋巴结也发现了脓肿的存在。



a. 免疫组3只羊



b. 对照组3只羊

红色箭头表示脓肿。

图 6 Cp 攻毒山羊在攻毒部位(左后肢皮下)的脓肿情况

2.7 Cp 灭活苗免疫山羊攻毒后各脏器及淋巴结载菌量结果

对攻毒山羊各脏器 Cp 进行检测, 发现免疫组和对照组山羊的肝、脾、肺和肾脏中均未检测到 Cp。对免疫组唯一 1 只在攻毒部位出现脓肿的山羊样本进行检测, 发现其 Cp 量为 1.06×10^9 CFU/g, 而对照组 3 只山羊在攻毒部位脓肿的 Cp 量分别为 3.53×10^{10} 、 1.06×10^{10} 、 1.39×10^{11} CFU/g。将对照组山羊中相应部位淋巴结混合检测, 发现下颌淋巴结、颈浅淋巴结和髂下淋巴结中均有 Cp, 其载菌量分别为 9.3×10^8 、 9.0×10^4 、 1.9×10^8 CFU/g, 在髂淋巴结、膈淋巴结、腹股沟淋巴结和肠系膜淋巴结均未检测到 Cp, 在免疫组所有上述淋巴结样本中均未检测到 Cp。

3 讨论与结论

3.1 讨论

目前 Cp 在我国多个省市均有感染致病的报道, 特别是放养山羊发病率更高, 而该病原一旦在羊场中存在则极难根除, 因此无 Cp 的羊场如何预防、存在 Cp 病例的羊场如何降低其感染发病数和减少经济

损失是急需养殖户重视的问题。接种疫苗是防控 Cp 的最佳手段,国外已有的商品化灭活苗包括硕腾公司生产的 Glanvac[®] 系列疫苗、科罗拉多州血清公司生产的 Caseous D-T[®] 和 Case-Bac[®] 疫苗,弱毒活疫苗有 Labovet Produtos Veterinários 生产的 Vacina 1002[®] 和 Vencofarma Lab 生产的 Linfovac[®] [1], 这些疫苗在防控 Cp 感染中发挥了重要作用。目前,我国尚无预防 Cp 感染的商品化疫苗,一些学者以铝胶、ISA 206 VG、白油等为佐剂制备 Cp 灭活苗,通过小鼠 [11-12] 和/或山羊 [12-13] 进行免疫评价并取得了一定的免疫保护效果。

机体应对 Cp 感染的免疫十分复杂,体液免疫和细胞免疫各自起到了一定的作用 [14]。我们发现所制备的 Cp 灭活苗免疫可诱导山羊血清 IgG 抗体显著升高,且二免后山羊 IgG 抗体明显高于首免,证明该灭活苗免疫山羊可产生明显的体液免疫反应。虽然所制备灭活苗中含 Cp 培养上清液,但经过 2 次免疫后,免疫组山羊血清中抗 PLD 抗体水平与对照组差异并不明显,Cp 攻毒后对照组和免疫组山羊血清中抗 PLD 抗体水平均明显上升,其中对照组在攻毒后第 3~8 周(首免后 11~16 周),免疫组在攻毒后 2~8 周(首免后 10~15 周)抗 PLD 抗体水平均高于攻毒前水平。据报道 Cp 在感染的巨噬细胞内 PLD 会高水平表达 [15],该灭活苗免疫未能诱导高水平 PLD 抗体的原因可能是体外培养条件下 PLD 表达水平相对较低,所分泌的 PLD 蛋白尚不足以引发机体产生高水平抗体。

本研究发现 Cp 灭活苗免疫山羊白细胞数量高于对照组,其中二免后 28 d 达到显著水平,该结果与屈辉 [16] 报道注射口蹄疫 O 型疫苗的波尔山羊白细胞在第 28 d 显著升高、李玉豪 [17] 报道牛病毒性腹泻重组抗原亚单位疫苗免疫组绵羊的白细胞数高于对照组相似。由于伴随免疫应答的白细胞相应升高,本研究结果提示 Cp 灭活苗免疫可增强山羊的免疫应答能力。此外,研究表明所制备的 Cp 灭活苗免疫可缓解因 Cp 感染引起山羊体质量下降及体温升高,明显减少 Cp 攻毒引起的脓肿数量和淋巴结载菌量。如果单以是否产生脓肿来判定 Cp 疫苗对山羊的免疫保护率 [1], 研究表明所制备的 Cp 灭活苗对山羊的免疫保护率为 66.7%。此外,本研究发现注射以 ISA 201 VG 为佐剂的 Cp 灭活苗在注射部位可形成一定的皮肤破溃,ISA 201 VG 是基于矿物油的佐剂,这与张媛等 [18] 报道小鼠皮下注射猪丹毒丝菌油佐剂灭活苗产生皮肤破溃相似,但本研究的皮肤破溃在注射疫苗后 49~56 d 基本上完全恢复,而且所制备 Cp 灭活苗免疫对山羊增质量无明显影响,提示该疫苗具有直接应用于生产的可能性。后续研究中,将进一步优化制苗条件及免疫方法,增大试验山羊的数量,在临床上进一步评价其免疫保护效果,为研发防控 Cp 感染的疫苗提供资料。

3.2 结论

本研究制备了 Cp 灭活苗,免疫山羊后可诱导抗 Cp 血清 IgG 抗体的显著升高,缓解因 Cp 攻毒引起的山羊体质量下降及体温升高,减少 Cp 攻毒引起的脓肿数量和淋巴结载菌量,为山羊养殖中 Cp 感染防治提供了参考资料。

参考文献:

- [1] DE PINHO R B, DE OLIVEIRA SILVA M T, BEZERRA F S B, et al. Vaccines for Caseous Lymphadenitis: Up-to-Date and Forward-Looking Strategies [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(6): 2287-2296.
- [2] LI H X, YANG H Y, ZHOU Z Y, et al. Isolation, Antibiotic Resistance, Virulence Traits and Phylogenetic Analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from Goats in Southwestern China [J]. Small Ruminant Research, 2018, 168: 69-75.

- [3] 徐志豪,黄诗琴,李乡城,等. 四川省山羊皮下脓肿的流行病学调查及病原体分析 [J]. 中国兽医科学, 2016, 46(8): 991-996.
- [4] 郑国英,马玉馨,李太仙,等. 昆明市西山区山羊伪结核棒状杆菌的分离鉴定 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(9): 32-37.
- [5] 魏宇辰,王斌,白新栋,等. 奶山羊不同组织来源于酪性脓肿中伪结核棒状杆菌的分离及毒力基因和耐药性检测 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43(5): 945-950.
- [6] 王斌,魏宇辰,白新栋,等. 陕西省及甘肃省部分地区山羊和绵羊干酪性淋巴结炎样脓肿中病原菌种类的调查与分析 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42(12): 2427-2433.
- [7] 唐伟,黄祥元,刘天猛. 山羊皮下脓肿的病原学分析 [J]. 湖南畜牧兽医, 2023(1): 28-32.
- [8] 王锐鸿,林昶,池雪林,等. 山羊伪结核棒状杆菌 LY20 株分离鉴定及病理组织学观察 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41(12): 2411-2420.
- [9] 李潇. 山羊伪结核棒状杆菌疫苗候选株筛选及灭活苗制备工艺研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [10] 吴陞. 山羊伪结核棒状杆菌 PLD 原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立与应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [11] 熊朝海. 羊源伪结核棒状杆菌分离鉴定及其自制灭活疫苗免疫效果初探 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- [12] 王斌. 伪结核棒状杆菌的分离鉴定和传代致弱及类毒素的免疫应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [13] 侯宏虎,王志芳,杨增岐. 羊伪结核及大肠埃希菌病二联灭活油苗的试制 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(10): 116-118.
- [14] 赵宏坤,范伟兴,胡敬东,等. 羊伪结核病研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(3): 77-78.
- [15] MCKEAN S C, DAVIES J K, MOORE R J. Expression of Phospholipase D, the Major Virulence Factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Is Regulated by Multiple Environmental Factors and Plays a Role in Macrophage Death [J]. Microbiology, 2007, 153(7): 2203-2211.
- [16] 屈辉. 注射口蹄疫 O 型疫苗对波尔山羊白细胞计数的分析 [J]. 湖南畜牧兽医, 2012(4): 17-18.
- [17] 李玉豪. 牛病毒性腹泻粘膜病重组抗原蛋白亚单位疫苗制备与免疫效果评价 [D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
- [18] 张媛,魏财文,李建,等. 猪丹毒丝菌生产用菌种 CVCC43005 株最高扩繁代次的确定及疫苗佐剂的筛选 [J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(10): 7-14.

责任编辑 周仁惠