猪丹毒杆菌 C43005 株的制备及检定

王秀丽, 刘 博, 张 媛, 彭国瑞, 李 建, 辛凌翔, 蒋玉文*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2016-11-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 03-0021-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为研究猪丹毒杆菌 C43005 株的菌种特性, 制备了一批猪丹毒杆菌 C43005 株并对菌种的真空度、剩余水分、形态、培养特性、生化特性、血清学特性、毒力、免疫原性等参数进行检定, 重点对该菌种的毒力进行重复试验并对影响毒力的因素进行分析。结果表明, 菌种的真空度、剩余水分、形态、培养特性、生化特性、血清学特性、免疫原性均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇版相关质量标准的规定, 毒力试验结果明显受培养基质量和动物个体差异的影响。本研究可以为猪丹毒杆菌 C43005 株的制备和检定提供参考依据。

[关键词] 猪丹毒杆菌 C43005 株; 毒力; 免疫原性

The Preparation and Verification of Swine Erysipelas Bacillus C43005 Strain

WANG Xiu-li, LIU Bo, ZHANG Yuan, PENG Guo-rui, LI Jian, XIN Ling-xiang, JIANG Yu-wen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to study the bacterial characteristics of swine erysipelas bacillus C43005 strain, a batch of swine erysipelas bacillus C43005 strain was prepared, and then the vacuum degree, residual moisture, morphology, culture characteristics, biochemical properties, serological characteristics, virulence, and immunogenicity were tested. The virulence experiment of C43005 was repeated and the influence factors were analyzed. The results showed that the vacuum degree, residual moisture, morphology, culture characteristics, biochemical properties, serological characteristics, immunogenicity conformed to the law of People's Republic of China Veterinary Biological Products Regulation (2000 version), and the virulence test results were obviously affected by medium's quality and experimental animals' individual differences. This research could provide some reference data for the preparation of swine erysipelas bacillus C43005 strain.

Key words: swine erysipelas bacillus; C43005 strain; virulence; immunogenicity

目前我国的生产和检验用菌种作为标准物质进行管理, 猪丹毒杆菌 C43005 株是王明俊先生在猪丹毒灭活疫苗(猪丹毒氢氧化铝菌苗)试验中经比较 8 株猪丹毒杆菌的免疫原性, 筛选出的免疫原

性最好的菌株, 因此选择了 C43005 株为猪丹毒灭活疫苗的生产用菌种^[1-2]。《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版规定, 本菌种的保存期为 2~8℃ 保存 10 年, 在菌种过期前需要更换批

作者简介: 王秀丽, 助理研究员, 从事兽用生物制品的检验及研究工作。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

次,新制备的菌种需要参照质量标准对所有参数进行检测,且由中国兽医药品监察所鉴定、保管和供应^[3]。目前能追溯到的鉴定资料只有2006年的制备和检定报告,之前的制备和检定资料因未归档而无法查阅。本文详细报告C43005株猪丹毒杆菌的制备和检定方法及结果,以期为将来菌种的溯源和检定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌种 猪丹毒杆菌C43005株(1983年3月27日冻干),由中国兽医药品监察所菌种保藏中心提供。

1.2 培养基及试剂 马丁琼脂培养基、马丁肉汤培养基、肉肝胃膜消化汤培养基、硫盐(TG)、酪胺琼脂(GA)、葡萄糖蛋白胨汤(GP)、生理盐水、5%蔗糖脱脂牛奶购自北京中海生物技术有限公司;健康动物血清,购自Hyclone公司,批号:GWH0092,裂解血细胞全血、绵羊脱纤血由中国兽医药品监察所提供,API coryne 棒状杆菌生化鉴定试纸条,购自biomerieux. sa公司,革兰氏染色液购自山东奥博星生物技术有限公司。

1.3 实验动物 小鼠(KM系),购自北京维通利华实验动物技术有限公司,健康易感猪,购自河北、山东、四川。

1.4 菌种复壮、冻干 开启1983年3月27日冻干的猪丹毒杆菌C43005株,经肉肝胃膜消化汤溶解后,用接种环取少量菌液划线接种含10%健康动物血清的马丁琼脂平板,37℃培养24h后,挑取单菌落接种于20mL含2%裂解血细胞全血的肉肝胃膜消化汤,37℃静置培养24h后,取10mL静脉注射20kg左右的健康易感猪,猪死亡后剖解,无菌取肝脏和心血,用接种环取少量心血、肝脏分别接种含10%健康动物血清的马丁琼脂平板各1付,分别接种10mL肉肝胃膜消化汤,37℃培养24h。

若平板和肉肝胃消化汤中的细菌纯粹生长,挑取平板上的单菌落接种含10%健康动物血清的马丁琼脂斜面小管若干支,37℃培养24h后,接种预培养24h无菌生长的含10%健康动物血清的马丁琼脂斜面中管,37℃培养24h。

用含5%蔗糖的10%脱脂牛奶将菌体洗下,收集于含玻璃珠的灭菌分装瓶中,充分振荡混匀后,用长针头注射器分装至安瓿瓶中,按照特定的冻干曲线冻干后封口。

1.5 菌种的检定

1.5.1 真空度测定 按照《中国兽药典》^[4]进行检验。

1.5.2 纯粹检验 用马丁琼脂培养基,按照《中国兽药典》^[4]进行检验。

1.5.3 剩余水分测定 按照《中国兽药典》^[4]进行检验。

1.5.4 培养特性 在含有10%健康动物血清或含4%健康动物血清和0.1%裂解血细胞全血的马丁琼脂平板上,37℃培养36~48h,观察菌落形态。

1.5.5 血清学特性 沉淀反应抗原的制备:取在含10%绵羊脱纤血的血斜面上培养的C43005株接种于含0.5%乳糖的马丁肉汤培养基(加入10%的健康动物血清),37℃培养24h,纯粹检验合格后加入0.5%的甲醛灭活24h,3000r/min离心30min,收集菌体,用无菌PBS洗涤2次,在沉淀物中加入适量蒸馏水(30倍浓缩),经121℃高压1h,冷却后离心取上清即为沉淀反应抗原,加入0.01%的硫柳汞,置于2~8℃备用。琼脂双相扩散法检定血清型:在0.01mol/L PBS中加入1%~1.2%的琼脂,融化后加入0.01%的硫柳汞,倾注平板,凝固后打孔,孔径与孔距均为4mm,在酒精灯火焰上加热封底,在中心孔加入沉淀反应抗原,外周各孔加入定型血清,置于湿盘中37℃作用24h,当中心孔与周围孔之间出现清晰的乳白色沉淀线,即为相应的血清型。

1.5.6 生化特性检查 参照试纸条的使用说明书进行检定。

1.5.7 毒力 以肉肝胃膜消化汤培养24h的菌液1~5mL(每1mL不少于活菌30亿CFU),静脉注射断奶后1~3个月体重20kg以上的健康易感猪2头,应于4日内死亡;5~10个活菌皮下注射18~22g的小白鼠5只,均应于7日内死亡^[3]。

1.5.8 免疫原性 开启新冻干菌种,用马丁肉汤

溶解后划线接种含 10% 健康动物血清的马丁琼脂平板, 37 °C 培养 24 h, 挑取中等大小的菌落接种于 100 mL 含 2% 裂解血细胞全血的肉肝胃膜消化汤中, 37 °C 培养 28 h, 取菌液参照《中国兽药典》^[4] 进行纯粹检验。检验纯粹后按菌液总量的 0.3% 加入甲醛溶液, 37 °C 灭活 18 ~ 24 h, 灭活期间振荡数次。灭活后参照《中国兽药典》二〇一〇版三部进行无菌检验; 按照菌液与氢氧化铝胶 5:1 的比例充分混匀, 静置 2 ~ 4 d 后, 弃去上清, 浓缩至原体积的 40%^[3]。

用体重 16 ~ 18 g 的小白鼠 10 只, 分成 2 组, 第 1 组皮下注射疫苗 0.1 mL, 第 2 组皮下注射用 40% 氢氧化铝胶 4 倍稀释的疫苗 0.2 mL, 21 d 后连同条件相同的对照小鼠 6 只, 其中 3 只对照小鼠与免疫小鼠各皮下注射 1000 MLD C43006 和 C43008 的混合菌液, 另 3 只小鼠皮下注射 1 MLD C43006 和 C43008 的混合菌液, 观察 10 d, 注射 1000 MLD 的对照小鼠应全部死亡, 注射 1 MLD 的对照小鼠应至少死亡 2 只, 免疫小鼠至少保护 7 只为合格^[3]。

2 结果

2.1 真空度测定 对冻干的 150 支菌种参照《中国兽药典》^[4] 进行检验, 2/150 无辉光, 148/150 呈现白色或粉色或紫色辉光, 真空度良好。2 支无真空的菌种高压处理。

2.2 纯粹检验 随机抽取 5 支真空度测定良好的菌种, 按照《中国兽药典》^[4] 进行检验, 5/5 纯粹, 符合规定。

2.3 剩余水分测定 按照《中国兽药典》^[4] 进行检验, 结果为 0.8%、0.4%、0.9%、0.7%, 均小于 4%, 符合规定。

2.4 培养特性 在含 4% 健康动物血清和 0.1% 裂解血细胞全血的马丁琼脂平板上, 37 °C 培养 48 h, 肉眼观察菌落表面圆整光滑, 呈微蓝灰色露珠状, 符合规定。

2.5 血清学特性 C43005 株与 2 型猪丹毒血清出现明显沉淀线条, 与 1 型血清无沉淀反应, 说明 C43005 株为猪丹毒 2 型, 符合规定。

2.6 生化特性 测试结果见表 1, 符合细菌分类学中猪丹毒杆菌的生物学特性。

表 1 猪丹毒杆菌 C43005 生化检查结果

测试	反应	结果	判定
NIT	硝酸盐还原	无色	-
PYZ	吡嗪胺酶	淡橙色	-
PYRA	吡咯烷酮基方胺酶	橙色	+
PAL	碱性磷酸酶	淡橙色	-
β-GUR	β-葡萄糖醛酸酶	淡浅褐色	-
β-GAL	β-半乳糖苷酶	淡浅褐色	-
α-GLU	α-葡萄糖苷酶	淡浅褐色	-
β-NAG	N-乙酰-β-葡萄糖胺酶	褐色	+
ESC	β-葡萄糖苷酶	无色	-
URE	脲酶	黄色	-
GEL	明胶	黑色素无扩散	-
O	对照(发酵)	红色	-
GLU	葡萄糖	黄色	+
RIB	核糖	橙色	+
XYL	木糖	红色	-
MAN	甘露醇	红色	-
MAL	丙二酸盐	橙色	+
LAC	乳糖	橙色	+
SAC	蔗糖	红色	-
GLYG	肝糖原	红色	-
CAT	触酶(ESC或GEL测定)	无气泡	-

2.7 毒力 小鼠的毒力试验结果显示,20151222 批肉肝胃膜消化汤培养的猪丹毒杆菌 C43005 株的最小致死剂量(MLD)大于 10 CFU,20160126 批肉肝胃膜消化汤培养的 C43005 株的 MLD 为 4.3 CFU,初步证明肉肝胃膜消化汤对 C43005 的毒力有明显影响。用 20160126 批肉肝胃膜消化汤培养菌液对小鼠的毒力试验,结果符合标准中“5~10 个活菌皮下注射 18~22 g 的小白鼠 5 只,均应于 7 日内死亡”的规定,结果见表 2;猪的毒力试验结果显示,用 20160126 批肉肝胃膜消化汤培养的菌液

分别对山东、四川、河北地区的体重、日龄相近的猪进行毒力试验,结果显示对山东地区猪的 MLD 大于 $2.2 \times 10^{10.0}$,对四川地区猪的 MLD 大于 $2.6 \times 10^{10.0}$,对河北地区猪的 MLD 为 $1.6 \times 10^{10.0}$,说明不同地区猪对 C43005 的耐受程度不同。20151222 批和 20160126 批肉肝胃膜消化汤培养的菌液对河北地区猪的毒力试验结果差异也说明不同批次肉肝胃膜消化汤对 C43005 的毒力有明显影响。用 20160126 批次肉肝胃膜消化汤培养的菌液对河北猪进行试验,结果 2/2 死亡,符合规定,结果见表 3。

表 2 猪丹毒 C43005 株对小鼠毒力试验结果

培养基批次	动物数量/只	攻毒剂量/(CFU·只 ⁻¹)	不同攻毒时间后死亡小鼠数量/只							结果
			24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	
20151222	5	10.8	0	0	0	0	0	2	0	2/5 死亡
	5	1.8	0	0	0	0	1	3	0	4/5 死亡
	5	4.3	0	0	0	0	2	2	1	5/5 死亡
20160126	5	8.9	0	0	0	0	2	3	/	5/5 死亡
	5	13.3	0	0	0	1	0	3	1	5/5 死亡
	5	17.8	0	0	0	0	3	1	1	5/5 死亡

“/”表示小鼠全部死亡后无小鼠死亡记录

表 3 猪丹毒 C43005 株对猪毒力试验结果

培养基批号	动物来源	动物数量/只	菌液浓度/(CFU·mL ⁻¹)	注射剂量/mL	攻毒菌数/(CFU·头 ⁻¹)	不同攻毒时间后猪死亡数量/头				结果
						24 h	48 h	72 h	96 h	
20160126	山东	2	$3.1 \times 10^{9.0}$	4	$1.2 \times 10^{10.0}$	0	0	0	0	0/2 死亡
		2	$3.1 \times 10^{9.0}$	5	$1.6 \times 10^{10.0}$	0	0	0	0	0/2 死亡
		2	$3.1 \times 10^{9.0}$	7	$2.2 \times 10^{10.0}$	0	0	0	0	0/2 死亡
20160126	四川	2	$3.3 \times 10^{9.0}$	5	$1.6 \times 10^{10.0}$	0	0	0	0	0/2 死亡
		2	$5.2 \times 10^{9.0}$	5	$2.6 \times 10^{10.0}$	0	0	0	0	0/2 死亡
20160510	四川	2	$3.1 \times 10^{9.0}$	5	$1.6 \times 10^{10.0}$	0	0	0	0	0/2 死亡
		2	$5.2 \times 10^{9.0}$	5	$2.6 \times 10^{10.0}$	0	0	0	0	0/2 死亡
20151222	河北	2	$6.3 \times 10^{9.0}$	5	$3.2 \times 10^{10.0}$	1	0	0	0	1/2 死亡
20160126	河北	2	$3.3 \times 10^{9.0}$	5	$1.6 \times 10^{10.0}$	0	0	1	1	2/2 死亡

所有试验猪均为 60~70 日龄,体重 20~22 kg 的健康易感猪

2.8 免疫原性试验 疫苗灭活前对菌液进行活菌计数,菌液浓度为 $3.7 \times 10^{9.0}$ CFU/mL,免疫小鼠 21 d 后攻毒,免疫 1 组小鼠 5/5 保护,免疫 2 组小鼠 4/5 保护,对照 1 组和对照 2 组小鼠均 3/3 死

亡,结果符合规定。C43006 株和 C43008 株混合菌液毒力测定结果显示 1MLD 为 4.3 CFU,见表 4,攻毒保护结果见表 5。

表4 C43006 和 C43008 混合菌液毒力测定结果

预注菌数/CFU	实际注射菌/CFU	不同攻毒时间后小鼠死亡数量/只							测毒结果
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	
2.0	2.1	0	0	0	1	0	0	0	1/3 死亡
4.0	4.3	0	0	0	2	1	/	/	3/3 死亡
6.0	6.4	0	0	2	1	/	/	/	3/3 死亡
8.0	8.6	0	0	0	3	/	/	/	3/3 死亡

“/”表示小鼠全部死亡后无小鼠死亡记录

表5 攻毒保护试验结果

组别	小鼠数量/只	攻毒菌数/CFU	不同攻毒时间后小鼠死亡数量/只										结果	
			24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h		
免疫1组	5	$4.5 \times 10^{3.0}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5/5 保护
免疫2组	5	$4.5 \times 10^{3.0}$	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4/5 保护
对照1组	3	$4.5 \times 10^{3.0}$	0	0	2	1	/	/	/	/	/	/	/	3/3 死亡
对照2组	3	$4.5 \times 10^{3.0}$	0	0	2	1	/	/	/	/	/	/	/	3/3 死亡

“/”表示小鼠全部死亡后无小鼠死亡记录;免疫1组表示小鼠免疫的疫苗原液,免疫2组表示小鼠免疫1份疫苗与3份40%的铝胶生理盐水的混合液;对照1组表示攻1000 MLN的对照组,对照2组表示攻1 MLN的对照组

3 讨论与小结

郑庆端在猪丹毒氢氧化铝胶甲醛灭活苗的研究报告中还比较了肉胃消化汤、胃蛋消化汤、牛肝胃酶消化汤、肉肝胃酶消化汤、胰酶消化汤1和胰酶消化汤2等培养基以及马丁肉汤加血清等培养基对猪丹毒促生长能力及制备疫苗的效力差异,结果显示猪丹毒杆菌在肉肝培养基中生长良好,制出的疫苗效力表现良好,猪丹毒杆菌在胰酶消化汤2和牛肝胃酶消化汤中生长甚差,猪丹毒在肉胃消化汤、胃蛋消化汤培养基中生长良好,但制备的疫苗免疫保护效力较差,说明疫苗的效力受培养基和菌数的共同影响^[5]。本研究试验结果显示,猪丹毒杆菌 C43005 对小鼠和猪的毒力均受培养基的影响,新鲜肉肝胃膜消化汤的制备因受牛肉、牛肝、猪胃等原材料的新鲜程度及消化温度、时间、pH 值、高压温度及时间等影响较大^[3,5],因此在进行菌种检定时要先对培养基的促生长能力及培养菌的毒力进行预试验,筛选出合适的培养基进行菌种检定。

猪丹毒杆菌 C43005 对猪的毒力试验结果显示,不同地区的猪对 C43005 的耐受程度不同。在

细菌类兽用生物制品效力检验中攻毒菌种毒力测定的结果也受实验动物品系、来源等的影响,这也是细菌类生物制品的效力检验即使是 SPF 小鼠、SPF 鸡等有质量标准的动物攻毒前仍需预测毒力的原因,目前猪仅是一种实验用动物,没有相关的质量标准,地区差异、品系差异、养殖环境差异均影响试验结果。

《中华人民共和国兽用生物制品规程》中对 C43005 毒力的质量标准规定为“制造和检验用菌种,以肉肝胃消化汤培养 24 h 的菌液 1 ~ 5 mL (每 1 mL 含活菌不少于 30 亿 CFU) 静脉注射断奶后 1 ~ 3 个月体重 20 kg 以上的健康易感猪 2 头,应于 4 日内死亡”^[3],质量标准规定的攻毒菌液的浓度没有上限,此为质量标准中存在的一个漏洞,在 C43006 和 C43008 的毒力检定中和 C43005 存在同样的问题,2006 年 C43005 菌种的检定中对健康易感仔猪的最小致死剂量为 1.5×10^{10} CFU/头(每头猪注射 5 mL $3.0 \times 10^{9.0}$ CFU/mL 的菌液),因此建议修订 C43005 毒力试验的质量标准,控制攻毒菌液浓度的上限,且经过进一步的试验验证,将攻毒剂量进行适当调整。

此次猪丹毒对猪的毒力试验结果显示,以20160126批次的肉肝胃消化汤培养的C43005以 $3.3 \times 10^{9.0}$ CFU/mL的菌液浓度对河北地区的猪攻毒,猪2/2在4日内死亡,符合质量标准,但受培养基质量的影响,或受不同地域猪的个体差异影响,试验结果差异显著,且多组实验结果均不符合质量标准的规定,菌种的毒力不能客观评价。因此建议对用于生产或检验用菌种检定的培养基、试剂、实验动物的品种品系等制定相关质量标准。

参考文献:

- [1] 中国兽医药品监察所. 中国兽医微生物菌种保藏管理中心. 中国兽医菌种目录[S].
- [2] 王明俊, 李扬隄. 猪丹毒氢氧化铝菌苗试验报告[J]. 中国畜牧兽医杂志, 1956, (2):67-73.
- [3] 农业部兽用生物制品规程委员会. 中华人民共和国兽用生物制品规程二〇〇〇年版[S].
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版三部[S].
- [5] 郑庆端, 马闻天, 王明俊. 猪丹毒氢氧化铝甲醛菌苗研究[J]. 畜牧兽医学报, 1957, (2):3-21.

(编辑:李文平)