

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.10.04

猪霍乱沙门氏菌 C79102 株的制备与检定

王秀丽, 张媛, 李建, 彭国瑞, 刘博, 辛凌翔, 蒋玉文*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-03-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 10-0024-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为研究猪霍乱沙门氏菌 C79102 株的菌种特性, 制备了一批猪霍乱沙门氏菌 C79102 株, 并对菌种的真空度、纯粹、剩余水分、培养特性、形态及生化特性、血清学特性、特异性、毒力等进行检定, 重点对菌种的毒力进行研究。试验结果表明, 该冻干菌种的真空度、纯粹、剩余水分、培养特性、形态及生化特性、血清学特性均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇版质量标准的规定, 特异性检验结果显示 C79102 在含 1% 醋酸铊的普通肉汤中不生长, 毒力试验结果显示, 不同制备方法获得的肉肝胃消化汤培养的菌液毒力差异明显。本研究可以为猪霍乱沙门氏菌的制备和检定提供参考依据。

[关键词] 猪霍乱沙门氏菌 C79102 株; 特异性; 毒力

The Preparation and Certification of *Salmonella choleraesuis* Strain C79102

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

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

Corresponding author: JIANG Yu-wen, E-mail: jiangyuwen@ivdc.org.cn

Abstract: In order to study the bacterial characteristics of *Salmonella choleraesuis* C79102 strain, a batch of *Salmonella choleraesuis* strain C79102 was prepared, and then the vacuum degree, residual moisture, morphology, culture characteristics, biochemical properties, serological characteristics, virulence, and immunogenicity were tested. The results showed that the vacuum degree, purity test result, residual moisture, morphology, culture characteristics, biochemical properties, serological characteristics of C79102 conformed to the Veterinary Biological Products Regulations of the People's Republic of China, 2000 edition, Specificity test result showed that C79102 could not grow in common broth with 1% acetic acid thallium. The virulence test results showed that the virulence of C79102 obviously affected by meat liver stomach digested nmedium's quality. This research could provide some reference data to the preparation of *Salmonella choleraesuis* strain C79102.

Key words: *Salmonella choleraesuis* strain C79102; specificity; virulence

作者简介: 王秀丽, 助理研究员, 主要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

仔猪副伤寒又称猪沙门氏菌病,是由猪霍乱沙门氏菌引起的仔猪高热性传染病,该病分布广泛,主要感染断奶期仔猪,临床上以急性败血症、慢性坏死性肠炎、顽固性下痢等为特征,当并发或继发感染其它疾病或治疗不及时时,死亡率较高,给养猪业造成重大的经济损失,严重困扰着养猪业的健康发展^[1]。在我国,猪沙门氏菌感染率很高,在屠宰中往往污染猪肉,引起人沙门氏菌感染发病。接种疫苗是主要的预防手段。

猪霍乱沙门氏菌 C79102 株为仔猪副伤寒活疫苗效力检验用强毒菌种,也是仔猪副伤寒沙门氏菌 C500 株菌种检定免疫原性试验的攻毒菌种,分离自江苏淮阴猪,血清型为 6,7:C:1,5^[2-3],对仔猪副伤寒活疫苗免疫效果的评价有重要意义。《中华人民共和国兽用生物制品规程》中规定本菌种在 2~8 °C 保存期为 10 年^[3]。新制备的菌种需满足《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇一〇版中的该菌种的质量标准,本文详细报告 C79102 株猪霍乱沙门氏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 猪霍乱沙门氏菌 CVCC79102 株,1990 年 3 月 16 日冻干,F5,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 普通琼脂培养基、普通肉汤培养基、硫盐(TG)、酪胨琼脂(GA)、葡萄糖蛋白胨汤(GP)、生理盐水、5%蔗糖脱脂牛奶、肉肝胃膜消化汤、肉肝胃酶消化汤、肉肝胃消化汤(干粉)均购自北京中海生物技术有限公司;细菌生化鉴定试纸条,购买自 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,沙门氏菌 O₇ 因子血清购自丹麦国家血清研究所(SSI)。

1.3 实验动物 实验兔购自北京隆安实验动物技术有限公司;健康易感猪,菌种复壮用健康易感猪购自河北某养殖场,毒力试验用健康易感猪购自山东某养殖场。

1.4 菌种复壮,冻干 开启 1990 年 3 月 16 日冻干

的猪霍乱款沙门氏菌 C79102 株,用普通肉汤溶解后,取少量菌液划线接种 2 付普通琼脂平板,37 °C 培养 24 h。

从河北某养殖场采集 4 份 12 kg 以上健康断奶仔猪的血液,分离血清,56 °C 灭能 30 min,冷却至室温后备用;将其中 1 付普通琼脂平板上的培养物用生理盐水洗下,用分光光度计调浓度至 OD_{600nm} 为 1.5 左右,煮沸 30 min,冷却至室温备用;4 份血清分别取 100 uL 2 倍系列稀释至 2~4 稀释度,每孔分别加入 100 uL 的灭活抗原,用封板膜封板后置于 37 °C 孵育 24 h,未出现凝集的判定为健康易感猪。

挑取另 1 付普通琼脂平板上的单菌落接种于 20 mL 普通肉汤中,37 °C 静置培养 24 h 后,取 10 mL 静脉注射筛选出的 12 kg 以上的健康易感断奶仔猪,猪死亡后剖解,无菌取肝脏和心血,用接种环分别取少量肝脏、心血接种普通琼脂平板各 1 付,分别接种 10 mL 普通肉汤,37 °C 培养 24 h。

若普通琼脂平板和普通肉汤中的细菌纯粹生长,挑取平板上的若干个单菌落接种普通琼脂斜面小管若干支,37 °C 培养 24 h 后,接种预培养 24 h 无菌生长的普通琼脂斜面中管,37 °C 培养 24 h。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 16 号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、纯粹检验及剩余水分测定 按现行《中国兽药典》^[4]进行检验。

1.5.2 培养特性 用接种环取少量菌体在普通琼脂平板上划线培养,37 °C 培养 18~20 h,观察菌落形态。

1.5.3 形态和生化特性 取新鲜培养的普通琼脂平板上的菌体参照试剂盒的说明书进行革兰氏染色,观察菌落形态,用生化鉴定试纸条参照使用说明书进行生化特性检查。

1.5.4 血清学特性 用无菌棉拭子在普通琼脂平板培养物上取适量菌苔,在生理盐水中混匀,用分

光光度计测定菌液浓度,调整菌液浓度至 OD_{600nm} 为 1.5 左右,取 50 μ L 菌液与等体积的沙门氏菌 O_7 因子血清进行玻片凝集试验,3 min 内观察结果。

1.5.5 特异性 用接种环取普通琼脂平板上的单菌落接种含 1% 醋酸铊的普通肉汤 10 mL,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,观察 C79102 的生长情况。

1.5.6 毒力测定 从山东某养殖场采集 12 份 12 kg 以上健康断奶仔猪的血清,56 $^{\circ}$ C 灭能 30 min,冷却至室温后备用;筛选方法同 1.4 菌种复壮中健康易感仔猪的筛选。

挑取新鲜培养的普通琼脂平板上的单菌落接种肉肝胃膜消化汤,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后(肉肝胃消化汤 1 代培养物)分别取 0.1 mL 接种于 10 mL 肉肝胃膜消化汤、10 mL 肉肝胃酶消化汤和 10 mL 肉肝胃消化汤(干粉),接种完后将肉肝胃消化汤 1 代培养物置于 2~8 $^{\circ}$ C 保存备用,之后将接种物置于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h(肉肝胃消化汤 2 代培养物);分别对肉肝胃消化汤 2 代培养物进行活菌计数,再取 2~8 $^{\circ}$ C 保存的肉肝胃消化汤 1 代培养物 0.1 mL 分别接种于 10 mL 肉肝胃膜消化汤、10 mL 肉肝胃酶消化汤和 10 mL 肉肝胃消化汤(干粉),置于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h;参照初次培养的肉肝胃消化汤 2 代培养物的计数结果,分别用肉肝胃膜消化汤将 3 种后接种培养物稀释到 20 CFU/mL、25 CFU/mL,每个浓度的菌液分别皮下注射 2 只兔子,每只注射 1.0 mL。将后接种肉肝胃膜消化汤 2 代培养物分别用肉肝胃膜消化汤稀释至 1.5×10^8 CFU/mL、 2.0×10^8 CFU/mL、 2.5×10^8 CFU/mL,每个浓度的菌液分别静脉注射 3 头 12 kg 以上的健康易感断奶仔猪,每头猪注射菌液 2.0 mL。然后对攻毒的菌液进行活菌计数,确定实际的攻毒菌数。家兔和猪攻毒后均观察 21 d,家兔应全部死亡,猪应至少死亡 2 头^[3]。

2 结果

2.1 真空度测定 对冻干的 150 支菌种进行检验,2/150 无辉光,148/150 呈现白色或粉色或紫色辉光,2 支无真空的菌种 121 $^{\circ}$ C 高压 30 min 处理。

2.2 纯粹检验 随机抽取 5 支真空度测定良好的菌种进行检验,5/5 纯粹,符合规定。

2.3 剩余水分测定 随机抽取 16 支菌种,随机分为 4 组,测定剩余水分,结果为 0.9%、0.2%、0.3%、0.7%,均小于 4.0%,符合规定。

2.4 培养特性 C79102 在普通琼脂平板上 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h,菌落为圆形、边缘整齐、突起、半透明、略湿润的光滑型,符合规定。

2.5 形态和生化特性 新鲜培养的普通琼脂平板上的菌体参照试剂盒的说明书进行革兰氏染色,为革兰氏阴性小杆菌,符合规定。生化鉴定结果符合细菌分类学中沙门氏菌的生化特性,生化特性检查结果见表 1。

2.6 血清学特性 C79102 在普通琼脂平板上的新鲜培养物与沙门氏菌 O_7 因子血清出现典型的凝集反应(呈片状凝集),符合规定。

2.7 特异性 在含 1% 的醋酸铊的普通肉汤中不生长。

2.8 毒力 本试验选择肉肝胃膜消化汤、肉肝胃酶消化汤、肉肝胃消化汤(干粉)3 种培养基培养菌液对家兔进行毒力试验,结果显示,C79102 以 1% 的接种量(肉肝胃消化汤 1 代培养物 0.1 mL 接种 10 mL 肉肝胃消化汤)接种 3 种肉肝胃消化汤,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h(肉肝胃消化汤 2 代培养物),在肉肝胃消化汤(干粉)培养基中菌液浓度最高,为 2.9×10^9 CFU/mL,但毒力最差,最小致死剂量大于 25.2 CFU,在肉肝胃酶消化汤和肉肝胃膜消化汤中菌数相当,分别为 1.4×10^9 CFU/mL、 1.5×10^9 CFU/mL,肉肝胃膜消化汤中毒力最强,最小致死剂量小于 18.7 CFU,在肉肝胃酶消化汤培养的菌液最小致死剂量大于 19.4 CFU,结果见表 2。因此选择肉肝胃膜消化汤培养的菌液对健康易感仔猪进行毒力试验,结果显示,C79102 株沙门氏菌对健康易感断奶仔猪的最小致死剂量小于 3.8×10^8 CFU/mL,符合规定,结果见表 3。

表 1 猪霍乱沙门氏菌 C79102 株生化特性检查结果

Tab 1 Biochemical properties test results of *Salmonella choleraesuis* C79102 strain

测定项目	反应	结果	测定项目	反应	结果
ODC	鸟氨酸脱羧酶	+	IND	吡啶产生	-
ADH	精氨酸双水解酶	-	βNAG	N-乙酰-β 葡萄糖苷酶	-
LDC	赖氨酸脱羧酶	+	βGAL	β-半乳糖苷酶	-
URE	脲酶	-	GLU	葡萄糖	+
LARL	L-阿拉伯糖醇	-	SAC	蔗糖	-
GAT	半乳糖酸盐	-	LARA	L-阿拉伯糖	+
5KG	5-酮基-葡萄糖酸钠	-	DARL	D-阿拉伯糖醇	-
LIP	脂肪酶	+	αGLU	α-葡萄糖	+
RP	酚红	+	αGAL	α-半乳糖苷酶	-
βGLU	β-葡萄糖苷酶	-	TRE	海藻糖	+
MAN	甘露醇	+	RHA	鼠李糖	+
MAL	麦芽糖	+	INO	肌醇	-
ADO	侧金盏花醇	-	CEL	纤维二糖	-
PLE	/	-	SOR	山梨醇	+
βGUR	β-葡萄糖酸酶	-	2MAL	α-麦芽糖苷酶	-
MNT	丙二酸	-	ASPA	L-天门冬素芳胺酶	-

"+"表示反应结果阳性, "-"表示反应结果阴性。

表 2 家兔毒力试验结果

Tab 2 Virulence test results on rabbits

培养基	菌液浓度 /(×10 ⁹ CFU/mL)		注射剂 量/CFU	攻毒后的时间/d														结果
	预数	复数		1~8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
肉肝胃酶消化汤	1.8	1.4	15.6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3/5 死亡
			19.4	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
肉肝胃膜消化汤	1.5	1.5	18.7	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0	0	1	/	/	5/5 死亡
			23.3	1	1	1	2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	5/5 死亡
肉肝胃消化汤 (干粉)	2.3	2.9	25.2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	2/5 死亡
			31.6	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	1	/	/	5/5 死亡

"0~2"表示家兔死亡的数量; "/"表示动物全部死亡后无死亡记录。

表 3 健康易感仔猪毒力试验结果

Tab 3 Virulence test results on healthy susceptible piglets

菌液预数浓度 /(CFU · mL ⁻¹)	预注射菌液浓度 /(CFU · mL ⁻¹)	注射体 积/mL	菌液复数浓度 /(CFU · mL ⁻¹)	实际注射剂量 /CFU	攻毒后的时间/h							结果	
					24	48	72	96	120	144	168		
	1.5×10 ⁸	2.0		3.8×10 ⁸	0	0	0	1	0	1	1		3/3 死亡
1.2×10 ⁹	2.0×10 ⁸	2.0	1.5×10 ^{9.0}	5.0×10 ⁸	0	0	0	1	1	1	/		3/3 死亡
	2.5×10 ⁸	2.0		6.2×10 ⁸	0	0	0	2	0	1	/		3/3 死亡

"0~2"表示健康易感仔猪死亡的数量, "/"表示动物全部死亡后无死亡记录。

3 讨论与小结

猪霍乱沙门氏菌 C79102 株经检定其培养特性、形态及生化特性、血清学特性、毒力均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版标准的规定。毒力试验结果显示,不同肉肝胃消化汤培养基培养的菌液浓度差异明显,肉肝胃消化汤(干粉)培养基培养的菌液菌数最高但是毒力最弱,肉肝胃膜消化汤和肉肝胃酶消化汤培养的菌液浓度差异不明显,肉肝胃膜消化汤培养的菌液毒力更强,最小致死剂量小于 18.7 CFU。文献报道的效力检验中兔子的最小致死剂量为 18~19 CFU^[5-7]。但新鲜肉肝胃膜消化汤中的肉汤受动物的年龄及肉、肝、胃的新鲜程度和消化程度影响较大^[7],不同批次的新鲜肉肝胃膜消化汤差异较大,导致测毒结果不稳定,本次制备及检定的实验数据可以为将来 C79102 株的制备及检定提供参考资料。

猪霍乱沙门氏菌 C79102 株的制备及检定的依据为《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版,但是在《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版中未涉及到 C79102 株的制备依据,仅规定了 C79102 株的毒力标准,未涉及培养特性、形态及生化特性、血清学特性、特异性等的质量标准,而以往中国兽医药品监察所的归档资料中对于 C79102 菌株的检定参照 C500 株进行,因 C500 株是在 1% 醋酸铊的压力下筛选的弱毒菌株,所以在含 1% 的醋酸铊的普通肉汤中能够均匀浑浊生长,而 C79102 株未经过压力筛选,在含醋酸铊的普通肉汤中不生长,故 C500 株的特异性检验结果与 C79102 株不同。综上所述,建议对 C79102 株的制备及检定依据进行修订。

参考文献:

[1] Hendriksen R S, Vieira A R, Karlsmose S, *et al.* Globalmonitor-

ing of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007 [J]. *Foodborne Pathogenic Disease*, 2011, 8:887-900.

[2] 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].

China Institute of Veterinary Drug Control, China Veterinary Culture Collection Center. *China Veterinary Culture Directory* [S].

[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].

Committee of Veterinary Biological products of Ministry of Agriculture. The veterinary biological products regulations of the People's Republic of China, 2000 edition [S].

[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版三部[S].

Committee of China Veterinary Pharmacopoeia, *Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China*, 2015 edition [S].

[5] 康凯,姚文生. 仔猪副伤寒活疫苗两种菌落的免疫效力比较试验[J]. 中国兽药杂志, 2000, 34(3):34-35.

Kang K, Yao W S. The comparison of immune effect of 2 colonies of paratyphoid live vaccine for piglets [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2000, 34(3):34-35.

[6] 朱良全,孙晔,李聪研,等. 仔猪副伤寒活疫苗生产用菌种生长曲线的建立及合成培养基初步应用[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(2):51-56.

Zhu L Q, Sun Y, Li C Y, *et al.* Establishment of the growth curve of paratyphoid live vaccine strain for production and its application in synthetic medium [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2016, 50(2):51-56.

[7] 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.

Zhu L Q, Sun Y, Liu Y T, *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.

(编辑:陈希)