

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.03.06

猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗抗原菌 选择性显色培养基的研发和应用

韩美珍¹, 徐中清², 才学鹏³, 李秀辉⁴

(1. 北京中海生物科技有限公司, 北京 100081; 2. 中国兽医药品监察所, 北京 100081;

3. 中国兽药协会, 北京 100081; 4. 中海生物技术(枣庄)有限公司, 山东枣庄 277000)

[收稿日期] 2021-10-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 03-0046-07 [中图分类号] S859.797

[摘要] 为研制便于检测猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗抗原含量的选择性显色计数琼脂(以下简称猪三联显色培养基)以代替传统的马丁琼脂,对比研究了干粉马丁琼脂、新鲜马丁琼脂和猪三联显色培养基的理化特性和生长特性,并通过活菌计数方法平行对比了猪丹毒单价苗、猪肺疫单价苗和猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗的抗原含量。结果显示,猪三联显色培养基在活菌计数的准确性和重复性上均与干粉马丁琼脂保持一致,而且两种菌的菌落回收率均能达到 0.9 以上。研究表明,猪三联显色培养基可以代替马丁琼脂作为检测猪丹毒和猪肺疫抗原菌含量的计数琼脂,在猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗生产过程中监测疫苗质量。

[关键词] 猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗;显色培养基;显色底物;活菌计数;回收率

Development and Application of the Selective Chromogenic Medium for Antigen Bacteria of Combined Classical Swine Fever – Swine Erysipelas and *Pasteurella multocida* Live Vaccine

HAN Mei-zhen¹, XU Zhong-qing², CAI Xue-peng³, LI Xiu-hui⁴

(1. Beijing Zhonghai Biotechnology Co., Ltd, Beijing 100081, China; 2. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China;

3. China Veterinary Drug Association, Beijing 100081, China; 4. Zhonghai Biotechnology (Zaozhuang) Co., Ltd,

Zaozhuang, Shandong 277000, China)

Abstract: In order to replace traditional Martin agar, a selective chromogenic counting agar (hereinafter referred to as swine triplex vaccine chromogenic medium) was developed for detecting antigen content of Combined Classical Swine Fever – Swine Erysipelas and *Pasteurella multocida* live vaccine. In this study, the physical characteristics and growth characteristics of dry powder Martin agar, fresh Martin agar and swine triplex vaccine chromogenic medium were compared in parallel, and the antigen content of Swine Erysipelas live vaccine, Swine *Pasteurella multocida* live vaccine and Combined Classical Swine Fever – Swine Erysipelas and

Pasteurella multocida live vaccine, were compared in parallel by bacteria plate counting. The study results showed that the accuracy and repeatability of the bacteria plate count of swine triplex vaccine chromogenic medium were consistent with that of dry powder Martin agar, and the colony recovery rate of both bacteria was above 0.9. Therefore, the swine triplex vaccine chromogenic medium in this study can replace Martin agar as a counting agar to detect the content of antigen bacteria of Swine Erysipelas and Swine *Pasteurella multocida*, and monitor the quality of vaccine in the production process of Combined Classical Swine Fever – Swine Erysipelas and *Pasteurella multocida* live vaccine.

Key words: Combined Classical Swine Fever – Swine Erysipelas and *Pasteurella multocida* live vaccine; chromogenic medium; chromogenic substrate; bacterial plate count; recovery rate

猪丹毒(Swine Erysipelas, SE)是由猪丹毒杆菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*, ER)引起的一种急性热传染病,也是一种人畜共患病,呈世界性分布。猪多杀性巴氏杆菌病(Swine Pasteurellosis)是由猪多杀性巴氏杆菌(*Swine Pasteurella multocida*)引起的一种传染病^[1],又名猪肺疫、猪出血性败血症,俗称“锁喉风”。该病广泛分布于世界各地,是猪的一种常见传染病。猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)引起的一种高度接触性传染病,被我国列为一类动物疫病,是危害养猪业的主要传染病之一。目前,生产上常用猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗对猪瘟猪丹毒猪肺疫三种疾病进行免疫防控,其免疫效果直接影响着养猪行业的发展和广大养殖户的利益,而影响免疫效果的决定性因素是疫苗中有效抗原的含量。

活菌计数是疫苗质量标准的重要参数,对于评价疫苗的安全性和免疫效力有重要意义。多年来,一直使用干粉马丁琼脂或者新鲜马丁琼脂作为计数琼脂,由于猪肺疫和猪丹毒在马丁琼脂上的菌落形态相近,有时甚至会有两种菌落重叠或覆盖的情况,肉眼不易区分,所以无法准确计算每头份三联苗中分别含有的活菌数。鉴于此,我们研制出了一种检测猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗中猪丹毒和猪肺疫抗原含量的选择性显色培养基作为活菌计数琼脂。

1 材料与方法

1.1 实验用菌种 猪多杀性巴氏杆菌 CVCC1765 株菌种,即 EO630 株,弱毒株;猪丹毒杆菌 CVCC1319

株菌种,即 G4T10 株,弱毒株;二者均由中国兽医药品监察所鉴定、保管和供应。按照《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版中的方法制备猪肺疫菌液和猪丹毒菌液。

1.2 培养基及耗材 干粉马丁琼脂产自北京中海生物科技有限公司,按照产品要求配制而成,为本研究的对照组一;新鲜马丁琼脂由北京中海生物科技有限公司供应,为本研究中物理性状对比部分的对照组二;猪三联显色培养基按照以下原材料配方配制:蛋白胨 40 g、氯化钠 5 g、琼脂粉 15 g、显色剂 0.02 g、纯化水 1000 mL,为本研究的实验组。猪多杀性巴氏杆菌单价活疫苗(EO630 株)、猪丹毒单价活疫苗(G4T10 株)和猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗各 10 瓶,均购买自九江博美莱生物科技有限公司。无菌玻璃吸管和器皿由北京中海生物科技有限公司供应;一次性平皿(直径 9 cm),购买自青岛金典生化器材公司。

1.3 理化特性对比 干粉马丁琼脂、新鲜马丁琼脂和猪三联显色培养基均按照规程添加 4% 健康动物血清和 0.1% 裂解血球全血^[2],制备琼脂平板,比较三种培养基理化参数差异。由于商品化干粉培养基应用越来越广泛,制备过程简单,批间差异小,在干粉马丁琼脂平板上培养细菌,其菌落数和菌落形态与新鲜马丁琼脂差异不大^[3],因此以下研究仅用干粉马丁琼脂作为对照组。

1.4 菌落生长实验 干粉马丁琼脂和猪三联显色培养基均按照 1.3 项方法制备琼脂平板。分别接种猪肺疫菌液和猪丹毒菌液进行活菌计数^[4]。比

较三种计数平板上的菌落形态和活菌数差异,并计算猪三联显色琼脂上两种菌的菌落回收率(回收率 = 实验组计数/对照组计数)。

将猪肺疫苗液和猪丹毒菌液按照 1:1 比例混合均匀,按照规程方法稀释至适宜浓度^[5],接种干粉马丁琼脂平板和猪三联显色培养基平板,观察平板上两种菌落形态,并计算菌落数量和菌落回收率。

1.5 显色底物添加量对比实验 配制猪三联显色培养基:先配制基础培养基(蛋白胨 40 g、氯化钠 5 g、琼脂粉 15 g、纯化水 1000 mL),再加入显色底物,添加量分别为 0.01 g、0.02 g、0.04 g、0.08 g,依次命名为配方一、配方二、配方三、配方四。将四种猪三联显色培养基配方的琼脂平板和干粉马丁琼脂平板分别接种猪肺疫苗液和猪丹毒菌液进行活菌计数。

1.6 重复性和准确性实验 从购买的 10 瓶猪肺疫 EO630 株单价活疫苗和 10 瓶猪丹毒 G4T10 株单价活疫苗中,分别随机抽取 5 瓶,分别用无菌蛋白胨水稀释成 1 mL/头份,再稀释至适宜浓度后,分别接种猪三联显色培养基琼脂平板和干粉马丁

琼脂平板,并对菌落进行计数,即为两种单价苗的实际抗原含量。

1.7 对猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗成品的检测 从购买的 10 瓶猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗中,随机抽取 5 瓶,用无菌蛋白胨水稀释成 1 mL/头份,再稀释至适宜浓度后,接种猪三联显色培养基琼脂平板和干粉马丁琼脂平板。对干粉马丁琼脂中的大菌落和小菌落分别计数,并对猪三联显色琼脂平板中的红色菌落和灰白色菌落分别计数。

1.8 数据统计与分析 实验结果的数据进行单因素方差分析处理,分析结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 物理性状对比 三种计数琼脂相比(见表 1),干粉马丁琼脂的颜色较深,相对另外两种琼脂,不利于菌落观察和计数。新鲜马丁琼脂制备工艺繁琐,而且原材料来源不稳定,很容易影响培养基质量。而猪三联显色琼脂原材料配方简单,配制方法容易,而且琼脂颜色较浅,有利于菌落观察和计数。所以,本研究中的猪三联显色培养基在使用过程中更有优势。

表 1 计数琼脂理化特性对比

Tab 1 Comparison of physical and chemical properties of counting agar				
样品编号	培养基名称	主要原材料	琼脂平板颜色	成品保质期
对照组一	干粉马丁琼脂	蛋白胨、盐	棕黄色	36 个月
对照组二	新鲜马丁琼脂	牛肉汤、猪胃消化液	浅黄色,偏白	2~8 ℃ 6 个月
实验组	显色培养基	蛋白胨、盐、显色底物	浅黄色,偏粉	24 个月

2.2 菌落生长实验 通过肉眼观察,猪肺疫和猪丹毒在马丁琼脂上仅能以大小来区分,而在显色培养基上,猪肺疫为大菌落,且菌落呈红色,猪丹毒为小菌落,且菌落呈灰白色,略带黄色^[6],在计数过程中更直观(图 1)。由计数结果得出,本研究中的猪

三联显色琼脂平板与对照马丁琼脂平板上的两种抗原含量无明显差异,而且两种抗原菌的菌落回收率均能达到 1.00 以上。混合样品的计数结果均能达到单一菌液计数结果的一半,与预期结果一致(表 2)。

表 2 菌落生长实验对比结果

Tab 2 Comparative results of colony growth test				
抗原名称	计数琼脂名称	抗原含量/(10 ⁸ CFU · mL ⁻¹)	24 h 菌落形态	菌落回收率
EO630 株	马丁琼脂	111	S 型,淡黄色菌落,直径 2 mm	/
	显色培养基	116	S 型,红色菌落,直径 2 mm	1.04
G4T10 株	马丁琼脂	69	S 型,灰白色菌落,直径 1 mm	/
	显色培养基	75	S 型,灰白色菌落,直径 1 mm	1.08
混合样品	马丁琼脂	大菌落 59,小菌落 32	大菌落为 EO630,小菌落为 G4T10	/
	显色培养基	红色菌落 58,灰白菌落 35	红色菌落为 EO630,灰白色菌落为 G4T10	/

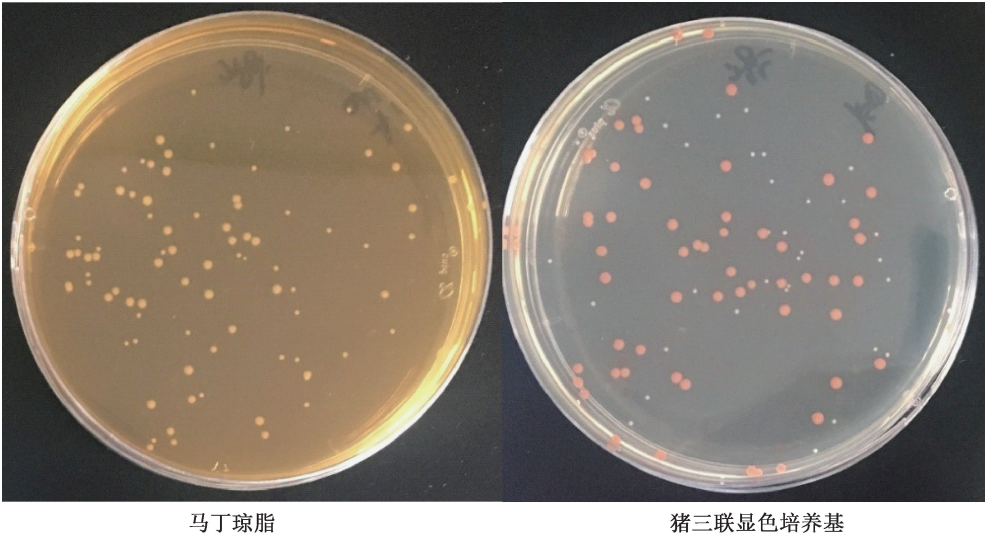


图 1 猪丹毒 G4T10 和猪肺疫 EO630 混合液接种两种培养基的菌落形态比较(彩图见封三)

Fig 1 Comparison of colony morphology after inoculation with mixture of Swine Erysipelas G4T10 and *Pasteurella multocida* EO630 in two medium

2.3 显色剂添加量对比实验 结合表 3、表 4 结果得出,显色底物加量对猪丹毒菌落生长形态和活菌数没有影响,对猪肺疫的计数结果影响明显:当显色底物加量大于 0.02 g/L 时,对猪肺疫菌落生长有抑制作用,而且显色底物加量越多,抑制作用越明显;而显色底物加量小于 0.02 g/L 时,猪肺疫菌落颜色较浅。综合以上结果,确定此猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗抗原菌选择性显色培养基的显色剂加量为 0.02 g/L。

2.4 重复性和准确性实验 将表 5、表 6 中 EO630 单价苗和 G4T10 单价苗的计数结果经方差分析得出(表 7),随机抽取的 5 个猪肺疫单价苗和 5 个猪丹毒单价苗的抗原菌含量在显色培养基和马丁琼

脂上均无明显差异($P>0.05$)。而且菌落回收率曲线趋势平稳,均能维持在 1.0 ± 0.1 。结果表明猪三联显色培养基的重复性和准确性都很好。

表 3 显色底物添加量对抗原含量的影响

Tab 3 Effect of chromogenic substrate addition on antigen content			
培养基名称	显色底物加量/(g · L ⁻¹)	抗原含量/(10 ⁸ CFU · mL ⁻¹)	
		EO630	G4T10
干粉马丁琼脂	—	97	66
显色培养基	配方一	0.01	104
	配方二	0.02	116
	配方三	0.04	85
	配方四	0.08	22

表 4 显色底物添加量对菌落形态的影响

Tab 4 Effect of chromogenic substrate addition on colonial morphology				
培养基	显色底物加量 /(g · L ⁻¹)	菌落形态		
		EO630 抗原	G4T10 抗原	
干粉马丁琼脂	—	S 型,淡黄色菌落,直径 2 mm	S 型,灰白色菌落,直径 1 mm	
显色培养基	配方一	S 型,浅红色菌落,直径 2 mm	S 型,灰白色菌落,直径 1 mm	
	配方二	S 型,红色菌落,直径 2 mm	S 型,灰白色菌落,直径 1 mm	
	配方三	S 型,红色菌落,直径 2 mm	S 型,灰白色菌落,直径 1 mm	
	配方四	S 型,红色菌落,直径 2 mm	S 型,灰白色菌落,直径 1 mm	

表 5 EO630 单价苗用两种琼脂计数结果

Tab 5 Test result of EO630 monovalent vaccines with two kinds of agar			
样品编号	抗原含量/(10 ⁸ CFU · 头份 ⁻¹)		回收率
	显色培养基	马丁琼脂	
1	3.4	3.0	1.13
2	2.6	2.5	1.04
3	3.6	3.7	0.97
4	3.3	3.5	0.94
5	3.8	3.4	1.10

表 6 G4T10 单价苗用两种琼脂计数结果

Tab 6 Test result of G4T10 monovalent vaccines with two kinds of agar			
样品编号	抗原含量/(10 ⁸ CFU · 头份 ⁻¹)		回收率
	显色培养基	马丁琼脂	
1	8.4	9.0	0.93
2	7.1	7.8	0.91
3	7.5	8.0	0.94
4	8.2	7.9	1.04
5	7.9	7.5	1.05

表 7 单价苗在两种琼脂上计数结果的方差分析

Tab 7 Variance analysis of counting results of monovalent vaccine on two kinds of agar			
抗原名称	抗原含量/(10 ⁸ CFU · 头份 ⁻¹)		显著性
	显色培养基	马丁琼脂	
单价苗 - EO630	3.34 ± 0.46	3.22 ± 0.48	<i>P</i> > 0.05
单价苗 - G4T10	7.82 ± 0.53	8.04 ± 0.57	<i>P</i> > 0.05

2.5 对猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗成品的检测结果 将表 8 的猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗计数结果经方差分析(表 9)得出,显色培养基与马丁琼脂上的猪肺疫 EO630 和猪丹毒 G4T10 抗原含量的计数结果无明显差异(*P* > 0.05)。

表 8 猪三联活疫苗成品抗原含量计数结果

Tab 8 Count results of swine triplex live vaccine				
样品编号	10 ⁸ CFU/头份			
	显色培养基	马丁琼脂	EO630	G4T10
1	3.3	8.5	3.1	8.2
2	2.7	7.3	3.0	7.2
3	3.5	7.8	3.5	7.5
4	3.3	8.3	3.1	8.2
5	3.6	8.2	3.7	7.9

表 9 猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗在两种琼脂上计数结果的方差分析

Tab 9 Variance analysis of counting results of swine triplex live vaccine on two kinds of agar				
抗原名称	抗原含量/(10 ⁸ CFU · 头份 ⁻¹)		显著性	
	显色培养基	马丁琼脂	EO630	G4T10
三联苗 - EO630	3.28 ± 0.35	3.28 ± 0.30	<i>P</i> > 0.05	
三联苗 - G4T10	8.02 ± 0.48	7.80 ± 0.44	<i>P</i> > 0.05	

3 小结与讨论

3.1 研究结论 本研究通过平行对比猪三联显色培养基和马丁琼脂得出,猪三联显色培养基在琼脂颜色方面优于对照组一干粉马丁琼脂,在制作方法和保质期方面优于对照组二新鲜马丁琼脂。在菌

落生长方面,猪肺疫能在显色培养基上显红色,而猪丹毒为灰白色,能通过肉眼快速、准确地鉴别。同时,该显色培养基的活菌计数结果与干粉马丁琼脂没有显著性差异($P > 0.05$),菌落回收率能达到 0.9 以上。显色底物的加量对比实验表明,显色底物的加量会影响猪肺疫活菌计数的结果,当加量为 0.02 g/L 时,显色效果最好,且对菌落生长没有抑制。因此,确定该猪三联显色培养基的主要成分为:蛋白胨 40 g、氯化钠 5 g、琼脂粉 15 g、显色底物 0.02 g、纯化水 1000 mL,调节 pH7.2 ~ 7.6。

3.2 研究过程遇到的问题 在猪瘟猪丹毒猪肺疫三联苗成品检测过程中发现,成品疫苗会在冻干及保存等过程中,部分抗原菌变弱或衰亡,部分菌落有生长延迟的现象,导致接种在计数平板上菌落大小不均一。尤其是猪肺疫,培养 24 h 时,部分猪肺疫菌落生长延迟,直径大小和猪丹毒菌落差不多,肉眼不易区分,只能继续培养至 48 h,待猪肺疫菌落长大,再进行菌落计数。而在猪三联显色培养基上,在培养 24 h 时,无论猪肺疫菌落大小,都能显红色,从而可以快速准确区分猪肺疫菌落和猪丹毒菌落。

3.3 应用推广 目前,利用显色底物、荧光底物与酶的特异性反应来检测、鉴定含特异性酶的微生物的新技术已经发展起来,其中利用酶显色底物的显色培养基检测不需要任何辅助设备,敏感性强、特异性高^[7],得到广泛的应用。本研究中的猪三联显色培养基就是通过添加酶显色底物,与猪肺疫中含有的特异性酶发生反应,产生红色物质,从而通过直接观察菌落颜色即可对菌种做出鉴定,克服了之前在马丁琼脂上,猪肺疫和猪丹毒两种菌落形态、颜色相近的缺点,从而能快速、准确地计算两种菌的抗原含量。

在猪丹毒猪肺疫二联苗、猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗的检验过程中,可能会受到多种因素影响^[8],如培养基质量、血清质量、培养条件、平板的平整度等,经常出现接种在马丁琼脂上的猪肺疫菌落大小不均一、或者两种菌落重叠和覆盖的情况,导致猪肺疫和猪丹毒不能肉眼区分,从而不能准确

地计算出疫苗抗原含量,重复检验或者辅助其他鉴别方法均会大大降低工作效率。因此利用显色培养基就能快速准确地进行鉴别和计数,大大提高了检测效率。

活菌计数是疫苗质量标准的重要参数,对于评价疫苗的安全性和免疫效力有重要意义。在细菌类疫苗生产过程中,无论是单价苗、二联苗还是三联苗,半成品检验、配苗以及成品检验等步骤均需要活菌计数来监测抗原菌含量,因此计数琼脂的高灵敏性和准确性就体现了很重要的作用。经研究表明,猪三联显色培养基的计数结果与对照组马丁琼脂无明显差异,因此可以代替马丁琼脂用于此类疫苗生产过程中的活菌计数和纯粹检验。

参考文献:

- [1] 徐晓剑,丁兆汉. 猪瘟、猪丹毒、猪多杀性巴氏杆菌病三联灭活苗的使用[J]. 中国畜禽种业, 2019(8): 71-72.
Xu X J, Ding Z H. Use of triplex inactivated vaccine of Swine Fever - Swine Erysipelas and *Pasteurella multocida* [J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2019 (8): 71-72.
- [2] 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]. 192-193.
Committee of Veterinary Biological products of Ministry Agriculture. The veterinary biological products regulations of the People's Republic of China, 2000 edition[S]. 192-193.
- [3] 徐中清,薛丽华. 马丁干粉培养基的性能研究[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(4): 19-21.
Xu Z Q, Xue L H. Study on the properties of Martin dry powder medium[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2004, 38(4): 19-21.
- [4] 王雷,宋延华,潘永飞. 一种检测猪瘟猪丹毒猪肺疫三联活疫苗抗原菌含量的选择性培养基及其制备方法和应用[P]. 中国:CN106755273A, 2017-05-31.
Wang L, Song Y H, Pan Y F. Preparation method and application for a selective culture medium for detecting antigen bacteria content of Swine Fever - Swine Erysipelas and *Pasteurella multocida* live triplex live vaccine [P]. China: CN106755273A, 2017-05-31.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 2015 年版[S].
Committee of China Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015 edition[S].

- [6] 杨金生, 刘云志, 宫江, 等. 猪丹毒杆菌的分离与鉴定[J]. 贵州畜牧兽医, 2017(6): 24-26.
Yang J S, Liu Y Z, Gong J, *et al.* Isolation and identification of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. Guizhou Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017 (6): 24-26.
- [7] 边俏, 罗芸许, 星星, 等. 一种用于艰难梭菌分离培养的新型显色培养基的性能评价[J]. 临床检验杂志, 2019(4): 301-304.
Bian Q, Luo Y X, Xing X, *et al.* Performance evaluation of a new chromogenic medium for isolation and culture of *Clostridium difficile* [J]. Journal of Clinical Laboratory, 2019 (4): 301-304.
- [8] 王秀丽, 刘博, 辛凌翔, 等. 多杀性巴氏杆菌类活疫苗活菌计数参考品的研究能力验证结果分析[J]. 中国兽药杂志, 2019(9): 34-37, 42.
Wang X L, Liu B, Xin L X, *et al.* Analysis on the verification results of the research ability of live bacteria counting reference materials of *Pasteurella multocida* live vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2019, (9): 34-37, 42.

(编辑:李文平)