

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.04

用冻干菌液进行猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病 二联灭活疫苗效力检验的研究

邵庆红, 邢佳鹏, 朱文革, 张连祥, 方鹏飞

(北京华信农威生物科技有限公司, 北京 102209)

[收稿日期] 2019-09-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019)11-0022-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 在猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗的效力检验中, 需要进行动物攻毒保护试验。传统方法使用的是 2~8℃ 保存的新鲜菌液对试验动物进行攻毒。本研究中使用的是低温保存的冻干菌液, 并对冻干保存的菌数进行了测定和优化。结果表明, 冻干保存的菌液能达到新鲜菌液同等的检验结果。同时, 对冻干菌液保存期进行试验验证, 发现细菌存活状态稳定。因此, 在猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗效力检验中, 可将新鲜的攻毒菌液冻干保存, 用于攻毒保护试验, 以避免每次繁重的新鲜菌液前期准备工作, 并克服活菌数衰减所造成的检验结果不准确等问题。

[关键词] 猪丹毒杆菌; 猪多杀性巴氏杆菌; 冻干菌液; 效力检验

Study on the Efficacy Test of Freeze-dried Strain for Combined Inactivated Swine Erysipelas and *Pasteurella multocida* Vaccine

SHAO Qing-hong, XING Jia-peng, ZHU Wen-ge, ZHANG Lian-xiang, FANG peng-fei

(Beijing Sino-agriva Biotech Co., Ltd., Beijing 102209, China)

Abstract: In the detection of vaccine efficacy of combined inactivated vaccine against swine erysipelas and *Pasteurella multocida*, challenge protection test is indispensable in animal models. In traditional method, fresh cultured bacteria, which is temporarily stored at 2~8℃, is always used to challenge animals. In this study, however, the bacteria lyophilized were used as challenge agent and the dose of lyophilized bacteria was measured and optimized in the experiments. The result shows that the lyophilized preserved bacteria liquid has the same effect with the fresh bacterial liquid. Meanwhile, the storage period of freeze-dried bacterial liquid was also verified and the result indicates that viability of bacteria is stable. Therefore, in the efficacy test of vaccine, the fresh cultured bacteria can be lyophilized and stored in the refrigerator as challenge agent which could avoid the repeated, time-consuming and arduous preparatory work and overcome the inaccurate results which may be caused by the attenuation of the viable of the bacteria.

Key words: lyophilization; swine erysipelas; *Pasteurella multocida*; effectiveness test

猪丹毒病是由猪丹毒杆菌引起猪的一种烈性传染病,发现较早,分布十分广泛,世界各大洲凡养猪地区几乎都有发生猪丹毒病的报道,给养猪业造成很大损失。我国是养猪大国,过去认为猪丹毒主要发生在南方各地,但近些年东北、华北、西北等北方地区发病也较多。这主要是因为近些年对病毒病的重视,忽视了细菌病的防控,往往复杂的猪病情况和不良环境导致猪免疫力下降,给猪丹毒杆菌有机可乘。猪多杀性巴氏杆菌病与猪丹毒病类似,均属条件致病菌,在正常条件下不会导致猪发病,但在环境比较差,如闷热、寒冷、潮湿、营养缺乏、密度过大等不良条件下,导致机体免疫力下降,就会使病原繁殖,从而引起发病^[1]。

疫苗接种是预防两种病发生的有效的方法。目前,市场上有减毒活疫苗、灭活疫苗,皆有良好的免疫效果。猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗因使用安全、易于保存、对母源抗体的影响不敏感、不受抗生素的影响且可联合免疫,得到广泛的认可^[2]。

效力检验是评价猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗保护效果的关键参数。此产品的效力检验需要进行动物攻毒试验,在以往的检验中,质检室一直使用新鲜菌液进行攻毒试验。这就需要在检验工作中进行大量的前期准备工作,如培养基配制、菌液繁殖、活菌计数、最小致死量确定等等,检验程序繁琐,工作量大。新鲜菌液一般在效力检验攻毒前 7 d 制备完毕,在进行攻毒试验之前攻毒用菌液置于 2~8℃ 冷藏状态中保存,但活菌数随着时间的延长而逐渐下降,从而会影响最终检验结果的准确性,而将菌液冻干更易于长期保存,也能减少检验人员的工作量^[3]。本研究就冻干保存的攻毒菌与新鲜菌液进行攻毒对比试验,并对冻干菌进行保存期验证,以期能将新鲜的攻毒菌液冻干保存用于产品的攻毒保护试验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 疫苗 猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗,由北京华信农威生物科技有限公司生产,批号为 183602、183603,规格为 20 mL/瓶,物理性状检验和安全检验及其他检验项目均合格。

1.1.2 攻毒用菌种 猪丹毒杆菌 1 型 C43-8 株(CVCC 43008)和 2 型 C43-6 株(CVCC 43006)、多杀性巴氏杆菌 C44-8 株(CVCC 44408)强毒菌液,基础菌种购自中国兽医药品监察所,由北京华信农威生物科技有限公司质检室自繁并鉴定合格,20%甘油,-70℃保存。其中,C43-6 株、C43-8 株同比例混合进行猪丹毒部分的效力检验,C44-8 株进行猪多杀性巴氏杆菌病部分的效力检验。

1.1.3 培养基 马丁肉汤,购自中海生物科技有限公司;裂解血细胞全血,购自北京平睿生物科技有限公司。

1.1.4 冻干保护剂 5%蔗糖脱脂牛奶冻干保护剂,由北京华信农威生物科技有限公司质检室自制,经 116℃、15 min 高压灭菌处理。

1.1.5 试验动物 16~18 g 清洁级小鼠,昆明系,雄性,76 只,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司;体重 1.5~2.0 kg 普通级兔,日本大耳白,性别不限,20 只,购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司。

1.1.6 小型冷冻干燥机 LABCONCO。

1.2 方法及判定标准

1.2.1 猪丹毒部分的效力检验 每批疫苗用体重 16~18 g 小鼠 32 只,分为冻干菌组和新鲜菌液组,每组设有免疫 1 组和免疫 2 组,同时设空白不免疫对照 1 组和对照 2 组。小鼠皮下接种疫苗 21 d 后,各免疫组和对照组分别用相应的猪丹毒杆菌混合菌液进行攻毒。攻毒后观察 10 d,每组注射 1000 MLD (Minimum Lethal Dose, 最小致死量,简写 MLD)的对照小鼠应全部死亡,注射 1 MLD 的对照小鼠至少死亡 2 只,免疫小鼠应至少保护 7 只^[4]。具体免疫方案和攻毒剂量见表 1。

表 1 猪丹毒部分效力检验

Tab 1 The detection of swine erysipelas

参数	免疫 1 组	免疫 2 组*	对照 1 组	对照 2 组
免疫剂量	0.1 mL/只	0.2 mL/只	-	-
免疫只数	5	5	3	3
攻毒剂量	1000MLD	1000MLD	1000MLD	1MLD

肩标*表示此组小鼠皮下注射 4 倍稀释的疫苗,即 1 份疫苗加 3 份 40% 氢氧化铝胶生理盐水的混合液

1.2.2 猪多杀性巴氏杆菌病部分的效力检验 每批疫苗用体重 1.5~2.0 kg 兔 12 只,分为冻干菌组和新细菌液组,每组设有免疫组和空白不免疫对照组。在疫苗接种 21 d 后,各免疫组和对照组分别用相应的 C44-8 株菌液进行攻毒,皮下注射 80~100 CFU (Colony-Forming Units, 菌落形成单位,简写 CFU)。攻毒后观察 8 d,对照组兔应全部死亡,免疫组兔应至少保护 2 只^[4]。具体免疫方案和攻毒剂量见表 2。

表 2 猪多杀性巴氏杆菌病部分效力检验

Tab 2 The detection of *Pasteurella multocida*

参数	免疫组	对照组
免疫剂量	2.0 mL/只	-
免疫只数	4	2
攻毒剂量	80~100 CFU	80~100 CFU

1.2.3 新鲜菌液的繁殖 马丁肉汤培养基按配方进行配制,分装量为 200 mL/瓶,按要求进行灭菌。在灭菌合格的马丁肉汤中加入 0.5% 的裂解血细胞全血混匀,分别按照 1.5% 的比例加入 C43-6 株、C43-8 株、C44-8 株三种甘油冻存菌,在 37 °C 摇床培养 5~6 h,手摇菌液呈明显的云雾状停止培养。

1.2.4 新鲜菌液的保存及冻干 将停止培养的三种菌液各取出 100 mL,分别加入适宜比例的蔗糖牛奶保护剂混匀分装至 7 mL 管制瓶,2.2 mL/瓶,放入冻干机进行 21~22 h 的冷冻真空干燥,置于 -70 °C 保存。将剩余的菌液置 2~8 °C 冰箱冷藏保存。

1.2.5 活菌计数

1.2.5.1 新鲜菌液的活菌计数 将停止培养的菌液用马丁肉汤进行倍比稀释,选择合适稀释度,平

铺法活菌计数,并多次复核最终确定攻毒前活菌数。

1.2.5.2 冻干菌的活菌计数 将经冷冻真空干燥的冻干菌用 1 mL 马丁肉汤进行复原,并进行倍比稀释,选择合适稀释度,平铺法活菌计数,并多次复核最终确定攻毒前活菌数。

1.2.6 猪丹毒杆菌最小致死量的测定 根据新鲜菌和冻干菌的活菌数,分别将 C43-6 和 C43-8 按活菌数进行同比例混合,选择不同的菌数剂量进行小鼠攻毒试验,能使小鼠死亡的最小活菌数为猪丹毒杆菌对小鼠的最小致死量。

1.2.7 冻干菌种保存期验证试验 将冻干的猪丹毒杆菌和猪多杀性巴氏杆菌自冻干日期起保存 2 个月、4 个月、6 个月、8 个月、10 个月、12 个月分别进行活菌计数,监测冻干菌在保存过程中的衰减情况。

2 结果与分析

2.1 猪丹毒杆菌最小致死量 将 2~8 °C 保存猪丹毒杆菌的新鲜混合菌液和 -70 °C 保存的冻干混合菌种分别选择 4 个剂量注射小鼠,小鼠死亡情况见表 3。可见,新鲜菌液的小鼠 MLD 为 3.2 CFU,冻干菌种的小鼠 MLD 为 6.7 CFU。

表 3 猪丹毒杆菌混合菌液的小鼠最小致死量

Tab 3 Minimum lethal dose in mice with erysipelas mixture

组别	注射剂量 /(CFU·只 ⁻¹)	注射小鼠数量 /只	死亡小鼠数量 /只
新鲜菌液组	1	3	1
	2.1	3	2
	3.2	3	3
	5.9	3	3
冻干菌组	3.0	3	2
	4.8	3	2
	6.7	3	3
	7.5	3	3

2.2 活菌计数 由于新鲜菌液在停止培养 7~10 d 内进行活菌计数和 MLD 的计算且细菌的活菌计数只是一个相对值,故从表 4 的数据可以看出猪

丹毒杆菌和猪多杀性巴氏杆菌新鲜菌液在攻毒前和攻毒时的活菌数虽有差异但并不显著。另外,冻干菌种活菌计数需要用适宜培养基复融不易再次

保存,攻毒前和攻毒后也只是复核活菌数,故没有进行攻毒后的活菌数对比。表 5 数据表明冻干后的菌种在 -70 °C 保存一年细菌计数结果稳定。

表 4 活菌计数

Tab 4 Live bacterial count

菌株	新鲜菌液的活菌数		冻干菌液的活菌数	
	攻毒前	攻毒时	攻毒前	攻毒时
C43 - 6 株	1.20 × 10 ⁹ CFU/mL	—	1.39 × 10 ⁹ CFU/mL	—
C43 - 8 株	2.40 × 10 ⁹ CFU/mL	—	2.67 × 10 ⁹ CFU/mL	—
C43 - 6、C43 - 8 株混合菌液	1.57 × 10 ⁹ CFU/mL	1.44 × 10 ⁹ CFU/mL	2.58 × 10 ⁹ CFU/mL	2.81 × 10 ⁹ CFU/mL
C44 - 8 株	5.50 × 10 ⁹ CFU/mL	6.00 × 10 ⁹ CFU/mL	1.30 × 10 ⁹ CFU/mL	1.50 × 10 ⁹ CFU/mL

表 5 冻干菌种保存期验证试验

Tab 5 Test of lyophilized bacteria preservation period

保存期	活菌数		
	C43 - 6 株	C43 - 8 株	C44 - 8 株
保存 2 个月	1.4 × 10 ⁹ CFU/mL	2.2 × 10 ⁹ CFU/mL	1.2 × 10 ⁹ CFU/mL
保存 4 个月	1.53 × 10 ⁹ CFU/mL	2.8 × 10 ⁹ CFU/mL	1.4 × 10 ⁹ CFU/mL
保存 6 个月	1.46 × 10 ⁹ CFU/mL	2.62 × 10 ⁹ CFU/mL	1.33 × 10 ⁹ CFU/mL
保存 8 个月	1.35 × 10 ⁹ CFU/mL	2.5 × 10 ⁹ CFU/mL	1.61 × 10 ⁹ CFU/mL
保存 10 个月	1.21 × 10 ⁹ CFU/mL	2.16 × 10 ⁹ CFU/mL	1.46 × 10 ⁹ CFU/mL
保存 12 个月	1.48 × 10 ⁹ CFU/mL	2.7 × 10 ⁹ CFU/mL	1.6 × 10 ⁹ CFU/mL

2.3 攻毒保护试验结果

2.3.1 猪丹毒部分效力检验攻毒保护结果 两批疫苗的猪丹毒部分效力检验分别用新鲜菌液和冻干菌种进行小鼠攻毒试验,详细数据见表 6。新鲜菌液组注射 1 MLD 剂量的对照组 2 小鼠全部死亡,注射 1 000 MLD 剂量的对照组 1 的小鼠全部死亡,

183602 批免疫组小鼠有 9/10 只保护,183603 批免疫组的小鼠有 8/10 只保护。冻干菌液组注射 1 MLD 剂量的对照组 2 的小鼠全部死亡,1000 MLD 剂量的对照组 1 的小鼠全部死亡,183602 批免疫组的小鼠有 10/10 只保护,183603 批免疫组小鼠有 10/10 只保护。

表 6 两批猪丹毒部分效力检验

Tab 6 The detection of swine erysipelas

参数	新鲜菌液组				冻干菌液组			
	免疫组 1	免疫组 2	对照组 1	对照组 2	免疫组 1	免疫组 2	对照组 1	对照组 2
攻毒剂量*	3400	3400	3400	3.4	7000	7000	7000	7.0
183602 批效检结果	4/5 保护 9/10 保护	5/5 保护	3/3 死亡	3/3 死亡	5/5 保护	5/5 保护	3/3 死亡	3/3 死亡
183603 批效检结果	4/5 保护 8/10 保护	4/5 保护	3/3 死亡	3/3 死亡	5/5 保护	5/5 保护	3/3 死亡	3/3 死亡

肩标 * 表示以攻毒时活菌计数的量计算,单位是 CFU

2.3.2 猪多杀性巴氏杆菌病部分效力检验攻毒保护结果 两批疫苗的猪多杀性巴氏杆菌病部分效力检验分别用新鲜菌液和冻干菌液进行兔子攻毒试验,详细数据见表 7。新鲜菌液组对照组兔 2/2 死亡,183602 批免疫组兔子 3/4 保护,183603 批免疫组兔子 2/4 保护。冻干菌液组对照组兔 2/2 死亡,183602 批免疫组兔 3/4 保护,183603 批免疫组

兔子 3/4 保护。

从表 7 数据看出新鲜菌液和冻干菌种的攻毒剂量基本一致,这是由于此产品检验标准规定为攻含活菌 80 ~ 100 CFU,而 C44 - 8 对兔的最小致死量至多为 10 CFU^[5],故猪多杀性巴氏杆菌病部分效力检验部分无论新鲜菌液还是冻干菌种攻毒用活菌数都控制在 90 CFU 左右。

表 7 两批猪多杀性巴氏杆菌病部分效力检验

Tab 7 The detection of *Pasteurella multocida*

参数	新鲜菌液组		冻干菌液组	
	免疫组	对照组	免疫组	对照组
攻毒剂量*	90 CFU	90 CFU	93 CFU	93 CFU
183602 批效检结果	3/4 保护,1/4 死亡	2/2 死亡	3/4 保护,1/4 死亡	2/2 死亡
183603 批效检结果	2/4 保护,2/4 死亡		3/4 保护,1/4 死亡	

肩标 * 表示以攻毒时活菌计数的量计算,单位是 CFU

3 讨论与结论

新鲜菌液在冷藏状态中细菌活性逐渐衰减,最佳保存时间仅为一周左右,而冻干菌种在 12 个月的监测期内活菌计数结果稳定,更易于长期保存^[6-8],故利用冻干菌进行攻毒试验在保证攻毒菌数准确的前提下,避免了每个批次的产品检验都进行菌种繁殖、重复计数复核等工作,也降低了攻毒失败的风险,简化检验操作,提高工作效率,是值得推行的方法。

冻干菌种相对新鲜菌液有一定优势,但冻干过程可能会影响细菌体内部分酶的活性,降低细菌的活力和致病性^[9-10],导致最小致死剂量会发生变化,因此应定期对冻干菌种的毒力进行监测,外加实验动物的个体差异,每次攻毒前应当测定冻干菌种对实验动物的最小致死剂量。

此研究利用两批产品的效力检验进行了冻干菌种和新鲜菌液的攻毒试验对比,冻干菌种在试验中能够达到新鲜菌液同等的检验结果。另外在长期保存过程中冻干保存的菌种活菌数稳定,可以保证对照组死亡,检验成立。初步说明将攻毒用菌液进行冻干保存用于猪丹毒、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗效检攻毒试验是可行的。

参考文献:

[1] 郭中华. 猪多杀性巴氏杆菌病的症状、诊断及防治[J]. 现代畜牧科技, 2016, 12(24): 115 - 116.
Guo Z H. Symptoms, diagnosis and prevention of *Pasteurella multocida* disease[J]. Modern Animal Husbandry Science and Technology, 2016, 12(24): 115 - 116.

[2] 万莉, 韩国全, 郭万柱, 等. 猪丹毒疫苗的研究进展[J]. 猪业科学, 2010(6): 32 - 35.
Wan L, Han G Q, Guo W Z, et al. Research Progress in erysipelothrix rhusiopathiae vaccine[J]. Swine Industry Science, 2010(6): 32 - 35.

[3] 赵蕾, 沈志强, 梅建国, 等. 兽用生物制品常用的菌种保存方法探讨[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(7): 8 - 9
Zhao L, Shen Z Q, Mei J G, et al. Discussion on the preservation method of bacteria commonly used in animal biologicals[J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010(7): 8 - 9.

[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二〇一五年版[S]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 49 - 52.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the people's Republic of China 2015 edition[S]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2015: 49 - 52.

[5] 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]. 化学工业出版社, 2000: 67 - 69.
Committee of Veterinary Biologics Outlines of Ministry of Agricul-

- ture. Regulations of the People's Republic of China on Veterinary Biological Product 2000 edition [S]. Chemical Industry Press, 2000: 67 - 69.
- [6] 张爱梅, 郭大成, 王建丽. 国内菌种保藏材料及保藏方法研究现状[J]. 河南预防医学杂志, 2011, 6:405 - 407.
Zhang A M, Guo D C, Wang J L. The recent research of our country in the material and methods of the virus preservation[J]. Henan Journal of Preventive Medicine, 2011, 6:405 - 407.
- [7] 常金梅, 蔡芷荷, 吴清平, 等. 菌种冷冻干燥保藏的影响因素[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 959 - 962.
Chang J M, Cai Z H, Wu Q P, *et al.* Influencing factors of freeze - drying preservation of Culture[J]. Microbiology China, 2008, 35(6): 959 - 962.
- [8] 龚建森, 刘学贤, 许明, 等. 鸡白痢沙门氏菌冻干菌种保存试验[J]. 南方农业学报, 2013, 44(1): 145 - 149.
Gong J S, Liu X X, Xu M, *et al.* Preservation experiment on frozen - dried Salmonella pullorum strain[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(1): 145 - 149.
- [9] 刘丽凤, 孟祥晨. 双歧杆菌的冻干损伤及保护[J]. 中国乳品工业, 2006(1): 39 - 43.
Liu L F, Meng X C. Damage by freeze - drying and protection of Bifidobacterium[J]. China Dairy Industry, 2006(1): 39 - 43.
- [10] 张光磊, 张新创, 翟雷. 活菌制剂冻干保护剂的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2015(4): 80 - 85.
Zhang G L, Zhang X C, Zhai L. Advances on cryoprotectants of live bacteria preparations [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2015(4): 80 - 85.

(编辑:李文平)