

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.01.03

禽多杀性巴氏杆菌检验用菌种的研究

冯妍,张一帜,王秀丽,王甲,刘燕,姚文生,任小侠*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2023-09-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 01-0013-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为研究禽多杀性巴氏杆菌类兽用生物制品效力评价用菌株,制备了一批禽多杀性巴氏杆菌 CVCC44801 株,并对菌种的形态、生化特性、培养特性、血清学特性、真空度、纯粹、剩余水分及毒力等进行检定,进一步评估了冻干菌菌数的稳定性,对冻干菌与新鲜培养菌液的毒力进行了比较。试验结果表明,该冻干菌种的形态及生化特性、培养特性、血清学特性、真空度、纯粹、剩余水分、毒力均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇版菌种标准的规定。冻干菌菌数保持稳定,并且与新鲜培养的攻毒菌液相比,毒力并无差异。本研究为禽多杀性巴氏杆菌类兽用生物制品效力评价用菌株的制备和检定提供参考依据。

[关键词] 禽多杀性巴氏杆菌 CVCC44801 株;毒力;效力评价

Study on Strains for Testing *Pasteurella multocida* in Poultry

FENG Yan, ZHANG Yi-zhi, WANG Xiu-li, WANG Jia, LIU Yan,

YAO Wen-sheng, REN Xiao-xia*

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

Corresponding author: REN Xiao-xia, E-mail: 413655463@qq.com

Abstract: In order to study the strains of *Pasteurella multocida* for the efficacy evaluation of veterinary biological products, a batch of avian *Pasteurella multocida* CVCC44801 strains were prepared, and the morphology, biochemical characteristics, culture characteristics, serological characteristics, vacuum degree, purity, residual water and virulence of the strains were tested, and the stability of the freeze-dried bacteria was further evaluated. The virulence of freeze-dried bacteria was compared with that of freshly cultured bacteria. The results showed that the morphology, biochemical characteristics, culture characteristics, serological characteristics, vacuum degree, purity, residual water and virulence of the lyophilized strain were in accordance with the quality standard of the Regulations of the People's Republic of China on Veterinary Biological Products 2000 edition. The number of freeze-dried bacteria remained stable, and the virulence was not different from that of freshly cultured

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项(GY202104)

作者简介: 冯妍, 硕士, 从事细菌类生物制品的检测及相关科研工作。

通讯作者: 任小侠。E-mail: 413655463@qq.com

bacteria. This study provides a reference for the preparation and verification of strains for the efficacy evaluation of *Pasteurella multocida* bioproducts for veterinary use.

Key words: avian *Pasteurella multocida* CVCC44801 strain; virulence; effectiveness evaluation

禽多杀性巴氏杆菌病又称禽霍乱,是由多杀性巴氏杆菌所引起的鸡、火鸡、鸭、鹅等禽类的一种出血性、败血性传染病,在各地呈散发性或地方性流行^[1]。各种家禽、野禽对多杀性巴氏杆菌均易感染,发病率和死亡率高^[2]。该病主要通过呼吸道、消化道及皮肤外伤感染发病,导致禽霍乱。通过对鸡只的解剖检查以及实验室诊断可以准确地诊断疾病,帮助疾病的早期预防和治疗^[3]。目前对于该病的控制措施,主要采用的是四环素、氟苯尼考及链霉素治疗,但易产生抗药^[4],且应用时间较长时对禽体尤其是泌尿系统产生明显毒害作用^[5]。疫苗免疫也是防控该病的重要手段,发展安全高效的禽多杀性巴氏杆菌类疫苗以及对应检验方法成为疾病防控的迫切需求^[6]。目前禽多杀性巴氏杆菌类疫苗效力检验通常采用新鲜培养物进行预数菌,根据预数菌的结果再重新培养进行攻毒,两次培养条件和结果很难达到完全一致,有可能会对效力评价结果产生一定影响。本研究制备了一批禽多杀性巴氏杆菌检验攻毒用冻干菌株,并对菌种的形态及生化特性、培养特性、血清学特性、真空度、纯粹、剩余水分、毒力等进行检定,进一步评估了冻干菌数的稳定性,对冻干菌与新鲜培养菌液的毒力进行了比较。对于禽多杀性巴氏杆菌检验攻毒用菌株的研究有助于客观评价不同的商品化疫苗,有利于提高生物制品检验的规范性和科学性,为疫苗质量提升和迭代升级提供基础方法支撑。

1 材料与方法

1.1 菌种 禽多杀性巴氏杆菌 CVCC44801 株,2000 年 3 月 22 日由国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心提供。

1.2 培养基及试剂 马丁肉汤培养基、改良马丁琼脂培养基、液体硫乙醇酸盐培养基(TG)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、酪胺琼脂培养基(GA)、生理盐水、磷酸盐缓冲液(pH6.0)均购自北京中海生

物技术有限公司;ID 32 E,购自 Bio Mérieux 公司;健康动物血清,购自 PAN-BIOTECH;革兰氏染液、瑞氏染液,购自北京索莱宝科技有限公司;普鲁兰多糖、海藻糖二水合物、PVP K30、甘露醇、硫脲,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水氯化钙,购自国药集团化学试剂有限公司;蔗糖、明胶,购自 BBI Life Sciences;绵羊脱纤血、绵羊裂解血球全血,实验室自制。多杀性巴氏杆菌 A 群定型血清、多杀性巴氏杆菌 B 群定型血清、多杀性巴氏杆菌 D 群定型血清,购自中国兽医药品监察所。

1.3 实验动物 SPF 鸡,91 日龄、111 日龄,购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司。

1.4 冻干保护剂的配置 普鲁兰多糖 0.5 g、蔗糖 3.5 g、海藻糖二水合物 6.0 g、明胶 2.0 g、PVP K30 0.2 g、甘露醇 0.2 g、硫脲 1.2 g、无水氯化钙 1.11 g,溶于 100 mL 蒸馏水,混匀,调 pH 至 7.3。

1.5 菌种制备 取菌种进行真空度检测,出现辉光,真空度良好。开启菌种用 1.0 mL 马丁肉汤溶解,接种于含 0.1% 裂解血球全血及 4% 健康动物血清的改良马丁琼脂平板 3 付,37 °C 培养 16 h。之后挑取该平板上的典型 Fo 菌落,接种于含 0.1% 裂解血球全血的马丁肉汤培养 24 h,原液肌肉注射 111 日龄 SPF 鸡 1 只,1 mL/只。SPF 鸡于 24 h 内死亡,剖检,分离细菌。取肝脏组织和心血分别接种于含 0.1% 裂解血球全血及 4% 健康动物血清的改良马丁琼脂平板,37 °C 培养 24 h。挑选单个典型 Fo 型菌落接种于接种改良马丁琼脂中管培养基,37 °C 培养 24 h。在改良马丁琼脂中管斜面培养物中加入冻干保护剂,混合均匀分装,每支 0.5 mL,进行冻干,制备完成效力评价禽多杀性巴氏杆菌菌种 1 株。

1.6 菌种的检定

1.6.1 真空度测定、纯粹检验及剩余水分检定 根据 2020 年版《中国兽药典》进行检验^[7]。

1.6.2 培养特性检定 用接种环刮取少量菌体在含 4% 健康动物血清及 0.1% 裂解血细胞全血的改良马丁琼脂平板上划线培养,37 °C 培养 16 h,观察菌落形态。

1.6.3 形态和生化特性检定 取新鲜培养的改良马丁琼脂平板上的菌体进行革兰氏染色,镜检;取毒力检定中死亡的 SPF 鸡进行剖检,取肝脏组织涂片,进行瑞氏染色,镜检。使用 ID 32 E 快速鉴定试剂盒参照使用说明书进行生化特性检查。

1.6.4 血清学特性检定 用磷酸盐缓冲液将改良马丁琼脂平板上新鲜培养的菌体洗下,加入透明质酸酶溶液。混匀后,至于 37 °C 水浴 4 h,8000 r/min 离心 20 min,取含有荚膜抗原的上清液与新鲜红细胞混合,置 37 °C 培养 24 h,1500 r/min 离心 10 min,弃上清液,留致敏的红细胞,用生理盐水配成 1% 的致敏红细胞悬液。将 A、B、D 型定型血清 56 °C 水浴 30 min 后,作 1:5 倍稀释,然后各管加 1% 致敏红细胞悬液。血清对照:A、B、D 定型血清稀释液 + 1% 正常红细胞液混合;抗原对照:1% 致敏红细胞悬液 + 生理盐水;血球对照:1% 正常红细胞悬液 + 生理盐水;各管混匀后,置 37 °C 培养箱作用 2 h,观察是否出现凝集现象。

1.6.5 稳定性检定 冻干后 0、1、3、6、12 个月,随

机抽取 3 支冻干菌种进行活菌计数。

1.6.6 毒力检定 根据均一性检定结果,取冻干菌种直接用马丁肉汤稀释至 8、4、2 CFU/mL,1 mL/只肌肉注射 SPF 鸡各 4 只,应于 3 日内全部死亡。同时取新鲜培养菌液,用马丁肉汤稀释至 8、4、2 CFU/mL,1 mL/只肌肉注射 SPF 鸡各 4 只。

2 结果与分析

2.1 真空度测定 对冻干菌种进行真空度测定,均呈现白色或紫色辉光,符合规定。

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

2.3 剩余水分测定 抽取 4 支真空度测定良好菌种进行剩余水分测定,剩余水分测定结果为 1.4%、1.2%、1.7%、1.4%,符合规定。

2.4 培养特性检定 肉眼观察培养 16 h 的菌落状态,菌落表面光滑,呈微蓝色;在低倍显微镜下,45 度折光观察,菌落结构细致,边缘整齐,呈桔黄色,属 Fo 菌落型。

2.5 形态和生化特性检定 挑取新鲜培养物进行革兰氏染色,结果为革兰氏阴性杆菌,对毒力检验中死亡的 SPF 鸡进行剖检,取肝脏组织涂片,瑞氏染色为两级着色球杆菌,生化检定结果符合禽多杀性巴氏杆菌培养特性,见表 1。

表 1 CVCC44801 菌种生化特性检定结果

Tab 1 Biochemical characteristics results of strain CVCC44801

试验	反应/酶	结果	试验	反应/酶	结果
ODC	鸟氨酸脱羧酶	-	IND	吡啉反应	+
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	-	βCAL	β-半乳糖苷酶	-
URE	脲酶	-	GLU	葡萄糖	+
LARL	L-阿拉伯糖	-	SAC	蔗糖	+
GAT	半乳糖酸盐	-	LARA	L-阿拉伯糖	-
5KC	5-酮基-葡萄糖酸钠	-	DARL	D-阿拉伯糖醇	-
LIP	脂酶	-	αGLU	α-葡萄糖	-
RP	酚红	-	αGAL	α-半乳糖苷酶	-
βOLU	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	帕拉金糖	-	SOR	山梨醇	-
βGUR	β-葡萄糖酸酶	-	αMAL	麦芽糖苷酶	-
MNT	丙二酸	-	ASPA	L-天冬氨酸酰胺酶	-

“+”表示反应结果阳性,“-”表示反应结果阴性

2.6 血清学特性检定 结果见表 2。荚膜抗原与 B 型、D 型血清无凝集反应,与 A 型定型血清有凝集反应,(表 2)。判定血清学特性检定结果均符合规定。

表 2 CVCC44801 菌种血清学特性检定结果

Tab 2 Serological characterization results of strain CVCC44801

试验	结果
A 型定型血清 +1% 的致敏红细胞	+
B 型定型血清 +1% 的致敏红细胞	-
D 型定型血清 +1% 的致敏红细胞	-
A 型定型血清 +1% 正常红细胞(血清对照)	-
B 型定型血清 +1% 正常红细胞(血清对照)	-
D 型定型血清 +1% 正常红细胞(血清对照)	-
1% 致敏红细胞悬液 + 生理盐水(抗原对照)	-
1% 正常红细胞悬液 + 生理盐水(血球对照)	-

“+”表示有凝集反应,“-”表示无凝集反应

2.7 稳定性检定 冻干后 0、1、3、6、12 个月,随机抽取 3 支冻干菌种进行活菌计数,将保存 1、3、6、12 个月的冻干菌种分别与保存 0 个月的冻干菌种菌数进行 *t* 检验对比分析。结果显示,冻干菌种在 -70 °C 保存 1 月、3 月、6 月、12 月与保存 0 个月的菌数无显著性差异 ($P > 0.05$),该冻干菌种在 -70 °C 保存条件下稳定性良好。结果见表 3 和图 1。

2.8 毒力检定 将 -70 °C 以下保存 9 个月的 CVCC44801 株冻干菌种稀释至 10^{-7} ,取 5 mL 菌种加入 7.5 mL 培养基,再进行 2 倍稀释,1 mL/只肌肉注射 SPF 鸡各 4 只,注射剂量经复数为 7、3、2 CFU/只。取冻干菌种 24 h 培养物进行活菌计数,根据活菌计数结果,相同培养条件培养攻毒菌液,按照活菌计数结果稀释至 10^{-7} ,取 10^{-7} 菌液 1 mL + 16.75 mL 培养基再进行 2 倍稀释,1 mL/只肌肉注射 SPF 鸡各 4 只,注射剂量经复数为 7、4、2 CFU/只(表 4)。

表 3 CVCC44801 菌种稳定性检定试验结果

Tab 3 Stability test results of strain CVCC44801

冻干后时间/月	活菌计数 (CFU/支)	平均值 (CFU/支)	<i>t</i> -检验 <i>P</i> 值
0	3.2×10^8 、 3.0×10^8 、 2.9×10^8	3.0×10^8	/
1	3.2×10^8 、 3.4×10^8 、 3.5×10^8	3.4×10^8	0.0557
3	3.3×10^8 、 3.5×10^8 、 3.2×10^8	3.3×10^8	0.0739
6	3.5×10^8 、 3.1×10^8 、 3.9×10^8	3.5×10^8	0.1321
12	3.0×10^8 、 3.4×10^8 、 3.2×10^8	3.2×10^8	0.3153

$P > 0.05$ 为差异不显著

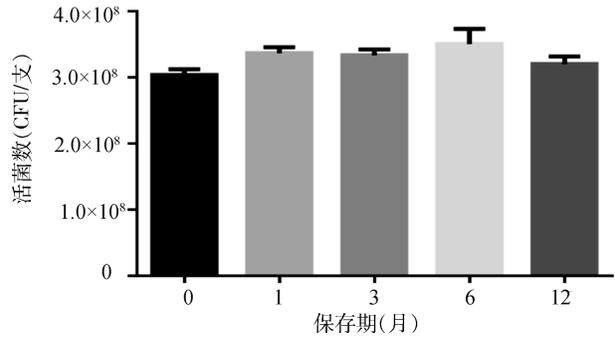


图 1 CVCC44801 菌种稳定性检定试验结果

Fig 1 Stability test results of strain CVCC44801

表 4 CVCC44801 菌种毒力检定试验结果

Tab 4 Virulence test results of strain CVCC44801

分组	SPF 鸡数量/只	实际注射剂量/CFU	不同时间动物死亡数/只			结果
			24 h	48 h	72 h	
新鲜菌液	4	7	4	/	/	4/4 死亡
	4	3	2	2	/	4/4 死亡
	4	2	0	2	1	3/4 死亡
冻干菌种	4	7	3	1	/	4/4 死亡
	4	4	3	1	/	4/4 死亡
	4	2	0	1	1	2/4 死亡

3 讨论与小结

本研究检定该批禽多杀性巴氏杆菌 CVCC44801 株培养特性、形态及生化特性、血清学特性、毒力、纯粹、剩余水分及真空度项目均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版菌种标准的规定^[8]。使用新鲜培养的攻毒菌液与冻干的攻毒菌株进行比较,毒力无明显差异。目前禽多杀性巴氏杆菌类灭活疫苗效力检验存在的主要问题有:(1)效力检验用菌株受培养基、培养条件及菌株筛选因素影响,预试验与正式攻毒偏差大^[9];(2)同一类型不同企业产品效检用菌毒种差异大,企业间

检验水平参差不齐。为全面客观评价行业内疫苗质量,亟需建立通用的效检菌株标准物质对毒力、稳定性等指标进行统一。针对以上问题,通过本研究制备的冻干菌株,复溶后直接进行攻毒,可不受培养基、培养条件等因素对菌液培养的影响,从而避免了菌数不稳定导致的实验偏差。另一方面通过实验验证了冻干菌种的毒力和稳定性,证明其具备替代新鲜菌液攻毒的能力。现有的禽多杀性巴氏杆菌类生物制品,都使用 CVCC44801 株进行效力检验,可对不同企业的产品质量提供统一评价。并且与传统的蔗糖牛奶以及明胶类冻干保护剂相比较,本研究采用复合型保护剂添加糖类、醇类、聚合物、盐类等,糖类能抑制蛋白的变性^[10],醇类能加速冻干的干燥过程防止蛋白质之间相互作用导致的变性^[11],聚合物能促进胞外粘性层形成保护细胞膜^[12],通过不同保护机制成分共同协同促进^[13],有效提高冻干菌种的稳定性。本研究通过对禽多杀性巴氏杆菌 CVCC44801 株的制备及检定,为相关兽用生物制品效力评价用菌株的研究提供了参考。

参考文献:

- [1] 倪洪权. 鸡禽霍乱的流行病学、诊断及防控措施[J]. 现代畜牧科技, 2020(09): 142-143.
- Ni H Q. Epidemiology, diagnosis and control measures of chicken cholera[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2020(09): 142-143.
- [2] 战武. 禽霍乱病的诊断和防治措施[J]. 中国畜禽种业, 2022, 18(06): 187-188.
- Zhan W. Diagnosis and control measures of avian cholera[J]. The Chinese Livestock and Poultry Breeding, 2022, 18(06): 187-188.
- [3] 王爱琴. 禽霍乱疾病的实验室诊断及防治措施[J]. 中国动物保健, 2022, 24(01): 65-67.
- Wang A Q. Laboratory diagnosis and control of avian cholera disease[J]. China Animal Health, 2022, 24(01): 65-67.

- [4] 陈红梅, 程龙飞, 邓辉, 等. 禽源多杀性巴氏杆菌耐药性分析及氟苯尼考耐药基因 floR 分布[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(03): 93-96.
- Chen H M, Cheng L F, Deng H, et al. Analysis of antimicrobial resistance and distribution of the floR gene in *Pasteurella multocida* isolated from poultry [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 51(03): 93-96.
- [5] 李浩, 刘阳, 李长安. 多杀性巴氏杆菌病研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(2): 31-32.
- Li H, Liu Y, Li C A. Progress of multocida pasteurellosis[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2011, 30(2): 31-32.
- [6] 梁圣, 赵新新, 程安春. 禽霍乱新型疫苗的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(11): 2317-2325.
- Liang S, Zhang X X, Cheng A C. Progress in development of new-type vaccines against fowl cholera[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2018, 49(11): 2317-2325.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 中国农业出版社, 2021.
- Committee of China Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia People's Republic of China, 2020 edition [S]. China Agriculture Press, 2021.
- [8] 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版[S]. 化学工业出版社, 2000.
- Committee of Veterinary Biological products of Ministry Agriculture. Regulations of the People's Republic of China on Veterinary Biological Products, 2000 edition [S]. Chemical Industry Press, 2000.
- [9] 王秀丽, 刘元杰, 罗玉峰, 等. 马丁琼脂培养基质量控制标准研究[J]. 中国兽药杂志, 2023, 57(05): 21-26.
- Wang X L, Liu Y J, Luo Y F, et al. Study on quality control standard of martin agar medium [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2023, 57(05): 21-26.
- [10] Bemy J F, Hennebert G L. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates[J]. Mycologia, 2018, 83(6): 805-815.
- [11] Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2011, 63(13): 1053-1073.

(编辑:李文平)