

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.05.04

马丁琼脂培养基质量控制标准研究

王秀丽,刘元杰,罗玉峰,朱良全,李建,刘燕,李俊平*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-09-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2023)05-0021-06 [中图分类号] Q93-335

[摘要] 为建立马丁琼脂培养基质量控制标准,系统评价马丁琼脂培养基适应性和促生长能力,运用多杀性巴氏杆菌、丹毒杆菌和链球菌类活疫苗活菌计数参考品,通过活菌计数统计分析,对新鲜马丁琼脂、干粉马丁琼脂或改良马丁琼脂进行适应性和促生长能力系统测试。结果显示:新鲜马丁琼脂、干粉马丁琼脂和改良马丁琼脂均对多杀性巴氏杆菌、丹毒杆菌、链球菌的适应性和促生长能力差异显著,需同时选择巴氏杆菌类、丹毒杆菌类、链球菌类活疫苗计数参考品评价马丁琼脂培养基的适应性和促生长能力,表明活菌计数参考品用于建立马丁琼脂质量控制标准是可行的。

[关键词] 马丁琼脂培养基;活菌计数;参考品;适应性;促生长能力

Study on Quality Control Standard of Martin Agar Medium

WANG Xiu-li, LIU Yuan-jie, LUO Yu-feng, ZHU Liang-quan, LI Jian, LIU Yan, LI Jun-ping*

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

Corresponding author: LI Jun-ping, E-mail: lijunping03@163.com

Abstract: In order to evaluate the adaptability and growth promoting ability of Martin agar medium systematically, and establish quality control standard of Martin agar medium. This study used *Pasteurella multocida*, *Erysipelas* and *Streptococcus* live vaccine viable count reference to test the adaptability and growth promoting ability of fresh Martin agar, dry powder Martin agar and modified Martin agar through the statistical analysis of viable count. The results show that the adaptability and growth ability is very different among *Pasteurella multocida*, *Erysipelas* and *Streptococcus* to fresh Martin agar, Martin agar powder and modified Martin agar. It is necessary to choose *Pasteurella multocida*, *Erysipelas* and *Streptococcus* live vaccine viable count reference at the same time, to evaluate the adaptability and growth-promoting ability of Martin agar medium, shows that it is feasible to establish a standard index for quality control of Martin agar with viable count reference.

Key words: Martin agar medium; live bacteria count test; reference; adaptability; growth-promoting ability

基金项目: 兽药行业公益性重点专项(GY202010)

作者简介: 王秀丽, 硕士, 从事兽用生物制品检验及检测技术研究。

通讯作者: 李俊平。E-mail: lijunping03@163.com

活菌含量是影响兽用细菌类活疫苗安全性和免疫效力的关键指标,其通过活菌计数法测定。计数准确是生产合格产品的前提,也是客观评价产品质量的基本要求。马丁琼脂培养基是《中国兽药典》规定的链球菌、巴氏杆菌、猪丹毒杆菌类兽用生物制品重要的生产和检验培养基^[1-2],尚无统一质量标准。培养基的生产企业一般从培养基的性状、无菌检验和 pH 值测定等参数对培养基进行质量控制,对于生产和检验最重要的参数—适应性和促生长能力,因缺少质控依据而未控制。培养基的适应性和促生长能力又是影响计数结果的关键因素。因此,系统评价活菌计数培养基的适应性和促生长能力,建立检验培养基质量控制标准,对客观评价兽用细菌类疫苗质量意义重大。

多杀性巴氏杆菌、链球菌、猪丹毒杆菌和沙门氏菌活菌计数参考品^[3-5]是由本实验室经过长期研究制备而成,参考品经协作标定定值,具有良好的均一度和稳定性,在 -70 ℃ 保存 5 年以内其活菌数不下降。可作为相应产品活菌计数检验的对照品用于计数过程的质量控制,判断检验结果是否有效,尤其是对于评估检验用培养基质量的影响有重要意义。

《中国兽药典》中用于多杀性巴氏杆菌、链球菌和猪丹毒杆菌类产品活菌计数检验的马丁琼脂培养基制备方法一致,但马丁琼脂培养基成品质量受多种因素的影响。2016 - 2019 年监督或复核检验中猪瘟、猪丹毒、猪多杀性巴氏杆菌三联活疫苗活菌计数检验中曾 3 次出现猪丹毒活菌计数结果符合规定,多杀性巴氏杆菌计数结果为 0 的情况,初步表明猪丹毒和多杀性巴氏杆菌对马丁琼脂培养基的适应性有显著差异。本研究拟用活菌计数参考品对 2020 年 9 月至 2021 年 12 月购自不同厂家的干粉或新鲜马丁琼脂培养基进行监测,以评价马丁琼脂培养基的适应性和促生长能力,以期建立马丁琼脂培养基质量控制标准提供依据。

1 材料与方法

1.1 参考品 多杀性巴氏杆菌类活疫苗活菌计数参考品,批号:201701,菌数 $2.1 \times 10^{10} \sim 3.0 \times 10^{10}$ CFU/瓶,丹毒杆菌类活疫苗活菌计数参考品,批号:

201701, $4.3 \times 10^{10} \sim 6.3 \times 10^{10}$ CFU/瓶,链球菌类活疫苗活菌计数参考品,批号:201801, $8.5 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^8$ CFU/瓶,均由中国兽医药品监察所研制和标定。

多杀性巴氏杆菌类活菌计数参考品、链球菌类活菌计数参考品、丹毒杆菌类活菌计数参考品均用 10 mL 马丁肉汤溶解,分别 10 倍系列稀释至 $10^{-6}/3$ 、 10^{-5} 、 $10^{-6}/5$ 稀释度,充分混匀后滴定 3 付马丁琼脂平板,0.1 mL/付,37 ℃ 培养,多杀性巴氏杆菌类活菌计数参考品 24 h 后计数,链球菌类活菌计数参考品 16 h 后计数,丹毒杆菌类活菌计数参考 48 h 后计数。

1.2 培养基及试剂 新鲜马丁琼脂、马丁琼脂干粉、新鲜改良马丁琼脂、改良马丁琼脂干粉、马丁肉汤培养基为 2020 年 9 月至 2021 年 12 月从不同公司购买或本实验室配制。新鲜马丁琼脂培养基为根据《中国兽药典》附录用牛肉汤和猪胃消化液为主要原材料配制而成;改良马丁琼脂新鲜培养基为根据《兽用生物制品规程》二〇〇〇版附录配制而成;马丁琼脂干粉、改良马丁琼脂干粉培养基为市售干粉培养基,按照说明书将干粉和适宜体积的蒸馏水煮沸溶化后,分装高压制成;健康动物血清为新生牛血清,购自 GIBCO,批号:1852632,裂解血细胞全血,由本实验室制备,批号 202001。

1.3 活菌计数检验培养基的制备 丹毒杆菌、链球菌类活疫苗计数参考品计数培养基:将马丁琼脂(含改良马丁琼脂和干粉配制备的马丁琼脂,下同)融化后冷却至 55 ℃ 左右,加入预热的 10% 健康动物血清,混匀后制备平板,15 ~ 20 mL/付;多杀性巴氏类活疫苗计数参考品计数培养基:将马丁琼脂融化后冷却至 55 ℃ 左右,加入预热的 4% 健康动物血清和 0.1% 裂解血细胞全血,混匀后制备平板,15 ~ 20 mL/付。

1.4 监测方法 2020 年 9 月至 2021 年 12 月,用巴氏杆菌、丹毒杆菌和链球菌类活疫苗计数参考品对马丁琼脂类产品进行监测,对其适应性与促生长能力进行评价,共监测新鲜马丁琼脂培养基 22 批,马丁琼脂干粉培养基 2 批,改良马丁琼脂干粉培养基 2 批,新鲜改良马丁琼脂 3 批。

每批培养基监测试验均随机抽取巴氏杆菌、丹

毒杆菌、链球菌类活疫苗活菌计数参考品各 1 支,根据参考品说明书的要求,用马丁肉汤培养基稀释,按现行《中国兽药典》附录活菌计数法的要求计数。将多杀性巴氏杆菌、丹毒杆菌、链球菌类活疫苗活菌计数参考品最终稀释度的菌液分别滴待监测培养基平板,每批平板各 3 付。 37°C 培养适宜时间后计菌落数,分别计算每批培养基测试的每瓶活菌计数参考品含有的菌落形成单位数(CFU)。

参考品含菌数(CFU) = 三付平板菌落形成单位数的平均值 \times 稀释倍数 \times 溶解体积

注意事项:参考品用之前取出恢复至室温后立即使用;滴定平板后菌液勿流到平板边缘;待表面晾干后置于适宜温度下倒置培养;三付平板菌落数相差小于 50% 计数结果有效。

2 结果

2.1 促生长能力 结果显示:所有被监测培养基对猪丹毒计数参考品的促生长能力良好;新鲜马丁琼脂培养基中有 10 批同时对猪丹毒、巴氏杆菌和链球菌类活疫苗计数参考品促生长能力良好,占 45.4%,8 批对巴氏杆菌类活疫苗计数参考品促生长能力差(7 批不生长,1 批不在参考品标定范围内),占新鲜培养基的 36.4%,5 批对链球菌类计数参考品的促生长能力差,占 22.7%,0 批同时对巴氏杆菌和链球菌的促生长能力差;3 批新鲜改良马丁琼脂中 2 批对链球菌促生长能力差,1 批对巴氏杆菌促生长能力差;2 批马丁琼脂干粉均对于巴氏杆菌促生长能力差;2 批改良马丁琼脂干粉培养基中 1 批对 3 种菌的促生长能力良好,1 批不适于巴氏杆菌的生长(表 1、表 2)。结果表明:丹毒杆菌、多杀性巴氏杆菌和链球菌对马丁琼脂培养基的促生长能力存在明显差异。

2.2 适应性 结果显示,计数结果在协作标定范围内的参考品在培养基上生长,其菌落大小均匀一致,延长培养时间不会有新菌落长出,说明培养基对参考品的适应性良好,而参考品在适宜稀释

度的平板无菌落生长,或计数结果不在参考品标定范围内(如新鲜马丁琼脂培养基 20210420 批),或菌落大小不一(图 1),延长培养时间仍会有新菌落长出,说明对培养基的适应性不良。除巴氏杆菌类活疫苗计数参考品在 20210420 批培养基上计数不在参考品范围内和无菌生长的培养基,其余参考品在培养基上生长菌落均大小均匀一致,结果表明:培养基的适应性和促生长能力是相互联系的,适应性差的一般促生长能力不良。

2.3 参考品稳定性 28 批培养基对丹毒杆菌活菌计数参考品的计数果均参考品标定的范围内,18 批巴氏杆菌活菌计数参考品生长的培养基中 17 批计数结果在参考品范围内,1 批略低于标定范围,21 批链球菌生长的培养基中链球菌计数结果均在参考品标定范围内。表明参考品的稳定性良好,计数结果在参考品的范围内的培养基用于活菌计数的检验,其效率和可信度均增加。

3 讨论与小结

活菌计数结果受诸多因素影响^[6],检验员严格按照标准操作规程进行操作,仍存在差异,但培养基的影响因素更大,根据本实验室的研究数据,对某些菌适应性不好的培养基计数结果可能相差若干数量级。美国联邦法规(9CFR)将对照品加入活菌计数的过程,对照品计数结果有效作为待检样品计数结果判定的前提。本实验室研制的活菌计数参考品与 9CPR 中用的对照品有类似作用(根据我国的法规,判定结果有效的条件有区别),可有效评价检验结果的有效性或分析影响因素。但每次活菌计数均加入参考品略显繁琐。培养基是影响活菌计数结果最关键的因素之一,研究有效的质控活菌计数培养基质量的方法对提高检验效率和检验结果的互认水平有十分重要的意义,但目前国内外针对活菌计数检验培养基适应性和促生长能力的研究较少。

表 1 2020 年 10 月至 2021 年 12 月马丁琼脂培养基适应性和促生长能力监测结果

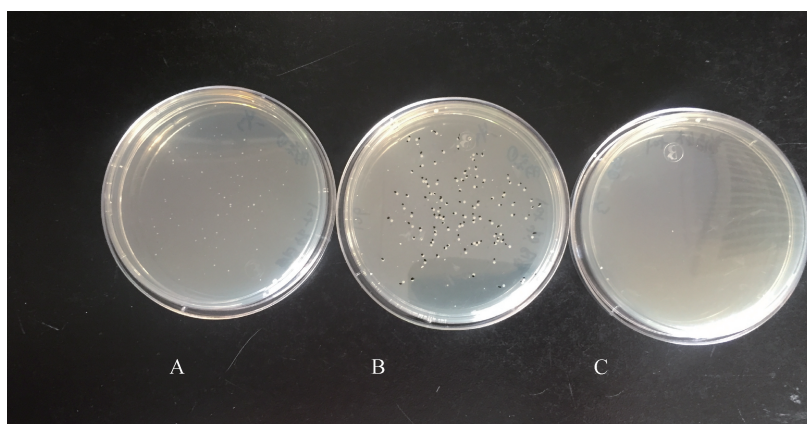
Tab 1 Test results of adaptability and growth promoting ability of Martin agar, from Oct 2020 to Dec 2021

培养基编号	名称及批号	活菌计数参考品每瓶含量		
		丹毒杆菌类/ 10^{10} CFU	巴氏杆菌/ 10^{10} CFU	链球菌类/ 10^8 CFU
1	新鲜马丁琼脂 202011019	4.8	0	1.2
2	新鲜马丁琼脂 20201117-1	4.9	2.4	1.2
3	新鲜马丁琼脂 20201117-2	5.0	2.3	1.0
4	新鲜马丁琼脂 20201117-3	5.3	2.2	1.0
5	新鲜马丁琼脂 20201215-1	5.2	2.1	1.2
6	新鲜马丁琼脂 20201215-2	4.6	2.1	1.0
7	新鲜马丁琼脂 20201215-3	4.8	2.1	1.2
8	新鲜马丁琼脂 20210223	5.0	2.1	1.2
9	新鲜马丁琼脂 20210420	5.3	0.9	0
10	新鲜马丁琼脂 20210511-1	4.6	0	1.0
11	新鲜马丁琼脂 20210511-2	4.5	0	1.1
12	新鲜马丁琼脂 20210511-3	4.8	0	1.1
13	新鲜马丁琼脂 20210523	4.7	2.1	0
14	新鲜马丁琼脂 20210629-1	4.4	0	1.1
15	新鲜马丁琼脂 20210629-2	4.2	0	1.0
16	新鲜马丁琼脂 20210629-3	4.3	0	1.2
17	新鲜马丁琼脂 20210904-1	5.0	2.1	1.1
18	新鲜马丁琼脂 20210904-2	5.2	2.1	1.1
19	新鲜马丁琼脂 20210904-3	5.2	2.1	1.2
20	新鲜马丁琼脂 20211014	4.4	2.2	0
21	新鲜马丁琼脂 20211116	4.1	2.4	0
22	新鲜马丁琼脂 20211123	4.3	2.1	0
23	马丁琼脂干粉(20201019)	4.9	0	1.0
24	马丁琼脂干粉(20210511)	4.4	0	1.2
25	改良马丁琼脂干粉(20201009)	5.7	2.2	1.1
26	改良马丁琼脂干粉(20210523)	5.1	0	1.2
27	新鲜改良马丁琼脂(20201009)	4.2	2.4	0
27	新鲜改良马丁琼脂(20210323)	4.7	2.1	0
28	新鲜改良马丁琼脂(20210523)	4.4	0	1.1

表 2 参考品在新鲜马丁琼脂培养基上生长情况统计

Tab 2 Growth of reference statistics on fresh Martin agar medium

生长情况	比例	百分比/%
丹毒杆菌、链球菌、多杀性巴氏杆菌均生长	10/22	45.4
丹毒杆菌、链球菌生长,多杀性巴氏杆菌不生长	7/22	31.8
丹毒杆菌、多杀性巴氏杆菌生长,链球菌不生长。	5/22	22.7
丹毒杆菌生长,链球菌、多杀性巴氏杆菌不生长	0	0
丹毒杆菌、链球菌、多杀性巴氏杆菌均不生长	0	0



A: 生长不良, 菌落大小不一, 延长培养时间, 会有新菌落长出; B: 菌落大小均匀; C: 不生长

A: Poor growth with vary sizes, new colonies would grow out if incubation time prolonged;

B: Colonies were uniform in size; C: No growth

图 1 多杀性巴氏杆菌计数参考品在不同批次马丁琼脂培养基上的生长状态

Fig 1 Growth status of *Pasteurella multocida* reference on different batches of Martin agar medium

根据本研究结果, 巴氏杆菌、链球菌和猪丹毒杆菌对依据《中国兽药典》规定制备的马丁琼脂的适应性和促生长能力有显著的差异。通过为期 1 年多对各种马丁琼脂的监测结果, 能同时满足 3 种菌适应性和促生长能力的培养基仅占 35.7%。根据《中国兽药典》规定, 活菌计数检验培养基为新鲜马丁琼脂培养基, 统计 22 批新鲜马丁琼脂培养基的监测结果, 同时适于 3 种菌活菌计数的培养基比例为 45.4%, 因此, 对活菌计数检验培养基的质控非常必要。

按照《中国兽药典》附录的工艺制备的新鲜马丁琼脂培养基, 是按照特定工艺用牛肉制备牛肉汤、猪胃制备猪胃消化液, 将牛肉汤、猪胃消化液和一定比例的琼脂粉、NaCl 等混合配制而成, 因制备过程受诸多因素影响, 批间差异较大。其影响因素待进一步研究。马丁琼脂干粉培养基是由葡萄糖、蛋白胨等干制营养成分组合而成, 改良马丁琼脂干粉培养基是在马丁琼脂干粉培养基的基础上通过调整配比、增加营养成分等提高培养基的促生长能力的改良培养基。目前不同厂家生产的马丁琼脂干粉或改良马丁琼脂干粉培养基均无固定配方和质量标准, 且与新鲜马丁琼脂存在同样的缺点, 因

此尽管新鲜马丁琼脂培养基存在适应性和促生长能力不稳定的缺陷, 但仍然是目前《中国兽药典》规定的活菌计数培养基。

因培养基的生产工艺复杂, 影响因素众多^[7], 通过控制生产工艺稳定培养基的质量非常困难。加上巴氏杆菌、链球菌和猪丹毒杆菌对依据《中国兽药典》规定制备的马丁琼脂的适应性和促生长能力有显著的差异。因此, 考虑培养基的应用目的, 参考无菌检验培养基和支原体检验培养基质量控制方法及人用药物注册技术要求国际协调会 (ICH) 和《中国药典》对微生物限度检查用 TSA 的质控要求^[8,9], 选择多杀性巴氏杆菌、丹毒杆菌和链球菌类活菌计数参考品为参考, 评价成品培养基的适应性和促生长能力是比较有效地选择。因此拟建立的马丁琼脂培养基质量标准: 性状为熔化后为黄色澄明液体; 无菌检验, 应无菌生长; pH 值为熔化后温度降至 50 °C 测定 pH 值, 应在 7.2 ~ 7.6; 适应性和促生长能力: 用培养基对巴氏杆菌、丹毒杆菌和链球菌类活疫苗计数参考品进行活菌计数, 计数结果均应在参考品的协作标定范围内。培养基的生产企业根据马丁琼脂培养基的质控标准对活菌计数成品培养基进行质量控制, 检验合格后出

厂,可以有效提高培养基的批间稳定性。

本研究结果表明,多杀性巴氏杆菌、丹毒杆菌和链球菌类活疫苗活菌计数参考品同时用于马丁琼脂培养基成品的适应性和促生长能力评价,能有效筛选出适于活菌计数检验的马丁琼脂培养基。适应性和促生长能力符合要求的马丁琼脂培养基用于以上 3 类产品的检验,可避免培养基因素导致的检验结果不确定、不一致或不生长等问题,更科学高效地评价细菌活疫苗的产品质量。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国兽药典三部[S]. 2015.
Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume III[S]. 2015.
- [2] 中华人民共和国兽用生物制品规程二〇〇〇版[S]. 2000.
Regulations of the People's Republic of China on veterinary biological products[S]. 2000.
- [3] 王秀丽, 刘 博, 辛凌翔. 多杀性巴氏杆菌类活疫苗活菌计数参考品的研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(09): 34-37.
Wang X L, Liu B, Xin L X, *et al.* Study on reference of *Pasteurella multocida* live vaccine to live bacteria count [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55 (09): 34-37.
- [4] 刘 博, 张 媛, 袁 璐. 猪丹毒活疫苗活菌计数参考品的研究[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(05): 115-118.
Liu B, Zhang Y, Yuan L, *et al.* Study on reference of *Erysipelas* live vaccine to live bacteria count [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 56(05): 115-118.
- [5] 辛凌翔, 王秀丽, 吕文静, 等. 链球菌病类活疫苗活菌计数参考品的研制[J]. 生物工程学报, 2021, 37(07): 2554-2562.
Xin L X, Wang X L, Lv W J, *et al.* Study on reference of *Streptococcus suis* live vaccine to live bacteria count [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(07): 2554-2562.
- [6] 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(04): 19-21.
Xu Z Q, Xue L H. Study on the performance of Martin dry powder medium [J] Chinese Journal of Veterinary Drug, 2004 (04): 19-21.
- [7] 余 芬, 孙明波, 沈 伟, 等. 生物制品生产中 6 种常用液体培养基高压灭菌前后的 pH 变化特征分析[J]. 中国药品标准, 2015, 16(03): 176-180.
Yu F, Sun M B, Shen W, *et al.* Analysis of pH variation before and after autoclaving of 6 kinds of liquid media in biological products production [J]. Chinese Pharmaceutical Standards, 2015, 16(03): 176-180.
- [8] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 16293-2010 中华人民共和国国家标准: 医药工业洁净室(区)浮游菌的测试方法[S]. 2010.
State Administration for Market Regulation. GB/T 16293-2010 National standards of the People's Republic of China: Test method for Phytoplankton in clean room (area) of pharmaceutical industry[S]. 2010.
- [9] 中华人民共和国药典四部[S]. 2015.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume IV [S]. 2015.

(编辑:李文平)