

鸡传染性鼻炎灭活疫苗生产检验用 副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株的保存期试验

彭小兵, 蒋玉文, 李旭妮, 彭国瑞, 王秀丽

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2013 - 01 - 17 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2013) 06 - 0014 - 03 [中图分类号] S852. 61

[摘要] 对不同冻干年代的副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株菌种分别进行了毒力测定和免疫原性试验。分别用 1991、1997、2001、2011 年冻干的菌种, 以约 3 万 CFU/羽眶下窦接种 2 月龄 SPF 母鸡, 结果均可使鸡 5/5 发病; 分别用 1991、1997、2011 年冻干的菌种, 经繁殖制备疫苗后接种 SPF 鸡, 结果可提供 8/8、7/7、7/7 保护。结果表明, 副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株在 -70 ℃ 保存 10、14、20 年后的毒力和在 -70 ℃ 保存 14、20 年后的免疫原性仍符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇版) 规定。

[关键词] 副鸡禽杆菌; 毒力; 免疫原性; 保存期

Preservation Period Test of the Hpg - 8 Strain of *A. paragallinarum* Master Seed of Infectious Coryza Inactivated Vaccine

PENG Xiao - bing, JIANG Yu - wen, LI Xu - ni, PENG Guo - rui, WANG Xiu - li

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

Abstract: The virulence on SPF chicken and immunogenicity of the Hpg - 8 strain cultures of *A. paragallinarum* manufactured at different years were tested respectively. 5/5 chicken showed the clinical symptoms of infectious coryza after intranasal injected respectively with about 30000 CFU of the Hpg - 8 strain cultures of *A. paragallinarum* produced at 1991, 1997, 2001 and 2011. The protection rates of 8/8, 7/7 and 7/7 were obtained after chickens were inoculated with the coryza vaccine with the Hpg - 8 strain cultures of *A. paragallinarum* produced at 1991, 1997, and 2011. The results indicated that the virulence on SPF chicken of the Hpg - 8 strain cultures of *A. paragallinarum* stored at -70 ℃ for 10, 14, 20 years and the immunogenicity of the Hpg - 8 strain cultures of *A. paragallinarum* stored at -70 ℃ for 14, 20 years still conformed to the regulations of The People's Republic of China Veterinary Biological Products (2000 edition).

Key words: *A. paragallinarum*; virulence; immunogenicity; preservation period

鸡传染性鼻炎是由副鸡嗜血杆菌引起的一种细菌性传染病, 表现为眼眶下水肿、打喷嚏、产蛋减少^[1], 世界各地养禽业均采用疫苗进行免疫接种来控制该病的发生。2005 年, Blackall 等^[2] 根据 16S rRNA 碱基序列的同源性及生化特性方面的相似性,

将副鸡嗜血杆菌 (*Haemophilus paragallinarum*) 归入巴氏杆菌科的一个新属, 即禽杆菌属 (*Avibacterium*), 副鸡嗜血杆菌也因之更名为副鸡禽杆菌 (*Avibacterium paragallinarum*)。副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株 (A 型) 是制备鸡传染性鼻炎灭活疫苗、鸡传染性鼻炎 (A + C

型)、新城疫二联灭活疫苗的生产检验用菌种,《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇版)^[3]规定,该菌种在-40℃的保存期为4年。本研究对不同冻干年代的副鸡禽杆菌 Hpg-8 株菌种分别进行了对 SPF 鸡的毒力测定和免疫原性试验,为该菌种制定更加合理的保存期提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料 副鸡禽杆菌(原名副鸡嗜血杆菌) Hpg-8株(CVCC254),由本实验室分别于1991年6月19日、1997年10月22日、2001年7月14日、2011年4月14日繁殖冻干,检定合格后交菌种保藏室-70℃保存。鸡肉汤培养基由本实验室制备,半合成培养基由北京中海生物科技有限公司提供,鸡血清由北京元亨金马生物科技有限公司提供。2月龄SPF母鸡、5日龄鸡胚均由北京梅里亚维通实验动物技术有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 菌种对 SPF 鸡的毒力测定 每批冻干菌种无菌操作打开,用鸡肉汤培养基溶解后卵黄囊接种5日龄鸡胚,待鸡胚死亡后收取卵黄液,置-20℃保存。取卵黄液按《中华人民共和国兽药典》(二〇一〇年版三部)^[4]进行活菌计数,根据计数结果将卵黄液用鸡肉汤培养基稀释成不同的滴度,每滴度各眶下窦注射2月龄SPF鸡5羽,每日观察记录鸡的发病情况,观察7d。面部出现一侧或两侧眶下窦及周围肿胀或流鼻涕或兼有流泪者,判为发病。

1.2.2 菌种的免疫原性检定

1.2.2.1 制苗 按《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇版)的方法制备油乳剂灭活疫苗,配苗前的菌体悬液浓度为56亿/mL。置2~8℃冰箱保存备用。

1.2.2.2 免疫 取制备好的疫苗恢复至常温,每批各颈部皮下注射60日龄SPF鸡8羽,每羽注射0.5mL;同时设空白对照鸡4羽,每羽注射PBS溶液0.5mL,与免疫组同条件饲养。

1.2.2.3 攻毒 免疫30d后,取副鸡禽杆菌 Hpg-8 菌株培养物,用鸡肉汤培养基进行30倍稀释后,对所有鸡眶下窦注射0.2mL(50~100万CFU),观察14d。

2 结果

2.1 菌种对 SPF 鸡的毒力测定结果 结果如表1所示。结果表明,各冻干年代的菌种在约3万

CFU/羽的剂量时,仍能使SPF鸡5/5发病,均达到甚至超过了《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇版)的标准(10万CFU/羽剂量使鸡5/5发病)。

表 1 不同冻干年代副鸡禽杆菌 Hpg-8 株对 SPF 鸡的毒力试验结果

菌株冻干时间	保存年限(年)	攻击菌数(万CFU/羽)	攻毒鸡数量(羽)	发病情况
1991.6.19	20	29.6	5	5/5 发病
		9.9	5	5/5 发病
		3.3	5	5/5 发病
1997.10.22	14	25.9	5	5/5 发病
		8.6	5	5/5 发病
		2.9	5	5/5 发病
2001.7.14	10	30.9	5	5/5 发病
		10.3	5	5/5 发病
		3.4	5	5/5 发病
2011.4.14	0	29.0	5	5/5 发病
		9.7	5	5/5 发病
		3.2	5	5/5 发病

2.2 菌种的免疫原性检定结果 如表2所示。结果表明,1991、1997、2011年冻干的菌种在制苗后免疫SPF鸡,分别能使鸡8/8、7/7、7/7免受副鸡禽杆菌强毒的攻击,达到了《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇版)的标准(对照组4/4发病时,免疫组至少6/8保护或对照组3/4发病时,免疫组至少7/8保护)。

表 2 不同冻干年代副鸡禽杆菌 Hpg-8 株的免疫原性试验结果

菌株冻干时间	保存年限(年)	攻击菌数(万CFU/羽)	攻毒鸡数量(羽)	发病情况
1991.6.19	20	63.1	8	8/8 保护
1997.10.22	14	63.1	7	7/7 保护
2011.4.14	0	63.1	7	7/7 保护
对照鸡	/	63.1	4	4/4 发病

3 讨论

作为疫苗生产检验用菌种,保持良好的毒力和免疫原性是生产合格疫苗和开展检验工作的前提和关键,因此对冻干菌种在一定保存期内的毒力和免疫原性是否仍保持原有标准进行探索具有重要意义。然而,迄今为止尚未有关于副鸡禽杆菌保存期试验的相关报道。该菌培养物以非冻干的形式直接在2~8℃或-20℃保存,其自然死亡率均很高。《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二〇〇〇版)亦规定,副鸡禽杆菌 Hpg-8 株菌种在-40℃的保存期也仅为4年。在从事鸡传染性鼻

两株副猪嗜血杆菌的分离鉴定及药敏试验

乔荣岑¹, 王生富^{1,2}, 孙进忠¹, 张许科¹, 廖永洪^{1,2}, 白朝勇^{1,2*}

(1. 普莱柯生物工程股份有限公司, 河南洛阳 471000; 2. 国家兽药工程技术研究中心生物制品研究所, 河南洛阳 471000)

[收稿日期] 2013-01-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0016-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 从疑似副猪嗜血杆菌病发病猪场采集 58 份病料, 分离到 2 株革兰氏阴性短小杆菌。对分离菌株进行培养特性、生化特性、血清型分型研究以及 PCR 检测和测序分析, 结果表明, 分离的两株细菌均为血清 4 型副猪嗜血杆菌。对分离菌株进行药敏试验分析, 结果显示分离株对头孢噻肟、头孢噻吩、替米考星高度敏感, 对四环素、丁胺卡那、恩诺沙星、环丙沙星中度敏感, 对甲氧苄氨嘧啶、复方新诺明、链霉素、阿莫西林、新霉素均耐药。

[关键词] 副猪嗜血杆菌; 分离; 鉴定; 血清型; 药敏试验

Isolation, Identification and Drug Sensitivity Research of *Haemophilus parasuis* 2 Strains

QIAO Rong - cen¹, WANG Sheng - fu^{1,2}, SUN Jin - zhong¹,

ZHANG Xu - ke¹, LIAO Yong - hong^{1,2}, BAI Chao - yong^{1,2*}

(1. Pulike biological Engineering. INC., Luoyang, Henan 471000, China; 2. Institute of National Engineering and Research Centers for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471000, China)

Abstract: The two small gram - negative bacilli were isolated from 58 samples of pigs with suspected infection by

作者简介: 乔荣岑, 工程师, 从事动物生物制品的生产与开发。

通讯作者: 白朝勇。E-mail: chybai63vp@ yahoo. com. cn

炎类灭活疫苗进口产品的质量监督检查过程中注意到, 来自 3 个不同国家的企业提供的副鸡禽杆菌菌种在 -20 ℃ 的保存期分别为 10、13、20 年, 且菌种经本实验室复苏后其生长特性及毒力均良好。菌种的复苏、复壮、繁殖、冻干和检定工作不仅需要投入较长的时间, 同时尚需消耗一定数量的人力、财力和物力。因此, 采用科学有效的保存方法并制定合理的保存期, 既能有效地延续菌种的固有特性, 又可避免不必要的资源浪费, 并可提高工作效率。本试验的结果表明, 真空冻干菌种于 -70 ℃ 保存 10、14、20 年, 其毒力仍能满足要求; 真空冻干菌种于 -70 ℃ 保存 14、20 年, 其免疫原性仍能满足要求。因此, 制定更长副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株菌种的保存期显然是必要的, 并且是可行的。

副鸡禽杆菌 Hpg - 8 株菌种在各年代繁殖冻干时均按《中华人民共和国兽用生物制品规程》(二

○○○版) 的标准检定全部项目, 本次试验对不同保存年代菌株的毒力和免疫原性重新进行了试验, 结果均符合规定, 表明该菌株于 -70 ℃ 保存 20 年, 仍可作为鼻炎类疫苗制品的生产检验用菌种。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 144 - 147.
- [2] Blackall P J, Christensen H, Beekenhans T, et al. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55 (Pt1): 353 - 362.
- [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○○○版[S].
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部二○○○版[S].

(责任编辑: 侯向辉)