

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.02

猪丹毒疫苗效力检验攻毒冻干培养物的制备与应用研究

彭国瑞,王秀丽,彭小兵,辛凌翔,张一帜,魏津,李建,
李旭妮,刘博,马欣,李俊平,张媛*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2020-03-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)06-0014-06 [中图分类号] S852.6

[摘要] 为提高猪丹毒疫苗效力检验结果的稳定性、一致性及工作效率,冻干制备了效力检验攻毒用猪丹毒丝菌培养物,对性状、纯粹、真空度、剩余水分、活菌计数、均一性等进行检测,测定在不同温度下短期存放的活菌数,监测在低温下长期保存的活菌数和毒力,并将其应用于猪丹毒活疫苗和灭活疫苗的效力检验。结果显示,该攻毒培养物性状良好,纯粹生长,真空度合格率 98.2%,剩余水分小于 3.5%,活菌数均值为 3.8×10^9 CFU/瓶,瓶间活菌数变异系数(C.V)为 10.0%,37℃以下温度存放 2.5~3.0 h 活菌数稳定,变异系数(C.V)为 4.9%, -20℃保存 36 个月活菌数为 3.0×10^9 CFU/瓶,每只小鼠注射 6 CFU 活菌 5/5 死亡,应用于猪丹毒灭活疫苗和活疫苗效力检验结果与常规方法一致。结果表明,该猪丹毒丝菌冻干培养物状态良好,活菌数和毒力较为稳定,能够满足猪丹毒疫苗效力检验攻毒使用,且提高了检验结果的一致性、稳定性及工作效率。

[关键词] 猪丹毒丝菌;疫苗;活菌计数;效力检验;攻毒

Preparation and Application of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Challenge Culture for Potency Testing of *Erysipelas* Bacterins

PENG Guo-Rui, WANG Xiu-Li, PENG Xiao-Bing, XIN Ling-Xiang, ZHANG Yi-Zhi,
WEI Jin, LI Jian, LI Xu-Ni, LIU Bo, MA Xin, LI Jun-Ping, ZHANG Yuan*

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

Corresponding author: ZHANG Yuan, E-mail: 8078@sina.com

Abstract: In order to improve stability, uniformity and efficiency of potency testing of *Erysipelas* Bacterins, *Erysipelothrix rhusiopathiae* challenge culture was prepared by freeze-drying, and its characteristics, purity, plate counts, virulence, vacuum degree, residual moisture content were determined. Its plate counts were tested

基金项目:国家重点研发计划“兽用生物制品质量检验和控制标准(2017YFF0208603)”

作者简介:彭国瑞,助理研究员,从事兽用生物制品检验与研究。

通讯作者:张媛。E-mail:8078@sina.com

after stored in different temperatures for short time, and plate counts and virulence were monitored after stored in low temperature for long time. It was applied in potency testing of *Erysipelas* inactivated and live vaccines. The results showed that this kind of *E. rhusiopathiae* challenge culture has of good characteristics and purity, its residual moisture content was under 3.5%, the average value of plate counts was 3.8×10^9 CFU per bottle and the coefficient of variation of the 10 samples was 10.0%, the plate counts did not change obviously under 37 °C for 2.5 ~ 3.0 h, and it contained 3.0×10^9 CFU per bottle and could lead to 100% mortality of mouse by hypodermic injection of 6 CFU after stored in -20 °C for 36 months. It was applied in testing of *Erysipelas* Bacterins as challenge culture effectively, and the potency testing results were identical with the traditional culture. These data suggest that freeze - drying *E. rhusiopathiae* challenge culture is of good characteristics, its plate counts and virulence show a better stability, and it can be applied in potency testing of *Erysipelas* Bacterins and improves stability, uniformity and efficiency.

Key words: *E. rhusiopathiae*; vaccine; plate counts; potency testing; challenge

目前,我国用于预防猪丹毒病的疫苗有猪丹毒活疫苗(GC42 或 G_4T_{10} 株),猪瘟、猪丹毒、猪多杀性巴氏杆菌病三联活疫苗,猪丹毒灭活疫苗,猪丹毒、猪多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗等产品,有 20 家左右的企业生产,年产量近 300 批 2.38 亿头份。按照《中华人民共和国兽药典》2015 年版三部(以下简称《中国兽药典》),猪丹毒疫苗的效力检验用攻毒菌为猪丹毒丝菌强毒血清 1 型 C43-8 株和 2 型 C43-6 株的混合菌液。常规方法制备用于疫苗效力检验攻毒培养物,需经过菌种复苏、菌落筛选、扩大培养、菌液活菌预计数、毒力测定、菌液活菌复数以及攻毒和攻毒菌液计数等多个步骤^[1],多次强毒菌种的新鲜培养,重复工作多,检验操作周期长,工作量大,而且由于攻毒菌液对环境温度敏感,保存条件要求高,保存不当常常会导致细菌死亡,菌数降低,对检验工作存在较大影响。

为此,本研究将猪丹毒检验用菌种制成更为易于稳定保存和使用的冻干型攻毒培养物,经过一次培养制备,用于多批次检验,减少强毒的重复培养,以期在增强检验结果准确性的同时,简化操作步骤,提升检验工作效率,为标准品的制备奠定试验基础。

1 材料

1.1 菌种 猪丹毒丝菌血清 1 型 CVCC43008 (C43-8)株和 2 型 CVCC43006 (C43-6)株由中国兽医药品监察所制备并保存。

1.2 试剂 肉肝胃消化汤、马丁肉汤、马丁琼脂培养基和蔗糖脱脂奶等购自北京中海生物公司,新生胎牛血清购自 GIBCO 公司,裂解血细胞全血由实验室自制,猪丹毒灭活疫苗、猪丹毒活疫苗(G_4T_{10} 株)为国内两家企业生产成品。

1.3 实验动物 体重 18 ~ 22 g ICR 小鼠购自北京维通利华试验动物公司。

2 方法

2.1 复苏培养 将猪丹毒冻干菌种 CVCC43008 株和 CVCC43006 株安瓿启封后,用肉肝胃消化汤稀释,分别划线接种含 10% 血清马丁琼脂平板,37 °C 培养 48 h。革兰氏染色镜检合格后,各挑取中等大小、表面光滑圆整、呈微蓝灰色露珠状典型菌落 3 个,分别接种含 2% 裂解血细胞全血肉肝胃消化汤,37 °C 200 r/min 振荡培养 18 h^[2]。

2.2 冻干与保存 将 2 株猪丹毒培养菌液等体积混合后,与含 16% 蔗糖 20% 脱脂奶的冻干保护剂 1:1 (V:V) 混匀,2.0 mL/瓶分装至 7 mL 装量的西林瓶内,加胶塞,入箱冻干,压盖,加铝帽,制成猪丹毒冻干培养物,于 -20 °C 医用冷藏箱保存待检定。

2.3 性状观察 肉眼观察冻干培养物在瓶内的状态,轻轻振荡是否易于瓶壁脱离,以及加稀释液后的溶解情况。

2.4 纯粹检验 随机抽取 5 瓶用含 10% 血清马丁琼脂斜面培养基,按《中国兽药典》附录 3306 进行

纯粹检验^[3]。

2.5 真空度与剩余水分测定 -20 ℃ 保存 18 个月,随机取 4 瓶,测定真空度和剩余水分含量。

2.6 活菌计数方法 将冻干培养物用马丁肉汤适当比例梯度稀释后,用含 10% 血清的马丁琼脂培养基平板培养,按《中国兽药典》附录 3405 进行活菌计数。

2.7 瓶间活菌数均一性试验 随机取 10 瓶冻干培养物,分别进行活菌计数,比较瓶间活菌数差异。

2.8 短时间存放温度对活菌数的影响 模拟实际攻毒使用时可能短期存放的温度条件,研究短期存放温度对活菌数的影响。随机取 18 瓶冻干培养物,分别在 37 ℃、25 ℃、室温(20~25 ℃)、4 ℃、简易冰盒(随时间温度逐步从 -20 ℃ 升高到 -1 ℃)等温度条件下各存放 3 瓶,2.5~3.0 h 后进行活菌计数。

2.9 低温长期保存活菌数和毒力监测 冻干培养物 -20 ℃ 保存 1、3、6、9、12、18 和 36 个月后,分别随机取 3 瓶,进行活菌计数,按照 3.6×10^9 CFU/瓶的预估活菌数,用肉肝胃消化汤将冻干培养物稀释至 8 CFU/0.2 mL,冰浴保存,在 2 h 内使用。0.2 mL/只腹股沟皮下注射体重 18~22 g ICR 小鼠各 5 只,观察 7 d^[2]。同时进行活菌计数,确认实际攻毒剂量^[4]。

2.10 在猪丹毒疫苗检验中的应用

2.10.1 疫苗免疫与攻毒 按照《中国兽药典》猪丹毒灭活疫苗和猪丹毒活疫苗效力检验方法,将商品化猪丹毒灭活疫苗和猪丹毒活疫苗免疫小鼠,分别采用本方法和常规方法制备的攻毒培养物稀释

后攻击小鼠进行效力检验^[2]。

2.10.2 冻干培养物制备攻毒菌液 随机取同批次制备保存 36 个月冻干培养物 3 瓶,其中 1 瓶进行活菌计数,根据计数结果将第 2 瓶稀释至 10、8、6、4、2 CFU/0.2 mL,冰浴保存,在 2 h 内使用,0.2 mL/只腹股沟皮下注射体重 18~22 g ICR 小鼠各 5 只,观察 7 d,同时进行活菌计数,计算实际测毒小鼠 1 MLD 活菌数。按照测毒结果将第 3 瓶稀释后制成攻毒菌液攻毒,同时进行活菌计数,计算实际攻毒剂量。

2.10.3 常规培养制备攻毒菌液 开启猪丹毒菌株 C43008 株和 C43006 株菌种各 1 支,肉肝胃消化汤溶解后,划线接种含 10% 血清马丁琼脂平板,37 ℃ 培养 48 h。挑取表面圆整光滑,呈微蓝灰色露珠状的菌落,两菌株分别接种含 2% 裂解血细胞全血的肉肝胃消化汤 37 ℃ 培养 18 h,等体积混匀,3 mL/支分装,-70 ℃ 冻存(需在 21 d 内使用)。保存 3 d 后,取 1 支进行活菌计数。根据计数结果,另取 1 支稀释至 10、8、6、4、2 CFU/0.2 mL,冰浴保存,在 2 h 内使用,0.2 mL/只腹股沟皮下注射体重 18~22 g ICR 小鼠各 5 只,观察 7 d,同时进行活菌计数,计算实际测毒小鼠 1 MLD 活菌数。按照测毒结果将第 3 支冻存菌稀释制成攻毒菌液攻毒,同时进行活菌计数,计算实际攻毒剂量。

3 结果与分析

3.1 性状观察 冻干培养物为海绵状团块,较易与瓶壁脱离,加马丁肉汤振摇后 2 min 内溶解。

3.2 纯粹检查 用马丁肉汤溶解后按照表 1 所示接种培养基,在 25 ℃、37 ℃ 培养 5 d,结果 5/5 纯粹生长。

表 1 纯粹检验结果

Tab 1 The results of purity test

瓶号	25 ℃ 培养			37 ℃ 培养	
	TG 小管	马丁琼脂斜面	TSB 小管	TG 小管	马丁琼脂斜面
1	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—

“—”纯粹生长;“+”有杂菌生长;“×”不生长

3.3 真空度与剩余水分测定 冻干培养物真空度测定合格率 98.2%。36 个月后抽取 4 瓶真空度检验 4/4 合格,测定剩余水分含量分别为 2.7%、1.9%、2.5% 和 3.2%。

3.4 瓶间活菌数均一性试验 10 瓶冻干培养物平均活菌数为 3.8×10^9 CFU, 变异系数 (C. V) 为 10.0% (表 2)。

表 2 均一性试验结果

Tab 2 The results of uniformity test

冻干培养物瓶号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值
活菌数/CFU	3.8×10^9	4.4×10^9	3.4×10^9	3.8×10^9	4.2×10^9	4.0×10^9	3.4×10^9	3.2×10^9	3.4×10^9	4.0×10^9	3.8×10^9

3.5 短时间存放温度对活菌数的影响 冻干培养物在 37 °C 条件下平均活菌数较低为 2.4×10^9

CFU。在 25 °C、室温、4 °C、简易冰盒、-20 °C 等条件下较为稳定,变异系数(C. V)为 4.9% (表 3)。

表 3 短期存放条件对活菌数的影响

Tab 3 The effect of different storage environment on viable count

存放条件	活菌数/CFU			
	瓶 1	瓶 2	瓶 3	平均值
37°C	2.0×10^9	2.6×10^9	2.4×10^9	2.4×10^9
25°C	3.4×10^9	3.0×10^9	3.0×10^9	3.2×10^9
室温(约 20°C)	3.2×10^9	3.0×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9
4°C	3.6×10^9	3.2×10^9	3.2×10^9	3.4×10^9
简易冰盒(-20 ~ -1°C)	2.8×10^9	3.0×10^9	3.2×10^9	3.0×10^9
-20°C	3.4×10^9	3.8×10^9	3.4×10^9	3.6×10^9

3.6 低温长期保存活菌数和毒力监测 在监测期内冻干培养物活菌数较为稳定,保存 12 个月变异

系数为 3.9%,36 个月变异系数为 9.1% (表 4)。

表 4 低温长期保存活菌数和毒力的变化

Tab 4 The changes of viable count and virulence in low temperature storage environment

保存时间/月	活菌数/CFU				攻毒剂量/(CFU · 只 ⁻¹)	小鼠死亡情况
	瓶 1	瓶 2	瓶 3	平均值		
1	3.4×10^9	3.2×10^9	3.6×10^9	3.4×10^9	7	5/5
3	3.8×10^9	4.0×10^9	3.2×10^9	3.6×10^9	9	5/5
6	3.8×10^9	3.4×10^9	3.4×10^9	3.6×10^9	8	5/5
12	3.4×10^9	4.0×10^9	3.8×10^9	3.8×10^9	9	5/5
18	2.8×10^9	2.4×10^9	2.8×10^9	2.6×10^9	5	5/5
36	3.2×10^9	3.0×10^9	3.2×10^9	3.0×10^9	6	5/5

3.7 在猪丹毒疫苗效力检验中的应用

为 4 CFU。

3.7.1 测毒结果 表 5 所示,本方法制备的冻干培养物小鼠 1 MLD 含活菌数为 5 CFU,常规方法

3.7.2 检验结果 表 6 所示,本方法与常规方法制备的攻毒培养物应用于疫苗检验结果一致。

表 5 猪丹毒疫苗效力检验测毒结果

Tab 5 The results of toxicity test in potency testing of *Erysipelas* Bacterins

预注射菌数 /(CFU·只 ⁻¹)	冻干培养物		常规培养	
	实际注射菌数 /(CFU·只 ⁻¹)	小鼠死亡情况	实际注射菌数 /(CFU·只 ⁻¹)	小鼠死亡情况
10	9	5/5	10	5/5
8	7	5/5	8	5/5
6	5	5/5	6	5/5
4	3	4/5	4	5/5
2	1	0/5	2	2/5

表 6 猪丹毒疫苗效力检验结果

Tab 6 The results of potency testing of *Erysipelas* Bacterins

攻毒菌液来源	对照组一		对照组二		免疫组	
	攻毒量 1 MLD 活菌数/(CFU·只 ⁻¹)	小鼠死亡情况	攻毒量 1000 MLD 活菌数/(CFU·只 ⁻¹)	小鼠死亡情况	灭活疫苗 保护率	活疫苗 保护率
冻干培养物	5	3/3	5000	3/3	10/10	10/10
常规培养	4	3/3	4000	3/3	10/10	10/10

4 讨论与结论

本研究将疫苗检验用猪丹毒丝菌 CVCC43008 株和 CVCC43006 株培养物混合制成冻干型攻毒制剂,通过短时间存放温度对活菌数的影响实验,模拟了实际攻毒稀释前培养物可能短期存放的环境温度和条件,其活菌数在 25 ℃、室温、4 ℃、简易冰盒、-20 ℃等条件下均较为稳定。因此,该冻干培养物在使用时不应暴露于高温环境,尽量在恒温较低温度条件下保存并使用。同时,这种冻干培养物在一定时间内可以长期稳定保存,经活菌数和毒力监测,能够满足检验攻毒使用,将其应用于猪丹毒疫苗的效力检验,多批次检验使用一次培养菌液,大大减少了强毒的重复培养,避免了攻毒菌液不易保存、细菌容易死亡、毒力易减弱等不足,也有利于提高检验的可重复性,保证检验结果的一致性、稳定性和检验成功率,降低了检验工作量,提高了效

率,为猪丹毒疫苗效力检验攻毒用培养物标准品的制备提供了试验基础。

下一步,可以将本研究制备的猪丹毒丝菌冻干培养物制成效力检验攻毒标准品在三个层次上应用于猪丹毒疫苗的效力检验。一是在一次检验中,对该冻干培养物进行预活菌计数,根据预计计数结果梯度稀释后,注射实验动物小鼠或本动物猪进行测毒,然后对待检疫苗免疫组和对照组动物攻毒来评价疫苗的免疫效力;二是该冻干培养物所含活菌数在监测使用期内稳定(在活菌计数方法偏差范围内),在一次检验中,按照监测标定的活菌数,测毒后即可攻毒;三是该冻干培养物活菌数和毒力在使用期内均稳定,在一次使用标准实验动物小鼠检验中,不进行活菌计数和测毒,根据标定的活菌数和毒力,按照固定比例稀释后,直接对待检疫苗组和对照组实验动物进行攻毒。

参考文献:

- [1] 王秀丽, 刘博, 张媛, 等. 猪丹毒杆菌 C43005 株的制备及检定[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(3):21-26.
Wang X L, Liu B, Zhang Y, *et al.* The preparation and verification of *Swine Erysipelas bacillus* C43005 strain [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(3):21-26.
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版三部[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary pharmacopoeia of the People's Republic of China volume III 2015 edition[S]. Beijing: China Agricultural Press, 2016.
- [3] United States Department of Agriculture Animal and Plant Health

Inspection Service. Supplemental assay method for potency testing of *Erysipelas* bacterins in mice [S]. 2014; SAM611. <http://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/veterinary-biologics>.

- [4] 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 2000 年版[S].
Commission of Regulations for Veterinary Biological Products of Ministry of Agriculture. Regulations for Veterinary Biological Products of the People's Republic of China (2000 edition) [S].

(编辑:李文平)