

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.10.03

鸡毒支原体灭活疫苗效力检验 气囊注射攻毒方法的研究

魏 津, 刘 博, 马 欣, 王 甲, 赵浩然, 刘元杰, 冯 妍, 刘业兵, 罗玉峰*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2022-04-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 10-0012-06 [中图分类号] S859.797

[摘 要] 鸡毒支原体灭活疫苗效力检验采用的喷雾攻毒方法所需菌液量大, 结果易受喷雾时间和器械设备影响。为探索一种简便、易行且结果稳定的新方法, 研究冻干了一批攻毒用菌株鸡毒支原体 R 株, 对其性状、纯粹、真空度、剩余水分、培养特性、特异性、活菌计数和均一性等进行检定, 结果全部符合规定。将其稀释成不同活菌数, 采用气囊注射方式攻毒, 试验结果与《中国兽药典(2020 年版三部)》中的喷雾方法相比更加稳定、准确。使用两种攻毒方法对 5 批次疫苗进行效力检验, 结果无显著差异, 可为该类疫苗攻毒方法优化提供新思路。

[关键词] 鸡毒支原体; 灭活疫苗; 气囊注射; 效力检验

Research on Air Sacs Challenge Method of Potency Test of *Mycoplasma gallisepticum* Inactivated Vaccine

WEI Jin, LIU Bo, MA Xin, WANG Jia, ZHAO Hao-ran, LIU Yuan-jie,

FENG Yan, LIU Ye-bing, LUO Yu-feng*

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

Corresponding author: LUO Yu-feng, E-mail: luoyufengmy@163.com

Abstract: The aerosol challenge method for potency test of *Mycoplasma gallisepticum* inactivated vaccine requires a large amount of live broth culture and the result is influenced by spraying time and equipment. In order to establish a new method with stable test results, one batch of freeze-drying *Mycoplasma gallisepticum* R strain culture was prepared in this study, and its characteristics, purity, vacuum degree, residual moisture content, specificity, viable count and homogeneity were determined, and the results were confirmed to the regulations. Different challenge doses were applied in air sacs injection method, the results show that the injection method is stable and accurate, compared with the aerosol challenge regulated in Veterinary Pharmacopoeia of People's

基金项目: 中国兽医药品监察所兽药行业公益性重点专项“猪、鸡支原体生产/检验用菌种标准的修订”(GY202007)

作者简介: 魏 津, 助理研究员, 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: 罗玉峰。E-mail: luoyufengmy@163.com

Republic of China. Five batches of vaccines potency tests results show that there was no significant difference with aerosol challenge method. This research offered a good reference for the optimization of the challenge method of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*; inactivated vaccine; injection into air sacs; potency test

鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)是致病性最强、引起损失最大的禽支原体,主要导致鸡慢性呼吸道疾病(Chronic respiratory disease, CRD)^[1],以呼吸道啰音、咳嗽、流鼻涕为主要症状,部分表现为结膜炎、眶下窦炎。CRD 虽然致死率不高,但严重影响家禽产蛋率、孵化率和饲料转化率,给养殖企业造成重大经济损失^[2]。临床中由于长期使用或滥用抗菌药物,导致鸡毒支原体耐药菌株不断增加,给通过药物防控该病带来困难,甚至危及食品安全^[3],因此疫苗免疫是防控该病的重要手段,国内市场上占主导地位的是鸡毒支原体灭活疫苗^[4]。效力检验是评价疫苗质量的最核心手段,《中国兽药典(2020 年版三部)》中收录的该疫苗质量标准的效力检验采用免疫攻毒法,攻毒方式为喷雾^[5]。该方法需要制备 500–600 mL 的攻毒培养物,经过菌种复苏、扩大培养、活菌预计数和攻毒菌液计数等步骤,且活菌计数周期长,攻毒感染剂量不易控制,对操作人员的经验和技术要求高。同时,攻毒结果易受器械设备的影响较大,喷雾操作后消毒难度较大,存在生物安全隐患。为此,本研究通过将鸡毒支原体检验用攻毒菌种制备成方便使用和保存的冻干攻毒培养物,进行气囊注射攻毒试验和比较研究,旨在建立一种更加科学准确、操作简便的攻毒方法,也为相关标准品的研究制备提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 菌种 鸡毒支原体 R 株(CVCC 1651)由中国兽医药品监察所鉴定、保存和供应。

1.2 材料与试剂 硫乙醇酸盐流体培养基(TG)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、12% 明胶 40% 蔗糖保护剂均购自北京中海生物科技有限公司。圆形灭菌滤纸片,购自 oxoid 公司。鸡毒支原体抗血清,实验室保存。CM 液体和固体培养基由实验室自制。

1.3 实验动物 SPF 鸡购自北京勃林格殷格翰有限公司。

1.4 方法

1.4.1 冻干培养物制备

1.4.1.1 菌种扩繁 将–20℃保存的鸡毒支原体 R 株冻干菌种用 1 mL CM 液体培养基复溶后,按一定比例接种到 CM 液体培养基中 37℃培养 24 h 后,按一定比例接种培养基连续传代,第 3 代菌液经纯粹检验和活菌计数后待用。

1.4.1.2 分装冻干 取生长良好,有轻度混浊,无沉淀的第 3 代菌液,按总体积 10% 比例加入保护剂,充分混匀后分装至安瓿瓶内冻干,冻干后置于–80℃冰箱保存。

1.4.2 冻干培养物的鉴定

1.4.2.1 常规检验 对冻干培养物进行性状、纯粹检验、剩余水分、真空度、培养特性和活菌计数检验。

1.4.2.2 特异性试验 代谢抑制试验:用 CM 液体培养基对鸡毒支原体 R 株培养物进行 10 倍系列稀释到 10^{-5} ,取 1 mL 稀释好的菌液,加入含鸡毒支原体抗血清 0.05 mL(终浓度为 5%)的 CM 培养基 1 mL,同时设加阴性血清的小管为阳性对照,空白培养基作为阴性对照,置于培养箱 37℃培养 14 d,观察培养基颜色变化。生长抑制试验:取直径 6 mm 的圆形灭菌滤纸片,用未经稀释的鸡毒支原体抗血清湿透后,放入无菌平皿内,置于 2~8℃干燥待用。将 R 株培养物各 0.3 mL 分别接种到 2 个 CM 固体培养基,均匀铺开,放置 37℃培养箱使培养基表面稍干燥。用灭菌小镊子夹取抗血清纸片贴在固体培养基表面靠中间位置,另一个固体培养基贴空白纸片作为对照,置于培养箱 37℃培养 10 d 后在显微镜下观察结果。

1.4.3 瓶间活菌数均一性试验 随机抽取 10 瓶

冻干培养物,使用颜色变化单位(简称 CCU)分别对其进行活菌计数,比较活菌数的差异。

1.4.4 气囊注射攻毒方法的建立 将冻干培养物复溶后,根据冻干后活菌计数结果进行 10 倍倍比稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} ,将原液和每个稀释度进行活菌计数后分别取 0.2 mL 和 0.4 mL 气囊注射 10 只 75 日龄 SPF 鸡。制备鸡毒支原体 R 株的培养物 550 mL,进行活菌计数后在隔离器内喷雾攻击 10 只 75 日龄 SPF 鸡。另取 10 只鸡,5 只气囊注射 0.4 mL 培养基作为气囊注射对照组,5 只用培养基进行喷雾作为喷雾对照组。7 d 后记录活菌计数结果,确定实际攻毒剂量。14 d 后将所有组别的鸡剖检,记录气囊病变分数结果,气囊病变记分标准参照《中国兽药典(2020 年版三部)》“鸡毒灭活疫苗质量标准附注”^[5]。将气囊注射与喷雾攻毒的结果进行单因素方差分析。

1.4.5 气囊注射攻毒方法的评价 用喷雾和 1.2.4 项确定的气囊注射两种攻毒方法同时对 5 家企业 5 个批次的疫苗进行两次效力检验。每批疫苗取 1 瓶摇匀后免疫 56 日龄 SPF 鸡 8 只,1 mL/只。免疫 30 天后攻毒,比较两种方法的对照组气囊病变分数情况和平均气囊保护率,记分标准及计算方法参照《中国兽药典(三部)》“鸡毒灭活疫苗质量标准附注”^[5],评价利用气囊注射攻毒方法对灭活疫苗效力检验的可行性。

2 结果与分析

2.1 常规检验 冻干的 165 支菌种中,5 支无辉光,160/165 呈现白色或紫色辉光,真空度良好。纯

粹检验结果符合规定,水分测定结果为 0.7%、1.4%、0.2%、0.7%,均不超过 4.0%。活菌计数结果为 10^9 CCU/mL,培养菌落呈典型的“油煎蛋”状外观,符合培养特性的规定。

2.2 特异性试验 代谢抑制试验:加抗血清的培养基小管未变色,加阴性血清的培养基小管变黄,培养基对照管未变色。生长抑制试验:抗血清纸片周围无菌落生长,出现大于 2.0 mm 的抑菌圈;空白纸片的平板有菌落生长,没有抑菌圈,说明该菌种为鸡毒支原体,符合规定。

2.3 瓶间活菌数均一性试验 10 瓶冻干培养物活菌数均为 10^9 CCU,变异系数为 0%。

2.4 气囊注射攻毒方法的建立 喷雾攻毒用培养物活菌数为 10^9 CCU/mL,冻干培养物活菌数为 10^9 CCU/mL,稀释后复数结果 10^{-1} 、 10^{-2} 两个稀释度对应的活菌数为 10^8 CCU/mL 和 10^7 CCU/mL。不同攻毒方法的气囊病变分数结果见表 1;气囊注射 0.2×10^7 CCU 和 0.4×10^7 CCU 的培养物,6/10 和 5/10 分别出现 2 分以上的典型气囊病变,不符合菌种毒力标准的发病要求^[6];喷雾组方差大于气囊注射的 6 个实验组(方差反映一组数据的离散程度),说明喷雾组分数差异大,感染剂量不均一。将不同攻毒方法的病变分数进行单因素方差分析,结果见表 2;在显著水平 $\alpha = 0.05$ 时,气囊注射 0.4×10^9 CCU、 0.2×10^8 CCU 和 0.4×10^8 CCU 的 F 值均大于 F 临界值, P 值小于 0.05,与喷雾结果差异显著;气囊注射 0.2×10^9 CCU 的 F 值均小于 F 临界值, P 值大于 0.05,与喷雾结果无显著差异。

表 1 不同攻毒方法的气囊病变分数结果

Tab 1 Air sac lesion scores of different challenge methods													
攻毒方式	数量	活菌数/(CCU · mL ⁻¹)	气囊病变记分										方差
喷雾	10	10^9	1	3	2	3	3	3	0	4	3	4	1.6
喷雾对照组	5	/	0	0	0	0	0	/	/	/	/	/	/
气囊注射 0.4 mL	10	10^9	4	4	3	4	4	3	4	4	4	3	0.23
	10	10^8	3	4	4	4	3	4	3	3	4	4	0.28
	10	10^7	1	2	1	3	3	2	1	3	1	2	0.88
	10	10^9	2	2	3	4	4	3	4	4	3	3	0.32
气囊注射 0.2 mL	10	10^8	3	3	3	4	4	2	3	2	3	4	0.23
	10	10^7	1	3	2	2	3	1	1	1	1	2	0.82
气囊注射对照组	5	/	0	0	0	0	0	/	/	/	/	/	/

表 2 不同剂量气囊注射与喷雾攻毒方法气囊病变结果方差分析

Tab 2 Variance analysis of aerosol challenge and air sac injection with different doses							
攻毒剂量/(CCU·mL ⁻¹)	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	F 临界值
0.4 mL×10 ⁹	组间	6.05	1	6.05	6.6	0.019314	4.413873
	组内	16.5	18	0.916667	/	/	
	总计	22.55	19	/	/	/	
0.4 mL×10 ⁸	组间	5	1	5	5.357143	0.032651	
	组内	16.8	18	0.933333	/	/	
	总计	21.8	19	/	/	/	
0.2 mL×10 ⁹	组间	0.45	1	0.45	0.468208	0.502528	
	组内	17.3	18	0.961111	/	/	
	总计	17.75	19	/	/	/	
0.2 mL×10 ⁸	组间	4.05	1	4.05	4.418182	0.0499	
	组内	16.5	18	0.916667	/	/	
	总计	17.75	19	/	/	/	

“/”表示无数据

2.5 气囊注射攻毒方法的评价

2.4 项结果表明, 气囊注射 0.2 mL 10⁹ CCU/mL 的冻干培养物与现行喷雾方法无显著差异, 选用该攻毒剂量进行气囊注射攻毒。两次效力检验攻毒对照组气囊病变分数结果见表 3; 两次气囊注射攻毒分数无明显差异, 和喷雾方法相比, 分数也无明显差异。

表 3 不同攻毒方法两次效力检验的气囊病变分数

Tab 3 Air sac lesions scores of different challenge methods in two potency tests										
攻毒方法	分组	数量	活菌数/(CCU·mL ⁻¹)	气囊病变记分						
第一次喷雾	对照组	6	10 ⁹	3	3	3	1	2	1	/
	免疫组 1	8		1	1	1	1	0	2	0
	免疫组 2	8		0	1	0	0	0	1	2
	免疫组 3	8		0	1	0	0	0	1	1
	免疫组 4	8		0	1	0	0	1	0	1
	免疫组 5	8		1	0	0	0	1	0	0
第一次气囊注射(0.2 mL)	对照组	6	10 ⁹	2	3	3	3	2	3	/
	免疫组 1	8		0	0	2	1	1	0	1
	免疫组 2	8		1	1	0	1	0	2	0
	免疫组 3	8		2	0	0	0	0	0	0
	免疫组 4	8		1	0	1	0	1	1	1
	免疫组 5	8		0	2	0	1	0	0	1
第二次喷雾	对照组	6	10 ⁹	3	2	2	1	3	0	/
	免疫组 1	8		1	0	1	0	1	0	2
	免疫组 2	8		1	2	0	0	0	0	0
	免疫组 3	8		0	1	0	0	0	0	1
	免疫组 4	8		0	2	1	0	0	0	0
	免疫组 5	8		1	0	0	1	0	0	0
第二次气囊注射(0.2 mL)	对照组	6	10 ⁹	2	2	3	3	3	2	/
	免疫组 1	8		1	0	1	2	1	1	0
	免疫组 2	8		1	0	3	0	1	0	0
	免疫组 3	8		1	0	0	0	0	1	0
	免疫组 4	8		0	1	1	0	1	1	1
	免疫组 5	8		0	1	0	0	0	0	2

两次效力检验结果比较见表 4。结果表明，5 家企业 5 批产品采用两种攻毒方法进行效力检验，平均气囊保护率无明显差异，检验结果符合率 100%。

表 4 不同攻毒方法两次效力检验的结果比较

Tab 4 Comparative results of different challenge methods in two potency tests						
企业编号	平均气囊保护率/%				检验结果	符合率
	第一次喷雾	第一次气囊注射	第二次喷雾	第二次气囊注射		
1	65.4	67.2	62.5	65	符合规定	100%
2	71.2	71.9	72.7	75	符合规定	100%
3	82.7	85.9	86.3	85	符合规定	100%
4	77.0	76.6	79.5	75	符合规定	100%
5	82.7	81.3	86.3	80	符合规定	100%

3 结论与讨论

目前国内外鸡毒支原体灭活疫苗效力检验均采用喷雾攻毒法。在鸡毒支原体的研究过程中,有多种方法用于鸡的攻毒感染试验,包括鼻、眼、窦和气管内的接种^[7],气囊注射^[8]、气雾攻毒^[9]、肺内注射^[10]。据赖月辉等 2018 年报道^[11]气囊攻毒的病变比肺内攻毒出现的病变更典型,效果更好,具有良好的重复性。采用气囊注射具有易定位、易操作和接种量更精确的优点,直接感染气囊,避免了喷雾攻毒试验鸡由于吸入量可能不同导致感染剂量不均一,发病情况差异大的问题。同时,采用注射攻毒,所需培养物量少,易于制备,并利于隔离器消毒处理,大大降低了生物安全隐患。

采用新鲜培养物攻毒,需要每次预培养摸索攻毒菌株在该批培养基的生长曲线,并据此重新培养进行攻毒,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。本研究制备了冻干攻毒用培养物,保存于-80℃,通过攻毒试验确定了攻毒剂量,应用于两次鸡毒支原体疫苗效力检验中,结果表明,在此段时间内活菌数和毒力均保持稳定,且效力检验结果与喷雾方法无显著差异。将其应用于效力检验将减少复苏强毒菌种和再培养等步骤,降低工作量。每次采用同一批攻毒用冻干培养物,提高了检验结果的准确性和可重复性,提升了检验效率,为研制攻毒用标准品

提供实验依据。

未来可通过不同保存条件、保存时长内活菌数和毒力稳定性的监测,确定本研究中冻干培养物的保存要求和时限。同时可考虑筛选一种新的冻干保护剂,提高其在不同温度环境存放的稳定性并延长保存期,实现对外供应,为提高鸡毒支原体疫苗效力评价水平奠定基础。

参考文献:

[1] Levisohn S, Kleven S H. Avian mycoplasmosis [J]. Scientific and Technical Journal,2000,19(2):425-429.

[2] 王育伟,岳华,张晓晖,等. 鸡毒支原体研究概况[J]. 动物医学进展,2016,37(7):106-110.

Wang Y W, Yue H, Zhang X J, et al. The situation of research on *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016,37(7):106-110.

[3] 牛家强,徐业芬,胡思顺,等. 藏鸡鸡毒支原体的分离鉴定及对常用抗菌药物的敏感性试验[J]. 中国兽医学报,2018,38(11):2084-2093.

Niu J Q, Xu Y F, Hu S S, et al. Isolation and identification of *Mycoplasma gallisepticum* from Tibetan chickens in Tibet and its sensitivity to common antimicrobial agents [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2018,38(11):2084-2093.

[4] Muhammad I, Wan Y H, Mohammad Z K, et al. Current status of vaccine research, development, and challenges of vaccines for *Mycoplasma gallisepticum* [J]. Poultry Science, 2020 (99): 4195-4202.

[5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版三部

[S]. Committee of China Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, Volumn III ,2020 Edition[S].

[6] 鸡毒支原体灭活疫苗制造及检验试行规程[Z]. Regulations for manufacture and test protocols of *Mycoplasma gallisepticum* inactivated vaccine[Z].

[7] Levisohn Sharon,Dykstra M J,*et al.* Comparison of *in vivo* and *in vitro* methods for pathogenicity evaluation for *Mycoplasma gallisepticum* in respiratory infection[J]. Avian Pathology,1986,(15):233-246.

[8] Barbour E K,Newman J A. Preliminary data on efficacy of MG vaccines containing different adjuvants in laying hens [J]. Vet Immunol Immunopathol,1990,26(2):115-123.

[9] Whithear K G,Harrigan K E,Kleven S H. Standardized method of aerosol challenge for testing the efficacy of MG vaccines [J]. Avian Disease,1996,40(3):654-660.

[10] 闻人楚,陈培龙,陈嘉棣,等. 4 株鸡毒霉形体对 SPF 源雏鸡的致病性试验[J]. 上海农业学报,1995,11(2):1-5.

Wen R C,Chen P L,Chen J L,*et al.* Pathogenicity test of 4 *Mycoplasma gallisepticum* strains on SPF chickens [J]. Acta Agriculturae Shanghai,1995,11(2):1-5.

11 赖月辉,李嘉爱,齐冬梅,等. 鸡毒支原体人工发病模型的建立[J]. 广东畜牧兽医科技,2018,43(3):42-44.

Lai Y H,Li J A,Qi D M,*et al.* Establishment of the model for *Mycoplasma gallisepticum* infection [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science,2018,43(3):42-44.

(编辑:李文平)