

猪肺疫内蒙系弱毒菌苗的检验

袁建琴¹ 高斌战²

1. 山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 030801; 2. 山西隆克尔生物制药有限公司, 山西太谷 030800

摘要 为了确保猪肺疫内蒙系弱毒菌苗的生物安全, 保证其对猪肺疫的预防效果, 试验通过菌苗水分测定、活菌苗纯粹检验、活菌苗计数检验、菌苗安全检验及菌苗效力检验, 对其生物安全进行综合评定。结果显示: 猪肺疫内蒙系弱毒菌苗水分含量在 3% 以下; 无杂菌存在; 计数结果与出厂时标注的头份数相符; 安全检验中免疫动物均存活; 效力检验中免疫组小白鼠均存活, 对照组小白鼠均死亡。表明猪肺疫内蒙系弱毒菌苗各项检验合格, 可用于实际生产。

关键词 猪肺疫; 弱毒菌苗; 生物安全; 水分测定; 纯粹检验; 计数检验; 安全检验; 效力检验

猪肺疫又名猪巴氏杆菌病, 俗称“清水喉”或“锁喉风”, 是由巴氏杆菌引起的一种急性、热性传染病, 以败血症、咽喉炎和胸膜肺炎为主要特征。本病的发生与猪体抵抗力及病原毒力有很大关系, 健康猪约 30% 带菌; 饲养管理不善、长途运输、发生寄生虫病等, 可使猪体抵抗力降低, 引起猪只内源性感染。本病虽一年四季都可发生, 但在气候多变的早春、晚秋多见, 常与猪瘟及猪肺炎支原体病混合感染或继发感染。病猪的分泌物不断排出有毒力的病原菌, 经消化道、呼吸道或皮肤、黏膜的伤口感染健康猪。本病一般为散发, 但毒力较强的病原菌有时可引起地方性流行^[1]。猪肺疫内蒙系弱毒菌苗对于猪肺疫有很好的预防效果, 所以其药品本身的纯粹性、效价性及安全性显得特别重要。鉴于菌苗本身的特性, 本试验采用合适的方法^[2-10]对猪肺疫内蒙系弱毒菌苗的安全特性进行了检验, 以确保菌苗的安全。

1 材料与方法

1.1 试验动物

小白鼠(18~22 g)和豚鼠(300~400 g)均购于山西医科大学。

1.2 主要试剂

猪肺疫内蒙系弱毒菌苗(批号为 20120201, 山

西隆克尔生物制药有限公司生产); C44-1 猪肺疫强毒菌(山西隆克尔生物制药有限公司提供); 普通肉汤(pH 值为 7.2~7.4, 按 23.5 g/L 配制); 营养琼脂(按 32.0 g/L 配制); 固体酪胺琼脂(GA, 按 45.0 g/L 配制); 硫乙醇酸盐(TG, 按 29.5 g/L 配制); 葡萄糖蛋白胨(GP, 按 17.0 g/L 配制)。

1.3 试验准备

观察所使用菌苗的出厂日期、失效日期和贮存方法, 观察菌苗是否有淤结、粘连等异常现象。玻璃瓶有裂纹、瓶塞松动以及色泽等物理性状与说明书不一致的菌苗不得使用^[7]。

1.4 菌苗的水分测定

1) 从每批菌苗中抽取真空良好、冻干均匀、无异物的样苗 4 瓶, 分别标记为 A、B、C、D, 记录测定日期、天气、室温、菌苗名称及其批号等。

2) 将冻干苗捣碎后小心倒入称量瓶中, 在电子天平上进行称量, 并记录。

3) 将盛有药品的称量瓶小心放进 65 °C 干燥箱中烘干, 一直到药品干至恒重为止(约 6 h); 然后, 将盛有药品的称量瓶取出, 称重, 并记录。

1.5 菌苗的纯粹检验

1) 每批菌苗抽样 5 瓶, 去盖留塞, 标注批号。

2) 准备 37 °C 下 TG、GA 各 5 支, 25 °C 下 GA、

TG、GP 各 5 支,按顺序插入试管架,移入超净工作台。

3)用镊子夹取酒精棉放入手心揉搓消毒,再将样品瓶塞用酒精棉依次擦拭。然后,点燃酒精灯,在火焰旁用 5 mL 注射器吸取 4 mL 的普通肉汤小心注入菌苗药品瓶内,小心轻轻摇动菌苗瓶使菌苗稀释均匀,待菌样溶解后,分别向盛有各种培养基的试管中接入 0.2 mL 菌液。

4)接种完成后,分别在 37 和 25 °C 培养箱中培养 5 d,每天对菌的生长情况进行观察,并详细记录。

1.6 菌苗的计数检验

1)准备 3 组试管(分别标记为 I 号、II 号、III 号),每组 7 支,排列于试管架上,用 10 mL 吸管分别向每支试管加 4.5 mL 肉汤。

2)用 10 mL 吸管分别向每瓶样苗加 5 mL 肉汤。待溶解后,再用 1 mL 吸管从稀释的样苗中吸取 0.5 mL 加入到 I 号组的第 1 支试管中,这时稀释倍数是 10^{-1} 。

3)用手心轻振样苗 10~15 次,另换 1 支 1 mL 吸管在第 1 支试管中吸排液体 3~5 次,以混匀;再从第 1 支试管中吸取 0.5 mL 加入到第 1 组第 2 支试管内,此时稀释倍数为 10^{-2} 。重复上述操作依次稀释到第 7 支试管,此时稀释倍数为 10^{-7} 。

4)再换 1 支 1 mL 吸管吸排 3~5 次,吸取适量滴入 2 付普通肉汤平皿内(每付 0.1 mL,分别标为 +I 号和 -I 号),摇匀后,倒置于 37 °C 恒温箱。

5)对剩余的 2 瓶样苗进行同样操作,并分别将相应的平皿标为 +II 号、-II 号和 +III 号、-III 号。培养 24 h 以后,观察并计数。

1.7 菌苗的安全检验

1)以最低菌数计算,将原菌苗稀释成 2×10^9 个/mL,在 2 只豚鼠的后腿肌肉处注射 2.5 mL(含菌 5×10^9 个)。

2)将以上豚鼠注射苗再稀释 20 倍(即成 1×10^8 个/mL),随即向 5 只小白鼠的皮下注射 0.1 mL(含菌 1×10^7 个)。

3)观察以上试验动物 10 d,并进行记录。

1.8 菌苗的效力检验

1)用 20% 铝胶生理盐水,将猪肺疫内蒙系弱毒菌苗按最低菌数稀释成 1×10^7 个/mL,用稀释菌液向 7 只小白鼠的皮下注射 0.2 mL(含菌 2×10^6 个),观察 14 d。

2)第 12 天时,先分别测定冰箱冷藏箱不同位置的温度(内部 6 °C、中部 7 °C、门侧 8 °C)。然后,用 10 mL 吸管分别向 3 支试管(分别标记为 1 号、2 号、3 号)内加入 4.5 mL 肉汤,再向 C44-1 猪肺疫强毒菌中加入 5.0 mL 肉汤,待样苗溶解后,摇匀。之后,用 1 mL 吸管从稀释的样苗中吸取 0.5 mL 分别加入到 1 号、2 号、3 号试管中。最后,将这 3 支试管置 37 °C 恒温培养箱内培养 1 d。

3)第 13 天时,先准备 3 组试管(分别标记为 1 号、2 号、3 号),每组 6 支,排列于试管架上,用 10 mL 吸管分别向每支试管加 4.5 mL 肉汤。然后,取出恒温培养箱中的 3 管强毒苗,从 1 号样苗试管中用 1 mL 吸管吸取 0.5 mL 加入到 1 号组第 1 个试管内(即稀释为 10^{-1}),用手心轻轻振打 10~15 次;另换 1 支 1 mL 吸管在第 1 支试管内吸排 3~5 次以混匀,之后吸取 0.5 mL 加入第 2 支试管内。重复以上步骤,逐个稀释到第 6 支试管(即稀释为 10^{-6})。之后,再换 1 支 1 mL 吸管吸排 3~5 次,吸取适量滴入 2 付普通肉汤平皿内(每付滴 0.1 mL,分别标为 +1 号和 -1 号),小心将所加液体铺开,倒置放于 37 °C 恒温箱。最后,对 2 号与 3 号菌苗进行同样操作并分别将相应的平皿标为 +2 号、-2 号和 +3 号、-3 号。24 h 后对平皿进行观察并计数。上述操作完成后,将 3 管强毒菌分别放入冰箱的内部(1 号)、中部(2 号)和门侧(3 号)。

4)第 14 天时,先对平皿计数结果进行统计,依照统计结果,从冰箱中的 3 管强毒菌中分别取出适量菌液进行稀释。然后,挑选 5 只经猪肺疫内蒙系弱毒菌苗免疫的小白鼠连同 3 只对照鼠(未经免疫),皮下注射 30 个致死量的 C44-1 猪肺疫强毒菌。之后,再另加 3 只小白鼠做副对照,皮下注射 1 个致死量的 C44-1 猪肺疫强毒菌。最后,观察 1 周,对各组小白鼠的生长以及存活情况进行详细的记录。

5)每天继续对冰箱中的强毒菌进行稀释并接种至肉汤培养皿中,第 2 天观察计数,重复 5 d。

2 结果与分析

2.1 菌苗的水分测定

2013 年 3 月 6 日,天气为阴天,室温 20 °C,样苗批号为 20120201,恒温干燥箱的设定温度为 65 °C,测定冻干苗中的水分含量如表 1 所示。

表 1 菌苗水分测定

样苗	A	B	C	D
称量瓶质量/g	10.735	10.637	10.695	10.722
干燥前称量瓶及样苗质量/g	11.014	10.911	10.970	10.996
干燥后称量瓶及样苗质量/g	11.006	10.904	10.962	10.988
样苗质量/g	0.279	0.274	0.275	0.274
样苗中水分质量/g	0.008	0.007	0.008	0.008
样苗含水量/%	2.87	2.55	2.91	2.91

注:样苗含水量=样苗中水分质量/样苗质量×100%

由表 1 可以看出,采用干燥法通过 3 次称重得到的样苗含水量为:A 2.87%、B 2.55%、C 2.91%、D 2.91%。

2.2 菌苗的纯粹检验

经隔日观察,25℃下以 GA、TG、GP 为培养基以及 37℃下以 TG、GA 为培养基的菌样均未出现杂菌,以 GA 为培养基的菌苗生长良好(见图 1),以 GP 为培养基的菌样呈絮状(见图 2),以 TG 为培养基的菌样上下分层且混浊(见图 3)。



图 1 以 GA 为培养基的菌苗(右为对照)



图 2 以 GP 为培养基的菌苗(右为对照)



图 3 以 TG 为培养基的菌苗(右为对照)

2.3 菌苗的计数检验

将培养了 24 h 的培养皿从恒温培养箱中取出,菌苗的计数检验结果见表 2。

表 2 菌苗计数检验结果 个

样苗	I 号		II 号		III 号	
	+I 号	-I 号	+II 号	-II 号	+III 号	-III 号
菌数	31	30	29	31	32	31
平均	31		30		31	

由表 2 可以看出,菌苗的平均计数结果为 30 个。因将原菌苗稀释 10^{-8} ,故最低样苗菌数为 3×10^9 个,根据公式:确定出厂头份数=最低样苗菌数 $\times 5 / (3 \times 10^8)$,可计算得出菌苗头份数为 50。

2.4 菌苗的安全检验

经过 10 d 的观察,发现豚鼠全部存活,小白鼠也无一死亡;且两者均无发病症状和其他不良反应,活动、精神状态等表现正常。

2.5 菌苗的效力检验

1) 将冰箱内部、中部、门侧的菌苗在培养皿上培养之后进行计数并将结果汇总(见表 3)。

表 3 菌苗效力计数测定 个

样苗	1 号		2 号		3 号	
	+1 号	-1 号	+2 号	-2 号	+3 号	-3 号
第 1 天	96	94	101	100	119	120
第 2 天	82	78	97	92	114	120
第 3 天	75	78	85	82	95	92
第 4 天	68	61	72	73	83	78
第 5 天	54	49	65	62	69	66

注:1 号温度为 6℃;2 号温度为 7℃;3 号温度为 8℃

由表 3 可以看出,菌落数:3 号 > 2 号 > 1 号,且随着时间的推移菌落成活率下降。

2) 观察表明,免疫组小白鼠生活状态良好、无一死亡,对照组和副对照组中的小白鼠在注射强毒后迅速死亡。

3 讨论

3.1 菌苗的水分测定

菌苗的水分含量会对菌苗本身的品质以及稳定性产生重要影响。菌苗所含残余水分过高,会致使相当数量的菌苗死亡,从而造成免疫失败。但水分含量过低,又会使菌体脱水,同样会使菌苗死亡,达不到免疫的目的^[9]。在进行水分测定前,要先对菌苗进行简单的检查,看清生产日期、批号、贮存温度等,且要选择肉眼观察无杂质的菌苗。在开盖和测定时,要确保无杂质引入,且要保证不将菌苗中的冻干粉洒出,以免对试验结果造成影响。本试验检验

的 4 组菌苗的水分含量均小于 3%，达到了冻干苗水分含量的质量检测标准。

3.2 菌苗的纯粹检验

需氧菌适宜在 GA 固体培养基上生长；需氧菌适宜在 TG 液体培养基的上部粉红层生长，而厌氧菌则适宜在底部；霉菌和腐生菌适宜在 GP 培养基上生长。另外，25 和 37℃ 覆盖了大多数菌生长的最适温度范围。为了能综合检验菌苗中是否含有杂菌，从而更全面地判定菌苗本身的纯粹性，故用 GA、TG 和 GP 3 种不同培养基并在 25 和 37℃ 2 种不同温度下培养猪肺疫弱毒菌苗。本试验所用菌苗在 GA、TG 和 GP 3 种培养基及 25 和 37℃ 2 种温度下均未见杂菌生长，而且菌苗弱毒菌株均有生长，排除了人为等外部因素在试验时将杂菌致死的可能。故判定所用菌苗的纯粹检验项目合格。

3.3 菌苗的计数检验

免疫接种时，菌苗的用量要合适，超量会导致动物不适或引起并发症甚至死亡；不足则达不到预防疾病的目的。所以，计数检验对菌苗含量的检测十分必要。本试验检验后通过计算得出该菌苗头份数为 50，与菌苗说明书标注的头份数相符。故判定所用菌苗的计数检验项目合格。

3.4 菌苗的安全检验

对人、畜、环境安全是对各类兽用生物制品最基本的要求。兽用生物制品质量标准规定：对于预防、治疗等用途的不同类型的兽用生物制品必须进行安全检验。根据兽用生物制品研究报告所制定的生物制品标准说明，用一定的剂量和合适的途径接种实验动物（家兔、小鼠、豚鼠等），经过一定的观察期，通过对被接种动物局部或全身的评价，可以反映接种产品的安全性。本试验中实验动物全部生长正常，故判定所用菌苗的安全检验项目合格。

3.5 菌苗的效力检验

鉴于猪肺疫病原菌能使小白鼠发病，使之产生免疫原性，而且能在小白鼠体内产生免疫反应。故

本试验选用小白鼠作为攻毒实验模型。

在攻毒时，为了确定当天要为小白鼠注射的 C44-1 猪肺疫强毒菌的数量，故要对冰箱不同位置的 C44-1 猪肺疫强毒菌进行培养计数，这样当天取出培养了 24 h 的平皿中的菌落数即为前 1 d 试管中强毒菌的菌存数，而且由表 3 统计结果可以得出每天冰箱中的强毒菌会以 10% 的速度死亡。所以，在第 14 天时，再用 C44-1 猪肺疫强毒菌攻击免疫组、对照组以及副对照组小白鼠时，可以由当天平皿中的菌存数推算出为小白鼠注射的强毒菌量。试验结果表明，该菌苗所能保护的免疫组的小白鼠为 5/5，已经达到了保护 4/5 以上的标准。故判定所用菌苗的效力检验项目合格。

参 考 文 献

- [1] 姜平. 兽医生物制品学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 67-68.
- [2] 刘操, 杨忠宝, 刘建柱. 猪肺疫菌苗及种类[J]. 猪业科学, 2009, 8(3): 35-36.
- [3] 张文奎. 猪肺疫的诊断与防治[J]. 山东畜牧兽医, 2013, 8(3): 21-22.
- [4] BLACKALL P J, MCINTOSH G B. The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis [J]. Veterinary Microbiology, 2001, 1(1): 35-37.
- [5] 周国家, 唐巧英. 生物制品生产规范与质量控制[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 121-122.
- [6] 袁方. 探讨药品储存对药品质量的影响[J]. 科技视界, 2012, 7(2): 183.
- [7] 孙建红, 曹殿军. 常用畜禽疫苗实用指南[M]. 北京: 金盾出版社, 2003: 65-66.
- [8] 徐姗姗, 刘景利. 兽用生物制品检验工作中的探讨(一)[J]. 畜牧兽医科技信息, 2011, 4(2): 12-14.
- [9] 武文娣, 刘大卫. 2012 年 6 月全球疫苗安全咨询委员会报告[J]. 中国疫苗和免疫, 2013, 5(1): 92-95.
- [10] 孙玉荣, 沈玉春, 殷海莹. 实验动物在兽医生物制品生产和检验中的重要作用[J]. 辽宁畜牧兽医, 1997, 2(1): 43-45.

(责任编辑: 郭会田)