

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2021.3.03

羊链球菌 CVCC55001、CVCC55002 株的制备与鉴定

张一帜,任小侠,李建,王秀丽,刘元杰,李俊平,张媛*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2020-10-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 03-00011-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为研究羊链球菌 CVCC55001、CVCC55002 株的菌种特性,制备了新的菌种批并对其形态及生化特性、培养特性、血清学特性、真空度、纯粹、剩余水分、毒力及免疫原性等进行了鉴定,对其适宜培养基进行了筛选。试验结果表明,该冻干菌种的形态及生化特性、培养特性、血清学特性、真空度、纯粹、剩余水分、毒力及免疫原性均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇版质量标准的规定。在免疫原性鉴定中,未免疫羊的最小致死剂量:CVCC55001 为 1.2×10^4 CFU, CVCC55002 为 2.6×10^4 CFU,免疫组能够被有效保护。使用不同培养基对该菌进行培养比对,证实血清为该菌必需成分。本研究可为羊链球菌的制备和鉴定提供参考,也为该菌的稳定培养和疫苗工艺改进提供了研究基础。

[关键词] 羊链球菌;毒力;免疫原性;培养基筛选

Preparation and Verification of *Streptococcus ovis* Strains CVCC55001 and CVCC55002

ZHANG Yi-zhi, REN Xiao-xia, LI Jian, WANG Xiu-li, LIU Yuan-jie, ZHANG Yuan*

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

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

Abstract: In order to study the characteristics of *Streptococcus ovis* CVCC55001 and CVCC55002 strains, new batches were prepared, the morphology and biochemical characteristics, culture characteristics, serological characteristics, vacuum degree, purity, residual moisture, virulence and immunogenicity of the strains were tested, and the appropriate medium for the bacteria was screened. The results showed that all the verification items of two strains were in compliance with the quality standard of "Regulations for Veterinary Biological Products of the PRC, 2000 version". In the immunogenicity test, the minimum lethal dose of unimmunized sheep was CVCC55001 1.2×10^4 CFU, CVCC55002 2.6×10^4 CFU, and the immunized group could be effectively protected. Different culture media were compared for the bacteria, and it was confirmed that the serum was essential for the bacteria culture. This study provides a reference for the preparation and verification of

作者简介:张一帜,助理研究员,从事细菌类生物制品的检测工作。

通讯作者:张媛。E-mail: 8078@sina.com

Streptococcus ovis, and provides a research basis for the culture stability of the bacteria and the improvement of vaccine technology.

Key words: *Streptococcus ovis*; virulence; immunogenicity; medium selection

羊链球菌病是由溶血性链球菌引起的一种急性热性传染病,多发于冬春寒冷季节(11月至次年4月)。羊链球菌病主要通过消化道和呼吸道传播,自然感染潜伏期通常为2~10 d。病羊主要症状是呼吸困难,行动不便,临死时跪地不起,伴有磨牙、呻吟等症状。临床上特征表现为发热,下颌和咽喉部肿胀,胆囊肿大和纤维素性肺炎^[1]。在我国,羊链球菌严重危害山羊、绵羊健康,该菌也能够感染人,引起高热伤口感染、心内膜炎、肺炎及会厌炎等细菌感染典型症状^[2]。

羊链球菌 CVCC55001、CVCC55002 为羊链球菌灭活疫苗生产、检验用强毒菌种,也是羊链球菌菌种免疫原性鉴定的攻毒菌种。此二株菌种最初由青海牧医所于青海省贵南县分离所得,现保存于中国兽医微生物菌种保藏管理中心。羊链球菌 CVCC55001、CVCC55002 均属于强毒株,血清型为兰氏 C 型,属马链球菌兽疫亚种(*S. equi* subsp. *zooepidimicus*)^[3]。该菌环境抵抗力较弱,对湿热和干燥均敏感,在 60 °C 处理 30 min 即会死亡。该菌对于红霉素、青霉素、四环素、金霉素以及磺胺类药物都非常敏感^[4]。《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版中规定这两株菌种在冻干状态下 2~8 °C 的保存期为 4 年,新制备的菌种应按照《规程》进行鉴定。本文对 CVCC55001、CVCC55002 株羊链球菌的制备和鉴定方法进行了研究,并对该菌的适宜生长培养基进行比对,以期为该菌的鉴定和相关标准的制修订提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种 羊链球菌 CVCC55001、CVCC55002 株,2016 年 3 月 22 日冻干,F7,由中国兽医药品监察所菌种保藏中心提供。

1.2 培养基及试剂 马丁琼脂培养基、改良马丁琼脂培养基、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基、马丁肉汤培养基、缓冲肉汤培养基、液体硫乙醇酸盐

培养基(TG)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、生理盐水、5%蔗糖脱脂牛奶均购自北京中海生物技术有限公司;ATB 链球菌快速鉴定试剂盒、哥伦比亚血琼脂平板购自 Bio Mérieux 公司,革兰氏染色液购自海博生物,荚膜染色液购自源叶生物,链球菌分型试剂盒购自 Oxoid 公司。

1.3 实验动物 实验兔购自北京隆安实验动物技术有限公司;健康绵羊分别购自河北、甘肃某养殖场。

1.4 菌种复壮 开启 2016 年 3 月 22 日冻干的羊链球菌 CVCC55001、CVCC55002 株各一支,用 0.5 mL 马丁肉汤溶解后,分别接种含 10% 绵羊脱纤血马丁琼脂平板(以下简称血平板)2 付,37 °C 培养 18 h。之后挑取该平板上的典型菌落,分别接种含 10% 绵羊脱纤血琼脂斜面 2 支,37 °C 培养 24 h,血斜培养物呈灰色、半透明、湿润、粘稠。将血斜培养物划取少量接种含 10% 马血清的马丁肉汤,37 °C 静置培养 24 h 后,肉汤培养物一致混浊,无菌膜。将肉汤培养物 20 倍稀释后,2 mL/只颈静脉注射 1~2 岁健康绵羊。羊于 4~5 d 内死亡,剖解无菌取肝脏和心血,用接种环分别取少量肝脏、心血接种血平板各 1 付,37 °C 培养 24 h。

1.5 菌种的鉴定

1.5.1 真空度测定、纯粹检验及剩余水分测定 根据 2015 年版《中国兽药典》进行检验^[5]。

1.5.2 培养特性鉴定 用接种环取刮取少量菌体在含 10% 绵羊脱纤血琼脂平板或哥伦比亚琼脂平板上划线培养,37 °C 培养 18~24 h,观察菌落形态。

1.5.3 形态和生化特性鉴定 取新鲜培养的哥伦比亚琼脂平板上的菌体进行革兰氏染色、荚膜染色,进行判定。参照 ATB 链球菌快速鉴定试剂盒使用说明书进行生化特性检查。

1.5.4 血清学特性鉴定 按照 Oxoid 链球菌分群试剂盒说明书,挑取新鲜培养物,加至酶溶液中混

匀、消化后,分别与革兰氏 A、B、C、D、E、F 群典型血清进行反应,观察是否出现凝集现象。

1.5.5 培养基比对研究 分别使用含 10% 新生牛血清改良马丁琼脂、改良马丁琼脂、含 10% 新生牛血清 TSA、TSA 对于 CVCC55001、CVCC55002 肉汤培养物进行活菌计数,平板培养 18 ~ 24 h 观察记录结果。

1.5.6 免疫原性鉴定 按照《中华人民共和国兽用生物制品规程》制备羊链球菌 CVCC55001、CVCC55002 灭活疫苗^[6], 2 ~ 8 °C 保存。分别免疫 1 ~ 2 岁各绵羊 4 头, 5 mL/头。再分别用 CVCC55001、CVCC55002 新鲜菌液对同一批羊进行测毒, 14 d 后确定各株的最小致死量。免疫 21 d 后使用 CVCC55001、CVCC55002 最小致死量对免疫组、对照组羊进行攻毒, 观察各组羊状态持续 21 d, 记录结果。

1.5.7 毒力鉴定 分别采集 CVCC55001、CVCC55002 株测毒试验中濒死羊心血, 接种含 5% 血清缓冲肉汤, 培养 16 h 后用马丁肉汤 1000 倍稀释濒死羊心血培养物, 2 mL/头静脉注射绵羊 1 ~ 2 岁羊 2 头, 之后对于菌液进行活菌计数。再取出 1 支 CVCC55001 株和 CVCC55002 株濒死羊心血, 接种含 5% 血清缓冲肉汤, 培养 16 h。次日, 统计活菌计

数结果并按该结果使用马丁肉汤将两种菌液分别稀释至 90 CFU/mL (规程要求 70 ~ 100 CFU/mL), 同时复数确认实际注射剂量, 1 mL/只静脉注射家兔各 5 只。要求绵羊注射后 21 d 内全部死亡, 家兔注射后 10 d 内全部死亡^[6]。

2 结果与分析

2.1 真空度测定 对冻干的 2 株菌种进行真空度测定, CVCC55001 株 194/200、CVCC55002 株 194/200 呈现白色或粉色或紫色辉光, 符合规定; 将不符合规定的冻干菌种进行无害化处理。

2.2 纯粹检验 分别各抽取 5 支真空度测定良好的 CVCC55001、CVCC55002 株菌种进行纯粹检验, 结果均为 5/5 符合规定。

2.3 剩余水分测定 分别各抽取 8 支真空度测定良好的 CVCC55001、CVCC55002 株菌种进行剩余水分测定, 剩余水分测定结果为 CVCC55001: 0.8%、0.6%、0.9%、1.2%; CVCC55002: 0.6%、0.7%、0.9%、1.1%, 均符合规定。

2.4 培养特性鉴定 肉眼观察培养 18 h 的 CVCC55001、CVCC55002 株菌落状态为灰色、半透明、湿润、粘稠, 继续培养至 24 h, 对光观察可见菌落周围有一圈透明溶血环, 为 β 溶血 (图 1)。



图 1 CVCC55001 株 (左)、CVCC55002 株 (右) 菌落培养形态

Fig 1 Colony culture morphology of strain CVCC55001 (left) and CVCC55002 (right)

2.5 形态和生化特性鉴定 挑取新鲜培养物进行革兰氏染色, 结果为革兰氏阳性球菌, 呈单个、成对和短链排列。挑取新鲜培养物进行荚膜染色, 结果为有透明状荚膜。符合形态鉴定规定。使用自动

细菌鉴定系统读取 CVCC55001、CVCC55002 菌种反应结果相同, 均为马链球菌兽疫亚种, 具体详见表 1, 生化特性鉴定结果符合规定。

表 1 CVCC55001、CVCC55002 菌种生化特性鉴定结果

Tab 1 Biochemical characteristics results of strain CVCC55001 and CVCC55002

生化项目	简称	结果	生化项目	简称	结果
乳糖	LAC	+	精氨酸双水解酶	ADH	+
甲基-β-D 葡萄糖吡喃苷	MβDG	-	D-松三糖	MLZ	-
D-蜜二糖	MEL	-	D-甘露醇	MAN	-
支链淀粉	PUL	+	L-阿拉伯糖	LARA	-
焦谷氨酸芳胺酶	PYRA	-	马尿酸盐	HIP	-
甘氨酸色氨酸芳胺酶	GTA	-	糖原	GLYG	+
D-阿拉伯醇	DARL	-	环式糊精	CDEX	-
丙氨酸苯丙氨酸脯氨酸芳胺酶	APPA	+	D-麦芽糖	MAL	+
尿素酶	URE	-	β-甘露醇	βMAN	-
β-葡萄糖醛酸酶	βGUR	?	β-葡萄糖苷酶	βGLU	-
β-半乳糖苷酶	βGAR	-	β-半乳糖苷酶	βGAL	-
碱-性磷酸酶	PAL	+	VP 试验	VP	-
B-N 乙酰葡萄糖胺	βNAG	-	D-海藻糖	TRE	-
D-塔格糖	TAG	-	D-山梨醇	SOR	?
蔗糖	SAC	+	D-核糖	RIB	-
D-棉子糖	RAF	-	α-半乳糖苷酶	αGAL	-

“+”表示反应结果阳性，“-”表示反应结果阴性，“?”表示反应结果可疑

2.6 血清学特性鉴定 按照 Oxoid 链球菌分群试剂盒说明书进行检测,菌种 CVCC55001、CVCC55002 株菌落与 A、B、D、E、F 群典型血清均无凝集反应,与 C 群典型血清出现凝集反应。判定血清学特性鉴定结果均符合规定。

2.7 培养基比对研究 分别对 CVCC55001、CVCC55002 肉汤培养物进行活菌计数,将原菌液稀释至 $10^{-5}/3$ 后,吸取 0.1 mL 滴板培养 20 h。结果

可以看到,无论是改良马丁琼脂还是 TSA,在不加新生牛血清(NBS)的情况下都无链球菌生长,说明血清是 CVCC55001、CVCC55002 株菌生长必须营养成分。对比改良马丁琼脂(含血清)和 TSA(含血清)的结果,菌落数相近,TSA(含血清)平板上的菌落较大,说明 TSA 促进该菌生长速度优于改良马丁琼脂,二者对于该菌的促生长能力相近(表 2)。

表 2 CVCC55001、CVCC55002 菌种不同培养基活菌计数结果

Tab 2 Bacteria count results of strain CVCC55001 and CVCC55002 with different media

培养基	CVCC55001			CVCC55002		
TSA	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
TSA + NBS	112	102	102	131	174	162
	126	107	88	168	158	138
改良马丁琼脂	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
改良马丁琼脂 + NBS	116	89	117	151	164	148
	132	103	113	145	160	173

2.8 免疫原性鉴定 经测毒得到两株菌对于绵羊的最小致死剂量为: CVCC55001 1.2×10^4 CFU、CVCC55002 2.6×10^4 CFU。将新鲜培养菌液稀释至最小致死剂量对于免疫组和对照组进行攻毒, 同时进行复数, 1 d 后计算确定实际攻毒剂量。攻毒后 14 d 内, CVCC55001 株对照组 2/2 死亡, 免疫组 4/4 存活; CVCC55002 株对照组 2/2 死亡, 免疫组 3/4 存活(表 3), CVCC55001、CVCC55002 株免疫原性鉴定符合规定。

2.9 毒力鉴定 将 CVCC55001、CVCC55002 死羊心血缓冲肉汤培养物 1000 倍稀释, 静脉注射 1~2 岁绵羊 2 头各 2 mL, 次日根据复数结果计算实际注射剂量为 CVCC55001: 1.2×10^5 CFU/头、CVCC55002: 3.4×10^5 CFU/头, 绵羊经注射后 21 d 内全部死亡。分别注射家兔 CVCC55001 91 CFU/只、CVCC55002 85 CFU/只, 在注射后 10 d 内全部死亡(表 4)。CVCC55001、CVCC55002 株毒力鉴定符合规定。

表 3 CVCC55001、CVCC55002 菌种免疫原性鉴定试验结果

Tab 3 Immunogenicity test results of strain CVCC55001 and CVCC55002

菌株及分组	每头攻毒剂量/CFU	攻毒后不同时间动物的死亡情况										结果	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10~21 d		
55001	免疫组	1.3×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/4 健活
	对照组	1.3×10^4	0	0	0	0	0	0	1	1	/	/	2/2 死亡
55002	免疫组	3.8×10^4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3/4 健活
	对照组	3.8×10^4	0	0	1	0	1	/	/	/	/	/	2/2 死亡

“0、1”: 表示实验动物死亡的数量; “/”: 表示该组攻毒动物均已死亡

表 4 CVCC55001、CVCC55002 菌种毒力鉴定试验结果

Tab 4 Virulence test results of strain CVCC55001 and CVCC55002

菌株及分组	注射剂量/CFU	攻毒后不同时间动物的死亡情况										结果	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10~21 d		
CVCC 55001	兔 5 只	91	0	5	/	/	/	/	/	/	/	/	5/5 死亡
	羊 2 头	1.2×10^5	0	0	0	1	0	0	0	1	/	/	2/2 死亡
CVCC 55002	兔 5 只	85	0	5	/	/	/	/	/	/	/	/	5/5 死亡
	羊 2 头	3.4×10^5	0	0	0	1	0	1	/	/	/	/	2/2 死亡

“0~5”: 表示实验动物死亡的数量; “/”: 表示该组攻毒动物均已死亡

3 讨论与小结

本研究鉴定该批羊链球菌 CVCC55001 及 CVCC55002 株培养特性、形态及生化特性、血清学特性、免疫原性、毒力、纯粹、剩余水分及真空度项目均符合《中华人民共和国兽用生物制品规程》二〇〇〇年版标准的规定。在免疫原性和毒力鉴定中显示 CVCC55001 对于羊的最小致死剂量为 1.2×10^4 CFU、对于兔的致死剂量为 91 CFU; CVCC55002 对于羊的最小致死剂量为 2.6×10^4 CFU、对于兔的致死剂量为 85 CFU。马链球菌兽疫

亚种链球菌对于其他动物也有着感染性, 孙智远等使用链球菌马链球菌兽疫亚种 C74-63 株对兔最小致死量为 250 CFU, 猪最小致死量为 3000 CFU^[7]。近年来, 随着分子生物学等技术的发展, 对于菌种的功能研究也不断深入, Xu 等对于链球菌马链球菌兽疫亚种抗吞噬作用的研究中, 利用转座子诱变定位了若干与抗吞噬作用相关的基因^[8], 这些基因的功能与该菌的致病能力密切相关, 此类研究也为今后提升优化菌种鉴定的精确性和科学性提供了思路。

在《中华人民共和国兽用生物制品规程》中规定该菌种培养时使用改良马丁琼脂和绵羊血马丁琼脂平板培养^[6]。但在实际鉴定和研究过程中,由于马丁琼脂和改良马丁琼脂在制备中均需求牛肉汤和猪肺汤等天然性成分,导致这两种培养基不同批次的促生长能力时常出现差异。TSA 作为国际上广泛应用的一般细菌培养基,配制简便,标准明确。本研究将 TSA 与改良马丁琼脂对于 CVCC55001 和 CVCC55002 的促生长情况进行了对比,发现 TSA 能够替代改良马丁琼脂,同时还具有更强的促生长速度,为相关标准和规程对于该菌的培养基的优化和变更提供了参考。

参考文献:

- [1] 马芳. 羊链球菌病的防治[J]. 养殖与饲料, 2019(9): 94-95.
Ma F. Prevention and treatment of *Streptococcus ovis* [J]. Breeding and Feed, 2019 (9): 94-95.
- [2] 李瑾, 焦翔. 马链球菌兽疫亚种菌血症一例[J]. 上海医学检验杂志, 1998(4): 244.
Li J, Jiao X. A case of bacteremia of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. Shanghai Journal of Medical Laboratory Science, 1998 (4): 244.
- [3] 中国兽医药品监察所, 中国兽医微生物菌种保藏管理中心. 中国兽医菌种目录[M]. 中国农业科学技术出版社, 2002: 120.
China Institute of Veterinary Drug Control, China Veterinary Culture Collection Center. China Veterinary Culture Directory[M]. China Agricultural Science and Technology Press, 2002: 120.
- [4] 陈海军. 羊链球菌病的流行病学、临床症状、实验室诊断与防控措施[J]. 现代畜牧科技, 2019(5): 125-126.
Chen H J. Epidemiology, clinical symptoms, laboratory diagnosis and prevention and control measures of sheep *Streptococcus* disease [J]. Modern Animal Husbandry Technology, 2019 (5): 125-126.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 中国农业出版社, 2016: sup7-14.
Committee of China Veterinary Pharmacopoeia, Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China, 2015 edition[S]. China Agriculture Press, 2016: sup7-14.
- [6] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程[S]. 化学工业出版社, 2000: 36-38.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. The veterinary biological products regulations of the People's Republic of China[S]. Chemical Industry Press, 2000: 36-38.
- [7] 张旭晖, 孙智远, 付强, 等. 猪源马链球菌兽疫亚种感染动物模型的筛选[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(12): 64-67.
Zhang, X H, Sun Z Y, Fu Q *et al.* Screening of an animal model of swine - origin *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemic* infection [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 50(12): 64-67.
- [8] Xu B, Zhang P, Zhou H, *et al.* Identification of novel genes associated with anti - phagocytic functions in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*[J]. Vet Microbiol, 2019, 233: 28-38.

(编辑:李文平)