

• 基础实验研究论著 •

应用噬菌体进行炭疽疫苗纯菌检查方法的建立^{*}

魏 东, 李恪梅, 王国治[△]

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要:目的 建立应用噬菌体进行炭疽活疫苗纯菌检查的方法, 并与现用纯菌检查方法进行比较。方法 使用噬菌体对与炭疽芽孢杆菌分类学上接近以及常见污染细菌进行裂解观察, 确定噬菌体特异性。选取具有代表性的可能污染菌定量掺入炭疽疫苗中, 制备模拟污染疫苗, 进行噬菌体裂解纯菌检查方法的灵敏度研究, 同时与现用的直接接种纯菌检查方法进行比较。结果 炭疽噬菌体能特异地裂解炭疽芽孢杆菌, 对与炭疽芽孢杆菌分类学上接近以及常见污染细菌无裂解作用。噬菌体裂解法对掺入炭疽疫苗中蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌及大肠埃希菌的检出限均为 1 CFU/人份, 而现用纯菌检查方法的检出限分别为 5、5 及 50 CFU/人份。结论 噬菌体裂解法检测炭疽活疫苗中污染菌有较好的特异性和灵敏度, 该方法的应用对疫苗质量控制具有重要意义。

关键词:炭疽疫苗; 噬菌体; 纯菌检查; 质量控制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)13-1537-02

Application of phage for the detection of purity of anthrax vaccine^{*}

Wei Dong, Li Kemei, Wang Guozhi[△]

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To develop phage lysis method for the detection of purity of anthrax vaccine and to compare phage lysis method with the routine method. **Methods** Nine strains of non-Bacillus anthracis were lysed with anthrax phage to evaluate the specificity of phage. The quantified three strains of non-Bacillus anthracis were respectively added into anthrax vaccine to evaluate the sensitivity of phage, which was compared with the routine method. **Results** The anthrax phage could lyse Bacillus anthracis and without cross-reaction with other strains of non-Bacillus anthracis. The detection limit of phage lysis method for detection of Bacillus cereus, Bacillus subtilis and Escherichia coli, which were added into anthrax vaccine, were all 1 CFU/dose. The detection limit of routine method for Bacillus cereus, Bacillus subtilis and Escherichia coli were 5, 5 and 50 CFU/dose. **Conclusion** Phage lysis method might be sensitive and specific for detection of purity of anthrax vaccine. This method could be with the potential to be used as a supplementary method for quality control of anthrax vaccine.

Key words: anthrax vaccine; phage; detection of purity; quality control

皮上划痕人用炭疽活疫苗是用炭疽芽孢杆菌弱毒株经培养、收集菌体后稀释制成的活菌悬液。炭疽疫苗现用纯菌检查方法是无菌检查实验中的直接接种法^[1]。由于炭疽疫苗为活菌制剂, 高浓度疫苗本菌作为优势菌对可能存在的污染菌具有抑制作用, 对少量的污染菌存在漏检可能。需建立一种更灵敏的方法进行纯菌检查, 为疫苗的安全性提供保障。噬菌体是一类感染细菌、放线菌、真菌等微生物的病毒, 亦称细菌病毒。它体积微小, 结构简单, 具有严格的寄生性, 广泛分布于自然界中。鉴于噬菌体有溶菌作用和严格的种型特异性, 可利用噬菌体作细菌的鉴定和分型, 亦可用于检测标本中的未知细菌和防治某些传染病^[2-9]。本研究应用噬菌体进行炭疽活疫苗纯菌检查, 并与直接接种法纯菌检查的结果进行比较, 以评价噬菌体裂解方法进行炭疽活疫苗纯菌检查的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株及噬菌体 炭疽芽孢杆菌(CMCC63001)、蜡样芽孢杆菌(CMCC63301)、枯草芽孢杆菌(CMCC63501)、巨大

芽孢杆菌(CMCC63101)、短小芽孢杆菌(CMCC63202)、地衣芽孢杆菌(CMCC63517)、金黄色葡萄球菌(CMCC26003)、鼠疫耶尔森菌(CMCC52006)、大肠埃希菌(CMCC44113)、布鲁菌(CMCC55010)等菌株均由中国医学细菌保藏管理中心提供。皮上划痕人用炭疽活疫苗(批号 201101010)由兰州生物制品研究所生产。炭疽噬菌体(批号 20110801)由中国食品药品检定研究院制备。

1.1.2 实验用培养基 营养琼脂培养基由本院培养基室制备。

1.1.3 主要仪器 恒温培养箱(SANYO, MIR-153), 生物安全柜(上海力新, HFsafe 1200)。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体特异性实验 将炭疽芽孢杆菌及蜡样芽孢杆菌等其他 9 株细菌接种营养琼脂培养基平皿, 滴加炭疽噬菌体, 35℃培养观察裂解情况。

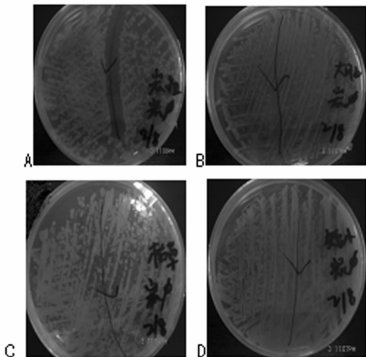
1.2.2 灵敏度实验 将已知活菌数含量的蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌及大肠埃希菌分别用生理盐水稀释成 1×10^6 、 $1 \times$

^{*} 基金项目: 国家科技重大专项课题资助项目(2009ZX10004-804)。[△] 通讯作者, E-mail: tbtestlab@163.net。

10⁵、1×10⁴、1×10³ 及 200 CFU/mL。将以上不同活菌含量菌液分别与炭疽疫苗按 1∶9 的比例混合,制备模拟污染疫苗。取 120 μL 不同杂菌含量的模拟污染疫苗与 120 μL 炭疽噬菌体混合,接种 2 个营养琼脂培养基平皿,每个平皿 100 μL,用“L”棒涂匀,35℃培养观察,并对可疑菌落进行革兰染色观察。取 1×10³ CFU/mL 蜡样芽孢杆菌及枯草芽孢杆菌各 50 μL 涂平皿,取 1×10³ CFU/mL 大肠埃希菌 100 μL 涂平皿,做活菌计数。同时取 50 μL 炭疽疫苗涂平皿作对照。取不同杂菌含量的模拟污染疫苗接种 2 个营养琼脂中管斜面,200 μL/中管,35℃培养观察,对可疑菌落进行革兰染色观察。同时取 200 μL 炭疽疫苗及各种添加菌接种中管斜面作对照。

2 结 果

2.1 噬菌体裂解特异性 炭疽噬菌体能裂解炭疽芽孢杆菌,噬菌体流过出现明显透明裂解带。该噬菌体对蜡样芽孢杆菌等其他 9 株细菌无裂解作用,见图 1。



A:炭疽芽孢杆菌;B:大肠埃希菌;C:枯草芽孢杆菌;D:短小芽孢杆菌。

图 1 炭疽噬菌体裂解特异性

2.2 灵敏度

2.2.1 蜡样芽孢杆菌检出灵敏度 噬菌体裂解法对掺入炭疽疫苗中蜡样芽孢杆菌的检出限为 1 CFU/人份,结果见表 1。经染色观察直接接种纯菌检查方法的检出限为 5 CFU/人份。

表 1 噬菌体裂解法对蜡样芽孢杆菌检出灵敏度

理论菌落数 (CFU/平皿)	实际菌落数(CFU/平皿)		结果判定
	A	B	
1	0	2	+
5	6	8	+
50	38	41	+

2.2.2 枯草芽孢杆菌检出灵敏度 噬菌体裂解法对掺入炭疽疫苗中枯草芽孢杆菌的检出限为 1 CFU/人份,结果见表 2。经染色观察直接接种纯菌检查方法的检出限为 5 CFU/人份。

表 2 噬菌体裂解法对枯草芽孢杆菌检出灵敏度

理论菌落数 (CFU/平皿)	实际菌落数(CFU/平皿)		结果判定
	A	B	
1	0	1	+
5	11	6	+
50	48	28	+

2.2.3 大肠埃希菌检出灵敏度 噬菌体裂解法对掺入炭疽疫苗中大肠埃希菌的检出限为 1 CFU/人份,结果见表 3。经染色观察直接接种纯菌检查方法的检出限为 50 CFU/人份。

表 3 噬菌体裂解法对大肠埃希菌检出灵敏度

理论菌落数 (CFU/平皿)	实际菌落数(CFU/平皿)		结果判定
	A	B	
1	1	1	+
5	4	3	+
50	51	58	+

3 讨 论

炭疽活疫苗现用纯菌检查方法是套用无菌检查中的直接接种法。无菌检查与纯菌检查的样品有本质区别,通常进行无菌检查的样品应该是无菌状态,而纯菌检查的样品是含有高浓度细菌的活菌制剂。本研究使用的炭疽疫苗即为活菌制剂,高浓度疫苗本菌作为优势菌对可能存在的污染菌具有抑制作用^[10],对少量的污染菌存在漏检可能。

通过噬菌体裂解特异性研究表明,炭疽噬菌体能特异性裂解炭疽芽孢杆菌,而对与炭疽芽孢杆菌分类学上接近以及常见污染细菌无裂解作用^[11]。炭疽芽孢杆菌与蜡样芽孢杆菌在细菌分类学上非常相近^[12],枯草芽孢杆菌及大肠埃希菌为常见实验室污染菌,所以选择这 3 种细菌进行灵敏度实验。灵敏度实验结果证实,炭疽疫苗对污染菌具有明显的抑制作用,特别是对革兰阴性的大肠埃希菌,含量达到 50 CFU/人份才能被直接接种法检出。炭疽疫苗的每 1 次人用剂量为 50 μL,为使接种于中管内的菌液能分布均匀,实际接种量为 200 μL,相当于 4 次人用剂量,故大肠埃希菌的检出限实际为 200 CFU/中管。对于污染 50 CFU/人份及以上含量大肠埃希菌的炭疽疫苗,至少 4 d 后才可观察到杂菌生长。

应用噬菌体裂解法进行炭疽活疫苗纯菌检查的检出效果明显好于常规直接接种法,对掺入炭疽疫苗中蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌及大肠埃希菌的检出限均可达 1 CFU/人份。该方法 18~24 h 即可观察结果,而且背景清楚,易于观察。

噬菌体裂解法检测炭疽活疫苗中污染菌有较好的特异性和灵敏度,是现用直接接种法必要的补充,该方法的应用对疫苗质量控制具有重要意义。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 中国医药科技出版社,2010:74-76.

[2] 吴俐健,张含玉,王笑歌,等. 噬菌体生物扩增法检测结核性液体标本的临床应用价值[J]. 山西医药杂志,2011,40(4):336-338.

[3] 黄至澄,王世文,李恪梅,等. 不动杆菌属噬菌体分离及其裂解谱分析[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(3):268-270.

[4] 苏胜兵,马红霞,徐凤宇. 噬菌体在细菌性疾病诊断和治疗中的应用[J]. 中国兽医科学,2011,41(5):546-550.

[5] 万学勤,唐冬生,刘爱平,等. 幽门螺杆菌毒性噬菌体分离纯化及模拟治疗研究[J]. 南方医科大学学报,2011,31(2):304-307.

[6] Schofield DA, Westwater C. Phage-mediated bioluminescent detection of Bacillus anthracis[J]. J Appl Microbiol, 2009, 107(5): 1468-1478.

(下转第 1541 页)

实验结果显示,52 株白色念珠菌临床分离株及 2 株标准株的遗传为相似系数 0.79 ± 0.13 ,以相似系数大于或等于 0.8 为判定基因同源性阈值^[7],临床株中有约 65.4% 的菌株基因型相同,提示从患者呼吸道分离的白色念珠菌临床株基因同源性较高,亲缘关系较近。既往研究也认为,在人体定植感染的白色念珠菌有基因型聚集的现象,考虑与特定基因型白色念珠菌黏附致病力强相关^[9-10]。而来源于外科等不同病区的 7 株白色念珠菌分离株相似系数为 0.81 ± 0.16 ,未出现基因多态性增高的现象,考虑菌株来源并未影响菌株基因的多态性分布,而本实验不同来源的菌株较少也可能影响实验结果。

生物膜是白色念珠菌的毒力因子之一,能形成生物膜的菌株毒力更强,实验所用的临床分离株生物膜表型存在差异,其中有 26 株菌生物膜形成能力“高”,结合基因分型的结果,发现生物膜形成能力“高”的白色念珠菌菌株可为多种基因类型,除 V 型外,其他基因型均包含生物膜形成能力“高”的菌株。而同一基因型的菌株形成生物膜的表型存在差异,如 I 型中有一半的菌株生物膜形成能力“高”,而另一半菌株生物膜形成能力“低”。计算生物膜形成能力“高”的菌株相似系数为 0.8 ± 0.14 ,生物膜形成能力“低”的菌株相似系数为 0.81 ± 0.12 ,而所有菌株的相似系数为 0.79 ± 0.13 ,提示生物膜形成能力相似的菌株间未出现基因型聚集,基因多样性减弱的现象,即根据白色念珠菌分离株 rep-PCR 基因分型并不能预测其生物膜表型。Durán 等^[11]用 RAPD 的方法也未发现与生物膜形成相关的基因型,但另有研究则显示特定基因型的白色念珠菌菌株生物膜形成能力“高”,提示基因型与生物膜形成相关^[12],考虑相关实验结果存在差异,可能与实验方法及实验检测的基因位点不同有关。因此,深入研究与生物膜形成相关的基因表达调控机制,寻找可能预测生物膜形成的基因分型方法,将有利于防治白色念珠菌生物膜形成所致的定植感染。

参考文献

- [1] Nseir S, Jozefowicz E, Cavestri B, et al. Impact of antifungal treatment on Candida-Pseudomonas interaction: a preliminary retrospective case-control study[J]. Intensive Care Med, 2007, 33(1): 137-142.
- [2] Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, et al. PCR fingerprinting of
- (上接第 1538 页)
- [7] 赵龙华, 杨维青. 细菌群集运动与生物被膜和耐药性的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 1986-1988.
- [8] 刘忠泉, 佺静, 朱雪薇. 噬菌体变色法检测结核分枝杆菌[J]. 中国热带医学, 2010, 10(3): 367-388.
- [9] 武英. 应对耐药菌的新方法——噬菌体制剂[J]. 国外医药抗生素分册, 2011, 32(5): 223-228.
- [10] 毕波, 周慧敏, 杨平, 等. 微生态制剂局部给药加速残余创面愈合

Candida albicans associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(11): 4066-4075.

- [3] Jain N, Kohli R, Cook E, et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of Candida isolates from urine[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6): 1697-1703.
- [4] 李洪利. 真菌感染临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 87-88.
- [5] 平竹仙, 李丰良. 临床真菌检测及耐药性动态变化特征及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1380-1381.
- [6] 项明洁, 刘锦燕, 倪培华, 等. 重复序列 PCR(rep-PCR)指纹分析技术在病原真菌鉴定和分型中的应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(6): 376-380.
- [7] Wise MG, Healy M, Reece K, et al. Species identification and strain differentiation of clinical Candida isolates using the diversi lab system of automated repetitive sequence-based PCR[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 6): 778-787.
- [8] Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, et al. Molecular typing of Candida albicans strains isolated from denture wearers by repetitive sequence-based PCR[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(2): 141-149.
- [9] Giblin L, Edelmann A, Zhang N, et al. A DNA polymorphism specific to Candida albicans strains exceptionally successful as human pathogens[J]. Gene, 2001, 272(1/2): 157-164.
- [10] Schmid J, Tortorano AM, Jones G, et al. Increased mortality in young candidemia patients associated with presence of a Candida albicans general-purpose genotype[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9): 3250-3256.
- [11] Durán EL, Mujica MT, Jewtuchowicz VM, et al. Examination of the genetic variability among biofilm-forming Candida albicans clinical isolates[J]. Rev Iberoam Micol, 2007, 24(4): 268-271.
- [12] Borecká-Melkusová S, Bujdáková H. Variation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among genotypes of Candida albicans and Candida dubliniensis under antifungal treatment[J]. Can J Microbiol, 2008, 54(9): 718-724.

(收稿日期: 2012-01-12)

临床研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(3): 232-234.

- [11] 马珍, 谢三星. 炭疽杆菌与类炭疽杆菌鉴别技术的研究进展[J]. 肉品卫生, 1994, 3: 27-28.
- [12] Lyndsay R, Peter G, Agron, et al. Genome differences that distinguish Bacillus anthracis from Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(5): 2755-2764.

(收稿日期: 2011-10-20)