

重组溶葡萄球菌酶粉的抑杀菌效果试验

文 / 陆珉¹ 钱春妹¹ 张鲁敬¹ 解虹¹ 黄青山^{1,2}

(1 江苏昆山博青生物科技有限公司 2上海复旦大学生命科学院遗传学研究所遗传工程国家重点实验室)

摘要: 在实验室条件下,对金黄色葡萄球菌、链球菌(无乳链球菌和停乳链球菌)、化脓隐秘杆菌用不同规格的重组溶葡萄球菌酶粉以常规使用剂量进行抑杀菌实验。结果表明:重组溶葡萄球菌酶粉在常规药物剂量下,对金黄色葡萄球菌具有良好的抑杀菌效果,对链球菌、化脓隐秘杆菌有一定的抑杀效果。

关键词: 重组溶葡萄球菌酶粉;抑杀菌;效果

重组溶葡萄球菌酶粉是以重组溶葡萄球菌酶为原料,经低温冷冻干燥而制成的单方制剂。本制剂作为抗菌药,是通过裂解葡萄球菌细胞壁肽聚糖中的甘氨酸五肽键桥进而破坏细菌细胞壁的完整性,使其死亡,进而达到杀灭病原菌的目的。重组溶葡萄球菌酶粉一类新兽药已经于2009年被农业部批准上市,目前已经在奶牛子宫内膜炎与乳房炎的预防和治疗中得到广泛应用,主要用于治疗革兰氏阳性菌,如葡萄球菌、链球菌、化脓棒状杆菌或化脓隐秘杆菌等引起的牛急性和慢性子宫内膜炎,隐性乳房炎和临床型乳房炎,并产生了良好的经济效益和社会效益。但在成品检测项目中,重组溶葡萄球菌酶粉并没有体现其抑菌效果,为了能够更清晰地表明重组溶葡萄球菌酶粉在奶牛体内的抑菌效果,本文在实验室条件下,对其进行了药物常规使用剂量稀释后的抑菌率检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、停乳链球菌(ATCC35666)、无乳链球菌(ATCC624)、化脓隐秘杆菌(ATCC

19411),以上菌种均来源于中国兽医药品监察所。

1.1.2 药物

重组溶葡萄球菌酶粉400单位/瓶(批号:20120301);重组溶葡萄球菌酶粉800单位/瓶(批号:20120203),购于昆山博青生物科技有限公司。

1.1.3 培养基与试剂

细菌培养基(营养琼脂培养基),购自国药集团化学试剂有限公司;KF链球菌琼脂培养基,购自上海研生生化试剂有限公司;血琼脂培养基,购自上海酶联生物科技有限公司;中和剂,自行配制,并鉴定合格,原料购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验仪器

双人超净台(SW-CJ-2D),苏州净化设备有限公司;隔水式恒温培养箱(GSP-9080MBE)和霉菌培养箱(MJX-160B-Z),上海博讯实业有限公司;移液器(200 μL、1 mL、5 mL)及配套的塑料吸头,大龙兴创实验仪器有限公司;电动混匀器。

2 实验步骤

2.1 细菌悬液制备程序^[1]

2.1.1 培养基选择。金黄色葡萄球菌选用营养琼脂培养基,链球菌(无乳链

球菌、停乳链球菌)选用KF链球菌琼脂培养基,化脓隐秘杆菌选用血琼脂培养基。

2.1.2 金黄色葡萄球菌、链球菌(无乳链球菌和停乳链球菌)、化脓隐秘杆菌菌悬液制备。取第3~6代的培养了18~20 h的新鲜斜面培养物,用吸管吸取5.0 mL稀释液(稀释用TPS,即酸化水用生理盐水)加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用吸管将洗液移至另一无菌试管中,用电动混匀器混合20 s,或在手掌上振打80次,以使细菌悬浮均匀。

2.1.3 初步制成的菌悬液,先用细菌浓度比浊测定法粗测其含菌浓度,然后用稀释液稀释至所需浓度。

2.1.4 细菌繁殖体悬液应保存在4℃冰箱内备用。应当天使用不得过夜。

2.1.5 怀疑有污染时,应以菌落形态、革兰氏染色与生化试验等方法进行鉴定。

2.2 抑杀菌实验

2.2.1 按照2.1配制实验用菌悬液,使其浓度为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ CFU/mL。

2.2.2 药物使用剂量

(1) 重组溶葡萄球菌酶粉,每瓶为400单位,分别取2瓶,用无菌水稀释至200 mL、500 mL及800 mL。

(2) 重组溶葡萄球菌酶粉,每瓶为800单位,分别取2瓶,用无菌水稀释至200 mL、500 mL及800 mL。

2.2.3 活菌培养计数

取4 mL重组溶葡萄球菌酶冻干粉稀释液加入1 mL实验用菌悬液,混匀,反应10 min后,取0.5 mL加入4.5 mL中和剂中,混匀,中和反应10 min。吸取1.0 mL样液,按活菌培养计数方法测定存活菌数,每管样液接种2个平皿。如平板上生长的菌落数较多时,可进行10倍系列稀释后,再进行活菌培养计数。

2.2.4 平行实验

同时用无菌水代替冻干粉稀释液,进行平行实验,作为阳性对照。

2.3 重复实验

重复抑杀菌实验3次,以保证结果的准确性。

3 实验结果

3.1 重组溶葡萄球菌酶粉对金黄色葡萄球菌的抑杀菌实验结果

从表1可以看出,不同规格的重组溶葡萄球菌酶粉在常用3种稀释浓度

度下,对金黄色葡萄球菌的抑杀菌能力都在88%以上,随着稀释浓度的降低,杀菌效果逐步减弱。

3.2 重组溶葡萄球菌酶粉对链球菌的抑杀菌实验结果

从表2可以看出,不同规格的重组溶葡萄球菌酶粉在常用3种稀释浓度下,对链球菌的抑杀菌能力都在80%以上,随着稀释浓度的降低,杀菌效果逐步减弱。重组溶葡萄球菌酶粉对无乳链球菌和停乳链球菌的抑杀菌效果无明显差异。

3.3 重组溶葡萄球菌酶粉对化脓隐秘杆菌的抑杀菌实验结果

不同规格的重组溶葡萄球菌酶粉在常用3种稀释浓度下,对化脓隐秘杆菌的抑杀菌能力都在80%以上,随着稀释浓度的降低,杀菌效果逐步减弱。

4 结论

实验结果表明,重组溶葡萄球菌

酶粉在常规的药物剂量下,对金黄色葡萄球菌具有良好的抑杀菌效果,对无乳链球菌、停乳链球菌、化脓隐秘杆菌有一定的抑杀菌效果。

5 讨论

重组溶葡萄球菌酶作为基因重组大肠杆菌表达的酶类生物制剂,主要通过溶解细菌细胞壁而杀死细菌,而非抑制细菌生长繁殖达到杀菌效力,是一种高效的生物杀菌剂^[2],特别是对有抗生素耐药性的细菌有非常好的杀菌效果,且不会在动物体内残留。以上这些优点使重组溶葡萄球菌酶成为一个新的研究热点。

金黄色葡萄球菌、链球菌、化脓隐秘杆菌都是导致奶牛子宫内膜炎、乳腺炎的主要致病菌^[3,6],并且混合感染和单一感染同时存在,且混合感染率明显高于单一感染率。在临床上,重组溶葡萄球菌酶对革兰氏阳性菌,如葡萄球菌、链球菌、化脓棒状杆菌或化脓隐秘杆菌等引起的牛急性、慢

表1 重组溶葡萄球菌酶粉对金黄色葡萄球菌的抑杀菌实验结果

菌株编号	重组溶葡萄球菌酶粉 20120301 (400 单位/瓶)			重组溶葡萄球菌酶粉 20120203 (800 单位/瓶)		
	2瓶 200 mL	2瓶 500 mL	2瓶 800 mL	2瓶 200 mL	2瓶 500 mL	2瓶 800 mL
26003	97.0%	92.1%	89.2%	99.1%	95.7%	93.6%
	96.6%	91.2%	88.7%	99.4%	95.6%	93.1%
	96.9%	91.8%	88.8%	99.5%	95.5%	93.4%

表2 重组溶葡萄球菌酶粉对链球菌的抑杀菌实验结果

菌株编号	重组溶葡萄球菌酶粉 20120301 (400 单位/瓶)			重组溶葡萄球菌酶粉 20120203 (800 单位/瓶)		
	2瓶 200 mL	2瓶 500 mL	2瓶 800 mL	2瓶 200 mL	2瓶 500 mL	2瓶 800 mL
35666	94.9%	86.2%	80.9%	96.6%	91.6%	88.7%
	95.3%	84.8%	82.1%	97.2%	90.1%	88.5%
	95.0%	85.2%	80.3%	97.8%	90.9%	87.7%
624	95.2%	85.4%	80.4%	97.5%	91.1%	89.3%
	96.0%	84.1%	81.6%	98.7%	91.8%	88.2%
	96.3%	85.9%	80.7%	97.1%	90.5%	88.9%

表3 重组溶葡萄球菌酶粉对化脓隐秘杆菌的抑杀菌实验结果

菌株编号	重组溶葡萄球菌酶粉 20120301 (400 单位/瓶)			重组溶葡萄球菌酶粉 20120203 (800 单位/瓶)		
	2瓶 200 mL	2瓶 500 mL	2瓶 800 mL	2瓶 200 mL	2瓶 500 mL	2瓶 800 mL
19411	93.9%	86.0%	81.0%	96.3%	92.8%	89.1%
	94.5%	85.2%	80.2%	95.0%	92.3%	89.9%
	94.9%	85.9%	80.9%	96.8%	93.2%	88.6%

性子宫内膜炎, 隐性乳房炎和临床型乳房炎有良好的疗效。

重组溶葡萄球菌酶是通过生物发酵生产得到的, 其生产过程具有安全、无污染、环保、无废弃物、无辐射等优点。Robert J W的农业食品安全调查小组调查报告显示^[7]: 现在仍没有很有效的方法预防和治疗由金黄色葡萄球菌引起的乳腺炎。溶葡萄球菌酶是目前最有效的杀灭金黄色葡萄球菌的生物制剂。溶葡萄球菌酶在治疗奶牛乳腺炎时的药物残留对动物和饮用牛奶的消费者无害; 其在牛奶中有杀菌活性, 并且不改变牛奶的物理、化学或营养成分; 同时, 由于乳酪和

酸奶制品涉及到有益菌的培养, 溶葡萄球菌酶在巴氏杀菌时可被灭活并且不影响正常的有益菌的培养过程。因此, 用溶葡萄球菌酶治疗哺乳期奶牛金黄色葡萄球菌感染是目前为止最有效、最安全的方法, 而且对保护生态环境和生产绿色食品具有重要现实意义。C

参考文献

- [1] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2002: 15124
- [2] Bastos, M.d.C.d.F., B.G. Coutinho, M.L.V. Coelho. Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications.

Pharmaceuticals, 2010 (3): 1139-1161.

[3] 王国卿, 王洪海, 郭梦尧, 等. 奶牛产后急性子宫内膜炎病原的分离与鉴定. 中国兽医杂志, 2010, 46 (10): 10-12.

[4] 侯振中, 许微微. 奶牛子宫内膜炎致病菌的分离与鉴定. 东北农业大学学报, 2008, 39 (12): 76-81.

[5] 李玉, 敖日格乐, 王纯洁, 等. 临床型奶牛乳房炎致病菌的分离与鉴定. 畜牧与兽医, 2011, 43 (3): 78-81.

[6] 付连军, 尹柏双, 李伟, 等. 临床型奶牛乳房炎病原菌分离鉴定及药敏试验. 黑龙江畜牧兽医, 2012 (10): 76-77.

[7] Robert J.Wall. By way of example. Biotechnological defence against mastitis diense. Agricultural outlook forum presentel. 2006 (2): 17.

(收稿日期: 2012-12-18)

新西兰遇干旱影响奶粉产量

【本刊辑】2013年3月10日, 据《新西兰先驱报》报道, 新西兰北岛遭遇的干旱继续恶化, 成为70年来最严重的一次。新西兰是全球乳制品生产大国, 经济学家因此普遍预计, 干旱或推高包括奶粉在内的全球奶制品价格。在几天前结束的一次全球乳制品交易活动上, 全脂奶粉价格大涨, 增幅为两年半来最大。

自2013年2月底以来, 新西兰奥克兰海湾大桥北部地区就出现了严重干旱。道琼斯新闻日前援引新西兰第一产业部的消息称, 干旱有蔓延趋势, 目前, 包括怀卡托在内的地区都遭遇了干旱, 而该地区牛奶的产量占新西兰全国的25%。此外, 普伦蒂湾和霍克斯湾也遭遇干旱。有消息称, 干旱

的天气使牧草等饲料出现了短缺的情况, 最近几个月, 不少农民已开始提前屠宰或出售牲畜, 以渡过难关。

新西兰2012年的出口贸易总额为380 亿美元, 其中奶制品出口贸易总额占25%。然而受干旱影响, 专家预测2013年新西兰北岛的牛奶生产量将降低大约15%。经济学家预测, 干旱或推高包括奶粉在内的全球奶制品的价格。

另据澳新银行估计, 大批农场主受到了干旱的影响, 而他们生产的奶制品总量预计占新西兰奶制品生产总量的46%。

事实上, 新西兰干旱的影响已经显现, 2013年3月5日, 在恒天然全球乳制品交易网举行的一次贸易拍卖中, 全球奶制品价格提高了10.4%。彭博社援引新西兰奶业巨头恒天然集

团的消息称, 全脂奶粉价格在2013年3月5日的拍卖中出现大幅增长, 增幅为两年半来最大。数据显示, 其中2013年5月交付的奶粉价格上涨了19.3%, 为2010年9月以来最高, 6月交付的奶粉价格也上涨了17.3%。

恒天然日前还确认了收购价格预测, 认为2013年上半年全球奶制品价格会有所上涨。

新西兰银行策略师麦克·琼斯表示, 新西兰干旱加剧, 产量降低, 而需求依然旺盛, 所以奶制品价格会继续有所上涨。

此前, 随着新西兰北岛地区干旱的加剧, 新西兰银行已向奶农提供了财政救济。