

支原体液体培养基质控菌生长分析

董姣姣¹, 杨江威¹, 赵卓¹, 王金恒^{2*} (1. 北京三药科技开发公司, 北京 100176; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 摸索肺炎支原体在支原体肉汤培养基和口腔支原体在精氨酸支原体肉汤培养基中的生长规律, 比较不同密闭方式对支原体液体培养基灵敏度的影响, 同时考察液体培养基基础的有效期。方法: 采用变色单位试验法测试肺炎支原体和口腔支原体在相应液体培养基不同培养时间段的颜色变化单位 (CCU), 并绘制生长曲线。使用3种不同密闭方式的器具制备液体培养基并检测灵敏度。测试液体培养基基础存放0、15、30、60和90天的灵敏度。结果: 使用3种不同密闭方式培养, 支原体肉汤培养基和精氨酸支原体肉汤培养基灵敏度均达到 10^9 CCU·mL⁻¹。支原体肉汤基础和精氨酸支原体肉汤基础存放于2~8℃有效期为90天。结论: 本试验为支原体液体培养基灵敏度的检查和研究提供依据。

关键词: 质控菌; 生长曲线; 颜色变化单位; 支原体培养基; 有效期

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)02-0210-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.02.013

Growth Analysis of Quality Control Strains in Mycoplasma Liquid Culture Medium

Dong Jiaojiao¹, Yang Jiangwei¹, Zhao Zhuo¹, Wang Jinheng^{2*} (1. Beijing San Yao Science and Technology Development Company, Beijing 100176, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To explore the growth regularity of *Mycoplasma pneumoniae* in mycoplasma broth medium and *Mycoplasma oral* in arginine mycoplasma broth medium, compare the effects of different airtight ways on the sensitivity of mycoplasma liquid medium, and investigate the storage validity period of prepared liquid basic medium. **Methods:** The color change unit (CCU) of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma oral* in the different growth stages was measured by the color change unit test, and their growth curve was drawn. The liquid culture medium was prepared by using three different sealed instruments and the sensitivity was tested. The sensitivity of prepared liquid basic medium was tested at 0, 15, 30, 60 and 90 days. **Results:** The sensitivity of both mycoplasma broth medium and arginine mycoplasma broth medium reached 10^9 CCU·mL⁻¹ in tightly stoppered containers with three kinds of instruments. The validity period of mycoplasma broth and arginine mycoplasma broth basic medium was 90 days at 2-8℃. **Conclusion:** This experiment provided a reference for the test and study of the sensitivity of mycoplasma liquid medium.

Keywords: quality control strains; growth curve; color change unit (CCU); mycoplasma medium; validity period

在生物制品生产过程中,支原体是常见的造成严重细胞或组织污染的因素之一。支原体引起的污染可以持续很长一段时间而不造成明显的细胞损伤,在培养液中几乎可以影响代谢的每一个途径,包括改变细胞的表型特征和影响细胞正常生长,但又难以通过肉眼观察到明显的混浊现象^[1]。研究人员^[2]对79株生物制品生产用细胞库细胞进行无菌、支原体及外源病毒污染检测,未发现任何一株细胞存在细菌、真菌污染,支原体污染细胞的阳性率为12.7%,外源病毒污染率为6.3%,表明在疫苗、生物技术产品、基因治疗产品及组织工程产品生产用细胞中均存在不同程度的支原体污染,应加强控制和检测支原体。

采用培养法检测支原体具有准确性好、结果稳定的特点^[3],但对培养基的要求较高。《中华人民共和国药典》2020年版3301支原体检查法中推荐使用的支原体液体培养基,包含支原体肉汤培养基和精氨酸支原体肉汤培养基。支原体肉汤培养基的质控菌株为肺炎支原体,精氨酸支原体肉汤培养基的质控菌株为口腔支原体,在进行支原体检查前需确保所使用的培养基灵敏度符合要求^[4]。培养基灵敏度的检测方法采用变色单位试验法(Color Change Unit, CCU),该方法对于实际操作要求较高,质控菌种的生长状态、培养条件、培养体系均会影响培养基灵敏度。本试验旨在测定并绘制肺炎支原体在支原体肉汤培养基和口腔支原体在精氨酸支原体肉汤培养基中的生长曲线,考察不同密闭方式对培养基灵敏度的影响,同时测定灭菌后支原体肉汤基础和精氨酸支原体肉汤基础的有效期,为培养基的灵敏度检查和使用提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 器具与仪器

中试管(18 mm × 180 mm),橡胶塞(不透气),螺旋盖试管(18 mm × 150 mm),生化培养箱(赛福,型号SPX-450),高压灭菌锅(HIRAYAMA,型号HVE-50),生物安全柜(Haier,型号HR40-II A2)。

1.2 培养基及血清

支原体肉汤培养基和精氨酸支原体肉汤培养基,均由北京三药科技开发公司实验室制备。新生牛血清(浙江天杭,批号:19040103)。

1.3 菌种

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*) ATCC

15531和口腔支原体(*Mycoplasma orale*) ATCC 23714,均由中国食品药品检定研究院提供。

1.4 培养基配制

按照产品说明进行配制,分装8 mL · 支⁻¹,121 °C灭菌15 min,备用。临用前每支试管加入2 mL新生牛血清(培养基:血清体积比为8:2)。

1.5 菌液制备

分别将肺炎支原体接种至支原体肉汤培养基,口腔支原体接种至精氨酸支原体肉汤培养基中,经36 °C ± 1 °C密闭培养(微需氧状态)至培养基变色,即支原体肉汤培养基由西瓜红色变为黄色,精氨酸支原体肉汤培养基由橙黄色变为玫红色。各自盲传两代,取变色的培养管作为接种管。

1.6 生长曲线

取接种管进行10倍系列稀释,选取适当稀释度的菌悬液接种至相应的培养基中,采用变色单位试验法自第0天开始每隔24 h接种3支试管测定灵敏度,连续测试14天,以培养基生长变色的最高稀释度作为其灵敏度,即CCU表示,选取平均值作为最终结果。CCU结果待36 °C ± 1 °C培养14天后记录。以取样时间为横坐标,以平均CCU的对数为纵坐标,绘制生长曲线。

1.7 密闭方式

选用3种不同的器具实现密闭的培养条件:中试管盖橡胶塞(不透气)、中试管无菌石蜡液封和螺旋盖试管拧紧管盖。取稳定期的培养物进行10倍系列稀释至10⁻⁹,分别吸取菌液1 mL接种至不同器具的相应培养基中,每种密闭方式做3个平行,至36 °C ± 1 °C密闭培养14天,以2/3以上呈现变色的最高稀释级作为培养基的灵敏度。

1.8 有效期测试

将灭菌后的支原体肉汤基础(不含血清)和精氨酸支原体肉汤基础(不含血清),选用螺旋盖试管密闭,置2~8 °C冰箱存放,存放时间设为0、15、30、60和90天。取相应存放天数的培养基,按比例加入新生牛血清后,进行灵敏度测试。

2 结果

2.1 生长曲线

肺炎支原体在支原体肉汤培养基和口腔支原体在精氨酸支原体肉汤培养基中的生长曲线如图1所示。

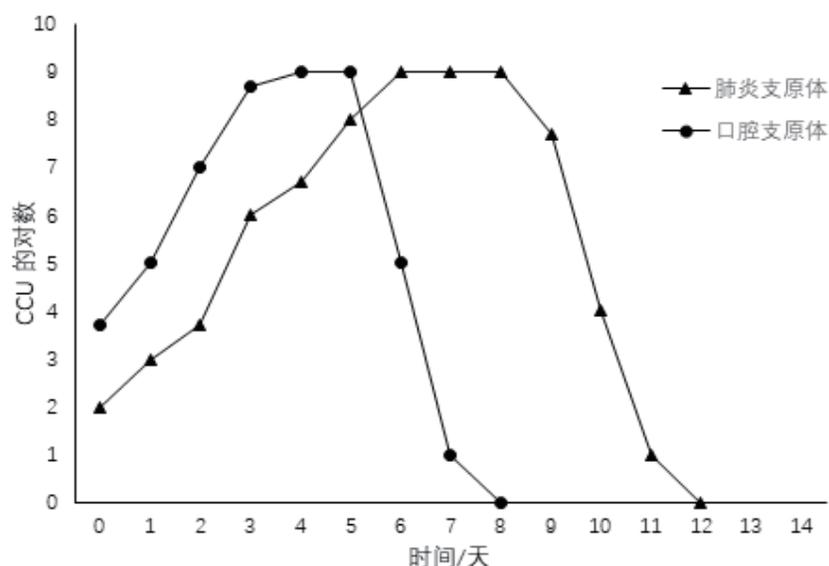


图1 肺炎支原体在支原体肉汤培养基和口腔支原体在精氨酸支原体肉汤培养基中的生长曲线

从图1可以看出,肺炎支原体在第1天至第5天表现出明显生长,其中第2天至第3天生长速率最快,CCU平稳上升,在第6天到第8天到达生长高峰至 10^9 CCU·mL⁻¹,于第9天起进入衰亡期,直至第12天CCU降至0。口腔支原体在第1天至第3天处于高速生长,CCU持续上升,并在第4天和第5天到达生长高峰至 10^9 CCU·mL⁻¹,于第6天起CCU快速下

降,直至第8天降至0。

2.2 密闭方式

使用3种器具不同的密闭方式制备2种培养基,并测定灵敏度,结果见表1。支原体肉汤培养基接种肺炎支原体,灵敏度均达到 10^9 CCU·mL⁻¹;精氨酸支原体肉汤培养基接种口腔支原体,灵敏度均达到 10^9 CCU·mL⁻¹。

表1 在3种器具中培养基灵敏度

培养基	中试管盖橡胶塞	中试管无菌石蜡液封	螺旋盖试管
支原体肉汤培养基 / (CCU·mL ⁻¹)	10^9	10^9	10^9
精氨酸支原体肉汤培养基 / (CCU·mL ⁻¹)	10^9	10^9	10^9

2.3 有效期测试

灭菌后的支原体肉汤基础和精氨酸支原体肉汤基础在2~8℃存放0、15、30、60和90天后加

入血清测定灵敏度,见表2,其灵敏度均达到 10^9 CCU·mL⁻¹。

表2 在2~8℃存放有效期测试

培养基	2~8℃存放时间				
	0天	15天	30天	60天	90天
支原体肉汤基础 / (CCU·mL ⁻¹)	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9
精氨酸支原体肉汤基础 / (CCU·mL ⁻¹)	10^9	10^9	10^9	10^9	10^9

3 讨论

3.1 生长曲线

肺炎支原体在支原体肉汤培养基和口腔支原体在精氨酸支原体肉汤培养基中的生长曲线与细菌生长曲线类似,均有对数生长期、稳定期和衰亡期,但其衰亡期较短。因试验采用生长稳定的纯培养物,两株支原体均未出现明显的停滞期。从生长曲线分析,两种支原体均存在稳定期,最高灵敏度可达 10^9 CCU·mL⁻¹,肺炎支原体的最佳收获时间为培养的第6~8天,口腔支原体的最佳收获时间为培养的第3~5天。选用不同生长期的支原体,其最高变色单位不相同,故在进行培养基的灵敏度检查时应选用处于稳定期的菌液,才能够保证试验结果的稳定。赵飞等^[5]在2010年测试了肺炎支原体CCU值随时间变化的关系,其平台期维持1天左右而后迅速转为衰亡期,且衰亡期仅持续1天左右,CCU即从 10^9 CCU·mL⁻¹降至0,提出为提高菌浓度可尝试增加缓冲体系来制备培养基。刘力雍等^[6]则将HEPES缓冲液引入培养基中,测定肺炎支原体液体培养基的生长曲线变化,结果显示不同浓度的HEPES缓冲液均可影响肺炎支原体的生长曲线变化,较低浓度可提高最大菌量,较高浓度可延长平台期。本次试验采用的自制培养基,质控菌株(肺炎支原体和口腔支原体)的稳定期均能够持续2~3天,可给试验人员提供较为宽泛的接种期;同时灵敏度能够满足《中华人民共和国药典》2020年版标准规定。

3.2 密闭方式

采用3种不同密闭方式培养支原体:中试管盖橡胶塞(不透气)、中试管无菌石蜡液封和螺旋盖试管拧紧管盖。在密闭管口的不同方式中,肺炎支原体在支原体肉汤培养基和口腔支原体在精氨酸支原体肉汤培养基中灵敏度均能够达到 10^9 CCU·mL⁻¹。结果显示其不同的密闭方式,培养基的灵敏度一致。赵宏大等^[7]学者在支原体液体培养基的培养条件考察时发现液体培养基在微有氧培养环境下灵敏度检测结果更加敏感和稳定,并同时建议《中华人民共和国药典》修订时将培养条件明确规定为微有氧环境,液体培养基密闭管口。因此,试验人员需在液体培养基中培养支原体时,采用任何一种密闭方式均可。

3.3 有效期

对制备的支原体肉汤培养基和精氨酸支原体肉汤培养基测试有效期,其结果显示灭菌后的培养基基础(不含血清),置于2~8℃冰箱中存放90天,与新鲜配制的培养基灵敏度一致。国内有研究学者测试了含有血清的支原体检验用培养基在2~8℃及-20℃的保存期,其在2~8℃有效期为1个月,-20℃有效期为12个月^[8]。培养基基础保存方便,同时减少多次培养基配制灭菌的误差,为研究和检测人员使用培养基提供参考。

3.4 检测方法

本试验采用检测培养基灵敏度的方法是《中华人民共和国药典》2020年版中推荐的变色单位试验法,与欧美药典对支原体检查法中培养基质量控制检验方法的规定存在较大差异^[9]。曾有学者^[10]使用灵敏度法和吸光度法检测市售4家不同生产商的支原体肉汤培养基和精氨酸支原体肉汤培养基,认为颜色变化程度检测和菌落直径测定检验支原体培养基的促生长能力更敏感。沈青春等^[11]参考病毒滴度TCID₅₀(半数组织细胞感染量)的标准测定方法,对早期学者提出的支原体活菌滴度指标—CCU₅₀(半数变色单位)的测定方法进行改进,得出结论CCU₅₀测定法能对支原体活菌滴度进行精确评估。近年来有学者^[12]采用固体培养检测支原体并公开了易致污染的支原体在固体培养基上的形态特征,不过同时也指出支原体不同生长期、菌体浓度和培养基的组成均会使支原体的形态在固体培养基上发生变化。

随着经济的发展和检测技术水平的提升,多种支原体检测方法不断涌现,每种方法各有优势^[13],药典中也提到可采用经国家药品检定机构认可的其他方法,其不同方法可靠性和稳定性的研究是以后努力的方向。

参考文献:

- [1] The United States Pharmaceutical Convention, Inc. USP40NF35: General Chapter 63: Mycoplasma Tests[S]. Volume 1, 2017: 130-136.
- [2] 孟淑芳,李修兰,冯建平,等.我国生物制品生产用细胞外源因子污染情况检测[J].中国生物制品学杂志,2006,19(6):627-629.

- [3] 陈波, 徐程林, 刘桂芳, 等. 生物制品中支原体检定方法的验证及统计学评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(1): 62-64.
- [4] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 306-308.
- [5] 赵飞, 李晶, 陶晓霞, 等. 肺炎支原体液体培养中pH与活菌浓度的关系研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(11): 848-849.
- [6] 刘立雍, 陶晓霞, 张建中, 等. 不同浓度HEPES缓冲液对肺炎支原体培养效果的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2015(4): 312-315.
- [7] 赵宏大, 谢文, 范文平, 等. 支原体检查试验培养条件考察[J]. 中国药师, 2015(4): 679-681.
- [8] 罗玉峰, 于秀兰, 娜琳, 等. 支原体检验用培养基的研究[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(6): 26-29.
- [9] 范文平, 赵宏大, 谢文. 中国药典与欧美药典对支原体检查培养基规定的差异[J]. 中国药品标准, 2014, 15(2): 85-87.
- [10] 赵宏大, 谢文, 范文平, 等. 不同来源药品支原体检查用培养基的促生长能力研究[J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2062-2066.
- [11] 沈青春, 李聪研, 冯倩倩, 等. 用半数变色单位法精确测定支原体活菌滴度[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1347-1352.
- [12] 傅元欣, 魏然, 宣俊文, 等. 易致污染的支原体在固体培养基上的形态特征[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(5): 17-22.
- [13] Dabrazhynetskaya A, Volokhov D V, David S W, et al. Preparation of Reference Strains for Validation and Comparison of Mycoplasma Testing Methods[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(4): 904-914.

(收稿日期 2022年4月20日 编辑 王雅雯)