

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53 (12) :1347 - 1352; 4 December 2013  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 用半数变色单位法精确测定支原体活菌滴度

沈青春<sup>1,2</sup>, 李聪研<sup>1</sup>, 冯倩倩<sup>1</sup>, 孙晔<sup>1,2</sup>, 宁宜宝<sup>2</sup>, 朱良全<sup>1,2</sup>, 王芳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北京中海生物科技有限公司, 北京 100081

<sup>2</sup>中国兽医药品监察所, 北京 100081

**摘要:**【目的】使用半数变色单位法实现对支原体活菌滴度的精确测定,以替代当前常用的CCU(变色单位)测定法。【方法】参考病毒滴度TCID<sub>50</sub>(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—CCU<sub>50</sub>(半数变色单位)的测定方法进行改进,并做了重复性、敏感性试验以及与CCU的比对验证试验。为进一步验证该方法的适用性,使用其对猪肺炎支原体和鸡滑液支原体培养物进行了活菌滴度精确测定和评价。【结果】该方法可重复性良好,并具有较强的敏感性和适用性。【结论】CCU<sub>50</sub>测定法能对支原体活菌滴度进行精确评估,有望成为支原体培养工艺研究、支原体疫苗研发等方面的有效工具。

**关键词:**支原体,活菌滴度,半数变色单位,变色单位

**中图分类号:**Q93-3 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2013)12-1347-06

支原体是当前所发现的能独立生存、自行繁殖的最小微生物,其结构简单,缺少细胞壁,在培养基上一般呈“煎蛋状”菌落。支原体在自然界分布极广,包括动物、植物、昆虫和土壤中都有存在,很多支原体种类具有致病性,如与人类疾病相关的肺炎支原体、生殖道支原体等,以及与动物疫病相关的鸡毒支原体、牛传染性胸膜肺炎支原体、猪肺炎支原体等<sup>[1-2]</sup>。

目前几乎所有的支原体都可以进行人工培养,培养物滴度的测定方法一般使用颜色变化单位(color change unit, CCU)<sup>[3-4]</sup>或菌落形成单位(colony-forming units, CFU)<sup>[5-6]</sup>,由于支原体的培养条件要求相比细菌要严格得多,大部分种类在固体培养基上很难形成典型菌落,因此CCU成为最常用的支原体活菌滴度测定指标<sup>[7-8]</sup>。CCU测定方法

可以大致评估培养物中的活菌滴度,但不够精确,相邻两个滴度之间相差10倍,很难满足一些对活菌数要求较为严格的实验需求。

本研究是在Masover等(1975)实验中使用到的CCU<sub>50</sub><sup>[9-10]</sup>基础上,借鉴了病毒培养物的病毒滴度TCID<sub>50</sub>(50% tissue culture infective dose)的标准测定方法<sup>[11-14]</sup>,将其改进后应用于支原体的活菌滴度测定,并对该方法进行了敏感性和可重复性等验证,以期能成为支原体活菌滴度的一种常用的精确测量方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

菌种:猪鼻支原体(*Mycoplasma hyorhinis*) BTS-7

基金项目:农业科技成果转化资金项目(201132603022);北京市企业研发机构创新能力提升项目(Z121102002812080)

作者简介:沈青春(1976-),男,湖北麻城人,副研究员,博士,从事兽用生物制品科研和监察工作。Tel: +86-10-62103689; Fax: +86-10-62187899; E-mail: shenqingchun@ivdc.gov.cn

收稿日期:2013-04-12;修回日期:2013-09-02

株、鸡滑液支原体 (*Mycoplasma synoviae*) GX11-T 株, 由中国兽医微生物菌种保藏管理中心提供。猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 232 株, 由中国兽医药品监察所检测技术研究室提供。

## 1.2 培养基

非禽源支原体检验培养基 (液体) (批号: 20130301)、改良 Frey 氏液体培养基 (批号: 20130501), 由北京中海生物科技有限公司提供。

## 1.3 活菌滴度测定

**1.3.1 CCU<sub>50</sub>测定方法:** 先将猪鼻支原体 BTS-7 株 F2 代按 10% 接种量接入非禽源支原体检验培养基 (液体), 37 °C 静置培养 48 h, 此时培养物 pH 约 6.8, 收获用于 CCU<sub>50</sub> 和 CCU 测定。

对以上猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物进行 10 倍比稀释至 10<sup>-9</sup>, 分别从 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup> 管中各取 0.2 mL 加入到装有 1.8 mL 培养基的小管中, 每个稀释度设 6 个重复, 共计 24 支小管, 置 37°C 静置培养。2 周后进行结果判定, 统计各个稀释度培养基变色 (pH 变化值 ≥ 0.5) 的小管数量, 按照 Reed 和 Muench 法计算半数变色单位 (CCU<sub>50</sub>)。

**1.3.2 CCU 测定方法:** 取 10 支装有 1.8 mL 液体培养基的小圆底试管, 在第 1 管中加入 0.2 mL 猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物, 充分混匀后从第 1 管吸出 0.2 mL 液体加入第 2 管, 再混匀, 吸出 0.2 mL 加入第 3 管, 依次类推, 直到第 10 管。取 2 支含 2 mL 液体培养基的小管作为对照, 置 37°C 静置培养。2 周后观察培养基颜色变化, 并判定结果, 从培养基颜色由红变到橘黄 (pH 下降值 ≥ 0.5) 的最后一稀释管作为 CCU 计数的终点, 如: 第 1-8 管发生颜色改变 (pH 变化值 ≥ 0.5), 而第 9、10 管未发生明显颜色变化, 则培养物的 CCU 为 10<sup>-8</sup>/mL。

## 1.4 CCU<sub>50</sub>的可重复性验证

将猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物分别由 3 位不同的研究人员同时对该培养物进行 CCU 测定和 CCU<sub>50</sub>测定, 以比较两种活菌滴度测定方法的可重复性。

## 1.5 CCU<sub>50</sub>的敏感性验证

由于目前还没有一种可靠的方法对支原体活菌数进行精确测定, 难以直接验证其敏感性, 本文通过将 1.4 中猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物分别进行 2 倍和 3 倍稀释后, 再次进行 CCU<sub>50</sub>和 CCU 测定, 以 1.4 中 3 次 CCU<sub>50</sub>测定结果取平均值作为基准值

计算 2 倍和 3 倍稀释后的理论值, 通过比较稀释后的 CCU<sub>50</sub>测定结果与理论值的符合程度, 以对 CCU<sub>50</sub>测定方法的敏感性进行初步评价。

## 1.6 CCU<sub>50</sub>测定方法在其他支原体上的应用

将猪肺炎支原体 232 株接种到非禽源支原体培养基, 将鸡滑液支原体 GX11-T 株接种改良 Frey 液体培养基, 培养至颜色变黄时, 按照 1.3 的测定方法分别对猪肺炎支原体 232 株和鸡滑液支原体 GX11-T 株培养物进行 CCU<sub>50</sub>和 CCU 测定, 并各做 1 次重复, 以验证 CCU<sub>50</sub>测定方法的适用性。

## 2 结果

### 2.1 CCU 测定结果

三组对猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物进行 CCU 测定的小管中变黄的小管分别 1-8、1-8 和 1-9, 即 3 次 CCU 测定结果分别为 10<sup>-8</sup>/mL、10<sup>-8</sup>/mL、10<sup>-9</sup>/mL, 虽然结果在允许的 ± 1 个滴度的误差范围内, 但 10<sup>-8</sup>和 10<sup>-9</sup>的差距多达 10 倍。

### 2.2 CCU<sub>50</sub>测定结果

3 次由不同人员对同一份猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物测定结果如表 1。

参照《中国兽药典》(2010 版, 三部) 附录 7 的病毒半数致死量、感染量测定法, 按照公式 (1) 的方法计算 CCU<sub>50</sub>。

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于 50\% 的累计变色百分比} - 50\%}{\text{高于 50\% 的累计变色百分比} - \text{低于 50\% 的累计变色百分比}}$$

公式 (1)

$\log \text{CCU}_{50}$  = 高于 50% 变色的稀释度的对数 + 距离比例 × 稀释系数的对数;

则试验 1 结果: 距离比例 = 1,  $\log \text{CCU}_{50}$  = -7 + 1 × (-1) = -8;

试验 2 结果: 距离比例 = 0.7,  $\log \text{CCU}_{50}$  = -7 + 0.7 × (-1) = -7.7;

试验 3 结果: 距离比例 = 0.75,  $\log \text{CCU}_{50}$  = -7 + 0.75 × (-1) = -7.75;

接种量为 0.2 mL, 以上 3 次 CCU<sub>50</sub>测定结果可分别表示为  $\text{CCU}_{50} = 10^{-8.0}/0.2 \text{ mL}$ 、 $\text{CCU}_{50} = 10^{-7.7}/0.2 \text{ mL}$  和  $\text{CCU}_{50} = 10^{-7.75}/0.2 \text{ mL}$ , 将其转换成每毫升含 CCU<sub>50</sub> 数分别为:  $5.0 \times 10^8 \text{ CCU}_{50}/\text{mL}$ 、 $2.8 \times 10^8 \text{ CCU}_{50}/\text{mL}$ 、 $2.5 \times 10^8 \text{ CCU}_{50}/\text{mL}$ , 均值为  $3.43 \times$

$10^8$ CCU<sub>50</sub>/mL。3 次测定结果最大值与最小值相差 1 倍, 可能是由试验中随机性造成的偏差, 但相比 CCU 的测定结果, 已有较大改善, 总体上可重复性良好。

### 2.3 CCU<sub>50</sub> 敏感性测定结果

将同一个培养物稀释 2 倍和 3 倍后, 再对稀释后的培养物进行 CCU<sub>50</sub> 测定, 并将测定结果按照 2.2 的方法进行计算, 结果如表 2。

表 1.3 次对 BTS-7 株 F3 代培养物进行 CCU<sub>50</sub> 测定的结果

Table 1. The 3 repeat results of the culture of Mycoplasma hyorhinis BTS-7 strain determined by CCU<sub>50</sub> assay

Code of the repeat test	Dilution rate	Amount of color changed tubes	Amount of tubes without color change	Total of color changed tubes	Total of tubes without color change	Percent of color changed tubes / %	CCU <sub>50</sub> / 0.2 mL results
1	$10^{-6}$	6	0	15	0	100	$10^{8.0}$
	$10^{-7}$	6	0	9	0	100	
	$10^{-8}$	3	3	3	3	50	
	$10^{-9}$	0	6	0	9	0	
2	$10^{-6}$	6	0	14	0	100	$10^{7.7}$
	$10^{-7}$	6	0	8	0	100	
	$10^{-8}$	1	5	2	5	28.6	
	$10^{-9}$	1	5	1	10	9.1	
3	$10^{-6}$	6	0	14	0	100	$10^{7.75}$
	$10^{-7}$	6	0	8	0	100	
	$10^{-8}$	2	4	2	4	33.3	
	$10^{-9}$	0	6	0	10	0	

表 2. 分别对 BTS-7 株 F3 代培养物进行 2、3 倍稀释后的 CCU<sub>50</sub> 测定结果

Table 2. The results of the 1/2 and 1/3 diluted culture of Mycoplasma hyorhinis BTS-7 strain determined by CCU<sub>50</sub> assay

Dilution multiple of the culture	Dilution rate	Amount of color changed tubes	Amount of tubes without color change	Total of color changed tubes	Total of tubes without color change	Percent of color changed tubes	CCU <sub>50</sub> / 0.2 mL results
2 ×	$10^{-6}$	6	0	13	0	100%	$10^{7.53}$
	$10^{-7}$	4	2	7	2	77.8%	
	$10^{-8}$	2	4	3	9	25.0%	
	$10^{-9}$	1	5	1	11	8.3%	
3 ×	$10^{-6}$	6	0	11	0	100%	$10^{7.40}$
	$10^{-7}$	5	1	5	1	83.3%	
	$10^{-8}$	0	6	0	7	0%	
	$10^{-9}$	0	6	0	13	0%	

经过 2 倍和 3 倍稀释后, 猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物的测定结果分别为  $CCU_{50} = 10^{-7.53} / 0.2$  mL 和  $CCU_{50} = 10^{-7.4} / 0.2$  mL, 将其转换成每毫升含  $CCU_{50}$  数分别为:  $1.69 \times 10^8$  CCU<sub>50</sub> / mL、 $1.26 \times 10^8$  CCU<sub>50</sub> / mL。按照 2.2 中测定的培养物活菌滴度均值计算得出的 1/2 倍和 1/3 倍稀释理论值分别为  $1.72 \times 10^8$  CCU<sub>50</sub> / mL 和  $1.14 \times 10^8$  CCU<sub>50</sub> / mL, 测定值与理论值比较接近, 仅存在较小的偏差, 表明  $CCU_{50}$  测定方法能对不同的稀释做出明显的反应, 测定值与理论值的接近度也侧面证明了该测定方法的敏感度良好。

同时对经过 2 倍和 3 倍稀释后的猪鼻支原体 BTS-7 株 F3 代培养物使用 CCU 测定方法进行检测的结果为  $10^{-8}$  / mL、 $10^{-8}$  / mL, 表明 CCU 测定方法对 2 倍和 3 倍稀释没有做出明显反应。

### 2.4 CCU<sub>50</sub> 测定方法在其他支原体的应用结果

对各稀释度的变色管数量进行统计后, 按照 2.2 的方法计算测定结果, 猪肺炎支原体 232 株的两次  $CCU_{50}$  测定结果分别为:  $10^{-8.0} / 0.2$  mL、 $10^{-8.22} / 0.2$  mL, CCU 的两次测定结果为  $10^{-8}$  / mL、 $10^{-9}$  / mL; 对鸡滑液支原体 GX11-T 株的两次  $CCU_{50}$  测定分别为:  $10^{-7.45} / 0.2$  mL、 $10^{-7.5} / 0.2$  mL, CCU 的

两次测定结果为  $10^{-8}$  /mL、 $10^{-8}$  /mL。

猪肺炎支原体 232 株和鸡滑液支原体 GX11-4 株的 CCU<sub>50</sub> 测定结果与其相应的 CCU 结果基本上同一个数量级上,但更精确,而且两次测定结果相差也较近,表明 CCU<sub>50</sub> 测定方法适用于猪肺炎支原体和鸡滑液支原体的活菌滴度测定。

### 3 讨论

当前对支原体活菌滴度评价常用的方法仍然是传统的 CCU 和 CFU 测定方法,但由于支原体菌落微小,比较难于统计,还有部分种类支原体极难在固体培养基上形成典型菌落,因而 CCU 测定成为最为常用的支原体活菌滴度评价方法。近年来也先后出现了紫外测定法和 PCR 方法等快速测定支原体培养物菌体滴度的方法,但均不能区分活菌与死菌体,只能作为菌体抗原浓度的参考指标<sup>[15]</sup>。Masover 等 (1975) 在试验中首次使用半数变色单位 (CCU<sub>50</sub>) 评价支原体的活菌滴度<sup>[9]</sup>,但描述非常简略,具体测定和计算方法没有详细说明。Robertson 等 (1978) 对 CCU<sub>50</sub> 测定的稀释方法进行了详细描述,即先对待测的支原体进行 10 倍比稀释到  $10^{-9}$  (或  $10^{-12}$ ),再将每个稀释度的试管分成 9 个 0.2 mL 加入到 0.3 mL 容积的无菌微量板孔中,再用胶带封上用于培养<sup>[10]</sup>。Stemke 和 Robertson (1982) 使用人型支原体 (*M. hominis*) 和解脲支原体 (*U. urealyticum*) 对 CFU 和 CCU<sub>50</sub> 的测定结果与核酸浓度进行相关性比较,发现 CCU<sub>50</sub> 与核酸浓度相关性更好,但随后很少有文献提及 CCU<sub>50</sub>。该方法作为支原体活菌滴度的测定方法并没有被广泛采用,分析其原因可能包括: Masover 等尽管提出半数变色单位的概念,但没有作为一种方法加以描述和验证;随后 Robertson 等描述了使用微量板对支原体 CCU<sub>50</sub> 进行测定的方法,但微量板不适合大多数支原体的培养,而且容易出现污染等问题,影响测定的准确性。Stemke 和 Robertson (1990) 又利用细胞中 ATP 的特性,即活细胞中含有一定量的 ATP,当细胞死亡时,ATP 则很快分解消失的特性,通过荧光素酶 (luciferase) - 荧光素 (luciferin) 方法测定细胞中 ATP 的含量,已实现对猪肺炎支原体和絮状支原体活菌数的快速测定<sup>[16]</sup>。近年来,随着 ATP 化学荧光技术的发展并广泛应用于活细胞计数,Calus 等 (2010) 将其用于

猪肺炎支原体培养物活菌数的测定,并用其绘制了生长曲线<sup>[17]</sup>。ATP 荧光技术具有快速、方便的特点,但对样品处理、检测仪器精度和稳定性等有较高要求。

本研究借鉴了病毒滴度 TCID<sub>50</sub> 的标准测定方法,用于对支原体活菌滴度 CCU<sub>50</sub> 的测定,通过可重复性和敏感性评价,结果表明该方法可重复性良好,并能对 2 倍和 3 倍稀释做出明显反应,测定结果均与理论值也较为接近,因此 CCU<sub>50</sub> 测定法基本上可满足支原体活菌滴度的精确测定需求,弥补了 CCU 测定方法的不足,所需要的时间与 CCU 方法基本相同,但操作稍显复杂。

有报道显示,通过设置多个重复取平均值的办法可增加 CCU 测定方法的准确性,但由于样本间的差异较大,效果有限<sup>[18-20]</sup>。此外,在滴度的计算方法上,CCU 测定方法也较为粗放,方法中对培养物进行 10 倍比稀释,每次从上一个稀释度吸取 0.2 mL 接入下一个稀释度的 1.8 mL 培养基中,而不是 0.1 mL 接入到 0.9 mL 中,因此该方法判定的测定结果实际上为每 2 mL 的结果,即试验结果 3.1 中的 3 次 CCU 测定结果应该分别为  $10^{-8}/2$  mL、 $10^{-8}/2$  mL 和  $10^{-9}/2$  mL,因此该方法在理论上就偏高了 1 倍。CCU<sub>50</sub> 测定法在接种量上进行了充分考虑,将 CCU<sub>50</sub> 表示为每 0.2 mL 含有的半数变色单位数,避免了理论上可能出现的偏差。

为了证明该方法的适用性,试验中选用了一株猪肺炎支原体和一株禽类支原体进行实验,其中猪肺炎支原体被认为是当前最难培养的支原体种类之一,实验测定结果符合预期,而且两次结果相差很近,表明该方法重现性和适用性良好,而对其他种类支原体是否也完全适用仍需通过实验来验证。CCU<sub>50</sub> 测定结果是基于培养物的某个稀释倍数下 50% 的试管可被培养而得出,如果 X 表示为每管的平均活细胞数,根据泊松分布,  $P = 1 - 0.5 = e^{-X}$ ,  $X = 0.6931$ ,约等于 0.7,即 1 个单位的 CCU<sub>50</sub> 大约等于 0.7 个活菌 (假设 1 个支原体活菌即可繁殖生长)<sup>[21]</sup>,因此,CCU<sub>50</sub> 也可以根据这一规律把活菌滴度直接换算成活菌数。

综上所述,本文中描述的支原体 CCU<sub>50</sub> 测定法很好地解决了 CCU 测定方法的精确度差的问题,并具有较好可重复性和敏感性,有望成为支原体基础研究与应用等方面的有效工具。

## 参考文献

- [1] Christiansen G, Jensen LT, Boesen T, Emmersen J, Ladefoged SA, Schiøtz LK, Birkelund S. Molecular biology of Mycoplasma. *Wien Klin Wochenschr*, 1997, 109 (14-15): 557-561.
- [2] Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell Journal*, 2012, 13 (4): 203-212.
- [3] Kraybill WH, Crawford YE. A Selective Medium and Color Test for Mycoplasma Pneumoniae. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 1965, 118: 965-970.
- [4] Purcell RH, Taylor-Robinson D, Wong DC, Chanock RM. A color test for the measurement of antibody to the non-acid-forming human Mycoplasma species. *American Journal of Epidemiology*, 1966, 84 (1): 51-66.
- [5] Anderson DL, Pollock ME, Brower LF. Morphology of Mycoplasma laidlawii type A. I. Comparison of electron microscopic counts with colony-forming units. *Journal of Bacteriology*, 1965, 90 (6): 1764-1767.
- [6] Mel'nikov VA, Rakovskaia IV, Andreev VM. [Size distribution of colony-forming units in a population of Mycoplasma laidlawii]. *Mikrobiologiya*, 1972, 41 (6): 1031-1037.
- [7] Ma LD, Chen B, Dong Y, Fan J, Xia L, Wang SZ, Liu Q, Jiang L. Rapid mycoplasma culture for the early diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2010, 24 (4): 224-229.
- [8] Xu S, Sharma H, Mutharasan R. Sensitive and selective detection of mycoplasma in cell culture samples using cantilever sensors. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105 (6): 1069-1077.
- [9] Masover GK, Mischak RP, Hayflick L. Some effects of growth medium composition on the antigenicity of a T-strain mycoplasma. *Infection and Immunity*, 1975, 11 (3): 530-539.
- [10] Robertson JA. Bromothymol blue broth: improved medium for detection of Ureaplasma urealyticum (T-strain mycoplasma). *Journal of Clinical Microbiology*, 1978, 7 (2): 127-132.
- [11] Barrett PN, Meyer H, Wachtel I, Eibl J, Dorner F. Determination of the inactivation kinetics of hepatitis A virus in human plasma products using a simple TCID<sub>50</sub> assay. *Journal of Medical Virology*, 1996, 49 (1): 1-6.
- [12] Gustafsson RK, Engdahl EE, Fogdell-Hahn A. Development and validation of a Q-PCR based TCID<sub>50</sub> method for human herpesvirus 6. *Virology Journal*, 2012, 9: 311.
- [13] LaBarre DD, Lowy RJ. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID<sub>50</sub> and plaque assays. *Journal of Virological Methods*, 2001, 96 (2): 107-126.
- [14] Wulff NH, Tzatzaris M, Young PJ. Monte Carlo simulation of the Spearman-Kärber TCID<sub>50</sub>. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 2012, 2 (1): 5.
- [15] Shen QC, Qing QS, Wang Q, Ning YB, Zhao Y, Song L, Zhang GC, Wu HM. Determinate the cell count in culture of Mycoplasma hyopneumoniae by PCR. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2006 (01): 55-57. (in Chinese)  
沈青春, 覃青松, 王琴, 宁宜宝, 赵耘, 宋立, 张广川, 吴惠明. PCR方法测定猪肺炎支原体培养物菌数. 中国预防兽医学报, 2006 (01): 55-57.
- [16] Stemke GW, Robertson JA. The growth response of Mycoplasma hyopneumoniae and Mycoplasma flocculare based upon ATP-dependent luminometry. *Veterinary Microbiology*, 1990, 24 (2): 135-142.
- [17] Calus D, Maes D, Vranckx K, Villareal I, Pasmans F, Haesebrouck F. Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of Mycoplasma hyopneumoniae in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 83 (3): 335-340.
- [18] Li JA. The title change of the attenuated Mycoplasma gallisepticum culture at 2 - 10°C. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 1997 (02): 42. (in Chinese)  
李嘉爱. 鸡毒支原体弱毒培养液在 2 ~ 10°C 中活菌滴度的变化. 中国兽药杂志, 1997 (02): 42.
- [19] Liu YQ, Ding JB, Li BB, Xiu L, Zhang RT. Growth curve and generation time determination of Quality-Control strain mycoplasma detecting medium. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2012 (12): 13-15 + 18. (in Chinese)  
刘轶秋, 丁家波, 李蓓蓓, 徐磊, 张瑞婷. 支原体检验用培养基质控菌株的生长曲线与世代时间测定. 中国兽药杂志, 2012 (12): 13-15 + 18.
- [20] Luo YF, Zhu LQ, Feng J, Liu YQ, Yang TY, Li L, Zhang RT, Zuo JR, Wang D, Yu XL, Na L, Xie LH.

Study of medium in the tests for absence of mycoplasma. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2009 (06) : 26-29. (in Chinese)  
罗玉峰, 朱良全, 冯娟, 刘轶秋, 杨挺英, 李琳, 张瑞婷, 左继荣, 王栋, 于秀兰, 娜琳, 薛丽华. 支原体检

验培养基的研究. 中国兽药杂志, 2009 (06) : 26-29.

[21] Stemke GW, Robertson JA. Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982, 16(5) : 959-961.

## Accurate titration of mycoplasma culture measured by 50% color change unit assay

Qingchun Shen<sup>1,2\*</sup>, Congyan Li<sup>1</sup>, Qianqian Feng<sup>1</sup>, Ye Sun<sup>1,2</sup>, Yibao Ning<sup>2</sup>, Liangquan Zhu<sup>1,2</sup>, Fang Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Beijing Zhonghai Biotech Co., Ltd., Beijing 100081, China

<sup>2</sup> China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Objective] A new method was introduced for precise determination of the live cell titer of mycoplasma culture, and would be a candidate to replace the commonly used CCU (color change unit) assay. [Methods] The CCU<sub>50</sub> (50% color change unit) was modified according to the method of TCID<sub>50</sub> (50% tissue culture infective dose) assay used for viral titer assessment, and adopted to estimate the live cell titer of mycoplasma. Sensitivity and reproducibility of the CCU<sub>50</sub> assay were assessed, and adaptability was checked with *M. hyopneumoniae* and *M. synoviae*. [Results] The CCU<sub>50</sub> assay showed better reproducibility, sensibility and adaptability than traditional CCU assessment approaches. [Conclusion] The method could be applied to accurate titration determination for mycoplasma, and might be considered as a useful tool for the research of high density fermentation of mycoplasma and development of vaccine.

**Keywords:** mycoplasma, titration, 50% color change unit, color change unit

(本文责编:张晓丽)