

研究总结汇编

1980

广东农科院兽医研究所

一九八〇。

- 1、O型口蹄疫鼠化毒株的低浓度继代试验
..... 郑锦兰 1—7页
- 2、正常猪的血液对O型口蹄疫鼠化毒的影响
..... 郑锦兰 7—13页
- 3、猪O型口蹄疫鼠化弱毒鸭胚苗两次注射区域试验
许 南 何君梅 13—18页
- 4、抽佐剂提高猪O型口蹄疫鼠化弱毒鸭胚疫苗免疫效力试验初报
许 南 何君梅 19—24页
- 5、猪O型口蹄疫鼠化弱毒鸭胚苗同居感染试验
许 南 何君梅 25—28页
- 6、猪O型口蹄疫病毒对鸭胚初代细胞的适应性试验
赵心贤 曾子坤 伍惠卿 欧美霞 29—34页
- 7、佛山低温毒的分离培育和安全效力及田间试验
赵心贤 曾子坤 伍惠卿 欧美霞 35—42页
- 8、疫病毒在小白鼠体内干扰口蹄疫病毒感染现象观察
郑锦兰 杜伟贤 42—46页
- 9、猪喘气病康复猪肺组织带菌测定试验小结
冯广仁 林克义 陆 三 李海金 47—53页
- 10、猪喘气病及场康复母猪免疫性测定试验报告
李海金 林克义 冯广仁 陆 三等..... 54—57页
- 11、猪喘气病后期病灶猪体继代弱毒株培育探索试验小结
林克义 李海金 陆 三 郭翠云 57—65页

12. 猪肺炎支原体及疑禽败血支原体的微粒凝集现象在显微镜下的初步观察

李兰桂 叶仰山 李伯定 郭翠云 66—73页

13. 猪喘气病 4 P 菌株试验小结

李兰桂 叶仰山 李伯定 郭翠云 73—77页

14. 猪喘气病支原体对低温度(3℃)适应的探索

李兰桂 叶仰山 李伯定 郭翠云 78—82页

15. 猪喘气病支原体活体分离试验小结

林广寿等 83—87页

16. 猪喘气病广州西屠场四系猪源交替继代试验总结

温球升 李海金 冯广仁 陆三 88—98页

17. 中药抑杀姜片虫囊蚴试验总结

曾琳 蔡衡青 99—106页

18. 中草药治疗猪喘气病研究小结

黄志先 甘淑鸣 107—118页

19. 钩吻药理实验(初报)

梁洁榆 陈南云 119—127页

20. 钩吻碱对鸡育肥效果的初步观察

梁洁榆 陈南云 128—131页

21. 石井系鸭瘟弱毒疫苗对我国台湾“花鸭”澳洲“狄高”鸭和丹麦“白鸭”的安效试验报告

陈天杰 赵长旺 姚月华 曾继娣 132—145页

22. 石井系鸭瘟弱毒种真空冻干低温保存六年的特性观察试验

梁眷衡 陈天杰 郭美仪 145—151页

23. 鹅感染鸭瘟试验小结

黄承锋 朱治远 罗懿云 152—158页

24. 鸡传染性喉气管炎病毒株的收集鑑定和分离传代

朱治远 叶良韶 何美联 158—163页

25. 几种抗球虫药对鸡球虫病防治对比试验

谢明权 卢奕民 164—168页

26. 不同年龄的白洛克鸡对盲肠球虫的敏感性试验

谢明权 卢奕民 169—175页

○型口蹄疫鼠化毒株的低浓度继代试验

郑 锦 兰

○型口蹄疫病毒通过乳鼠继代培育用于牛的弱毒疫苗国内外都有成功的例子。在我国鼠化毒用于猪却表现毒力很强。我们曾选用1968年分离的猪源毒株通过乳鼠继代300代对猪尚未达到致弱的目的。以1:100浓度的鼠代毒注射猪引起蹄部的反应率20%—30%用37℃减毒24小时以氢氧化铝胶作稀释液制成的疫苗或将鼠化毒(300代)通过磷酸三腺苷(A、T、P)处理继代5代以12—14天龄鸭胚为制苗材料制成的疫苗。在蹄部反应率有所下降,但免疫效果尚不理想。

是否由于病毒本身的问题,值得我们探索。过去鼠化继代的方法是以口蹄疫病毒致死的骨骼肌肉组织,制成1:10的悬液注射乳鼠继代。这种继代方法是假定继代的病毒群体的所有病毒颗粒在抗原性和致病性完全一致的基础上进行的。通过不断的继代病毒的群体保留抗原性而对本动物的致病性逐渐消失^{或完全消失}达到培育出抗原性好而又安全的弱毒疫苗。由于没有考虑到口蹄疫病毒的本质,因此继代工作多少带点盲目性。

由于病毒分子生物学的发展推动了口蹄疫病毒本质的研究。口蹄疫病毒是属于小核糖核酸病毒。在同一培养物或是悬浮液中含有四种病毒颗粒。1. 140S 颗粒,是完整的颗粒。核糖核酸占31.5%,且蛋白质占68.5%,核糖核酸决定病毒的感染性和遗传性,且蛋白质则决定抗原性、免疫性和血清的反应能力。2. 75S 颗粒不含核糖核酸的空壳体。3. 12S 颗粒是由蛋白质壳体裂解后形成的壳微体。空壳和壳微体不产生细胞致病作用,无蚀斑,都没有感染力,只有抗原和血清学反应能力。4. “与病毒感染相关抗原”(virus infection associated antigen 称为VIA 抗原)是一种无衣壳的病毒

抗原。沉降系数小于4.5s。这4种颗粒在疫苗中的比例高低影响到疫苗的效果。因此 Garland 等提出评定口蹄疫疫苗的效果。不采用费钱很大的动物试验，而用单相放射性免疫扩散试验等方法分析140s、75s和12s 来判定疫苗的效果。

由此可见，在鼠化继代口蹄疫的过程中，那一种颗粒占多数就决定疫苗反应的强弱，免疫效果的优劣。

Bernal 等用组织培养以低浓度方法克隆化快速培育出牛用的口蹄疫弱毒疫苗。

我们试用低浓度继代的方法。将O西M300代在乳鼠继代。通过较少的病毒毒体，筛选出致病性低或者消失而保存抗原性好的病毒毒体作为猪用的口蹄疫弱毒疫苗。

试验方法

1. 病毒：O西M300代鼠化毒。该毒株是1968年分离的猪源口蹄疫病毒，通过乳鼠继代300代。

2. 继代方法：以O西M300代鼠化毒测毒 10^{-7} 0.1毫升死亡的乳鼠。收获骨骼肌肉作为原始种毒。继代时稀释为 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 3—4个稀释度，以0.1毫升接种4天龄乳鼠4—5只。待其死亡，选择 10^{-6} 或 10^{-7} 死亡的乳鼠，收获骨骼肌肉按前法继代。在继代过程也是测毒的过程。

3. 对猪的安效试验：从35代起，每隔5代，以鼠毒1:10 2毫升的剂量接种2—3月龄小猪。观察安全性14天。以后隔一定时期用强毒（广1MF₈）以1:500 2毫升的剂量攻击。观察14天。

结果

1. 继代

继代至100代。每代用4天龄乳鼠测毒。按 Reed及Muench

计算1050。各代的毒价表列如下：

低浓度继代的毒株毒价一览表（对乳鼠的LD₅₀）

	1-10代	11-20代	21-30代	31-40代	41-50代	51-60代	61-70代	71-80代	81-90代	91-100代
1	8.5	8.2	7.5	7.0	7.5	7.5	6.5	8.3	7.4	8.3
2	8.5	8.6	7.6	7.5	7.3	8.3	8.3	8.0	7.7	8.5
3	8.5	8.0	7.8	7.5	7.7	6.5	6.7	8.0	8.7	8.4
4	8.5	8.2	7.6	7.7	8.3	7.5	7.5	8.5	8.4	8.0
5	7.6	8.5	7.5	6.7	7.5	6.5	7.3	8.5	8.7	8.3
6	8.4	8.8	7.5	6.7	7.7	6.5	7.7	8.5	8.4	8.3
7	8.5	7.6	7.2	7.7	7.3	6.7	5.8	8.3	8.3	8.0
8	8.5	7.8	7.3	7.5	7.3	7.5	8.0	9.0	8.2	8.4
9	8.8	8.6	7.2	8.0	7.7	7.7	7.6	7.7	8.3	7.2
10	8.5	8.4	7.0	7.3	7.2	7.2	7.5	8.0	9.0	8.5

从上表可见通过低浓度继代各代毒价的变化並不规律。並不随代次的增多而提高。两头高，中间低。1-20代绝大多数在8.0以上。

21-70代大多数在6.5-7.7之间，71-100代大多数在8.0以上。

2. 对猪的安全性及攻毒结果

从35代起，每5代以鼠毒1:10 2毫升注射2-3月龄小猪2头，观察安全性及一定期间用(广1)MF8 1:500 2毫升攻毒。

低浓度继代毒株对猪的安全性及攻毒效果表

试验日期	代次	LD ₅₀	注射猪数	反应头数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率	对照猪发病
7.12	35	6.67	2	1	37	2	2	100%	3/3 100%
7.21	40	7.73	2	0	28	2	1	50%	" "
7.30	45	7.5	2	1	19	2	2	100%	" "
8.8	50	7.17	3	0	29	3	0	0	" "
8.20	55	6.5	2	0	17	2	2	100%	" "
8.28	60	7.17	2	1	32	2	2	100%	2/3 66.7%
9.13	65	73.3	2	0	28	2	2	100%	3/3 100%
9.21	70	7.5	2	0	20	2	2	100%	" "
9.29	75	8.5	2	2	29	2	2	100%	" "
10.6	80	8.0	2	2	22	2	2	100%	" "
10.13	85	8.67	2	1	31	2	2	100%	2/2 100%
10.21	90	9.0	2	2	24	2	2	100%	" "
11.12	95	83.3	2	0	23	2	2	100%	" "
12.8	100	7.5	6	0	22	6	6	100%	2/3 66.7%

从上表可见，在14个代次中无蹄部反应而攻毒后100%保护的有55代、65代、70代、95代、100代等5个代次。

55代对猪的安全及效果试验

从继代过程中55代以1:10 2毫升的剂量对小猪不引起蹄部反应而攻毒后100%获得免疫。因此有必要重复，以1:10和1:100两浓度对小猪进行试验。结果表列如下：

55代(1:10)对小猪安全及效果表

试验次	日期	疫苗毒价LD50	注射猪数	反应头数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率	对照猪发病
1	8.20	06.50	2	0	19	2	2	100%	3/3 100%
2	10.4	7.67	2	0	24	2	2	100%	~ ~
3	11.4	6.5	4	1	18	4	3	75%	~ ~
4	12.1	7.67	4	2	22	4	4	100%	2/2 100%
5	12.25	6.67	4	0					~ ~
合 计			16	3		12	11	91.7%	11/11 100%

55代(1:100)对小猪安全及效果表

试验次	日期	疫苗毒价	注射猪数	反应头数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率	对照猪发病
1	10.4	7.67	4	0	24	4	1	25%	3/3 100%
2	11.4	6.5	4	0	18	4	2	50%	3/3 100%
3	12.1	7.67	4	0	22	4	3	75%	2/2 100%
4	12.25	6.67	4	0					
合 计			16	0		12	6	50%	

55代(1:10)对小猪安全及效果试验。5次安全试验16头3头有蹄部反应。反应率18.8%。攻毒4次12头。11头有保护。保护率91.7%

55代(1:100)对小猪安全及效果试验4次16头。全部无反应。攻毒3次12头。6头有保护。保护率50%。

从55代来看1:10浓度效果较好。但反应率稍高。1:100浓度安全性好。但免疫率较差。

100代毒对猪的安全及效果试验

100代毒用三种乳鼠制成1:10、1:100悬液注射小猪进行安效试验。一种是15天龄乳鼠接种量为 $10^{-1.0} \sim 0.2$ 毫升。一

种是5天龄乳鼠接种量为 10^{-2} 0.1毫升, 一种是5天龄乳鼠接种量为 10^{-7} 0.1毫升。试验猪的安全及效果表列如下:

100代(1:10)对小猪安全及效果表

试验日期	制苗材料	注射头数	反应头数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率	对照猪发病
12.8	大日龄乳鼠	2	1	22	2	2	100%	2/3 66.7%
	小日龄乳鼠 (10^{-2} 接毒)	2	0	22	2	2	100%	
	小日龄乳鼠 (10^{-7} 接毒)	2	0	22	2	2	100%	

100代1:100对小猪安全及效果表

试验日期	制苗材料	注射头数	反应头数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率	对照猪发病
12.8	大日龄乳鼠	2	0	22	2	2	100%	2/3 66.7%
	小日龄乳鼠 (10^{-2} 接毒)	2	0	-	2	2	100%	
	小日龄乳鼠 (10^{-7} 接毒)	2	0	-	2	2	100%	

从上述可见, 100代毒不论来自大日龄乳鼠或小日龄乳鼠(接毒量 10^{-2} 0.1毫升或 10^{-7} 0.1毫升)浓度不论1:10或1:100对小猪均不产生蹄部反应。攻毒后均100%保护。安全性和免疫效果都很理想。

论 讨

低浓度继代在组织培养蚀斑克隆化应用较多, 从蚀斑中可以挑选出具有一定特性(致病性低, 免疫原性好)的毒株。在乳鼠方面应用较少。通过本试验说明0西M300代通过乳鼠100代的继代, 免疫原性较好。从35—100代的14个代次中除40代免疫率较低外其余12个代次免疫率都达100%, 而且有5个代次

对小猪无反应而免疫率达100%，而有的代次反应率虽然高，但是反应程度是轻的。初步看来经过这样的筛选可能获得反应率低而免疫效果好的弱毒疫苗。特别是100代不论用大日龄的乳鼠或小日龄的乳鼠制成浓度1:10或1:100的疫苗对小猪无反应而免疫率达100%。是有苗头的代次，当然试验的次数还不够多，尚难作出肯定的结论。

由于条件关系我们没能从通过低浓度继代的鼠化毒病毒的颗粒究竟是哪一种颗粒占优势，有待于将来的探讨。

参考文献略

本试验得杜伟贤同志协助，谨致谢。

1980年12月

正常猪的血液对O型口蹄疫鼠化毒的影响

郑 锦 兰

动物的血球对某些病毒有吸附的作用。我们在用正常猪的血液吸附O型口蹄疫鼠化毒接种鸭胚试验发现经过正常猪的血液处理的O型口蹄疫鼠化毒毒价很低，引起我们对正常猪血液对正常猪血对口蹄疫病毒毒价影响的注意，因此进行以下的试验。

试 验 方 法

1. 正常猪血的采集

正常猪来自非口蹄疫疫区。以前腔血管采血法，采集猪血置于盛有肝素的试管，马上振荡摇匀防止凝固。

2. 病毒

为本组培育的O型鼠化毒O西M300代。制成1:10的悬液。离心沉淀，取上清液。

3. 病毒与正常猪血作用的程序

将制备的O型鼠化毒1:10浓度悬液的上清液1毫升加入9毫升的正常猪血中。另外以同样的鼠化毒1毫升加入9毫升磷酸盐缓冲液内。作为对照。置37℃孵育。8小时，24小时分别取出样本测毒。

4. 测毒方法

用4天龄乳鼠测毒。选择3—4窝乳鼠。每窝8只以上。分作两半，一半接种稀释的血液处理毒，一半接种同样稀释液的对照毒，测毒时作3—4个稀释度。根据乳鼠死亡数按 Reed 和 Munch 法算LD₅₀。比较两组对乳鼠的LD₅₀。以生物统计学处理数据。

结 果

一. 乳鼠测毒结果

1. 8小时处理用乳鼠测毒10次的结果

测毒结果见表，两组的LD₅₀平均值：血处理为5.62，对照组为7.29，对照组比试验组高67%。

正常猪血8小时作用Ld50对照表

试验次	血处理组 x_1	对照组 x_2	$d = x_2 - x_1$	$d - \bar{d}$	$(d - \bar{d})^2$
1	6.0	7.25	1.25	-0.42	0.1764
2	4.67	7.50	2.83	-1.16	1.3456
3	5.0	7.69	2.69	-1.02	1.0404
4	6.33	7.33	1.00	0.67	0.4489
5	4.67	6.50	1.83	-0.17	0.0289
6	6.25	6.67	0.42	1.25	1.5625
7	5.5	7.00	1.50	1.17	1.3689
8	5.5	7.25	1.75	-0.12	0.0144
9	6.0	8.25	2.25	-0.58	0.3364
10	6.32	7.50	1.18	0.49	0.2401
Σ	56.24	72.94	16.7		
	$\bar{x}_1 5.62$	$\bar{x}_2 7.29$	$\bar{d} 1.67$		

生物统计学处理

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{s_d}, \quad s_d = \sqrt{\frac{\Sigma (d - \bar{d})^2}{N(N-1)}} = \sqrt{\frac{6.5624}{10 \cdot 9}} = \sqrt{0.0729} = 0.27$$

$$t = \frac{7.29 - 5.62}{0.27} = \frac{1.67}{0.27} = 6.185$$

查表 自由度 $N - 1 = 10 - 1 = 9$ 时 5% $t = 2.268$

1% $t = 3.25$

现测得 t 值为 $6.18 > 3.25$ $BP < 0.001$ 说明差异非常显著。可以得出结论，正常猪血在 37°C 作用8小时能使O型口蹄疫鼠化毒的毒价降低。

2.24小时处理用乳鼠测毒22次的结果

测毒结果见表。但两组的Ld50平均值血处理组为5.33对照组为6.90。对照组比试验组高1.57。

正常行血作用24小时Ld50对照表

试验次	血处理组 x_1	对照组 x_2	$d = x_2 - x_1$	$d - \bar{d}$	$(d - \bar{d})^2$
1	5.0	7.0	2.0	-0.62	0.3844
2	4.5	6.75	2.25	-0.87	0.7569
3	4.0	6.54	2.54	-1.16	1.3456
4	4.0	5.75	1.75	-0.37	0.1369
5	5.83	6.75	0.92	0.46	0.2116
6	4.83	6.55	1.72	-0.34	0.1156
7	5.23	6.33	1.10	0.28	0.0784
8	5.63	6.67	1.04	0.34	0.1156
9	5.23	6.5	1.27	0.11	0.0121
10	5.47	6.63	1.16	0.22	0.0484
11	5.75	7.33	1.56	-0.18	0.0324
12	7.17	7.50	0.33	1.05	1.1025
13	6.0	7.63	1.63	0.25	0.0625
14	6.0	7.5	1.50	-0.12	0.0144
15	6.5	7.0	0.50	0.88	0.7744
16	6.0	7.25	1.25	0.16	0.0256
17	6.17	7.5	1.33	0.05	0.0025
18	5.83	6.5	0.67	0.71	0.5041
19	5.67	6.67	1.0	0.38	0.1444
20	4.74	7.33	2.59	1.21	1.4641
21	5.67	7.17	1.50	0.12	0.0144
22	6.33	7.0	0.67	0.31	0.0961
Σ	121.55	151.85	30.28		7.4429
	$\bar{x}_1 5.33$	$\bar{x}_2 6.90$	1.38		

生物统计学处理

$$t = \frac{\bar{X}_2 - \bar{X}_1}{s_d} \quad s_d = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{N(N-1)}} = \sqrt{\frac{7.4429}{22 \times 21}} = \sqrt{0.01611} = 0.1269$$

$$t = \frac{6.9 - 5.33}{0.1269} = \frac{1.57}{0.1269} = 12.372$$

查表

自由度 $df = 1 - 1 = 22 - 1 = 21$ 时 5% $t = 2.080$

1% $t = 2.831$

现测得 t 值为 $12.372 > 2.831$ $P < 0.001$ 说明差异非常显著

可以得出结论：正常猪血在 37°C 作用 24 小时能使 O 型口蹄疫鼠化毒的毒价降低。

二、对猪的安全性及效果

1. 正常猪血在 37°C 处理 8 小时的鼠毒对猪的安全性及效果

以经过正常猪血在 37°C 处理 8 小时的鼠化毒悬液 (1:100) 2 毫升注射小猪 2 头，观察 14 天。19—21 天用 (广 1) MF8 1:5002 毫升攻击。结果表列如下：

试验次	试验日期	血处理组						对照组						对照猪发病
		注射猪数	皮应数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率	注射猪数	皮应数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率	
1	4.23	2	2	21	2	2	100%							2/2 100%
2	5.26	2	1	19	2	2	100%	2	1	19	2	2	100%	2/3 66.7%
3	6.22	2	0	20	1	1	100%	2	0	20	2	1	50%	3/3 100%
	累计	6	3		5	5	100%	4	1		4	3	75%	

从上表可见血处理组三次注射猪共 6 头。有蹄部反应 3 头，反应率 50%，反应率虽高，但程度较轻。对照组 2 次共注射猪 4 头，反应应 1 头，反应率 25%，反应程度较轻。攻毒给鼠血处理组 5 头，全部保

护，对照组4头，3头保护，保护率75%。

2. 正常猪血在37℃处理24小时的鼠毒对猪的安全性及效果以经过正常猪血在37℃处理24小时的鼠化毒悬液(1:100)2毫升注射猪22头观察14天，10—25天用(广1)MF8 1:500 2毫升攻击，结果表列如下：

试验次	试验日期	血 处 理 组						对 照 组						对照猪 发病
		注射猪数	反应数	攻毒头数	保护头数	保护率	注射头数	反应数	攻毒期(天)	攻毒头数	保护头数	保护率		
1	4.24	2	2	2	2	100%							2/2 100%	
2	5.27	2	0	2	2	100%	2	0	18	2	2	100%	2/3 66.7%	
3	6.22	2	0	2	2	100%	2	0	20	2	1	50%	3/3 100%	
4	8.1	2	0	2	2	100%	2	1	21	2	1	50%	2/3 66.7%	
	7.30	4	0	23	4	0	2	0	23	2	2	100%	" "	
5	8.23	6	0	24	6	100%	3	0	24	3	3	100%	" "	
6	10.8	4	2	20	4	100%	2	1	20	2	2	100%	3/3 100%	
累 计		22	4	13.6	22	17	77.4%	13	2	13	10	77%		

从上表可见24小时血处理组6次共注射猪22头，4头蹄部反应，反应率为13.6%，对照组5次共注射猪13头，2头蹄部反应，反应率为15.4%。攻毒结果血处理组22头，17头保护，保护率77.4%，对照组13头，10保护，保护率77%。

血处理组和对照组对猪的安全性(蹄部反应)和效果(保护率)差异不大。

讨 论

正常猪的血在37℃下对口蹄疫O型鼠化毒不论作用8小时或24小时在乳鼠测毒表现能降低毒价。是否在正常猪的血液里存在着中和口蹄疫病毒的物质值得探索。Anderson报导在正常猪血清中出现对口蹄疫病毒的交叉反应。Bogel等也曾报导在正常猪

血清中发现有一种对热稳定的巨球蛋白能中和O型口蹄疫病毒。

在本试验，正常猪血液处理的鼠毒在乳鼠的表现毒力的降低比较明显。但对猪不论安全性与免疫性与对照组比较无显著的差异。对猪仍然有一定程度的蹄部反应。

1980年12月

本试验得到杜伟贤同志协助，谨致谢。

猪O型口蹄疫鼠化弱毒鸭胚苗 两次注射区域试验

许雨

何君梅

一九七九年猪O型口蹄疫鼠化弱毒鸭胚苗在湖北省黄陂、武昌、浠水、新洲、鄂城五县，八个公社试点注射，进行安全试验和效力试验。初步认为鸭胚苗使用安全，有一定的保护力。在这个基础上，今年元月，进一步选择多年来五号病流行的武昌、黄陂、洪湖、监利四个县，开展大面积两次注射区域试验。接种加强剂量的目的，是要激发第二次免疫应答，以保证获得充分保护。

一、材料及方法：

1. 试验猪：从未注射过五号病疫苗的什交猪为主。

对存栏性猪，除去带仔母猪，重胎母猪，哺乳仔猪，国外纯种猪不注射外（四不打）普遍实行两次注射。第一次使用20% $Al(OH)_3$ 生理盐水稀释的1%鸭胚苗进行注射，十四天后用同样稀释液稀释的10%鸭胚苗进行第二次注射，每头耳根肌注2 ml。