

世界农业
丛刊

兽医译丛

(一)

农业出版社

65
60

兽 医 译 丛

(1)

中国畜牧兽医学学会《中国兽医杂志》编辑部编

农 业 出 版 社

《世界农业》丛刊

兽 医 译 丛 (1)

中国畜牧兽医学会《中国兽医杂志》编辑部编

农业出版社出版 (北京朝内大街130号)

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

787×1092毫米16开本 11印张 241千字

1981年4月第1版 1981年4月北京第1次印刷

印数 1—2,800册

统一书号 16144·2275 定价 1.15 元

前 言

在向农业现代化进军的大好形势下,《兽医译丛》和大家见面了,这是我们兽医工作者久已盼望的又一喜讯。

《兽医译丛》是农业出版社为了适应广大科技人员的需要,计划出版的一套国外农业译丛之一。它主要从国外兽医近期书刊和专业会议等文献中,重点选译和介绍国外兽医科学的新理论、新技术和新成果,以供我国兽医人员参考或借鉴。

本译丛每期按照译文的性质进行归类。第一期计分传染病、寄生虫病、兽医针灸、普通病以及兽医基础及生物药品五类。其中绝大多数文章是近几年发表的,也有少数是七十年代初期的。

编好《兽医译丛》是一件光荣而繁重的工作,希望广大译者和读者,能给以大力支持和帮助,使它更好地发挥作用,为兽医现代化服务。

中国畜牧兽医学会《中国兽医杂志》编辑部

目 录

• 传染病 •

- 禽腺病毒的发病学研究.....Jane K. A. Cook (1)
- 口蹄疫及其预防..... (4)
- 1976 年产蛋量下降症候群
——鸡的一种“新”病—— (16)
- 猪痢疾.....柏 崎 守 (18)
- 猪传染性胃肠炎.....古 内 进 (25)
- 犊牛痢疾轮状病毒感染症.....稻叶右二 (35)

• 寄生虫病 •

- 弓形体病的血清学诊断..... L. Jacobs (44)
- 牛口服氨基甲酸酯类杀虫药——BPMC (2-另-丁基苯基-N-甲基氨基
甲酸酯) 的实验报告.....小西辰雄等 (51)
- 噻嘧啶 (Pyrantel pamoate) 对马蛔虫及圆虫的驱虫效果 真田良典等 (60)
- 马胃蝇及其防治措施.....И. А. АЗИМОВ (65)

• 兽医针灸 •

- 针刺在马体的临床试验..... L. Gideon (67)
- 电针麻醉在狗头、颈部镇痛作用的
阐明及其扩展区域的手术实施.....石崎智等 (73)
- 电针麻醉在狗腹、腰、臀部镇痛作用的
阐明及其扩展区域的手术实施.....石崎智等 (75)
- 介绍兽医针刺麻醉.....木全春生 (77)

• 普通病 •

- 兽医眼科学与比较眼科学的近代进展.....K. N. Gelatt (82)
- 在北海道发生的以体表无毛为主的牛先天性畸形的调查研究.....细川和久等 (97)
- 急腹症 (一) J. Coffman 等 (109)
- 马消化系统疾病..... E. J. Catcott 等 (114)

• 兽医基础及生物药品 •

- 猪个体发育中 T 和 B 淋巴细胞的动态.....И. М. Карпутъ (135)
- 初生驹的适应期..... P. D. Rossdale 等 (139)

禽腺病毒的发病学研究

Jane K. A. Cook

多年来禽腺病毒在鸡病中一直是热烈争论的题目,而且至今仍未解决。Yates 和 Fry (1957) 第一次分离出鸡胚致死孤儿病毒(CELO)以及 Burmester、Sharpless 和 Fontes (1960) 第一次分离出 Gallus 腺病毒样病毒(GAL)以来,在世界各地的病鸡群中或表面上健康的鸡群里,经常可分离出这种病毒。所以经常从病鸡分离出来的病毒,在未被判定为病原之前要谨慎对待。目前至少已报道了 10 种独立的鸡腺病毒血清型(Calnek 和 Cowan, 1974),包括火鸡(Scott 和 McFerran, 1972)和鹅(Csontos, 1967)特有的腺病毒。由于对其他鸡血清型的研究少,所以本文只讨论 CELO 和 GAL 血清型。

一、两种类型的禽腺病毒

1. CELO 病毒

为了使 CELO 病毒对鸡引起人工发病,曾使用多种接种途径进行了多次试验。据报道,CELO 病毒经气管内接种或用气雾接种后,能引起轻度呼吸道感染(Monreal 和 Ahmed, 1963; Lim、Mustaffa-Babjee、Bains 和 Spradbrow, 1973; Winterfield、Fadley 和 Gallina, 1973; Aghakhan 和 Pattison, 1974)。其他工作者也曾报道,经各种途径接种 CELO 病毒后,不能察觉到呼吸道或其他临床症状。接种 CELO 病毒后引起死亡的唯一报道是经脑接种所致(Yates 和 Fry, 1957; Ahmed 和 El Sisi, 1969)。

但是病毒在许多种组织中均可繁殖,除了报道过呼吸道有高的病毒滴度外(Kawamura、Sato、Tsubahara 和 Isogai, 1963),在上皮细胞中还有核内包涵体(Cook, 1968),在肝脏(已经报道过有肝炎)(Rinaldi、Mandelli、Cessi、Valeri 和 Peters, 1974)和肠道中,也是病毒繁殖的重要部位(Clemmer 和 Ichinose, 1968),在肠内容物和粪便中也发现有高浓度的病毒(Kawamura 等, 1963; Clemmer, 1972)。

近来,禽腺病毒(尤其是 CELO 血清型)与室外散养鸡产蛋量的关系问题引起了人们很大的兴趣。给产蛋母鸡通过气管或经饮水口服接种 CELO 病毒人工感染后,据报道(Cook, 1972),产蛋量大约下降 10%,但影响是一过性的。感染后三周内,产蛋量恢复到以前的水平;蛋壳质量也不受影响,蛋的内部质量与对照组亦无出入。Winterfield 等(1973)报道,从一群有蛋壳质量问题(主要是畸形和有隆起的壳)的白来航鸡中,分离出名为印第

• 1976年9月在马尔他举行的第五届欧洲家禽会议上宣读此论文,但未在会议录中刊出

安纳 C (Indiana C) 的 CELO 血清型病毒。产蛋量约下降 3%，以前是 79%。他们分离出的病毒，在小鸡中引起了呼吸障碍，并发现气管炎和肝炎，但著者却没有报道用这个病毒来人工感染产蛋母鸡，以检查它对产蛋量和质量的影响。因此，归罪于 CELO 病毒影响产量问题，目前还没有足够的证据。所以需要更多的做更多的工作，才能证明这个病毒对室外产蛋鸡的危害。

2. GAL 病毒

有关 GAL 病毒发病学的资料更少。Kohn (1962) 经气管接种小鸡并从许多组织和粪便中回收了这种病毒，但他没有观察到任何感染症状。Sharpless 和 Jungherr (1961) 曾报道，把病毒接种到 2 周龄鸡的股骨中后，发生了高达 25% 的死亡率，有许多鸡呈现出肝炎。Mcdougall 和 Peters (1974) 在静脉中接种 GAL 血清型分离物后，观察到了肝炎，但没有报道鸡有任何症状。

二、一日龄鸡或鸡胚接种后的致病力研究

为了获得更多的关于这些病毒致病力的资料，研究了在幼龄期接种的影响 (Cook, 1974)。由于已知腺病毒是在肠道中复制并引起肝炎 (Sharpless 和 Jungherr, 1961)，所以认为，以非呼吸道感染是有可能的，于是选择了腹腔 (IP) 和经口两种途径，用新孵出的雏鸡作感染对象。假若病毒的致病力低，那么小鸡可能更为易感。

在对一日龄无特定病原 (SPF) 鸡 IP 接种 GAL 病毒后，死亡率高达 70%。死亡率的高低与所用的鸡品种而异。死亡发生于接种后 3—7 天之间。带有 GAL 病毒抗体的鸡蛋孵出来的小鸡，在一日龄期攻毒时，死亡率则仅有 10%。

随着年龄的增长，小鸡对 GAL 病毒的抵抗力迅速增强，当接种推迟到 7 天时，只有 3% 的小鸡死亡，10 日龄时接种，无死亡发生。

因为 IP 接种是一种不寻常的感染途径，所以又研究了 GAL 病毒的口服法。经口接种后，死亡率仅为 5%，但体质的下降同病毒经 IP 接种时相似。口服后可以从小鸡的组织中回收病毒，而且观察到腺病毒中和抗体反应。从而看出，经口接种时，GAL 病毒能够对小鸡产生影响，并引起轻微死亡和体重下降。

当检查接种 GAL 病毒后死亡的小鸡时，最常见的特点是肝炎，但也见到肾肿胀、出血及腺胃表面出血等。从接种后 5 天发病鸡的肝组织切片中，发现主要的变化多数在坏死区和一些变性的肝细胞中见有核内包涵体；到接种后 7 天，还可看到许多淋巴细胞增生性病灶。肾组织切片中变化轻得多，最引人注目的变化是从接种后 5 天起可见到淋巴细胞增生性病灶，但不见有包涵体。

当用 CELO 病毒 IP 接种于一日龄小鸡时，结果则大不相同，既无死亡也不发生体重下降。然而，病毒在小鸡的组织中繁殖并从粪便中排出。也观察到中和抗体反应。

除了研究用这两种血清型接种刚出壳的小鸡外，还探讨了接种于鸡胚时的影响。研究结果，两种病毒之间的差别非常明显 (Cook, 1977)。当 17 日龄的胚接种 CELO 病毒时，

60%的胚死亡,而接种稀释液的对照组,死亡率仅为16%,孵化后的7天中小鸡的死亡率相当高(44%)。而用GAL病毒接种于17日龄的胚,死胚率并不高于对照组,但孵出后的死亡率竟高达52%,可见死亡的出现全在7日龄期。因此,不论是胚内或是孵出后立即接种,GAL病毒的作用都非常相似,而CELO病毒则仅在胚内接种时,才有致死的作用。所以,似乎可以下这样的结论:鸡胚对CELO病毒易感,而小鸡则对GAL病毒易感。

三、禽腺病毒在混合感染中的作用

鉴于禽腺病毒无所不在,甚至经口接种之后,GAL血清型也能够在小鸡中引起重复感染,所以应当考虑到这些病毒在混合感染中的作用。

已经证明禽腺病毒的混合感染中,存在着干扰和协同两种作用。Aghakhan、Pattison和Butler(1976)证明在实验条件下,鸡败血性枝原体的S6株和CELO病毒之间的协同现象。

CELO病毒在鸡胚中的存在干扰了新城疫和流感A病毒的繁殖(Ablashi、Chang和Yates, 1965),而在产蛋母鸡中存在却显著地减轻了禽传染性支气管炎(AIB)病毒对产蛋量的影响(Cook, 1972)。也可以使后来接种的AIB病毒的生长速度减缓(Cook, 1973)。

对小鸡进行AIB疫苗接种,现在已成为常规预防措施之一,所以曾探讨预先接种CELO和GAL病毒对AIB病毒感染过程的影响(Cook, 1977)。当用CELO病毒接种于17日龄的鸡胚,对孵出的小鸡攻以AIB病毒时,在双重接种的小鸡中见不到传染性支气管炎的临床症状,从它们的组织中回收不到AIB病毒,也不产生AIB中和抗体。这个发现与Jordan和Nassar(1974)的结果是一致的。然而,当GAL病毒在AIB病毒之前接种时,传染性支气管炎的临床症状则与单独接种AIB病毒的小鸡一样显著。AIB病毒可从接种了两种病毒的小鸡呼吸道中,于接种后10天内回收到,而单独接种AIB病毒的小鸡至少需14天后才能回收到。起初AIB病毒也能够从大多数的其他组织中回收到,但是与单独接种AIB病毒的小鸡比较,就越来越不易回收到了。而在双重接种的小鸡中,只见有轻度的AIB中和抗体反应。

这些结果证明,在上述实验条件下,禽腺病毒能影响小鸡对AIB病毒感染的反应。看来这个禽腺病毒血清型所表现的不同程度的干扰现象,很可能是由于两个病毒不同的复制速度所造成的。

原载〔英〕“World's Poultry Science Journal”

34(1), 38—42, 1978

胡祥璧 译

口蹄疫及其预防

这个课题，是由法国里昂梅里厄研究所兽医总主任，梅里厄法国口蹄疫研究所（简称 IFFA）前所长 C. Mackowiak 博士于 1978 年 5 月访华时，在技术座谈会上讲的。除讲述外，还提供了许多新资料：包括 1977 年新出版的国际生物制品标准化文集第 35 卷——1976 年国际口蹄疫讨论会文集，梅里厄研究所出版的口蹄疫文集三册，还有最近几年里，梅里厄科学家们出版的有关口蹄疫研究报告、疫苗样品、幻灯片等。内容丰富，体现了这个专业课题的现代科技水平。

C. Mackowiak 博士的报告内容包括三个方面：

一、略谈国际口蹄疫疫情、防治和梅里厄研究所的国际技术合作概况。

二、重点介绍 30 年来梅里厄研究所不断研究改进口蹄疫疫苗的生产技术过程，不用动物组织制苗，而采用悬浮细胞培养物生产疫苗，使疫苗的生产方式从实验室阶段发展到大规模工业化生产阶段。

三、制苗技术的经验总结和梅里厄研究所在最近未来研究课题的发展方向。

（一）国际口蹄疫疫情现状

他首先指明：口蹄疫传播极快，对畜牧业造成的危害和招致极大的国民经济损失，是国际间法定传染病之一。

到 1977 年止，全世界仍有 60 多个国家有口蹄疫发生。实验诊断鉴定口蹄疫病毒有七个抗原型（血清型），根据 1976 年英国 Pirbright 口蹄疫世界参考实验室的报告资料，到目前共已鉴定出 61 个血清亚型病毒。

——亚洲一型毒仍旧局限在亚洲大陆，有 3 个亚型。

——南非一、二、三型毒，仍主要存在于非洲大陆，其他地区极少发现，分别各有 6、3、4 个亚型。

——O、A、C 病毒，和它们的许多亚型，则分布于全世界，包括欧洲、亚洲、非洲及拉丁美洲大陆。

A 型毒已有 30 个亚型，

O 型毒已有 10 个亚型，

C 型毒仅有 5 个亚型。

并指出任何国家在疫情发生之初，首先应明确鉴定病源病毒的血清型及其亚型，然后制取特异性疫苗，才能进行有效的防制。

在 Mackowiak 提出的全世界和亚洲口蹄疫疫情分布地图上，中国大陆的四周都有口蹄疫疫情存在，并标明香港曾发现亚洲一型和 O、A、C 型病毒。

（二）欧洲国家口蹄疫的防制效果

口蹄疫虽表现世界性扩散，但欧洲各国，通过 15 年来国际上的密切合作，已控制了口蹄疫的发生。

法国的做法是：每年认真采取强迫性和系统性的疫苗预防接种，同时加强严格的兽医卫生措施，自 1960 年以来，除因进口牲畜、肉类散毒，而偶有散发外，已没有流行疫情。少数散发疫情也可以通过迅速掌握情报，严格卫生措施，屠杀少数病畜，加强注射疫苗等综合防疫措施，而迅速扑灭。

整个西欧国家和法国一样，采取同样的综合防疫措施，获得同样的成功。由于有严格的防疫制度，牲畜经常年注射疫苗，获得牢固而持久的免疫力。从而使口蹄疫在欧洲历史性的流行图完全改观。

现在，全世界每年要使用 20 亿剂量的口蹄疫单价疫苗（灭活疫苗）。这大约需要生产 400 万升疫苗才能满足此需要量，同时又需要生产 800—1000 万升的病毒培养液，才能生产出这么多的疫苗。如此大量的病毒培养液，是用数千升容积的不锈钢发酵罐生产的。这是一种新的生产工艺技术，使得口蹄疫疫苗，已从实验室制造阶段，发展到大规模工业化生产阶段。在整个病毒学领域里，口蹄疫苗是个先驱的范例。

（三）梅里厄研究所的国际技术合作概况

30 年前，梅里厄研究所创建“法国口蹄疫研究所”（简称 IFFA），专门从事口蹄疫疫苗的研究，诊断疫情，制造疫苗等。到现在止，这个研究所已发展成为世界上口蹄疫研究所的先驱者之一（其他国家有：英国的 Pirbright 研究所及 Wellcome 公司和意大利的 Brescia 研究所等）。

据称，目前世界上使用的口蹄疫疫苗的 1/3 量是由里昂的梅里厄及其分所，和在阿根廷、巴西、乌拉圭的分厂制造供应的。此外，他们还以不同的方式和许多国家进行技术合作，例如，和伊朗的 Razi 研究所合作生产疫苗，和苏联合作在莫斯科建厂，采用梅里厄的技术，生产牛用 Frenkel 法舌皮疫苗。还协助印度、伊拉克建立疫苗制造厂等等。

在紧急控制国际疫情方面，有下述事例：如 1962 年、1964 年和 1973 年前后三次分别和伊朗、土耳其合作，迅速控制南非一型，A22 型，和亚洲一型病毒在中东地区的发展和流行，紧急制苗成功地保护了欧洲大陆和中东地区。此外，1975 年和 1977 年又以同样方式派专家小组到菲律宾、摩洛哥、阿尔及利亚，紧急诊断发生自 O、A、C 型病毒疫情，迅速在数月内制取特异性疫苗，及时扑灭疫情。动作迅速是成功的决定因素。

总的来说，梅里厄研究所在欧亚非三个大陆进行较广泛地技术合作，通过诊断，了解全世界的口蹄疫新病毒型的出现，并进行一系列血清学、免疫学研究，根据需要再研制特异

性疫苗。他们强调说，口蹄疫病毒的传布快似喷气机。事实证明没有国际合作，控制或消灭口蹄疫疫情是不容易的。

二

梅里厄研究所的口蹄疫疫苗的研制内容分述如下：

（一）制苗用病毒的生产

随着制苗用病毒抗原需要量的增加，以及不断改进工艺，减低成本，提高质量的要求，总的发展演进是逐渐排除用活牛及小动物（兔）制苗，而改用细胞培养物大量生产病毒。

这主要有：

Frenke——用牛舌皮培养病毒，

IBRS-2——猪肾细胞系单层细胞和转瓶培养法，

IFFA-3——田鼠肾细胞系悬浮细胞发酵罐大量培养法。

现分别介绍如下：

1. 活牛繁殖病毒法

最早由 Waldmann 提出。将病毒接种于牛舌皮内，采取病牛的舌水泡皮制苗，虽可生产出免疫源性优良的病毒抗原，但量少价贵，且病牛散毒危险极大，所以许多国家已摒弃不用。自 1952 年开始，法国也停止用活牛制苗。

近年来，许多国家用仔兔繁殖病毒制苗，虽便于大量生产，但由于灭活病毒组织困难，存在大量外源蛋白，以及重复注苗时动物的反应较大等不利因素，用兔抗原制苗受到限制。

2. Frenkel 法

用牛舌皮培养病毒，最早于 1947 年由荷兰 Frenkel 发明。1950 年以后，梅里厄研究所发展利用 1000 升以上的不锈钢发酵罐进行工业化生产。

法国的经验，主要是做好建立若干中心站，搜集各大屠宰场的新鲜牛舌皮，将采取的牛舌皮立刻保存于 4℃ 盐水中，保持舌上皮细胞的活性，迅速运到制造车间。在搜集后 36—40 小时内迅速剪碎，送入发酵罐，通氧培养，繁殖病毒。

用此法可以生产出价格低廉，免疫源好的病毒抗原，主要用于生产牛用的灭活苗。

目前世界上仍用 Frenkel 法生产病毒的最大实验室，除里昂梅里厄研究所之外，还有拉丁美洲的阿根廷、巴西、乌拉圭及莫斯科。

3. IBRS-2 猪肾细胞系单层培养法

法国自 1960 年开始，用巴西建立的 IBRS-2 猪肾细胞进行扁瓶静置培养和转瓶培养，大量繁殖病毒，可以解决牛舌皮供应不足的困难。但猪肾细胞培养毒，主要用于生产猪用的油剂灭活苗。产苗量较少，尚未达到工业化生产规模。

4. 田鼠肾细胞系的悬浮培养法

1968—1970 年，一些用舌皮培养有困难的西欧国家，发展了工业化生产疫苗的悬浮培养细胞法，这样可以不受细胞“供应动物”的限制，能在大于 2500 升的发酵罐中生产大

量病毒抗原。

但是,发展这种培养技术的前提,一是需要有完善的各种设备,二是要有受过训练的熟练技术工作人员,以及较贵的大量培养基和血清。

法国所用的田鼠肾细胞系有两种:一是英国培育的 BHK-21细胞系的不同克隆系;二是梅里厄研究所自己培养驯化出来的 IFFA-3 田鼠肾悬浮细胞系。

这株细胞是 1967 年美国 Wistar 研究所培育出来的 NIL-2 胚胎田鼠肾单层细胞,减少其培养液中的血清浓度,驯化成悬浮培养的细胞系。

据称其性状比 BHK-21 细胞优越。表现在繁殖力强,增殖快,悬浮培养液中仅需加 2% 小牛血清。用 NaHCO_3 作缓冲系统,培养期中无需调节 pH, 生长周期 2—3 天。现在主要用它生产病毒。

表 1 IFFA-3 细胞系适应于悬浮培养的驯化过程

处 理 方 法	繁 殖 方 法	标 记
起 源 细 胞	单 层	NIL-2
适应于 Eagle's MEM 培养液 + 10% 小牛血清 ——传 16 代	悬 浮	IFFA-2 第 1 代
繁殖于建立悬浮培养细胞种的培养液中, 仍加 10% 小牛血清	悬 浮	IFFA-2 第 9 代
适应于 Eagle's MEM 培养液加 2% 小牛血清	悬 浮	IFFA-3 第 1 代 IFFA-3 第 19 代
繁殖建立 MCS* 细胞种	悬 浮	IFFA-3 第 25 代
用于工业化生产	悬 浮	IFFA-3 第 26—43 代

* MCS = Master Cell Stock (种细胞库)

这株细胞符合 1970 年 7 月美国农业部提出的“兽医疫苗生产用细胞系的选择标准程序”,即所谓“种细胞库制度”(MCS)。

IFFA-3 细胞系具有种的特性,来源于 NIL-2 叙利亚金黄田鼠胚胎的雄性细胞。田鼠细胞的染色体是二倍体, $2n = 44$ 染色体,这株雄性细胞表示高比例数的假二倍体——染色体 38—44 个。还有少数的假四倍体,染色体 78—86 个。已按美国农业部“MCS”标准检验:不含有任何血球吸着因子或潜在病毒,如猪瘟或粘膜病毒,没有污染细菌——霉菌及枝原菌,也没有致瘤性和致癌性。NIL-2 活细胞注射新生田鼠可以生瘤,而 IFFA-3 活细胞接种犊牛和猪都不产生瘤,没有报告过它对田鼠是否致瘤,但是有人报告,不含活细胞的制品对田鼠不生瘤。

[注: (1) 致瘤性,指活细胞在动物注射部位的繁殖能力,因此能逐渐发展成瘤。用接种一定数量活细胞来进行致瘤性检验。

(2) 致癌性,某一因子(指病毒或其他存在于细胞内的细胞颗粒)在被检动物体中产生瘤的能力。将活细胞经反复冻融或超声波裂解后,注射动物进行致癌性试验。]

此外，法国测知 IB-RS-2猪肾单层细胞对实验室动物和初生乳猪，都无致瘤性和致癌性。

梅里厄研究所在前述工作基础上，利用 Frenkel 法牛舌皮培养毒和悬浮细胞培养毒制造牛专用的 $Al(OH)_3$ ——石竹甘灭活苗。

利用猪肾细胞系转瓶培养毒，生产猪专用的油剂灭活苗。

利用静止培养的单层细胞做病毒滴定和研究工作。

(二) 牛用灭活疫苗的生产检验和应用

1. 牛用三价苗的成分比例，均用浓缩的病毒抗原制造牛用三价灭活苗。牛用每剂 5 毫升，先分别制取 O、A、C 各型单价苗，经检验合格后，再等量混合制成最后的三价苗。

表 2 牛用各型单价灭活苗的配制成分

成 分	Frenkel 法	悬 浮 培 养 物
病毒 (每单价剂量)	0.2—0.25 克牛舌皮	3 毫升培养物上清液
$Al(OH)_3$ 胶	25%	25%
灭活剂 (福尔马林或缩水甘油醛)	0.05 或 0.01%	0.05 或 0.01%
石竹甘溶液	0.1%	0.1%

2. 按 Frenkel 法牛舌皮培养毒制苗

从牛舌皮搜集中心站搜集的牛舌皮碎片，必须保存在 $4^{\circ}C$ ，维持活性的生理溶液中，尽快运往制造厂，在 36—40 小时内用于制苗。在 100—1000 升的不锈钢发酵罐内进行病毒培养。用经 Baker 改变的 Frenkel 培养液，按适当比例加进新鲜牛舌皮碎片。在 $37^{\circ}C$ 下连续通进氧气搅拌培养。随病毒型的不同，培养 18—24 小时，收获病毒上清液，经过离心、滤过，并检验病毒液的物理化学及生物学特性合格后，再加入 $Al(OH)_3$ 胶，浓缩病毒液进行沉淀，用于制造单价灭活苗。

$Al(OH)_3$ 胶的干物质量 (Al_2O_3) 是 1.6—2.0 %。胶态很好，和细菌性产品统一应用，用病毒吸附法测补结价或用中性红测吸附性，检验铝胶质量。

制造疫苗：将病毒液、灭活剂、石竹甘和 $Al(OH)_3$ 按前述成分比例，混入不锈钢灭活罐中，保持 $30^{\circ}C$ 。随不同病毒型的需要，进行搅拌、灭活 36—40 小时，即成疫苗。然后迅速冷却到 $4^{\circ}C$ ，再分装于贮存器内，保存于 $4^{\circ}C$ 等待检验。检验合格的各型毒单价苗，按等量混合制成三价苗。在三价苗的每牛剂量 5 毫升中，含不同型单价苗各 1.66 毫升。

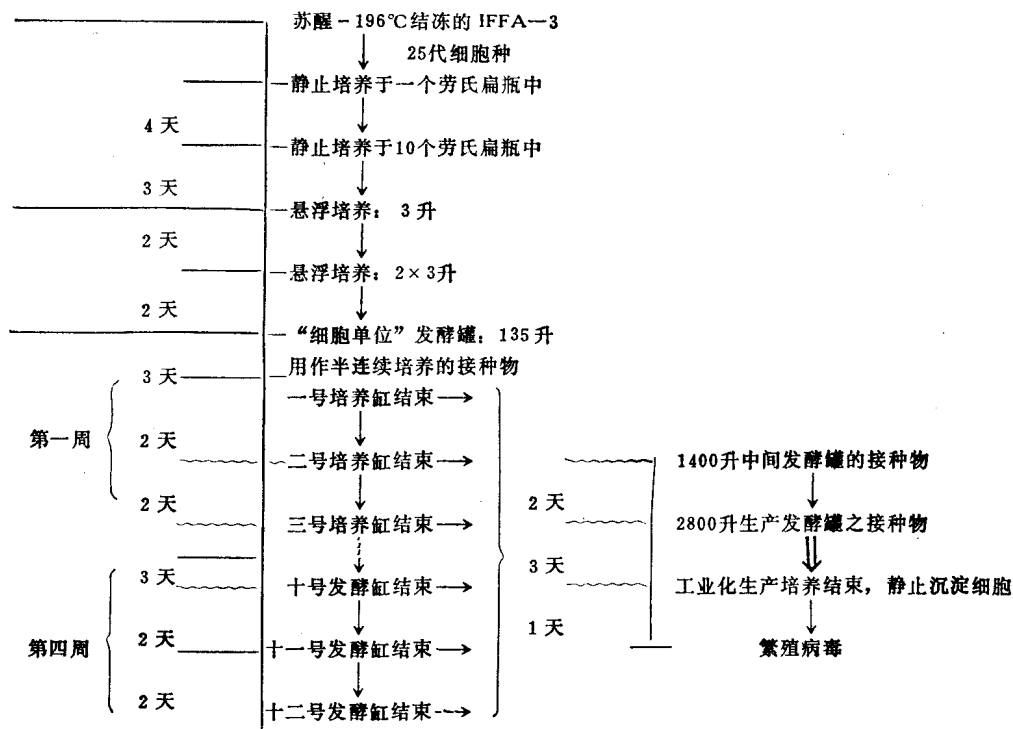
3. 用 IFFA-3 悬浮培养细胞病毒制苗

检验合格的 IFFA-3/25 代 /MCS 细胞种，分装成小安瓶，用下述培养液*置于 $-196^{\circ}C$ 液氮缸中保存。制苗前，先在大发酵罐中逐级扩大繁殖，再备制细胞适应病毒，然后才能大量繁殖病毒抗原制苗。

* 冰冻保存 IFFA-3 细胞的培养基：
 Eagle BME 10× 液液 100份
 抗菌素 2份
 1% 酵母浸汁 100份

小牛血清 20份
 $NaHCO_3$ (5.6%) 30份
 双蒸水加到 1000份
 $pH = 6.8$

(1) 工业化大量繁殖 IFFA-3 悬浮细胞的方法及程序如下:



悬浮培养 IFFA-3 细胞的培养基用 Eagle's BME 加 2% 小牛血清。用 5.6% NaHCO_3 调 pH 为 7.2 进行培养, 繁殖期中可不再调正 pH。最适宜的培养温度为 35.5°C , 通气方式仅用 95% 空气加 4% CO_2 的滤过混合气做培养基液面的通气, 而培养液内不予通气。

细胞的繁殖周期为 2—3 天。接种细胞的浓度, 在培养 2 天时用 30 万细胞/每毫升; 培养 3 天时用 18 万细胞/每毫升。每批细胞培养到末期, 细胞浓度可达到 200 万/每毫升。

繁殖完成的细胞, 降温到 4°C , 静置沉淀一天后, 经灭菌检验及细胞活性检验合格后, 即可用于接种病毒, 用于制苗。

(2) 细胞适应毒的制备:

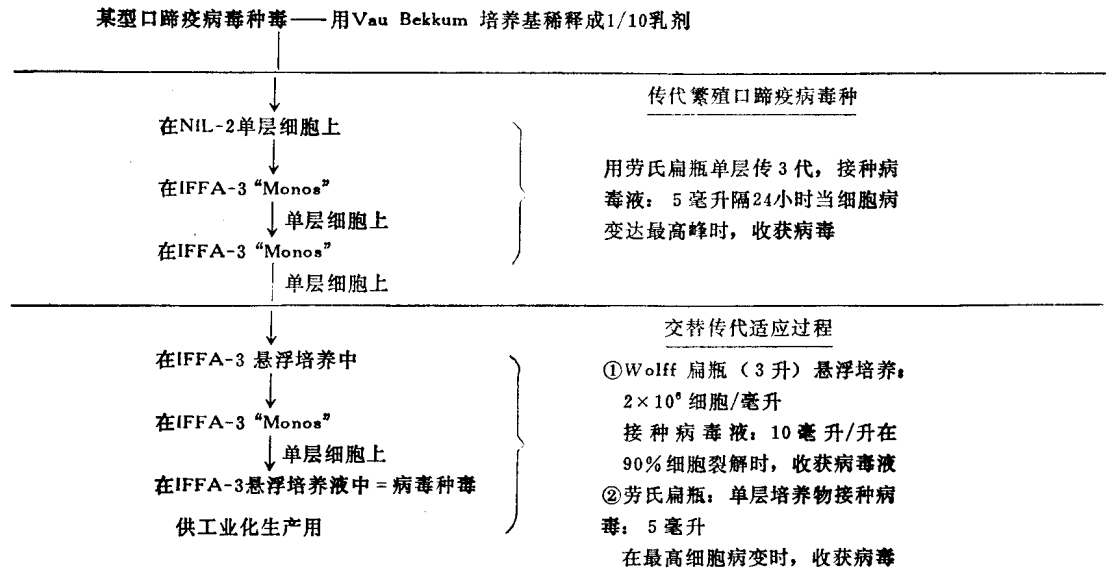
制苗用的各型优良种毒, 必须分别先行适应于 IFFA-3 悬浮细胞, 使其成为适应细胞毒, 然后才可大量繁殖用于制苗。

细胞适应毒的培育和工业化大量繁殖制苗用的各型病毒, 均在特殊设备和严格保证无菌及无外源病毒污染的条件下进行。

培育细胞适应毒需要经过 NIL-2 单层细胞传代和 IFFA-3 “Monos” 单层细胞传代以及 IFFA-3 悬浮细胞和 IFFA-3 “Monos” 单层细胞交替传代的逐渐适应过程如下。

培养细胞适应病毒时, 所用的培养基种类: NIL-2 的劳氏扁瓶单层培养, 用 Stoker 培养基。而用 IFFA-3 细胞做劳氏扁瓶单层培养和 Wolff 瓶等做悬浮培养时, 则均用 Van Bekkum 培养基。其成分配法如下页表。

制苗用细胞适应病毒的程序



成 分	每 1000 毫升重量	成 分	每 1000 毫升重量
蛋 白 胨	3000毫克	MgCl ₂ ·6H ₂ O	95毫克
NaCl	7480毫克	CaCl ₂ ·2H ₂ O	238毫克
KCl	190毫克	乳蛋白水解物	4000毫克
葡 萄 糖	2068毫克	NaHCO ₃	1680毫克
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	47.5毫克	加双蒸水剂	1000毫升
			pH = 7.40

（3）工业化生产大量病毒——用于制造疫苗：

按上节在4℃下沉淀的IFFA-3细胞，弃去上清液，换加繁殖病毒用的Van Bekkum培养基于沉淀细胞中，使最后的细胞浓度仍为200万/毫升。先将细胞搅拌悬浮，升温到37℃，然后接种不同型的细胞适应毒。培养一定时间，在所有细胞全被裂解时，停止病毒繁殖，迅速将病毒液降温到4℃，在搅拌状况下，加进氯仿，再经过离心、滤过，放置4℃保存。待检验合格用于制苗。

悬浮细胞病毒的制苗方法完全和Frenkel舌皮培养毒的制苗方法相同。

4. 牛用Al(OH)₃灭活苗的检验

为了确保疫苗品质，法国规定，在制苗过程中和最后的产品，要进行安全无害性和效力检验。此外，除梅里厄研究所生产部门自己检验单价苗和三价苗外，法国国家检验所还要从每批产品中取样进行检定。

各种检验的要求和标准如下：

(1) 每批疫苗生产过程的检验, 包括上百道工序, 例如检查制造培养基的各种化学药剂、检查细胞系和病毒培养物的理化及生物学特性 (温度、pH等参性、滴度等等), 最后用免疫牛攻击强毒法, 检验成品疫苗的效价。

(2) 梅里厄研究所根据多年的经验, 制定了自己的检验标准。这些标准符合 1975 年第十四次口蹄疫会后, 由巴黎国际兽疫局(OIE)提出的推荐书, 并得到欧洲药典和生物制品国际标准化委员会 1976 年在里昂开会的肯定。这些推荐是:

①牛专用口蹄疫疫苗的效价, 必须用牛评定。除牛以外其它动物的检验, 仅能做为辅助技术。

②疫苗的效价, 必须用充分易感的牛来检验, 得到的每一批单价苗, 用最低保护率来表示。疫苗效检牛须经舌部皮内攻击强毒, 蹄部不应出现任何继发性损害, 才认为获得保护。

(3) 认为疫苗效检牛, 抵抗强毒攻击保护率不低于 70% 的牛符合推荐标准, 这个标准相当于梅里厄研究所自定的平均观察保护率的 87%。实际上真正在野外现场的保护率接近 100 %。因此, 国际兽疫局和欧洲药典已经决定, 为了能达到这样保护百分率, 平均观察的牛效价 (Bovine potency 或法文 Puissance borine) (简称 Bp 或 Pb) 必须等于 3 (Bp3 或 Pb3)。

(4) 梅里厄研究所的具体效检方法是: 用不含 Al(OH)₃ 佐剂的中性稀释液, 将样品疫苗稀释成不同稀释度, 每一稀释度免疫一组易感牛, 注苗后 21 天, 效检牛经舌部皮内攻击 10000 个 LD₅₀ 量某型口蹄疫强毒。这样可以计算出每一剂量单价疫苗中, 含有的对牛的 50 % 保护剂量 (DP₅₀), 亦即是疫苗的牛效价 (Bp 值或 Pb 值)。经过许多试验已经证明, Bp 值或 Pb 值同保护率是符合的。

例如, 疫苗的最低保证 Pb 值 = 1.65 时, 即可符合国际兽疫局推荐的不低于 70 % 的最低保护率。换算法详见下表:

口蹄疫疫苗的Pb值 (不加佐剂稀释疫苗) 和PD₅₀值 (加佐剂稀释疫苗)
的换算表 (表示相同的保护性)

最低保护百分数	最低保证值		平均观察值 **	
	PD ₅₀	Pb	PD ₅₀	Pb
42	0.60	0.83	6.0	1.79
50	1.00	1.00	10.00	2.16
70*	3.70	1.65	37.00	3.60
85	13.00	2.70	130.00	5.80
90	27.00	3.40	270.00	7.30
95	65.00	4.80	650.00	10.40
98	180.0	7.00	1800.00	15.10

* 国际兽疫局的推荐标准

** 平均观察值是由最低保护值 × 极限因子平均 fL 值得来的
对 PD₅₀ 系统的 fL 值 = 10.00
对 Pb 系统的 fL 值 = 2.16

(5) 疫苗也可以用豚鼠测定 50% 保护剂量 (DPG_{50})。还可利用血清中和试验, 测知注苗动物血清中的抗体浓度, 但这些技术仅作为辅助用。

5. 牛用灭活疫苗的免疫期和牛的免疫程序

牛在注射疫苗后的第 7—10 天, 可以测出免疫应答, 到第 3—4 周时达到高峰。随后的演变, 随所用疫苗的种类、质量、牛的年龄和健康情况的不同而有不同的变化。

用中和试验法证明: 五月龄的犊牛, 注射疫苗后的血清中和抗体的消失情况比 24—36 月龄成年牛注苗后的抗体消失快得多。

不同日龄的牛注射疫苗后 21 天攻毒测其保护力, 亦得到同样的结果。证明牛必须采取第二次加强注射疫苗的方法, 才能确保其抗病力。

因此, 总结得出对牛的免疫程序如下:

(1) 6 个月龄以上的牛, 必须于第一次注苗后 3—4 月, 再加强注射疫苗一次, 然后每年注射疫苗一次。

(2) 6 个月以下的犊牛第一次注苗后, 必须按每 2—3 月的间隔加强注射疫苗二次, 然后每年注射疫苗一次。

法国按此免疫程序, 实行对牛的强迫性和普遍性疫苗注射, 已经控制口蹄疫的发生。

(三) 猪专用口蹄疫疫苗的生产检验和应用

牛用的 Frenkel 疫苗, 一般对猪的效力较差。据称, 在野外使用尚有一定效力, 但维持时间很短, 不能产生预防性效果。所以必须创造猪专用的口蹄疫灭活苗。

猪比牛对口蹄疫病毒更敏感。梅里厄研究所在 15 年前开始研究猪用疫苗, 最近 5 年来, 已研制生产高效价的猪用油佐剂灭活苗, 其特点是:

(1) 将猪源口蹄疫强毒, 用 IBRS-2 猪肾细胞系繁殖适应后, 采取转瓶培养细胞法繁殖病毒, 用于制苗。

(2) 病毒的灭活剂是缩水甘油醛 (GDA)。

(3) 灭活抗原加入油佐剂, 用 Arlacel A 作乳化剂加入矿物油制成乳化稳定的油包水分散相的灭活苗。

1. 猪肾细胞适应毒的培育

取 -196°C 液态氮中结冻保存的 IBRS-2 猪肾细胞种, 经劳氏扁瓶静止培养, 经细胞单层传代, 扩大细胞量, 再接种转瓶培养, 一般 3—4 天长成细胞片, 即可接种病毒。

采用已经适应于猪肾细胞系的细胞毒制造疫苗。转瓶培养应换新鲜培养液后, 才接种稀释毒, 繁殖制苗。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 小时, 待细胞出现 90% 病变后, 收获病毒液。

先将病毒液冷却至 4 $^{\circ}\text{C}$, 通过搅拌, 加入氯仿, 再离心滤过, 备用制苗。

2. 配制猪用单价苗和多价苗

每剂单价疫苗注猪剂量的配制标准是 1 毫升, 其中应含有病毒液 0.5 毫升。待生产培养病毒液检验合格后, 才可用于配苗。

制苗时, 将病毒液、灭活剂, 混合于不锈钢的灭活罐中, 搅拌升温保持 25 $^{\circ}\text{C}$, 随病毒型不同, 灭活 10—20 小时。然后将已灭活的病毒液降温至 4 $^{\circ}\text{C}$, 加入油质佐剂, 搅匀后即