

编号: 0152

内 部

科学技术成果报告

猪丹毒弱毒菌种G4T(10)的研究

科学技术文献出版社

刊登国内、外广告启事

我社出版的科技刊物，学科较全，专业较广。为给国内、外各厂矿、企业、科研单位、大专院校等刊登广告提供方便，决定从即日起开辟广告栏，欢迎选用。

有关刊登广告的具体手续、价目及刊物，详见我社的“承办国内广告业务暂行办法”及“承办国外广告业务暂行办法”。此项业务请直接与我社广告组联系，统一办理。

(社址：北京和平街北口 电话：46局4504)

科学技术文献出版社

一九八〇年四月十日

科学技术成果报告

猪丹毒弱毒菌种G4T(10)的研究

(内部发行)

编辑者：中国科学技术情报研究所

出版者：科学技术文献出版社

印刷者：中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本：787×1092¹/₁₆。印张：1.75 字数：46.4千字

1980年6月北京第一版第一次印刷

印数：1—2,120册

科技新书目：163—41

统一书号：14176·43 定价：0.30元

5404:0152

目 录

一、前言	(1)
二、猪丹毒弱毒菌株G4T(10)的生长特性观察	(1)
三、猪丹毒弱毒菌株G4T(10)的安全性试验	(6)
四、猪丹毒弱毒菌株G4T(10)的免疫原性试验	(9)
五、猪丹毒弱毒菌株G4T(10)稳定性试验	(15)
六、G4T(10)猪丹毒弱毒菌苗区域试验	(18)
七、用猪丹毒弱毒菌株G4T(10)试生产联苗小结	(22)
八、G4T(10)猪丹毒弱毒菌苗制造及检验试行规程	(26)
九、附记	(28)
参考文献	(28)

猪丹毒弱毒菌种G4T(10)的研究

江苏省农科院畜牧兽医研究所

农业部南京兽医生物制品厂

一、前 言

随着养猪生产的不断发展,防治猪传染病的发生显得更为重要。猪丹毒病是猪的较常见的传染病,对猪的健康威胁很大,控制猪丹毒病的发生是保证养猪业较快发展的一项必不可少的措施。以前预防猪丹毒病的菌苗,曾使用过氢氧化铝甲醛苗,但由于制造这种菌苗需要较多的原材料,产品的成本较高,注射的剂量较大,使用不方便。因此,常出现防疫密度不高情况,这对严密控制猪丹毒病的发生,产生不利的影响。广大兽医与社员群众迫切要求培育成使用方便,安全有效的弱毒菌苗,以供预防注射之用。我们过去曾培育过几个猪丹毒弱毒菌株,在农村进行了区域试验,注射猪数有的达20万头以上,但经过多次实践,有的菌株免疫原性较好,注射猪后反应率却较高,有的菌株安全性较好,但免疫原性又不够满意,这些菌株都不能满足当前生产上对菌苗质量的要求。为此,我们从1972年开始,用多种细菌诱变方法,筛选了几个菌株,其中以采用哈尔滨兽医研究所的G370菌株,通过0.01%吡啶黄血琼脂斜面传40代,又经0.04%吡啶黄血琼脂斜面传10代诱变的菌株(称为G4T(10)),经实验室的多次试验及较大规模的区域试验,证明这个菌株的毒力较弱,抗原性稳定。免疫原性较好,免疫期较长,是一个比较好的猪丹毒弱毒菌株,现将本菌株的一系列试验结果写成报告,并以此作为我们谨向建国三十周年的献礼!

为了叙述上的方便,我们将各个试验项目分别写成报告,内容包括:猪丹毒弱毒菌株G4T(10)的生长特性观察、安全性试验、免疫原性试验、稳定性试验、试生产菌苗小结、区域试验以及菌苗制造的规程草案等七篇报告。由于水平所限,对试验数据的分析,文字的阐述,难免有不少欠妥之处,请批评指正。

二、猪丹毒弱毒菌株G4T(10)的生长特性观察

为了掌握猪丹毒弱毒菌株G4T(10)的各种特性,并为本菌株的鉴定提供依据,我们将G4T(10)与哈兽研所G370的原始强毒菌株C43—5对比,进行了菌体与菌落的形态观察,生长与生化特性试验,并作了菌株血清型的鉴定工作,现将试验结果报告于下:

(一) 试验材料

1. 菌株:猪丹毒弱毒菌株G4T(10)及原始强毒菌株C43—5
2. 培养基。

(1) 液体培养基:

马丁肉汤:制备方法参考《兽医生物药品制造及检验规程》1973年修订本,和猪丹毒病。

汤的配方是1000毫升水中加猪胃350克。

肉肝胃膜消化汤：制法见附录。

(2) 固体培养基：

马丁琼脂平板：马丁肉汤1000毫升中加琼脂22克，矫正至pH7.6~7.8，倒入平皿前加牛血清4%，裂解羊血0.1%。明胶培养基：1000毫升蒸馏水中加入蛋白胨5克，牛肉浸膏3克，明胶120克，矫正至pH7.6~7.8，分装试管或倒入平皿。

(3) 糖发酵管培养基：1000毫升蒸馏水中含蛋白胨10克，牛肉浸膏3克，氯化钠5克，酚红0.02克，pH矫正至7.8。每管分装4.5毫升，消毒后分别加入10%浓度的各种不同糖类0.5毫升，使最后含糖浓度为1%。

(4) 其他生化试验如甲基红试验，V—P二氏试验，硝酸盐还原试验，靛基质产生试验及硫化氢试验等的培养基及试剂，按常规方法配制。

(5) 鉴定血清型用的A型，B型标准血清系农业部兽医药品监察所提供。

(二) 试验方法

1. 将G4T(10)及C43—5分别接种于马丁肉汤及肉肝胃膜消化汤试管，在36℃温箱培养24小时，观察细菌在液体培养基中的生长情况。

2. 将二个菌株的液体培养物涂于玻片上，用革兰氏染色法染色，在光学显微镜下观察菌体形态。

3. 将二个菌株的液体培养物稀释，接种琼脂平板及明胶平板，前者放36℃，后者放18℃温箱，分别培养观察2天及5天，观察其菌落形态有否差异。

4. 用接种针分别沾取二个菌株的菌苔，在盛有明胶的试管中作穿刺，在18℃温箱培养，观察其生长情况。

5. 将二个菌株的菌液分别接种于不同种类的糖发酵管，在36℃温箱培养，观察7天后判定其结果。接种M.R.，V—P，硝酸盐还原试验，靛基质产生试验，硫化氢试验等几种培养基，培养于36℃温箱，观察4天后判定其结果。

6. 将二个菌株分别培养，参照Dedié的方法，用盐酸溶解抗原，以标准血清进行猪丹毒菌株的血清型鉴定。

7. 将二个菌株的肉肝胃膜消化汤24小时培养物，请中国科学院上海实验生物研究所电镜组制超薄切片并进行电镜照相。

(三) 试验结果

1. 在液体培养基的生长情况：

将G4T(10)接种马丁肉汤管，培养24小时，菌液轻微浑浊，摇动试管，菌液呈云雾状。在肉肝胃膜消化汤中培养则菌液较浑浊，摇动试管时可看到较浓的云雾状，底部有沉淀。C43—5在这二种培养基中的生长情况与G4T(10)无明显差异。

2. 菌体形态：

染色，呈革兰氏阳性杆菌，二个菌株在大小，形态上似无明显差异，但G4T(10)有少量几个菌连在一起的短链，而C43—5则基本上是单个或二个菌连在一起。

3. 在马丁琼脂平板（加血清及裂解血）上的菌落形态：

培养24小时，G4T(10)菌落呈乳白色稍带兰灰的圆菌落，用测微计测量，菌落直径为0.75~0.92毫米。18倍扩大镜检查，见菌落不太圆整，边缘呈不规则的波状，菌落表面有浅而细的桔皮样皱纹，菌落一般较平坦，但中心稍凸起，凸起的部分色较黄，凸起部分的周

围稍凹陷，在菌落中心有粗细不一致，数量不等的棕褐色颗粒，有的无颗粒。C43—5 亦为乳白色稍带兰灰的圆菌落，直径0.625~0.9毫米。18倍扩大镜检查，菌落较G4T(10)圆整，从边缘开始菌落即隆起，在自然光下，菌落颜色较G4T(10)黄而均匀，菌落表面较G4T(10)光滑细致，中心有的无颗粒，有的也有大小、数量不一的棕褐色颗粒（见照片1.2）。

4. 在明胶培养基穿刺培养的生长情况：

将G4T(10)在明胶试管穿刺放18℃温箱培养3天，穿刺线上可以看到有少量生长，培养5天则可看到沿穿刺线呈乳白色稍带黄的生长线，用10倍扩大镜检查，见穿刺线上有很密很短的毛从中轴向水平方向长出，培养时间再延长，则有的试管从穿刺生长线向斜上方长出少量较长的树枝状分枝。C43—5培养3天也有少量生长，培养5天，沿穿刺线从乳白稍带黄色的中轴向周围方向长出细匀的绒毛状菌丝，肉眼观察，形态象试管刷状，但用10倍扩大镜检查时，由于穿刺线周围长出的菌丝很细，所以试管刷的轮廓反而看不清楚，只能看到由很细颗粒组成的穿刺生长线。

5. 明胶平板上的菌落形态：

我们先后曾试用过四个厂生产的明胶，接种猪丹毒菌液后的培养结果证明，上海明胶厂的化学纯的明胶质量最好，培养基清朗，猪丹毒菌的菌落生长也较好，上海化学试剂采购供应站的生化明胶及青岛明胶厂的化学纯明胶次之，北京化工厂的化学纯明胶，猪丹毒菌的菌落生长最差。现将上海明胶厂的化学纯明胶制备的平板上的猪丹毒菌的菌落形态叙述如下：

G4T(10)：在培养后3天，肉眼非常仔细地观察可以看到极小的乳白色针尖状的菌落，如果不是很注意的话，还以为没有生长。用测微计测量，菌落直径为0.2~0.25毫米。10倍或18倍扩大镜检查，可以看到大部分是从中心向四周长出的小假根状菌落，有的是淡乳白色较透明的圆形菌落或从圆菌落向一边或四周长出数量不等短细的菌丝，培养5天，菌落直径0.4~0.75毫米，基本上全是圆的树状菌落。在树状菌落的周围，有少量能长出1至数根较粗的绳索状扭曲的长菌丝，有的在绳索状长菌丝上又有较细较短的分枝，有的在树状菌落的一边或四周又长出很多细而密的菌丝。曾对G4T(10)在明胶平板上的不同形态菌落进行过统计，在587个菌落中，树状菌落为497个，占84.67%，在树状菌落的周围长出1至数根粗绳索状长菌丝的有65个，占11.07%，在树状菌落的一边或四周长出很细的菌丝的有25个，占4.26%（见照片3、4、5、7、8）。

C43—5，在明胶平板上培养3天，肉眼可以看到很薄的淡乳白色云絮状圆菌落，直径1~1.5毫米，10倍或18倍扩大镜检查，看不清楚其中的结构，培养5天，云絮状菌落增厚，色较3天时稍白，菌落直径增大至4~6毫米，扩大镜检查，仍无法看清其结构，只能见到一片模糊的阴影。在上海生化明胶平板上，C43—5菌落的菌丝增粗，因而18倍扩大镜检查可以看到分布比较稀疏的菌丝（见照片6）。

6. 生化特性：

曾将G4T(10)及C43—5分别接种葡萄糖、半乳糖、果糖、乳糖、甘露糖、阿拉伯胶糖、木糖、鼠李糖、麦芽糖、蔗糖、蕈糖、棉实糖、糊精、淀粉、菊糖、水杨素、甘油、侧金盞花醇、甘露醇、山梨醇、卫矛醇、肌醇等22种糖发酵培养基，结果：葡萄糖、半乳糖、果糖、乳糖培养24小时产酸不产气，甘露糖4天才变酸，其余观察7天，既不产酸也不产气。甲基红试验、V—P二氏试验、硝酸盐还原试验、靛基质试验等均为阴性。硫化氢试验阳性。结果证明：G4T(10)弱毒与C43—5强毒二个菌株在生化特性上未发现有明显差异。

7. 菌株血清型鉴定：

将二个菌株分别提取的抗原与A型、B型标准血清进行试验,证明:原始菌株C43—5为B型,而G4T(10)则变为A型。

8. 电镜照相观察:

将二个菌株的电镜照片(15000倍)再放大3倍,即45000倍进行观察,未发现G4T(10)与C43—5有什么明显差异,见电镜照片9、10。

(四) 讨论与结语

根据试验结果,猪丹毒弱毒菌株G4T(10)与原始的强毒菌株C43—5的主要差异表现如下:

1. G4T(10)在明胶培养基穿刺培养后呈乳白色带黄的短毛生长线,而C43—5则呈细匀的试管刷状生长。

2. 在明胶平板上,G4T(10)大部分呈乳白色树状菌落,少数在此菌落外能长出1至数根较粗绳索状扭曲的长菌丝,有的又有细的分枝,极少数在此菌落的一边或四周长出浓密的细的菌丝。C43—5为较大的淡乳白色薄云絮状菌落。

3. 在含血清、裂解血的马丁琼脂平板上,G4T(10)菌落乳白稍带兰灰色,边缘较平而中心稍隆起,18倍扩大镜检查,表面有浅而细的桔皮样皱纹,中心有棕褐色颗粒,有的无颗粒。C43—5菌落色相似。18倍扩大镜检查,从边缘开始菌落即隆起,在自然光下用扩大镜观察,菌落较G4T(10)稍黄,表面较光滑细致,颗粒情况相似。

4. 原始强毒菌株C43—5的血清型属B型,而G4T(10)弱毒菌株则变为A型。

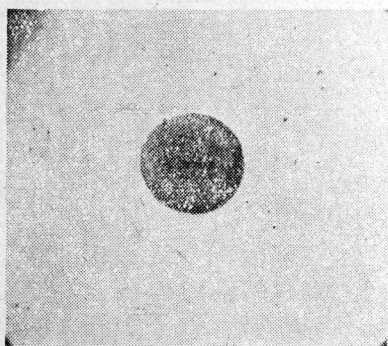
其他在液体培养、生化特性、菌落大小及电镜照片观察等,二个菌株之间未发现明显差异。

附录一,肉肝胃膜消化汤制造方法

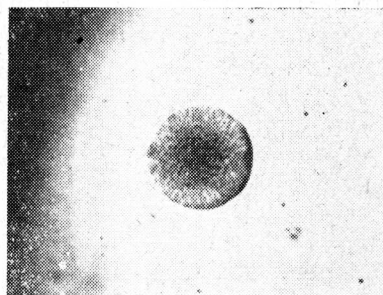
1. 成份(原材料要求新鲜)

黄牛肉	1000克
牛、羊肝或猪肝	500—750克
猪胃粘膜	1000克
常水	10000毫升
盐酸(化学纯)	110毫升

2. 取剔去脂肪后绞碎的肉、肝、胃膜,置于预热至60~65℃的常水中,混匀后(此时温度应在50~55℃)加入盐酸。



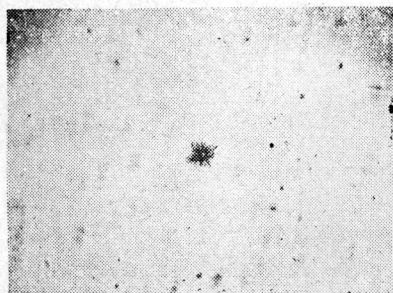
照片1: C43—5在琼脂平板上的
菌落形态(培养2天)



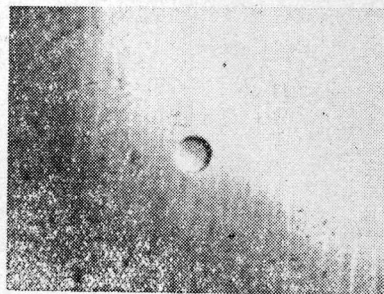
照片2: G4T(10)在琼脂平板上的
菌落形态(培养2天)

3. 将上述混匀的肉肝胃膜混合液置于50~55℃恒温条件下, 消化20~24小时, 消化期间, 定时搅拌, 消化完成后除去上浮脂肪, 然后用绒布滤过。

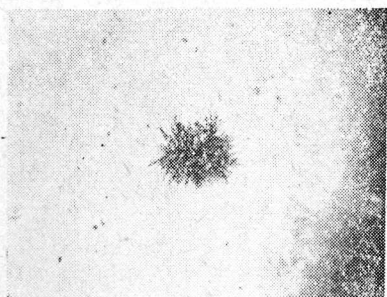
4. 全部残渣装入布袋与上述滤液同时放入煮锅内, 徐徐加温至65~75℃, 用氢氧化钠矫正pH至7.8, 煮沸半小时, 冷却、沉淀、滤过、分装后以10磅气压(116℃)消毒40分钟, 最终pH应为7.6~8.0。



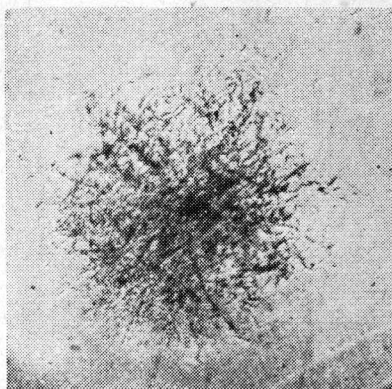
照片3: G4T(10)在明胶(上海, 化学纯)平板上菌落形态(培养3天)



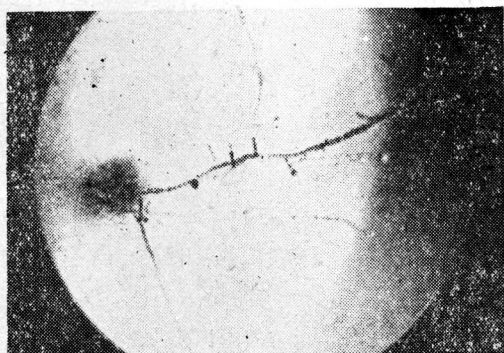
照片4: G4T(10)在明胶(上海, 化学纯)平板上菌落形态(培养3天)



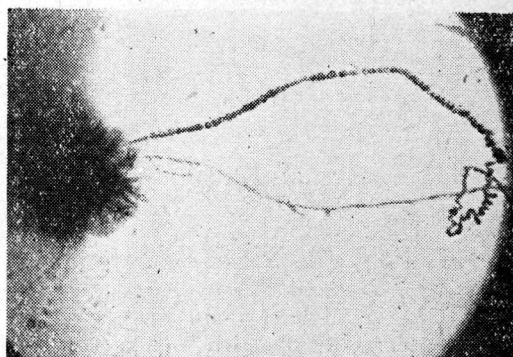
照片5: G4T(10)在明胶(上海, 化学纯)平板上菌落形态(培养5天)



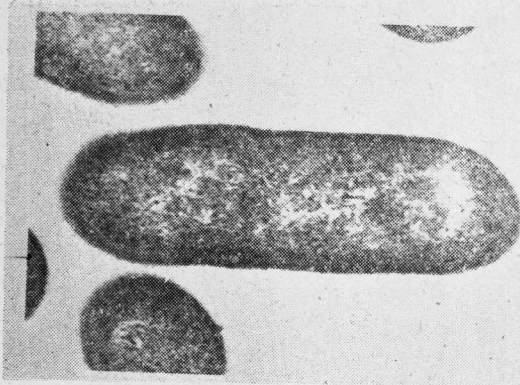
照片6: C43-5在明胶(上海, 生化)平板上菌落形态(培养3天)



照片7: G4T(10)在明胶(上海, 化学纯)平板上菌落形态(培养5天)

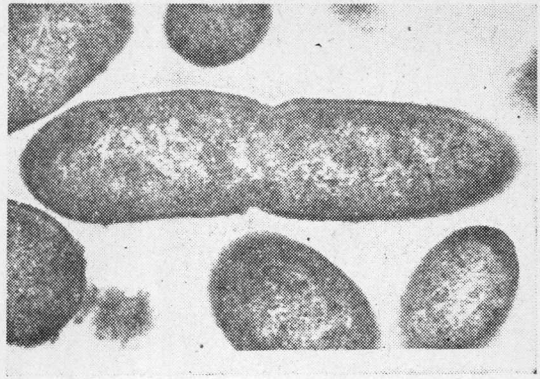


照片8: G4T(10)在明胶(上海, 化学纯)平板上菌落形态(培养5天)



电镜照片 9: G4T(10)

核质开始分裂, 细胞中部下缘的细胞壁与胞膜已开始向内凹陷 (放大45000倍)



电镜照片10: C43—5

核质与细胞质已分裂为二部分, 细胞中部两侧的细胞壁与胞膜已明显地向内凹陷, 菌体变长, 细菌正处在分裂过程中 (放大45000倍)

三、猪丹毒弱毒菌株 G4T(10)的安全性试验

一九七四年农业部兽医药品监察所组织有关兽药厂及科研单位, 对四个猪丹毒弱毒菌株进行了筛选试验, 在试验中发现G4T(10)菌株免疫原性比其他三个菌株好, 但在区域试验时出现反应率较高, 仍不够理想, 因此当时被列为后备菌株。近二年来我们对该菌株继续培育, 并经过大量试验, 选育了猪丹毒弱毒菌株 G4T(10), 现将本菌株对小白鼠和猪的安全性试验, 以及对家鸽的毒力试验等结果报告如下。

(一) 试验材料和方法

1. 试验材料:

(1) 菌苗: 猪丹毒弱毒菌株G4T(10)单苗, 猪瘟、猪丹毒二联苗, 猪瘟、猪丹毒、猪肺疫三联苗 (以下简称单苗、二联苗、三联苗)。

(2) 试验动物: 小白鼠体重17~22克, 健康猪3~8月龄, 新淮猪杂交种, 成年家鸽。

(3) 培养基: 肉肝胃膜消化汤。

(4) 稀释液: 20%氢氧化铝生理盐水, 马丁肉汤。

2. 试验方法:

(1) 猪丹毒弱毒菌株G4T(10)对小白鼠的安全性试验: 将G4T(10)单苗、二联苗或三联苗, 用20%氢氧化铝生理盐水或马丁肉汤稀释, 皮下接种小白鼠, 观察二周。

安检剂量一般采用10亿菌, 为了测定最大的安全剂量, 我们还将菌液离心浓缩后用50亿和100亿菌两个剂量。

(2) 猪丹毒弱毒菌株G4T(10)对猪的安全性试验: 我们采用皮下注射单苗 500 亿个活菌或二联苗、三联苗30头份 (有8头猪注射二联苗20头份), 注射后观察7~14天, 主要观察试验猪的食欲, 体温及精神有无变化。

另外我们还采用皮下注射G4T(10)培养物, 每头猪背部两侧注射6个点, 每点0.02毫升, 含4555万个活菌, 测注射部皮肤的反应。

(3) 猪丹毒弱毒菌株G4T(10)对家鸽的安全性试验: 将G4T(10)培养物用马丁肉汤稀

释, 分不同剂量肌肉注射成年家鸽, 注射后观察两周, 记录其反应与死亡数。

(二) 试验结果

1. G4T(10)对小白鼠的安全性: G4T(10)单苗, 二联苗或三联苗皮下接种小白鼠, 每只10亿菌(有七组接种二联苗一头份), 共进行37个批组的试验, 存活率为91.9%(存活数273/297)。

在37个批组中, 注射G4T(10)单苗的共24个批组, 其存活率为90.7%(存活数165/182); 注射二联苗的12个批组, 存活率93.3%(存活数98/105); 注射三联苗的只有一个批组, 存活率为100%(存活数10/10)。

在接种小白鼠时我们用了两种稀释液, 用20%氢氧化铝生理盐水稀释的21个批组, 存活率为93.51%(存活数173/185); 用马丁肉汤稀释或不稀释的培养物共16个批组, 存活率为89.3%(存活数100/112)。

把37个批组的存活率加以分析, 存活率100%的有20个批组, 90%的6个批组, 80%的有9个批组, 70%和60%的各一个批组, 详见表1。

用50亿及100亿菌接种小白鼠, 将菌液离心浓缩后不加氢氧化铝生理盐水稀释与离心浓缩后加20%氢氧化铝生理盐水稀释接种小白鼠进行对比。结果用氢氧化铝生理盐水稀释的, 接种50亿和100亿菌, 小白鼠的存活率均为95%, 而原菌液浓缩不加氢氧化铝生理盐水的, 接种100亿菌, 其存活率仅40%, 接种50亿菌, 其存活率为55.6%。详见表2。

2. G4T(10)对猪的安全性: G4T(10)单苗500亿菌或二联苗、三联苗30头份皮下接种猪, 共进行7个批组试验, 注射猪35头, 100%健活, 其中注射G4T(10)单苗500亿菌的进行3个批组试验, 注射猪12头, 有3头注射后体温轻度升高, 其他未见明显反应; 注射30头份(一批20头份)二联苗的进行3个批组试验, 注射猪15头, 有一头体温升高, 其余未见明显变化; 用三联苗30头份注射猪只做了一次试验, 注射猪8头, 观察两周, 食欲正常, 其中有4头猪在注射后第二天体温升高0.5~1°C, 第3天体温全部降至正常, 有5头猪在注射局部发生水肿。详见表3。

G4T(10)培养物皮下注射猪, 我们同时注射了三头猪, 注射后24、48、72小时观察注射部的皮肤均无红肿反应, 体温也正常。

3. G4T(10)对家鸽的安全性: G4T(10)单苗肌肉注射家鸽, 我们做了3种剂量, 每种剂量注射鸽4只, 第1组每只注射50万菌, 第2组每只注射500万菌, 第3组每只注射5000万菌, 其结果见表4。

表1 G4T(10)10亿菌接种小白鼠存活率分析

存 活 率 %		100	90	80	70	60
用20%氢氧化铝 生理盐水稀释	试 验 组 数	14	2	4	1	
	存活鼠数/注射鼠数	$\frac{119}{119}$	$\frac{18}{20}$	$\frac{29}{36}$	$\frac{7}{10}$	
用马丁肉汤稀释	试 验 组 数	6	4	5		1
	存活鼠数/注射鼠数	$\frac{39}{39}$	$\frac{36}{40}$	$\frac{22}{28}$		$\frac{3}{5}$

(三) 讨论与小结

1. 通过37个批组的试验证明, 猪丹毒弱毒菌株G4T(10)对小白鼠是安全的, 皮下接种10亿菌, 小白鼠存活率在90%以上, 其中用20%氢氧化铝生理盐水稀释的21个批组存活率达93.5%; 用20%氢氧化铝生理盐水稀释, 接种小白鼠100亿菌共存活率仍达95%, 虽然这种大剂量试验进行批次较少, 但可看出G4T(10)对小白鼠毒力是很低的。同时也可看出用20%氢氧化铝生理盐水稀释猪丹毒菌苗比肉汤稀释的安全。

表2 G4T(10)对小白鼠的大剂量安全试验

接 种 菌 数	注 射 物	存活鼠数/注射鼠数	存 活 率 %
100亿	菌液离心浓缩后, 加20%氢氧化铝生理盐水	19/20	95
100亿	离心浓缩	8/20	40
50亿	菌液离心浓缩后加20%氢氧化铝生理盐水	19/20	95
50亿	离心浓缩	10/18	55.6

表3 G4T(10)对猪的安全性试验

苗 别	试验次序	接种菌数	稀 释 液	健活头数/注射头数	反 应
单 苗	1	500亿	20%氢氧化铝生理盐水	3/3	无
单 苗	2	500亿	20%氢氧化铝生理盐水	4/4	其中2头体温轻度升高
单 苗	3	500亿	20%氢氧化铝生理盐水	5/5	其中1头体温升高第二天降至正常
二联苗	4	250亿	20%氢氧化铝生理盐水	5/5	其中1头体温升高, 由于喂大量变质的白菜, 引起拉稀
二联苗	5	30头份	20%氢氧化铝生理盐水	2/2	无
二联苗	6	20头份	20%氢氧化铝生理盐水	8/8	无
三联苗	7	30头份	20%氢氧化铝生理盐水	8/8	其中4头在注射后第二天体温升高0.5—1℃, 第三天恢复常温, 5头注射局部水肿。

表4 G4T(10)对家鸽的安全性试验

组 序	注射菌数/剂量	稀 释 液	存活只数/注射只数	存 活 率 %
1	50万/0.5ml	马 丁 汤	3/4	75
2	500万/0.5ml	马 丁 汤	2/4	50
3	5000万/0.5ml	马 丁 汤	0/4	0

2. 通过7个批组的试验证明,猪丹毒弱毒菌株G4T(10)对猪也是安全的,皮下接种单苗500亿菌或二联苗、三联苗30头份的试验猪100%健活,个别猪体温有短时间升高,而大部分试验猪均未见有明显反应(区域性的安全试验另有报告,本文不再论述)。

我们曾用猪丹毒强毒菌株C43—2、6、7、8皮下接种猪,每点100个菌/0.02ml,48小时内注射部皮肤的红肿宽度及长度达30mm以上,5—7天后注射局部皮肤坏死,且体温升到41℃以上。G4T(10)皮内接种猪每点4555万菌。皮肤与体温均毫无反应,这也说明本菌株对猪的毒力是很弱的。

3. 三联苗30头份注射猪的安全性试验中,我们发现在注射后第二天8头猪中有4头体温升高0.5~1℃,有5头猪注射局部水肿。为什么在注射单苗或二联苗时没有出现这种现象?而在注射三联苗后发生这种情况,这是否与三联苗中含有猪肺疫菌苗或这批菌苗污染的杂菌有关,值得我们注意。

4. 从注射家鸽5000万、500万、50万菌3组不同剂量的试验结果看出,G4T(10)对家鸽还具有一定的毒力。

四、猪丹毒弱毒菌株G4T(10)的免疫原性试验

培育制造菌苗的弱毒菌株要求既安全又有效,但是安全与效力常是一个矛盾,往往安全性较好的菌株,而免疫原性不够好,反之免疫原性好的菌株而安全性不够好,如何使安全与有效的矛盾得到统一,培育既安全而又有效的弱毒菌株,是我们研究的一个重要课题。近几年来我们培育了猪丹毒弱毒菌株G4T(10),经过系统的试验证明其安全性与免疫原性均较好。兹将G4T(10)菌株的免疫原性试验结果报告于后:

(一) 试验材料与方法

1. 试验材料:

(1) 菌苗,以G4T(10)菌种制成以下几种菌苗:

- ①肉肝胃膜汤培养液体菌苗(简称湿苗)
 - ②猪丹毒弱毒冻干苗(简称单干苗)
 - ③猪瘟、猪丹毒二联冻干苗(简称二联苗)
 - ④猪瘟、猪丹毒、猪肺疫三联冻干苗(简称三联苗)
- 单干苗、二联苗、三联苗均由南京兽医生物药品厂制造。

(2) 试验动物:

猪:①本所饲养场新淮杂交猪。

②烟台地区农科所饲养的烟台黑猪、荣昌猪及约克杂交猪等。

上述试验猪均为3月龄以上,体重40—50斤,血清培养凝集试验阴性或弱阳性的健康猪。

小白鼠:本所小动物房供给,体重17—22克。

家鸽:南京动物园及南京兽医生物药品厂供应的成年鸽。

地鼠:本所动物房饲养的3—4周龄健康地鼠。

(3) 培养基:肉肝胃膜消化汤、马丁肉汤、血液琼脂斜面、明胶平板等均按规定方法制造。

(4) 稀释液:20%铝胶生理盐水或马丁肉汤。

(5) 攻毒用强毒菌株: 猪用C43—2、C43—6、C43—7、C43—8四个品系的培养物混合后耳静脉注射, 每次攻毒前, 四系强毒均通过家鸽复壮一次, 小白鼠用C43—6、C43—8二个强毒培养物混合后皮下注射。

猪丹毒野外强毒菌株: 自北京、山东、江苏、安徽、四川等地病死猪中分离, 经用明胶平板及明胶穿刺培养, 小白鼠毒力测定鉴定为强毒菌株。

2. 试验方法:

(1) 猪丹毒弱毒菌种G4T(10)对小白鼠的效力试验:

将G4T(10)湿苗、单干苗、二联苗或三联苗用20%铝胶生理盐水或马丁肉汤稀释后, 皮下接种1000万个活菌, 14天后以1000个致死量的强毒菌进行攻击, 并设正副对照鼠各3只, 正对照接种1000个致死量, 副对照接种1个致死量。此外还以1000、1万、10万、100万菌免疫, 以1000个致死量强毒菌攻击, 以测定其最小免疫量。另以1000万菌免疫, 以10万、100万、1000万、1亿个致死量强毒菌进行攻击, 以测定其抵抗最大攻毒菌数。

(2) 猪丹毒弱毒菌株G4T(10)对地鼠的免疫原性试验:

皮下注射G4T(10)100万—5亿活菌苗, 11—14天后腹腔注射50亿C43—2等四系强毒, 观察其反应情况。

(3) 猪丹毒弱毒菌株G4T(10)对猪的效力试验:

近期效力: 皮下注射G4T(10)湿苗或单干苗20万, 100万或1000万活菌, 14天后以四系强毒攻击, 观察其近期免疫力。

免疫力产生期及免疫持续期试验: 皮下注射20万, 5亿活菌或二联苗1头份, 于注射菌苗7—10天或三、四、六个月后以四系强毒攻击, 攻毒后每日测温, 并观察其精神, 食欲等反应。

(二) 试验结果

1. G4T(10)对小白鼠的免疫原性试验:

(1) G4T(10)菌株的最小免疫量试验: 我们曾用1000万个菌免疫小白鼠, 以1000个致死量强毒攻击, 共进行37个批组试验, 平均保护率为92.22% (保护数166/180)。为了测试G4T(10)的最小免疫剂量, 从1000个菌—1000万个菌分别免疫, 以1000个致死量强毒攻击。1000个菌免疫保护81.82%, 10000个菌免疫保护76.67%, 10万个菌免疫保护94.87%, 100万及1000万个菌免疫均可保护100%。详见表5。

表5 小白鼠接种不同剂量菌苗攻毒后的保护统计

疫苗批号	保护数	免疫菌数					对照存活数	
		1000个	10000个	10万个	100万个	1000万个	正	副
27批二联苗				4/4	6/6	6/6	0/3	0/3
32批二联苗				5/6	6/6	5/5	0/3	0/3
46-3批二联苗			5/6	5/5		5/5	0/3	0/3
46-6批二联苗			4/6	6/6			0/3	0/3
湿苗		27/33	14/18	17/18	9/9	17/17	0/12	0/12
小计	保护数	27/33	23/30	37/39	21/21	33/33	0/24	0/24
	保护率%	81.82	76.67	94.87	100	100	0	0

(2) 小白鼠接种菌苗后抵抗最大攻毒量试验: 共进行 8 个批组。菌苗用铝胶稀释, 每鼠皮下接种 1000 万个活菌, 分别以 10 万、100 万、1000 万、1 亿个致死量攻击, 其保护率分别为 91.67%、83.33%、92.98% 和 62.5%。详见表 6。

(3) 小白鼠接种菌苗后对不同地区分离的猪丹毒强毒菌株的保护试验: 共试 7 批, 每鼠皮下接种 1000 万个活菌, 隔 14 天后用北京、山东、安徽、江苏以及四川等地分离的野外强毒进行攻击, 攻击剂量是 1000 个最小致死量。结果证明 G4T(10) 菌苗免疫小白鼠后对不同地区强毒菌株的攻击均能保护。详见表 7。

2. G4T(10) 菌苗对地鼠的免疫原性试验:

共进行 4 个批组试验, 用 100 万、1000 万、5 亿菌免疫地鼠, 均为 100% (11/11) 保护, 对照地鼠 90.9% (10/11) 死亡, 详见表 8。

表 6 免疫小白鼠攻击不同致死量强毒菌的保护率

试验批次	试验鼠数	免疫菌数	强毒攻击 (致死量)	保护鼠数		对照存活数	
				保护鼠数/试验鼠数	%	正	副
2	12	1000 万/0.2ml	10 万	11/12	91.67	0/6	0/6
3	18	1000 万/0.2ml	100 万	15/18	83.33	0/9	0/9
9	57	1000 万/0.2ml	1000 万	53/57	92.98	0/24	0/24
5	32	1000 万/0.2ml	1 亿	20/32	62.5	0/12	0/12

表 7 G4T(10) 菌苗免疫小白鼠以不同地区强毒菌株攻击后的保护试验

组别	菌苗批号	试验鼠数	免疫菌数	强毒攻击		保护鼠数		对照存活数	
				菌株	致死量(个)	保护鼠数/试验数	%	正	副
1	单苗 25	6	1000 万/0.2ml	安徽	1000	6/6	100	0/3	0/3
	三联 25	6	"	安徽	1000	6/6	100		
2	二联 27	5	"	山东	"	5/5	100	0/3	0/3
3	BA50 湿苗	6	"	北京	"	6/6	100	0/3	0/3
4	二联 32	6	"	江苏	"	6/6	100	0/3	0/3
5	二联 46-3	5	"	四川	"	5/5	100	0/3	0/3
	二联 61-4	6	"	"	"	5/6	83.33		

表 8 猪丹毒弱毒菌苗 G4T(10) 对地鼠的免疫原性试验

地鼠数	免疫菌数	免疫途径	免疫天数	攻毒菌数	攻毒途径	保护地鼠数		对照存活数
						存活	%	
2	1000 万	皮下	11	50 亿	腹腔	2/2	100	0/3
2	5 亿	皮下	11	50 亿	腹腔	2/2	100	
4	100 万	皮下	14	50 亿	腹腔	4/4	100	0/4
3	100 万	皮下	13	50 亿	腹腔	3/3	100	1/4

3. G4T(10)菌苗对猪的免疫原性试验:

(1) 猪的近期效力试验: 接种20万活菌的猪10头, 攻毒后保护8头, 2头死亡, 对照猪9头全部发病, 死亡6头。100万与1000万个菌免疫猪共试4个批组、16头免疫猪攻击强毒后全部健活, 而对照猪17头死亡16头。

(2) 猪的免疫力产生期试验, 注射二联苗后7天及10天, 攻击猪丹毒四系强毒, 7天组试验猪4头, 10天组试验猪5头, 攻毒后全部保护, 没有死亡。对照猪5头死亡3头, 2头重反应。详见表9。

表9 免疫力产生期试验统计

免疫时间	试验猪数	免疫剂量	攻毒后反应				保护猪数/试验猪数
			无	轻	重	死	
7天	4	二联苗 一头份	1	3	0	0	4/4
10天	5	一头份	4	0	1	0	5/5
对照	5		0	0	2	3	2/5

(3) 猪的免疫持续期(免疫期)试验:

注射本菌苗后3个月、4个月和6个月免疫期共进行14个批组试验; 其中20万个活菌免疫4头猪, 3个月后攻毒全部保护; 4个月免疫期二个批组8头猪5亿个菌免疫, 攻毒后全部保护, 对照猪8头全部死亡; 6个月免疫期共进行11个批组试验, 56头免疫猪攻毒后保护54头, 保护率96.43% (其中一头猪因脐赫尔尼亚引起肠管坏死而死亡已计算在内), 详见表10。

4. G4T(10)、GT(10)、GC42等菌株的免疫原性比较:

(1) G4T(10)与GT(10)对小白鼠的免疫原性比较:

稀释液用20%铝胶生理盐水及马丁肉汤二种。试验结果证明二个菌株对小白鼠的免疫原性相似, 而以铝胶生理盐水稀释的免疫原性比马丁肉汤稀释的更好些, 详见表11。

-(2) G4T(10)与GT(10)、GC42对猪的免疫原性比较:

①G4T(10)、GT(10)、GC42小剂量对猪的近期免疫原性对比试验: 各以100万菌免疫, 13天后以四系强毒攻击, 保护率分别为100%、100%、75%, GC42菌苗免疫的猪攻毒后重反应与死亡的多, 详见表12。

②G4T(10)与GT(10)对猪近期免疫原性比较试验: 共进行11批组, 攻毒后G4T(10)组100%保护, GT(10)组保护90.63%, 详见表13。

③G4T(10)与GT(10)菌苗免疫持续期比较, 前后共进行32批组试验, 每头猪用5亿菌免疫, 隔4、6个月攻击强毒。G4T(10)与GT(10)二个菌株的免疫期没有明显差别, 详见表14。

④G4T(10)与GC42等菌株的免疫期比较。

山东省畜牧兽医工作站进行了G4T(10)与GC42菌苗6个月免疫期比较试验, 试验结果, G4T(10)菌苗组, 4.1亿—4.9亿个菌免疫猪8头攻毒后全部保护; 6.6亿—7.7亿个菌免疫猪共8头, 攻毒后除一头因脐赫尔尼亚引起肠管坏死而死亡外, 余7头均健活。注射GC42菌苗组, 5.2亿个菌免疫猪8头, 攻毒后死亡5头, 保护3头; 8.2亿—8.3亿免疫猪8头攻毒

后死亡1头，保护7头。对照猪4头全部发病，死亡3头。G4T(10) 菌苗的总保护猪数为15/16，保护率93.75%，GC42菌苗保护猪数为10/16，保护率62.5%详见表15。

表10 G4T(10)菌苗对猪的免疫期试验统计

菌苗批号	试验猪数	免疫菌数	免疫期	攻毒菌数	攻毒后反应				保护猪数/试验猪数	对 照	备 注
					无	轻	重	死		存活猪数/试验猪数	
1	4	20万	3个月	5亿	1	2	1	0	4/4	2/5	攻毒前发生传染性胃肠炎
1	4	5亿	4个月	84亿	0	0	0	4	0/4	1/4	
1	4	5亿	4个月	5000万	1	2	1	0	4/4	0/4	
2	4	5亿	4个月	500万	1	1	2	0	4/4	0/4	
1	4	5亿	6个月	40亿	1	0	2	1	3/4	0/4	
1	5	5亿	6个月	1000万	4	1	0	0	5/5	2/4	
2	5	5亿	6个月	300万	2	3	0	0	5/5	3/4	
二联	5	1头份/2ml	6个月	5亿	3	2	0	0	5/5	1/5	
14—1	5	5亿/2ml	6个月	5亿	3	1	1	0	5/5		
单干苗3	5	5亿/2ml	6个月	5亿	3	1	1	0	5/5		
湿苗4	5	5亿/2ml	6个月	5亿	3	1	1	0	5/5	6/12	
78—1	8	5亿/2ml	6个月	44亿	2	3	3	0	8/8		
78—2	8	7亿/2ml	6个月	106亿	1	5	2	0	8/8	1/4	
宁27	4	4.1亿/2ml	6个月	300万	3	0	1	0	4/4		
宁32	4	4.9亿/2ml	6个月	300万	3	0	1	0	4/4		
宁27	4	6.6亿/2ml	6个月	300万	3	0	0	1	3/4		
宁32	4	7.7亿/2ml	6个月	300万	3	1	0	0	4/4		

山东省免疫期试验的结果，免疫猪一头因脐赫尔尼亚引起肠管坏死而死亡

注1：轻反应：体温升高超过1—1.5℃、稽留2天，减食。

重反应：体温升高超过2℃，稽留超过3天，停食。

2：以下二批试验猪未统计在内：

- ① 四个月免疫期一组，因在攻毒前发生传染性胃肠炎致使攻毒后死亡，以后重复试验4头免疫猪全部保护。
- ② 二联14-1一组6个月免疫期猪，虽然5头猪全部保护，但因攻毒剂量偏低，对照猪死亡不合规定，亦未统计在内。

表11 G4T(10)与GT(10)免疫原性比较（小白鼠）

菌 种	免疫菌数	稀 释 液	试验批组	攻毒后 保护鼠数	保 护 率 %	对照存活数	
						正	副
G4T (10)	1000万	肉 汤	12	45/57	78.95	0/36	0/36
G4T (10)	1000万	铝 胶	7	31/32	96.88	0/21	0/21
GT (10)	10 0万	肉 汤	5	25/30	83.33	0/15	0/15
GT (10)	1000万	铝 胶	5	20/20	100	0/15	0/15

表12 三种猪丹毒弱毒菌苗小剂量免疫猪对比试验

菌 种	项 别	猪 数	免疫菌数	免疫时间	攻毒菌数	攻 毒 后 反 应				保护数	保护率 %
						无	轻	重	死		
GC42*②		4	100万	13天	5亿	0	1	3	0	4/4	100
GC42*③		4	100万	13天	5亿	1	0	1	2	2/4	50
GT(10)*④		4	100万	13天	5亿	3	0	1	0	4/4	100
G4T(10)*①		4	100万	13天	5亿	2	2	0	0	4/4	100
对 照		4			5亿	0	0	0	4	0/4	0

备 注

1. 免疫日期1975年2月21日；攻毒日期：1975年3月6日。
2. 试验猪来源：江苏省、江浦县、老山林场。
3. *①、②、③、④系菌苗批号。

表13 G4T(10)与GT(10)免疫原性比较 (猪)

菌 种	免疫菌数	试验批次	试验猪数	攻 毒 后 反 应				保护数	保护率 (%)	对 照 存活数/ 试验数
				无	轻	重	死			
G4T(10)	1000万	3	12	4	5	3	0	12/12	100	1/13
GT(10)	1000万	8	32	22	4	3	3	29/32	90.63	3/25

表14 G4T(10)与GT(10)免疫期比较 (猪)

菌 种	免疫菌数	免 疫 期	试 验 批 组	试 验 猪 数	攻 毒 后 反 应				保 护		对 照 存活数/ 试验猪数
					无	轻	重	死	猪 数	%	
GT(10)	5亿	4个月	11	44	14	17	4	9	35/44	79.55	4/18
GT(10)	5亿	6个月	8	34	27	6	0	1	33/34	97	6/12
G4T(10)	5亿	4个月	2	8	2	3	3	0	8/8	100	0/8
G4T(10)	5亿	6个月	11	56	29	14	11	2	54/56	96.36	10/29

表15 G4T(10)与GC42猪丹毒弱毒菌苗6个月免疫期比较

试验菌株	菌苗批号	试验猪数	免疫剂量	强毒攻击菌数	反 应				保 护 数		备 注
					无	轻	重	死	存活数/试验数		
G4T(10)	宁27	4	4.1亿/2ml	300万/2ml	3	0	1	0	4/4		由脐赫尔尼亚引起肠管坏死而死亡。
G4T(10)	宁32	4	4.9亿/2ml	300万/2ml	3	0	1	0	4/4		
G4T(10)	宁27	4	6.6亿/2ml	300万/2ml	3	0	0	1	3/4		
G4T(10)	宁32	4	7.7亿/2ml	300万/2ml	3	1	0	0	4/4		
GC42	济56	4	5.2亿/2ml	300万/2ml	0	0	1	3	1/4		
GC42	济30	4	5.2亿/2ml	300万/2ml	2	0	0	2	2/4		
GC42	济56	4	8.2亿/2ml	300万/2ml	1	1	1	1	3/4		
GC42	济30	4	8.3亿/2ml	300万/2ml	1	1	2	0	4/4		
对 照		4		300万/2ml			1	3	1/4		