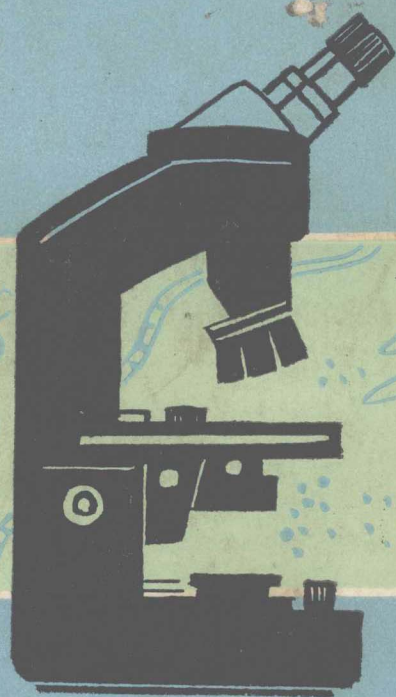


研究报告选编



广西农学院 猪病研究室
兽医微生物学家畜传染病学教研室

我室1954年至1964年着重猪布氏病研究, 1970年至1982年着重猪喘气病、辐射在家畜免疫上应用、猪大肠杆菌病等方面研究。现将试验报告中主要部份选编成册, 供有关同志参考, 并向校庆五十周年献礼! 由于水平所限, 加之时间仓促, 错误在所难免, 请批评指正。

猪 病 研 究 室
广西农学院
兽医微生物学家畜传染病学教研室

1982年10月

目 录

猪喘气病病原分离研究.....	韦家槐 施万球 (1)
用钴(Co^{60})致弱猪喘气病鸡胚毒免疫猪试验	施万球 李肇熙 余克伦 (4)
钴 60 致弱猪肺炎支原体一号苗安全性与免疫性的重复试验	农林部兽医药品监察所等六个单位 (7)
用 Co^{60} 辐射猪喘气病病原支原体培育疫苗免疫试验报告	施万球 韦家槐 余克伦 李肇熙 (11)
西江农场在18年56次引种中防止猪喘气病传染的经验调查.....	施万球 陈修文 (19)
陆川县防治猪喘气病经验的初步调查(1976)	施万球 余克伦 (20)
广西部份国营猪场猪喘气病调查.....	施万球 余克伦 陈修文 林卡民 韦家槐 (22)
猪肺炎支原体、杂支原体在猪、兔、羊胎、地鼠肺、肾、鸡胚单层细胞上培养观察	韦家槐 施万球 梁家权 陆芹章 (29)
以对流免疫电泳检测猪肺炎支原体抗体的探讨	研究生 张重辉 指导教师 施万球 韦家槐 余克伦 (31)
猪喘气病治疗试验.....	施万球 赵振球 (40)
广西猪布氏杆菌病.....	施万球 (43)
猪布氏杆菌病诊断报告(摘要)	施万球 (51)
关于猪布氏杆菌病的初步探讨(摘要)	施万球 (51)
猪布鲁氏菌的分离与鉴定研究(摘要)	施万球 李肇熙 李康然 董乐记 (52)
广西陆川猪正常血清对布氏菌凝集价调查.....	施万球 李康然 余克伦 (54)
人工对猪接种猪布氏Ⅲ型菌株的观察(摘要)	施万球 李肇熙 李康然 余克伦 (58)
从猪布氏菌病场迅速培育健康群试验.....	施万球 李肇熙 李康然 余克伦 (59)
广西某些国营农场仔猪下痢的病原探讨.....	施万球 韦家槐 郑世伦 (60)
大肠杆菌耐药性研究	研究生 郑世伦 指导教师 施万球 韦家槐 李肇熙 余克伦 (65)
巴氏杆菌在改良半固体培养基上延长保存期试验.....	韦家槐 施万球 梁家权 (79)
41株多杀性巴氏杆菌对14种药物的敏感性试验.....	韦家槐 施万球 梁家权 殷勤云 (85)
关于猪丹毒病几个问题的讨论.....	施万球 (91)

乳牛筛鼻甲骨癌报告	施万球 罗树韬 (101)
牛夹竹桃中毒报告	施万球 李德付 劳家兴 (104)
^{60}Co 射线对一些微生物诱变的试验报告	广西农学院猪病研究室 (106)
^{60}Co 射线诱变的多杀性巴氏杆菌Str.R.突变株及其毒力和免疫性的研究 研究生 殷勤云 指导教师 韦家槐 施万球 余克伦	(112)
多杀性巴氏杆菌弱毒株GNC ₀₁ 免疫鸭试验报告 韦家槐 施万球 殷勤云 张九鼎等	(127)
雏鸡的新城疫母源抗体调查	施万球 韦家槐 陆芹章 赵勋婉 赵新柳 (130)
鸡新城疫Ⅱ系、F系、Lasota系、日本B ₁ 系四种弱毒株的安全性与免疫性比较试验 施万球 韦家槐 陆芹章 赵勋婉 赵新柳	(135)
某场鸡群发生传染性支气管炎的诊断及扑灭经过报告 施万球 韦家槐 梁鸿唐 赵善昌 余克伦 张 伟	(143)
牛喘气病(暂定名)的调查研究(摘要)	陈传强 (145)
特异性抗体标记葡萄球菌A蛋白(SPA)进行协同凝集反应在猪丹毒诊断的探讨(摘要) 余克伦 甘浪帆 黄国敏	(146)
应用辣根过氧化物酶酶联SPA的免疫吸附试验对猪喘气病诊断(摘要) 余克伦 刘 琪 阮育玲	(147)

猪喘气病病原分离研究

韦家槐 施万球

一、目的与意义

猪喘气病的病原是猪肺炎支原体。这种支原体培养要求苛刻,直到1965年英国Goodwin,美国Lam和Switzer才首次从病猪分离成功。但分离技术要求高,在分离中尚存在许多问题有待解决,故须进一步研究。本病免疫问题也尚未解决,形成世界上流行十分严重的传染病。如欧洲、加拿大、日本等屠宰场的检查,发病率一般超过50%。我国于1956年发现此病,1977年在广东召开的全国猪喘气病防治会议上曾指出:全国二十九个省(市)都有此病流行,病猪约占猪总头数的30%左右,可见此病对养猪事业危害严重。目前,全国已把猪喘气病研究工作列为重点科研课题之一。为此,我们在1975年下半年开展了病原分离培养的研究工作。

二、历史的回顾

猪喘气病的病原在历史上有很长的时期未弄清楚,最早误认为是细菌,1933年以后的30年误认为是病毒,直到六十年代才弄清楚其病原是猪肺炎支原体。由于猪肺炎支原体对营养要求苛刻,分离时比猪呼吸道的其它支原体如鼻支原体等难于生长,当培养基质量欠佳,不能满足其生长的需要时,就会使分离工作失败,或标本中混有其它杂支原体时,也常常影响了猪肺炎支原体的分离,因此直接影响着防治研究的进展。1973年上海兽医研究所首先分离培养成功,1974年江苏农科院分离出地方菌株。我国为了进一步弄清楚猪喘气病的病原,为本病防治研究打下基础,1975年在上海召开的喘猪气病科研协作会议,要求分离地方菌株,很多省(市)开展了病原分离工作。根据会议的精神,我们继上海、南京之后,于1975年分离出地方菌株。1975年夏天,在武汉召开了猪喘气病病原分离技术交流会。会议以后,很多单位都能在无细胞培养基上分离出猪肺炎支原体,到1977年底统计,我国有12个单位分离出有致病力的菌株38个,分离水平已接近世界水平。

三、试验设计

1975年夏天在上海召开的猪喘气病科研协作会议上提出两个研究课题,即地方菌株的分离和免疫的研究,鉴于当时设备不足,没有承担病原分离工作,只承担了免疫方面的研究。会后觉得搞免疫工作还必须首先研究病原,因此决定克服困难,创造条件搞分离工作。抓住主要矛盾,进行设计。

1、解决营养要求高的问题

(1) 在复合培养基内添加鸡胚浸液。我们采用的培养基所含成份是根据英国Goodwin所报导的复合培养基, 主要成份是牛心消化汤、水解乳蛋白、Hank氏液、酵母浸液、健猪血清、青霉素、醋酸钙, 但这种培养基分离率较低, 不够理想。江苏农科院在此培养基上加以改进, 添加了Eagle氏液做成KM₂培养基, 提高了分离率, 但这种培养基需要十几种纯的氨基酸和几种维生素, 价钱既高, 一时也无法购买齐全。因此只能按实验室现有的条件想办法加以改进, 创造有利于猪肺炎支原体生长的条件, 根据我们过去工作的体会, 鸡胚浸液有促进组织培养生长的作用, 其中必含有较丰富的氨基酸、维生素等成份, 可能有助于猪肺炎支原体的生长, 因此在复合培养基中加入1%鸡胚浸液。

(2) 由单一一种酵母菌的浸液改用多种酵母菌的浸液。酵母含有很高的蛋白质、核酸、维生素, 此外, 尚含有胆固醇、胆硷等, 但各种酵母所含的质与量则不同, 我们为了得到较全面的适于猪肺炎支原体生长的营养成份, 将一般采用单一一种酵母改用3—4种广西703饲用酵母菌做成酵母浸液。

2、杂支原体的控制问题

在猪的呼吸道往往有些正常寄居的杂支原体, 如鼻支原体。它们营养要求较低, 生长迅速, 在培养基中很易占优势, 使猪肺炎支原体的分离失败。为了控制杂支原体, 我们采用了下列方法:

(1) 采用病肺组织埋块培养法, 使猪肺炎支原体在肺组织中生长, 在数量上可以迅速占优势, 并以肺组织作为桥梁过渡到无细胞培养。

(2) 在培养基中添加链霉素, 根据一些资料报导, 杂支原体对链霉素较敏感, 而猪肺炎支原体不敏感, 所以在最初分离的低代次培养基中加入100—200单位/毫升链霉素, 以抑制杂支原体。

3、选择在早期发病猪取病料

一般在发病早期的病肺含支原体较多, 故在室外取回病料, 用人工接种健康猪, 经X光检查, 在发病早期即剖杀取病变的肺进行分离。

4、以实验室的弱毒菌株作对比观察

我们在初期分离中对猪肺炎支原体形态全无经验, 为了便于掌握, 以我们实验室适应鸡胚的一号苗纯系, 同时进行无细胞培养作为模式, 以进行对比观察。

5、在培养中加入本病免疫血清作代谢抑制试验

若属本病的支原体, 其代谢即受抑制。未受抑制即可能属细菌L型, 或杂支原体。借此以鉴别是否属本病支原体。

四、试验方法与结果

1975年

方法: 病料→取样剪块, 加Hank氏液(内加青霉素、链霉素各200单位/毫升)洗涤→取7—8小块放入预先涂有鸡血浆的小瓶作埋块培养→转入复合培养基传代, 观察培养基PH变化, 取培养物(涂片检查)鉴定, 当培养变化稳定后, 以免疫血清作代谢抑制试验。

结果: 从南宁冻肉厂取病料3份, 实验室人工感染猪病料1份, 鸡胚弱毒材料1份, 共

5份材料，后两份材料接种后能使培养基有规律地变酸，PH下降，培养第六代以后涂片染色镜检有两极、环状等多形微生物，培养基中若加免疫血清能抑制其代谢，培养基PH不下降。培养至第9代用航空寄给江苏农科院检查鉴定（菌株名称分别命名75010，7508），肯定两个菌株均有较典型的支原体多形性形态，能被免疫血清凝集。75010在第14代接种猪两头，在接种后第3—4周发病，剖检有典型的喘气病病变，故证实我们分离出了地方菌株。

1976年

方法：与75年基本相同，但改埋块为浸泡法，直接将病料小块放在培养基内浸泡培养。
结果：两份材料、两份鸡胚弱毒中分离出三个菌株。

1977年

方法：同1976年，主要是为了检查弱毒苗在鸡胚和猪肺上生长情况。

结果：从2份鸡胚材料、6份弱毒苗接种猪后取猪肺作分离材料，均分离出菌株。

五、体 会

1、在培养工作的初期我们采用了实验室保存的纯系鸡胚弱毒株培养做模式对比；用免疫血清作代谢抑制试验，克服了无经验的困难，避免了走弯路。

2、我们在复合培养基中加鸡胚浸液有利于猪肺炎支原体的生长，曾作过两次比较试验，加鸡胚浸液的比不加的生长较快，菌数多；生长滴度可达 10^{-8} 。以含有鸡胚浸液做成的固体培养基，培养猪肺炎支原体长出较多而大的菌落。（四川农科院77年的报导也认为当支原体在复合培养基生长不好时，加鸡胚浸液能促进生长。）

3、杂支原体在复合培养基中PH值很快下降，而猪肺炎支原体变色较慢，特别在3—6代变得很慢。杂支原体形态以点状、球状为主，环状者多为小环。猪肺炎支原体以环状两极为主，大环较多。

4、猪肺炎支原体与杂支原体的区别：除了培养基PH变化有快慢，形态有些区别外，主要还要通过猪体来区别，即猪肺炎支原体可使猪发生喘气病，而杂支原体一般不致病。最近我们将猪肺炎支原体、杂支原体分别接种于猪肺单层细胞及肾单层细胞进行培养，发现两种支原体均能使肺单层细胞发生病变，而杂支原体并使肾单层细胞出现病变，猪肺炎支原体则无病变；因此是否可用组织培养鉴别两种支原体，有进一步研究的必要。

5、培养基中所含水解乳蛋白量在77年以前采用0.25%，后广西兽医研究所介绍用0.125%更有利，因此我们在77年以来也采用0.125%，支原体也一样生长得好。

6、突破了培养关，促进科研工作地开展。以前，我们检查猪喘气病一号苗（经钴⁶⁰处理使之毒力减弱的鸡胚适应株）是很困难的，因为一号苗在鸡胚中培养是否生长，繁殖得怎么样是没有标志的，要判断必须在猪体上进行试验；现在突破了培养关，检查就容易多了，对选育弱毒株及免疫试验研究工作的开展都有较大的促进。

参考文献（略）

用钴(Co^{60})致弱猪喘气病鸡胚毒免疫猪试验

施万球 李肇熙 余克伦

猪喘气病在我区各地都有不同程度的发生与流行,严重地影响养猪业的发展。目前我国尚未研制出良好的疫苗用于预防免疫,现存有已适应鸡胚的猪喘气病鸡胚毒 $\text{S}_{243}\text{Y}_{33}$ 混合毒(以下简称P.S.Y.V.)毒力虽有减弱,但在我区试点使用,由于毒力尚大,未能推广作为疫苗。本试验拟用钴 60 不同剂量照射再致弱,探讨以适应我区猪免疫用的理想疫苗。

试验方法与试验结果

一、预备试验:用枯草杆菌、猪丹毒杆菌、猪巴氏杆菌、禽巴氏杆菌、乙型溶血链球菌、鸡新城疫弱毒系、鸭瘟弱毒系等五种细菌二种病毒,以钴 60 照射,剂量取20、25、30、40、50万伦琴不同剂量。照射后培养或接鸡胚观察其受照射影响情况,找出致弱剂量,以便作为正式试验的参考数据。试验步骤与具体操作方法从略,试验结果如下:

(1)细菌组:经钴 60 照射达20万伦琴,细菌即将大部分被杀死。

(2)病毒组:鸡新城疫系弱毒(简称N.C.V.)经钴 60 50万伦琴照射后,接种鸡胚未致死,即此毒在此剂量已被杀死。而鸭瘟弱毒(简称D.P.V.)经20万、40万伦琴照射后接种鸡胚均未引起鸡胚致死,即20万、40万伦琴已杀死D.P.V.毒。

因此在正式试验时,P.S.Y.V.毒的照射参照上述二病毒结果,采用20、30、40万伦琴三个剂量分别进行试验。

二、正式试验:进行了三次共七组试验。

第一次试验:

目的:用钴 60 以20、30、40万伦琴照射(P.S.Y.V)毒,观察其是否致弱和免疫性。

方法:取(P.S.Y.V)毒,以Hank's液稀释成1:1放入直径1cm试管,每管1.5ml。在冰冻状况下分20、30、40万伦琴三组以钴 60 照射,照射后每组接种猪三头。接种采用滴鼻法,每头剂量系以10倍稀释接种5ml,另外未照射的(P.S.Y.V)毒接种猪三头作对照,接种后观察三个月,观察有无病状出现,并X光透视二次。而后以5ml10倍稀释的济南系强毒分别滴鼻接种,30天剖杀,内眼检查肺病理变化,判定免疫结果。

结果:

(1)、(P.S.Y.V)毒对本地猪毒力较强,在试验中的三头对照猪X光透视出现“+”或“++”病变,并有1/3猪出现临床症状。

(2)、经照射的(P.S.Y.V)毒接种三组共九头猪,观察三个月,无临床症状,仅一头X光透视有“+”。

(3)、攻毒后放血检查肺病变见表一。20万伦琴组2/3猪全部免疫,1/3猪有病变但较轻。30万伦琴组有1/3猪全部免疫。40万伦琴组全无免疫。

第二次试验:

目的:在第一次试验基础上,选出具有免疫力的钴 60 20万、30万伦琴照射组,重复试验,观察其免疫力。

方法：取第一次试验经钴⁶⁰20、30万伦琴照射的(P.S.Y.V)毒(冻干保存)，再通过鸡胚三代，方法如第一次。20万伦琴组接种猪八头，30万伦琴组接种猪六头，接种后观察三个月，然后用廖平强毒攻毒，方法亦如第一次，攻毒后30天放血，肉眼检查肺的病理变化，判定免疫结果。

结果：

(1)、免疫猪在三个月免疫观察期间无临床症状，X线透视亦无病变。

(2)、攻毒后三周放血观察肺病变，见表二。20万伦琴组有5/8猪全部免疫，2/8猪免疫不全，1/8猪未得免疫。30万伦琴组有4/6猪免疫不全，2/6未得免疫。

第三次试验：

目的：以钴⁶⁰10万伦琴、20万伦琴照射Y₃₃毒，连续三次，观察其对猪致弱情况和免疫性。

方法：以钴⁶⁰照射Y₃₃毒，分二组，即20万伦琴与10万伦琴，每照射一次后通过鸡胚一次，连续三次照射后接种猪，20万伦琴组接八头，10万伦琴组接六头，接种方法和前两次相同，经三个月以廖平攻毒，攻毒后三周放血检查肺病变，以确定免疫效果。

结果：

(1)、在免疫观察期间，二组均无临床症状，仅一头X光透视出现“±”。

(2)、攻毒后三周宰杀观察肺病变，结果如表二所示，20万伦琴组4/8猪全部免疫，4/8猪未得免疫。10万伦琴组1/8猪全部免疫。7/8猪肺有“++”、“+++”病变

讨论与小结

(一)根据试验结果，猪喘气病S₂₄₃Y₃₃混合毒经钴⁶⁰以40、30、20万伦琴照射后，毒力均能减弱作疫苗注射，90天后除二头外，X光透视均无病变。

(二)免疫后攻毒，试验结果如表二。

(1)20万伦琴照射剂量组二批试验，第一批得到免疫猪2/3，保护率66.7%；第二次重复试验得到免疫猪5/8，保护率62.5%。

20万伦琴通过冻干保存并三次传代后，接种猪作重复试验，结果前后相同，说明致弱性与免疫性可传代并稳定。

(2)30万伦琴照射剂量组得到免疫猪1/3，保护率33.3%；40万伦琴照射剂量组无保护力。

从免疫规律分析，以20万伦琴剂量组较好；30万伦琴次之，40万伦琴则无。符合40万和30万伦琴照射的种毒由于照射剂量大，全部或大部分种毒被杀死，故注射未能使猪产生免疫反应，攻毒后亦无免疫保护。

(三)第三次试验用钴⁶⁰以20万、10万伦琴三次照射此种毒，结果得到20万组免疫猪4/8，保护率50%；而10万组得到免疫猪1/8，保护率12.5%。

(四)从试验结果看，猪喘气病S₂₄₃Y₃₃混合毒经钴⁶⁰20万伦琴剂量照射后制苗，全免疫达到62.5%以上，并还有部分不完全免疫，故该毒较为理想，但免疫剂量、免疫时间、免疫反应、病变特征等项目，有待今后探讨。

本试验得到区兽医研究所猪喘气病科研小组协助，特此致谢。

参考文献(略)

表二

经钴⁶⁰照射后免疫试验结果

组别	照射剂量 (伦琴)	猪数	免疫剂量及方法	时间 间隔 (日)	注射强毒 种类、剂 量及方法	结果					对照发病	备注
						保护 头数	%	保护不 全头数	%	未得 保护	%	
试验组	40万	3	10倍稀释 5 ml滴鼻	90	济南毒10倍 稀释5 ml 滴鼻	0	0	0	0	3	100	第一次试验
试验组	30万	3	"	"	"	1	33.3	0	0	2	66.7	
试验组	20万	3	"	"	"	2	66.6	0	0	1	33.4	
对照组		2			"						2	第二次试验
试验组	30万	6	"	"	"	0	0	4	66.6	2	33.4	
试验组	20万	8	"	"	"	5	62.5	2	25	1	12.5	
对照组		2			"						2	第三次试验
试验组	20万经 三次照射	8	"	"	廖平毒10倍 稀释5 ml 滴鼻	4	50			4	50	
试验组	10万经 三次照射	8	"	"	"	1	12.5			7	87.5	
对照组		2			"						2	

钴⁶⁰致弱猪肺炎支原体一号苗安全性 与免疫性的重复试验

农业部兽医药品监察所 广西农学院 广西兽医研究所
宁夏农业科学院 宁夏农学院 四川农科院畜牧研究所

猪肺炎支原体一号苗（以下简称一号苗）系广西农学院1972年冬用钴⁶⁰照射猪喘气病原鸡胚传代系S₂₄₃Y₃₃混合毒培育而成。曾在室内和农场对小猪试验证明有一定的效果。为了进一步明确其安全性与免疫性，因而再作此次重复试验。

材 料

一号苗鸡胚毒试验分为二组，一组是用传代次数较低的七、八两代混合毒，一组是用十六代毒。

强毒：用济南系冻干强毒通过猪复壮一代后使用。

试验猪：选用广西西江农场断乳后不久的陆川小猪，购回后隔离观察二个月，经五次X光透视检查阴性供试验用。饲料以粗糠为主，饲养五个月，每头增重30—40斤左右。

方 法

一、用一号苗卵黄囊七、八两代混合毒以Hank氏液制成1:10的乳剂免疫健康小猪10头，每头滴鼻5毫升，每周X光胸部透视一次，平时观察有无临床反应，经65天攻毒。

二、第十六代一号苗免疫陆川小猪10头，方法同上。

三、攻强毒：取新鲜济南系强毒接种的病猪肺块制成1:10和1:200倍的悬浮液，对七、八两代混合苗免疫猪和十六代苗免疫猪各七头，以1:10肺悬液攻毒，两组余下的免疫猪各三头以1:200肺悬液攻毒，每头气管注射5毫升，攻毒后每天观察临床症状，每周X光胸部透视一次，待对照猪出现症状后1—3周扑杀检查肺病变。

四、对照猪：共七头猪，其中与免疫猪同源健康小猪三头，不同来源健康小猪四头，分别以1:10和1:200肺悬液攻毒，每头气管注射5毫升。

结果与讨论

一、关于一号苗安全性

以一号苗10×稀释5毫升和200×稀释5毫升对20头断乳后两个月的陆川猪滴鼻，经64

表一 一号苗免疫试验安全性与免疫效果表 (攻强毒10×稀释5毫升组)

疫苗猪号 代数	接 苗 后 反 应 (8 月 3 日 接 苗)										攻 毒 透 胸			后 反 应		备 注
	X 光 透 胸										X 光 透 胸 (空 白 为 未 检)	宰 杀 距 攻 毒 时 间 (天)	宰 杀 距 攻 毒 时 间 (天)	肉 眼 观 察 病 理 变 化		
	咳嗽喘气															
	3/8	10/8	17/8	24/8	31/8	7/9	14/9	21/9	28/9	5/10					14/10	
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	29	+	*剖检“±”， 反应轻，左侧 心、尖叶局部 有绿豆大小、 轻微膜样变， 切面少量浸 润，气管内有 少量泡沫，有 代偿性气肿。	
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	29	+		
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	20	+		
7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	29	—		
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	20	+		
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	20	+		
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++	20	+		
小 计	0	0	1	1	6	1	0	2	4	2	7	3	阳性 6 (85.7%) 阴性 1 (14.3%)	+		
20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29	—		
21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	29	—		
22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	20	+		
23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	29	—		
24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	20	+		
26	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	29	—		
27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	29	±		
小 计	0	0	2	3	5	6	3	3	2	0	7	1	阳性 2 (28.6%) 阴性 4 (57.1%) 可疑 1 (14.3%)	+		
103	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	20	+		
104	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	20	+		
304	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	20	+		
306	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	20	+		
小 计	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	4	4	阳性 4 (100%)		

表二

一 号 苗 免 疫 试 验 安 全 性 与 免 疫 效 果 表
(攻 强 毒 200 × 稀 释 5 毫 升 组)

疫 苗 代 数	猪 号	接 苗 后 反 应 (8 月 3 日 接 苗)										攻 毒 日 期 及 剂 量	攻 毒 后 反 应			喘 气	宰 杀 距 攻 毒 时 间 (天)	宰 杀 检 查 肉 眼 观 察 病 理 变 化
		X					透						X 光 胸 透 (空 白 为 未 检)	14/10 25/10 1/11				
		3/8	10/8	17/8	24/8	31/8	7/9	14/9	21/9	28/9	5/10				咳			喘 气
		3/8	10/8	17/8	24/8	31/8	7/9	14/9	21/9	28/9	5/10							
七 、 八 代	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
小	计	0	1	1	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	+	阳性 3 (100 %)	
十 六 代	25	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
	28	-	-	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	+	+	
	29	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
小	计	0	0	1	1	1	3	1	1	0	0	0	0	0	0	+	阳性 3 (100 %)	
对 照 猪	105	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-					+	+	
	303	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±					+	+	
	302	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±					+	+	
小	计	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±					+	阳性 3 (100 %)	

天观察，结果无咳嗽、喘气等临床症状，在10次X光透视中，出现1—6次“±”的有1/5 20，出现3—4次“±”和一次“+”的有4/20，全都“—”的1/20。从临床观察和X光胸透结果来看，临床无反应，X光透视虽有“±”或一次“+”但反应轻微，一般认为安全性还是良好的，详见表一、二。

与试验猪同来源不接种一号苗的对照猪，经与试验猪同时临床观察与X光透视，临床无咳嗽，X光透射发现“±”有1/5头，“+”有4/5头，宰杀有“+”反应的两头（101号和102号），经肉眼检查，102号疑似支气管炎，101号仅见肺纹理比较粗乱。同来源的试验猪与对照猪X光胸透出现“±”和“+”，对于这种情况，认为除一号苗反应外，亦不排除部分属于支气管肺炎的病变。

二。免疫效果

试验猪免疫后65天分两组攻毒，分别用10×和200×的强毒5毫升接种，同时设对照组，两组对照组均属阳性，病变虽有差异，但差异不显著，试验结果如表一、二。为了便于分析一号苗各代免疫情况，根据攻毒后剖检病理变化来判断一号苗的免疫力，七、八代组仅有1/10全保护，4/10有部分免疫力，十六代组有4/10全保护，1/10全保护略有可疑，4/10有一定保护力，1/10无保护力，见表三。

由于七、八代卵黄囊毒，曾在-5℃至-10℃冰箱冰盒中保存19天是否有一定的影响，仍待进一步探讨。

十六代组有一定免疫力，但不够理想，十六代是从十五代冻干保存毒仅复壮一代而来，是否与复壮未完全，毒价较低有关，仍待今后研究。

表三 七、八代组、十六代组免疫效果综合表

组 别	猪头数	宰 杀 后 肺 肉 眼 病 变				阳性合计
		—	±	+	++	
七、八代组	10	1	0	4	5	9
十六代组	10	4	1	4	1	5
对 照 组	7	0	0	2	5	7

用 Co^{60} 辐射猪喘气病病原支原体

培育疫苗免疫试验报告

施万球 韦家槐 余克伦 李肇熙

猪喘气病在国际称流行性肺炎 (Swine Enzootic Pneumonia), 流行严重。美国某地调查发病率35%至60%, 加拿大、南斯拉夫、罗马尼亚、日本、英国等在屠宰场检出此病超过50%, 我国1977年在广东佛岗专题会议上估计患本病的猪约有1/3, 即将近一亿头。

近年来, 随着机械化养猪和社队集体猪场的发展, 猪群集中, 本病的危害更显得突出。为了预防这种猪病, 研究免疫用苗是当前科学工作者迫切的任务。

我国自1958年开始研究疫苗, 20多年来做了不少工作, 取得了一定的进展。但是, 由于培育疫苗工作多限于生物学方法, 一些菌株虽然通过兔或鸡胚三百多代, 都未取得成功。为了迅速培育疫苗, 我们采用 Co^{60} 辐射猪喘气病支原体, 希望通过诱变获得毒性减弱免疫性好的菌株以制疫苗。几年来, 我们初步选育出毒性低、有一定免疫性的菌株, 名为一号苗。1976年农林部药品监察所组织四川、宁夏、广西兽医研究所、宁夏农学院等单位来我院对一号苗的安全与效力进行试验, 结果一号苗的十六代安全性良好, 免疫后攻强毒的猪, 有40%全保护, 10%全保护尚稍有可疑。40%有部分免疫力, 10%全无保护。后经全国协作会议提出, 1977年在北京和南京两地试验, 结果一正一负, 因此, 还必须继续进行研究。现将工作报告如下。

一、照射剂量的选择和一号苗的选育

用 Co^{60} 辐照猪喘气病支原体的目的, 是降低其致病的毒性, 保留其免疫的抗原性。根据一般报导, 辐射诱变效应往往随剂量增高而增高, 同时高剂量易使毒性负变 (即减弱)。因此, 拟选择能使80%左右个体死亡的剂量。但这种剂量的确定是困难的。原因是:

1、用 Co^{60} 辐照支原体, 特别是猪喘气病支原体未见报导过, 确定一个合适的剂量, 必须从头探索。

2、猪喘气病支原体在六十年代以前, 尚被误认为病毒, 不易培养, 又属多形态, 靠显微镜检查不易确定。在本实验开始时, 我国尚未掌握用无细胞的培养基进行培养的技术。对该支原体的死活是靠通过猪来鉴定的。就是对接种猪观察三个月, 如猪发病证明支原体是活的能致病; 或接种猪免疫后三个月, 以强毒攻击, 经三、四个月不发病, 亦可说接种于猪的支原体是活的, 它能够使猪产生免疫。因此一次试验不仅需要半年时间, 而且耗费活猪, 试验计划要求周密。

为了解决这些困难, 我们选用了比较易于观察, 结果易于鉴定的细菌、病毒作预备试验, 以找出致死剂量, 供辐照猪喘气病支原体时参考。

预备试验使用的细菌有枯草杆菌、猪丹毒杆菌、猪巴氏杆菌、禽巴氏杆菌、溶血性链球菌，病毒有鸡新城弱毒Ⅰ系、鸭瘟弱毒系等。通过五批试验，不到一个月的时间，找出了试验的细菌，经Co⁶⁰照射20万伦琴即全部死亡。病毒则在20万至50万伦琴间即全部无致病性（被杀死或失去毒性）。

根据预备试验的结果，确定对猪喘气病支原体选用10万至40万伦琴剂量照射。试验系用农林部药品监察所猪喘气病支原体卵黄囊菌株为始发菌株，经二次试验，选出20万伦琴组比较好，并简称为一号苗。试验结果如表一、表二。

表一 Co⁶⁰对猪喘气病支原体第一次试验情况

照射剂量 (伦琴)	试验猪头数	照射后接种猪情况					备 注
		接种后观察三个月		接种猪三个月后攻强毒 经三周剖杀观察结果			
		临床症状	X光胸透 观察	全免疫	部分免疫	无免疫	
20万	3	—	—	2	0	1	
30万	3	—	—	1	1	1	
40万	3	—	有一头出现“+”		1	2	
对照组（未经过照射的猪喘气病支原体接种组）	2	有严重 症 状	有病变 反 应	（未攻强毒剖杀 均有显著病变）			
攻毒对照组（未经任何 免疫接种的健康猪）	2					2	与试验的三组 猪同时用强毒 接种

表二 Co⁶⁰对猪喘气病支原体第二次试验情况

照射剂量 (伦琴)	试验猪头数	照射后接种猪情况				
		接种猪后三个月观察		接种猪三个月后攻强毒 经三周剖杀观察结果		
		临床症状	X光胸透观察	全免疫	部分免疫	无免疫
20万	8	—	1/8有“+”反应	5	2	1
30万	6	—	—	0	4	2
对照组	2					2

为了进一步探索诱变，经上述试验选出20万伦琴组菌株后，又用10万、20万伦琴重复照射三次，即每一菌株照射一次后，传三代又照射一次，其结果不如原来一次照射的理想。见表三。

表三

Co⁶⁰对猪喘气病支原体用10万、20万伦琴重复照射试验结果

照射剂量 (伦琴)	试验猪 (头数)	照射后接种情况				
		接种后观察三个月		接种猪后三个月攻强毒 经三周剖杀观察结果		
		临床症状	X光透 视 观 察	全免疫	部分免疫	无免疫
10万	6	—	—	1	3	2
20万	8	—	—	4	2	2
对照组	2			0	0	2

从上三表中看出,猪喘气病支原体应用20万伦琴剂量诱变较好,毒力显著降低,而免疫抗原性保存较好。经40万伦琴照射组,免疫猪全不起免疫作用,可能已全部杀死,或虽不死但已丧失抗原性。

1975年我们突破了猪喘气病支原体无细胞培养技术,照射后的支原体用培养方法检查了共七批次,证明15至20万伦琴对本病原无致死作用,这与广西兽医研究所的结果相似。

试验结果表明,细菌经20万伦照射,接近全死亡。而病毒经20至50万伦琴照射,全丧失致病性。猪喘气病支原体耐辐射力不超过30万伦琴,似比细菌强比病毒弱。从这三种微生物来看,体积大小(细菌>支原体>病毒)对辐射的耐受性似有相关。又从生物结构复杂程度看,细菌较支原体复杂,支原体又较病毒复杂,又似与生物结构越复杂,耐受辐射力越低,其确切关系有待探讨。

二、一号苗毒力减弱的稳定性观察

一号苗是通过Co⁶⁰辐射诱变降低了其毒性后选育成的,但诱变过程是群体诱变,其后代是否有返祖、增强毒力现象,必须通过观察才能确定。其观察分室内试验与农场试验两部分。①室内试验,是对已接一号苗的试验猪分期X光胸透2—3个月,观察肺部有无病变。参与试验的单位除我单位外,还有农林部药品监察所主持几省协作在广西、北京、南京等地试验,观察猪共124头。②农场试验是在室内试验基础上逐步扩大到农场试验,共七个场、一个县,观察猪1608头,主要观察接种一号苗的猪有无咳嗽和喘气症状,其中亦有部分进行X光胸透。结果如表四、表五。

从表四看出,室内免疫试验16次,共猪124头,使用一号苗到24代次,除在南京试验使用19代对太湖猪反应较强外,其余14次试验猪104头包括广西陆川猪、四川内江猪都安全良好,毒力亦无返祖现象。1978年用断奶陆川猪连续通过三代,亦未见毒力增强。

表五是在农场对杂交初生小猪免疫试验的结果,在先锋农场免疫924头猪,在跃进、新光、宁明华侨、华山、东风等农场和灵山县部分公社等共免疫784头猪,结果亦认为安全。

三、一号苗抗原性(起免疫作用)的稳定情况观察

作为理想的弱毒活疫苗,除了要求毒力低外,必须保持稳定的抗原性,才能使疫苗