

马流产沙门氏杆菌的弱毒株及其免疫原性

王世若

(长春兽医大学, 长春)

利用分别含有煌绿、孔雀绿、结晶紫、锥黄素和特异性免疫血清的普通琼脂培养基, 对强毒马流产沙门氏杆菌连续进行了 13 个月的驯化培育, 结果获得了毒力减弱, 但仍保持较好抗原性的煌绿弱毒菌株(煌 288)。其 0.2 毫克的活菌培养物尚不能致小白鼠死亡, 小白鼠被 0.1 毫克的活菌培养物免疫后, 可以获得抗 8 M. L. D. 强毒活菌的攻击, 对于 32 M. L. D. 的攻击, 还可保护 1/5 的小白鼠免于死亡。为今后制造弱毒活菌苗, 过渡到马体提供了有希望的根据。

马副伤寒性流产, 是由马流产沙门氏杆菌引起的一种传染病。病的主要特征是妊马突然流产, 包括胎胞早期消失、死胎、早产或生产无生活能力的胎儿。本病在欧洲、美洲及亚洲的不少国家均有报道^[1,2,4,7]; 我国的一些养马地区也有发生^[6,18]。一旦流行较难控制, 给马匹生产带来巨大损失。据 1963—1970 年调查, 有的地方马流产率平均在 15% 以上。有个生产队 1966—1967 年度的妊马数为 174 匹, 流产了 145 匹, 流产率竟达 83.3% 之高。

从送来的 111 份马流产胎儿胃内容物的检验结果看, 从中分离到典型的马流产沙门氏杆菌 39 株占 35.1%, 送检的 179 份母马血清, 马副伤寒性流产试管凝集反应阳性者 53 份占 30%, 疑似者 23 份占 12%。现在不少国家对本病的特异性免疫进行了大量的研究, 但迄今尚未彻底解决^[4-17]。他们研制的死菌苗系用加热法或甲醛法杀菌, 以钾明矾、铬明矾、氢氧化铝胶、磷酸钙、琼脂或油剂作辅佐剂; 由于这类菌苗在免疫效力和副作用等方面尚存在一定问题, 所以未能普遍应用^[3-12]; 除此之外, 有些作者指出, 死菌苗只能阻止败血症的发生, 而无预防感染的能力, 认为对马副伤寒

性流产的免疫研究, 应着眼在弱毒活菌苗方面。应用微量强毒菌作预防接种, 也能获得较好的免疫效果^[13]。但鸟羽^[14,15]等认为, 死菌苗与活菌苗的免疫效力间, 只有量的区别而无质的不同, 所以利用选种困难、危险的活菌苗作预防接种, 不如应用效力差些的死菌苗为适当。

为彻底解决马副伤寒性流产的特异免疫问题, 我们应用煌绿等 4 种染料及马副伤寒性流产免疫血清作为致变因子, 对强毒的马流产沙门氏杆菌进行了驯化致弱工作, 并用小白鼠作了免疫试验, 以期获得具有一定免疫原性的弱毒菌株, 用于本病的特异预防, 现将所得结果报告如下:

材料和方法

一、菌株

由马流产胎儿胃内容物中分离, 经鉴定为典型的马流产沙门氏杆菌。具有良好的凝集原性。对小白鼠的最小致死量 (M. L. D.) 为 0.05 毫克。

二、致变药物的配制

将煌绿(煌)、孔雀绿(孔)、结晶紫(结)、锥黄素(锥)等, 以灭菌蒸馏水配成 1% 溶液。免疫血

本文于 1975 年 6 月 3 日收到。

清(清)系用3株典型的马流产沙门氏杆菌的混合培养物免疫家兔获得,凝集价为1:25,600。

三、菌株的驯化方法

上述药物按需要量加入普通琼脂中,作成斜面备用。每代培养18—20小时。每10—40代增加药物浓度1次,各种药物的最终含量见表1。在驯化期间,按常规方法对其进行形态特征、菌落及生化特性、抗原性、毒力和免疫原性等方面的检查。

表1 驯化菌株改变药物的剂量

药物种类	100毫升琼脂培养基中药物的含量(毫克)		增加倍数
	起 始	终 结	
煌 绿	5.0	170.0	34
孔雀 绿	5.0	200.0	40
结晶 紫	0.5	5.0	10
锥 黄 素	1.0	40.0	40
特异血清	0.5 毫升	3.0 毫升	6

表2 驯化菌株形态、菌落和生化特性的变异

菌株(代)	形 态	革兰氏染色	菌 落	生 化 特 性														
				葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	甘油	鼠李糖	果糖	杨 苷	木 胶 糖	伯 胶 糖	山 梨 糖	单 奶 糖	硫 化 氢	胍 基 质
煌 288	典 型	-	较大的S型	+	-	⊕	⊕	-	-	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-
孔 288	典型,混少量长丝	-	较小的S型	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-
结 248	典 型	-	较大的S型	+	-	⊕	⊕	-	-	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-
锥 130	典型,混少量长丝	-	S 型	⊕	-	⊕	+	-	-	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-
清 130	典 型	-	S 型	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	-	-
原 株	典 型	-	S 型	⊕	-	⊕	⊕	-	-	-	⊕	-	⊕	⊕	⊕	⊕	+	-

注: - 阴性, + 产酸, ⊕ 产酸产气。

也失去了产气的能力;各菌株均不再产生H₂S。

二、抗原性的变异

利用沙门氏菌属因子血清,对煌288、孔288、结248、锥130、清120和原株菌的抗原构造进行了检查,结果证明,均含有4,12:—: e, n, x 因子,未发生改变。

另外,应用煌150、结110、锥100及原菌株免疫家兔制备血清,然后分别与煌150、孔150、结110、锥100、清120及原

结果和讨论

对选用的菌株应用含有上述不同致变因子的培养基连续驯化了13个月,少者120代,最多288代。现将各菌株的变异情况及对小白鼠的免疫性能分述如下:

一、形态、菌落及生化特性的变异

详细结果见表2。形态上除孔288和锥130两株菌出现少量的、较原菌株长4—20倍左右的长丝外,其他3株菌的形态均典型。

菌落外观与原株比较,煌288、结248二株菌仍保持S型,但较原株稍大,孔288变为较小的S型,其它二株菌的菌落正常。

在生化特性上,煌288、结248分解葡萄糖丧失产气能力,锥130分解甘露醇时,

菌株制备的凝集原进行了试管交叉凝集反应。由表3结果看出,各驯化菌的抗原性基本上稳定在原来的状态,仅煌150菌制备的凝集素血清,对各驯化菌株的凝集性增强。

三、毒力的变异

在驯化过程中,对各菌株进行过3次毒力测定。

取各菌株的24小时培养物作成不同浓度的生理盐水混悬液,分组给体重

表 3 驯化菌株的凝集性

凝集原	凝集素血清的稀释倍数															生理盐水对照																
	煌 150							结 110					锥 100				原 株															
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:200	1:400		1:800	1:1600	1:3200	1:6400												
煌 150	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	++	#	#	#	#	+++	++	-						
孔 150	#	#	#	#	#	#	+++	#	#	#	#	#	+	#	#	#	#	+++	++	#	#	#	#	++	#	#	#	#	++	-		
结 110	#	#	#	#	#	+++	+++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	++	#	#	#	#	+++	#	#	#	#	+++	-	
锥 100	#	#	#	#	#	#	+++	#	#	#	#	#	++	#	#	#	#	#	+++	++	#	#	#	#	#	++	#	#	#	#	++	-
清 120	#	#	#	#	#	#	++	#	#	#	#	+++	++	#	#	#	#	+++	++	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-		
原菌株	#	#	#	#	#	#	+++	#	#	#	#	#	++	#	#	#	#	#	+++	#	#	#	#	#	++	#	#	#	#	#	-	

- 不凝集, +-# 不同程度的凝集强度。

18—20 克的健康小白鼠腹腔注射 0.5 毫升, 共观察 3 周, 其间死亡者一律剖检, 取心血和肝脏用 BTB 乳糖琼脂作分离培养。未死者于第 3 周捕杀, 用同样材料作培养。

与原菌株比较, 各变异菌株伴随驯化代数的增加, 其毒力均有不同程度的减弱, 尤以煌 288 及结 248 更为明显, 前者 0.2 毫克, 后者 0.4 毫克尚不能引起接种的小白鼠死亡, 第 3 周捕杀, 培养结果均阴性; 较

大剂量的注射, 小白鼠虽然不能全部耐受, 但死亡日期明显后移, 多在 10—18 天之间死亡, 进行细菌分离培养时, 只有少数菌落出现。孔 288、锥 130、清 120 三株菌的毒力虽有降低, 但与上述菌株相比, 无论在试验小白鼠的死亡率、死亡时间(多在接种后的 10 天内死亡), 或者细菌的分离情形(多出现菌苔) 来看, 均不如上述二株菌明显(表 4)。

表 4 驯化菌株毒力的变异状况

注射菌量 (毫克)	驯化菌株 (代)															原株
	煌			孔			结			锥			清			
	110	150	288	110	150	288	90	110	248	100	120	130	90	120		
0.1	1/2	0/3	0/3	2/1	2/1	2/1	0/3	0/3	0/3	1/2	0/3	0/3	3/0	2/1	3/0	
0.2	1/2	1/2	0/3	2/1	2/1	2/1	0/3	0/3	0/3	1/2	1/2	1/2	3/0	3/0	3/0	
0.4	3/0	1/2	1/2	3/0	3/0	2/1	1/2	1/2	0/3	3/0	1/2	0/3	3/0	3/0	3/0	
0.8	3/0	3/0	1/2	3/0	3/0	2/1	3/0	1/2	1/2	3/0	1/2	1/2	3/0	3/0	3/0	

小白鼠: 死亡数/存活数。

另外, 将煌 288、结 248 二个驯化株的细菌, 以普通琼脂连续通过 20 代, 以 18—20 克小白鼠连续通过 10 代后, 测毒结果表明, 其毒力仍维持在致弱后的水平。由此可见, 这二株弱毒菌的毒力至少在此复归条件下是稳定的。

四、免疫性的检查

将煌 288、结 248 二个菌株的 24 小时培养物做成每毫升含菌量为 0.5 毫克的生理盐水悬液。然后给体重 18—20 克的小白鼠皮下注射 0.2 毫升, 3 周后, 将注射的小白鼠分成 5 组, 与健康的对照小白鼠一

表 5 驯化菌株免疫性试验结果

攻击活菌量 (毫克)	小白鼠号	试 验 组				对 照 组				
		煌 288		结 248		死亡时间 (天)	细菌分离 心血 肝			
		死亡时间 (天)	细菌分离 心血 肝	死亡时间 (天)	细菌分离 心血 肝					
0.1	1	30 (捕杀)	-	-	30 (捕杀)	-	-	1	++	++
	2		-	-		-	-	1	++	++
	3		-	-		-	-	5	++	++
	4		-	-		-	-	5	++	++
	5		-	-		-	-	5	++	++
0.2	1	30 (捕杀)	-	-	30 (捕杀)	-	-	(18 小时)	++	++
	2		-	-		-	-	(20 小时)	++	++
	3		-	-		-	-	3	++	++
	4		-	-		-	-	3	++	++
	5		-	-		-	-	5	++	++
0.4	1	30 (捕杀)	-	-	14	+	+	(10 小时)	++	++
	2		-	-	14	+	+	(10 小时)	++	++
	3		-	-	14	+	+	(10 小时)	++	++
	4		-	-	30 (捕杀)	-	-	(18 小时)	++	++
	5		-	-	30 (捕杀)	-	-	(18 小时)	++	++
0.8	1	3	+	+	6	-	-	(10 小时)	++	++
	2	14	+	+	6	++	++		++	++
	3	14	+	+	7	++	++		++	++
	4	16	+	+	12	+	+		++	++
	5	30 (捕杀)	-	-	30 (捕杀)	+	+		++	++
1.6	1	3	+	++	3	++	++	(10 小时)	++	++
	2	5	+	+	3	++	++		++	++
	3	5	+	+	5	++	++		++	++
	4	7	+	+	5	++	++		++	++
	5	30 (捕杀)	-	-	6	+	++		++	++

- 培养阴性, + 培养出现菌落, ++ 培养出现菌苔。

起,用不同剂量的强毒活菌攻击。攻击后观察一个月,其间死亡者一律剖检,取心血及肝脏用 BTB 乳糖琼脂作培养,未死者在第 30 天捕杀,采取同样材料分离培养。其免疫结果见表 5。

从表 5 结果看出,对照组小白鼠攻毒后迅速死亡,分离培养证明,心血和肝脏均含有大量的攻击菌。以煌 288 株菌和结 248 株菌免疫过的小白鼠无接种损失,而且可分别保护 8 M. L. D. 及 4 M. L. D. 的

强毒活菌攻击,第 30 天捕杀,作分离培养检查时,结果均阴性。另外一部分小白鼠虽不被保护,在观察期间死亡,但死亡日期明显后延,而且培养结果与对照组相比,细菌数量少得多。

总结以上的实验结果看出,在驯化获得的 5 个弱毒菌株中,煌 288 株不但保持了典型的形态和培养特征,而且在毒力上降低到可被实验动物接受的程度,在实验条件下,对小白鼠具有较好的免疫原性,较

钾明矾死菌苗的免疫力高一倍以上^[8], 为今后进一步过渡到马体免疫, 创造了条件。

参 考 资 料

- [1] Вышегеский, С. Н.: Частная эпизоотология, Сельхозгиз, 274, 1954.
- [2] Скоморохов, А. Л.: Заразные болезни животных, Сельхозгиз, 354, 1956.
- [3] Stableforth, A. W.: Infections Diseases of Animals, Diseases due to Bacteria, 2: 521, 1959.
- [4] Erturk, O.: *Conell Vet.*, 45: 440—443, 1955.
- [5] Dhanda, M. R.: *Ind. J. Vet. Sci. and Anim. Husband.*, XXV: 245—253, 1955.
- [6] 安达秀雄: 日本兽医学杂志, 23: 125—129, 1961.
- [7] Singh, I. P., Sharma, V. K. and Kaura, Y. K.: *Brit. Vet. J.*, 127 (8): 378, 1971.
- [8] 王世若: 畜牧兽医学报, 5 (1): 72—84, 1960.
- [9] 胡体拉等: 家畜传染病学(合订本), 科学出版社, 96, 1972.
- [10] Sato, G.: *Jap. J. Vet. Res.*, 2: 21—32, 1954.
- [11] 日本农林省畜产局, 家畜卫生统计: 68, 1956.
- [12] Рево, М. В.: Ветеринарная микробиология, 244, 1958.
- [13] Вальдман, А. А.: Паратифозная инфекция, СТР, 139—150, Медгиз, 1955.
- [14] 鸟羽: 最近的兽医学, 137—145, 1951.
- [15] 鸟羽: 日本兽医学杂志, 14: 327—328, 1952.
- [16] Смолякова, Т. К.: Ветеринария, 72, 1951.
- [17] Шуляк, Ф. С.: *Труды Московской Вет. Акад.*, Том XII: 107—115, 1956.
- [18] 王煥新等: 中国兽医学杂志, 3, 106, 1958.

ATTENUATED STRAIN OF *SALMONELLA ABORTUS-EQUI* AND ITS IMMUNOGENICITY

WANG SHIRUO

(Changchun Veterinary College, Changchun)

Strains of *Salmonella abortus-equi* were serially subcultured on agar media containing brilliant green, malachite green, crystal violet, trypanflavin and specific antiserum separately. After 13 months, an attenuated strain (B.G. 288) with good immunogenicity was obtained.

Mice well tolerated the inoculation of living bacterial cell mass up to 0.2 mg, and those inoculated with 0.1 mg all survived after challenge with 8 M. L. D. of a virulent strain, while those with 32 M.L.D., about one fifth was protected.