

## 深层培养法生产无毒炭疽芽孢苗

甘肃省兽医药品厂

(兰州)

1. 以 2% 蛋白胨水溶液为培养基,以无毒炭疽芽孢为菌种,连续深层培养 2—5 代作为种子,再经深层通气培养制成芽孢苗。接种后先在 35—36℃ 连续通气培养 8 小时,然后自然降温在 31—33℃ 继续培养 16 小时至收苗。通气量为 1:3 (V/V), 24—28 小时芽孢形成率一般可达 80% 以上。此芽孢可经受 60℃ 30 分钟热处理。

2. 深层培养所得芽孢苗安全试验,对家兔注射 1 毫升(每毫升含  $1.5—2.5 \times 10^7$  活芽孢),对绵羊注射 10 毫升后动物均健活;区域试验时,对绵羊注射 0.5 毫升,对马、牛、驴、骡注射 1 毫升亦安全。

3. 免疫力试验表明,兔可获得 3/4 以上的保护,对绵羊,有二批可保护 100%,一批保护 80%。

4. 用 30% 甘油水溶液稀释成含  $10^6$  活芽孢的液体免疫绵羊,二批可抗强毒炭疽芽孢 200 个,对最小致死量强毒芽孢获 100% 保护;一批保护 75%,与固体培养芽孢苗相似。

5. 室温或 10—15℃ 保存一年至 43 个月,芽孢菌原液活芽孢死亡不显著,免疫原性稳定,免疫力强。

长期以来,许多人曾为改进预防炭疽疫苗的安全性及免疫方法进行过很多研究。但炭疽芽孢苗的生产方法,仍采用固体培养,用大型扁瓶生产,虽可提高产量和工作效率,却有生产周期长。易污染,不便操作等缺点。在无产阶级文化大革命中,广大工人批判了刘少奇、林彪的修正主义科技路线,冲破了束缚群众手脚的条条框框,在各级党组织领导下,充分发挥“三结合”技术革新小组的作用,大胆创新,深层培养无毒炭疽芽孢获得了成功。从此简化了生产工序,节约了原材料,为我国兽药生产作出了贡献。

### 一、炭疽芽孢苗的制备

**培养基:** 2% 蛋白胨水溶液,用 2N NaOH 调整 pH 至 7.6, 121℃ 灭菌 30 分钟,静置 2 天,取上清液,灭菌使用。

**菌种:** 印度系无毒炭疽芽孢和强毒炭疽芽孢(畜羊系),由农林部兽医药品监察所提供。无毒芽孢先用 2% 蛋白胨水溶液深层培养 2 代,使适应形成芽孢。每 100 毫升芽孢原液中加入 30 毫升无菌甘油,摇匀后在 10℃ 中保存备作种子用。

**芽孢苗的制备:** 培养基灭菌前加 0.2% 植物油消沫。接种后于 35—36℃ 连续通气培养 8 小时,逐渐加大通气量[3 小时后通气量为 1:3 (V/V),直至收苗],自然降温至 33—31℃,再继续培养 16 小时,芽孢形成 80% 以上(即部分芽孢游离,部分菌体中间形成空泡并成短链)时收苗。加入 0.2% 石炭酸,30% 甘油即为芽孢苗原液。稀释成  $1.5—2.5 \times 10^7$  芽孢/毫升即为芽孢苗。

本文于 1976 年 8 月 12 日收到。

## 二、芽孢苗保存试验

### (一) 耐热试验

取芽孢原液于 60℃ 处理 30 分钟, 以稀释法用培养皿计数芽孢存活数和芽孢形成率。以不加热者为对照。结果见表 1。由表 1 可见, 深层培养的芽孢原液中, 非芽孢的繁殖体甚少, 处理前后活芽孢数基本近似。

表 1 热处理前后芽孢数之比较

批号	处理前(亿/毫升)	处理后(亿/毫升)
7101	2.8	2.5
7102	2.8	2.4
7104	4.3	4.6

### (二) 活芽孢保存试验

在 10—15℃ 保存每年度制得的芽孢原液和芽孢苗, 不同时间取样计数芽孢存活率。结果见表 2。

表 2 芽孢原液、芽孢苗活芽孢保存试验

制造年份	类别	批号	产品活芽孢数(亿/毫升)	保存后活芽孢计数		活芽孢增减率*
				时间(月)	芽孢数(亿/毫升)	
71年	原液	7101	2.8	43	2.5	-10.7
		7102	2.8	43	3.0	+7.1
		7103	3.2	43	3.6	+12.5
		7104	4.3	43	3.5	-18.6
73年	原液	7301	3.3	24	3.1	-6.1
		7302	5.3	24	5.6	+5.6
		7303	4.4	24	4.8	+9.1
71年	芽孢苗	7101—1	0.1600	41	0.1400	-12.5
		7102—1	0.2100	41	0.1600	-23.8
		7103—1	0.1900	41	0.1730	-8.9
		7104	0.1800	41	0.1230	-31.7
73年	芽孢苗	7301	0.2200	12	0.1980	-9.1
		7302	0.2440	12	0.2010	-17.6
		7303	0.1910	12	0.2080	+8.9
74年	芽孢苗	7401	0.2060	15	0.2430	+17.9
		7402	0.2515	15	0.2400	-4.6

\* “+”表示增加, “-”表示减少。

由表 2 可见, 芽孢原液和芽孢苗在保存期内, 芽孢死亡率不显著。

## 三、免疫力试验和最小免疫量试验

免疫力试验用健康家兔和绵羊各 4 只, 皮下注射连续培养 5 代, 用 30% 甘油稀释成含  $10^6$ — $10^7$  芽孢/毫升的深层培养芽孢苗(0.5 毫升/只), 14 天后再次皮下注射强毒炭疽芽孢(剂量为最小致死量之 100 倍), 同时用固体培养的芽孢苗作对照, 试验该芽孢苗之免疫力, 连续观察 10 天, 结果(表 3, 4)说明, 深层培养芽孢苗的免疫力不变。

表 3 深层培养芽孢苗对家兔免疫力试验

批号	皮注免疫量(毫升)	免疫天数	攻强毒芽孢数	对家兔保护数
7101	0.5	18	100 MLD.	4/4
7102	0.5	14	100 MLD.	4/4
7103	0.5	18	100 MLD.	3/4
固体培养芽孢苗(对照)	0.5	18	100 MLD.	4/4

注: 1. 未免疫者 2/2 死于炭疽; 2. 对家兔一个致死量为 1000 个强毒炭疽杆菌芽孢。

表 4 深层培养芽孢苗对绵羊免疫力试验

批号	免 疫			攻 毒		保护数
	羊只数	皮注剂量(毫升)	天数	羊只数	剂量(毫升)	
7101	5	0.5	40	5	100 MLD.	5/5
7102	5	0.5	40	4	100 MLD.	4/4
7103	5	0.5	40	5	100 MLD.	4/5*

\* 7103 批未获全保护结果, 但家兔免疫试验合格。

将连续深层培养 5 代的炭疽杆菌芽孢原液, 以 30% 甘油溶液配成含不同活芽孢数的液体, 同时免疫绵羊, 然后以 100 万个强毒菌活芽孢(为最小致死量的 200 倍)攻毒试验其最小免疫量, 结果(表 5)表明, 炭疽杆菌芽孢苗未因连续深层培养 5 代而改变其最小免疫量。

表 5 深层培养炭疽杆菌芽孢苗最小免疫量试验\*

批号	原液含活芽孢数( $\times 10^6$ 个活芽孢/毫升)	免疫量( $\times 10^6$ 个活芽孢)	对绵羊保护只数
7301	15.5	1.0	4/4
		5.0	3/4
		7.7	3/4**, 4/4
7302	26.0	1.0	3/4
		5.0	3/4
		13.0	4/4
7303	28.4	1.0	4/4
		5.0	3/4
		14.8	4/4
固体培养芽孢苗(对照)	24.0	1.0	3/4
		5.0	4/4

\* 1. 未免疫羊, 攻毒 5000 个活芽孢后 7 天内死亡 2/2; 2. 攻强毒活芽孢数为  $1.0 \times 10^6$  个; 3. 免疫注射日期, 73.7.5。  
\*\* 第一次检查免疫羊攻毒后 12 天半死一只。

四、菌种毒力试验

用无毒菌种及经连续深层培养 5 代的芽孢液接种试管斜面, 37℃ 培养 24 小时, 再移至马丁氏肉汤中培养 24 小时, 然后用小白鼠(皮下注射剂量 0.25 毫升)、豚鼠、家兔(皮下注射剂量 0.5 毫升)测定毒力。小白鼠可引起部分或全部死亡, 豚鼠允许死亡 1/2, 家兔应健康存活。结果见表 6。

表 6 三株经不同处理的无毒炭疽菌毒力比较试验

菌 株	试验日期	试验动物	只 数	皮下注射量(毫升)	观察天数	试验结果
农林部兽医药品监察所无毒菌株	72.12.27	家 兔	2	0.5	10	健 活
	72.12.27	豚 鼠	2	0.5	10	健 活
	72.12.27	小 白 鼠	4	0.25	10	2/4 死于炭疽
适应深层培养第 5 代的菌株	72.12.27	家 兔	2	0.5	10	健 活
	72.12.27	豚 鼠	2	0.5	10	1/2 死于炭疽
	72.12.27	小 白 鼠	4	0.25	10	1/4 死于炭疽
	73. 3.14	家 兔	2	0.5	10	健 活
	73. 3.14	豚 鼠	2	0.5	10	健 活
	73. 3.14	小 白 鼠	4	0.25	10	1/4 死于炭疽
固体培养的芽孢菌(7138 批)	73. 3.14	家 兔	2	0.5	10	健 活
	73. 3.14	豚 鼠	2	0.5	10	健 活
	73. 3.14	小 白 鼠	4	0.25	10	1/4 死于炭疽

从上表看出, 深层培养第 5 代的菌株毒力稳定, 小动物试验结果与规程规定相同, 死亡动物的脾、血涂片镜检, 亦未发现菌体带有荚膜<sup>[6]</sup>。

五、安全性试验

(一) 实验室试验

家兔: 取 1.5—2.0 公斤健兔 2 只、皮下注射芽孢苗 1 毫升, 观察 10 日。

绵羊: 取健羊 3 只, 皮下注射芽孢苗 10 毫升, 观察 10 日。

试验结果表明, 受试动物全部健活。

(二) 区域性试验

在我国某些地区连续两年对羊、牛、马、骡、驴进行了广泛试用。对大家畜皮下注射 1 毫升芽孢苗, 对绵羊皮下注射 0.5 毫升, 观察 10 天。结果见表 7。先后共试验了绵羊 18325 只、马 13836 匹、骡 84 匹、驴 132 头、牛 7943 头、除极个别外, 受试动物均健活。

为了过细地观察深层培养芽孢苗免疫马匹后的安全性, 我们在某马场对 589 匹马、4 匹骡逐个地进行了免疫后安全试验观察, 结果见表 8。

由表 6、7 可见, 深层培养芽孢苗经区

表 7 区域性安全试验

批号	受 试 物	头数	皮下注射剂量(毫升)	观察天数	结 果
7104	滩 羊	601	0.5	10	安 全
7101	土种羊	80	0.5	10	注射当天死亡 1 只原因不明
7205	土种羊	261	0.5	10	安 全
7103	土种羊	41	0.5	10	安 全
7215	土种羊	118	0.5	10	安 全
7104	土种羊	1455	0.5	10	安 全
	驴	132	0.5	10	安 全
7301	土种马	400	1	10	安 全
7302	混血马	207	1	10	安 全
7303	骡	84	1	10	安 全
7301	马	8611	1	10	安 全
7302	牛	4118	1	10	安 全
	羊	5864	0.5	10	安 全
7301	马	4618	1	10	安 全
7302	牛	3825	1	10	安 全
	羊	9905	0.5	10	安 全

域性安全试验是安全的。在试验过程中,除少部分马匹注射局部有 3—4 厘米红肿块外,均未出现全身反应,说明芽孢苗是正常的。

## 六、保存期、免疫期试验

用 1 岁以内的健康藏系绵羊作试验动物。除 7301-1、7302-1、7303-1 3 批用甘油保存外,其余均用原液保存,免疫注射前以 30% 甘油或 25% 氢氧化铝胶水稀释,每批芽孢数均基本相近。每批试验免疫 6 只绵羊,每只皮下注射 0.5 毫升。

### (一) 15 个月后芽孢苗的免疫力试验

用保存 15 个月后的深层培养炭疽杆菌芽孢苗免疫羊 14 只后,以最小致死量的 500 倍剂量攻强毒,结果见表 9,可见 15 个月芽孢苗的免疫力正常。

### (二) 免疫期试验

将 3 批保存 33 个月的深层培养的芽孢苗原液进行免疫期试验,同时以固体培

表 8 骡马安全试验

芽孢苗批号	畜种	品 种	性 别	年 龄	免疫头数	皮注射剂量(毫升)	结 果
7301	马	土种	♀	1	177	1.0	全
	马	土种	♂	3	3	1.0	
	马	土种	♀	2	19	1.0	
7302-1	马	土种	♀	2	187	1.0	部
			♂	3	2	1.0	
7303	马	混血马	♂	1	186	1.0	健
	马	混血马	♂	2	6	1.0	
	马	混血马	♂	1	8	0.5*	
	马	混血马	♀	1	1	1.0	
	骡			1	4	1.0	

\* 体瘦弱。

表 9 保存 15 个月深层培养炭疽杆菌芽孢苗的免疫力

批号	保存液原有活芽孢数 ( $\times 10^6$ 个/毫升)	15 个月 后活芽孢数 ( $\times 10^6$ 个/毫升)	对羊保 护数**
7401	20.6	24.3	4/4
7403	25.15	24.0	4/4

\*\* 未经免疫羊只攻毒后死亡 2/2。

养,保存半年的芽孢苗作对照,试验结果见表 10。由表 10 可见,免疫注射前以 25% 氢氧化铝胶水稀释者,攻毒剂量为 1000 倍最小致死量,免疫期 422 天后,3 批试验动物分别被保护 60—66.6%;用 30% 甘油水溶液稀释者,两批被保护 66.6%,一批被保护 100%。另 3 批室温保存一年的芽孢苗,用 25% 氢氧化铝胶水和 30% 甘油水溶液稀释,免疫期 422 天后攻毒,保护率均分别为 66.6%,83.3% 和 100%。

因此,深层培养的炭疽杆菌芽孢原液的免疫原性是稳定的,免疫力是强的。同时,可用 25% 氢氧化铝胶水代替甘油作为稀释液,在使用疫苗之前稀释,这样,可以节约甘油。

表 10 深层培养炭疽杆菌芽孢苗, 原液保存期、免疫期试验

苗别	制苗 年别	批号	含活芽孢数 ( $\times 10^6$ 个/毫升)	稀 释 液	保存至免疫前		免疫期	对羊保护数	
					时 间 (月)	活芽孢数 ( $\times 10^6$ 个/毫升)		一次	二次
原    液	71 年	7101			33	18.60	422	2/3	
		7102		25%氢氧化 化铝胶水	33	21.20	422	2/3	
		7103			33	20.40	422	1/3	
							444		2/2
	71 年	7101-1		30%甘油水 溶液	33	20.00	422	3/3	
		7102-1		溶液	33	20.80	422	2/3	
		7103-1			33	19.46	422	2/3	
							444		2/3
芽    孢    苗	73 年	7301			12	19.80	422	2/3	
		7302		25%氢氧化 化铝胶水	12	20.10	422	3/3	
		7303			12	20.80	422	2/3	
							444		3/3
	73 年	7301+	22.0	30%甘油水 溶液	12	19.80	422	3/3	
		7302-1	24.4		12	20.10	422	1/3	
		7303-1	19.1	溶液	12	20.80	444	2/3	3/3
							444		3/3
固 体 培 养 苗	(对照)	713(4)		30%甘油 水溶液	5	18.60	422	3/3	
		708(4)			6	22.00	422	1/3	
							444		
		707(2)		水溶液	7	25.30	422	3/3	2/3

## PRODUCTION OF ANTHRAX SPORE VACCINE BY SUBMERGED CULTURE

THE MANUFACTORY OF VETERINARY PHARMACEUTICALS, GANSU PROVINCE

(Lanzhou)

1. The vaccine was prepared from an avirulent strain of *Bacillus anthracis* which was grown in 2% peptone water aerated with a rate of 1:3 by volume. The seed culture had been cultivated in the same way for 2—5 passages. The inoculated medium for the vaccine production was then incubated at 35—36°C. for 8 hours and later at 33—31°C. until the spores were well formed. A rate of more than 80% sporulation could usually be achieved at 24—48 hours, and the spores could withstand the treatment at 60°C. for 30 minutes.

2. The safety of the vaccines had been tested on rabbits and sheep in laboratory conditions. It was proved that the inoculation of 1 ml. of the vaccine into rabbits and 10 ml. into sheep were harmless. In field test, a dose of 0.5 ml. for sheep and of 1 ml. for horse, cattle, donkey, and mule were found to be innocuous.

3. The potency of the vaccines were checked on rabbits and sheep. More than

75% of the rabbits tested were able to survive the challenge, and in sheep, among three batches of the vaccines, two protected 100% and one 80% of the animals vaccinated.

4. The minimal dose of the vaccine required to develop immunity were determined. It was found that sheep could be well immunized by one million living spores suspended in 30% glycerin saline solution. After challenge by the standard virulent anthrax spores of 200 M.L.D., 100% and 75% protection were achieved in two groups of the sheep tested respectively.

5. Tests for the preservative property of the vaccines were conducted in room temperature or 10—15°C. After the storage for a period from 12 to 43 months, no apparent decrease of the living spore counts were observed. It appears that the vaccines thus made possesses high stability and immunogenicity.