

猪出血性败血病杆菌 E₀ 630 弱毒菌株的培育*

成都兽医生物药品厂

(成都)

将猪出血性败血病杆菌 (*Pasteurella suisepitica*) 强毒菌株 C44-1 在含有“海鸥”洗涤剂的马丁琼脂培养基上不断移植继代,至 630 代时得到弱毒菌株 E₀ 630。此菌几乎丧失对家兔及猪的致病力,用活菌 50 亿或 300—780 亿分别注射家兔或猪只均不能致死,但仍具有良好的免疫原性。经分别注射 0.75 亿—1 亿或 2—3 亿弱毒菌株免疫的家兔或猪只,均可抵抗强毒活菌的攻毒。E₀ 630 较稳定,连续通过不含“海鸥”洗涤剂的马丁琼脂培养基 50 代,血液琼脂培养基 23 代,或经连续接种易感猪 5 代后,对家兔及猪,毒力均无变化。此弱毒菌株可制成冻干活菌苗,用于预防猪出血性败血病。

在毛主席关于“自力更生,艰苦奋斗”的指示指引下,为适应我国畜牧事业的飞速发展,给制造猪丹毒、猪出血性败血病、猪瘟的“三联疫苗”提供猪出血性败血病杆菌弱毒菌种,1970 年由我所党委主持成立了以工人、技术人员和干部组成的“三结合”试验研究小组。试验人员以豪迈的革命精神,用了不到两年时间,成功地完成了猪出血性败血病杆菌强毒菌株的致弱培养工作,获得了安全性可靠、免疫原性较好的 E₀ 630 弱毒菌株,并已用于制造猪的“三联疫苗”。三年来用此疫苗预防注射 100 万余头猪,效果良好,深受广大贫下中农和兽医工作者的欢迎。现将试验结果介绍如下。

材 料

1. 猪出血性败血病杆菌 (*Pasteurella suisepitica*) C44-1、C44-8 强毒菌株 农林部兽医药品监察所提供。

2. 试验动物 小猪: 15—20 公斤,品种为本厂繁殖的约克夏杂交猪及四川内江猪;家兔: 1.5—2 公斤,品种为四川土种兔及青斯兰杂交兔。

3. 致弱细菌用培养基 为含有不同浓度“海鸥”洗涤剂的马丁肉汤琼脂。

方法和结果

(一) 菌株的致弱培育

将 C₄₄₋₁ 强毒菌株接种于含“海鸥”洗涤剂的马丁肉汤琼脂斜面培养基上,24 小时移殖 1 次,在培育传代过程中采用递增环氧乙烷含量及挑选有荧光的典型菌落传代的方法。自 20 代开始,用家兔测验菌株毒力减弱情况,传至 630 代用家兔作毒力及免疫原性测验,达到了预期效果,该菌株命名为 E₀ 630 (见表 1)。

由表 1 看出,100 代以前各代毒力无显著减弱现象,7—27 个活菌均能致死家兔,自 388 代起毒力明显减弱,其培养物 1480 个活菌不致死家兔;419—535 代的菌株毒力虽已显著减弱,但还不稳定,如 419 代培养物活菌 170 万不致死家兔,但 512 代培养物活菌 160 万却能致死;488 代培养物活菌 8000 万及 1.6 亿均不致死家兔,但 535 代培养物活菌 8000 万却能致死;

本文于 1976 年 8 月 8 日收到。

* 试验得到农林部兽医药品监察所的指导。南京兽医生物药品厂参加了试验工作。

表 1 致弱培育过程中各代菌株对家兔的毒力测验

培育代数	注 射 物	注 射 剂 量 结 果				备 注
		稀释度	剂 量 (毫升)	菌 数	存活/注射	
20	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁸	1	7 个	0/1	
70	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁸	1	27 个	0/1	
100	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁸	1	21 个	0/1	
388	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁸	1	15 个	1/1	
	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁶	1	1480 个	1/1	
419	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁶	1	1700 个	1/1	
	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁷	1	170 万	1/1	
488	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻⁷	1	160 万	1/1	
	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻¹	1	1.6 亿	1/1	
	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻¹	1	8000 万	2/2	
512	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻³	1	160 万	0/1	
	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻¹	1	1.6 亿	0/1	
	24 小时马丁肉汤培养物	原液	1	16 亿	0/1	
535	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻¹	1	8000 万	1/3	
580	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻¹	1	1.9 亿	1/1	
609	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻²	1	1900 万	2/2	
	24 小时马丁肉汤培养物	原液	1	19 亿	1/1	
	24 小时马丁肉汤培养物	10 ⁻²	1	1200 万	2/2	
	24 小时马丁肉汤培养物	原液	1	12.7 亿	1/1	
619	24 小时马丁肉汤培养物	原液	2	35.6 亿	1/1	
630	24 小时马丁肉汤培养物	原液	3	52 亿	1/1	第 1 次测毒力
	24 小时马丁肉汤培养物	原液	4	62 亿	1/1	第 2 次测毒力
	24 小时马丁肉汤培养物	原液	5	74.5 亿	2/2	第 3 次测毒力

表 2 致弱培养过程中对家兔的免疫原性测定

培育代数	免 疫			攻 强 毒 菌			结 果	
	注 射 物	剂 量 (毫升)	菌数(万)	菌 株	剂 量 (毫升)	菌 数 (个)	保 护	对 照 死 亡
609	24 小时马丁肉汤培养物、稀释液	1	1970	C ₄₄₋₁	1	6	2/2	
		1	1220	C ₄₄₋₁	1	6	2/2	2/2
630	同上	1	1490	C ₄₄₋₁	1	5	2/2	2/2
	同上	1	1240	C ₄₄₋₁	1	3	3/4	2/2

609 代至 630 代菌株的毒力不但显著减弱, 且已渐趋稳定, 如其中 609 代菌株培养物 1 毫升 19 亿活菌不致死家兔, 619 代菌株培养物 2 毫升活菌 35.6 亿不致死家兔, 630 代菌株培养物 5 毫升活菌 74.5 亿亦不致死家兔。

由表 2 看出, 用 609 代及 630 代菌株的 24 小时马丁肉汤培养物活菌 1220—1970 万免疫家兔能抵抗 C₄₄₋₁ 强毒菌株

3—6 个活菌(致死量为 2—4 个活菌), 证明该致弱菌株具有较好的免疫原性。

(二) E₆₃₀ 菌株的形态及培养特征

菌株为革兰氏染色阴性、无运动能力的卵圆形短杆菌, 在含 0.1% 裂解血球脱纤血及 10% 健康动物血清的马丁琼脂平板上划线, 37℃ 培养 22—24 小时, 菌落凸起, 表面光滑, 边缘整齐, 低倍显微镜 45℃ 折光观察, 菌落呈浅蓝绿色, 有萤光, 一侧

边缘有较宽的红色光带,菌落的颗粒性结构较粗糙,与 C₄₄₋₁ 原菌株菌落有显著的差异。

在马丁肉汤中生长迅速,无菌膜,菌液呈均匀浑浊。

在马丁肉汤琼脂培养基上生长良好,

菌落圆整,灰白色,潮润,半透明。

(三) E₀ 630 菌株的安全性

将 E₀ 630 菌株的 24 小时马丁肉汤培养物(静止或通气培养)及用此菌株所制冻干菌(方法见后)大剂量注射家兔及小猪,观察 10 天,结果见表 3。

表 3 E₀ 630 菌株对动物的安全性试验

注射苗类	试动物	注方法	注射菌数(亿)	结果存活/注射数	注射苗类	试动物	注方法	注射菌数(亿)	结果存活/注射数	
E ₀ 630 24 小时马丁肉汤静 止培养物 (Fg 型*)	兔	皮下	40	2/2	7205 批冻干苗 (Fg 型)	兔	皮下	50	2/2	
	兔	皮下	45	2/2		兔	皮下	75	2/2	
	兔	皮下	50	2/2		兔	皮下	100	1/1	
	兔	皮下	60	2/2		小猪	肌肉	200	1/1	
	兔	皮下	90	2/2		小猪	肌肉	300	1/1	
	兔	皮下	120	1/2		小猪	肌肉	500	1/1	
	小猪	肌肉	200	2/2		7206 批冻干苗 (nf 型**)	兔	皮下	50	1/1
	小猪	肌肉	300	2/2			兔	皮下	75	1/1
							兔	皮下	100	1/1
	E ₀ 630 马丁肉 汤通气培养物 (Fg 型)	兔	皮下	55		1/1	7401 批冻干苗 (Fg 型)	兔	皮下	50
兔		皮下	110	1/1	兔	皮下		75	2/2	
小猪		肌肉	300	4/4	7402 批冻干苗 (Fg 型)	兔	皮下	50	2/2	
小猪		静脉	100	1/1		兔	皮下	75	2/2	
小猪		肌肉	780	2/2						

* Fg 即 Fluorescent green 的缩写, Fg 型菌落在 45° 折光的低倍显微镜下观察时呈蓝绿色荧光, 这种菌落的免疫原性一般较好。

** nf 即 non-fluorescent 的缩写, nf 指无荧光菌落, 免疫原性一般较差。 nf 型和 Fg 型菌的毒力无差异。

由上表看出, E₀ 630 菌株培养物 50—75 亿活菌不致死家兔, 120 亿, 个别致死家兔; 静脉注射 100 亿活菌不致死猪, 肌肉注射活菌 300—780 亿, 4 小时后猪有轻微体温升高及略微减食现象, 证明该弱毒菌株对猪已基本上无致病力。

(四) E₀ 630 菌株的免疫原性

1. 用家兔作免疫原性试验: 将 7205、7206、7401 及 7402 四批冻干苗, 用肉汤稀释至不同菌数注射家兔进行免疫, 经 14—18 天后, 注射 C₄₄₋₁ 及 C₄₄₋₃ 强毒菌株的活菌作免疫原性试验, 结果见表 4。

由表 4 看出, 以 7500 万活菌免疫 8 批家兔, 总保护率 78.8%, 以 1 亿活菌免疫 4 批, 总保护率 81.2%, 试验证明以 7500 万

及 1 亿活菌免疫家兔, 具有较好的免疫力。

2. 用猪作免疫原性试验: 以 7205、7401 及 7402 批冻干苗, 用 20% 氢氧化铝生理盐水溶液稀释至不同菌数, 免疫注射体重 15—20 公斤小猪, 经 14—21 天, 注射 C₄₄₋₁ 强毒菌株的活菌作免疫原性试验, 结果见表 5。

由表 5 看出, 9 批猪的免疫试验中, 除用 7402 批菌苗的活菌 8000 万免疫的一批猪只保护 2/4, 效价不及格外, 其余 7 批均全保护或死亡 1 头, 9 批免疫试验中, 猪的总保护率为 79.5%; 但以 2 亿、3 亿活菌免疫的 3 批猪, 效价均能达到及格标准, 总保护率为 86.66%, 证明以 2—3 亿活菌免疫猪, 具有较好的免疫力。

表 4 E₀630 菌株对家兔的免疫原性试验

免 疫			攻 毒			结 果		备 注		
注射苗类	菌 数 (亿)	方 法	菌 株	菌 数 (个)	方 法	保 护	对 照			
E ₀ 630 (2 选) (Fg 型) 7205 批冻干苗	0.05	皮下	C ₄₄₋₁	1.6	皮下	1/3	2/2			
	0.1	皮下	C ₄₄₋₁	1.6	皮下	4/4				
	0.3	皮下	C ₄₄₋₁	1.6	皮下	0/4				
E ₀ 630 (2 选) (nf 型) 7206 批冻干苗	0.05	皮下	C ₄₄₋₁	1.6	皮下	0/4	2/2			
	0.1	皮下	C ₄₄₋₁	1.6	皮下	0/4				
	0.3	皮下	C ₄₄₋₁	1.6	皮下	2/4				
E ₀ 630 (2 选) 7205 批冻干苗	试验 第 1 次	0.3	皮下	C ₄₄₋₁	2.5	皮下	5/5	2/2		
		0.5	皮下	C ₄₄₋₁	2.5	皮下	2/5			
		0.75	皮下	C ₄₄₋₁	2.5	皮下	3/5			
	第 2 次	0.1	皮下	C ₄₄₋₁	2	皮下	2/4	2/2		
		0.3	皮下	C ₄₄₋₁		皮下	2/4			
	第 3 次	0.5	皮下	C ₄₄₋₃	80	皮下	2/4	2/2		
		0.75	皮下	C ₄₄₋₃	80	皮下	3/4			
		1	皮下	C ₄₄₋₃	80	皮下	3/4			
	第 4 次	0.75	皮下	C ₄₄₋₃	79	皮下	4/4	2/2	Fg 型 nf 型	
		0.75	皮下	C ₄₄₋₃	79	皮下	3/4			
	第 5 次	0.75	皮下	C ₄₄₋₃	80	皮下	2/4	2/2		
		1	皮下	C ₄₄₋₃	80	皮下	3/4			
	E ₀ 630 (2 选) 7401 批冻干苗	第 1 次	0.75	皮下	C ₄₄₋₁	2	皮下	4/4	2/2	
			1	皮下	C ₄₄₋₁	2	皮下	4/4		
		第 2 次	0.75	皮下	C ₄₄₋₁	2	皮下	4/4		
E ₀ 630 (2 选) 7402 批冻干苗	0.75	皮下	C ₄₄₋₁	2	皮下	3/4	2/2			
		1	皮下	C ₄₄₋₁	2	皮下			3/4	

注：按全国兽医生物药品制造及检验规程：猪出血性败血病菌苗效力判定标准是：凡对照兔全死，免疫兔、保护 2/4—4/4 者认为及格。

表 5 E₀630 菌株对猪免疫原性试验

免 疫			攻 菌			结 果		备 注
注射苗类	菌 数 (亿)	方 法	菌 系	菌 数 (个)	方 法	保 护	对 照 死	
7205 批冻干苗 (Fg 型)	1	皮下	C ₄₄₋₁	150	皮下	4/4	3/3	体重 60 斤 体重 30 斤 体重 30 斤
	1.3	皮下	C ₄₄₋₁	160	皮下	1/4		
	2.6	皮下	C ₄₄₋₁	160	皮下	5/5	3/3	
	3	皮下	C ₄₄₋₁	160	皮下	4/5	3/3	
7401 批冻干苗 (Fg 型)	0.75	耳肌	C ₄₄₋₁	76	耳肌	4/4	3/3	
	0.3	耳肌	C ₄₄₋₁	76	耳肌	4/4		
7402 批冻干苗 (nf 型)	0.8	耳肌	C ₄₄₋₁	76	耳肌	2/4	3/3	
	0.4	耳肌	C ₄₄₋₁	76	耳肌	3/4		
7401 批	2	耳肌	C ₄₄₋₁	75	耳肌	4/5	3/3	三联单苗对照

注：按全国兽医生物药品制造及检验规程：对照猪全死，免疫猪全保护或死亡 1 头，或对照猪死 2/3，免疫猪全保护为及格。

3. 免疫持续期试验：将 7401 批冻干活菌 3 亿免疫注射两组猪，一组经 4 个月注射强毒菌株 C₄₄₋₁ 活菌 60 个，保护 4/5，一组经 6 个月后注射强毒菌株 C₄₄₋₁ 活菌 65 个，保护 5/5，证明 E₀.630 菌株至少有半年的免疫持续性。

(五) E₀.630 菌株的稳定性

1. 连续在马丁琼脂斜面培养基上传代的稳定性试验：将 E₀.630 菌株移植于马丁琼脂斜面培养基上，每 24 小时移植 1 次，连续传至 50 代，用家兔作毒力及免疫原性试验，结果见表 6。

表 6 E₀.630 菌株在马丁琼脂斜面培养基上连续移植的毒力及免疫原性试验

代数	毒力试验				免疫原性试验(家兔)						结果	
	注射方法	注射只数	菌数(亿)	存活只数	免疫方法	注射菌数(万)	攻强毒菌株	菌数(个)			免疫保护	对照死亡
原代	皮下	2	50	2	皮下	7500	C ₄₄₋₁	80			2/4	2/2
20代	皮下	4	52	4	皮下	7500	C ₄₄₋₁	80			3/4	
30代	皮下	4	57	4	皮下	7500	C ₄₄₋₁	80			4/4	
40代	皮下	4	50	3	皮下	7500	C ₄₄₋₁	80			3/4	2/2
50代	皮下	4	50	4	皮下	7500	C ₄₄₋₁	80			4/4	

由上表看出，在马丁琼脂斜面培养基连续移植各代菌株培养物以活菌 50—57 亿注射家兔时，除用 40 代时的活菌注射时有一只家兔死亡外，其余均健活。与原代比较，毒力无显著增强现象，以活菌 7500 万免疫兔，保护均达到及格标准，与原代菌株免疫原性无明显差异。

连续传至 23 代，以培养物活菌 40.5 亿注射家兔 2 只，均健活，故 E₀.630 弱毒菌株在回复原来生活条件下连续传 23 代，毒力无明显增强现象，证明其弱毒性状已趋稳定。

2. 连续在鲜血琼脂斜面培养基上传代的稳定性试验：将 E₀.630 菌株移植于鲜血琼脂斜面培养基上，每 24 小时移植 1 次，

3. 连续通过猪体的稳定性试验：将 E₀.630 菌株的 24 小时马丁肉汤培养物静脉或肌肉注射于猪体，24—48 小时后采血分离到猪出血性败血病菌，以此菌的马丁肉汤培养物再注射于猪体，连续至 5 代，每代用家兔测验其毒力变化，结果见表 7。

表 7 E₀.630 菌株连续通过猪体各代毒力测验

代数	注射物	通过猪体						用家兔作毒力测验		
		注射方法	注射剂量(毫升)	注射菌数(亿)	采血分离细菌		注射猪存活/注射数	注射菌数(亿)	注射方法	结果存活/注射数
					24小时采血	48小时采血				
原代	24小时马丁肉汤培养物	静脉	7	100	+	+	1/1	45	皮下	2/2
第1代		肌肉	2	300	+	+	1/1	75	皮下	2/4
第2代	24小时马丁肉汤培养物	静脉	8	120	+	+	1/1	45	皮下	4/4
第3代		肌肉	20	300	+	+	1/1			
第4代	24小时马丁肉汤培养物	静脉	8	80	+	+	1/1	42	皮下	2/2
		肌肉	30	300	+	+	1/1	75	皮下	2/2
第5代	24小时马丁肉汤培养物	静脉	7	98	+	+	2/2			
		静脉	8	80	+	+	1/1	24	皮下	2/2
							48			

由表 7 看出，连续通过猪体数次后，E₀630 菌株的培养物的毒力无明显增强。

(六) E₀630 菌株的保存性

1. 保存期中的免疫原性试验：将保存

于 -8—15℃ 的 E₀630 菌株所制的 7205 批冻干苗在 6, 8, 10 及 15 个月后进行免疫原性试验，结果见表 8。

由表 8 看出，保存于 -8—15℃ 的

表 8 E₀630 7205 批冻干苗保存期中免疫原性试验

保存时间	保存温度 (°C)	免 疫		攻 毒		结 果	
		动 物	菌数(亿)	菌 株	菌数(个)	免疫保护	对照死亡
6 个月	-8—15	猪	1	C ₄₄₋₁	160	1/4	2/3
	-8—15	猪	2	C ₄₄₋₁	160	5/5	
8 个月	-8—15	猪	3	C ₄₄₋₁	160	4/5	3/3
10 个月	-8—15	兔	0.5	C ₄₄₋₃	80	2/4	2/2
	-8—15	兔	0.75	C ₄₄₋₃	80	3/4	
	-8—15	兔	1	C ₄₄₋₃	80	3/4	
15 个月	-8—15	兔	0.75	C ₄₄₋₃	80	2/4	2/2
	-8—15	兔	1	C ₄₄₋₃	80	3/4	

7205 批 E₀630 冻干苗，经保存 8 个月和 15 个月后，分别对猪和兔，仍然具有较好的免疫原性。

2. 保存期中的存活菌数测定：将 E₀630, 7401 批冻干苗存放于不同温度下，在不同时间作细菌存活测定，结果见表 9。

表 9 E₀630 冻干苗保存期中的菌数测定

苗 号	冻干后菌数 (亿)	保 存		测 验 菌 数		注
		温 度(°C)	时 间	存 活(亿)	存 活(%)	
7401 批	42.5	-8—15°C	6 个月	31.5	74.1	
		-8—15°C	16 个月	31.0	72.9	
	31	0—8°C	85 天	19.0	61.30	
		25°C	5 天	14.5	76.30	
			10 天	31.0	163.15	
			16 天	14.3	75.21	

由上表看出，保存于 -8—15℃ 的 E₀630 冻干苗存放 16 个月，细菌存活率 72.9%，保存于 0—8℃ 下，85 天后细菌存活率为 61.3%；保存于 25℃ 下，16 天后细菌存活率为 75.21%，证明 E₀630 菌株的冻干苗在不同温度下经过一定时间，细菌尚有 60% 以上的存活率。

结 论

将猪出血性败血病杆菌的强毒菌株

C₄₄₋₁ 在含“海鸥”洗涤剂的培养基上培育 630 代，得到了弱毒菌株 E₀630。E₀630 菌株的安全性、免疫原性、稳定性及保存性能均较好，可用于制造冻干菌苗，亦可用于配制预防猪瘟、猪丹毒和猪出血性败血病的三联菌苗。

AN ATTENUATED STRAIN OF *PASTEURELLA* *SUISEPTICA* E₀ 630

Chengdu Veterinary Pharmaceutical Plant
(*Chengdu*)

After continuous subculturing of C₄₄₋₁, a virulent strain of *Pasteurella suisseptica*, on Martin agar medium containing "Sea gull" detergent for 630 generations, this strain almost lost its pathogenicity to rabbit or swine.

Injection of such attenuated strain, E₀630, at a dosage of 50×10^8 and $300-780 \times 10^8$ living cells was not lethal to rabbit and swine, respectively. E₀630 has a desirable immunogenicity. Either swine injected with $2-3 \times 10^8$ living cells or rabbit injected with 0.75-1.0

$\times 10^8$ can resist the challenge of a virulent strain. The attenuated strain proved relatively stable as no restoration of virulence in rabbit or swine was observed after successive passage on Martin agar medium with out "Sea gull" detergent for 50 generations, on fresh blood agar medium for 23 generations or on susceptible swine for 5 generations. This attenuated strain can be used for the preparation of the lyophilized vaccine against swine hemorrhagic septicaemia.