

羊链球菌弱毒菌苗的研究

青海省兽医生物药品厂  
(西 宁)

用我厂培育出的羊链球菌弱毒菌种,制成弱毒菌苗,进行了初步试产和试用。试验证明,该弱毒菌苗较原羊链球菌氢氧化铝菌苗免疫效果好,使用方便,生产成本低,既可用于注射免疫,又可进行气雾免疫。以下报道 60 代羊链球菌弱毒菌种的培育及其主要特性。

一、弱毒菌种培育

用 6204、6310、6304 三个品系的羊链球菌强毒菌株,分别采取物理、化学、动物与物理交替等

方法进行致弱培育。其中用 6204 强毒菌株,通过鸡和高温交替传代致弱获得满意结果。强毒菌种接种鸡时,每隔七天杀一次,由脾脏分离细菌继代;通过高温时,将强毒菌接种于血液琼脂上,置 42—44℃ 高温培养 21 小时。通过鸡和高温交替致弱培育的 60 代菌种,毒力大大减弱,并保持良好的抗原性。原强毒菌种对绵羊静脉注射 2—20 万菌,对家兔静脉注射 10—70 个菌致死。而 60 代弱毒菌种对绵羊静脉或皮下注射 80—640 亿菌,对家兔皮下注射 8—120 亿菌不死(见表1、2)。

表 1 羊链球菌弱毒菌种对绵羊毒力试验

日 期	菌 种		年龄(岁)	注射方法	体温反应	观察天数	结果	本菌还原
	代数	菌数(亿)						
71.7.15	60	80	3	静脉	+	32	活	-
71.7.15	60	160	2	静脉	#	9	死	+*
71.7.15	60	320	3	静脉	++	32	活	-
71.7.15	60	640	3	静脉	++	32	活	+
71.9.17	60	160	2	静脉	++	23	活	
71.9.17	60	320	3	静脉	++	23	活	
71.9.17	60	640	3	静脉	+	23	活	+
71.10.10	60	640	3	皮下	+++	7	杀	+
71.10.10	60	160	2	皮下	++	7	杀	+
72.5.22	60	225	4	皮下	+	53	活	-
72.5.22	60	535	1	皮下	-	53	活	-

\* 误注入少量空气。

二、弱毒菌苗制造

(一) 培养基: 缓冲肉汤。

成分(%): 蛋白胨或胨 2, 氯化钠 0.2, 磷酸氢二钠 0.1, 重碳酸钠 0.2, 葡萄糖 0.2, 牛肉汤 1000 毫升。

制法: 将牛肉除去脂肪筋膜绞碎, 以碎牛肉 500 克加蒸馏水 1000 毫升, 煮沸 90 分钟补足失

去的水份滤过。按肉汤量加入 2% 蛋白胨, 0.2% 氯化钠加热至 80—90℃, 用氢氧化钠调整 pH7.2, 再徐徐加入 0.1% 磷酸氢二钠、0.2% 重碳酸钠煮沸 90 分钟, 静置沉淀 6—8 小时, 吸取上清液滤过分装于大瓶内, 经 118℃ 高压消毒 40 分钟。灭菌后培养基之 pH 为 7.6—7.8。葡萄糖配成 50% 溶液, 消毒后在接种时加入, 使其含糖量为

本文于 1977 年 6 月 14 日收到。

表 2 羊链球菌弱毒菌种对家兔毒力试验

日 期	菌 种		观察天数	存 活 数	备 注
	代 数	菌数(亿)			
71.7.15	60	8	34	1/1	
71.7.15	60	40	34	1/1	
71.7.15	60	80	34	1/1	
71.9.17	60	40	24	1/1	
71.9.17	60	80	24	1/1	
72.5.8	60	80	7	0/1	他病死亡,无本菌
72.5.8	60	80	21	3/3	
72.5.22	60	53.5	15	1/2	他病死一只,无本菌
72.5.22	60	23.5	15	2/2	
72.5.22	60	57	15	1/1	
72.5.22	60	60	15	2/2	
72.5.22	60	107	15	1/1	
72.5.22	60	120	15	1/1	

\* 注射方法为皮下注射。

0.2%。

## (二) 菌苗生产

取鲜血琼脂培养物少许,接种于缓冲肉汤小瓶中,在 37—38℃ 中培养 16—24 小时后作为种子液。种子液检验合格后按 1—3% 比例接种到生产培养基中,同时加入葡萄糖,在 37—38℃ 中培养 16—24 小时即为菌液。菌液中加入 2% 明胶、1% 疏豚、5% 蔗糖作保护剂,分装小瓶中,真空冻干即成。

## 三、弱毒菌种的特性

### (一) 稳定性

将 60 代弱毒菌种接种于鲜血琼脂斜面,在 37℃ 温度中每隔 24 小时继代一次,连续移植至 25 与 62 代,用 80—120 亿菌皮下注射家兔 5 只,观察 21—30 天无任何可见反应。用 60 代弱毒菌种缓冲汤培养物 0.4—1 毫升皮下注射小白鼠使其死亡,连续通过 10 代后以 480—640 亿菌皮下注射绵羊 4 只,观察 30 天均健活,毒力无变化。用大量 60 代弱毒菌皮下注射绵羊,7—8 天扑杀,从淋巴和脾脏分离本菌,如此连续通过绵羊 5 代后以 640 亿菌注射绵羊 1 只于第三天死亡<sup>2</sup>;以 80—160 亿菌注射绵羊 2 只,观察 70—92 天均活,从淋巴、脾脏均未分离本菌,其毒力基本稳定。

### (二) 免疫力

用 60 代弱毒菌种以 60、600、6000 万菌皮下注射绵羊 6 只,三周至一月后分两次攻 7 个致死量强毒,观察 21 天以上,免疫羊 6/6 保护,对照羊 5/6 死亡(见表 3);以每羊 2100 万菌进行室内气雾免疫,26—33 天后分两次攻 1—7 个致死量强毒,观察 13—21 天,免疫羊 4/4 保护,对照羊 5/6 死亡(见表 4);以每羊 5 亿菌进行露天气雾免疫,两次免疫 20 只,经 27—34 天抽部分羊分两次攻 1—50 个致死量强毒,观察 16—18 天,免疫羊 9/11 保护,对照羊 4/6 死亡(见表 5)。

### (三) 菌苗最小免疫量

用弱毒菌苗,以 1 万菌免疫羊 4 组分两次攻毒,第一次攻 3—15 个致死量强毒,免疫羊 3/3 保护,对照 3/3 死亡;第二次攻 50 个致死量强毒,免疫羊 3/8 保护,对照 3/3 死亡。以 10 万菌免疫羊 5 组,分两次攻毒,第一次攻 3—15 个致死量强毒,免疫羊 2/2 保护,对照 3/3 死亡;第二次攻 50 个致死量强毒,免疫羊 7/12 保护,对照 3/3 死亡。以 50 万菌免疫羊一组,攻 3 个致死量强毒,免疫羊 2/2 保护,对照 3/3 死亡。据初步试验,最小注射免疫量为 1 万菌,但攻毒量不能超过 15 个致死量。

### (四) 菌苗免疫期

分别用弱毒菌苗 10、25、500 万菌进行皮下注射免疫羊三组,经 6、7、8、12、19 个月攻 1—20 个

表 3 60 代弱毒菌种对绵羊注射免疫效力试验

次数	组 别	免 疫			攻 毒			
					菌数(万)	致死量(个)	保护数	死亡数
1	免疫组		60	2	33	787	7	2/2
	对照组					787	7	3/3
	测毒组					7.87		0/1
2	免疫组	1	600	2	26	760	7	2/2
		2	6000	2	26	760	7	2/2
	对照组					760	7	2/3

表 4 60 代弱毒菌种对绵羊室内气雾免疫效力试验

次数	组 别	免 疫			攻 毒			
					菌数(万)	致死量(个)	免疫保护	对照死亡
1	免疫组		2100	2	26	760	1—7	2/2
2	免疫组	1	2100	2	33	787	1—7	2/2
		2	77	3	33	787	1—7	1/3
	测毒组					7.8		0/1

表 5 60 代弱毒菌种对绵羊露天气雾免疫效力试验

次数	组 别	免 疫			攻 毒			
		菌数(亿)	羊数	经过天数	菌数(万)	致死量(个)	免疫保护	对照死亡
1	免疫 1 组	5	3	34	1090	50	3/3	2/3
2	免疫 2 组	5	4	27	58	1—2	2/4	3/3
	免疫 3 组	5	4	27	58	1—2	4/4	
	测 毒 组				21.8			1/1

注: 第二组气雾免疫时因气雾枪接头漏气, 雾化程度较差; 攻毒后死亡的两只羊中有一只攻毒后无体温反应, 第 13 天死亡剖检分离细菌阴性, 可能因其它原因死亡。

致死量强毒。结果见表 6。以 3、5 亿菌进行露天气雾免疫、以 3000 万菌与布氏杆菌五号苗进行联合室内气雾免疫共三组, 经 8、12、13、15 个月攻 5—20 个致死量强毒。结果见表 7。

#### (五) 菌苗安全性和效力:

近几年在本省和新疆七个县十五个场社进行露天、室内气雾免疫绵、山羊 47 万 8 千余只, 尾部皮下注射免疫绵、山羊 11 万 2 千余只, 背侧皮下注射绵羊 10 万 5 千余只。经各地试验表明: 用 60 代弱毒菌苗大小羊以 0.1—5 亿菌进行露天气雾免疫, 以 0.3 亿菌进行室内气雾免疫, 或与布氏杆菌五号苗联合室内气雾免疫均很安全, 无任何反应; 成年羊每羊以 50、100、200 万菌(两岁以

下羊减半) 进行尾部皮下注射免疫很安全, 均无可见反应; 大小羊每羊以 25—1333 万菌进行背侧皮下注射亦安全, 但对少数羊有跛行、减食等反应, 对个别有病或体质瘦弱羊会引起反应死亡。

为了考察现场试用后的实际免疫效果, 从免疫羊中, 抽取部分羊进行攻毒试验, 结果用 1.64—3 亿菌进行露天气雾, 500 万菌皮下注射, 0.3 亿菌室内或与布氏杆菌五号苗联合室内气雾, 均可获得良好的免疫力(见表 8、9、10)。

#### (六) 菌苗保存期:

前后将 20 余批(箱)冻干苗和湿苗分别保存在不同温度中, 结果含水份不超过 4% 的冻干苗, 在 5—15℃ 暗室中, 加硫脲者经 15—37 个月, 不

表 6 弱毒菌苗注射免疫期试验

菌苗批号	免 疫		攻 毒					
	日期	菌数(万)	经过时间 (月)	羊数	菌数(万)	致死量(个)	保护数	对照死亡
7101-2	72.4.25	10	6	3	87.4	20	3/3	3/3
7102-2	72.8.3	500	8	4	1085	10	3/4	3/3
7102-2	72.8.3	500	12	4	695	5	4/4	5/5
7305-1	74.6.29	25	7	3	38	1	3/3	2/3
7305-1	74.6.29	25	19	3	65	20	3/3	3/5

注：免疫方法背侧皮下,攻毒方法静脉注射。

表 7 弱毒菌苗露天、室内气雾免疫期试验

菌苗批号	免 疫			攻 毒					
	日期	菌数(亿)	方法	经过时间 (月)	羊数	菌数(万)	致死量(个)	保护数	对照死亡
7101-2	72.3.10	5	露天	8	2	87.4	20	1/2	3/3
7101-1 7102-2	72.8.3	3	露天	8	4	1085	10	4/4	3/3
7101-1 7102-2	72.8.3	3	露天	12	4	695	5	4/4	5/5
7101-2	72.3.10	5	露天	13	3	1085	10	2/3	3/3
7305-1	74.6.13	0.3	室内	15	2	33.68	5	2/2	2/3

注：室内气雾免疫系与布氏杆菌五号苗联合气雾;攻毒方法均静脉注射。

表 8 智后茂公社绵羊大群免疫效力抽查结果

菌苗 批号	组别	免 疫				攻 毒			
		方法	菌数	羊数	经过天数	菌数(亿)	致死量(个)	免疫保护	对照死亡
7201-1	1	露天气雾	1.64亿	3	21	945	10	3/3	2/3
	2	露天气雾	1.00亿	4	21	945	10	1/4	
	3	皮下注射	66万	4	21	945	10	2/4	

注：未死亡的一只对照羊在进行气雾后曾混入过免疫羊群。

表 9 湖东种羊场大群免疫效力抽查结果

菌苗 批号	组别	免 疫				攻 毒			
		方法	菌数	羊数	经过天数	攻毒量	致死量(个)	免疫保护	对照死亡
7101-1混 7102-2合	1	露天气雾	3 亿	4	41	500×1毫升	2	4/4	2/2
7102-2	2	皮下注射	500万	2	41	500×1毫升	2	2/2	

加硫脲者经 12—17 个月,活菌基本无死亡;含水份较高的冻干苗保存在 7—25℃ 中,经 12 个月,活菌平均死亡率为 50%;湿苗在 0—19℃ 室温

保存两个月,活菌死亡为 37%。

通过鸡和高温交替致弱培育的 60 代羊链球菌弱毒菌种,毒力比原强毒菌种大大减弱,并且

表 10 青海湖公社大群免疫效力抽查结果

菌苗批号	组别	免 疫				攻 毒				
		方法	菌数(万)	羊数	经过天数	菌数(万)	致死量(个)	观察天数	免疫保护	对照死亡
7305-1	1	室内气雾	3000	2	28	39	1	21	2/2	3/3
	2	室内气雾	3000	2	28	39	1	21	2/2	
	3	室内气雾	3000	2	28	39	1	21	2/2	
	4	室内气雾	3000	2	28	39	1	21	2/2	

注: 1—3 组系与布氏杆菌五号苗联合气雾, 4 组系羊链球菌弱毒菌苗单独气雾。

基本稳定, 具有良好的免疫原性。用该弱毒菌苗在各地试用均安全有效, 同时使用方便, 既可用于注射免疫, 又可进行气雾免疫, 深受群众欢迎。弱毒菌苗在现地用于气雾和尾部皮下注射很安

全, 而进行背侧皮下注射对有病或体质瘦弱的羊则有一定反应; 尾部皮下注射免疫期尚未测定, 这些问题尚待进一步研究。