

猪链球菌弱毒菌株106的培育研究^{*}

刘镇明 欧守杼 欧秀华^{**}

(畜牧兽医系)

摘 要

本文报道了猪链球菌弱毒菌株106的培育研究。从败血型猪链球菌病死亡的猪只病料中分离出猪链球菌强毒菌种。通过高温诱变的方法,培育成本弱毒菌株。这株活的弱毒菌株,可以直接制成弱毒菌苗。经室内试验和生产应用,证明此菌苗安全、有效、经济、制备简便和稳定性良好,免疫持续期约7个月。菌苗可供肌肉注射或口服免疫。在安全区使用,能有效地预防猪链球菌病的发生与流行;对正在发病的疫区和受威胁区,用作紧急预防接种,能迅速获得控制疫情的效果。

前 言

败血型猪链球菌病,是猪的一种急性传染病,病原为溶血性链球菌。中监所对广东、广西、四川、北京等省、市败血型猪链球菌病的病原进行了鉴定,初步确定为同一血清群,与Bergey所述的兽疫链球菌的特性基本一致,故暂定名为猪链球菌(*Streptococcus suis*)^[1]。

本病近年来在我国常呈地方流行性爆发,发病率和死亡率都比较高,比国外报导的严重得多,使养猪事业受到很大的损失^{[2][3][4][5][6]}。

自Hare(1942)创制链球菌死菌苗以来^[7],其他工作者相继研制了多种混合菌苗,但死菌苗的免疫效力较差,如Woods(1977)所报导的用三种不同方法制成的佐剂菌苗,须注射三次才能产生较理想的免疫效力^[10]。Engelbrecht(1968)用自然失去毒力的E组链球菌制成弱毒冻干苗,以预防由E组链球菌所引起的猪脓肿病,有一定的保护效果^[6]。到目前为止,国外尚未见到有关败血型猪链球菌病弱毒菌苗的报道。因此,研制

^{*} 本研究得到广东省生物药厂,中山、新兴、花县等县畜牧局及南海县平洲公社兽医站的大力协作和支持,特此致谢!

^{**} 邝荣禄教授审正。岑德光、白琼等讲师也参加了部分工作。

一种安全、有效的弱毒菌苗，是生产的急需。

近几年来，国内有不少单位，如广西兽医研究所，福建兽医研究所和佛山兽医专科学校等，也进行了猪链球菌弱毒菌苗的研究工作，均取得可喜的成绩。

作者于1976年初开始进行了猪链球菌苗的研究工作，在研制灭活菌苗的同时，也进行了弱毒株的培育。

材料、方法与结果

一、猪链球菌弱毒菌株106的培育

(一) 强毒菌种

选用1975年从原广东化工学院猪场病死猪分离出来的猪链球菌强毒菌株，作为培育出发菌种。为了稳定其毒力，将强毒菌株连续通过小白鼠体9代，然后用鲜血琼脂分离出来。

1. 菌落形态：于鲜血琼脂平板上置37°C内培养24小时后，菌落呈圆形、边缘整齐、浅灰色、光滑、粘稠、如露滴状，呈β型溶血。如培养时间延长，或取出置室内，则菌落增大，几天后变成干瘪，仅在培养基表面留下浅灰色的痕迹。

2. 生化反应：发酵葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨醇，产酸不产气；不发酵鞣糖、菊糖、甘露醇、卫茅醇；能水解淀粉；在含6.5%氯化钠或pH8.5以上的肉汤中均不生长。

3. 毒力：以1亿—4.9亿个菌落形成单位（以下简称菌体）皮下或肌肉注射，可致死10公斤左右的长白杂或盘克杂猪；以900—6000个菌体皮下或肌肉注射，可致死1公斤左右的家兔；以45—450个菌体皮下注射，可致死15—20克的小白鼠（见表2、3、4）。

表1 高温致弱时不同代次对小白鼠的毒力测定

代次	培养基	培养方法	接种剂量	接种途径	接种只数	死亡时间(小时)
1	新鲜牛肉汤	37°C 24小时	原液0.1毫升	皮下	4	20—45
16	" "	" " "	" "	" "	4	20—30
38	" "	" " "	" "	" "	4	45—50
59	" "	" " "	" "	" "	4	58—80
79	" "	" " "	" "	" "	4	80—90
86	" "	" " "	" "	" "	4	54—92
106	" "	" " "	" "	" "	4	96—120
120	" "	" " "	" "	" "	3	15天后仍健活

(二) 致弱的途径及方法^{[5][6]}

将通过小白鼠体分离出来的强毒菌株（S化MF₉），接种于新鲜牛肉汤培养基中，采取逐步提高温度的方法进行高温诱变培育。从37°C开始，根据继代菌种生长适应的情

表2 弱毒菌株106对猪的毒力及稳定性试验

次数	猪种	体重 (公斤)	头 数	菌种	接种 菌数	接种 途径	观察 天数	反应情况	存活 率	21天后宰杀细 菌分离情况
一	长 白 杂	20	3	$\frac{6}{106}$ (湿菌苗)	550亿	皮下	45	2只接种后减食1—2天	3/3	/
		25	4		880亿	“ ”	45	2只接种后减食1—2天	4/4	
		20	2		550亿	口服	45	无异常	2/2	
	同 上	15	2	$\frac{8}{106}$ (冻干苗)	2亿	静注	14	无异常	2/2	/
		15	4		5亿	“ ”	14	接种后3—5天,2只轻度跛行	4/4	
二	同	15	3	同	860万	肌注	21	接种后10天内体温均无明显变化。	3/3	心、血、肝、脾、下颌、淋巴结、扁桃体均未分离出链球菌。
		15	3		8600万	“ ”	21		3/3	
	上	15	3	上	8.6亿	“ ”	21		3/3	
		20	3		344亿	皮下	21		3/3	
三	同	15	3	$106pF_5$ (湿菌苗)	970万	肌注	21	同 上	3/3	同 上
		15	3		9700万	“ ”	21		3/3	
	上	15	3		29.1亿	“ ”	21		3/3	
		20	3		368亿	“ ”	21		3/3	
四	同上	20	2	$106MF_6$	326亿	“ ”	45	/	2/2	/
强 毒 对 照	同上	10	1	强 毒	1.2亿	皮下		36小时死亡	0/1	/
	盘杂	10	1	S化 MF_9	1.2亿	“ ”		24小时死亡	0/1	
	长白杂	10	2	同 上	4.9亿	“ ”		90—110小时死亡	0/2	

• 注: $\frac{6}{106}$ 分母为弱毒菌株的代号, 分子为从106代后在培养基上通过的代数。

况, 逐渐提高温度。最高到45.5°C, 多数代次在43.5—45°C之间。1—45代培养时间, 每代为12小时左右。45—106代培养时间, 每代为24小时左右。在诱变过程中, 有时每提高一次温度, 要反复几次才能适应。在44°C以上高温培养24小时后, 上清液透明, 管底有小团块沉淀。镜检时菌体多呈较长链状排列, 多数重叠在一起, 结成小团。但以此菌种继代置37°C中培养24小时, 则培养物呈一致混浊, 不形成小团块沉淀, 镜检时菌体多数呈2—12个左右的短链状排列。

诱变至106代时, 反复进行猪的安全及效力试验, 取得了各项基本数据, 因此, 定名为猪链球菌弱毒菌株106 (以下简称106)。

二、致弱菌株106的特性

(一) 菌落的形态和生化特性均与原强毒株相似。

(二) 毒力及安全性

1. 毒力的变化: 在高温培育过程中, 适当代次通过小白鼠测毒, 以观察毒力的变化 (见表1)。从表1可以看出, 随着代次的不断增加, 小白鼠的死亡时间也相应延长。在45.5°C培育至120代时, 接种小白鼠不引起死亡,

2. 毒力减弱情况及安全性

(1) 106对猪只的毒力及安全性: 用弱毒菌株106的不同代次, 分别以口服或肌肉注射接种于15—25公斤体重的长白杂种猪(见表2)经二次试验的结果表明, 猪只口服、肌肉注射或皮下注射860万—880亿个活菌, 除个别有1—2天减食外, 其余均无异常, 存活率为21/21, 比原来强毒菌株的毒力降低180倍以上。但静脉注射5亿活菌, 则引起部分猪只出现轻度关节炎, 以后自然恢复, 没有死亡, 这说明本菌株对猪仍保留有一定的毒力。

(2) 106对家兔的毒力及安全性: 用弱毒菌株106皮下注射1—1.5公斤体重的家兔, 每只皮下注射10.3—24.6亿菌, 存活率为2/2—1/2, 注射少于6.5亿菌的家兔全部健活, 比原来强毒菌株的毒力降低10万倍以上(见表3)。

(3) 106对小白鼠的毒力及安全性: 用弱毒菌株106的不同代次, 皮下注射于15—20克体重小白鼠(见表4)。从六批试验的结果可看出, 皮下注射21万—25.4万个活菌, 存活率为2/3—3/4, 皮下注射少于9.6万个活菌的小白鼠全部健活, 比原来强毒的毒力下降2000倍左右。

表3 弱毒菌株106对家兔的毒力及安全性试验

次数	只数	体 重 (公斤)	菌 种	接种菌数	接种途径	观察 天数	反 应 情 况	存活率
一	2	1.2	$\frac{6}{106}$ (湿苗)	24.6亿	皮 下	14	2只有几个温次的体温反应	2/2
	2	1.1		18.45亿	" "	14	同 上	2/2
	2	1.0		13.53亿	" "	14	同 上	2/2
	2	1.0		0.615亿	" "	14	2只有2—3个温次的体温反应	2/2
	2	1.0		0.123亿	" "	14	无 异 常	2/2
二	2	1.3	$\frac{8}{106}$ (冻干苗)	78亿	" "	14	52小时—80小时死亡	0/2
	2	1.1		52亿	" "	14	48小时死1只余1只体温较高	1/2
	2	1.1		13亿	" "	14	2只有几个温次的体温反应	2/2
三	2	1.2	$\frac{8}{106}$ (冻干苗)	20.6亿	" "	14	第7天死1只余1只有体温反应	1/2
	2	1.0		10.3亿	" "	14	同 上	1/2
	2	1.0		6.5亿	" "	14	2只有几个温次的体温反应	2/2
四	2	1.3	$\frac{9}{106}$ (冻干苗)	30.48亿	" "	20	第6天死1只余1只有体温反应	1/2
	2	1.2		19.5亿	" "	20	2只有几个温次的体温反应	2/2
五	3	1.2	$\frac{9}{106}$	10亿	" "	14		2/3
	3	1.2		5亿	" "	14		3/3
强 毒 对 照	2	1.2	强 毒S化 通过小白 鼠体九代 分离出来。	600万	" "		18—24小时死亡	0/2
	2	1.2		60万	" "		20小时死亡	1/2
	2	1.1		6000个	" "		30—45小时死亡	0/2
	3	1.2		900个	" "		30小时死亡	1/3
	3	1.1		80个	" "		14天后仍健活	3/3

表4 弱毒菌株106对小白鼠的毒力及安全性试验

次 数	只 数	菌 种	接 种 菌 数	接 种 途 径	观 察 天 数	存 活 率
一	3	$\frac{9}{106}$ (湿菌苗)	0.21亿	皮 下	14	1/3
	3		210万	" "	"	1/3
	3		21万	" "	"	2/3
	3		2.1万	" "	"	3/3
	3		0.21万	" "	"	3/3
二	2	$\frac{22}{106}$ (冻干苗)	148万	皮 下	14	0/2
	2		14.8万	" "	"	0/2
	2		1.48万	" "	"	2/2
	2		0.148万	" "	"	2/2
三	3	$\frac{4}{106}$ (冻干苗)	960万	皮 下	14	0/3
	3		96万	" "	"	0/3
	3		9.6万	" "	"	3/3
	3		0.96万	" "	"	3/3
四	3	$\frac{8}{106}$ (冻干苗)	198万	皮 下	14	0/3
	3		19.8万	" "	"	2/3
	3		1.98万	" "	"	3/3
	3		0.198万	" "	"	3/3
五	3	$\frac{9}{106}$ (冻干苗)	25.4万	皮 下	14	3/4
	3		2.54万	" "	"	4/4
	3		0.254万	" "	"	4/4
六	3	$\frac{6}{106}$	17.4万	" "	14	2/3
	3		8.7万	" "	"	3/3
强 毒 对 照	3	强 毒 S化MF ₉	24万	皮 下		0/3
	3		2.4万	" "		0/3
	3		2400个	" "		0/3
	3		450个	" "		0/3
	3		45个	" "		1/3

(三) 免疫原性

1. 106菌苗对猪的最小免疫剂量: 用弱毒菌株106的不同代次, 经皮下、肌肉注射和口服等途径, 于室内进行了三批猪的试验。各批均用中监所寄来的广西(S西), 四川(S川), 安徽(S安)三个强毒菌株(中监所的编号为C74-21、C74-24、C74-27)混合攻毒。先将三个强毒菌株分别通过猪体二代, 采取心血、肝、脾并保存于-20℃冰箱中。攻毒时, 将这些含菌材料分别进行分离, 增菌, 然后将培养物等量混合作为攻毒剂。每次攻毒前均作致死量测定。试验结果见表5。从表中可以看出, 用本弱毒株制得的菌苗, 以38万—64.5万个活菌肌注免疫的猪只, 保护率为11/15; 口服免疫的猪只,

其保护率为14/16;对照猪的死亡率均为8/10。按生物统计学的卡平方测定, $P < 0.01$, 免疫组和对照组的差异是极显著的, 也就是说, 猪只接种38万—64.5万个活菌即可引起足够耐受人工攻毒的免疫力(口服的菌苗用生理盐水稀释, 肌肉注射的菌苗用20%的铝胶生理盐水稀释)。

2. 106菌苗对猪的免疫效力试验: 用弱毒菌株106制成菌苗(湿苗或冻干苗), 以3000万—15亿活菌, 注射或口服免疫四批猪只, 经7—24天后, 以致死量的强毒攻击, 免疫猪只保护率为22/22, 对照猪只死亡率为11/12(见表6)。从表6的结果可以看出, 以3000万—6600万活菌免疫的猪只, 均能获得良好的免疫效果。

3. 106菌苗免疫猪只对几个不同地方强毒菌株攻毒的耐受性, 从表6的结果也可以看出。用106菌苗免疫的猪只, 能耐受广西(S西)、四川(S川)、安徽(S安)猪链球菌强毒菌株致死量的攻击, 也能耐受我省第一军医大学(S军)猪链球菌强毒菌株致死量的攻击。

(四) 弱毒菌株106的稳定性试验

1. 连续通过易感动物体的毒力测定: 用弱毒菌株106静脉注射或皮下注射猪只, 于接种后2—5天内, 每天抽血2次, 把分离培养出来的菌种, 经增菌后, 接种于另一头猪。按此法连续通过猪体5代, (即106PF5), 再分离出来。以后, 以15万—26万倍的最小免疫量分别肌肉或皮下注射猪只, 测定其毒力变化情况。接种后的猪只, 10天内体温均无明显变化, 除大剂量接种的猪只个别有1—2天减食外, 其余均不引起任何不良的反应, 观察21天, 存活率为12/12, 第22天宰杀取心血、肝、脾、下颌淋巴结、鼠蹊淋巴结和扁桃体作细菌分离培养, 均未能分离到链球菌。另外, 连续通过小白鼠体6代(即106MF6), 分离出来后以326亿活菌皮下注射猪只, 亦不引起任何不良反应。与原来弱毒菌株106比较, 其毒力无明显差异, 详见表2。试验表明, 弱毒菌株106连续通过猪体5代或连续通过小白鼠体6代后未发现其毒力增强而表现稳定。

2. 通过培养基连续培养的免疫原性测定: 以弱毒菌株106接种于鲜血琼脂斜面上, 37℃培养24小时为一代, 连续接种25代(即25/106)。然后用猪只测定其免疫原性, 免疫猪只保护率为3/3, 对照猪只死亡率为3/4。由此可见, 在培养基上连续通过25代仍然保持良好的免疫原性。

三、猪体的带菌和排菌情况

(一) 免疫猪只体内带菌时间的测定: 取二组猪, 每组7头, 每头以含5亿菌的弱毒菌苗肌肉注射或口服接种, 然后分别于接种后1、2、3、4、5、6、7天宰杀。剖检可见接种后5天内的猪只, 多数下颌淋巴结和鼠蹊淋巴结轻度肿胀。取心血、肝、脾、下颌淋巴结和鼠蹊淋巴结分离培养, 注射组仅于注射后3天、4天在部分猪的下颌淋巴结和脾可分离到链球菌, 口服组仅于口服后3天、5天于下颌淋巴结可分离到链球菌。试验表明, 弱毒活菌在猪体内存在的时间不长。

(二) 同居感染试验: 于口服或注射2亿和368亿活菌的两组试验猪中, 各放入健康猪只观察同居感染情况, 观察14天, 免疫猪只与同居猪只均无异常反应, 再以致死量的强毒对免疫猪及同居猪攻毒, 结果免疫猪保护率为6/6, 而同居猪保护率为0/3, 对

照猪的死亡率为3/3。结果表明：即使用大剂量的弱毒菌苗接种猪只，亦无出现同居感染的现象。

四、免疫期试验

(一) 免疫产生时间的测定：用含0.5亿个活菌的弱毒菌苗，分别经口服或肌肉注射接种猪只，于接种后第7天进行攻毒，结果肌注接种的猪只，保护率为2/2、4/4，对照猪死亡率为3/4、3/3。口服接种的猪只保护率为1/2，对照猪死亡率为3/3。试验表明，经肌肉注射免疫的猪只，第7天即可产生坚强免疫力，而经口服免疫的猪只，第7天的免疫效力仍较差。

(二) 免疫持续期测定：用含0.15亿—2.5亿的弱毒菌苗，通过口服、皮下注射或肌肉注射等途径免疫猪只，经4个月、5个月、6个月、7个月、7.5个月、11个月后，以致死量的强毒攻击，结果（见表7）。初步试验表明，经口服免疫的猪只，免疫期可达11个月，经肌肉注射免疫的猪只，免疫期达7个月左右，至11个月则免疫效力较差。

五、弱毒菌株106的保存及菌苗的制造和检验

(一) 菌种的保存

1. 真空冻干保存：将弱毒菌种接种于葡萄糖血清缓冲肉汤中，置37℃培养6至

表5 弱毒菌株106对猪的最小免疫量测定

项目 次数	组 别	猪 种	头 数	免 疫			攻 毒				结 果		
				弱毒菌种	菌数 (万)	途 径	免疫后 天数	强毒菌种	菌 数	途 径	免疫猪 保护率	对照猪 死亡率	
一	试验组	长 白 杂	2	$\frac{9}{106}$	44	口服	22	S川、S西、 S安、37℃ 15小时培 养物等量 混合。	1380个	肌注	2/2		
			2	(冻干苗)	44	肌注	22		同上	“ ”	1/2		
			3	$\frac{6}{106}$	60	口服	22		同上	“ ”	2/3		
			3	(冻干苗)	60	肌注	22		同上	“ ”	2/3		
	对照组		3						同上	“ ”		2/3	
二	试验组	同 上	3	$\frac{9}{106}$	38°	口服	45	同 上	同上	“ ”	3/3		
			2	(冻干苗)	38°	肌注	45		同上	“ ”	2/2		
			4	$\frac{8}{106}$	64.5	口服	45		同上	“ ”	4/4		
			4	(冻干苗)	64.5	肌注	45		同上	“ ”	2/4		
	对照组		4						同上	“ ”		3/4	
三	试验组	同 上	4	$\frac{8}{109}$	40	口服	20	同 上	3.12万	“ ”	3/4		
			4	(冻干苗)	40	肌注	20		同上	“ ”	4/4		
	对照组		3						同上	“ ”		3/3	

*：更小的免疫剂量未作测定。

表6 菌苗注射、口服免疫猪只的效力测定试验

项目 次数	组 别	猪 种	头 数	免 疫			攻 毒				结 果	
				弱毒菌种	菌数	途 径	免疫后 天数	强毒菌种	菌数	途 径	免疫猪 保护率	对照猪 死亡率
一	试验组	长白杂	2	$\frac{2}{106}$ (湿菌苗)	15亿	皮下	14	S _军 、37℃ 20小时培 养物	4.2亿	皮下	2/2	
	对照组	长白杂	2						4.2亿	“ ”		2/2
二	试验组	同	4	$\frac{4}{106}$	2亿	肌注	24	同 上	3.1亿	皮下	4/4	
			2	(湿菌苗)	2.5亿	口服	24		3.1亿	“ ”	2/2	
	对照组	上	3						3.1亿	“ ”		3/3
三	试验组	同	3	$\frac{26}{106}$ (冻干苗)	5180万	肌注	14	S _川 、S _西 、 S _安 、37℃、 15小时培 养物等量 混合	1320个	肌注	3/3	
			3	$\frac{8}{106}$ (冻干苗)	6600万	“ ”	14		1320个	“ ”	3/3	
	对照组	上	2	同 上	6600万	“ ”	7		1320个	“ ”	2/2	
			4						1320个	“ ”		3/4
四	试验组	同	2	$\frac{9}{106}$ (冻干苗)	3000万	口服	20	同 上	3.12万	“ ”	2/2	
			4	$\frac{4}{106}$ (冻干苗)	5600万	口服	20		3.12万	“ ”	4/4	
	对照组	上	3						3.12万	“ ”		3/3

10小时，取出纯检合格者进行真空冻干，经冻干后的菌种，保存于-20°C冰箱中，保存时间暂定一年。

2. 培养基继代保存：将弱毒菌种接种于鲜血琼脂或普通琼脂斜面上（接种前先于斜面上加入1毫升左右的无菌血清），置37°C培养16—20小时，取出纯检合格者，把试管塞包好，置4—8°C冰箱中保存，隔20—30天继代一次。在培养基上连续继代5—10代左右，通过小白鼠或家兔一代，再次分离出来保存，以便更好地保持弱毒菌株的免疫原性。

（二）菌苗的制造

1. 菌种：取冻干或琼脂斜面保存的菌种，经1—2代增菌培养，纯粹检查和观察其培养特性，进行毒力及免疫原性测定，符合要求的可供制苗用。

2. 培养基：用新鲜牛肉制成的缓冲肉汤，灭菌后加入牛或猪的无菌血清2—5%、50%浓度的无菌葡萄糖溶液0.5—1%，即成葡萄糖血清缓冲肉汤。

表 7 免疫产生期和免疫持续期的测定试验

项目 次数	组别	猪种	头数	免 疫			攻 毒			结 果		
				弱毒菌种	菌 数	途径	免疫后 天数	强毒菌种	菌 数	途径	免疫猪 保护率	对照猪 死亡率
一	试验组	长白杂	2	106	5000万	口服	7	S川、S西、 S安等量 混合	3.12万	肌注	1/2	
			4	106	"	肌注	7		"	"	4/4	
	对照组		3						"	"		3/3
二	试验组	"	2	106	6600万	肌注	7	同 上	1320个	"	2/2	
	对照组		4						1320个	"		3/4
三	试验组	"	3	106	2 亿	皮下	120	S化	4.2亿	"	2/3	
			3	106	2.5亿	口服	120		"	"	3/3	
	对照组		2						"	"		2/2
四	试验组	"	2	106	2 亿	皮下	182	S化	4.9亿	"	2/2	
			2	106	2.5亿	口服	182		"	"	2/2	
	对照组		2						"	"		2/2
五	试验组	土种	2	106	1500万	肌注	157	S川、S西、 S安等量 混合	3.762万	"	2/2	
			2	106	1500万	口服	157		"	"	2/2	
	对照组		2						"	"		1/2
六	试验组	"	2	106	1500万	肌注	218	同 上	4.175万	"	1/2	
			2	106	1500万	口服	218		"	"	1/2	
	对照组		2						"	"		2/2
七	试验组	长白杂	4	106	4500万	肌注	225	S化	4.8亿	"	3/4	
			4	106	8400万	口服	225		"	"	3/4	
	对照组		3						"	"		3/3
八	试验组	"	2	106	2 亿	肌注	330	S川、S西、 S安等量 混合	1440个	"	1/2	
			2	106	2.5亿	口服	330		"	"	2/2	
	对照组		2						"	"		1/2*

* 余 1 头猪后肢关节肿大, 卧地不起, 10天后扑杀, 肿大关节分离出链球菌。

3. 种子液: 将菌种接种于葡萄糖血清缓冲肉汤中, 37℃培养16—24小时, 纯检合格为一级种子液。然后以 2 % 的接种量把一级种子液接种于另一瓶培养基中, 置37℃培养6小时, 纯检合格为二级种子液。

4. 制苗: 将纯检合格的二级种子液, 以 2 % 的接种量, 接种于大瓶葡萄糖血清缓冲肉汤中, 置 37℃ 中培养 5—10 小时, 菌液从深褐色变成黄褐色, 一致混浊而无沉淀, pH4.9—5.5。镜检无杂菌污染, 则可进行分装及安全试验。

5. 安全检验: 用弱毒菌株 106 制造的菌苗, 每批纯粹检查合格, 并做了 6 批猪的安全试验, 以 30 亿—880 亿活菌肌肉注射或皮下注射猪只, 均表现安全。

六、菌苗保存期

(一) 液体菌苗 (湿菌苗): 菌苗收获后, 置 4—8℃ 冰箱保存 7 天, 存活数为 69—73 %, 保存 11 天, 存活数为 50—62 %。

(二) 冻干菌苗: 菌苗冻干后于 -20℃ 保存 8 个月, 由原来菌数 2.6 亿/毫升下降至 2.3 亿/毫升, 存活数为 88.5 %, 保存 13 个月, 由原来菌数 12.3 亿/毫升降至 7.3 亿/毫升, 存活数为 59.4 %; 于 8℃ 保存 8 个月, 由原来菌数 2.6 亿/毫升下降至 1.1 亿/毫升, 存活数为 42.3 %; 于 25℃ 保存 12 天, 由原来菌数 12.4 亿/毫升下降至 10.2 亿/毫升, 存活率为 82.3 % (见表 8)。从表中可看出, 冻干菌苗于 -20℃ 保存 4 个月至 8 个月仍保持足够的菌数和良好的免疫原性。

表 8 冻干菌苗保存期及对猪免疫原性测定

菌苗批号	冻干后菌数	保存温度	保存时间	存活菌数	免 疫 原 性						
					免疫头数	免疫量 (万菌)	免疫途径	免疫后天数	攻毒量	免疫猪保护率	对照猪死亡率
790211	2.6 亿/毫升	-20℃	8 个月	2.3 亿/毫升	2	5600	口服	20	S 川、S 西、 S 安培养物 等量混合 3.12 万菌/头	2/2	3/3
					2	5600	肌注	20		2/2	
790713	12.3 亿/毫升	-20℃	4 个月	11.4 亿/毫升	2	3000	口服	20		2/2	
					2	5000	肌注	7		2/2	
					4	40	口服	20		3/4	
					4	40	肌注	20		4/4	
790713	12.3 亿/毫升	-20℃	13 个月	7.3 亿/毫升							
790211	2.6 亿/毫升	8℃	8 个月	1.1 亿/毫升							
790925	12.4 亿/毫升	25℃	12 天	10.2 亿/毫升							

七、生产实际使用

(一) 安全性观察: 各批菌苗在发出之前, 均按每头猪肌肉或皮下注射 30 亿—880 亿活菌, 进行安全检验, 安检存活率为 17/17, 均表现安全。自 1978 年以来, 用弱毒菌株 106 所制造的湿菌苗和冻干菌苗, 先后在我省 10 个县市及广州市郊区发生猪链球菌病的疫区和受胁区, 免疫猪只共 1,112,133 头。其中使用湿菌苗共免疫 227,873 头, 每头免疫量为 1 亿—3 亿菌; 使用冻干菌苗共免疫 884,260 头, 每头免疫量为 3000 万—5000 万菌。免疫后只有少数猪只出现轻微的体温反应, 减食一两餐, 极个别出现跛行, 但能自然康

复。从使用菌苗的部分地区调查结果，平均反应率为0.23%，死亡率为0.01%（见表9）。从表中可看出，菌苗的安全性良好，怀孕母猪、哺乳仔猪、公猪等口服本菌苗后，亦无不良反应。

表9 生产实际使用的反应情况

地 名	免 疫						反 应				死 亡		
	菌苗 类型	途径	母 猪 (空怀 重胎)	哺乳猪	大、中猪	公猪	合 计	减食	跛行	合计	反应率	死亡 数	死亡率
中 山 县	冻干苗	口服 肌注	931	542	37,996	4	38,927	38	2	40	0.10%	4	0.01%
南海县平洲	湿菌苗	口服	3151	3752	53,580	7	60,483	320	1	321	0.53%	6	0.01%
高要县广利	冻干苗	口服	394	947	5,326	4	6,667	6		6	0.07%		
花 县	冻干苗	肌注	各种类型的猪只				206,239	309		309	0.15%	14	0.007%
新 兴 县	湿菌苗	肌注	各种类型的猪只				147,783	365	5	370	0.25%	18	0.012%
惠阳县陈江	冻干苗	口服	同		上		5,000	15		15	0.3%		
新兴船岗	湿菌苗	肌注	同		上		2,283	1		1	0.005%		
新兴鱼苗场	湿菌苗	肌注	同		上		80						
总 计							467,462	1054	8	1062	平均 0.23%	42	平均 0.01%

（二）免疫效果调查：据使用菌苗的单位反映，以及我们对一些地方的调查情况来看，本菌苗在生产实际使用中具有良好的免疫效果，特别是在疫区或受威胁区，采取紧急预防接种，都能在短时间内收到迅速控制疫情的效果。

例如开平县龙胜公社，全社共19个大队，1978年6月份生猪存栏量22,645头。1979年6月中旬，13个大队爆发流行猪链球菌病，疫情凶猛，全兽医站18个人全力医治，6个人专门处理死猪，另外还请了3个临时工，共花医药费及死猪赔偿费3497.50元，人员劳累，疫情控制不了，6月下旬到新兴县取了湿菌苗，全面进行免疫接种，结果于使用菌苗5—7天后，疫情迅速停止，至8月底只用了药费389.70元和菌苗费300元，兽医人员的工作量大大减轻，经济开支大大减少。

新兴县的船岗公社，1978年初未发生猪链球菌病时，就已经注射了菌苗，结果周围公社爆发猪链球菌病，但该公社没有发生。1979年6月用本菌苗预防注射的大队，死于猪链球菌病的猪只大大减少或不发生本病，而没有注射菌苗的大队，链球菌病死亡的猪只最多。

花县新华公社社员刘应抗，家里养了两头猪，一头注射了链球菌苗，另一头因故没有注射。一个月后，没注射菌苗的猪死于链球菌病，注射菌苗的猪与该死猪同养一栏，但不受感染。另外，有5户社员，在外地买回5头未注射本菌苗的猪，先后死于链球菌病，而原来自养的猪虽然与买进来的猪同居，但因注射了菌苗，均不发生感染。

中山县三乡、坦洲两公社，在注射本菌苗前，猪链球菌病的疫情正在爆发流行，疫区不断扩大。据统计，在注射菌苗的前6天，死于链球菌病的猪只共89头，注射菌苗后第5至第10天死亡数减少为31头，发病猪头数也大大减少，疫情得到迅速地控制。

另外, 中山县兽药厂, 南海县平洲公社兽医站, 分别从非疫点的猪场购买经 1 亿活菌口服免疫的猪只, 进行攻毒试验, 结果免疫猪保护率分别为 3/3、2/2 对照猪的死亡率分别为 2/2、2/2。据花县及新兴县反映, 用 106 的冻干菌苗与猪肺疫和猪丹毒弱毒冻干菌苗混合, 肌注免疫猪只, 安全性和免疫效果均表现良好。

广东省生物药厂监察室也曾用 106 菌株制成菌苗对猪进行效力和安全试验, 其中以 250 万活菌体免疫的猪只, 攻毒结果保护率为 3/3, 对照猪死亡率为 2/3; 以本菌苗 1000 万活菌体与猪肺疫弱毒菌苗 2000 万活菌体和猪丹毒弱毒菌苗 5 亿活菌体混合接种猪只, 观察 14 天, 均无不良反应。以后分别以猪链球菌、猪肺疫, 猪丹毒强毒进行攻击, 结果以猪链球菌强毒攻击, 免疫猪只保护率为 3/3, 对照猪只死亡率为 2/3; 以猪肺疫强毒攻击, 免疫猪只保护率为 3/3, 对照猪只死亡率为 2/3; 但以猪丹毒强毒攻击, 免疫猪只保护效果不很理想。这仅是初步试验的情况, 有待于进一步试验。

讨 论

一、弱毒菌株 106 系利用高温诱变育成。其培养特性和生化特性与原强毒菌株及广西、四川、安徽、军医大等强毒菌株基本相似。经室内试验和生产实际使用结果表明: 用 106 菌株免疫的猪只, 均能耐受上述强毒菌株致死量的攻击。因此, 说明它们之间的抗原性相同或基本上相同。

二、以本菌株 9.6 万菌皮下注射小白鼠, 6.5 亿菌皮下注射家兔, 均不引起死亡。以 880 亿菌皮下注射或 550 亿菌给猪只口服, 除个别 1—2 天减食外, 不引起其他的不良反应; 但以 5 亿菌静脉注射猪只, 则可引起部分猪只出现轻度关节炎, 以后自然康复, 没有死亡。这表明本弱毒菌株对猪仍保留一定的毒力。

三、室内试验和生产实际使用表明, 以本菌苗 3000 万—6600 万活菌肌肉注射或口服免疫猪只, 均能收到良好的免疫效果, 且口服免疫的效果比肌肉注射好。另外, 初步试验也表明, 本菌苗与猪肺疫、猪丹毒弱毒菌苗混合使用, 安全性良好, 对本病和猪肺疫的免疫效果无影响。但对猪丹毒的免疫效果, 有待进一步试验。

四、鉴于弱毒菌株 106 连续通过小白鼠 6 代或猪体 5 代之后, 以其制得的菌苗对猪只的安全性仍然良好, 为了防止弱毒菌株长期在工人培养基继代下去, 免疫原性逐渐减损以至于丧失的可能, 我们采用在人工培养基中每继代 10 代左右, 即通过小白鼠体 1 代, 适当代次再通过猪体 1 次的办法, 以稳定其抗原性。

五、据 Wessman, G.E. 等 (1976) 报导, 生长在加血清的培养中的 E 组链球菌, 能合成一种表面蛋白质, 这种蛋白质与细菌抗猪白血球吞噬的抵抗力有关, 称为抗吞噬因子, 这种抗吞噬因子与毒价和免疫性有关^[12]。因此, 我们认为, 在肉汤中加入猪或牛的无菌血清, 对于本菌株也有可能增强其免疫原性。

六、关于本菌苗对小白鼠、家兔和猪免疫原性的平行关系问题, 因进行的次数不

多,未能很好地找出规律性。但在试验过程中,本菌苗对小白鼠、家兔似乎表现免疫原性较差。

参 考 文 献

- [1] 中监所,成都兽医生物药厂猪链球菌科研协作小组,1978,猪链球菌的鉴定和菌苗的研究,《中国畜牧兽医学学会年会论文》。
- [2] 福建省龙溪地区猪链球菌病研究小组,1977,猪溶血性链球菌病初步调查报告,《畜牧兽医通讯》,1:18—25。
- [3] 四川农科院畜牧所传染病研究室,1977,猪链球菌病,《畜牧兽医通讯》,1:5—7。
- [4] 广西兽医研究所,1977,猪链球菌病报告,《兽医科技通讯》,3,15—20。
- [5] 华南农学院牧医系,禽出败弱毒菌苗的研究报告,1978,《广东农业科学》,1:49—53。
- [6] 余贺,1963,《医学微生物学》,209。
- [7] Hare,T; Fry, R.M.and, Drr A.B.First impressions of the beta haemolytic streptococcus infection of swine, Vet.Rec.1942.54(27).267。
- [8] Dunne, H.W.Diseases of swine.1975.630。
- [9] woods, R.D.and Ross, R.F.Streptococcosis of swine, Vet.Bull.1976.46.No.6 . 397。
- [10] Woods, R.D.et al.Immunogenicity of experimental streptococcus equisimilis vaccine in swine, Amer.J.vet.Res.of AVMA 1977.38.No.1.33。
- [11] Engelbrecht, H.and Dolan, M.Vaccination of swine for jowl abscesses. Oral administration of group E *Streptococcus* vaccine (live cultrute-modified).Vet.Med./Small Animal Clin.1968.63 (9).872。
- [12] Wessman, G.E.et al.Detection of antibody to the antiphagocytic factor produced by group E streptococci. Cornell Vet. 1977.67.81。

THE DEVELOPMENT AND STUDY OF ATTENUATED *Streptococcus suis* STRAIN 106

Liu Zhen-Ming, Au Shau-Chu, Au Xiu-Hua

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine

ABSTRACT

The development of the attenuated *Streptococcus suis* strain 106 and its characteristics are reported. Using high temperature as a mutagenic agent, this strain was developed from a virulent strain of *Streptococcus suis*, isolated from pigs which died of septicaemia streptococcosis. Used as a vaccine in the laboratory and the field, the live attenuated culture proved to be safe, effective, economical, easy to prepare and stable. It gave immunity lasting 7 months, and was suitable for use either by intramuscular injection or oral administration. Used in clean areas, it was found to effectively prevent the occurrence and spread of streptococcosis, and in contaminated or menaced areas, to achieve a rapid control of outbreaks when used in emergency vaccination programs.