

## 用流产布氏杆菌 19号菌苗免疫 山羊和绵羊的试验

殷善述 謝 昕 許宝麒

(农业部兽医生物药品监察所)

許多作者曾試用 19 号菌苗来免疫綿羊和山羊以預防布氏杆菌病。在綿羊方面，据 Попов 和 Абакин<sup>[1]</sup>、Софиев、Сарсенов、коломакин、Студенцов 和 Васковская<sup>[2]</sup>、Савиц 和 Морозов<sup>[3]</sup> 报告，在发生布氏杆菌病的綿羊群中使用 19 号菌苗作預防接种，可以降低流产率 2 到 10 倍左右。Иванов 和 Романов<sup>[4]</sup> 和 Иванова<sup>[5]</sup> 也証明 19 号菌苗对綿羊效果良好。Софронов 和 Новаев<sup>[6]</sup> 在綿羊群中結合检疫隔离措施使用 19 号菌苗，也看到布氏杆菌性流产有逐年下降之势。Морякова<sup>[7]</sup> 給綿羊接种 19 号菌苗后作人工感染，看到一部分羊免疫效果良好，但有一部分羊免疫不完全。Ulasevich<sup>[8]</sup> 以 19 号菌苗单独接种或与死菌苗共同接种綿羊后作人工感染时，看到大部分試驗羊未获得保护。至于 19 号菌苗对山羊的免疫效力，报告的資料还不多。Stableforth<sup>[9]</sup> 根据 Moran (1950)、Maubecin、Moran、Jurado 和 Gedro (1950) 和 Alton 和 Jones (1956) 的試驗結果，认为 19 号菌苗对山羊免疫效果不好。Spink<sup>[10]</sup> 在他的著作中甚至认为 19 号菌苗对綿羊和山羊均无效。可見关于 19 号菌苗对羊的免疫效力問題，許多作者的意見还不一致。

此外，对于如何改变制苗和接种方法，以提高 19 号菌苗的免疫效力尙未有人給予充分的注意。据 Ramon<sup>[11]</sup> 报告，加輔佐剂于活菌苗中，可以提高其对动物的免疫效力。Chernigov<sup>[12]</sup> 加氢氧化鋁于猪型布氏杆菌 61 号菌种活苗中，发现其对綿羊、豚鼠和小白鼠的免疫效力比不加者强。另据 Carrère 和 Quatrefores<sup>[13]</sup> 报告，流产布氏杆菌 112 号活菌苗与馬尔他布氏杆菌死菌苗共同注射，其免疫效果远比单独注射活菌苗或死菌苗优越。其后 Lafenetre 和 Carrère<sup>[14]</sup> 又以同样方法注射綿羊和山羊，得到了 97% 的保护作用。Renoux<sup>[15]</sup> 将 19 号菌苗与福尔馬林杀死的馬尔他布氏杆菌死菌苗共同注射豚鼠，也发现其免疫效果比单独注射 19 号菌苗好。又据 Борзенков<sup>[16]</sup> 报告，用猪布氏杆菌 61 号菌种免疫綿羊时，皮內注射所产生的免疫比皮下注射高。另外，据 Вершилова 和 Кокорин<sup>[17]</sup> 报告，19 号菌种的变种“BA”菌苗所产生的免疫力与注射剂量有关。Elberg 和 Faunce<sup>[18]</sup> 在試驗他們的 Rev-1 菌苗对山羊的免疫时，也认为 Вершилова 的看法是正确的。因此，加輔佐剂于 19 号菌苗中，或将 19 号菌苗与死菌苗共同注射，或注射适当的剂量是否可以提高 19 号菌苗对羊的免疫效力，是值得研究的問題。

鉴于我国某些地区已經开始使用 19 号菌苗来免疫綿羊和山羊，为了肯定其效果和进一步提高其效力，几年来我們在这方面进行了一些試驗，茲将試驗結果报告如下。

## 对山羊的免疫試驗

首先按照接种牛的方法对山羊进行接种。共作两次試驗,所用試驗羊均为成年山羊。給山羊皮下注射一定量 19 号菌苗后,經過一定時間皮下感染强毒馬尔他布氏杆菌,再經過一定時間,將試驗羊屠杀,每羊从左右鼠蹊、左右乳房、左右顎下、頸部和付主动脈淋巴結以及肝和脾等 10 个部位取材料作分离培养,以检查馬尔他布氏杆菌的感染情况。第二次試驗时,还以 104 M 菌苗免疫山羊作比較,試驗結果見表 1。

表 1 19 号菌苗对山羊免疫試驗結果

試驗次数	組別	注射菌苗量 (亿)	免疫時間 (天)	攻击馬尔他布氏杆菌量 (万)	剖檢距 攻毒時間 (天)	感染率 (出菌羊数 <sup>(1)</sup> / 試驗羊数)	部位感染率 (出菌部位 <sup>(2)</sup> / 受檢部位 <sup>(3)</sup> )
第一次	19 号菌苗免疫組	105	90	50	44	3/3	5/30
	对 照 組			50	44	3/3	10/30
第二次	19 号菌苗免疫組	156	150	37	30	2/2	9/19
		184	92	37	30	2/2	5/17
		156	150	148	30	2/2	8/19
	104M 菌苗免疫組	156	114	37	30	4/4	14/34
		156	114	148	30	2/2	8/17
	对 照 組			37	30	4/4	23/36
			148	30	2/2	12/18	

註: (1) 出菌羊数系指該組羊中从其体内分离出馬尔他布氏杆菌的羊数。

(2) 出菌部位系指該組羊中分离出馬尔他布氏杆菌的部位总数。

(3) 受檢部位系指从該組羊取材料作細菌檢驗的部位总数。每羊原規定从 10 个部位取材料作檢驗,但如遇有个別部位的材料污染,則略去不計。

从两次試驗結果看出, 19 号菌苗对山羊的免疫效果不好,两次試驗羊均全部感染,免疫山羊的部位感染率仅比对照羊略低。

为了提高 19 号菌苗的免疫效力,在第三次試驗中,我們根据前言中所提到的几种可能性,試用了以下几种方法:

1. 寻找适当免疫剂量;
2. 采用皮内注射法;
3. 加輔佐剂于菌苗中;
4. 用死菌苗与 19 号菌苗共同免疫山羊。

試驗之前,为了明确輔佐剂的作用,还先用豚鼠进行了一次試驗。試驗分为三組:一組注射 19 号菌苗加氢氧化鋁胶;一組注射 19 号菌苗加羊毛脂乳化剂(乳化剂制法,石腊油 180 份,羊毛脂 30 份。pH 6.3 緩冲生理盐水 180 份,在高速电动攪拌器中攪拌 5 分钟,制成雪花膏状,高压灭菌备用。用时,取乳化剂 44 份与 10 份菌苗混合,每只注射 1 毫升);一組仅注射 19 号菌苗,不加輔佐剂。46 天后攻击强毒馬尔他型菌。剖檢时,取左右鼠蹊、左右顎下和付主动脈淋巴結以及肝和脾分离布氏杆菌,并鑑定其是否属于馬尔他型,以判定免疫效力,結果見表 2。

表 2 19号菌苗加辅佐剂对豚鼠免疫试验

组别	注射菌苗种类	免疫时间 (天)	攻击马尔他 布氏杆菌量	剖检距 攻毒时间 (天)	保 护 率 (无菌豚鼠/试验豚鼠)
1	19号菌苗7亿+氢氧化铝0.2克	46	60个活菌	30	3/5
	19号菌苗4亿+氢氧化铝0.2克	46	60个活菌	30	3/5
2	19号菌苗7亿+羊毛脂乳化剂	46	60个活菌	30	4/5
	19号菌苗4亿+羊毛脂乳化剂	46	60个活菌	30	3/5
3	19号菌苗7亿, 不加辅佐剂	46	60个活菌	30	1/5
	19号菌苗4亿, 不加辅佐剂	46	60个活菌	30	2/5
对照	不注射菌苗	—	60个活菌	30	1/5

从表 2 看出, 在剂量相同情况下, 加辅佐剂的菌苗所产生的免疫比不加者约高一倍, 而且加氢氧化铝与羊毛脂乳化剂的效果大致相同。由于加石腊油羊毛脂者不易注射, 因此, 我们在第三次试验中仅用氢氧化铝胶作试验。

第三次山羊试验分为 8 组进行。

第一组 19号活干苗以缓冲生理盐水稀释成每毫升含活菌 25 亿, 每支山羊颈部皮下注射 3 毫升, 计 75 亿活菌。

第二组 菌苗同上, 每毫升含活菌 50 亿, 每支山羊颈部皮下注射 3 毫升, 计 150 亿活菌。

第三组 菌苗同上, 每毫升含活菌 83.3 亿, 每支山羊颈部皮下注射 3 毫升, 计 250 亿活菌。

第四组 菌苗同上, 每毫升含活菌 375 亿, 每支山羊尾内侧皮内注射 0.2 毫升, 计 75 亿活菌。

第五组 用缓冲生理盐水稀释 19 号活干苗后, 每 4 毫升菌液加入 1 克氢氧化铝胶, 配成的菌苗每毫升含活菌 25 亿, 每支山羊颈部皮下注射 3 毫升, 计 75 亿活菌。

第六组 菌苗配法同第五组, 每毫升含活菌 50 亿, 每支山羊颈部皮下注射 3 毫升, 计 150 亿活菌。

第七组 死菌苗和 19 号菌苗共同注射。死菌苗的制法如下: 选抗原性好的马尔他布氏杆菌三株, 用液体培养基进行培养, 先在保温箱中静止培养二天, 每天上下午各振摇一次, 再用连续振荡培养法培养二天, 然后再静止培养 15 天(每两天振摇一次), 最后按 0.5% 加入福尔马林即成死菌苗。每支山羊颈部左侧皮下注射死菌苗 3 毫升, 同时在颈部右侧皮下注射 19 号菌苗 75 亿活菌。

第八组 先注射死菌苗, 后注射 19 号菌苗, 死菌苗同第七组, 每支山羊颈部左侧皮下注射死菌苗 3 毫升, 经过 15 天后, 在颈部右侧皮下注射 19 号菌苗 75 亿活菌。

各组试验山羊于注射菌苗后经过 99—127 天分成两亚组, 第一亚组皮下注射强毒马尔他布氏杆菌 9.74—12.3 万个活菌, 另一亚组皮下注射强毒马尔他布氏杆菌 97.4—123 万个活菌。同时以同一剂量感染 20 支山羊作为对照。再经过 30 天, 将全部试验羊和对照羊屠杀, 每羊从左右乳房, 左右鼠蹊, 左右颌下, 左右颈, 肠系膜和付主动脉淋巴结以及肝、脾、肾、子宫或睾丸等 14 个部位分离马尔他布氏杆菌, 以观察免疫效力, 结果见表 3。

表 3 用不同方法免疫山羊的结果

组别	注射菌苗种类和每支羊注射菌量	免疫时间(天)	注射马尔他布氏杆菌量(万)	剖检距攻毒时间(天)	感染率(出菌羊数 <sup>(1)</sup> /试验羊数)	部位感染率(出菌部位 <sup>(2)</sup> /受检部位 <sup>(3)</sup> )
1	19号菌 75 亿(皮下)	110	9.74 97.4	30 30	6/7 } 11/13 5/6	22/93 } 43/172 21/79
2	19号菌 150 亿(皮下)	110	9.74 97.4	30 30	5/6 } 9/10 4/4	16/62 } 33/107 17/45
3	19号菌 250 亿(皮下)	127	12.3 123	30 30	6/6 } 12/12 6/6	11/86 } 20/170 9/84
4	19号菌 75 亿(皮内)	127	12.3 123	30 30	6/6 } 12/12 6/6	10/84 } 29/168 19/84
5	19号菌 75 亿加氢氧化铝	127	12.3 123	30 30	5/6 } 8/12 3/6	9/84 } 15/168 6/84
6	19号菌 150 亿加氢氧化铝	110	9.74 97.4	30 30	5/8 } 10/15 5/7	6/105 } 21/203 15/98
7	19号菌 75 亿, 死菌苗 3 毫升, 同时注射	99	12.3 123	30 30	5/6 } 9/11 4/5	10/84 } 20/154 10/70
8	死菌苗 3 毫升, 15 天后注射 19 号菌 75 亿	99	12.3 123	30 30	6/6 } 10/11 4/5	17/84 } 30/154 13/70
对照组	不注射菌苗	—	9.74—12.3 97.4—123	30 30	10/10 } 20/20 10/10	35/109 } 78/243 43/134

註: (1) (2) (3) 同表一, 但每羊受检部位为 14 个部位。

从表 3 看出, 单独注射 19 号菌苗所产生的免疫, 不能令人满意, 但加氢氧化铝于菌苗中, 免疫效力可以提高一倍左右。这个结果是与对豚鼠的试验结果(表 2)相符合的。在这次试验中, 所用三个剂量(75, 150 和 250 亿活菌) 免疫效果都不很好, 而且保护率差别不显著。从保护率方面来看, 较好的免疫剂量应该是皮下注射 75 亿活菌, 但从部位感染率来看, 则应该是 250 亿活菌。可以认为剂量在 75 到 250 亿活菌之间, 免疫效果基本上没有多大差别。

表 3 中还看到, 在剂量相同的情况下, 皮内注射并不比皮下注射优越。此外, 死菌苗与 19 号菌苗共同注射, 可以提高一些免疫效力, 但与加氢氧化铝的菌苗相比较, 还是低得多。

为了明确辅佐剂之所以能提高 19 号菌苗对豚鼠和山羊的免疫效力, 是不是由于造成长期局部带菌, 使机体经常受到刺激而引起, 曾用豚鼠进行了补充试验: 取豚鼠 54 只, 分为三组, 每组 18 只(第三组 16 只), 第一组每只皮下注射加氢氧化铝胶的 19 号菌苗, 内含活菌 10 亿; 第二组每只皮下注射羊毛脂乳化剂 19 号菌苗 1 毫升(苗的制法同前), 内含活菌 10 亿; 第三组每只皮下注射 19 号菌 10 亿, 不加辅佐剂。注射后于一定时期从各组取出豚鼠 3 只作细菌检查, 观察局部淋巴结和主要内部器官的出菌情况, 结果见表 4。

由表 4 看出, 加辅佐剂并不能延长 19 号菌在豚鼠体内的停留期, 因此加辅佐剂之所以能提高免疫力, 并不是由于长期带菌引起。

表 4 19号菌苗加辅助剂后在豚鼠体内的停留期

检验距感染天数	第一组 19号菌10亿加 氢氧化铝胶		第二组 19号菌10亿加 羊毛脂乳化剂		第三组 19号菌10亿 不加辅助剂	
	受检豚鼠数	感染豚鼠数	受检豚鼠数	感染豚鼠数	受检豚鼠数	感染豚鼠数
9	3	3	3	3	3	3
13	3	3	3	3	3	3
22	3	1+(2)	3	1+(2)	3	3
48	3	0+(3)	3	0+(3)	3	0+(2)
60	3	0+(1)	3	0+(2)	3	0+(1)
90	3	0	3	0	3	0

註: 括号外为全身感染豚鼠数, 括号内为局部感染豚鼠数。

### 对绵羊免疫试验

在实验室条件下,我们对绵羊进行了一次试验。给绵羊皮下注射 194—273 亿 19 号菌后,经过 150—180 天,每羊皮下攻击马尔他布氏杆菌 37—74 万个活菌。再经过 30 天,将试验羊和对照羊屠杀,取主要淋巴结和内部器官分离羊型布氏杆菌,结果见表 5。表 5 说明,19 号菌苗对绵羊的免疫效力比山羊好,不但试验羊的感染率比对照羊低,而且部位感染率也比对照羊显著降低。值得注意的是,对照绵羊的感染率和部位感染率比山羊低得多(参阅表 1 和表 3),这可能是绵羊对马尔他布氏杆菌的易感性较低和个体差别较大的原故。

表 5 19号菌苗对绵羊免疫试验结果

组别	接种 19 号菌活菌数(亿)	感染马尔他布氏杆菌数(万)	感染率 (出菌羊数 <sup>(1)</sup> /试验羊数)	部位感染率 (出菌部位 <sup>(2)</sup> /受检部位 <sup>(3)</sup> )
接种菌苗组	194	37	0/2	0/17
	273	37	1/2	2/22
	194	74	0/2	0/17
	273	74	0/3	0/32
对照组	—	37	2/2	4/22
	—	74	1/3	4/29

註: (1) (2) (3) 同表一。

1958年到1961年,我们在两个绵羊群中进行接种试验。接种前,先用凝集反应和变态反应法检查全群羊只,阳性者清除出群,剩下阴性羊每只皮下注射 19 号菌苗 250 亿活菌苗。以后每年秋季配种前 1—3 个月又注射一次,每年生下的羊羔,经检验为阴性者亦注射菌苗。1961 年这两群发生流产比较多,其中一群检验了 21 只流产胎儿(感染豚鼠和直接培养)均未分离出布氏杆菌。另一群检验了 16 只流产胎儿,有 4 只分离出马尔他布氏杆菌,分离出马尔他布氏杆菌的流产羊中,有三只接种过一次 19 号菌苗,有一只接种过两次。由此可见 19 号菌苗对绵羊有一定的免疫效力,但不十分坚强,在自然感染的条件下,仍有一部分接种过一次或两次菌苗的羊可以获致感染并发生布氏杆菌性流产。

## 討 論

在我們的試驗中看到,19号菌苗对綿羊的免疫效果比对山羊好,采用皮下或皮內单独注射菌苗的方法,只有极少数山羊对人工感染有免疫,大多数山羊均无免疫或免疫不完全。但采用皮下单独注射菌苗的方法,大多数綿羊对人工感染和自然感染都有免疫。只有少数羊无免疫或免疫較弱。此种差别可能是由于山羊对布氏杆菌病比較易感,其所形成的免疫容易被入侵的病菌破坏所致。綿羊对布氏杆菌的易感性是不如山羊的,而且受个体的影响很大;这不但可以从表1,表3和表5的对照羊的感染情况中看出,在Renoux等人<sup>[19]</sup>的試驗中也可以看到同样情况。由于其易感性較差和个体差别較大,加以接种菌苗后又产生一定的免疫,所以对布氏杆菌病的抵抗力就表现得比山羊坚强。当然同一疫苗菌种在不同品种的动物体内是否有不同的免疫反应也是应当考虑的問題。

在我們的試驗中,接种过菌苗的綿羊有81%对人工感染获得保护,在自然感染的情况下,大多数羊也获得了保护。据Manthei<sup>[20]</sup>和Safford<sup>[21]</sup>等人报告,接种过19号菌苗的牛約有60—75%对人工感染或自然感染具有完全免疫,因此可以认为,19号菌苗对綿羊的免疫效果大致与对牛的免疫效果相同,很有使用价值。

在我們的試驗中,加輔佐剂可以提高19号菌苗对山羊的免疫效力。提高效力的原因現在还没有弄清楚。Ramon<sup>[11]</sup>在解释加羊毛脂于白喉杆菌和炭疽芽胞苗中可以提高免疫力时认为,輔佐剂可以使注射部位发生炎症,而菌体和芽胞由于羊毛脂的保护作用,沒有很快被消灭,而逐漸游离出来,在該处大量繁殖,产生毒素或其他物质,这些物质由于受該处发炎作用的影响,毒性被减弱,不能致病,但能刺激身体产生免疫。这样的解释对19号菌苗加氢氧化鋁来說不一定符合实际,因为在我們的試驗中(表4),加氢氧化鋁后,19号菌并不局限于注射处,而在其他部位的停留時間較对照者亦并不見延长。

## 結 論

1. 在三次試驗中,用皮下和皮內单独注射19号菌苗的方法先后接种了56只山羊,只有3只(5.3%)对人工感染获得完全保护,可以认为19号菌苗对山羊的免疫不能令人滿意。

2. 氢氧化鋁可以提高19号菌苗对山羊和豚鼠的免疫效力,27只接种氢氧化鋁苗的山羊,有9只(33.3%)对人工感染获得保护,而接种不加氢氧化鋁但剂量相同的菌苗的35只山羊,只有3只(8.5%)获得保护。

3. 19号菌苗对綿羊有良好的免疫效力,但有少数羊免疫不十分坚强,在自然感染的条件下,仍可被感染而发生布氏杆菌性流产。