

沙门氏菌马流产弱毒菌苗的研究*

房晓文 阎滋荣 张士玉 张学琴
郑明 冯文达 吴范庚 程水生

(农业部兽药药品监察所)

(1978年12月20日收稿)

摘 要

我们用醋酸铊培育出两株(355、A3)毒力弱而稳定、免疫力较好的光滑型沙门氏菌马流产弱毒菌种。其中355弱毒菌种对小白鼠的毒力比A3更弱,注射7000多匹孕马都安全,更适合制造弱毒菌苗。

1972~1976年四年间用新培育成功的355马流产弱毒菌种制成弱毒冻干活菌苗,在8个省的28个牧场进行了试用,根据其中19个牧场注射7000多匹孕马所搜集的资料,在自然条件有沙门氏菌马流产疫情存在的情况下,证明用该菌苗免疫孕马,可获得良好的效果。

菌苗在已发生沙门氏菌马流产的牧场使用,16天以后沙门氏菌马流产大减,52天以后停止。

本报告,对如何选育弱毒菌种、野外试验的设计和资料的可靠性,以及免疫程序和免疫剂量等问题,还依据试验资料进行了叙述与讨论。

国外常有沙门氏马流产杆菌病的报告,我国某些养马地区也有此病^{[1]、[2]、[3]、[4]}。

预防沙门氏菌流产病,在美国^{[7]、[8]}采用灭活菌苗,据称防疫有效,但一个生产年度需进行两回预防,每回注射三次。日本^[6]、土耳其^[9]、印度^[10]等国也使用灭活菌苗。在欧洲对灭活菌苗所持的态度是有保留的^{[7]、[11]}。国内有试用灭活菌苗的,但有的马场使用效果不好。据河北省北部几个马场反映,虽使用了灭活菌苗,并未能防止沙门氏菌马流产的发生,甚至仍有爆发流行。我们为了研制免疫效力良好而又安全的菌苗用于生产,于1970年开始进行了马流产弱毒菌苗的研究。本报告简述这个研究工作的主要过程及结果。

菌 种 的 培 育

首先用死菌苗以小白鼠测定细菌免疫原性的方法,由21株沙门氏马流产杆菌菌种中选出2株(菌种号为C77-1和C77-3)免疫原性较好的菌株。再利用醋酸铊作为培育弱毒菌种的减弱剂,通过连续传代,结果在C77-3传至355代时选出一株(简称为355),C77-1传至635代时选出一株(简称为A3)毒力弱和免疫原性较好的菌株。

*参加菌苗试验的协作单位有:河北省沽源牧场、察北牧场及御道口牧场等。

菌种的特性

一、培养特性:

355和A3两株弱毒菌种在普通肉汤和1%醋酸铊肉汤中,呈均匀一致混浊生长;普通琼脂平板生长的菌落为稍突起、湿润、边缘整齐的光滑型菌落,低倍显微镜下呈致密的微沙粒样结构。菌落形态,355主要为球杆状和球状,少数为杆状;A3主要为长短不一的短杆状,少数呈球状。革兰氏染色均为阴性。生化特性与各自的原始强毒菌种基不一致。

二、菌种的毒力:

(一)致死小白鼠情况:采用腹腔注射法多次测定355、A3及其相应的原始强毒77-3和77-1致死小白鼠的情况,结果如表1。

表1 小白鼠测毒情况

菌种	剂量	死亡率	剂量	死亡率	剂量	死亡率
355	0.5亿	0%	1亿	6.2%	1.5亿	9.1%
C77-3	0.5亿	10%	1亿	60%	1.5亿	71%
A3	0.5亿	5.7%	1亿	10%	1.5亿	38.7%
C77-1	0.5亿	80	1亿	85.7%	1.5亿	100%

(二)在小白鼠体内带菌情形:用355、A3及其原代强毒C77-3、C77-1菌种,分别以0.5亿活菌皮下注射小白鼠,每隔一日剖杀三只作细菌培养,结果如表2,3。

表2 小白鼠出菌情况

菌株	带菌天数 ^①	腋下淋巴结		肝脏		脾脏		心血	
		出菌数	%	出菌数	%	出菌数	%	出菌数	%
355	6	0/9 ^②	0	0/9	0	3/9	33	0/9	0
C77-3	38	12/57	21	17/57	30	21/57	37	3/57	5.2
A3	8	0/12	0	6/12	50	8/12	67	1/12	8
C77-1	36 ^③	19/52	36.5	18/52	35	30/52	58	6/52	11.5

说明:①能分离出细菌的最长天数;②表中分母代表宰杀鼠数,分子代表出菌鼠数;③指36天宰杀仍分出菌,以后未继续测定。

表3 小白鼠出菌程度

菌株	出菌程度				总计
	*	+++	++	+	
355	0	0	0	3	3
C77-3	21	4	11	17	53
A3	1	2	2	10	15
77-1	26	10	9	28	73

说明:①符号“+”是指培养斜面生长1~5个菌落,“++”生长6~10个菌落,“+++”生长11~20个菌落,“#”为生长20个菌落以上。②数字是指所有出菌小白鼠各个出菌部位的总和。

从以上致死小白鼠和带菌试验都证明了强毒77—1的毒力最强, 77—3次之; 弱毒A 3的毒力甚弱, 355更弱。

(三)对孕兔的流产情形: 两株原始强毒菌种及其相应的两株弱毒菌种分别给怀孕10天的家兔皮下注射, 结果77—1强毒1000万个活菌引起1/3孕兔流产; 1~10亿活菌引起9/10孕兔流产。C77—3强毒2~26亿活菌共注射13只孕兔, 全部正产; 42~54亿活菌引起6/8孕兔流产。A 3弱毒52活菌注射三只孕兔全部正产。355号弱毒2~50亿活菌注射孕兔14只, 全部正产。流产胎儿进行检验, 细菌培养均阳性。

由以上结果可知, C77—1毒力甚强, 皮下注射最小致流产量约一亿活菌左右; C77—3的毒力明显地弱, 致流产量约在42~54亿之间。A 3弱毒52亿不引起流产; 355弱毒50亿活菌不引起流产; 未进行更大剂量试验。

三、菌种的稳定性:

采用生产上最常使用的普通琼脂斜面连续移植, 和对沙门氏马流产菌较敏感的小白鼠和孕兔连续通过, 观察所培育的弱毒菌种的毒力是否发生变化。试验结果355和A 3两株弱毒菌种连续通过普通琼脂20代、小白鼠五代和孕兔五代以后, 其毒力均无增强趋势。

四、菌种的抗原性:

(一)以小白鼠测验菌种的免疫原性: 取355和A 3两株弱毒菌种的培养物或其冻干菌苗, 以0.5、1.0、1.5亿三种剂量, 腹腔注射体重18~20克的小鼠, 每个剂量10只, 两周后从腹腔攻击24小时培养的强毒菌液0.25毫升(约3个MLD)。经七次试验, 355和A 3的平均保护率分别为92.7%和89.3%, 其免疫原性均良好。

(二)355活菌苗免疫马的血清学反应: 选马流产凝集试验阴性的孕马14匹分成三组, 用355活菌苗25、50、100亿三个剂量分别肌肉注射, 每月进行一次血检, 直至第12个月。在第1、2月检查时, 25亿剂量免疫的5匹, 各有一匹凝集价在 $800\times$ 以下, 50亿和100亿免疫组全在 $800\times$ 以上。第三个月检查时, 25亿组有4/5, 50亿组有3/4在 $800\times$ 以上。100亿组全在 $800\times$ 以上。到第四个月时, 25亿组有3/5, 50亿组有2/4, 100亿组有4/5在 $800\times$ 以上。说明100亿免疫组凝集反应维持时间较长。从血清学反应结果考虑, 采用100亿剂量间隔四个月两次注射(即一个生产年度注射两次)似乎是可以的。

以355菌苗100亿剂量分别对8匹初配孕马进行臀肌注射, 13天后进行血检, 同天在对侧臀肌再次注射100亿活菌, 13天后再次血检。结果两次血检凝集价没有明显差异。依此推测没有必要在短期内进行两次免疫注射。

弱毒菌苗在马场试用效果

一、菌苗: 在1972~1976年期间, 以355号弱毒菌种试制冻干菌苗33批, 菌苗冻干后的活菌率为59~88%, 残余水份在1.6~3.8%范围。用小白鼠进行安全性检验, 以1.5~2亿活菌腹腔注射, 小白鼠生存81.7~100%。以1亿或1.5亿活菌腹腔免疫小白鼠, 14~21天攻击5个致死量强毒菌, 检验菌苗效力, 保护率为86.4~94.9%, 平均总保护率为91%。

二、对怀孕马的反应观察: 在大规模试用冻干苗之前, 曾以20~100亿活菌剂量给66匹怀孕马肌肉注射, 另又以100亿和200亿活菌剂量给8匹孕马口服, 观察60天。结果肌肉注射的普遍有体温反应(40℃以上持续1~2天的5匹, 其余均在40℃以下), 口服

的无反应。精神食欲普遍正常。没有发生苗原性流产。可以扩大试用。

三、预防沙门氏菌流产效果观察：1972年开始至1976年止，将355菌冻干苗先后发至28个牧场试用，共发出30000余匹剂。菌苗稀释剂主要用20%氢氧化铝胶悬液，也用生理盐水加花生油或单纯生理盐水；第一年用25、50、100亿活菌注射一次；第二年改用头年9~10月和次年1~2月期间，各注射菌苗一次的免疫程序，免疫剂量为100亿活菌，从我们重点掌握及调查收集到材料的26个牧场(群)的试验情况，自1972年以来共注射孕马7279匹，除1匹马出现过敏反应，经用肾上腺素处理恢复正常外，余无不良反应，其免疫效果是良好的。现按不同情况，将菌苗效力归纳如下：

(一)从有疫情、有对照、有细菌检验的马群中看355号弱毒菌苗的免疫效果：有3个牧场11个沙门氏菌流产马群，自1972年秋试用355弱毒菌苗，每年每个马群均留有1/3~1/2的不注苗的对照孕马，并对多数流产病例进行细菌学检验，结果见表4。

表4 355号弱毒菌苗在11个沙门氏菌流产疫队的免疫效果

生产年度	试验队(群)数	组别	免疫次数(1年度)	免疫剂量	试验孕马数	流产数	细菌培养检验			沙门氏菌流产数	沙门氏菌流产率(%)	沙门氏菌流产保护率(%)
							检数	阳性数	阳性率(%)			
1972—1973	4	免疫	1	25~50亿	369	18	13	*6 ^①	46.2	8.3	2.25	72.3
		对照	—	—	271	31	24	*17 ^②	70.8	21.9	8.1	0
1973—1976	7	免疫	2	100亿	357	13	9	0	0	0	0	100
		对照	—	—	462	70	46	28	60.9	42.6	9.2	0

* ①沙门氏菌阳性流产马为御道口牧场第八和第十七队的材料。

* ②17匹对照阳性中有13匹是此两队的。另4匹为涪源牧场及炮台营子各2匹。

说明：①沙门氏菌流产保护率 = $\frac{\text{免疫马数} \times \text{对照组阳性流产率} - \text{免疫组阳性流产数}}{\text{免疫马数} \times \text{对照组阳性流产率}} \times 100$

②对照组阳性流产率 = $\frac{\text{对照组流产数} \times \text{对照组菌检阳性率}}{\text{对照组马数}} \times 100$

③免疫组阳性流产数 = 免疫组流产数 × 免疫组菌检阳性率

④沙门氏菌流产数：是指根据细菌学检验阳性率推算全部流产马应占的阳性流产数。

⑤沙门氏菌流产率：是指占全部试验马的阳性流产率。

以上结果表明，355弱毒菌苗的免疫效力是良好的，其中1972~1973年在御道口牧场有二个马队的免疫组仍出现沙门氏菌流产，这可能与该生产年度只采用一次免疫、注射剂量小(25亿和50亿)有关。另外，该场为防止马流产，历来就有给孕马服用大蒜、松枝、卤碱和高锰酸钾、土霉素等药物的作法，这也可能影响活菌苗的免疫效力。1973年后，改用100亿每年注射2次，御道口牧场并停止喂药。几年来7个马群的357匹孕马中，无一出现沙门氏菌流产，而对照马462匹按细菌学检验沙门氏菌阳性率推算，则沙门氏菌流产为42.6匹。按对照马沙门氏菌流产率计算，免疫马获得对沙门氏菌流产100%的保护力。证明355菌苗的免疫效果是良好的。

(二)355弱毒菌苗在有严重流产历史的马场中试用效果的观察：有五个马场在试验前一年或连续几年发生过严重的流产，有的已作出确诊为沙门氏菌流产。这些场的孕马都全数注射，未留对照，试验期为1~4年，其免疫效果见表5。

表 5 355 号弱毒菌苗在有严重流产史的马场试用情况

场 别	未用 355 号活菌苗前流产情况					试用 355 号活菌苗后流产情况				
	生产年度	孕马数	流产数	流产率 (%)	检验结果	生产年度	年平均孕马数	年平均流产数	年平均流产率 (%)	年平均检验阳性率 (%)
康保“五·七”牧场	1971~1972	163	64	39.2	沙门氏菌	1972~1976 四 年	134	5.5	4.1	0.37*
察北牧场二分场	1971~1972	265	125	47.1	沙门氏菌	1972~1976 四 年	122.3	14.8	12	0
内蒙大黑河奶牛场	1973~1974	56	29	51.8	沙门氏菌	1974~1976 二 年	51.5	0	0	0
沽源杨家营子马场	1970~1971	100	50	50.0	沙门氏菌	1973~1974 一 年	80	0	0	0
沽源牧场二队	1973~1974	68	6	8.8	检 1 匹阳性	1974~1975 一 年	66	4	5.8	0

*康保“五、七”牧场1973年、1976年各出现沙门氏菌流产一匹,是注苗后第7、8个月时流产的。

以上五个场(队)试验前都有1~2年的严重流产史,经检验均为沙门氏菌流产,用355菌苗后二个场没有发生流产,三个场流产率大幅度下降,经细菌学检验仅康保五七牧场有两个年度各出现沙门氏菌阳性流产一匹,系发生于注苗后第7、8个月期间外,其余检验都未出现沙门氏菌流产。说明已收到良好防疫效果。

(三)355弱毒菌苗在已发生沙氏菌流产的马群中试用效果的观察:1973~1975年察北牧场有三个马群,在注射菌苗前约一个月期间发生沙门氏菌流产,其流产严重程度为:四分场场部马群34匹孕马,流产5匹(14.7%);一分场纯种马群175匹孕马,流产17匹(9.9%);一分场农业队33匹孕马流产3匹(9.1%)。其时场方要求把三群余下的217匹孕马,全部以355号菌苗进行免疫,免疫剂量为肌肉注射活菌100亿,其中一分场纯种群同时口服100亿。免疫后16天以内,四分场场部群出现流产4匹(13.7%);一分场纯种群出现流产4匹(2.5%);一分场农业队出现3匹(10%)。41~52天期间四分场场部群出现流产2匹(8%);一分场纯种群出现2匹(1.3%);一分场农业队出现1匹(3.7%)。以上流产胎儿经检验均为沙门氏菌流产,52天以后未再出现沙门氏菌流产。

以上试验结果表明,355弱毒菌苗用于已发生沙门氏菌流产疫群中须在52天以后才能杜绝沙门氏菌流产。有文献记载^[5],沙门氏菌流产潜伏期为12~70天。其中有二群马注射后16天以内基本没有降低流产率(13.7%和10%),这似乎可以认为是注苗前就已感染了沙门氏菌而流产。至于在41~52天期间还发生少数流产的问题,可能是注射前或注射后在还没有产生免疫力前感染的。另外41~52天期间有一群流产率为8%,是因为这时该场正爆发病毒性流产,可能影响沙门氏菌与流产免疫力的关系。

(四)355号弱毒菌苗在留有对照马群中试用、但未作流产检验的情况下的效果观察:几年来共计有七个牧场进行了此项协作试验,共注射孕马1413匹,留对照马842匹,试验结果各场免疫马总合流产率(括号外数字)及对照马总合流产率(括号内数字)如下:围场县种畜场为3.5(10.2)%;围场县种羊场为3.3(6.8)%;丰宁县种畜场为9.7(21.2)%;鱼儿山牧场为0(5.6)%;贵南军马场为4.6(15.4)%;张北县“五七”马场为9.4(13.2)%;

武清县运输公司马队为9.5(19.2)%。总计各场免疫马流产率为5.17%，对照马流产率为11%。因为流产胎儿未作细菌学检验，未能判断实有的沙门氏菌流产情况。但从免疫马流产率普遍比对照马低，而且有的马场下降非常明显来看，说明注射355弱毒菌苗后收到了较好的防止流产效果。

讨 论

在过去培育仔猪副伤寒时体会到要培育出较为理想的弱毒菌种，有几个基本条件：

1. 供培育的菌种最好能选其毒力较弱的；2. 菌种的抗原性要较好的；3. 培育菌种的减弱剂要作用缓和的；4. 培育过程中，要选择光滑型的菌落。这次马沙门氏菌流产弱毒菌种培育中，运用这些经验，又得到了比较理想的结果。

在我们现有试验室条件，要进行较大规模的怀孕马的试验，的确有困难。要肯定菌苗的实用价值，只能利用马场试用的数据来解决。在这次试验中，我们重点抓了细菌学诊断条件较好的察北、沽源、御道口三个马场。每群孕马只约半数进行免疫注射，留约半数作为对照。遇有流产，就进行细菌检验，明确流产性质。对其他的马场，因细菌诊断条件较差，其流产材料多未进行检查，但统计数字准确。采用这样的方法连续进行了四年的试验，其所得数据用于判断菌苗的效果，我们认为是可靠的。

通过四年来注射的7000多匹孕马(对照马5000多匹)，获得较为良好的防止沙门氏菌马流产效果，表明355弱毒菌苗的免疫效力比灭活菌苗好得多。据我们调查几个牧场曾采用春秋两季各间隔7~10天注射灭活菌两次的免疫方法，并未获得防止流产的效果，在使用灭活菌苗之后不久，又爆发了沙门氏菌流产。这与国外一些报道是符合的。

根据孕马血清凝集反应检查结果，在短期内(隔13天)两次注射活菌苗的凝集价不比一次注射高。这可能是由于第一次注射所产生的高抗体价的干扰，致第二次注射没有起作用的关系。孕马注射活菌25、50和100亿三种剂量产生抗体的持续时间，有剂量愈大持续时间愈长的倾向。其中100亿剂量在免疫后4个月有4%的凝集价仍维持在800~1600倍的范围。从血清抗体持续时间考虑，一个生产年度间隔4个月进行两次注射，每次剂量以100亿活菌似乎合适。当然菌苗的效力还与细胞免疫相联系，不能单凭体液免疫作为依据。

355弱毒菌苗虽然收到了防止沙门氏菌流产的明显效果。但是从四年来的实践证明，许多马场所发生的流产，有不少不属于沙门氏菌流产。在我们试验的全部对照马5000多匹所发生的流产600多例，其中300多例作过细菌培养检查，有75%左右不属于沙门氏菌流产，即在较严重的沙门氏菌流产群的对照马的流产，也有37%左右不属于沙门氏菌流产。情况十分清楚，专靠沙门氏菌流产菌苗来解决全部流产问题是不可能的。据我们检验与诊断，在非沙门氏菌流产中，病毒性流产占有重要位置。此外还出现因气候变化，饲养管理条件差等原因引起的非传染性流产。这些问题都有待分别解决。

参 考 文 献

- [1] 史振兴、刘金波(1955).广灵县马驴流产调查报告。中国畜牧兽医杂志 第2期 87~89页。
- [2] 王焕新、马中庆(1958).马副伤寒性流产。中国兽医杂志 第3期 106页。
- [3] 庄操礼.(1964).马副伤寒性流产的临床观察。中国兽医杂志 第6期 第9~11页。
- [4] 王世若.(1960).马副伤寒性流产的自动免疫研究(第一报)。畜牧兽医学报 第5卷 第1期 72页。
- [5] A.N.斯科莫罗霍夫(1956).家畜传染病学。沈正达等译(1958).家畜传染病学(上册), 395页。南京: 畜牧兽医图书出版社。
- [6] 北里研究所编.(1974).动物用疫苗。63~68页。东京: 养贤堂出版。
- [7] Brunner and Gillespie (1973). Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animals. 6th edition, P.156.Ithaca: Cornell Univ.
- [8] Merchant and Packer.(1967).Veterinary Bacteriology and Virology, 7th edition,p.142.The Iowa state University Press,Ames,Iowa,U.S.A.
- [9] Erturb.Omer.(1955) A *Salmonella abortus-equi* bacterin prepared by treating suspensions of the organism with formalin and chrome alum.The Cornell Veterinarian,p.440-443.
- [10] Dbanda,M.R.,J.M.Hall and M.M.Singh.(1955) Studies on *Salmonella equi* vaccine.Ind.I.Vet.Sci.and Anim.Hush.XXV: 245-253.
- [11] Buxton A. and H.I.Field.(1959) Salmonellosis.Infectious Diseases of Animals.Diseases due to bacteria,Vol.2,p.519.London. Buterworths Scientific Publication.

STUDIES ON AN ATTENUATED VACCINE OF
SALMONELLA ABORTUSEQUI

Fang Xiaowen, Yan Zirong, Zhang Shiyu, Zhang Xueqin, Zheng Ming, Feng Wenda, Wu Fangeng, Chang Shuisheng
*The Control Institute of Veterinary Bioproducts and
Pharmaceuticals, Ministry of Agriculture*

Summary:

By using thallium acetate as an attenuating agent, an avirulent variant was obtained from a virulent strain of *Salmonella abortus-equi*. The attenuated strain 355 was a smooth form. The strain differed from the virulent strain in that its pathogenicity for mice and pregnant rabbits had markedly reduced and it became resistant to thallium acetate. By intra-peritoneal inoculation of 207 mice, weighing 18-20g., with 1.5×10^8 live cells of strain 355, the mortality was 9 percent; but the same dose of virulent strain may kill 100 percent of them. Pregnant rabbits injected subcutaneously with 5×10^9 live cells of strain 355 did not abort, but with 10^8 live cells of virulent strain they aborted 10-15 days after injection. The bacteria were isolated from parenchymal organs of the aborted fetuses. The attenuated strain 355 grew well in thallium acetate broth containing 1 percent of thallium acetate but the virulent strain did not grow in it at all.

After subcutaneous administration to mice, the strain 355 was demonstrated in organs and blood within 6 days, but the virulent strain persisted in mice more than 36 days after injection.

The attenuation of strain 355 was shown to be irreversible after 20 successive transfers on thallium-acetate-free agar slants or 5 successive passages in mice or in pregnant rabbits.

Immunogenicity of strain 355 was confirmed most satisfactorily in mice and pregnant mares. (1) In 7 experiments, a number of white mice weighing 18-20g., were immunized by the intra-peritoneal route with $18^8 - 1.5 \times 10^8$ live cells of the attenuated strain 355. Fourteen days after vaccination they were challenged with 5 MLD of virulent culture, and 92.7 percent of the vaccinated animals were protected against the challenge. (2) Field trials were carried out on 7 farms, and half of the number of the pregnant mares were vaccinated in late autumn or early winter, and received a booster dose in early spring next year. The vaccine was administered by intramuscular injection with 10^{10} live cells per dose. This immunizing design was successful on farms where salmonella abortus infections were prevalent, none of the vaccinated pregnant mares aborted due to *Salmonella abortus-equi*. On the other hand, on the other 4 farms the pregnant mares injected only once with $25 \times 10^8 - 50 \times 10^8$ live cells showed a protection rate of 72.3 percent only.

When the live vaccine of strain 355 was used on farms where the outbreaks of contagious equine abortion were severe, abortion in the vaccinated mares declined after 16 days and completely controlled about 50 days after inoculation.