

## 流行性乙型脑炎减毒活疫苗的研究

### II. 2-8 株对马的安全性及免疫效果观察\*

中国医学科学院流行  
病防治研究所脑炎组  
(北京)

河北省张家口地区  
畜牧兽医工作站  
(张家口)

1. 用乙脑减毒“2-8”株制备的疫苗,大规模免疫马群(13万余匹)证明是安全的,脑内注射5匹马,每匹158,000 TCID<sub>50</sub>,病毒引起轻度发烧,仅一匹有轻度短暂的脑炎症状,全部存活无后遗症。

2. 免疫后1个月中和抗体阳转率二次实验分别为84.9%和86.6%。

3. 流行病学效果指出,疫苗注射组发病率为23/10万,而未注射组为172.1/10万,保护率为86.7%。

4. 以上结果指出“2-8”株是一株有希望的高度减毒株,值得进一步制备活疫苗在人群试用。

乙型脑炎减毒活疫苗“2-8”株(简称“2-8”株),在未进行人群试用以前,必须有足够的实验资料说明它是安全而又有效。先前报告<sup>[1]</sup>说明,“2-8”株对小白鼠及猴的毒力已大为减弱,对小白鼠、豚鼠、鸡、鸭及猴都有一定的中和抗体反应。自然界马属牲畜(马、骡)也有乙脑流行,而它的发病率高于人群。因此在马属牲畜中进行大规模的免疫,不仅为预防马属牲畜的脑炎提供一种办法,同时在使用中观察它的安全性及免疫效果,可为它今后是否能在人群试用提供重要的科学依据。我们在1970年进行了1万匹马属牲畜的免疫,1971年又免疫13万余匹。现将疫苗注射的安全性、血清中和抗体反应、及流行病学效果观察结果报告如下。

### 材料与方 法

一、病毒 制备疫苗的乙脑减毒株为“2-8”株(1)。以乙脑强毒株京卫研-1株(即A<sub>2</sub>株)

做血清中和试验。

二、疫苗制备 用14天龄金黄地鼠全肾组织,经0.2%胰酶消化制备单层细胞。用含10%乳牛血清、0.5%水解乳蛋白 Hanks 缓冲盐溶液(LH)为生长液。37℃培养,细胞成片后,将液体倾掉用 Hanks 液洗二次(马脑内注射的疫苗洗三次),然后加入与“2-8”株病毒事先混合的0.5% LH 或199维持液。病毒的最终浓度为每毫升100—1000 TCID<sub>50</sub>,用5.6% NaHCO<sub>3</sub>调pH为7.8。放37℃待病变发展到++左右收获。先后共制备30批疫苗,用地鼠肾细胞管滴定,滴度每毫升为10<sup>7</sup>—10<sup>8.5</sup> TCID<sub>50</sub>。

上述疫苗经冰浴内保存输送,生产到使用时间不超过1个月,每匹马(或骡、驴)皮下或肌肉注射1—2毫升。

### 三、观察指标

1. 疫苗安全性 体温反应;马脑内注射后观察神经系统症状(包括:视力丧失、嗜睡或狂躁,前腿交叉及旋转运动等,有其中之一者即为阳性(+),否则为阴性(-))及转归(包括:好、

\* 2-8-3-4株简称2-8株。

本文1974年5月16日收到。

后遗症及死亡)。

2. 血清中和和抗体反应 固定血清稀释病毒(A<sub>2</sub>)法,在3周小白鼠脑内进行,免疫前及免疫后1个月双份血清比较,中和指数大于1.6以上对数者即为阳转。

3. 流行病学效果判断 主要观察不同地区免疫组与未免疫组的发病率。

其它有关的材料和方法在结果中一并叙述。

## 结 果

### 一、“2-8”株疫苗对马属牲畜的安全性

在大规模的免疫过程中,除观察一般的反应外,我们选择一些马场共465匹马专门进行免疫后的体温观察,其中349匹系结合检疫由马场兽医单独进行,大都为3岁以上母马,少数为公种马;另外116匹为1岁幼马、孕马及少数刚出生的乳马,由我们自己观察。免疫前测温(肛门)1—3天,免疫后测温14—21天。从465匹马的观察中,未见体温反应及任何神经系统症状。到1972年为止,已先后免疫50万匹左右,未见到不良反应。

为了解疫苗免疫动物(或人)时,万一病毒进入因血脑屏障受破坏的动物或人是否会引起危险性的问题,我们选择五匹健康、中和抗体阴性的一岁幼马,进行马脑内直接注射,每匹注射0.5毫升(含158,100 TCID<sub>50</sub>病毒)。接种部位是左侧大脑半球实质内。注射后连续3天肌肉注射青链霉素以防止局部继发感染;并测体温及观察神经系统症状,共30天。结果如表1。

如表1所示,大量病毒直接注入马脑内没有引起死亡,仅2/5有中等度短暂的体温升高,3/5有低度短暂体温升高。其中10号马曾观察到两次不自主的短暂旋转运动,经过2天就自然恢复,没有遗留任何的后遗症;其余马匹,即使在发烧期间也未见饮食和运动异常。

### 二、“2-8”株疫苗对马的血清中和和抗体反应

我们用“2-8”株制成的疫苗,免疫中和和抗体阴性的1岁幼马共68匹,每匹注射1毫升,免疫后1个月颈动脉采血分离血清,用3周龄小白鼠脑内中和试验测定中和抗体,结果如表2。

表1 “2-8”株疫苗注射马脑内的反应

马号	注射前体温(°C)	发 烧 反 应			神经系统反应	转 归	备 注
		潜伏期(天)	最高体温°C	发烧天数			
10	39.2*	9	41.1	4	(+)	好	第9—11天观察到两次不自主短暂的旋转运动 饮食、运动与正常一样
11	39.5	11	40.3	4	(-)	好	
14	39.3	9	40.4	4	(-)	好	
19	39.7	10	40.4	2	(-)	好	
20	39.5	11	41.1	6	(-)	好	

\* 幼马的正常最高体温在39.5°C左右。

表2 “2-8”株疫苗对马的血清中和和抗体反应

实验次数	免疫总数	免疫后一个月中和和抗体变动情况		中和抗体阳转率(%)
		阴 性	阳 性	
1	53	8	45	84.9
2	15	2	13	86.6

表 3 1971 年马、骡“2-8”株疫苗注射及发病情况

地 区	疫 苗 注 射 组		未 注 射 组		未 详 发 病 数
	匹 数	发 病 数	匹 数	发 病 数	
1	30,174	8	2,259	5	2
2	18,309	5	10,502	5	
3	19,633	0	1,632	4	
4	15,172	6	1,638	4	
5	3,555	1	2,713	5	
6	6,354	3	2,617	4	
7	4,506	0	2,474	2	
8	3,511	2	3,620	3	
9	4,690	0	1,235	0	
10	6,385	3	3,421	15	
11	6,861	1	6,660	17	
12	5,889	0	1,903	6	
合 计	126,039	29	40,674	70	2
发 病 率/10 万		23		172.1	
保 护 率 %	86.67				

实验结果表明, 马一次免疫后中和抗体阳转率分别为 84.9% 和 86.6%, 有时可达 96% 以上(见表 7)。

### 三、“2-8”株疫苗免疫马、骡的流行病学效果观察

1. 1971 年的流行病学效果观察 在乙型脑炎流行前进行免疫注射即为注射组, 与未注射组相比较。

表 3 是根据要求所报的数字统计的结果, 其中可以看出, 在 126,039 匹经疫苗注射的马、骡中, 仅 29 匹发病, 发病率(按 10 万匹计算)为 23; 而未接受注射组 40,674 匹中则有 70 匹发病, 发病率为 172.1, 保护率为 86.7%。应指出, 有两匹病马由于未能确定是否接受过疫苗注射, 因此未统计在内。

表 4 是亲自深入现场进行 1 个县の詳細调查结果。同样可以看出, 疫苗注射组的发病率为 26.5, 而未注射组发病率为 221.3, 前者比后者减少 8.4 倍, 保护率为 88.48%。

两个结果基本上是符合的, 它们都表明疫苗注射有效。

2. 重流行区免疫后马、骡的流行病学效果观察 由于发病马、骡的诊断仅根据临床的表现, 因此可能参杂不是乙脑的病例。这种误诊现象在重流行区就会减少, 故将流行最重的两个县统计于表 5。

从表 5 可以看出, 未注射疫苗的 10,081 匹马、骡中有 32 匹发病, 发病率高达 317.4/10 万; 而注射疫苗的 13,246 匹中仅有 4 匹发病, 发病率为 30.2, 较未注射的少 10.5 倍, 保护率为 90.5%。

3. 1970 年免疫的马、骡对 1971 年流行的效果观察 1970 年免疫的马、骡在 1971 年是否还有预防效果, 我们进行了调查。表 6 指出在某县可供调查的 1970 年免疫的 6,321 匹马、骡中有 2 匹发病, 发病率为 33/10 万, 较 1971 年同地区未注射的发病率(221.3/10 万)低 6.7 倍, 保护率为 85.1%, 说明 1970 年免疫在 1971 年乙脑流行时仍有保护效果。必须指出, 免疫组

表 4 1971 年马、骡疫苗注射及发病情况

单 位	疫 苗 注 射 组		未 注 射 组	
	匹 数	发 病 数	匹 数	发 病 数
1	2,335	0	1,176	0
2	222	0	0	0
3	42	0	0	0
4	1,111	0	135	0
5	1,533	0	0	0
6	1,875	0	13	0
7	3,135	0	0	0
8	1,796	0	0	0
9	2,386	0	0	0
10	1,610	2	0	0
11	1,087	0	15	0
12	1,160	0	7	0
13	1,109	0	191	2
14	1,694	1	264	1
15	1,260	0	63	0
16	1,159	0	58	0
17	668	1	10	0
18	1,281	0	0	0
19	646	0	186	1
20	945	4	71	1
21	1,442	0	70	0
22	1,473	0	0	0
23	1,205	0	0	0
合 计	30,174	8	2,259	5
发 病 率/10 万	26.5		221.3	
保 护 率 %	88.48			

表 5 重 流 行 区 的 预 防 效 果 观 察

单 位	疫 苗 注 射 组		未 注 射 (对 照) 组	
	匹 数	发 病 数	匹 数	发 病 数
第 一 组	6,385	3	3,421	15
第 二 组	6,861	1	6,660	17
合 计	13,246	4	10,081	32
发 病 率/10 万	30.2		317.4	
保 护 率 %	90.49			

发病的 2 匹马都是 1 岁小马, 即 1970 年免疫时都是不到 3 个月的小驹, 免疫时年在 1 岁以上的马、骡则没有 1 匹发病。从表 7 可以看出, 在 28 匹 1—2 岁小马, 免疫

前抗体阴性者 26 匹, 免疫后抗体阳转 25 匹, 阳转率达 96.1%, 而 3 个月以下 10 匹小驹, 免疫前抗体阴性者 5 匹, 免疫后 1 个月抗体全部阳转; 但 5 匹免疫前有母体抗

表 6 1970 年免疫的马在 1971 年的发病情况

1970 年 疫 苗 注 射 组					*未注射(对照)组
年 龄 组	> 3 岁	1—2 岁	当 年	合 计 总 数	合 计 总 数
观 察 数	2,150	2,762	1,409	6,321	2,259
**发 病 数	0	0	2	2	5
发 病 率 / 10 万	33				221.3
保 护 率 %	85.1%				

\* 1970 年和 1971 年均未注射疫苗, 年龄分布与 1970 年注射组近似; \*\*系 1971 年流行时发病数。

表 7 “2-8” 株疫苗免疫马 1 个月后中和抗体的变动情况

年 龄	免疫总数	免疫前抗体		免疫后抗体		阳转率 %
		阴 性	阳 性	阳 转	不增加或下降	
1—2 岁	28	26	2	25	1	96.1
3 个月以下	10	5	5	5	5	100

体的小驹, 免疫后抗体不增加反而下降, 指出母体抗体可能是免疫无效的原因。上述两匹发病的小驹是否在免疫时带有母亲抗体免疫无效, 到成年时母体抗体消失而得病是值得考虑的。

## 讨 论

乙型脑炎病毒是一种嗜神经病毒, 因而在减毒的过程中始终考虑的就是它的安全性和免疫性的问题。在毛主席关于“我们的责任, 是向人民负责”的光辉思想指导下, 所获得的新毒株制成的疫苗在未应用于人以前, 应先在与人类乙脑发病相类似的动物群中进行考验。在调查马在自然界流行季节的发病情况中, 我们发现马与人一样, 老马与小驹都能得病, 而小白鼠及猪随年龄的增加实验皮下感染致死力下降。因此, 我们认为用马做疫苗株安全性的观察较用小白鼠为好。乙脑在人的发病率(流行区)一般在 20/10 万左右, 而这次所调查的未注射疫苗的马群发病率则高达 172.1/10 万。因此, 用马来观察效果是较

理想的。它不仅可考验安全性, 而且可观察免疫性及流行病学效果, 为应用于人群提供足够的科学资料。同时, 又可以有效地控制马属牲畜的乙脑流行, 为畜牧业生产建设服务。

乙脑“2-8”株疫苗大规模免疫马证明是安全的。马脑内注射 158,100 TCID<sub>50</sub> 病毒也不引起死亡, 没有后遗症; 免疫后抗体阳转率高达 84% 以上, 保护率也在 85% 以上。因而其安全性及免疫性较国外同类毒株为好<sup>[2-5]</sup>。

由于带有母体抗体的马, 不易通过疫苗注射来达到自动免疫, 因此对 6 个月以下的小驹最好在第二年再度免疫 1 次。这在将来疫苗大规模应用于人时, 也是值得注意的问题。

## 参 考 资 料

- [1] 中国医学科学院流行病学防治研究所脑炎组: 微生物学报, 14(2):176—184, 1974.
- [2] Hammon, W. M. et al.: *J. Immunol.* 96: 518, 1966.
- [3] Inoue, Y. K. et al.: *Bull. W. H. O.* 30:

- 181, 1964.  
[4] Hammon, W. M. et al.: Immunization for Japanese encephalitis 205, 1971.

- [5] Ilyenko, V. I. et al.: *Amer. J. Epid.* 95:148, 1972.

## STUDIES ON ATTENUATED JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS VACCINE

### II. SAFETY, EPIDEMIOLOGICAL AND SEROLOGICAL EVALUATION OF ATTENUATED 2-8 STRAIN VACCINE AFTER IMMUNIZATION OF HORSES

INSTITUTE OF EPIDEMIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES  
(Peking)

VETERINARY STATION, CHANGCHIAKOU, HOPEI  
(Changchiakou)

Vaccine prepared from attenuated 2-8 strain gave no reaction when given subcutaneously to 500,000 horses. There was only mild febrile reaction when a dose of 158,000 TCID<sub>50</sub> of the virus was given intracerebrally to five horses. Only one horse showed transient encephalitic symptoms. There was no death nor residual signs.

Neutralization test on sera obtained

one month after subcutaneous immunization from 53 and 15 initially serologically negative horses showed a positive conversion rate of 84.9% and 86.6% respectively. Epidemiological evaluation of the vaccine showed a protective rate of 86.7%.

It is recommended that the 2-8 strain can be used to prepare vaccine for human trial.