

流行性乙型脑炎减毒疫苗马匹免疫

王用楫 丛玉兴 刘培生

陈晶宇 张振兴 骆玉芹

孙勉 衣秀云

于雅清 高淑清

(北京生物制品研究所, 北京)

(黑龙江省兽医科学研究所, 富裕)

本文报告了流行性乙型脑炎减毒疫苗免疫马匹的实验研究。得到的结果总结如下:

1. 马匹经用乙脑减毒毒株 79、鸡 53 地、鸡 53 鸡、鸡 53 免疫后, 未发现体温升高或其它身体反应。
2. 以 1:5 浓度的乙脑 A₁ 株鼠脑病毒 10—20 毫升, 注射至中和抗体阴性马的颈部皮下, 可引起体温升高、白血球增多、病毒血症, 临床上有一定的症状表现, 但不致死。
3. 对照马攻毒后, 临床上出现食欲减退、精神沉郁、反应迟钝、消瘦等情况; 免疫马攻毒后, 无临床表现, 食欲、精神、反应都正常。
4. 对照马攻毒后, 在体温曲线上出现两个热峰。前驱热峰攻毒后 24 小时出现, 持续约 1 天; 主热峰发生在第 4—5 日, 可持续 5—6 日。免疫组马攻毒后, 前驱热峰依然出现, 而主热峰受到了制止。
5. 对照马攻毒后, 血液中白血球增多; 免疫组马攻毒后, 白血球仍然增多。
6. 对照马攻毒后, 出现病毒血症, 血液中病毒滴度最高可达 10^{-2} — 10^{-3} 0.03 毫升; 免疫马攻毒后, 病毒血症阴性。
7. 79、鸡 53 地、鸡 53 三种疫苗各免疫马 3 匹, 检查病毒血症。除鸡 53 免疫的 3 匹马中有 1 匹阴性外, 其余 8 匹全部有病毒血症, 出现在免疫后第 5—7 日。
8. 抗体反应试验结果表明, 减毒疫苗免疫后, 补体结合抗体滴度第 2 周较高, 第 4 周已下降; 中和抗体在免疫后 1 个月大部由免疫前阴性阳转。4 种疫苗中, 79 的抗原性较强, 鸡 53 较弱, 余 2 种居中。
9. 中和抗体的阳转率高于、且维持时间也久于补体结合抗体。
10. 79、鸡 53 地、鸡 53 三种疫苗免疫马匹后 1 个月, 中和抗体阳转率分别为 90.0%、94.7% 和 94.7%。
11. 减毒疫苗病毒滴度如在 $10^{-5.5}$ 或以上, 稀释 10 倍获得的中和抗体阳转率与不稀释的比较没有明显的差别; 稀释至 1:100 则阳转率下降。

在家畜中, 马匹是对流行性乙型脑炎(乙脑)感染比较敏感的动物。从非乙脑流行区引进的马群中, 到乙脑流行季节往往出现少数乙脑疑似病例, 个别马匹遗留后遗症严重甚或致死。1964 年 7 月从致死马的脑组织中曾分离一株证明为乙脑的病毒^[1]。

据国内外马匹的血清学的检查结果^[2-6], 认为在乙脑流行地区内, 马在流行季节中可能是乙脑病毒储存宿主之一。从健康马的血清中, 也曾分离出乙脑病毒^[7]。

为保护马匹不受乙脑严重感染, 减少

马匹作为乙脑病毒的储存宿主对人群的危害, 乙脑流行区的马匹, 特别是从非流行区进入的马群, 应该推广乙脑自动免疫。1970 年我们曾用乙脑减毒疫苗免疫马 14,072 匹。在全面使用疫苗前进行了一些试验观察。本文报告免疫后攻毒试验及病毒血症、抗体反应、免疫剂量观察的结果。

材料和方法

一、鸡 53 疫苗

系用乙脑减毒鸡 53 毒株制得。鸡 53 毒株

本文 1973 年 12 月 9 日收到。

来源于地鼠肾细胞传代的原 53 株^[1],先通过鸡胎、地鼠肾细胞交替传递 3 次,鸡胎细胞选空斑 1 次,而后在鸡胎中连续传代,称鸡 53 株。前 15 代只用 1:10 (每鸡胎加 Hanks 氏液 2.0 毫升)病毒液接种至 7 日鸡胎的卵黄囊中,37℃ 孵育,72—96 小时解剖,取胎,用玻璃研磨器乳化,青霉素小瓶地鼠肾细胞内作致病变滴定,TCD₅₀在 $10^{-3.0}$ — $10^{-4.0}$ 之间。16 代以后,用 1:100 或 1:1,000 稀释的病毒液传代。从鸡 25 代开始,孵育时间延长至 6—7 日,病毒液滴度有明显提高,达 $10^{-5.0}$ — $10^{-6.0}$ 之间。25 代以后的病毒液经冷冻干燥,真空封口,每安瓿装量为 1.0 毫升,即为鸡 53 疫苗。用前以蒸馏水 1.0 毫升融化。

二、鸡 53 鸡、鸡 53 地疫苗

用 25 代以后的鸡 53 株病毒液按 1:100—1:1,000 稀释,接种到鸡胎单层细胞或地鼠肾单层细胞,37℃ 平置培养 72 小时,收液,加 1.0% 明胶、10% 蔗糖,冷冻干燥,真空封口,每安瓿装量 1.0 毫升,即为鸡 53 鸡、鸡 53 地疫苗,TCD₅₀在 $10^{-3.5}$ 左右。

三、79 疫苗

系用乙脑减毒 79 毒株制备的疫苗。79 毒株来自乙脑减毒 12-1-1 毒株^[9],先在鸡胎单层细胞上培养选定空斑,在地鼠肾单层细胞内传代,且证明对小鼠的致病力消失而仍保有良好的免疫原性和抗原性。79 疫苗即在地鼠肾细胞内培养的 79 毒株病毒液,TCD₅₀约 $10^{-3.5}$,干燥,封口,安瓿装量同前。

四、马匹

用于攻毒试验的来自乙脑非流行区的马场,事先用小鼠脑内中和试验法证明中和抗体阴性。用于病毒血症试验的为 1 岁幼驹。为观察抗体反应和免疫剂量,先后免疫了马匹 3 批。第 1 批马 9 匹,来自非流行区,在实验马厩饲养,用来观察疫苗身体反应和免疫后抗体反应的初步检查。第 2 批马 60 匹,系公社马场 1—2 岁幼驹,用于抗体持续时间试验。第 3 批马 120 匹为国营马场 1—3 岁的幼驹,用于免疫剂量的观察。

五、鼠脑毒株病毒血症检查

从颈静脉采取马血分出血清,用原血清(10^0)、Hanks 氏液 10^{-1} 、 10^{-2} 稀释的血清,分别脑内接种 7—9 克的小鼠 3 只,观察小鼠 21 日。

据小鼠特异性死判定乙脑病毒存在。

六、体温检查

在观察马匹期间,每日上午 8—9 时、下午 3—4 时检查肛温一次。

七、白血球数目检查

在观察期内,每日上午 8—9 时由颈静脉采血,按常规方法计数。

八、疫苗病毒株病毒血症检查

培养地鼠肾单层细胞,感染待查血清。单层细胞的制备方法 & 营养液、维持液的成分同以前报告^[10]。

由于运输关系,血清析出后 4—6 小时才接种至细胞。为快速析出血清,接种前将血液置 37℃ 温箱 1—2 小时。血清用维持液 10 倍稀释,以原血清(10^0)及 10 倍稀释(10^{-1})两个浓度各接种 2—3 个细胞瓶,每瓶接种量为 0.2 毫升,加维持液 10 毫升,37℃ 孵育。第 4 日以后,每日早晚检查病变各一次。

九、补体结合试验

使用北京生物制品研究所供给的乳鼠脑乙醚提纯抗原,照常规方法进行^[11]。

十、中和试验

同以前报告^[12],但血清病毒混合液不经 37℃ 孵育。

强毒攻击试验

一、马匹免疫和反应观察

为了了解乙脑减毒毒株对马的安全性和免疫原性,1970 年 2 月用乙脑 79、鸡 53 地、鸡 53 鸡、鸡 53 四种疫苗,分别免疫中和抗体阴性的马各 2—3 匹。每匹使用剂量均为 2.0 毫升,1 次颈部肌肉注射。

免疫后每日测体温 2 次,并观察全身和局部反应,1 个月内,未见体温上升,亦无不良反应。

二、攻毒预备试验

由于乙脑强毒对马匹脑外感染致病性的资料很少见,在试验攻击前,先选中和抗体阴性的马 2 匹,用 1969 年秋季黑龙江省兽医科学研究所分离的乙脑 A₃ 强毒株,注

射至颈部皮下，以观察 A₃ 株对马的致病性。观察指标有：临床表现、体温、白血球数、病毒血症。2 匹马接受病毒注射的浓度不同，107 号马为 1:5 浓度，35 号马为 1:100。接种量均为 10 毫升。使用 A₃ 株第 13 代鼠脑病毒液，毒力(LD₅₀)为 10^{-8.3}。

107 号马于接受病毒注射后 24 小时(第 1 日)，体温由注射时的 38℃ 上升至 39.6℃，第 2 日下降至正常体温范围；第 6

日再次发热，第 8 日达顶峰 40.5℃。自第 12 日以后温度波动在正常范围内。在白血球增多的过程中，也有 2 个顶峰，发生在两个热峰之后 1—2 日。2 匹马的体温曲线、白血球数曲线见图 1、图 2。

比较图 1 和图 2，可知 35 号马的体温与 107 号马不同，没有发热；但与 107 号马相应的 2 个白血球增多的峰型却仍然存在。

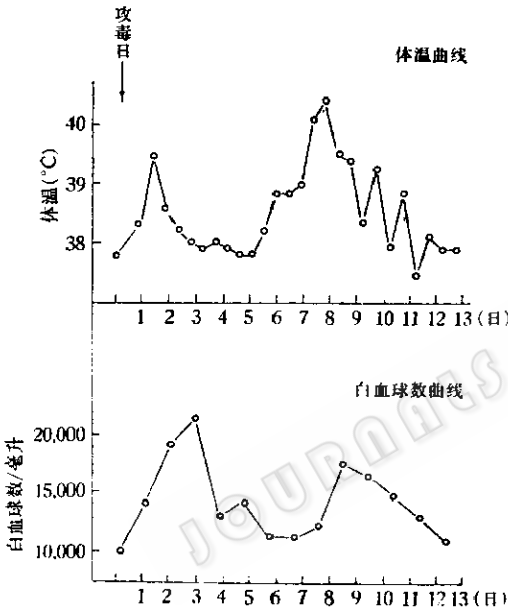


图 1 107 号马体温、白血球数曲线

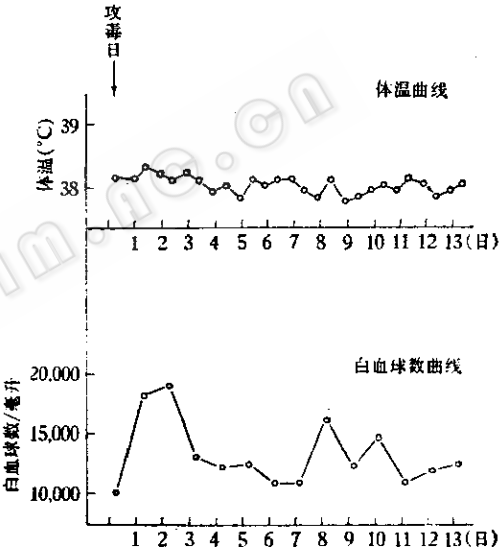


图 2 35 号马体温、白血球数曲线

表 1 强毒攻击预备试验结果

马号	性别	年龄	病毒使用剂量	临床表现	体温检查	白血球数目	病毒血症检查(小时)				
							1/2	24	48	72	96
107	♂	3 岁	1:5 10毫升	消瘦	发热	增多	+	+	+	-	-
35	♂	3 岁	1:100 10毫升	—	无热	增多	-	+	+	-	-

强毒攻击预备试验结果见表 1。

三、强毒攻击试验

9 匹经免疫的马在免疫后 3 个月，连同对照马用 A₃ 株鼠脑病毒攻击。为增加出现严重临床症状甚至致死的可能，攻击量

比预备试验增加一倍，即以 1:5 浓度的鼠脑病毒攻击，每匹接受剂量为 20 毫升，注射颈部皮下。病毒毒力经用小鼠脑内注射测定，LD₅₀ 为 10^{-8.0}。

攻毒后每天测体温两次，攻毒当天在

攻毒前先取血数白血球,以后每天取血各数白血球1次,直至第12日。攻毒后1/2小时采血,析出血清,用原血清(10^0)及 10^{-1} 、 10^{-2} 稀释的血清分别脑内接种小鼠,以检查病毒血症;以后在24、48、72、96小时再分别取血,继续检查病毒血症。

对照马63号(♂3岁,血清中和指数为1.0)攻毒后,体温曲线与预备试验的107号马比较,颇为相似,也有两个热峰。第一个可称为前驱热峰,攻毒后24小时出现,时间上与107号马相同,但热度较高,持续时间较久。第二个热峰可称为主热峰,第5日出现,早于107号马1天,热峰达 41.1°C ,高于107号马 0.6°C 。第4日发现食欲明显减退,体质消瘦,至第9日眼睛无神、发呆,消瘦益为明显,精神沉郁,反应迟钝。攻毒前测温时须要上架,攻毒后变得温驯,测温非常容易。膘情由六成降至五成。

另1匹对照马88号(♀,10岁,血清中和指数为0.32),攻毒后热峰有3个,分别于第1、3、6日出现。第一个 38.7°C ,历时1/2日,第2个 39°C ,历时1日;第三个 39.3°C ,历时1½日。就出现时间、体温高低和持续久暂来看,第三峰是主热峰。攻毒后第5日开始食欲减退,同时精神萎靡、迟钝,至第9日精神恢复,第10日发现喜欢卧地,经检查无异常。第11日以后逐渐恢复。攻毒后亦见消瘦,但不及63号马明显。

免疫组马匹,攻毒后食欲、精神等反应均无变化。

四、攻击后病毒血症检查

攻毒后,不同时间采对照组、免疫组马匹血液,分离病毒的结果如下。对照马在攻毒后1/2、24、48、72小时血液中均可测知病毒,血液中病毒最高含量 LD_{50} 在 10^{-2} — 10^{-3} 之间,出现在24小时,88号马

72小时血中仍有微量病毒存在。攻毒后1/2小时测出的病毒,可能是攻毒时注入的原来鼠脑病毒,24小时或以后测出的病毒,看来是在机体内繁殖的新代病毒。

免疫组的9匹马,虽经强毒攻击,从不同时间采取的血液中,都未能测出病毒。这个事实表明,用减毒毒株免疫马匹,能制止强毒攻击后的病毒血症,可能就是制止强毒在体内繁殖。

五、攻毒后体温检查

马匹经乙脑强毒感染后,象许多种全身性病毒性感染一样,也出现两个热峰。为衡量减毒毒株的免疫效果,将免疫马和对照马的体温检查结果,按两个热峰出现的时间,综合成为表2。根据有无发热、发热时间久暂和热峰存在与否,来判定免疫效果。

由表2可以看到:(1)对照马有前驱热峰和主热峰,主热峰的最高峰温高于前驱热峰的最高峰温。(2)免疫马9匹中,7匹有前驱热峰,最高峰温与对照马无差别,表明这7匹虽经免疫,但未能制止前驱热峰的出现;3号和5号马没有前驱热峰,可能是由于获得免疫的关系。(3)从第3—12日体温检查结果来看,9匹免疫马中7匹无热,对照马不但有热,而且热度高于前驱热,经免疫马所以无热峰出现,显然是减毒毒株免疫的结果。(4)14、15号马虽然都有主热峰存在,但主热峰的最高峰温却低于前驱热的峰温,这个差别正好与对照组主热峰峰温高于前驱热峰峰温的规律相反。免疫马主热峰峰温低于而不是高于前驱期热峰峰温的差别,可能也是免疫作用的表现。

应该提出的是,14号和15号马有与其它传染性疾病接触史,在攻毒前都曾有发热,攻毒后的发热不一定与攻毒有关。

总括来看,减毒毒株对前驱热峰没有

表 2 攻毒后体温检查结果

马匹号数	免疫病毒	第 1—2 日 检 查 结 果				第 3—12 日 检 查 结 果						攻毒前免疫三个月中和指数	攻毒后病毒血症检查结果
		最高体温		≥38.6持续时 间(日)	峰 型	最高体温		≥38.6持续或断续 时间(日)	日期起止	峰 型	顶峰 日期		
		≥38.6℃	≤38.5℃			≥38.6℃	≤38.5℃						
15*	79	39.5		1½	+	39.3		7	第 2—4、6 7—10、11日	+	第 7 日	1,600	—
85	”	38.9		½	+		38.2			—		32	—
87	”	40.2		1	+		38.4			—		3,200	—
14*	鸡53地	40.0		1½	+	39.1		1	第 6、8 日	+	第 6 日	320	—
84	”	39.2		½	+		38.3			—		32	—
4	鸡53鸡	39.1		1	+		38.2			—		16	—
5	”		38.0		—		38.1			—		1,600	—
3	鸡53		38.1		—		37.8			—		100	—
16	”	39.5		1	+		38.5			—		16	—
63	对 照	40.5		1½	+	41.1		6½	第4—9、11日	+	第 6 日	1	+
88	”	38.7		½	+	39.3		2½	第3、6—7日	+	第 6 日	0.32	+

* 攻毒前有发热, 14 号马攻毒前三日体温为 40.4℃、41.3℃、39.5℃; 15 号马攻毒前体温 38.3℃、39.3℃、39.1℃。

影响,但对主热峰的出现,有明显的抑止作用。

六、攻毒后的白血球检查

在攻毒预备试验中证明,马匹经用乙脑强毒攻击后,在白血球数曲线上,与体温

曲线相仿,也有两个白血球增多的峰型。据此,将免疫马与对照马白血球检查结果,以 12,000/毫升或以上,作为白血球数增多的标准,按第 1—2 日及第 3—12 日两阶段检查得到的白血球数,综合为表 3。

表 3 攻毒后白血球检查结果

马匹号数	免疫病毒	第 1—2 日 检 查 结 果				第 3—12 日 检 查 结 果					
		最 高 数 目		≥12,000/ 毫升持续 时间(日)	峰 型	最高数目	≥12,000/毫升持续或断续 时间(日)	峰 型	顶峰 日期		
		≥12,000/ 毫 升	<12,000/ 毫 升							时 间 (日)	日 期 起 止
15	79	12,900	11,500	1	+	16,300	6	第4—5、7 10—12日	+	第 4 日	
85*	”	25,000		2	+	24,250	10	第3—12日	+	第 4 日	
87	”	14,900		2	+	14,650	3	第4—5、12日	+	第 5 日	
14	鸡53地		11,100		-	17,850	7	第5—7、9—12日	+	第 5 日	
84*	”	13,200		1	+	17,400	2	第5—6日	+	第 5 日	
4	鸡53鸡				-	12,100	1	第 5 日	-		
5	”	14,100		2	+	13,050	3	第4—6日	+	第 6 日	
3	鸡 53	19,600		2	+	14,000	9	第3—7、9—12日	-		
16	”	14,800		2	+	13,400	5	第4、9—11日	+	第11日	
63	对 照	13,250		2	+	17,950	1	第 6 日	+	第 5 日	
88*	”	17,500		2	+	17,200	7	第3—7、9—12日	+	第 9 日	

* 攻击前白血球数较高, 84 号马为 14,050/毫升; 85 号马为 21,950/毫升; 88 号马为 17,150/毫升。

从表 3 白血球数增多与否、增多持续时间长短、增多峰型存在与否等方面,都看不出免疫组与对照组之间有明显的差别。由

此可以认为,减毒株免疫马匹,对马匹攻毒后的白血球增多,显示不出有明显的影响。

最后,将上述各项免疫效果观察结果

列入表 4, 以资比较。

表 4 免疫效果观察结果

马匹 号数	免 疫 病 毒	临床 症状	病毒 血症	发 热		白血球增多	
				前峰	后峰	前峰	后峰
15	79	—	—	+	+	+	+
85	”	—	—	+	—	+	+
87	”	—	—	+	—	+	+
14	鸡53地	—	—	+	+	—	+
84	”	—	—	+	—	+	+
4	鸡53鸡	—	—	+	—	—	—
5	”	—	—	—	—	+	+
3	鸡 53	—	—	—	—	+	—
16	”	—	—	+	—	+	+
63	对 照	+	+	+	+	+	+
88	”	+	+	+	+	+	+

减毒毒株免疫试验

一、减毒疫苗毒株病毒血症检查

一般认为, 预防全身性病毒性疾病的减毒疫苗, 都必须在受免疫者的机体内引起短暂的病毒血症。为了解 79、鸡 53 地、鸡 53 疫苗能否引起病毒血症, 用这 3 种疫

苗免疫 1 岁幼驹各 3 匹, 每匹颈部肌肉接种疫苗 2.0 毫升。接种后第 2 日(48 小时)第 4、5、6、7、9 日及第 11 日各采血 5—10 毫升, 析出血清, 用小方瓶地鼠肾单层细胞的病变来测定病毒。

地鼠肾细胞瓶接种血清后, 出现病变的最早日期为第 7 日, 最晚为第 11 日, 病毒血症检查结果见表 5。

从表 5 数据可知: (1)除鸡 53 株免疫 3 匹中的 1 匹为阴性外, 其余 8 匹均出现病毒血症, 出现在接种毒后第 5—7 日之间。第 6 日阳性最多。(2)病变出现在接种血清后第 7—11 日之间, 第 9 天出现最多。(3)用 1:10 稀释的血清, 得到阳性的例数较多, 而且出现病变的时间也较早。

二、抗体反应

第一批马用乙脑 79、鸡 53 地、鸡 53 鸡、鸡 53 四种减毒疫苗进行免疫, 每种疫苗免疫 2—3 匹。每匹 1 次颈部肌肉注射 2.0 毫升。免疫后每周采血 1 次, 连续 4 周, 作补体结合试验; 又免疫后 1、2、3 月各

表 5 病毒血症检查结果

马匹 号数	使 用 病 毒	血 清 浓 度	下 列 时 间 采 血 试 验 结 果					病 毒 血 症 日 期
			第 4 日	第 5 日	第 6 日	第 7 日	第 9 日	
128	鸡 53	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— +(11)	— +(9)	+(9) —	— —	} 第 5—7 日
131	”	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— —	— —	— —	— —	
132	”	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— —	+(9) +(9)	+(8) —	— —	} 第 6—7 日
104	鸡 53 地	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— +(11)	— +(9)	— —	— —	} 第 5—6 日
125	”	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— —	+(10) +(9)	— —	— —	
140	”	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— —	— +(9)	— —	— —	} 第 6 日
103	79	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— —	— +(9)	— —	— —	} 第 6 日
110	”	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— —	— +(9)	+(9) +(7)	— —	
141	”	10 ⁰ 10 ⁻¹	— —	— —	+(9) —	+(9) —	— —	} 第 6—7 日

注: +: 病变阳性, -: 病变阴性; 括号内数字代表病变出现日期。

表 6 第一批免疫马匹补体结合抗体检查结果

马匹 号数	性 别	年 龄 (岁)	使用* 病毒	免疫 前滴 度	免 疫 后 滴 度			
					一周	二周	三周	四周
15	♂	3	79	<2	<2	32	16	8
85	♂	6	„	<2	<2	16	2	<2
87	♀	1	„	<2	8	32	16	16
14	♂	3	鸡53地	<2	4	8	4	<2
84	♀	5	„	<2	<2	<2	<2	<2
4	♂	8	鸡53鸡	<2	4	8	8	2
5	♀	20	„	<2	<2	4	<2	<2
3	♀	6	鸡 53	<2	<2	<2	<2	<2
16	♂	12	„	<2	<2	<2	<2	<2

* 使用病毒毒力滴度 TCD₅₀, 除鸡 53 为 10^{-5.0} 外, 其余均为 10^{-3.5}

表 7 第一批免疫马匹中和抗体检查结果

马匹 号数	使用* 病毒	免疫前 中和指 数	免 疫 后 中 和 指 数		
			一 月	二 月	三 月
15	79	1.0	50	1,000	1,600
85	„	4.0	200	320	32
87	„	1.0	100	10,000	3,200
14	鸡53地	2.0	63	160	320
84	„	0.8	10	160	32
4	鸡53鸡	3.2	200	100	16
5	„	0.2	1,000	10,000	1,600
3	鸡 53	1.0	6.3	10	100
16	„	0.1	20	63	16

* 使用病毒毒力滴度 TCD₅₀, 除鸡 53 为 10^{-5.0} 外, 其余均为 10^{-3.5}

采血 1 次, 作小鼠脑内中和试验。马匹的性别、年龄、免疫毒株、免疫前后补体结合抗体滴度、中和抗体指数等项列入表 6 和表 7。

表 6、表 7 数据说明: (1) 补体结合抗体滴度绝大部分出现在第 2 周和第 3 周, 第 2 周滴度一般较高; (2) 部分马匹 2 月、3 月血清的中和指数比 1 月血清指数有明显增高; (3) 从补体结合滴度和 3 次中和试验结果综合比较, 79 疫苗抗原性较强,

鸡 53 疫苗微弱, 余 2 种疫苗无明显差别。

三、抗体持续时间

为了解疫苗免疫后抗体消长情况, 用乙脑减毒 79、鸡 53 地、鸡 53 三种疫苗各免疫马 20 匹, 共 60 匹。马匹性别、年龄随机分配, 剂量、途径同前。免疫前及免疫开始后, 间隔 1 个月采血 1 次, 连续 4 次, 作补体结合试验和小鼠中和试验。依免疫组别及补体结合抗体滴度、中和抗体指数, 将血清学试验结果综合成表 8 及表 9。

表 8 第二批免疫马匹补体结合抗体检查结果

免 疫 病 毒	采 血 时 间	补 体 结 合 抗 体 滴 度						观 察 例 数	阳转率 %	强阳转 率 %
		阴 性 ≤ 2	弱阳性 2	强 阳 性						
				4	8	16	32			
79	1 月	6	3	3	2		6	20	70.0	55.0
	2 月	13	5	2				20	35.0	10.0
	3 月	12						12	0	0
	4 月	11						11	0	0
鸡53地	1 月	6	5	4	3		1	19	68.4	42.1
	2 月	19						19	0	0
	3 月	5						5	0	0
	4 月	4						4	0	0
鸡 53	1 月	10	3	3	3			19	47.3	31.6
	2 月	14	5					19	26.3	0
	3 月	10	1					11	9.1	0
	4 月	8						8	0	0

表 9 第二批免疫马匹中和抗体检查结果

免 疫 病 毒	采 血 时 间	中 和 抗 体 指 数					观 察 例 数	阳 转 率 %	强阳转率 %
		阴 性 ＜10	弱阳性 11—49	强 阳 性					
				50—99	≥100	≥1,000			
79	一 月	2	3	3	9	3	20	90.0	75.0
	二 月	3	6	4	6	1	20	85.0	55.0
	三 月	4			2	1	7	42.9	42.9
	四 月	4	2	1	1	1	9	55.6	33.3
鸡53地	一 月	1	1	2	11	4	19	94.7	89.5
	二 月	4	5	4	4	2	19	79.0	52.6
	三 月		1	1	1	1	4	100.0	75.0
	四 月	1	1	1	2		5	80.0	60.0
鸡 53	一 月	1	4	2	9	3	19	94.7	73.6
	二 月	6	6	3	3	1	19	68.4	36.8
	三 月	2	4			1	7	71.4	14.3
	四 月	4	3	1	2		10	60.0	30.0

由表 8、表 9 列出的试验数据,可以看出: (1) 中和抗体的阳转率高于补体结合抗体, 中和抗体维持的时间久于补体结合抗体。(2) 从中和试验结果来看, 79、鸡 53 地、鸡 53 三种减毒疫苗能使 90% 或以上马的血清阳转, 至第 4 个月阳性率有明显下降。

四、免疫剂量比较

为比较减毒疫苗不同剂量的抗体反应, 作为判定疫苗最低免疫剂量的参考, 进行第三批免疫试验。用 79 和鸡 53 地 2 种疫苗的原液 (10^0) 及 10 倍 (10^{-1})、百倍 (10^{-2}) 稀释的病毒液各免疫 1—3 岁的幼

驹 20 匹, 共 120 匹, 颈部肌肉注射 2.0 毫升。年龄、性别随机分配, 免疫前及免疫后 1 个月采血。血清抗体结果见表 10 和表 11。应该提出的是, 所用这批 79 疫苗病毒 TCD_{50} 较高, 达 $10^{-7.0}$, 而鸡 53 地为 $10^{-5.5}$ 。

表 10 及表 11 表明: (1) 由中和抗体和补体结合抗体阳转率都说明, 79 疫苗免疫效果明显优于鸡 53 地; 这个差别与这两批疫苗毒力滴度悬殊较大, 达 1.5 个对数有关。(2) 病毒稀释 10 倍 (即 10^{-1} 组) 的中和抗体阳转率, 与原病毒 (10^0 组) 比较没有明显差别; 而补体结合阳转率在两组间则有差别, 鸡 53 地病毒尤为明显。(3) 如稀

表 10 第三批免疫马匹补体结合抗体检查结果

免 疫 病 毒	疫 苗 浓 度	补 体 结 合 抗 体 滴 度					观 察 例 数	阳 转 率 %	强阳转率 %
		阴 性 ＜ 2	弱阳性 2	强 阳 性					
				4	8	16			
79	10 ⁰		3	4	5	2	14	100.0	78.6
	10 ⁻¹	2	2	4	4		12	83.3	66.7
	10 ⁻²	7	1	2	3	1	14	50.0	42.9
鸡53地	10 ⁰	4	1	4	4		13	69.2	61.5
	10 ⁻¹	7			1		8	12.5	12.5
	10 ⁻²	8	1	2			11	27.3	18.2

表 11 第三批免疫马匹中和抗体检查结果

免 疫 病 毒	疫 苗 浓 度	中 和 抗 体 指 数					观 察 例 数	阳 转 率 %	强阳转率 %
		阴 性 ＜10	弱阳性 11—49	强 阳 性					
				50—99	≥100	≥1,000			
79	10 ⁰		1	3	6	3	13	100.0	92.3
	10 ⁻¹			2	6	4	12	100.0	100.0
	10 ⁻²	2	4		4	3	13	84.6	53.8
鸡53地	10 ⁰	3	2	1	7	1	14	78.6	64.3
	10 ⁻¹	1	4	2	2	2	11	90.9	54.5
	10 ⁻²	7	4				11	36.4	0

释至 1:100 (即 10⁻² 组), 与未稀释、稀释 10 倍的病毒比较, 两种疫苗中和抗体阳转率显著下降, 79 疫苗补体结合抗体阳转率亦有下降。从 79 疫苗稀释至 10⁻²、鸡 53 地疫苗稀释至 10⁻¹ 免疫马匹, 所得到的中和抗体阳转率分别为 84.6% 和 90.9%, 似可得出这样的印象, 即使马匹免疫后中和抗体阳转率达 80%, 疫苗的病毒滴度最低要求应为 10^{-4.5}。疫苗病毒滴度达 10^{-3.5} 或 10^{-6.5} 以上时, 稀释 10 倍或 100 倍仍可使中和抗体阳转率达到 80%。

讨 论

在攻毒试验中, 为了提高攻击病毒的毒力、加剧对照与免疫动物间发病或致死差别的目的, 强毒攻击途径可采脑内 (小鼠)^[13] 或鼻内 (猴)^[14] 攻击。但这两种方法与乙脑自然感染途径的蚊虫叮咬相差太远, 强烈过甚, 即使免疫动物发病、致死, 亦难否定免疫效果; 因此, 我们采用了皮下途径攻击大量病毒。在预备试验中发现, A₃ 株病毒能使马匹产生病毒血症、发热、白血球增多及一定的临床症状。白血球变化中除数目增多外, 血液象有向左推移的现象。

预备试验中, 107 号马与攻击试验中 63 和 88 号 2 匹对照马, 在感染次日出现前驱热峰。这可能是对大量病毒输入的反应, 也可能属非特异性的反应, 是否与注入

大量鼠脑悬液有关是值得进一步观察的。第 3—11 日间连续发热, 107、63 和 88 号马的热峰分别达 40.5℃、41.4℃和 39.3℃, 分别出现在感染后的第 8、第 6 和第 6 日。随 2 个热峰之后 1—2 日, 分别出现 2 个相应的白血球数目增多的峰。值得注意的是, 预备试验中 35 号马由于感染病毒量较小, 体温未升高, 但仍有 2 个白血球数目增多的峰, 出现时间与 107 马相同。这就表明, 马匹感染乙脑病毒后对白血球反应的灵敏性高于体温反应。

攻击所使用的 A₃ 毒株, 系 1969 年从乙脑半流行地区病死马的脑组织分离的。所谓半流行地区, 即在多数年份中无脑炎病例, 只在季节性降雨多而气温高的年份内, 马群中才有个别临床乙脑病毒出现。从 A₃ 株小鼠脑内 LD₅₀ 达 10^{-8.0}—10^{-8.5}, 而 7—9 克小鼠腹腔 LD₅₀ 为 10^{-4.5} 来看, 这个攻击病毒的脑外毒力不强。如用毒力特强的京卫研株^[15] 进行攻击试验, 对照组马可能出现更为严重的症状, 甚至致死, 从而就可能得到更明确的免疫效果。

据强毒攻击后免疫马不出现病毒血症, 表明减毒疫苗可切断马匹与蚊虫间的病毒循环。这一结果与国外使用灭活^[16,17] 或减毒^[17] 疫苗免疫, 可阻止猪病毒血症的报告相一致。

前述攻击试验中的马匹, 免疫后抗体

反应见表 6 和表 7。经强毒攻击后 1 个月,再采免疫组和对照组全部马的血液,检查抗体。9 匹免疫马中两种抗体急剧上升。补体结合抗体滴度 1 例为 1:32,余 8 例在 1:64—1:256 之间,2 匹对照马均为 1:64;中和指数 1 匹免疫马为 25,000,余 8 匹马均达到 $\geq 50,000$,对照马指数为 4,000 和 8,000。从中和抗体反应来看,免疫马匹经攻击后出现明显的抗体回顾反应。

在疫苗病毒血症的检查中,培养地鼠肾细胞采用小方瓶代替常规使用的青霉素小瓶。这是因为地鼠肾细胞在小方瓶内容易生长成片,且细胞维持较久,可达两周;而在青霉素小瓶内细胞生长成片的条件要求较高。病毒血症检查工作是在接近马场临时选定的实验室内进行的,所用的乳地鼠、器皿、液体全都是临用前运到的。针对当时的条件,我们选用了小方瓶。应该说明,在小方瓶中病毒所致的细胞病变在出现时间上,较青霉素小瓶迟 1—2 天,可能与接种待检样品量对维持液加入量之比,或者和瓶内细胞生长面和瓶内容积的相对之比,在两种瓶型之间不同有关。前已述及,小方瓶血清接种量为 0.2 毫升,加维持液 10 毫升,而一般青霉素小瓶法则分别加 0.1 毫升和 0.9 毫升。病毒血症试验中所观察的阳性结果系特异性病变,部分阳性材料经传代后的病变能为特异性免疫血清所中和。

此外,在种马场使用乙脑活疫苗大量免疫中,曾接种孕期母马 214 匹,当时未出现任何身体反应。至第二年产驹期间,发现明显畸形幼驹 6 例,其中 3 例为脑畸形——脑积水和大头症,1 例还合并小眼症、白内障。这 3 例畸形幼驹受到感染时或母体免疫时的胚胎日龄,分别为 60、63、70 天。有关乙脑活疫苗免疫母马引起的胚胎畸形的观察,以后还将总结报道。这个发

现表明,乙脑活疫苗不但能在马匹体内繁殖,而且还可通过胎盘侵犯胚胎,导致幼驹的畸形。

在检查疫苗病毒的病毒血症试验中,发现用 1:10 稀释的血清,比用原血清所得到的阳性例数较多,而且出现病变的时间也较早。这一情况不符合一般的规律,即病毒的浓度愈大,病变发生愈多和出现时间愈早的推想,表明可能有某些因素影响病变的产生。第一个可能因素是:疫苗病毒具有使细胞产生干扰素样物质的性质。许多病毒系统中弱毒毒株使细胞产生干扰素的能力往往强于强毒毒株^[18];且有乙脑病毒在某些细胞系统中产生干扰素的一些报道^[19,20]。另一个可能原因是血清成分能保护细胞或支持细胞,从而血清含量愈浓,使细胞愈不易出现病变。也可能这两个因素都参与一定作用。当然也不能排除还有其它未明的原因存在。

由病毒制成的可供应用疫苗必须满足两项要求,即安全和有效。一种有效的疫苗必须产生足够的免疫反应。作为活疫苗的病毒就是能在机体内繁殖,提供足量的免疫原性物质,从而引起免疫反应。以病毒血症检查方法,证明 79、鸡 53 地、鸡 53 疫苗病毒在肌肉接种马匹后的第 5、第 6 或第 7 日出现在血循环中,此点与原 53 株乙脑病毒,即鸡 53 地、鸡 53 的前代病毒,在接种猴子后的第 9 日曾出现在血流中^[21]的现象一致。这个一致意味着这系病毒在马、猴机体内都有繁殖的能力,从而为疫苗能产生免疫反应提出了物质基础。

从这次马匹免疫实验结果中,有两项证据表明疫苗病毒较攻击毒 A₃ 株的毒力为弱。第一, A₃ 株病毒出现血循环中较早,在感染的第 1—3 日,且伴有发热及临床种种症象,而疫苗株病毒在免疫后的第 5—7 天才出现病毒血症,且无热,无身体

反应。第二、免疫马经免疫后 1 个月,血清中和指数在 1,000 以下,补体结合抗体滴度在 1:16 以下;而攻击试验中的对照马,经 A₁ 毒株攻击后 1 个月,血清中和指数 4,000—8,000,补体结合抗体滴度达 1:64。

第一批马免疫后,10 匹中 4 匹补体结合抗体未阳转,最高滴度出现在免疫后的 2 周,至第 4 周阳转率下降;中和抗体全部阳转,且持续时间较长久。由此可以认为,测定抗体反应中和试验法比补体结合法灵敏。检查血清抗体采血的合适时间,用补体结合时应为免疫后 2 周,用中和试验时应为免疫后 1 个月以上。第二批免疫的 60 匹 1—2 岁的幼驹中,有 2 匹免疫前血清中和抗体阳性,指数分别为 200 和 6,300,免疫后 1 个月,指数都急剧增加,达 $\geq 63,000$,补体结合抗体滴度也较高,都为 1:8。这 2 匹幼驹出生后都经历过一个夏季,可能曾受到乙脑隐性感染。第三批免疫马中,免疫前中和抗体阳性的,免疫后抗体也都急剧上升。

在第一、二、三批免疫马匹证明减毒疫苗使用安全,在中和抗体基本阳转的实验基础上,1970 年 7 月开始用鸡 53 地干燥疫苗免疫马 14,072 匹,其中有少数驴、骡。通过大量免疫,未曾发现由于免疫而引起严

重的反应,似可说明乙脑减毒疫苗对不同品种、不同年龄的马匹是安全的。由免疫马匹用强毒攻击的试验及血清抗体的阳转情况,初步表明,乙脑减毒疫苗可能具有预防乙脑的效能。

参 考 资 料

- [1] 王用楫等: 畜牧兽医学报, 9: 155, 1966。
- [2] 戚景彝等: 微生物学报, 1: 202, 1953。
- [3] 汪美先等: 微生物学报, 4: 357, 1956。
- [4] 王潜渊等: 微生物学报, 5: 294, 1957。
- [5] Sabin, A. B. et al.: *Am. J. Hyg.*, **46**: 341, 1947。
- [6] Peterson, P. Y. et al.: *Am. J. Hyg.*, **56**: 320, 1952。
- [7] Дровищевская, А. И.: в кн.: Нейровирусные Инфекции, стр. 188, 1954。
- [8] 俞永新等: 微生物学报, **13**: 16, 1973。
- [9] 李河民等: 微生物学报, **12**: 41, 1966。
- [10] 王用楫等: 微生物学报, **10**: 31, 1964。
- [11] 北京协和医院检验科, 病毒实验诊断手册, 人民卫生出版社, 1961。
- [12] 王用楫等: 微生物学报, **1**: 97, 1953。
- [13] 许兆祥等: 微生物学报, **10**: 9, 1964。
- [14] Lee, G. C. Y. et al.: *Proc. Soc., Exp. Biol. and Med.*, **125**: 803, 1967。
- [15] 毛江森等: 微生物学报, **9**: 247, 1963。
- [16] Ando, Y.: *Virus (Tokyo)*, **20**: 1, 1970。
- [17] Ogata, M. et al.: *Virus (Tokyo)*, **20**: 211, 1970。
- [18] Isaacs, A.: *Adv. Virus Res.*, **10**: 30, 1963。
- [19] 毛江森等: 微生物学报, **10**: 339, 1964。
- [20] 王用楫等: 微生物学报, **12**: 95, 1966。
- [21] 俞永新等: 微生物学报, **8**: 260, 1962。

IMMUNIZATION OF HORSE WITH THE ATTENUATED VIRUSES OF JAPANESE B ENCEPHALITIS

WANG YUNG-CHI, TSUNG YU-HSIN, LIU PEI-SHENG, SUN MIAN, YI SHEO-YUN
(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

CHEN CHING-YU, CHANG CHEN-HSIN, LO YU-CHEN, YU YA-CHANG,
KAO SHOU-CHING

(Heilungkiang Provincial Veterinary Medicine Institute, Fuyu)

In the present paper experimental studies in horses immunized with the Jap

BE attenuated viruses were reported. The results obtained were summarized as

follows:

(1) Neither rising body temperature nor other body reaction was found in the horses receiving inoculation of the Jap BE virus strains 79, G53D, G53G, and G53.

(2) In the preliminary challenge test, two horses were injected by the subcutaneous route at neck region with 10 ml of the virulent Jap BE virus A₃ strain in 1:5 diluted mouse brain suspension. The injected animals were kept under observation. Two-peaked fever, two-peaked leucocytosis, three-day-viremia and other clinical manifestations were noticed, but no death resulted.

(3) Both control and immunized animals were challenged subcutaneously with 20 ml of the virulent mouse brain virus. After challenging the following symptoms appeared in the controls: loss of appetite, mental depression, retarded reaction and emaciation, while the immunized animals all remained without these clinical abnormalities.

(4) Differences were noticed on the post-challenge body temperature curve in both groups of animals. In the controls there were two, so-called prodromal and principal fever peaks, which had been illustrated in the virulence test. However, in the immunized horses only the prodromal fever peak appeared.

(5) Leucocytosis was demonstrated in the controls following challenging, and the number of white blood cells in the blood stream of the immunized was also increased.

(6) In contrast to the controls in which viremia was detected with a maximal titer of the challenge virus up to

10^{-2} — 10^{-3} /0.03 ml the immunized horses exhibited no viremia at all.

(7) An investigation of viremia in the horses following vaccination with strains 79, G53D and G53 was performed. Among nine horses, three of which received one of the above three strains, eight showed viremia detectable in the blood samples taken on the fifth to the seventh day after inoculation. The only viremia negative case was found in one of the three horses vaccinated with G53 strain.

(8) Results obtained in the antibody response tests indicated that complement-fixing antibody titer reached its maximum on the 14th day and then declined in the 4th week, while positive neutralizing antibody was often detected at the end of the first month after immunization. Among the attenuated viruses tested, the antigenicity of strain 79 showed to be stronger, and of G53 to be weaker than that of the other two strains.

(9) The neutralizing antibody following immunization was higher in seroconversion rate and longer in duration than complement-fixing antibody.

(10) With strains 79, G53D and G53, three groups of twenty horses, 60 in all, were immunized. The respective seroconversion rates of neutralizing antibody were found to be 90%, 94.7% and 94.7%.

(11) The neutralizing antibody conversion rate obtained in animals immunized with 1:10 diluted vaccine with the virus titer not less than $10^{-5.5}$ showed no significant variation as compared with the undiluted group. However, the rate in 1:100 diluted group was shown to be much lowered.