

流行性乙型脑炎病毒减毒株免疫仔猪血清学反应 和流行病学保护

王用楫 顾佩韦 李美容 孙勉
刘培生 衣秀云 丛玉兴 李月云

(北京生物制品研究所, 北京)

1. 用乙脑病毒的减毒株 C 株和强毒株 P₁ 株免疫仔猪, 接种 P₁ 株后 48 和 72 小时从仔猪血液中可检出病毒, 用 C 株免疫的动物, 检查病毒血症全属阴性。

2. 免疫前后检查和比较血清抗体的结果是: 用 P₁ 株免疫的两只仔猪, 免疫后抗体比免疫前明显增长; 用 C 株疫苗 10 毫升和 1.0 毫升各免疫 6 只的两组动物中, 免疫后分别有 5 只和 2 只抗体明显增长; 接受灭活疫苗的 6 只动物, 抗体全未增长。

3. 比较各组动物免疫前后血清抗体水平 (见表 2) 还发现, 对照组和灭活疫苗组内各有两只、C 株疫苗 10 毫升免疫组内有一只动物, 免疫后较免疫前的抗体水平反而有所降低。此种降低显然是母体被动抗体水平随年龄增大而下降的表现。

4. 在乙脑流行季节, 从各组动物体内连续采取血管末梢血液, 分离自然界散布的野生乙脑病毒, 以观察流行病学保护效果。从对照组动物 10 只中有 5 只、灭活疫苗组 6 只中的 2 只分离到了野生乙脑病毒; 而在用 C 株免疫的两组共 12 只, 用 P₁ 株免疫的 2 只中, 没有得到乙脑病毒。这些数据可以说明, C 株病毒可用于免疫仔猪以防止自然界乙脑病毒造成的病毒血症, 使用剂量小到 1.0 毫升仍有效。

流行性乙型脑炎 (简称乙脑) 病毒在温带流行区的越冬问题, 尚无定论。但是, 根据血清流行病学的大量数据, 当前已趋于公认, 猪是乙脑病毒繁殖的主要扩大宿主^[1], 即在人群间流行乙脑前, 猪群中有乙脑病毒血症的流行, 从而使大量蚊虫受到感染。因此, 在蚊虫完全被控制前, 人工预防接种免疫仔猪, 对控制人群间乙脑的流行, 具有重要意义。随着我国养猪事业和农田水利事业的发展, 乙脑的防疫工作也应紧紧跟上。为防止猪群中乙脑流行造成的损失, 以及防止猪作为乙脑病毒的扩大宿主而间接助长乙脑在人群间的流行, 对猪进行人工免疫的计划应该提到议事日程上来。1965 年我们曾采用乙脑病毒减毒株

C 株对仔猪进行免疫实验, 得到了一些血清学反应和流行病学保护方面的结果, 可供对猪只进行免疫时参考。

一、仔猪的选择和免疫

乙脑流行地区的仔猪, 其血清中可能含有来自母体的被动抗体^[2]。1965 年 4 月在北京郊区某农场采集月龄 1—4 个月的 4 组仔猪血液, 每组 4—5 只; 以小鼠脑内感染法^[3]测定血清的中和抗体水平; 得到的中和指数全部在 10 以下 (见表 1)。一般认为, 中和指数在 10 以下的抗体水平属于阴性范围内^[4]。仔猪出生后一般哺乳 60 天

本文于 1976 年 12 月 4 日收到。

断乳,故选择月龄为两个月的仔猪 30 只备用。

表 1 不同月龄仔猪血清中和抗体水平检查
(用小鼠脑内感染中和试验法)

仔猪 编号	月 龄	对照组 -lg LD ₅₀	试验组 -lg LD ₅₀	中和指数 对数	中和指数 数值
1	1	9.3	8.7	0.6	4.0
2		9.3	9.0	0.3	2.0
3		9.3	9.3	0.0	1.0
4		9.3	8.7	0.6	4.0
5	2	8.7	8.7	0.0	1.0
6		8.7	8.3	0.4	2.5
7		8.7	8.5	0.2	1.6
8		8.7	8.5	0.2	1.6
9	3	9.3	8.7	0.6	4.0
10		9.3	8.5	0.8	6.3
11		9.3	9.0	0.3	2.0
12		9.3	9.0	0.3	2.0
13		9.3	8.7	0.6	4.0
14	4	9.3	9.3	0.0	1.0
15		9.3	8.8	0.5	3.2
16		8.7	8.7	0.0	1.0
17		8.7	8.7	0.0	1.0
18		8.7	8.6	0.1	1.3

30只仔猪分为 5 组: 1. 对照组: 10 只分两圈饲养,未用灭活疫苗或活疫苗免疫; 2. 灭活疫苗组: 6 只, 每只皮下接种鸡胚细胞培养的灭活乙脑疫苗(当年产品) 1.0 毫升; 3. C 株免疫 I 组: 6 只,每只皮下注射乙脑病毒减毒株 C 株 1.0 毫升; 4. C 株免疫 II 组: 6 只,每只皮下注射 10 毫升(3、4 两组所用减毒株在鸡胚单层细胞中传递过 177 代,它对小鼠脑内感染的致死毒力为 -lg LD₅₀ = 3.0, 对 7—9 克小鼠腹腔注射 0.3 毫升时全部存活); 5. P₃ 株免疫组: 2 只,各皮下注射稀释度为 10⁻⁵ 的 P₃ 株鼠脑培养液 1.0 毫升(该毒株的小鼠脑内感染毒力 -lg LD₅₀ = 9.0)。各组动物均在 5 月 30 日免疫,分圈在同一地点,同样饲养和观察。

二、病毒血症的检查结果

在 C 株免疫的 I、II 两组中各选定仔猪两只,与 P₃ 株免疫组猪仔一起,在接种病毒后 12、24、48、72、96、120 和 168 小时从尾部末端剪断采血,每次 1.0 毫升,立刻与等量肉汤(pH 7.4)混合,在试管内振荡,防止凝固。稍加离心后取上层液体接种以下三种宿主系统以分离病毒。这三种宿主系统是: 1. 对 7—9 克小鼠脑内接种,根据小鼠是否死亡判定病毒的存在; 2. 接种 6—7 日鸡胚的卵黄囊,培养 72 小时,取胚制成 10% 的悬液,接种小鼠,根据小鼠是否死亡判定病毒的存在; 3. 接种经 2—3 日培养长成片的鸡胚单层细胞,接种后加营养琼脂覆盖,根据空斑的出现判定病毒的存在。结果发现,用 P₃ 株免疫的两只动物中,有 1 只在 48 和 72 小时后,用鸡胚单层细胞接种法检查出了病毒,在 72 小时后用小鼠致死法检查出了病毒。经 C 株免疫的 2 组动物中,由血液分离病毒的结果均为阴性。这表明 C 株病毒不引起仔猪病毒血症,而强毒株 P₃ 则可引起。

三、血清抗体的检查结果

各组动物在 5 月 28 日和 6 月 30 日分别采血 5.0 毫升,分离血清,冰冻保存供检查中和抗体。对照组动物的血清称第一、第二次血清;免疫组动物的血清即免疫前后的血清。由于用小鼠脑内感染法往往检查不出低水平的血清中和抗体,故采用敏感性较高的小鼠腹腔接种法。血清先用 10% 脱脂牛乳稀释 5 倍,与已知乙脑病毒 P₃ 株鼠脑培养物的 10 倍连续稀释液等量混合,取此混合液 0.3 毫升腹腔接种 7—9 克小鼠;同时以 5 倍稀释的正常豚鼠血清作为对照,依同样方法与病毒液混合后接种小鼠。每一稀释度的病毒接种 4 只小鼠,

表 2 第一、第二次仔猪血清中和抗体的变化
(用小鼠腹腔感染中和试验法)

免疫组别	仔猪号数	对照组 -lg LD ₅₀	第一次(免疫前)中和指数			第二次(免疫后)中和指数			第一、二次(免疫前后)指数增减*							
			试验组 -lg LD ₅₀	指数对数	指数数值	试验组 -lg LD ₅₀	指数对数	指数数值	无明显变化		明显增长		明显降低			
									对数	数值	对数	数值	对数	数值		
对 照 (未免疫)	2-♀-1	8.5	9.3	1.2	0.16	9.3	1.2	0.16	0	1.0						
	1-♀-20		9.2	1.3	0.2	8.7	1.8	0.63	+0.5	3.2						
	1-♂-1		8.8	1.7	0.5	8.0	0.5	3.2	+0.8	6.3						
	1-♂-5		8.5	0.0	1.0	9.3	1.2	0.16	-0.8	1/6.3						
	2-♂-7		8.3	0.2	1.6	7.7	0.8	6.3	+0.6	4.0						
	2-♀-11		8.2	0.3	2.0	8.4	0.1	1.26	-0.2	1/1.6						
	2-♀-10		6.8	1.7	50.0	—	—	—	?	?						
	1-♀-10		4.6	3.9	8,000	8.4	0.1	1.26								
1-♂-2	4.4	4.1	16,000	7.0	1.5	32										
2-♂-6	—	—	—	7.5	1.0	10										
灭活疫苗 (1.0毫升 一次)	3-♂-11	8.5	8.5	0.0	1.0	8.5	0.0	1.0	0	1.0						
	3-♀-2		8.2	0.3	2.0	8.8	1.7	0.5	-0.6	1/4						
	3-♂-10		7.6	0.9	8.0	9.5	1.0	0.1	-0.5	1/3.2						
	3-♂-6		6.8	1.7	50	7.3	1.2	16								
	3-♂-15		5.5	3.0	1,000	8.0	0.5	3.2								
	3-♂-1		—	—	—	5.7	2.8	630								
C 株 I (1.0毫升 一次)	4-♀-1	8.5	8.7	1.8	0.63	8.0	0.5	3.2	+0.7	5.0						
	4-♀-11		8.5	0.0	1.0	9.0	1.5	0.32	-0.5	1/3.2						
	4-♀-10		8.5	0.0	1.0	7.7	0.8	6.3	+0.8	6.3						
	4-♀-12		8.2	0.3	2.0	8.5	0.0	1.0	-0.3	1/2						
	4-♀-36		7.0	1.5	32	5.5	3.0	1,000								
	4-♀-31		7.0	1.5	32	3.8	4.7	50,000								
C 株 II (10毫升 一次)	5-♂-7	8.5	8.6	1.9	0.8	3.6	4.9	80,000								
	5-♀-1		8.4	0.1	1.26	5.0	3.5	3,200								
	5-♀-2		8.3	0.2	1.6	2.6	5.9	800,000								
	5-♀-10		7.0	1.5	32	6.0	2.5	320								
	5-♀-7		6.3	2.2	160	8.4	0.1	1.3								
	5-♀-6		5.5	3.0	1,000	2.8	5.7	500,000								
P ₃ 株 (10-1.0 毫升一次)	6-♂-22	8.5	7.5	1.0	10	2.5	6.0	1,000,000								
	6-♂-41		6.8	1.7	50	3.0	5.5	320,000								

* 明显增长即指数对数增 ≥ 1.0 或数值 ≥ 10; 明显降低即指数对数降 ≤ 1.0 或数值 ≤ 1/10; 无明显变化即指数对数增减在 > 1.0—< 1/10—< 10 之间。

观察 21 日, 记录死亡日期、数目, 按 Reed-Muench 氏法分别计算对照组和试验组的 LD_{50} , 以它们的比值表示该试验血清的中和水平, 这个比值即中和指数。

由表 2 看出: 1. 对照组的前 6 只动物第一次血清抗体水平较低, 第二次血清中和指数与第一次比较无明显改变, 这样的抗体水平显然属于抗体阴性范围; 其中第一次血清有一定抗体水平的两只动物 (1-♀-10 和 1-♂-2), 至第二次血清中则明显降低, 此种降低看来是来自母体被动抗体水平随仔猪成长而趋于下降的反映。2. 灭活疫苗组动物免疫前后血清抗体水平的动态与对照组第一次和第二次血清的极为相似。即免疫前低抗体的仔猪, 在免疫后无明显改变; 免疫前抗体具有一定水平的仔猪, 免疫后有所降低, 这表明用 1.0 毫升灭活疫苗免疫一次不足以唤起抗体反应。3. C 株免疫 I 组的动物, 经一次免疫后, 6 只中有 2 只免疫后较免疫前血清抗体明显增长; C 株免疫 II 组的动物, 则有 5/6 的动物在免疫后抗体有所增长。4. P_3 株免疫后的两只仔猪, 抗体全都急剧升高。

由上述结果似可认为, 1.0 毫升 C 株病毒液皮下注射免疫仔猪一次, 可使一部分动物血清抗体升高, 病毒剂量增高则抗体按相应比例升高; 有相当免疫水平的仔猪, 经 C 株或 P_3 株免疫后, 仍可使抗体增高; 有些仔猪在免疫前抗体强度中等, 随时间延长趋于降低, 此种免疫前的抗体强度显然来自先天抗体。

四、野生乙脑病毒引起的病毒血症的防止

一个减毒毒株是否适用于免疫仔猪, 主要取决于能否阻止流行季节前在自然界野生乙脑病毒引起的病毒血症。为了解 C 株病毒是否有此效用, 将对照组和各免疫

组动物, 自 7 月 1 日起每周断尾采血一次, 连续 6 次, 以所得血清按前述方法在三种宿主系统中分离野生乙脑病毒。结果(表 3)从对照组和灭活疫苗组的部分仔猪中得到了病毒, 而用 C 株和 P_3 株免疫后的动物血液中分离不到病毒。所得到的 12 株病毒, 经对小鼠致病力的检查(见表 4)和其中 7 个代表株对已知乙脑免疫血清中和试验鉴定(见表 4), 证明是乙脑病毒。

由此可见, 使仔猪血清抗体水平明显增长的强毒株 P_3 株和 10 毫升大剂量的 C 株减毒病毒, 固然可以阻止野生病毒引起的病毒血症, 1.0 毫升小剂量的 C 株病毒虽然只能使不足半数 (2/6) 仔猪出现抗体反应(表 2), 却仍然具有防止野生病毒引起的病毒血症的功能。而灭活疫苗则缺乏此种功能。

五、讨 论

一种新的活病毒疫苗, 往往首先要求在受免疫的宿主内不引起病毒血症, 以保安全, 安全有对个体和群体两重内容。个体安全就是接受疫苗者不致发病; 群体安全可能更为重要, 即疫苗病毒在宿主间不会相互传播, 或虽可传播但毒力不会增强。C 株病毒不致产生病毒血症, 对个体或群体宿主看来都是安全的。

作为一种有效的活疫苗, 其减毒程度似应以能产生可测知的免疫反应而不引起临床症状为准。C 株病毒, 用 1.0 毫升剂量不足以使大部动物唤起抗体反应, 虽则可以阻止野生病毒引起的病毒血症; 因此, 剂量应增至 5—10 毫升为宜, 加大剂量也便于实际掌握与操作。

本文介绍的中和试验, 采用血清稀释、小鼠腹腔接种的方法。结果发现: 1. 免疫后未见抗体增长的仔猪, 仍有阻止自然界野生病毒引起病毒血症的能力, 这说明抗

表 3 减毒病毒 C 株预防仔猪乙脑自然感染观察结果

免疫组别	免疫经过	免疫只数	使用宿主和野生乙脑病毒阳性比例		
			小鼠	鸡 胚	鸡胚细胞
对 照	未免疫任何疫苗或病毒	10	5/10	2/6	1/8
灭活疫苗	乙脑灭活疫苗皮下 1.0 毫升	6	2/6	1/2	1/3
C 株 I	C 株病毒液皮下 1.0 毫升	6	0/6	0/2	0/2
C 株 II	C 株病毒液皮下 10 毫升	6	0/6	—	—
P ₃ 株	P ₃ 株病毒液 10 ⁻² 皮下 1.0 毫升	2	0/2	—	—

表 4 12 个毒株对小鼠致死力和中和试验鉴定结果

毒 株 名	血样采 取日期 (日/月)	不同感染途径小鼠致死力(-lg LD ₅₀)				小鼠腹腔感染中和试验鉴定				
		传递 代数	脑内	腹腔	皮下	传递 代数	阴性血清 LD ₅₀	阳性血清 LD ₅₀	中和指数	
									对数	数值
1-♂-1 鼠	15/7	2	6.8	6.0	6.2	4	9.5	4.8	4.7	50,000
1-♂-1 鸡	15/7	3	5.7	4.8	5.2	—	—	—	—	—
1-♂-1 斑	15/7	2	5.0	4.5	3.7	—	—	—	—	—
1-♂-5 鼠	15/7	3	7.7	7.0	6.8	5	9.5	5.5	4.0	10,000
1-♂-5 鸡	15/7	3	6.3	6.5	5.5	—	—	—	—	—
3-♂-10 鼠	15/7	3	6.6	6.4	7.0	5	9.5	5.7	3.8	6,300
3-♂-10 鸡	15/7	3	3.5	4.5	4.2	—	—	—	—	—
3-♂-10 斑	15/7	2	4.8	5.2	3.2	—	—	—	—	—
1-♀-20 鼠	15/7	3	6.0	6.0	5.8	5	9.5	4.5	5.0	100,000
2-♀-1 鼠	22/7	3	6.7	6.0	5.7	5	7.5	<4.6	>2.9	>800
2-♀-11 鼠	15/7	3	7.5	7.3	5.8	5	7.5	3.8	3.7	5,000
3-♀-2 鼠	15/7	2	6.3	4.4	4.0	4	6.6	<3.5	>3.1	>1,260

体所需要的反应与阻止病毒血症所需要的最低免疫病毒剂量(或最低机体免疫水平)有所不同,抗体反应所需剂量高于抑制病毒血症所需剂量。2. 由表 2 可见,对照组和灭活疫苗组的部分仔猪、C 株免疫 II 组中未获免疫力的 5-♀-7 号仔猪中,观察到来自母体先天中和抗体,在出生后 3—4 个月间急剧下降的过程。3. 免疫前有一定抗体水平的部分仔猪,经 C 株或 P₃ 株免疫后,抗体强度仍然有所增加或急剧增加。

这部分免疫前有一定抗体水平的动物,免疫后其抗体强度之所以能继续增长,是由于所用毒株的毒力较强或剂量较大,

或二者兼备,足以胜过机体既有抗体水平的防御能力,从而使病毒得以继续扩散和繁殖。当然,能否感染成功,取决于机体的免疫水平的高低和毒株毒力强弱和剂量大小两方面的相对因素。免疫水平的高低是对相应毒株的毒力和剂量而言,如宿主对一定毒株的免疫水平低,则可以感染(主要为隐性感染)成功,抗体从而增加(见表 2, P₃ 株免疫的两只动物);反之,如机体免疫水平很高,则不能感染病毒,抗体不增加,甚至持续下降(见表 2, C 株免疫 II 组中的 5-♀-7 号)。同样,病毒毒力的强弱与剂量的大小,也是以相应机体免疫水平的高低为条件的。从接种减毒株 C 株和强

毒株 P₃ 株和不同抗体水平的仔猪所得到的不同抗体反应的结果,可以推论: C 株只能在抗体水平较低的机体内引起抗体增长,而 P₃ 株则能突破抗体水平较高的宿主的免疫障碍,使其受到隐性感染,导致抗体继续增高。流行地区人体、马匹或其它动物的血清抗体水平极高,用小鼠脑内接种法检查时,中和指数以千百万计^[5];这样高度的抗体水平,看来决不是一两次乙脑病毒感染所能达到的,可能是多年反复经受自然界野生乙脑病毒感染的累积结果。

在自然界中,野生乙脑病毒感染直接使猪致死的情况虽不多见,但此种病毒感染猪群的情况广泛存在^[6],孕期母猪受感染后,病毒可经胎盘侵犯胚胎,导致流产、死产或新生仔死亡^[7]。从怀孕早期感染乙脑病毒的子宫内孕体(Conceptus)内分离出了病毒^[8],这说明病毒能否侵入胚胎,与感染时孕期早晚有一定关系。

当前,国内外都在进行猪只免疫试验,初步表明,减毒活疫苗^[9]、灭活疫苗^[10]均可阻止人工强毒攻击所引起的病毒血症;用乙脑疫苗在流行期前免疫猪,也可间接收到保护人类的效果^[11]。这次试验也证实减毒株 C 株乙脑病毒在仔猪中可以阻止野生乙脑病毒引起的病毒血症。

最近报道过,用乙脑减毒疫苗免疫带有来自母体抗体的幼驹,往往不能成功^[12];以减毒疫苗免疫孕马可导致幼驹畸形^[13]。当采用活疫苗免疫猪只时,应注意观察这两方面的问题。

参 考 资 料

- [1] Scherer, W. F. and Buescher, E. L.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 8: 644, 1959.
- [2] Scherer, W. F. et al.: *J. Immunol.*, 83: 620, 1959.
- [3] 王用楫等: 微生物学报, 1: 97, 1953.
- [4] Hammon, W. McD. & Sather, G. E.: *Arboviruses in E. H. Lennette and N. J. Schmidt, Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections 4th Ed.*, p. 275, 1967.
- [5] 王潜渊等: 微生物学报, 5: 294 1957.
- [6] 王逸民等: 中华卫生杂志, 6: 197, 1958.
- [7] Burns, K. F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 75: 621, 1950.
- [8] Shimizu, T. et al.: *Jap. J. Exp. Med.*, 24: 363, 1954.
- [9] Ogata, M. et al.: *Virus (Tokyo)*, 20: 211, 1970.
- [10] Ando, Y.: *Virus (Tokyo)*, 20: 1, 1970.
- [11] Takahashi, K. et al.: Effects of immunization of swine upon the ecological cycle of Japanese encephalitis virus, in W. McD. Hammon, M. Kitaoka and W. G. Downs: *Immunization for Japanese encephalitis*, p. 292, Igaku Shoin Ltd. Tokyo, 1971.
- [12] 王用楫等: 微生物学报, 16: 17, 1976.
- [13] 王用楫等: 科学通报, 20: 529, 1975.

SEROLOGICAL RESPONSE AND EPIDEMIOLOGICAL PROPHYLAXIS IN PIGLETS IMMUNIZED WITH THE JAPANESE ENCEPHALITIS ATTENUATED VIRUS

Wang Yong-ji, Gu Pei-wei, Li Mei-rung, Sun Mian, Liu Pei-sheng
Yi Xiu-yun, Cong Yu-xing, Li Yue-yun
(*National Vaccine and Serum Institute, Beijing*)

1. Groups of piglets immunized with chick embryo cell-adapted attenuated C strain and mouse brain-adapted virulent P₃ strain of Japanese encephalitis virus were designed to observe the occurrence of viremia on successive occasions after inoculation. The P₃ virus could be detected in blood stream 48 or 72 hours after injection; whereas viremia was not observed in all the animals having received the C virus.

2. Both piglets inoculated with P₃ had a higher antibody level in the post-immune serum than the preimmune; in two groups of 6 piglets each vaccinated with 10 ml and 1.0 ml of the C virus fluid, five and two revealed increasing antibody level in the postimmune sera respectively; none of six having received the inactivated vaccine showed enhancement in antibody titre of the postimmune sera.

3. It was seen that five cases in which the antibody level in the post-immune serum appeared to be lower than the preimmune were distributed in three

piglet groups namely the control (2 cases), the inactivated vaccine treated (2 cases) and the C virus vaccinated (1 case). Such decrease, apparently, was resulted from the falling off of maternal passive immunity with the growing up of piglets.

4. Peripheral blood samples of the piglets in each experimental group were collected from July 1 to August 5, 1965, just during the prevalent season of encephalitis and tested for the presence of the wild type virus so as to evaluate the practical effectiveness against the viremia of the various vaccines tested. Five of 10 piglets in the control group and two of 6 in the inactivated vaccine group did give positive viremia; while no virus was isolated from 12 animals immunized with the C virus, nor from two piglets inoculated with P₃. These results indicated that C strain vaccine might be applied to prevent the occurrence of Japanese encephalitis viremia in the field and experiments have shown 1.0 ml was sufficient dose for this purpose.