

乙型脑炎减毒株活疫苗对预防 母猪流产的进一步观察

敖 坚 俞永新 武佩芬 张国铭

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

姚龙涛 朱全忠

(上海市奉贤县畜牧兽医站, 上海)

指 导 李河民

1. 以 BHK₂₁ 细胞系为基质生产的乙脑 14-2 株活疫苗, 经免疫孕猪后, 对母猪本身无任何不良反应, 对仔猪亦无不良影响, 证明该活疫苗对猪是安全的。

2. 乙脑减毒活疫苗免疫猪后, 产生乙脑中和抗体显著, 阳转率为 80—100%。14-2 株的抗体阳转率和几何均值均较 5-3 株高。

3. 免疫母猪的死产率显著下降, 据统计, 头胎母猪的死产率一般为 47.3—58.3%, 经乙脑活疫苗免疫后降低到 6.6—8.1%, 效果十分显著。其中 14-2 株较 5-3 株为优, 当疫苗稀释至 1000 倍时仍有较好的保护作用。

材 料 和 方 法

(一) 疫苗和接种方法

以 14-2 株乙脑减毒株接种原代地鼠肾组织培养细胞制备液体活疫苗, 病毒滴度 $\text{TCD}_{50}/0.2$ 毫升 $10^{6.5}$ 。每头猪的接种量为肌内 2 毫升。14-2 株接种乳地鼠肾传代细胞系 (BHK₂₁) 组织培养细胞制备液体活疫苗, 病毒滴度 $\text{TCD}_{50}/0.2$ 毫升 $10^{7.0}$ 。每头猪的接种量为肌内 1 毫升。

为了进行不同疫苗比较, 以 5-3 株减毒株接种地鼠肾组织培养细胞制备液体活疫苗, 病毒滴度 $\text{TCD}_{50}/0.2$ 毫升 $10^{7.0-7.1}$ 。每头猪的接种量为肌内 2 毫升。

(二) 免疫时间

重点观察的猪只均在该地蚊虫出现前的 3 月中旬接种疫苗。试验组与对照组设在同一种畜场或畜牧场, 配种后由兽医定期检查记录, 在秋季统计流产情况。

(三) 血清中和试验

采用血清浓度固定, 病毒液稀释的小鼠脑内中和试验法。判定标准以中和指数 < 10 为阴

性, 10—49 为弱阳性, 50 以上为阳性。本报告中的阳性结果均以中和指数 50 以上作统计, 需要弱阳性结果时, 另加以注明。

实 验 与 结 果

(一) 疫苗的安全性

在上海地区, 每年夏秋季分娩的头胎母猪, 其产活仔率一般在 41.7—55.1% 之间, 而经产母猪的产活仔率在 95% 以上。头胎母猪产活仔率低的主要原因, 系因感染乙脑病毒后所引起的流产所致。为了解 14-2 株对头胎母猪的安全性, 用活疫苗接种于怀孕 1—3 个月左右的母猪, 在秋季观察其产仔情况。结果表明, 无论是 14-2 株或 5-3 株活疫苗接种后所有猪只的体温, 食欲及活动均正常, 其产活仔率 14-2 株为 97%, 5-3 株为 94% (表 1)。证明两株活疫苗对孕猪是安全的, 无任何异常反应。

本文于 1979 年 12 月 29 日收到。

表 1 乙脑活疫苗接种孕猪后的产仔情况

疫 苗 别	孕 猪 数	怀孕天数	产仔总数	产活仔数	产活仔率 %	平均每胎产 活仔数(头)
14-2	9	22-50	91	88	97	9.7
5-3	10	27-95	98	92	94	9.2

表 2 乙脑活疫苗免疫猪体后的中和抗体反应

疫 苗		猪数*	免 疫 后 中 和 指 数					阳转率 %	GMT
组 别	滴 度 Log TCD ₅₀		< 10	> 10	> 50	> 100	> 1000		
14-2	HKC	6.50	6			2	4	6	1175
	BHK ₂₁	7.00	5			4	1	5	338
5-3	HKC	7.00	6		1	1	3	5	120
对 照		14	12	2				0	

* 免疫前中和指数均 < 10; HKC 为原代地鼠肾组织培养活疫苗; BHK₂₁ 为乳地鼠肾细胞系组织培养活疫苗。

(二) 疫苗的免疫原性

1. 血清中和抗体

对 17 头免疫前抗体阴性的猪分别用 14-2 株原代地鼠肾和 BHK₂₁ 活疫苗以及 5-3 株原代地鼠肾活疫苗进行免疫, 另以未接种疫苗的 14 头猪作为对照组。于接种前及接种后一个月分别采血按小鼠脑内法测中和抗体。其抗体阳转率 14-2 株两种疫苗均为 100% 而 5-3 株为 83.3%。从抗体滴度来看, 其几何平均值 (GMT) 14-2 株地鼠肾疫苗为 1175, BHK₂₁ 苗为 338, 5-3 株为 120 (表 2)。结果表明, 无论抗体阳转率或抗体滴度, 14-2 株均较 5-3 株为优。

2. 保护效果

以上海市几个郊区县种的种畜场内二月龄以上而又未经乙脑流行期的头胎母猪为观察对象。于三月中旬接种乙脑活疫苗, 接种后一个月左右配种, 在秋季观察受孕母猪的流产及死产情况, 计算死产率作为评价疫苗效果。观察结果列于表 3。在免疫的 245 只头胎母猪中, 14-2 株的死产率

分别为 8.6% 和 6.6%, 5-3 株为 8.1%, 而对照组的 137 只头胎母猪中, 其死产率分别为 47.3%, 52.6% 和 58.3%。结果表明, 二株活疫苗的死产率与对照组相比, 差异显著, 即无论哪株活疫苗都有明显的保护效果, 而二株之间则无显著差异。

3. 乙脑活疫苗免疫的猪群与自然隐性感染猪群的产活仔率比较

体液中含有乙脑中和抗体的母猪, 能够阻止乙脑病毒在其体内繁殖而不产生病毒血症^[1]。因此, 胎猪免于受到病毒的感染, 因而产仔正常^[2]。春季出生的母猪在经过乙脑流行季节后其自然感染率几乎 100%^[2]。因此用春季出生的母猪作为阳性对照组而设计下列试验, 观察乙脑活疫苗的免疫效果。

以当年乙脑流行季节后(秋季)出生的母猪于第二年四月份接种乙脑活疫苗为试验组, 取同年乙脑流行季节前(春季)出生的母猪为阳性对照组。两组均于第二年乙脑流行季节前配种, 在秋季观察其产仔情况, 结果列于表 4。以 14-2 株活疫苗免疫

表 3 乙脑活疫苗免疫猪群后的保护力

组 别	疫苗滴度 Log TCD ₅₀	母 猪 数	产仔总数	死 产 数	死 产 率 %
14-2 HKC 对 照	6.50	51	526	45	8.6
		10	97	51	52.6
14-2 BHK ₂₁ 对 照	7.00	19	213	14	6.6
		10	84	49	58.3
5-3 HKC 对 照	7.00	127	1364	111	8.1
		62	455	215	47.3

表 4 乙脑活疫苗免疫组与阳性对照组头胎母猪产活仔率比较

疫苗株别	组 别	孕 猪 数	产仔总数	产活仔数	产活仔率 %	差异显著性
14-2	免 疫 阳性对照	62	559	512	91.5	P>0.05
		49	441	409	92.7	
5-3	免 疫 阳性对照	68	737	681	92.4	P>0.05
		49	524	482	92.0	

的头胎母猪,其产活仔率为 91.5%,阳性对照组为 92.7%。以 5-3 株活疫苗免疫的头胎母猪其产活仔率为 92.4%,阳性对照组为 92%。结果说明经两株活疫苗免疫后的头胎母猪与经乙脑病毒自然感染后的头胎母猪,其产活仔率基本上一致,二株活疫苗之间亦无显著差异,保护效果十分显著。说明活疫苗免疫起到乙脑病毒自然感染的作用。

4. 二株减毒活疫苗的最小免疫量测定

从免疫效果来看,接种效价高的疫苗时,无论抗体阳转率或对猪的保护力,在两株减毒活疫苗之间没有明显的差别。为了进一步了解该二减毒株的免疫原性和更合理地使用疫苗,测定了活疫苗的最小免疫量。于免疫后一个月采血测定中和抗体,并在配种后观察受孕母猪的产仔情况。结果列于表 5 和表 6。以 5-3 株活疫苗(Log TCD₅₀/0.2 毫升 10^{7.0}) 免疫的猪只抗体阳转率为 83.3%,其死产率为 8.1%,而对照组则为 47.3%,保护效果十分显著。此疫苗稀释 10 倍(Log TCD₅₀/0.2 毫升 10^{6.0})

后免疫母猪,其抗体阳转率降低到 60%,死产率增高到 23.4%,但与对照组相比,其死产率仍有显著差异。以 14-2 株 BHK₂₁ 活疫苗(Log TCD₅₀/0.2 毫升 10^{7.0}) 免疫母猪后,其抗体阳转率为 100%,死产率为 6.6%。此疫苗稀释 1000 倍(Log TCD₅₀/0.2 毫升 10^{4.0}) 后免疫母猪,其死产率为 16.7%,而对照组则为 58.3% 仍能产生较好的保护力。但其抗体阳转率已出现偏低的趋势,即血清中和指数 >50 者仅占 11.1%,10—49 者占 88.9%。因此,14-2 株 BHK₂₁ 活疫苗以 Log TCD₅₀/0.2 毫升 10^{4.0} 病毒滴度一毫升免疫猪只,可视为对猪的最小免疫量。同时可看出,5-3 株 Log TCD₅₀/0.2 毫升 10^{6.0} 病毒量,相当于 14-2 株 Log TCD₅₀/0.2 毫升 10^{4.0} 病毒量的免疫效果,两者 TCD₅₀ 相差 10 倍以上,14-2 株的免疫力优于 5-3 株活疫苗。

从几年来积累的中和指数与保护力的数据来看(表 7),头胎母猪经活疫苗免疫后血清中和指数为 10—49 时,母猪的死产率为 9.8%,中和指数 < 10 的对照组猪,

表 5 乙脑活疫苗不同免疫量的中和抗体反应

组 别	疫苗免疫量 Log TCD ₅₀	猪数*	免疫后中和指数				阳性数	阳转率 %	GMT
			< 10	> 10	> 50	> 100 > 1000			
14-2 BHK ₂₁	7.0	5			4	1	5	100	338
	6.0	10		2	1	6	1	8	80.0
	5.0	9		1	3	5		8	88.8
	4.0	9		8			1	11.1	21
对 照	—	6	4	2			0		
5-3 HKC	7.0	6		1	1	3	1	5	83.3
	6.0	5		2		2	1	3	60.0
对 照	—	4	4				0		

* 免疫前中和指数均<10。

表 6 乙脑活疫苗不同免疫量的保护力

组 别	疫苗免疫量 Log TCD ₅₀	猪 数	产仔总数	死 产 数	死产率%
14-2 BHK ₂₁	7.0	19	213	14	6.6
	6.0	15	137	17	12.4
	5.0	14	188	18	9.6
	4.0	10	78	13	16.7
对 照	—	10	84	49	58.3
5-3HKC	7.0	127	1364	111	8.1
	6.0	8	94	22	23.4
对 照	—	62	455	215	47.3

表 7 不同中和指数与保护力的关系

组 别	中和指数	母 猪 数	产仔总数	死 产 数	死产率%
免 疫	10—49	20	183	18	9.8
	> 50	13	158	13	8.2
	> 1000	57	602	28	4.6
对 照	< 10	43	356	175	49.1

其死产率则为 49.1%。说明血清中和指数为 10—49 时,对猪已有较好的保护效果。

讨 论

本文通过猪体进一步试验观察证明,乙脑减毒 5-3 株或 14-2 株活疫苗在头胎母猪体上接种使用是安全的。王用楫氏认为乙脑减毒株(79 株等)接种早期孕马后可引起胎儿畸形^[4]。但,在我们的观察中

5-3 株或 14-2 株接种猪后不仅不引起猪体产生发热反应和其他临床症状,即使对早期孕猪接种也未发现任何不良反应和胎儿畸形,而且通过猪体繁殖 5 代后病毒的嗜神经毒力亦未增高^[4],这似乎说明 5-3 株与 14-2 株的毒力较弱而且遗传性是稳定的。对预防猪流产的免疫效果,日本学者曾以灭活疫苗进行免疫观察,效果不够满意,以后证明以高效价、大剂量、三次

接种方可获得较好的免疫效果^[5,6]。而以 m 株活疫苗对猪进行一次免疫后其抗体反应和预防流产效果都比较好,但还有较多的发热反应^[7,8]。我们进一步试验的结果证明 5-3 株和 14-2 株对猪体的免疫效果十分显著,抗体增长率达 80—100%,死产率可由对照组的 50% 左右下降到 6—8%,而且 14-2 株的免疫原性更高,当疫苗稀释到 1000 倍时即以 Log TCD 50/0.2 毫升 $10^{4.0}$ 病毒量免疫猪时,仍然有较好的保护作用,这一点在实际应用上具有重要意义,即在疫苗使用时可以稀释 10~100 倍,节省疫苗用量,便于推广应用。我们的试验同时证明,接种活疫苗后又可有效地阻止野毒感染^[4],它提供人们有根据地说明预防死产的效果和防止蚊虫吸猪血再扩散野毒病毒的效果。这一点在日本已经通过现场试验观察得到证实^[9-10]。在我国乙型脑炎病毒对人和家畜的感染非常广泛。猪是肉用家畜,基本上饲养一年即可屠宰,又更新大量新猪,因此容易感染乙脑病毒,成为新的扩散乙脑病毒的宿主,因此利用活疫苗免疫猪体不但对提高产活仔率发展养猪事业有实用价值,而且对预防人类乙型脑炎的流行亦具有重要意义。

制备兽用乙脑活疫苗的原材料应易得而成本低。在实验中为培养减毒株,我们利用了地鼠肾原代细胞和传代细胞系(BHK₂₁),以转瓶组织培养方法制备。这些细胞一般不易携带猪体病原体,对猪较为安全。利用 BHK₂₁ 系细胞比原代地鼠肾细胞有更方便和成本低的优点。但应考

虑,如果经常在实验室内传代时,可能易被支原菌(PPLO)污染或发生对乙脑病毒敏感性的改变,因此利用液氮保存细胞种子是必要的。目前生产和供应的乙脑减毒活疫苗均系液体疫苗,存在着保存期短和运输、存放条件要求较高(2—10℃)等缺点。随着应用区域的日益扩大,使用时间又相当集中,在较短的时间内制备出大量疫苗将是困难的。因此应考虑用冻干工艺安排常年生产,以满足广大地区的使用需要。我们已进行了初步试验研究,从病毒滴度和对小鼠的免疫性来看冻干疫苗是稳定的,将进一步进行现场扩大观察。给大量猪群进行免疫接种是一件繁重的工作,因此,为减轻工作量,便于更广泛使用,应研究包括乙脑活疫苗在内的兽用疫苗的联合免疫。

参 考 文 献

- [1] 北京药品生物制品检定所等: 药品与生物制品, 3: 188—191, 1976。
- [2] 上海市卫生防疫站等: 药品与生物制品, 1: 26—29, 1977。
- [3] 伊藤宏等: 日本兽医会雜誌, 27: 331, 1974。
- [4] 王用楫等: 科学通报, 20: 529, 1975。
- [5] Watanabe M: Immunization for Japanese Encephalitis, p. 304, WMCD, Hammon 氏等主编, 日本出版, 1971。
- [6] Nakamura, H.: 同上, p. 305—312, 1971。
- [7] Kanda, K.: J. Immunol., 100: 194, 1968。
- [8] HSU, S.T. et al.: Bull. WHO., 46: 465, 1972。
- [9] 高桥等: ウイルス, 21(2): 30, 1970。
- [10] 松尾等: 感染症学雜誌 46(12): 475, 1972。
- [11] Takahashi, et al.: 同 [5], p. 292—303, 1971。

FURTHER OBSERVATIONS ON JBE ATTENUATED LIVE VACCINES USED FOR PREVENTION OF STILLBIRTHS IN SWINE

Ao Jian Yu Yongxin Wu Peifen Zhang Guoming

(*National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products,
Ministry of Health, Beijing*)

Yao Longtao Zhu Quanzhong

(*Veterinary Station, Fengxian, Shanghai*)

Under the Direction of Li Hemin

1. Two attenuated JBE live vaccines designated as 5—3 and 14—2 have been used for immunizing sows in early pregnancy. No untoward reaction was noted and over 90% of the newborn piglets from the vaccinated mother pigs were healthy. These results suggest that these two vaccine strains were safe for the pregnant sows.

2. The serum neutralization antibody conversion rate of both vaccines in vaccinated sows was 80—100%, but that of the controls was negative. The vaccine strain 14—2, however showed much better

serum conversion and GMT.

3. The incidence of stillbirths due to infection with JBE spontaneously after vaccination was significantly decreased, but not in the controls. Only 6.6—8.1% of newborn piglets from the immunized sows were stillborn while there were 44.8—58.3% in those from the controls. Furthermore, the vaccine strain 14—2 seems to be more potent as when the vaccine was diluted to 10^{-8} , it still gave a good protection.