

森林脑炎减毒活疫苗的研究

I. 毒株的选育

黄永成 曹友松 曹一鸣 孙衍庆 刘东升 庄贞禧 辛 钧

(长春生物制品研究所, 长春)

为了提高病毒在神经外组织的繁殖能力和增强其免疫原性, 将 Coφ 乳鼠变异株于小白鼠、豚鼠和金黄地鼠进行了连续传代适应。选育出的减毒株其对嗜神经性毒力显著减弱, 当脑腔接种于地鼠和恒河猴时不能引起致病或死亡, 同时在中枢神经系统亦检查不到严重的组织学病变。减毒株保留对小白鼠脑腔的残余毒力和原株的抗原性。从对小白鼠的毒力上可认为本系减毒株和其它所报告的减毒株相似。

应用 HS₁ 减毒株所制备的活苗一次皮下接种无免疫史的 171 名志愿者时未发现局部或全身反应, 免疫后血清应用森林脑炎强毒“张株”或 Coφ 株测中和抗体时, 其阳转率为 38—60%。

森林脑炎(以下简称森脑)病毒的致病性和遗传特征比较稳定, Smorodintsev 等^[1]以人工驯化育种企图获得减毒株未能成功。我国朱氏等^[2,3]将森脑病毒 Coφ 株在乳龄小白鼠脑腔连续传递后发生毒力变异同时也失去在神经外组织的繁殖能力, 从而不能产生有效的活毒免疫。本文报告将乳鼠变异株再通过不同种动物的神经外途径传代适应一定代数达到增强病毒在神经外组织的繁殖能力和进一步降低变异株致病力的研究过程。

材料和方法

(一) 毒株

1. Coφ 株: 取自卫生部药品生物制品检定所, 在我实验室鼠脑传代, 低温保存。

2. 森张株: 从东北某林场病尸脑分离出, 鼠脑传代, 低温保存。

3. 乳鼠变异株: 传代历史见另报告^[4], 取第 40 代干燥毒种经 7 克小白鼠脑腔再传 3 代。

(二) 实验动物

1. 小白鼠: 常规检定用鼠体重为 10—12 克, 脑腔及鼻腔接种剂量为 0.03—0.05 毫升, 腹腔及皮下为 0.2 毫升; 用于静脉接种的鼠体重为 16—18 克, 剂量为 0.2 毫升, 除皮下接种组观察 28 天外, 其它途径接种者均观察 21 天。

2. 金黄地鼠: 常规检定用为生后 3 周离乳鼠。脑腔接种 0.05 毫升, 皮下接种 0.2 毫升。脑腔接种者观察 21 天, 并将健存鼠以乙醚麻醉解剖取脑置 Bouin 氏固定液然后做病理学检查。皮下接种者观察 28 天后采血, 每 2—3 只地鼠混合为一组进行血清中和和抗体测定。

3. 中国地鼠: 购自北京机关科研动物供销部, 体重为 20—30 克。

4. 恒河猴: 购自广西省南宁, 于脑实质或丘脑部位接种病毒 0.25—0.5 毫升。

5. 豚鼠: 常规检定用体重为 250—300 克。

(三) 检定方法

1. 病毒滴定: (1) LD₅₀: 按实验室常规方法。

(2) TCD₅₀: 应用鸡胚单层细胞(以下简称 CEC) 其制备和试验判定方法详见另报告^[4]。

本文于 1979 年 8 月 31 日收到。

2. 中和试验: 检测血清中和抗体主要应用小白鼠腹腔接种法或脑腔法并应用细胞法。

(四) 病毒变异过程与研究技术

1. 氯化铝加温处理^[5]: 取乳鼠变异株 43 代鼠脑毒种加 10% 牛血清 199 液制成 10% 悬液, 加等量含有 10mM 氯化铝的细胞维持液混合后置于 50℃ 水浴中加温处理 15 分钟, 然后再稀释成不同浓度分别接种于 CEC, 待出现明显细胞病变时收获, 再同法加氯化铝处理, 如此继续传递 5 代。从第 6 代起改为在病毒培养时加有氯化铝, 不再进行加温处理, 如此连续传递 5 代, 先后共计 10 代。经蚀斑纯化选出 AP₁₋₁ 株, 其对小白鼠的毒力比原株进一步减弱。

2. 小白鼠皮下组织传代: 将 AP₁₋₁ 株接种生后 1—2 日龄乳白鼠两侧腹股沟皮下各注射病毒 0.1—0.15 毫升, 每代接种一窝约 10 只, 3—4 天后放心血杀死, 用 75% 酒精擦洗注射部位进行消毒后, 剪取局部皮肤以 Earle 氏液洗数次, 剪碎, 置入乳钵中加少量维持液研磨, 离心沉淀后取上清接种 CEC, 待出现明显细胞病变时再同法接种小鼠皮下, 如此连续传递 5 代。从第 6 代起改用体重 7 克小鼠, 传代前先将病毒液与 10% 正常鼠脑组织液等量混合, 置室温作用 1 小时, 然后将其混合液接种于小白鼠皮下, 如此传递 6 代, 先后共经小白鼠皮下传递 11 代, 此系变异株称为 AS 系。

3. 豚鼠淋巴腺传代: 将 AS 系病毒经 CEC 快速传代, 每 24 小时传递一代。于第 6 代进行蚀斑纯化, 选出 No. 2 空斑为 P₁ 系。将 P₁ 株 CEC 22 代接种于生后 2 周, 体重约为 200 克的豚鼠两侧鼠蹊部皮下, 每侧 0.5 毫升。3—5 天后取两侧鼠蹊部淋巴结研碎制成 10% 悬液, 离心后取上清种入 CEC, 待出现病变时收获再接种豚鼠, 从第 5 代起改用体重 300 克的豚鼠, 于豚鼠淋巴腺共传递 6 代, 命名为 G₁ 系。

4. 地鼠皮下接种取脾传代: 将 G₁ 系变异株进行空斑纯化, 选出毒力较低的 No. 15 空斑命名为 P₁ 系, 从 P₁ 系再次挑斑纯化选出 No. 3 斑, 即 G₁ 系挑斑纯化 2 代称 G₁ 203 或 203 系。此系是高度减毒株, 对猴脑腔接种无致病力, 人体皮下接种安全。为提高该株的免疫原性, 采用地鼠皮下接种取脾传代方法。其过程是: 选用三周

离乳地鼠, 于两侧皮下各接种病毒液 0.3—0.5 毫升, 接种后 3 天取脾制成 10% 悬液, 离心沉淀后取上清再转种 CEC, 待出现明显细胞病变时收获再同法接种地鼠, 如此传递 7 代, 从第 8 代起不再经 CEC 增殖, 取脾制成悬液后直接接种地鼠皮下递传至 20 代, 此系简称 HS 系, 如传 6 代称为 HS₆。

5. 地鼠经口接种取脾传代: 将 HS₆ 株于 3—4 周金黄地鼠口服, 每只动物以塑料管灌入 0.5—1.0 毫升病毒, 接种后 6—7 天解剖取脾, 将其制成 10% 悬液, 离心后取上清种入 CEC, 培育 5—7 天时再转种 CEC, 待有明显细胞病变时收获再同法进行口服传代, 如此传递 6 代简称 HOS₆。

研究结果

一、毒力变异

(一) 对小白鼠的致病力

森脑病毒对小白鼠有很强的致病力, 而且鼠龄、体重和感染途径对病毒滴度无显著影响^[6]。

变异株对小白鼠的致病力进一步减弱, 不仅表现在神经外途径如腹腔和皮下接种均不致病外, 脑腔接种后其潜伏期和病程亦均有所延长, 详见表 1。

值得提出的, 我们获得几系的变异株中, 除高度减毒株 203 株外, 其它系减毒株于皮下注射病毒后, 个别鼠偶而入脑发病, 但在注射病毒的同时经考地松处理或脑腔空针刺刺激动物后均不能提高入脑率。小鼠皮下注射入脑率与小鼠体重有密切关系。

为了探讨小鼠皮下注射入脑率与病毒毒力的关系, 我们选择了入脑率较高的 G₁ 株, 取其皮下接种小鼠后入脑发病的脑组织制成 10⁻¹ 悬液再感染小鼠皮下, 虽经小鼠一代增强了毒力但仍未再发现有人脑发病者, 见表 2。

(二) 对中国地鼠的致病力

中国地鼠 (*Cricetulus gricus*) 对森脑

表 1 G₆ 变异株脑腔接种对小白鼠的致病性

观察方法与结果	小鼠体重			
	乳 鼠	8—10 克	14—16 克	30 克
接种剂量(毫升)	0.01	0.03	0.03	0.04
潜伏期(平均日数)	5.46	9.5	10.67	10.17
病程(平均日数)	2.3	1.6	2.58	3.5
死亡(平均日数)	7.69	11.1	13.25	13.67
logLD ₅₀ *	4.20	3.00	3.50	2.50

* 表中数字为负对数,以下表同。

表 2 G₆ 株再感染小鼠皮下的结果

皮下接种时小鼠体重	发病死亡日期	病鼠脑组织的病毒滴度 (log ₁₀ LD ₅₀)	病鼠脑组织 10 ⁻¹ 悬液接种小鼠皮下结果
7—9 克	10 天	6.33	0/5*
7—9 克	10 天	5.78	0/5
7—9 克	11 天	6.39	0/5
7—9 克	11 天	4.77	0/5
7—9 克	13 天	6.00	0/5
7—9 克	14 天	4.67	0/5
7—9 克	15 天	5.50	0/5
10—12 克	20 天	5.63	0/5

* 发病死亡鼠数/接种鼠数。

表 3 Coφ 原株与 G₆ 变异株对中国地鼠不同途径感染的致病力

毒 株	TCD ₅₀	脑 腔	腹 腔	皮 下	肌 肉	辜 丸	鼻 腔
COφ*		8.77	2/4	2/4	2/4	2/4	3/4
Coφ CEC ₁	7.5	4.75	1/4	1/4	2/4	2/4	1/4
G ₆	5.0	0	0	0	0	0	0

* 引自参考文献[7]。

表 4-1 Coφ CEC₁ 与变异株对金黄地鼠和小白鼠的毒力

动物种类	接种途径	剂量 (毫升)	Coφ CEC ₁		G ₆ 变异株			HS ₆ 变异株			HOS ₆ 变异株
			1 次	2 次	1 次	2 次	3 次	1 次	2 次	3 次	
小白鼠	脑腔	0.03	6.50	6.67	4.67	4.67	4.77	4.33	4.50	4.00	≥5.50
	皮下	0.20	5.00	—	2/100	2/98	2/100	2/100	0/99	0/100	2/97
金黄地鼠	脑腔	0.03	≥7.33	7.37	0/20	0/20	0/19	0/20	0/20	0/19	0/10
	皮下	0.20	≥5.50	6.00	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/25

病毒很为敏感,并借此可与流行性乙型脑炎病毒相鉴别^[7]。选用 G₆ 系变异株于不同途径接种中国地鼠同时以强毒株 CoφCEC 一代毒种以资对照,其结果列如表 3。

从表 3 结果可看出, G₆ 系减毒株对中

国地鼠已完全失去致病力,取脑组织检查亦无明显地病理学改变,进一步证明其毒力变异。

(三) 对金黄地鼠的致病力

已知森脑病毒组中的各个病毒均对金

黄地鼠 (*Cricetus auratus*) 有致病力, 而且脑腔感染病毒的滴度与小白鼠感染的结果相一致, 皮下感染的致病力与毒株的毒力强弱有密切关系^[8]。G₆, HS₆ 和 HOS₆ 等变异株均失去对金黄地鼠的致病力, 结果见表 4。地鼠脑腔接种病毒后 21 天取脑做病理学检查时均未发现有神经细胞坏死现象, 仅个别鼠有轻度炎症反应, 从炎症反应的发生率来看, HS₆ 株的毒力比 G₆ 株进一步减弱。

(四) 对恒河猴的毒力

选择对森脑病毒中和抗体阴性, 肺部透视检查正常的健康猴于脑实质或丘脑部位注射病毒。在注射前三天和注射后逐日测肛温并观察临床反应, 其结果列于表 5。

从表 5 结果可以看出, 注射强毒 Coφ

株的 2 只猴呈现典型的脑炎症状致死, 而注射弱毒株的 22 只猴均健康的存活, 其中仅有 4 只猴在观察中只有一天的低热, 体温为 40.1℃, 这或许与检温前动物的活动有关。

除 P₁₅ 变异株在接种后 14, 22 天分别解剖 1—2 只猴外, 多数猴在注射后 28 天解剖取脑和脊髓作了病理学检查, 其详细结果列于表 6。

关于中枢神经系统的病变分级方法, 一般把病变分成神经细胞坏死及炎症反应两类, 各类病变又分为 5 级。表 6 结果进行统计学分析可认为 Coφ 原株与变异株在对猴的神经毒力上有非常显著性差异 ($P < 0.001$), G₆ 和 P₁₅ 株差异不显著, 其中以 203 株毒力最低。

表 4-2 变异株脑腔接种金黄地鼠后脑组织病理学检查

变异株	试验次数	病毒滴度		检查结果	
		LD ₅₀	TCD ₅₀	神经细胞坏死	炎症反应
G ₆ CEC ₆	1	3.50	5.50	0/10	4/10
	2	4.77	5.00	0/10	1/9
G ₆ CEC ₆	1	4.67	5.50	0/10	3/10
	2	4.67	5.67	0/10	5/10
HS ₆ CEC ₆	1	4.33	5.50	0/10	1/10
	2	4.50	6.00	0/10	0/10
	3	4.00	5.50	0/10	1/10

表 5 原株和变异株接种恒河猴脑腔后的临床所见

毒株		病毒滴度 LD ₅₀	接种猴数	体重 (市斤)	临床观察所见(发病日数)			
					高温	四肢麻痹	瘫痪	死亡
Coφ 原株		5.33	2	5.5—6.8	7	8	8—10	9—11
变异株	G ₆	3.66	2	4.5—4.7	0	0	0	0
	G ₆	2.00	6	3.0—4.5	0	0	0	0
	P ₁₅	4.39	4	5.6—7.3	0	0	0	0
	P ₁₅	4.67	6	3.8—4.7	0	0	0	0
	203	3.66	4	4.7—7.9	0	0	0	0

表 6 强毒株与变异株病毒脑内接种后的病变观察

毒株	丘脑		中脑		桥脑		延脑		颈髓		腰髓		小脑皮质		小脑髓质	
	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应
强毒株	出现数	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4
	等级范围	3.0	2.0—4.0	4.0	1.0—4.0	2.0—3.0	1.0—4.0	1.0—4.0	1.0—4.0	1.0—3.0	1.0—4.0	1.0	4.0	3.0	0—4.0	1.0—3.0
	平均等级	3.0	3.25	4.0	3.0	2.75	2.25	3.0	2.0	3.0	2.50	3.0	4.0	3.0	3.0	2.0
G ₄	出现数	2/8	3/8	2/8	3/8	1/8	3/8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	2/8	0/8	0/8	3/8
	等级范围	0—1.0	0—3.0	0—3.0	0—1.0	0—1.0	0—1.0	0	0—2.0	0	0	0	0—2.0	0—2.0	0	0.20
	平均等级	0.25	1.0	0.5	0.75	0.12	0.37	0	0.37	0	0	0	0.37	0.75	0	0.75
P ₁₅	出现数	1/10	3/10	0/10	2/10	0/10	2/10	0/10	3/10	0/10	2/10	0/10	1/10	1/10	0/10	2/10
	等级范围	0—1.0	0—3.0	0	0—1.0	0	0—1.0	0	0—1.0	0	0—1.0	0	0—1.0	0—2.0	0	0—1.0
	平均等级	0.1	0.5	0	0.2	0	0.2	0	0.3	0	0.2	0	0.1	0.2	0	0.2
203	出现数	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

二、增强病毒在神经外组织繁殖能力和提高免疫原性

原乳鼠变异株不能在神经外组织中繁殖, 从而影响其免疫原性。我们在育种过程中一直以提高变异株在神经外组织的繁殖能力为目标来增强变异株的免疫原性, 但在不同状况下应选择不同种动物和不同适应途径。经氯化铝处理而获得的减毒株再通过乳龄小白鼠皮下传递 5 代后毒力有一定回升, 对小白鼠腹腔和皮下接种时其病毒滴度分别为 ≥ 2.50 和 $2.12 \log LD_{50}$ 。从第 6 代始改为 7 克小鼠传递 6 代后不仅毒力降低且在神经外组织繁殖能力提高, 免疫性增强; 另如于豚鼠皮下接种后能在血液、淋巴腺和脾脏等处可检测出病毒(见

表 7), 同时动物血清中和抗体阳转率可达 80% 以上。

高度减毒的 203 株人体皮下接种后证明安全但免疫原性较差, 为提高其免疫原性采用地鼠皮下接种病毒取脾传代方法, 结果增强了病毒在神经外组织的繁殖能力, 如接种病毒后 3—6 天在动物脾脏内病毒的滴度可达 $2.0 \log LD_{50}$ 以上, 见表 8。

原乳鼠变异株活毒免疫动物的保护力与 Coφ 原株福尔马林灭活疫苗的免疫效果无区别, 并且该株病毒对猴脑腔接种仍有致病性^[3]。我们育种获得的 G₆ 株不仅对猴、中国地鼠和金黄地鼠等动物脑内接种无致病性并且其免疫原性又有所提高, 见表 9。

高度减毒株 203 和 HS₆ 免疫性则差些。

表 7 P₁ 变异株豚鼠皮下接种后病毒的分布

分离病毒材料	采 标 本 日 数				
	2	4	6	8	10
血 液	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5
脾	3/5	5/5	5/5	0/5	0/5
淋巴腺	4/4	5/5	5/5	4/4	0/5
脑	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

表 8 HS 系于地鼠传代过程接种金黄地鼠皮下后脾内病毒增殖动态

代 数	病毒滴度 (LD ₅₀)	接种后取脾日期与脾脏内病毒滴度				
		3 天	6 天	9 天	11 天	13 天
HS ₃ CEC ₁	3.33	2.00	1.67	0	0	0
HS ₆ CEC ₄	3.67	2.17	2.00	0	0	0
HS ₁₀ CEC ₁	3.17	≤ 0.75	2.67	≤ 0.75	1.50	0
HS ₁₆ CEC ₁	4.00	1.33	2.33	≤ 0.75	0	0

表 9-1 G₁ 株小鼠皮下一次免疫后 28 天腹腔攻击强毒的保护力

代数	试验次数	病毒滴度		小鼠体重(克)	攻击毒	
		TCD ₅₀	LD ₅₀		张株	Coφ
CEC ₁	I	5.5	3.5	7-9 12-14	5.17 5.50	6.00 4.18
	II	5.0	4.77	7-9 12-14	4.91 6.01	4.00 3.92
CEC ₂	I	5.5	4.67	7-9 12-14	5.17 6.50	4.00 5.73
	II	5.67	4.67	7-9 12-14	6.06 5.25	3.18 5.12

表 9-2 G₁ 株不同途径免疫小鼠后攻击强毒 Coφ 株的保护力

免疫途径	攻击途径	LD ₅₀		
		对照组	试验组	保护力
腹腔	腹腔	8.0	3.0	5.00
皮下	腹腔	8.0	3.31	4.69
静脉	腹腔	8.0	3.22	4.78
鼻腔	腹腔	8.0	6.00	2.00

表 9-3 G₁ 株豚鼠皮下一次免疫后 8 周血清中和抗体测定

豚鼠号	小鼠腹腔法(LD ₅₀)			细胞法血清中和效价
	病毒对照	试验组	中和指数	
1	8.33	<2.87	>5.46	1:64
2	8.33	5.30	3.03	1:16
3	8.33	4.54	3.79	1:32
4	8.33	≥7.50	≤0.83	<1:8

三、变异株的稳定性

变异株经小白鼠脑腔回传后对小白鼠脑腔的毒力有显著回升, 腹腔的毒力有一定升高, 皮下毒力基本稳定。HS₁ 株经地鼠口服传代后增强了对小白鼠口服感染的致病力, 人脑率可达 18%, 而皮下接种人脑率仍稳定于 2%, 并且对金黄地鼠脑腔、皮下和口服接种均无致病力。各系变异株经动物传代后的稳定性见表 10。

HS₁ 变异株于 CEC 传 10 代时毒力稳定, 在 20 代时两系中有一系的毒力有一定的回升, 见表 11。

四、减毒株人群接种临床反应观察

为慎重起见, 我们首先选用了安全系数较大的高度减毒的 203 株制备活苗于我实验室 5 名同志进行了自身人体反应观察。在此基础上, 于研究所内 13 名同志接种了 HS₁ 株进行临床观察证明安全。相继在某学校 14—18 岁未曾注射过森脑灭活疫苗的青年学生 171 人皮下注射 HS₁ 减毒活苗, 注射后未见有局部红肿、疼痛、淋巴结肿大及其它不良自觉症状。一次注射后血清中和抗体阳转率为 38—60%。关于疫

表 10 不同系变异株经动物传代后毒力的稳定性

变异株	传代方法和代数	小白鼠毒力 (logLD ₅₀)		
		脑 腔	腹 腔	皮 下
P ₁	小白鼠脑腔 1 代	7.23	2.00	0
	小白鼠脑腔 5 代	7.50	1.50	0
	小白鼠脑腔 10代	7.50	3.23	0
G ₁	小白鼠皮下 10代	3.66	1/20	0
P ₁	小白鼠脑腔 5 代	6.38	0	0
HS ₁	金黄地鼠径口 6 代	≥5.50	8/24	2/97

表 11 HS₁ 变异株于 CEC 传代后毒力的稳定性

	代 数	病毒滴度 (LD ₅₀)	小白鼠皮下毒力		金黄地鼠脑内毒力
			7-9 克	10-12 克	
I 系	CEC ₁	3.50	0/49	0/49	0/9
	CEC ₇	3.30	0/50	0/50	0/10
	CEC ₁₇	≥5.33	1/50	1/50	0/9
II 系	CEC ₁₀	≥5.33	3/20	0/20	0/10
	CEC ₁₀	4.78	5/20	1/20	5/10

苗的制备、检定与临床反应观察的结果详见另报告^[9]。

讨 论

森脑病毒和其它许多病毒一样,在实验动物宿主连续传递数代以后发生变异,但不一定需要数十代或数百代以后,一般在6代即开始出现对原宿主毒力改变现象。值得提出,如欲获得理想变异株在适应和减毒过程中必须结合空斑分离,这不仅将加速研究进度并可选出稳定的变异株。

关于森脑病毒致病力变异的指征问题,从实验结果可认为变异株获得的生物学性状与其适应新宿主感染途径和方法有直接关系,如乳鼠变异株通过脑腔长期传代后降低了神经外途径的侵袭力,但再改为皮下传代适应后又可增强对小鼠皮下感染的致病力;同时又证明经口服传代后可增强对径口途径感染的致病力而其对皮下

致病力稳定不变。从此可看出,应用小白鼠做为森脑病毒变异指征是很敏感的,但不适用于判定减毒株对人安全的标准。小白鼠和对森脑病毒的敏感性不呈平行关系^[10],实际上目前已进行了人群接种观察的森脑减毒活苗都保留有对小白鼠脑内的残余毒力和一定皮下入脑率^[11-14]。

关于怎样正确判断获得的变异株对实验动物的残余毒力与疫苗株免疫原性的关系是很重要的,因为变异株的毒力和免疫原性的对立统一是有条件的,这就需要选择适宜的实验动物模型和建立切合实际的合理的实验室检定标准。有人主张用羊羔^[15]和猪崽^[16],也有人主张用猴^[17,18],于脑内接种后选取对病毒侵害最敏感部位即所谓指示中心,检查实验性脑脊髓炎的程度^[19,20]。G₁株指示中心病变等级相似于17D株和流行性乙型脑炎5-3减毒株。

Slonim^[21]比较了森脑病毒对小白鼠、金黄地鼠和猴的毒力时证明金黄地鼠对病

毒的敏感性介于小白鼠和猴之间。Ерофеев^[22]应用了强、弱毒株对比研究了金黄地鼠、猪崽和猴三者致病性的关系,结果认为金黄地鼠的敏感性高于猴和猪崽。Andzhaparidze等^[23]在检定Soph-K变异株时证明,于恒河猴脑腔接种时观察3个月正常而同时于金黄地鼠脑腔和皮下接种则分别有14%和4%动物致病。为此,建议应用金黄地鼠脑腔接种后不引起临床症状和中枢神经系统无严重细胞坏死做为实验室选种安全标准,在此基础上可再考虑进行猴体试验,这样有利于研究工作的进展。

关于变异株的稳定性问题,我们认为所谓稳定是相对地静止状态,这应当是有条件的,暂时地和相对的。Langat原株混有少数强毒粒子,而多数为弱毒粒子故其性状表现为弱毒株。这样毒株经CEC传代时,从第5代起就对猴有了致病性,第7代时已全部成为强毒粒子^[24]。Price^[25]报告了类似研究结果。我们获得的变异株通过CEC传代后其性状和毒力基本是稳定的。

研究病毒变异规律主要应用目的之一是育种制备减毒活苗。我们应用HS₆减毒株小批生产了活苗并证明了其安全性,在此基础上再用其安全指标来检定G₆等株并应用其制备活苗可能是有前途的。

参 考 文 献

[1] Smorodintsev, V. V. et al.: *J. Hyg.*, 67: 13,

- 1969.
- [2] 朱既明等: 生物制品通讯, 2:26, 1957.
- [3] 朱既明等: 微生物学报, 8(1):73, 1960.
- [4] 黄永成等: 微生物学报, 20(2):196, 1980.
- [5] Wallis, C.: *Virology*, 19: 483, 1963.
- [6] Casals, J. et al.: *J. Exper. Med.*, 79: 45, 1944.
- [7] Chang Nai-chu et al.: *Chinese Med. J.*, 69: 420, 1951.
- [8] Pogodina, V. V.: *Acta Virol.*, 8: 424, 1964.
- [9] 黄永成等: 生物制品通讯, 9:1, 1980.
- [10] Ильенко, В. И.: Клещевой энцефалит и другие арбовирусные инфекции с. 18, 1962. Минск. 引自 *Вопр. Вирусол.*, 6:691, 1967.
- [11] Plyenko, V. I. et al.: *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 39: 425, 1968.
- [12] Thind, I. S. et al.: *Amer. J. Epidem.*, 84: 193; 214; 225, 1966.
- [13] Mayer, V.: *Acta Virol.*, 19: 209; 219; 229, 1975.
- [14] Ладьяженская, И. П. и др.: *Вопр. Вирусол.*, 6: 675, 1977.
- [15] Анджапаридзе, О. Г. и др.: *Вопр. Вирусол.*, 6:691, 1967.
- [16] Погодина, В. В.: 同[10]. 20页.
- [17] Левкович, Е. Н.: *ibid* 13页.
- [18] Фроловой, М. П.: *ibid*, 38页.
- [19] 朱荫耕等: 中华病理学杂志, 10:113, 1966.
- [20] Nathanson, N. et al.: *Amer. J. Epidem.*, 82: 359, 1966.
- [21] Slonim, D. et al.: *Acta Virol.*, 10: 236; 336; 413, 1966.
- [22] Ерофеев, В. С. и др.: *Вопр. Вирусол.*, 5: 391, 1972.
- [23] Andzhaparidze, O. G. et al.: *Acta Virol.*, 22: 218, 1978.
- [24] Plyenko, V. I. et al.: *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 39: 419, 1968.
- [25] Price, W. H. et al.: *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, 12: 782, 1963.

STUDIES ON ATTENUATED TICK-BORNE ENCEPHALITIS VACCINE

I. SELECTION OF ATTENUATED STRAIN

Huang Yongcheng Cao Yousong Cao Yiming Sun Yanqing
Liu Dongsheng Zhuang Zhenxi Xin Jun
(*Changchun Serum and Vaccine Institute, Changchun*)

In order to increase peripheral multiplication and enhance immunogenicity, the suckling mouse variant "Coφ" was subpassaged continuously in mice, guinea pigs and gold hamsters. After passage, attenuated variants selected showed very low degree of neurotropism. By intracerebral route of inoculation, it was incapable of causing disease or death both in Hamster and M. rhesus, and its pathological changes in brain are nearly negligible. This variant retained its intracerebral pathogenicity for mouse and antigenically similar to the original line.

It was thus concluded that this strains virulence is more attenuated for mouse just as other reported strains.

The immunogenicity of variant "HS6" strain was tested in 171 volunteers without prior TBE virus experience and history of allergic state, by subcutaneous route of one dose. No local or generalized reaction was observed. The sera were assayed for specific virus neutralizing antibody against TBE virus strains "Chang" or "Coφ", the seroconversion rate appeared to be 38—60%.