

重慶市流行性乙型腦炎 病毒的分離與鑑定

朱錫華 姬雲堂 郭明靈 李元榮 鐵 衣 錢國安

(重慶軍醫大學)

重慶市所流行之腦炎,早在 1948 年^[1-2] 就有人提出報告,解放後杜氏^[3] 等尚根據臨床上的觀察,分析了 1950—1953 年間所發生的 75 例流行性乙型腦炎病例,至於重慶市所流行的腦炎,究竟屬於那一型? 仍有待於流行病學、病毒學等方面的證實。在重慶市流行性乙型腦炎研究委員會的統一領導下,我們擔任了病原學方面的研究工作,自 1954 至 1955 年止,在死亡病人腦組織中共分離出 9 株病毒; 1955 年在自然界蚊蟲中分離出了 3 株病毒;對病人血清的補體結合^[4-7] 及中和試驗,也作了較詳盡的分析與研究;我們準備先後將此等研究結果提出報告。

為此我們特將 1954 年在本市所分離的 7 株病毒(暫定名為重慶分₁,分₂,分₃,分₅,分₇,分₈,分₁₀ 株),抽取其中兩株(分₁,分₃) 病毒,作了比較系統的分離和抗原分析的工作。今將其分離經過和結果,研究方法及鑑定結果介紹如下。

材 料 及 方 法

(一) 分離病毒:

用無菌操作法採取死亡患者腦組織一塊,置於 50% 中性甘油中,在冰壺內運送至我校病毒實驗室,將此標本先用 pH 8.0 磷酸鹽緩衝鹽水沖洗 3 次,以後以 10% 滅活兔血清鹽水製成 10% 腦組織懸液,以每分鐘 3,000 轉速度,遠心沉澱 10 分鐘,取上清液接種 2—3 週鼠齡的小白鼠腦內或腹腔內,每份標本接種 3—5 隻小白鼠,每隻鼠的腦內接種劑量為 0.03 毫升;腹腔內接種劑量為 0.5 毫升。

死亡患者腦組織均由本校病理學教研室所供給。

(二) 鑑定病毒:

將分離出的 7 株病毒,抽出分₁、分₃ 兩株進行了過濾試驗、動物感染範圍試驗、交叉補體結合試驗、交叉中和試驗和交叉保護試驗等分析研究工作。

我們所採用的作為對照用的聖路易型和流行性乙型腦炎“中山”株病毒,均係 1954 年自北京中國協和醫學院細菌免疫學系攜回者,經鼠腦傳代一直保存在我們的實驗室內。

1. 過濾試驗：將流行性乙型腦炎分₁、分₃株病毒的 10% 鼠腦懸液（以 10% 滅活兔血清鹽水製成者），分別用蔡氏（Seitz）EK 及貝克菲（Berkefeld）N 濾器過濾。以過濾液 0.03 毫升注射於 2—3 週鼠齡之小白鼠腦內，每份標本接種 5 隻。

2. 動物感染範圍：用 10% 分₁、分₃及流乙腦炎病毒懸液，依不同途徑分別接種於小白鼠、豚鼠、家兔、大白鼠及鴿子體內。

3. 交叉補體結合試驗：

(1) 抗原：基本上按 Casals^[8]氏醋酮-乙醚浸漬法並參照吳氏^[9]等及汪氏^[10]等之改良法加以製成者。即在最後一步，用抽氣機抽乾殘餘乙醚後，加入 3 倍量原腦重之 0.04 M 枸橼鹼性磷酸鈉緩衝液（pH 7.2），置於 4°C 冰箱中約 20—24 小時（經常用手搖），次日取出，以每分鐘 3,000 轉速度在 -15°C 冰箱內離心沉澱 20 分鐘，吸取上清液再以同樣速度在室溫及 -15°C 冰箱內，各離心沉澱 30 分鐘，上清液加入防腐劑（1:10,000 硫柳汞）即為所用之抗原。

正常鼠腦抗原之製法與上同。

每次抗原製出後，均用豚鼠超免疫血清滴定其效價，一般使用抗原之滴度約為 1:4—1:8。

(2) 免疫血清：按 Hammon 氏^[11]法稍加改進後製成者。

(3) 操作法：係採用 Casals 氏^[12]微量法。

試驗中採用了聖路易型腦炎、流乙腦炎、分₁及分₃病毒與免疫血清間進行了補體結合試驗。為了初步鑑別其他 5 株病毒（分₂、分₅、分₇、分₈、分₁₀）的抗原性，我們也進行了以此 5 株病毒所作的免疫血清與“中山”株流乙腦炎抗原間之補體結合試驗。

4. 交叉中和試驗：一切操作經過均係採用北京中國協和醫學院細菌免疫學科病毒研究室^[13]的方法，試驗中採用了聖路易型腦炎、流乙腦炎、分₁及分₃ 4 株病毒。

5. 交叉保護試驗：詳細操作方法均係採用黃氏^[14]記載的方法，正如黃氏報告所講一樣，在免疫過程中小白鼠死亡現象很嚴重，因之最後僅得出了分₁株與流乙腦炎病毒間的交叉保護試驗結果。

分離及鑑定結果

(一) 分離結果

分離病毒共作了 15 例，分離陽性者為 7 例，其中僅 1 例為 6 月下旬分出者，餘者 6 例俱為 7 月間分得。

(二) 鑑定結果

1. 過濾試驗：除以蔡氏濾器過濾之分₁株病毒濾液注射的 5 隻小白鼠中有 1 隻始終未死亡外，其餘的小白鼠均於注射後第 4、5、6 天內呈現典型的腦炎症狀而先後死亡。

各濾液的雜菌試驗結果均為陰性，初步證明分₁、分₃兩株病毒，可以通過蔡氏 EK 及貝氏 N 濾器，並且是一種嗜神經系病毒。

2. 動物感染範圍：結果發現小白鼠對分₁、分₃兩株病毒都很敏感，而豚鼠、家兔、大白鼠、鴿子等都不敏感。

3. 交叉補體結合試驗：分₁、分₃及流乙腦炎免疫血清對分₁、分₃及流乙腦炎抗原相互進行的交叉補體結合試驗，均呈現顯著的陽性反應；分₁、分₃及流乙腦炎的免疫血清對聖路易型腦炎抗原的陽性滴度也很高，反之，聖路易型腦炎免疫血清對分₁、分₃及流乙腦炎抗原則僅呈低度的陽性反應。這部分試驗我們曾重複了數次，結果都很近似，在此僅記錄其中一次的結果(表 1)。

表 1 交叉補體結合試驗結果

抗原 免疫血清	分 ₁	分 ₃	流 乙	聖 路 易	正常鼠腦	鹽 水
分 ₁	1:128	1:128	1:128	1:128	—	—
分 ₃	1:128	1:256	1:128	1:128	—	—
流 乙	1:128	1:128	1:128	1:128	—	—
聖 路 易	1:4	1:8	1:4	1:128	—	—
正常血清	—	—	—	—	—	—

此外我們又用流乙腦炎抗原與另外所分離的 5 株病毒分₂、分₅、分₇、分₈、分₁₀所做的免疫血清來做補體結合試驗，結果也都呈顯陽性反應。

根據以上試驗結果，證明分₁、分₃二株病毒與流乙腦炎病毒在血清學上有着密切的關係。也可看出流乙腦炎、分₁、分₃與聖路易型腦炎有交叉反應存在。至於分₁、分₃病毒和流乙腦炎病毒的免疫血清對聖路易型腦炎抗原的滴度高，而聖路易型腦炎免疫血清對分₁、分₃、流乙腦炎抗原的滴度低，這種結果的出現，不僅可進一步說明流乙腦炎病毒與聖路易型腦炎病毒間有交叉抗原存在，而且可以說明流乙腦炎病毒的抗原比聖路易型腦炎病毒的抗原更廣泛些。

4. 交叉中和試驗：分₁、分₃病毒及流乙腦炎病毒免疫血清對分₁、分₃及流乙腦炎病

表 2 交叉中和試驗結果

病 毒 血 清	分 ₁		分 ₃		流 乙		聖 路 易	
	LD ₅₀	中和指數	LD ₅₀	中和指數	LD ₅₀	中和指數	LD ₅₀	中和指數
分 ₁	10 ^{-3.29}	5120	10 ^{-2.42}	5495	<10 ^{-3.0}	<5623	10 ^{-5.62}	77.62
分 ₃	10 ^{-3.0}	10000	10 ^{-3.15}	1023	10 ^{-3.0}	5623	10 ^{-5.29}	166.0
流 乙	10 ^{-2.84}	14450	10 ^{-2.49}	4677	10 ^{-3.0}	5623	10 ^{-4.68}	660.7
聖 路 易	10 ^{-4.43}	371.5	10 ^{-4.49}	46.77	10 ^{-3.66}	15.49	10 ^{-3.62}	7762
正常血清	10 ^{-7.0}	—	10 ^{-6.16}	—	10 ^{-6.75}	—	10 ^{-7.51}	—

毒均有顯著交叉中和作用,但對聖路易型腦炎病毒則沒有或只有很低的中和能力;聖路易型腦炎免疫血清對其本型病毒之中和能力很高,但對另外 3 株病毒却只有很低的中和能力,結果如表 2。

5. 交叉保護試驗:分₁株免疫鼠對分₁病毒及流乙腦炎病毒的保護指數都很高;流乙免疫鼠對分₁病毒的保護指數比對其本型病毒還要高。這個結果足以證明分₁與流乙腦炎病毒有顯著的相互免疫作用,結果如表 3。

表 3 交叉保護試驗結果

病 毒 免 疫 鼠	分 ₁		流 乙	
	LD ₅₀	保護指數	LD ₅₀	保護指數
分 ₁	10 ^{-3.5}	9333	10 ^{-3.0}	30900
流 乙	10 ^{-3.61}	72440	10 ^{-3.78}	8513
正常小白鼠	10 ^{-7.47}	—	10 ^{-7.49}	—

根據以上過濾試驗、動物感染範圍、交叉補體結合試驗、交叉中和試驗和交叉保護試驗等一系列的試驗結果來看,1954年由重慶市所分離的分₁、分₃二株病毒與流乙腦炎病毒在生物學性格、血清學免疫學上有着密切的關係,且可以證明是同屬一型。

結 論

1. 1954年6、7、8月重慶市流行性腦炎流行時,我們曾從15例死亡患者腦組織標本中分離出7株病毒,暫時定名為重慶分₁、分₂、分₃、分₅、分₇、分₈、分₁₀。

2. 7株病毒中抽出分₁、分₃二株作了系統地分析鑑定工作,同時更以另外5株病毒的免疫血清與流乙腦炎抗原進行了補體結合試驗。

3. 通過過濾試驗、動物感染範圍、交叉補體結合及中和試驗的結果,可以充分證明分₁、分₃二株病毒與流乙腦炎病毒同屬一型。交叉保護試驗只得出了分₁與流乙腦炎病毒間的試驗結果,更進一步證明了分₁與流乙腦炎病毒間的免疫學上的密切關係。

4. 另外5株病毒(分₂、分₅、分₇、分₈、分₁₀)可初步認為與流乙腦炎病毒在血清學上有密切關係。

5. 交叉補體結合及交叉中和試驗中,呈現出分₁、分₃、流乙腦炎與聖路易型腦炎間有不同程度的交叉現象。試驗結果雖與國外文獻報告符合,但因著者尚未見國內文獻報告此點,故特提出以供同道的參考與討論。

參 考 文 獻

- [1] Chen, K. T. *et al.*; *Chin. Med. J.*, **66**: 409—418, 1948.
- [2] Kan, H. C.; *Chin. Med. J.*, **66**: 419—420, 1948.
- [3] 杜淑昭等：中華醫學雜誌，**6**: 449—452, 1953。
- [4] 朱錫華等：微生物學報，**5** (3): 336—339, 1957。
- [5] 朱錫華等：重慶市自然界蚊蟲分離流乙腦炎病毒之結果，未發表材料。
- [6] 姬雲堂等：微生物學報，**5** (3): 302—304, 1957。
- [7] 重慶市1955年流行性乙型腦炎防治與研究工作總結。
- [8] Casals, J.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**: 339—343, 1949.
- [9] 吳安然、朱錫華等：微生物學報，**1** (2): 196—201, 1953。
- [10] 汪美先等：微生物學報，**1** (2): 191—195, 1953。
- [11] Hammon, W. M. and Espana C. A.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **66**: 113—115, 1947.
- [12] Casals, J.; *J. Immunol.*, **56**: 337, 1947.
- [13] 中國協和醫學院：病毒學實習講義，48—55, 1953。
- [14] 黃禎祥等：中華醫學雜誌，**37**: 280—286, 1951。

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF EPIDEMIC B TYPE ENCEPHALITIS VIRUS IN CHUNGKING

CHU HSI-HUA, CHI YUN-TANG, KAO MING-LING, LI YUAN-JUNG, TI YI and CHIEN KAO-AN

Department of Bacteriology, Army Medical College, Chungking

7 strains of viruses, namely Chungking No. 1, No. 2, No. 3, No. 5, No. 7, No. 8, and No. 10, were isolated from brain tissue of 15 fatal cases of encephalitis. Two of these had been systematically studied and identified, while the remaining 5 were only examined by complement fixation test. Results of filtration test, host-range, cross complement fixation tests, cross neutralization tests and cross protection tests all indicated that the viruses isolated belong to the epidemic B type encephalitis.