

流行性乙型腦炎病毒的研究

吳 蛟 如 吳 樹 吟

(福建中心檢驗室)

近年來，在本省所發現的腦炎，病勢很急，自發病到死亡時不超過 24 小時者占 77%，最短一例只有 8 小時。由於以上情況，著者等將這些病例中所分離的病毒作了檢定並且研究了它們的性質以及各種臟器中的分布，特別注意到它們對各種動物血球的血凝作用，發現後者和國內外所報道的病毒性質，有所不同。因此將這些結果，在本文中提出以供研究流行性乙型腦炎病毒者，作一參考。

病毒分離

此項工作主要以急性病例的材料為對象；48% 的材料係由病程 1 日的病例中收集的；另有病程 2、3、4、6、8、10 日等的病例材料為比較。有一例病例病程為 12 小時，另一例病程為 8 小時，俱由腦組織中分離出病毒。詳細分布見表 1。

表 1 病程種類、數目及分離病毒的結果

病 程 日 數	病例數目	百 分 率	分 離 病 毒 結 果 (%)
1 日以內	24	48	25
2 日以內	7	14	42.8
3 日以內	9	18	44.4
4 日以內	3	6	66.6
6 日以內	1	2	100
8 日以內	2	4	100
10 日以內	1	2	100

(一)分離病毒所用的方法：以病理材料注射小白鼠腦內為分離病毒的方法，所用的小白鼠皆經特殊防蚊設備飼養出來，大部分採用乳鼠，最小年齡為生後 4 天；普通皆用 8 天的乳鼠；僅在無乳鼠時始用年齡 3、4 星期的小白鼠。

(二)材料：由病人所收集的材料包括腦組織、血液、骨髓、肝組織、睪丸、脊髓液等。各種標本數量及分離病毒的陽性率見表 2。

在分離病毒工作的初期，我們着重採取腦組織作為分離病毒的材料。根據文獻記載及國內外各地分離腦炎病毒工作的經驗，皆認腦組織為分離病毒百分率最高的材料。

表2 分离脑炎病毒的材料种类、标本数及分离病毒的阳性率

材 料 种 类	腦 組 織	血 液	骨 髓	肝 組 織	辜 丸	脊 髓 液
标本数	30	11	6	2	1	1
占材料总数的%	60%	22%	12%	4%	2%	2%
阳性	46.6%	18.2%	33.3%	0	100%	0
可疑	10%	9.1%	0	50%	0	0
阴性	43.3%	72.7%	66.6%	50%	0	100%

所以最初我們都是用后腦池穿刺法抽取腦組織研磨成 10% 懸液，注射乳鼠腦內，但發現有 66% 以上的乳鼠發病不明顯或不發病。当时即考慮到病程初期可能病毒突破血液大腦屏障至腦組織內的濃度不高，故接種腦組織的乳鼠反应不正常，所以兼用其他材料如血液、肝組織等接種乳鼠腦內。

(三)分离病毒的结果：所有病理材料注射小白鼠腦內后，按照規定時間及方法，观察动物的情况及所表现的症狀，得出 7 株腦炎病毒。

病毒鑒定

分离出的七株腦炎病毒，按照規定方法先作动物感染范围試驗及濾过試驗，然后再作相互补体結合試驗，相互中和試驗及相互保护試驗。对照毒株系用 1953 年在福州分离出的一株病毒，經去年用中央衛生部發給的抗乙型腦炎血清及乙型腦炎抗原鑒定过系屬乙型腦炎病毒。7 株中僅 1 株作过相互中和試驗及相互保护試驗，2 株与抗乙型腦炎血清作过中和試驗，因合格小白鼠缺乏，不能同时各株皆作此項鑒定。此外按照苏联 A. K. Шубладзе 和 Э. Ш. Вардосанидзе 氏^[1]方法作各种动物赤血球凝集譜；但我們無其他腦炎毒株如聖路易腦炎、苏联春夏腦炎及馬类腦炎等病毒毒株作鑒定对照实为一大缺点。

鑒定結果如下：

1. 动物感染范围試驗，以 10% 的感染各株腦炎病毒的小白鼠的腦組織懸液分別接种于白鼠、豚鼠、白兔子的腦內及腹腔內，并皮下接種鴿子体内和接種雞胚卵黃囊內，其結果如表 3。

上述各株病毒作动物感染范围試驗的結果，小白鼠腹腔注射除第 1、2 兩株病毒外，其他各株小鼠皆全部或部分死亡。雞胚卵黃囊注射各毒株后皆能在 48 小时內使雞胚胎死亡，其他动物經各毒株注射后皆不發病。

2. 過濾实验：將感染各株腦炎病毒的小白鼠腦組織，混和消毒的海沙，研磨成 10% 混懸液；以每分鐘四千轉的离心机离心 30 分鐘；將清液吸出，以 Seitz 氏石棉濾板过滤，

表3 動物感染範圍試驗結果

毒株名稱	小白鼠 (四週)		豚鼠 (體重250公分)		白兔		鴿子 皮下注射	雞胚 卵黃囊	備 考
	腦內	腹腔	腦內	腹腔	腦內	腹腔			
第 1 株	4/4	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/0	×	病人血液分離出
第 2 株	4/4	0/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	+	病人腦組織分離出
第 3 株	4/4	2/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	×	暴發型病人腦組織分離出
第 4 株	4/4	4/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	+	暴發型病人腦組織分離出
第 5 株	4/4	4/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	+	暴發型病人腦組織分離出
第 6 株	4/4	4/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	+	病人腦組織分離出
第 7 株	4/4	3/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	×	病人腦組織分離出

注：有×記號說明雞胚未接種。

再將濾液注射小白鼠腦內，結果各株濾過液病毒皆能使小白鼠在5天內發病症狀典型。

3. 相互中和試驗：因小白鼠數量不夠所以先以第3, 第6, 第1, 3株病毒與抗流行性乙型腦炎病毒的診斷血清(榕檢)作中和反應；並以第3株病毒的免疫血清與乙型腦炎病毒(榕檢)作相互中和反應。以標準抗流行性乙型腦炎血清(N₂47)為血清對照，其結果如表4。

表4 各病毒毒株相互中和反應的結果

免 疫 血 清	第 3 毒 株		第 6 毒 株		第 1 毒 株		流行性乙型腦 炎病毒毒株		備 考
	50% 致死量	中 和 指 數	50% 致死量	中 和 指 數	50% 致死量	中 和 指 數	50% 致死量	中 和 指 數	
抗流行性乙型腦炎血清	10-2.5	3162	10-2.8	1586	10-2.6	2512	10-2	10,000	腦內注射
第3株毒株血清	10-1.66	21880	—	—	—	—	10-2	10,000	腦內注射
抗乙型腦炎血清第47號	10-3	1000	—	—	—	—	10-2	10,000	腦內注射
正常血清	10-6	—	10-6	—	10-6	—	10-6	—	—

4. 相互補體結合試驗：將分離出的腦炎病毒第3, 第6及第1, 3株病毒製成抗原及免疫血清。抗原用苯浸法製出，以華東生物制品所的抗原及流行性乙型腦炎血清，并榕檢流行性乙型腦炎的抗原和血清作對照，以作交叉補體結合反應其結果如表5。

表5 各病毒毒株相互補體結合反應的結果

免 疫 血 清	抗 原					
	第3毒株	第6毒株	第1毒株	流行性乙型 腦炎病毒	華東抗原	正常抗原
第3毒株	1:32	1:32	1:64	1:64	1:32	—
第6毒株	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	—
第1毒株	1:16	1:32	1:32	1:32	1:32	—
乙型腦炎病毒	1:16	1:32	1:32	1:16	1:32	—
華東抗乙型腦炎血清	1:32	1:64	1:128	1:128	1:128	—

5. 相互自動免疫試驗：以第3株病毒免疫的小白鼠及乙型腦炎病毒榕檢免疫的小

白鼠作相互自动免疫試驗,其結果都有很高的保护指数。

表6 相互自动免疫試驗的結果

免 疫 小 白 鼠 組	第 3 毒 株		流行性腦炎病毒(榕檢)	
	50%致死量	保 护 指 数	50%致死量	保 护 指 数
第3毒株	<10 ⁻¹	>100,000	<10 ⁻¹	>10,000
流行性腦炎病毒	<10 ⁻¹	>100,000	<10 ⁻¹	>10,000
正常小白鼠	>10 ⁻⁶		>10 ^{-4.5}	

分离出的腦炎病毒毒株对各种动物的赤血球的凝集譜

我們的操作方法是根据苏联 A. K. Шубладзе 氏的方法: 各种赤血球的濃度为 0.25%, 稀釋液为 0.85% 的氯化鈉溶液, 溶液的 pH 为 7.4。抗原为 20% 的感染腦炎病毒的鼠腦懸液, 經每分鐘 3000 轉离心 30 分鐘, 而后吸出其上清液所制成。各种动物的赤血球, 以生理食鹽水洗滌 4 次, 即以生理食鹽水將赤血球稀釋为 0.25% 懸混液。病毒稀釋液和赤血球混懸液的剂量俱为 0.5 毫升。混和后各管搖动 3 分鐘, 然后放于 3 种温度 4°C、23°C、37°C 中, 經 4 小时記錄結果。我們將第 3 株病毒及榕檢病毒和 9 种动物的赤血球作凝集反应, 其結果如表 7。

表7 第3毒株与流行性乙型腦炎毒株对9种赤血球凝集譜

赤 血 球 种 类		第 3 毒 株			流行性乙型腦炎毒株		
		4°C	23°C	37°C	4°C	23°C	37°C
成	雞	—	—	—	—	—	—
雛	雞	—	+	+	—	—	—
鴿	子	+	+	+	—	—	—
兔	子	—	—	—	—	—	+
豚	鼠	—	—	—	—	—	—
綿	羊	—	+	+	—	—	—
	馬	—	—	—	—	—	—
大	白 鼠	—	—	—	—	—	—
	狗	—	—	—	—	—	—

根据苏联 A. K. Шубладзе 氏的各种腦炎赤血球凝集譜, 乙型腦炎病毒在苏联領土所分离出的毒株, 僅能凝集雛雞及綿羊的赤血球。雛雞赤血球在各种不同温度如 4°C、23°C、37°C 俱能凝集。而綿羊赤血球則僅能在 23°C 及 37°C 能凝集。但根据朱氏的报告^[2], 也只能凝集雛雞、成雞、綿羊的赤血球。在本試驗中第 3 株病毒与苏联所分离乙型腦炎毒株的凝集譜比較接近, 雛雞和綿羊的赤血球俱能凝集; 但温度稍有不同, 雛雞赤血球在 4°C 不凝集。在本試驗中所用病毒尚有几株能在 4°C、23°C、37°C 各种温度中凝集鴿子赤血球。結果見表 8。

表 8 鴿子赤血球凝集結果

对鴿子赤血球有凝集的毒株	对鴿子赤血球不凝集的毒株
第 3 毒株	檢檢, 毒株
第 4 毒株	第 1 毒株
第 5 毒株	第 2 毒株
第 6 毒株	

感染鼠中各臟器病毒的分佈

我們以乙型腦炎病毒的腦組織懸液注射于小白鼠腹腔內, 每天殺死一批, 檢查各臟器病毒的出現和消失時間, 連續檢查 5 天, 其結果如表 9。

表 9 各臟器病毒的出現和消失時間

材料採取与 病毒注射腹 腔的距离时 間	材料种类与实验結果							各組織接种小白鼠后發病的时间
	腦組織	肝組織	脾組織	肺組織	腎組織	辜丸	血液	
24 小 时	+	—	+	+	—	+	+	6, 5, 6, 6, 6, 7, 7, 5, 5, 5, 6, 7, 11, 8
48 小 时	+	—	+	—	+	+	+	5, 5, 6, 6, 6, 6, 8, 8, 7, 8, 8, 6, 6, 6, 6, 6
72 小 时	+	—	+	—	+	—	+	6, 7, 6, 6
96 小 时	+	+	+	—	+	—	+	5, 5, 6, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6, 6, 5, 5, 5, 6
120 小 时	+	—	—	—	—	—	—	5, 5, 5, 4, 5, 5, 5, 5, 6, 6, 5, 6, 6, 5, 5, 6, 6, 6, 5, 5, 6, 6, 6, 5
								6, 6, 6, 5
								4, 5, 4, 4

* 为檢檢 1; ** 为檢檢 2。

接种病毒于小白鼠腹腔內經 24 小时, 腦組織內發現病毒的毒株为第 3 株病毒, 第 1 株病毒在 48 小时后病毒始侵入腦組織, 病毒至其他內臟的时间各毒株皆相似, 肝組織內發現病毒的时间在 96 小时以后, 至 120 小时病毒即消失; 脾組織在 24 小时內即發現病毒, 直至 96 小时以后病毒才消失; 肺組織 24 小时內發現病毒, 48 小时以后即消失; 腎組織在 48 小时內才發現病毒, 至 96 小时以后才消失; 辜丸在 24 小时內即有病毒, 但 48 小时以后即消失; 血液和脾臟同在 24 小时內即發現病毒, 直至 96 小时以后才消失。在尸体解剖的組織病理切片檢查亦証明各內臟有病理变化。我們以人工方法使大动物如猴子發生急性病程, 死亡后猴子尸体各內臟亦同样可以証明有病毒存在。

再以新分离出毒株的 10% 鼠腦混懸液 0.5 毫升接种于一大批小白鼠腹腔內, 每 24 小时殺死数个; 將腦組織分成終腦、中間腦、后腦、延髓四部分, 分別研磨成 10% 懸混液, 然后各注射一批小白鼠(腦內注射)。另以第一病毒毒株作对照, 其結果如表 10。

由表 11 所表示的結果, 可以說明不同的乙型腦炎毒株在大腦組織內的分布情况可能是不同的, 第 3 株病毒在最初 24 小时內即到达延髓及終腦組織中; 而第 1 株病毒在 48 小时以后才到达延髓組織, 24 小时以后才到达終腦組織。急性病例死亡甚速, 可能即由于延髓主要中樞被病毒破坏所引起, 臨床症狀亦証明有嚴重的球麻痺症狀。病理

表 10 第 3 株病毒于不同时间在实验动物脑组织内分布情况

病 程 日 数	終 腦			中 腦 及 間 腦			后 腦			延 髓
	10-1	10-5	10-6	10-1	10-5	10-6	10-1	10-5	10-6	
第 1 日	50%	—	—	—	—	—	—	—	—	50%
第 2 日	50%	—	—	50%	—	—	—	—	—	50%
第 3 日	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%	50%	100%
第 4 日	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
第 5 日	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

表 11 第 1 株病毒于不同时期在实验动物脑组织内分布情况

病 程 日 数	終 腦			中 腦 及 間 腦			后 腦			延 髓
	10-1	10-5	10-6	10-1	10-5	10-6	10-1	10-5	10-6	
第 1 日	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
第 2 日	100%	—	—	100%	—	—	50%	50%	—	—
第 3 日	100%	—	—	50%	50%	—	50%	—	—	50%
第 4 日	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

切片检查亦察到延髓组织片有明显病理变化;中脑、间脑、后脑的组织中于 24 小时内,不能在小白鼠体内证明有病毒存在。

总 结

1. 在福建某一地区所流行的流行性乙型脑炎病例中分离病毒相当困难。作者曾在各期病程作比较,结果:病程 1 日以内阳性率仅 25%,病程 2 日以后阳性率逐渐提高,病程 6 日至 10 日分离 4 例俱为阳性,其中有 1 例系在 8 日后由血液分离出。

2. 分离病毒阳性率低的原因,最大可能性因由脑中采取材料与病毒在脑内分布情况不符合。

3. 分离出的病毒与流行性乙型脑炎免疫血清作相互中和反应,发现和标准菌株的中和指数低于与本身病毒的中和指数,同时与各种动物赤血球作凝集反应亦与苏联 A. K. Шубладзе 氏的报告不同,可能在抗原构造上与原来的乙型脑炎毒株有些不同。我们仍在继续研究各毒株的抗原性。

参 考 文 献

- [1] Шубладзе, А. К. и Э. Ш. Вардосанидзе: Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунологии. 10:62—69, 1954.
- [2] 朱锡华:微生物学报 3:63, 1954.

STUDY ON THE VIRUS OF JAPANESE B ENCEPHALITIS

WU CHIAO-JU AND WU SHU-YIN

Central Diagnostic Laboratory, Fukien

During a recent epidemic of Japanese B encephalitis at a certain place in Fukien Province, it was difficult to isolate the virus from the brain of persons died of the disease. The authors undertook a study of the reason for this failure, and the results obtained are reported in the present communication.

After analysing the date of virus isolation, it was found that when patients died of the disease within 24 hours, virus was isolated in only 25% of the cases, while higher results were obtained when isolations were made on patients died after three days of the disease. Besides, the authors also obtained occasional positive isolations from the circulating blood, the bone marrow, the liver and the testicle. These results, if confirmed, may prove of great value in the epidemiological and clinical study of the disease.

An experimental study was undertaken by the authors of the virus distribution in various parts of the brain of white mice on different days after an artificial infection. It was found that the virus appeared first in the front part of the brain, and last in the hind part. This fact may partly explain the failure to isolate the virus from patients died within 24 hours of the disease, as the usual procedure is to take the samples from the back part of the brain. It was also found, however, that different strains behaved differently in this respect.

A preliminary study of hemagglutinating activity of the local strains of encephalitis virus by Shubladze's method revealed certain differences from those described in literature. These, may indicate the difference in strain characteristics of the local virus.