

# 流行性乙型腦炎病毒血球凝集試驗的研究

朱錫華

(中國協和醫學院細菌學系)

自從發現流感病毒能使雞紅血球凝集<sup>[1]</sup>以來,學者們相繼研究了其他病毒的血凝現象。因此近年來有關病毒血凝試驗之研究日趨廣泛而深入,不僅在理論上有了輝煌的成就,而且在實際臨床應用上也給予了一定的幫助。

關於嗜神經病毒之血凝現象,早在1947年就已發現,截至目前止,已知有10餘種病毒,可以凝集各種動物的血球<sup>[2-8]</sup>。

我國在嗜神經病毒中,以流行性乙型腦炎較為嚴重,經過張氏<sup>[9]</sup>將補體結合法及中和法之優劣作一比較,並且提出兩法之優缺點。根據國內的具體情況,我們認為有必要追求出一種比較簡單的、敏感性高的、結果容易判斷的、可以測定抗體和抗原的血清診斷法。而血凝——血凝抑制反應正符合以上4種條件。我們以此種動機,從1953年10月開始進行研究流行性乙型腦炎之紅血球凝集試驗。前此我們<sup>[10]</sup>曾發表用一種醋酮——乙醚浸漬乳鼠腦抗原,作流乙腦炎病毒血球凝集試驗之初步報告。曾發現用此抗原作血凝試驗時,可用成雞紅血球來代替雞紅血球。今將其繼續試驗之結果介紹如下:

## 實驗材料和方法

1. 稀釋用溶液:任氏溶液(Ringer's solution) 0.01M或0.02M 磷酸鹽緩衝鹽水(pH6.8—7.0)。

2. 紅血球:使用萊亨雞的紅血球,收集在Alsever's溶液內,使用前用冷生理鹽水洗3次,再以任氏溶液配成0.25%懸液以備使用。

3. 免疫血清:

小白鼠免疫血清:製法與我們前次<sup>[10]</sup>的報告相同。

豚鼠免疫血清:試驗中使用的流乙、聖路易、西方、蘇聯4種腦炎的豚鼠免疫血清

是按 Hammon 氏<sup>[11]</sup>法製成者。

人免疫血清：用 18 名志願者，在注射疫苗之前和注射後不同日期，分別採血，分離的血清在低温冰箱內冰凍保存以備使用。

4. 小白鼠：為本院喂養者，乳鼠年齡為 2—5 日；成鼠年齡為 3—4 週。乳鼠經顱腔感染，劑量為  $(10^{-1})0.02$  毫升；成鼠為 0.03 毫升。臨死前放出心血，取出鼠腦，置低温冰箱內冰凍 24—48 小時，以備製造抗原。

5. 抗原製法：所使用之流乙腦炎病毒係中山株，於 1949 年由國外攜回，並曾在本學系通過鼠腦傳代多次者。在試驗中亦曾使用了我國分離之京衛研<sub>1</sub>株流乙腦炎病毒。

抗原按 Casal's<sup>[12]</sup>氏方法製備。但在最後一步用生理鹽水浸漬時並加以振盪<sup>[13]</sup>，振盪時間是 20 小時，溫度為 4°C，用此法我們製成 4 種抗原：

(1) 正常乳鼠腦抗原(每 1 克鼠腦加 2.0 毫升生理鹽水)

(2) 正常成鼠腦抗原(每 1 克鼠腦加 3.0 毫升生理鹽水)

(3) 流乙乳鼠腦抗原(每 1 克鼠腦加 2.0 毫升生理鹽水)

(4) 流乙成鼠腦抗原(每 1 克鼠腦加 3.0 毫升生理鹽水)

6. 血球凝集試驗：試驗前將吸管、試管、溶液等在 4°C 冰箱內保存。試驗在含水之冰槽內進行(4—8°C)。抗原用任氏液(pH 6.8—7.0)按 2 倍稀釋法稀釋，每管含不同稀釋度的抗原液 0.5 毫升，以後每管加 0.25% 紅血球懸液 0.5 毫升；振盪後置 4°C 冰箱內 2 小時，按 Salk 氏<sup>[14]</sup>法記錄其血凝的結果。

7. 血球凝集抑制試驗：仿 Casals 氏<sup>[15]</sup>方法除去血清中之非特異性抑制物質，為防止在用醋酮處理時，因含水份過多而影響其乾燥，我們改變了他的方法。即先將血清在 56°C 30 分鐘滅活，以後加 60 倍容量之醋酮，低速遠心沉澱，倒去上清，再添加同量之醋酮於沉澱物中，又以低速沉澱，倒去上清，真空抽乾後，沉澱中加原血清量 10 倍之生理鹽水(即 1:10 稀釋)。溶解後，用任氏液(pH 6.8—7.0)，按每管 2 倍稀釋，每管含各種不同稀釋度的免疫血清 0.25 毫升。以後每管再加 4—8 個凝集單位之抗原 0.25 毫升，在室溫中放置 30 分鐘後，最後加 0.25% 紅血球懸液 0.5 毫升，振盪後置 4°C 冰箱內或室溫內 2 小時，觀察並記錄血凝抑制的結果。

## 試驗結果

### 1. 關於抗原的研究

(1) 中山株與京衛研<sub>1</sub>株血凝滴度的比較：依照上法製成之抗原與萊亨雞血球作血凝試驗，發現中山株較京衛研<sub>1</sub>株病毒的血凝滴度為高(表1)。

表1 各種抗原血凝滴度的比較

抗 原	血 凝 滴 度	
	成 鼠	乳 鼠
流 乙 (中 山 株)	0	1:10240
流 乙 (京 衛 研 <sub>1</sub> )	0	1:160
正 常 鼠 腦	0	0

(2) 成鼠腦與乳鼠腦抗原性的比較：由表1可以看出用成雞紅血球作血凝試驗時，其抗原需用乳鼠腦製備，而成鼠腦抗原與成雞紅血球無凝集現象。

(3) 抗原保存的時間：爲了解抗原在4°C冰箱內保存的時間，我們將上記抗原，置於4°C冰箱內，於不同之日期取出試驗其血凝滴度，結果如下：

表2 在4°C冰箱內乳鼠腦抗原之保存時間與血凝滴度之關係

抗 原 保 存 日 期	血 凝 滴 度
14 天	1:10240
39 天	1:1280
52 天	1:640

由表2可以看出乳鼠腦抗原在4°C冰箱內保存近兩個月尚能使用，唯其血凝滴度，則隨其保存時間之增加而下降。

## 2. 關於紅血球的研究

文獻中記載流行性乙型腦炎病毒之血凝試驗，需用24小時內雞紅血球，前此

表3 10隻萊亨雞紅血球血凝滴度之差別

萊 亨 雞	血 凝 滴 度	萊 亨 雞	血 凝 滴 度
№ 11	1:10240	№ 16	1:2560
№ 12	1:640	№ 17	1:5120
№ 13	1:640	№ 18	1:640
№ 14	1:640	№ 19	1:1280
№ 15	1:1280	№ 20	1:640

我們的試驗證明<sup>[10]</sup>, 在用醋酮乙醚浸漬乳鼠腦抗原作血凝時, 成雞紅血球的滴度僅稍次於雛雞紅血球, 而在血凝抑制試驗上, 成雞血球反較雛雞血球為敏感, 故在實際應用上, 我們建議使用成雞紅血球。

(1) 動物個體差別對血凝的關係: 我們曾經使用志達雞場之 8 個月雞齡的萊亨雞 10 隻進行試驗, 結果證明 10 隻萊亨雞紅血球之凝集度差別很大(表 3)。

(2) 血球濃度與血凝滴度的關係: 在作嗜神經病毒血凝試驗時, 一般倡用 0.25% 紅血球懸液, 我們在作流乙腦炎病毒血凝時, 為了證實此點, 我們曾試驗了各種不同濃度的血球懸液(0.125、0.25、0.5、1%) 其結果如圖 1。

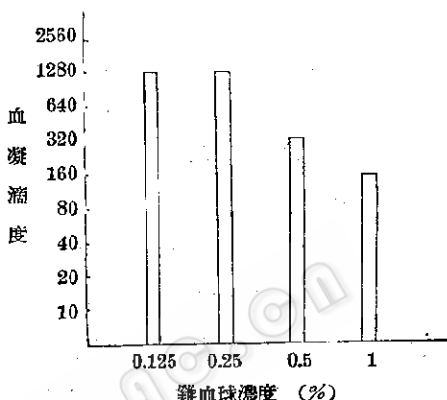


圖 1 血球濃度與凝集價

由圖 1 可以看出, 在作流乙腦炎病毒血凝試驗時, 使用 0.25% 紅血球懸液為最恰當。用 0.125% 紅血球懸液, 雖亦可得到與 0.25% 者相同, 但其凝集不甚明顯。

### 3. 關於免疫血清的研究

文獻中<sup>[6]</sup>記載, 作流乙腦炎病毒血凝抑制試驗時, 除去血清中非特異性抑制物質為主要問題。我們曾用醋酮處理法作出試驗, 其結果如表 4。

表 4 用醋酮處理血清中非特異性物質的結果

血 清	血 凝 抑 制 滴 度	
	未 處 理	經 醋 酮 處 理
*白 鼠 正 常 血 清	>1280	<20
*白 鼠 免 疫 血 清	>1280	160
△人 免 疫 血 清		
1. 潘	1280	320
2. 王	2560	20
3. 藍	1280	40
4. 蔡	2560	40

\*.....使用 4 個凝集單位抗原。

△.....使用 8 個凝集單位抗原。

上表明確指出，血清經醋酮處理後，確可除去血清中非特異性抑制物，如不加任何處理，其血凝抑制之結果將無法判斷。根據小白鼠正常血清無抑制流乙腦炎病毒血球凝集之能力，故其特異性亦可證明。

爲了更進一步了解流乙腦炎病毒是否與其他相近腦炎的免疫血清有交叉抑制現象，特作出以下試驗。

表 5 流乙腦炎病毒與其他腦炎免疫血清間的交叉抑制現象

病 毒	免 疫 血 清	血 凝 抑 制 滴 度
流 乙 腦 炎	流 乙 腦 炎	1:5120
	聖 路 易 腦 炎	1:640
	西 方 馬 腦 炎	1:80
	蘇 聯 春 夏 型 腦 炎	1:80

註：病毒使用 4 個凝集單位；免疫血清爲豚鼠製成者。

由表 5 可以看出，聖路易、西方、蘇聯春夏型腦炎之免疫血清，對流乙腦炎病毒的血凝現象，確有不同程度之抑制現象產生。如以流乙腦炎免疫血清的抑制價爲 1 來計算，則聖路易有  $1/8$ ，西方及蘇聯春夏型各有  $1/64$  的交叉抑制存在。

(3) 抗原量與血凝抑制的關係：關於使用抗原量的多寡與抑制價的關係問題，常被一般人所忽視。作血凝抑制試驗時，使用抗原量各自不同，有人用 4 個單位，有人用 8 個單位，也有人甚至用 16 個單位。使用抗原量的不同與其抑制結果到底呈現何種關係，亟待了解，今將試驗結果列表如下：

表 6 抗原量與血凝抑制價的關係

抗 原 量	*血 清 稀 釋 度									血清 對照	抗原 對照
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
2 單 位	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+
4 單 位	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+
8 單 位	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+
16 單 位	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+
32 單 位	—	—	—	+	+	+	+	+	+	—	+

\*小白鼠免疫血清

以上證明抗原量使用多少與抑制價之影響很大，其規律爲抗原量使用愈少抑制

價愈高,抗原量愈多抑制價愈低。此點的提出,對我們判斷血凝抑制結果及分析材料上有一定的幫助。

#### 4. 影響血凝作用的其他因素的研究

(1) 稀釋液與血凝滴度的關係:流乙腦炎病毒血凝試驗,對溶液及其 pH 的要求甚為嚴格,掌握此點甚為重要,因此我們曾用相同 pH(6.8—7.0)之 4 種不同溶液作了血凝試驗之比較,其結果如下表:

表 7 相同 pH (6.8—7.0) 不同溶液的血凝滴度比較

溶 液	血 凝 滴 度
0.01M 磷酸鹽緩衝鹽水	1:1280
任 氏 溶 液	1:2560
0.02M 磷酸鹽緩衝鹽水	1:1280
生 理 鹽 水	1:640

由以上結果可以看出,以任氏溶液為最好,血凝滴度最高,且其結果出現明顯,在室溫內放置 24 小時其結果仍不發生變化。其他 3 種溶液,以生理鹽水為最壞,結果出現模糊不易判斷,如在室溫內放置過久,此三者俱呈現溶血現象。因此我們採用了任氏溶液。

(2) 溫度與血凝滴度的關係:溫度對流乙腦炎病毒血凝之影響很大,試驗證明如下:

表 8 不同溫度下血凝的結果

溫 度	血 凝 滴 度
37°C	0
25°C (室溫)	1:640
4°C	1:1280

由表 8 看出 4°C 低溫時最好,且其結果甚為明顯。同時我們更觀察到流乙腦炎病毒一旦與雞紅血球吸附呈現凝集現象後,雖經 37°C、25°C 2 小時之處理,亦不呈現病毒解離現象,此點與流感病毒殊異。

#### 5. 血凝抑制試驗的初步應用

在檢討了以上各因素後,為了了解是否可將血凝抑制試驗應用於臨床診斷上,我

們初步試用於14例\*免疫前後的人血清，並以補體結合試驗作對照（見表 9）。

表 9 血凝抑制試驗與補體結合試驗的比較

姓 名	免 疫 次 數 與 劑 量	第一次免 疫與採血 間隔期間	免 疫 前 血 清		免 疫 後 血 清	
			血凝抑制 度	補體結合 滴度	血凝抑制 度	補體結 合度
5. 郭	1次2.0毫 升	46 天	1:80	0	1:320	0
6. 張	1次2.0毫 升	37 天	1:40	0	1:160	0
7. 杜	1次2.0毫 升	46 天	1:160	0	1:320	1:2
8. 鐵	1次2.0毫 升	46 天	1:320	抗 補 體	1:320	1:2
9. 龐	1次2.0毫 升	37 天	1:80	抗 補 體	1:640	1:2
10. 胡	1次2.0毫 升	37 天	<20	0	1:320	1:4
11. 房	1次2.0毫 升	46 天	1:40	抗 補 體	1:160	1:2
12. 唐	1次2.0毫 升	37 天	<20	0	1:640	1:2
13. 李	—	—	<20	0	1:80	0
14. 高	2次共3.0毫 升	46 天	1:160	0	1:1280	1:16 <sup>+</sup>
15. 江	2次共4.0毫 升	42 天	1:80	抗 補 體	1:1280	1:16
16. 宿	1次2.0毫 升	46 天	<20	0	1:160	1:2
17. 徐	1次2.0毫 升	46 天	1:80	0	1:320	1:2
18. 姜	1次2.0毫 升	46 天	1:160	1:2	1:320	1:4

\* 在接受腦炎疫苗的14例中，12例只免疫了1次，僅高、江2人接受兩次注射，其間隔期為5天。

從表 9 中來看，經兩次免疫後的兩例血清的血凝抑制滴度為 1:1280，其補體結合滴度為 1:16 或更高。有 4 例免疫前血清的血凝抑制滴度為 <20，其補體結合滴度為零。其中有 8 例免疫前後血清的血凝抑制滴度為 1:320、160、80、40，而其補體結合滴度為零。補體結合有滴度而血凝抑制無滴度者，却未發現 1 例。如拿血清滴度 4 倍增高之原則來測定免疫效價來看，則血凝抑制試驗有 10 例呈陽性結果（5、6、7、9、11、12、13、14、15、16），而補體結合試驗僅有 3 例（10、14、15）呈陽性結果。上述兩種不同結果的出現，是因為血凝抑制法的敏感性高呢？抑是血凝抑制法之特異性低？因所做例數太少，且缺少其他更好方法對照，在此不能作為肯定。

總之從結果中看出，用醋酮處理人血清後，其血凝抑制反應有陰性(<20)及強陽性(1:1280)之出現，且與補體結合反應的結果一致。因此可以推想血凝抑制法作為流乙腦炎的血清診斷法，是有可能性的。然而還有待今後用腦炎病人血清作更多比

較性的研究。

## 討 論

Sabin 氏等<sup>[6]</sup>證明流乙腦炎病毒血凝試驗時所使用的鼠腦抗原，經每分鐘 13,000 轉離心後，可增加其血凝滴度，（並可在 5°C 環境下保存若干天或更久）。此點提示了鼠腦抗原中可能存在有非特異性血凝抑制物，而此抑制物似可用高速遠心沉澱除去或減低。Mac-Donald 氏<sup>[8]</sup>作 Murray Valley 腦炎（以後略為 MVE）病毒血凝試驗時，曾發現成鼠腦與乳鼠腦所製抗原，其血凝滴度有很大區別。21 天鼠腦所製抗原，其血凝滴度為 80—160，5—10 天鼠腦所製抗原，其滴度為 1280—2560。而 Casal's 氏<sup>[15]</sup>等最近發現，用醋酮——乙醚浸漬製成的流乙腦炎，2—4 天乳鼠腦抗原與 24 小時內雛雞紅血球作血凝試驗時，其血凝滴度可達至 1:196,608。在我們的試驗中，用 Casal's 氏醋酮——乙醚浸漬法製就的抗原發現了只有乳鼠腦所製流乙腦炎病毒抗原，能凝集成雞紅血球。

據文獻<sup>[16]</sup>記載，成鼠腦與乳鼠腦組織的成份有很大區別。

表 11 乳鼠和成鼠腦組織化學成分的分析

	水 份	蛋 白 質	類 脂 質
乳 鼠 腦	87.8%	8.7%	3.5% (大部分為磷脂)
成 鼠 腦	78.1%	10.6%	11.3%

由表 11 可看出成鼠腦與乳鼠腦化學成份之主要差別在於類脂質，成鼠腦的含量約等於乳鼠腦之 3 倍以上，而類脂質本身為血球凝集的一種非特異性抑制物質。如此看來，成鼠腦所製抗原的所以不敏感，與其化學成份有密切關係。排除此種非特異性抑制物，在血球凝集試驗中是一重要關鍵。

最近日人波多氏<sup>[28]</sup>證明正常鼠腦中存在對雞血球之正常血凝素（非特異性），且經試驗證明亦為脂類（lipid），用脂溶劑可以除去此項物質。由此可見，使用醋酮——乙醚浸漬抗原與雞血球作血凝試驗，其優越性頗大。

中山株病毒為何滴度高，京衛研<sub>1</sub> 病毒為何滴度甚低，尚不能得到圓滿的解釋。

Sabin 氏<sup>[6]</sup>等證明，流乙腦炎病毒血凝抗原在 5°C 下保存最好。我們根據此項經驗，在 4°C 冰箱內保存抗原，證明保存 52 天後仍可以使用，唯其血凝滴度，隨保存日期之增加逐漸下降。降低的原因是由於在保存過程中抗原性遭受破壞抑或腦組織



中釋放出非特異性抑制物？仍有待研究。

日人工藤氏<sup>[17]</sup>作哥倫比亞——SK病毒血凝時證明，其所製抗原在 56°C 和 37°C 環境下，凝集力先於感染力而消失。我們所製抗原，在 4°C 冰箱內保存，其感染力雖然消失，血凝功能仍然很大。此點或者因為試驗時所採用的溫度與抗原製法之不同，因而產生了不同的結果。

嗜神經病毒之血凝試驗，對血球種的選擇性很高。文獻中記載哥倫比亞——SK、MM、Mengo 腦炎、腦心肌炎<sup>[2,3]</sup>、脊髓前灰白質炎<sup>[4]</sup>等病毒需用羊血球；GD VII 株鼠腦脊髓炎<sup>[5]</sup>需用人“O”型血球；流乙腦炎、聖路易腦炎<sup>[6,7]</sup>、MV 腦炎病毒<sup>[8]</sup>限制使用 24 小時內雛雞紅血球。前次我們曾初步報告<sup>[10]</sup>，用醋酮——乙醚浸漬法所製的流乙腦炎乳鼠腦抗原，不僅能凝集 24 小時內雛雞血球，且能凝集成雞血球，同時對其他動物紅血球也發現有不同程度的凝集作用。

Горбунова 氏<sup>[18]</sup>曾謂：甲型及亞甲型流感病毒，對哺乳類動物紅血球的血凝滴度比雞血球高，而乙型流感病毒持有相反的性質。最近又有人<sup>[19]</sup>發現腮腺炎病毒對動物紅血球之凝集範圍比流感病毒更為廣泛，且證明可根據兩病毒對某些哺乳類動物血球凝集性之有無，作為兩者鑑別之用。如此看來，或者可以利用病毒對各種動物紅血球凝集之選擇性，來初步鑑別各種腦炎病毒。

De Baan<sup>[20]</sup>氏等用哥倫比亞——SK、MM 病毒與羊血球作血凝試驗時，曾提出因羊之個體不同其血球之凝集性有顯著差別。我們使用了志達雞場 1953 年 10 月孵出之 10 隻萊亨雞作一比較試驗，在同一條件下證明，此 10 隻雞血球之凝集滴度大有出入(640—10240)。故在作血凝試驗時，不但要選擇動物血球的種類，即在同一種動物中，個體的差別，亦需注意。

根據文獻報導<sup>[6]</sup>，在作嗜神經病毒血凝試驗時，血球懸液的濃度以使用 0.25% 為最佳，我們的試驗也同樣證明了此點。

Sabin 氏等<sup>[6]</sup>證明作流乙血凝試驗時，使用 pH 6.5—6.8 的 0.01 M 磷酸鹽緩衝鹽水為最好。而 Casal's 氏等最近又創用 pH 6.8—7.0 的 0.02 M 磷酸鹽緩衝鹽水。我們採用了相同 pH 之 4 種溶液 (pH 6.8—7.0) 作了試驗，結果證明以任氏液為最合用，而且在整個試驗中採用了此種溶液。關於 pH 問題我們同樣的作了試驗，唯與以前著者的出入甚大。我們考慮或者因為使用抗原的製法不同，試驗的方法不同，所用儀器不同，因而產生不同結果，此點容後再作報告。

Gard 氏<sup>[21]</sup>在作哥倫比亞——MM 病毒血凝時，曾證明多價陰離子在 0.001—

0.01 M 之濃度時，對紅血球凝集呈高度抑制作用，一價及二價之陽離子無抑制作用。Bromer 氏<sup>[22]</sup>在作哥倫比亞——SK. MM 病毒血凝時，試驗了  $K^+$  及  $Ca^{++}$  兩離子濃度對血凝之影響，結果證明含有 1.5%  $CaCl_2$  時，紅血球不凝集，含 1.2%  $KCl$  時呈現高度之凝集性。日人藤本氏<sup>[23]</sup>曾謂：如在稀釋液中加  $KCl$ ，則流乙腦炎病毒可對成雞紅血球有凝集性。我們使用的任氏溶液中含有  $KCl$ ，且證明用此溶液作流乙腦炎血凝為最好。由此推論  $K^+$  離子對流乙腦炎病毒的血凝現象，或者同樣的可以予以良好的影響。

Sabin 氏等<sup>[6]</sup>證明，正常人、兎、猴、小白鼠之血清中，含有對流乙腦炎病毒凝集紅血球之非特異性抑制物質，並且說明，如果用脂溶劑（乙醚、苯、哥羅芳，氯化乙烯、醋酮、酒精乙醚混合液）處理後，可以除去此項物質。氏等用哥羅芳處理血清，證明美國人正常成人血清，未經處理者對流乙腦炎血凝抑制滴度為 320—640，經處理後抑制制度為 10；病人血清未經處理者滴度為 640，經處理後滴度為 320。Casals 氏等<sup>[15]</sup>用醋酮處理血清，證明流乙腦炎小白鼠免疫血清對流乙腦炎的血凝抑制滴度為 1:160，猴免疫血清為  $>40$ 。Chanock 氏等<sup>[24]</sup>在做聖路易腦炎病毒血凝抑制試驗時，亦曾使用醋酮處理血清，結果證明甚好。

經過我們的試驗證明，小白鼠、豚鼠、人的正常及免疫血清，用醋酮處理法除去其中非特異性抑制物質，其結果頗為良好，唯其手續仍嫌複雜，且使用藥品頗多，究非一種良好的方法。在作流感病毒血凝抑制試驗時，也曾發現正常動物血清中存在朱及 Francis 抑制物質，<sup>[33]</sup>且有人證明，用霍亂弧菌濾液<sup>[25]</sup>、胰蛋白酶<sup>[26]</sup>、梅奇尼科夫弧菌濾液<sup>[27]</sup>等可以除去此項物質。是否在流乙腦炎病毒血凝抑制試驗時，也可以使用上述的方法處理血清，有待於今後之研究。

Chanock 氏<sup>[24]</sup>等證明聖路易腦炎病毒與流乙腦炎、西方馬腦炎、蘇聯春夏型腦炎等病毒之免疫血清間，存在着交叉凝集抑制現象。我們同樣證明流乙腦炎病毒與聖路易、西方、蘇聯春夏型腦炎的免疫血清間，存在有交叉血凝抑制現象，其中尤以聖路易免疫血清為最高，其比例指數達  $\frac{1}{8}$ 。此點頗可引起研究腦炎病毒血凝試驗者之注意。

## 結 論

(1) 醋酮——乙醚浸漬法製成的流乙腦炎抗原與成雞紅血球作血凝試驗時，其抗原必需用乳鼠腦製成。中山株病毒之敏感性高，我國分離的京衛研<sub>1</sub>病毒之滴度頗低。本法製成之抗原在 4°C 冰箱內保存兩月尚可使用，唯其血凝滴度，隨保存時間

的增長逐漸下降。本抗原的感染力雖已消失，其血凝功能仍舊存在。

(2) 本法製成之抗原，對成年萊亨雞血球同樣持有較高的滴度，然因雞的個體不同，其血凝滴度之差別很大。試驗使用 0.25% 紅血球懸液為最好。

(3) 所用溶液之 pH 尚未作出肯定結論，唯溶液之 pH 在 6.8—7.0 時，使用任氏液為最好。溫度在 4°C 時凝集最好，且證明流乙腦炎病毒一旦與雞血球發生凝集現象後，不產生病毒解離之現象。

(4) 醋酐可以除去人、小白鼠、豚鼠血清中之非特異性抑制物質，唯流乙腦炎病毒與聖路易、西方、蘇聯春夏型腦炎的免疫血清間，有不同程度的交叉抑制現象，其中尤以聖路易腦炎免疫血清為最高。

(5) 抗原量的多寡與血凝抑制價有密切關係，抗原量使用愈少，抑制價愈高。

(6) 初步證明，用醋酐除去人血清中的非特異性抑制物質來作流乙腦炎之血凝抑制試驗是可以的。

## 參 考 文 獻

- [1] Hirst, G. K. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*, **94**: 22-24, 1941.
- [2] Hallauer, C. Fourth International Congress Microbiology, Copenhagen, Denmark, July 20-26, 1947, 257.
- [3] Olitsky, P. K. and Yager, R. H. Hemagglutination by Columbia-SK, Columbia-MM, Mengo encephalomyelitis and encephalomyocarditis: Experiments with other viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* **71**: 719-724, 1949.
- [4] Bremer, A. et Mustsaars, W. Agglutination des globules rouges de Mouton par le virus de la poliomyélite (Souch Lansing) *C. R. Soc. Biol.* **142**: 1194-1196, 1948.
- [5] Lahelle, O. and Horsfall, F. L. Jr. Hemagglutination with the GD VII strain of mouse encephalomyelitis virus. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.* **71**: 713-718, 1949.
- [6] Sabin, A. B. and Buescher, E. L. Unique physico-chemical properties of Japanese B encephalitis virus hemagglutinins. *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, **74**: 222-230, 1950.
- [7] Sabin, A. B. Hemagglutination of viruses affecting the human nervous system. *Fed. Proc.* **10**: 573-578, 1951.
- [8] Ma C-donald, F. Hemagglutination with the virus of Murray Valley Encephalitis (MVE). *Brit. J. Exp. Path.*, **33**: 537-542, 1952.
- [9] 張乃初：日本 B 型腦炎之血清診斷法，中華新醫學報，**1**(1)：42-47, 1950.
- [10] 朱錫華：流行性乙型腦炎病毒血球凝集試驗之初步報告，中華醫學雜誌，1954年，第六號，444-445頁。
- [11] Hammon, W. M. and Espana, C. A. simple method of producing control guinea pig immune sera for use with complement fixing antigens for the arthropod-borne virus encephalitis, *Proc. Soc. Exp. Biol Med.*, **66**: 113-115, 1947.

- [12] Casals J. Acetone-ether extracted antigens for complement fixation with certain neurotropic viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 70: 339-343, 1949.
- [13] 吳安然等: 改進流行性乙型腦炎酯酮乙醚浸漬抗原之初步研究。微生物學報, 1(2): 196-201, 1953.
- [14] Salk, G. E. A simplified procedure for titration of hemagglutination capacity of influenza-virus and the corresponding antibody. *J. Immunol* 49: 87-98, 1944.
- [15] Casals J. and Brown, L. V. Hemagglutination with certain Arthropod-borne viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83: 170-173, 1953.
- [16] 張乃初: 中國協和醫學院病毒學講義, 1954.
- [17] 工藤佑三: Col-SK ウイルスの血球凝集反應に關する研究, 第一報。血球凝集反應の條件にクツて Virus, 第4卷第1號。6-11, 1954.
- [18] Горбунова, А. С. Биологические свойства вирусов гриппа и вопросы их классификации. ЖМЭИ, 2, 39-45, 1953.
- [19] Шубладзе, А. К. и Салимов, М. А. Некоторых свойствах вируса эпидемического паротита, ЖМЭИ, 1. 1953.
- [20] De Baan, P. Verlinde, J. D and Waller—Fetter, P., Studies on hemagglutination by the EME-MM-columbia SK group of viruses, *Ant. V. Lee.*, 17: 119-128, 1951.
- [21] Gard, S and Heller, L. Hemagglutination by columbia-MM virus, *Proc. Exp. Biol Med.*, 76: 68-73, 1951.
- [22] Bremer, A. Action des ions  $K^{+}$  et  $la^{++}$  sur l' agglutination des globules rouges de mouton par des souches murines de poliomyelite(SK et MM), *C.R.S. Biol.*, 144: 1436-1437, 1950.
- [23] 藤本逸郎: 日本腦炎の血球凝集反應, 醫學中央雜誌, 第108卷第3號, 472, 1954.
- [24] Chanock, R. M. and Sabin, A. B. The hemagglutinin of St. Louis encephalitis virus. *J. Immunol.*, 70: 271-316, 1953.
- [25] Anderson, S. G. Mucins and mucoids in relation to influenza virus action, *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 26(5): 347-354, 1948.
- [26] Sampaio, A. A. and Isaacs, A. The action of trypsin on normal serum inhibition of influenza virus agglutinations, *Brit. J. Exp. Path.*, 34 (2): 152-158. 1953.
- [27] Фридман, Э. А. Простой метод инактивирования неспецифических ингибиторов вирусной гемагглютинации. ЖМЭИ, 69: 2, 1954.
- [28] 波多野基一: 日本腦炎血凝實驗中正常血凝素, ウイルスの綜合雜誌第4卷第2號, 140-155, 1954.

## HEMAGGLUTINATION IN JAPANESE B ENCEPHALITIS

CHU HSI-HUA

*Department of Bacteriology, Chinese Union Medical College*

In variance with the report of Casals, Japanese B encephalitis antigen, prepared by the acetone ether extraction method, was found to agglutinate not only young chicken cells, but also adult chicken erythrocytes. However, the potency of different strains showed varied activities, such as the Nakayama strain was much more potent than the strain locally isolated. Stored at 4°C, the antigen preserved its potency for two months, although its infectivity had long disappeared.

Besides the various factors involved in the hemagglutination test studied, it was found that the natural interfering substance, present in the human or mouse sera, could be readily removed by acetone precipitation, and when the precipitate was redissolved, the recovered sera showed specific virus hemagglutination-inhibition effect. Thus preliminary studies carried out in this investigation showed some potentiality of this reaction in the study of Japanese B encephalitis.