

从腦脊髓液分离流行性乙型腦炎病毒

王用楫 朱联英

(中央生物制品研究所, 北京)

近数年来全國許多城市都有流行性乙型腦炎的病例报告^[1], 因而腦炎的診斷实为一个重要的問題。根据臨床症狀和病理檢查只能作出腦炎的一般診斷, 而腦炎的型別必須由分离及鑒別病毒或病人血清診斷方能确定。

一般分离病毒的材料大都采用死者的腦組織^[2,3]。苏联工作者指出, 早期患者的腦脊髓液可能是分离腦炎病毒來源之一^[4]; 而且也有分离成功的报告^[5]。为了証明腦脊髓液是分离流行性乙型腦炎病毒的可能來源, 1953年7—8月間我們曾从事这一工作, 从早期患者的腦脊髓液中曾分离得到三株病毒, 經鑒定属于流行性乙型, 現在把分离方法鑒定結果报告于下。

材料和方法

1. 腦脊髓液: 于發病早期抽取, 不經离心沉淀, 亦不加任何稀釋液, 于半小时内接种小鼠。
2. 小鼠和接种方法: 选体重7—9克的健康小鼠, 每只腦腔接种腦脊髓液0.03毫升, 同时再腹腔接种0.3毫升。每份腦脊髓液接种小鼠5—8只。
3. 盲目傳代: 接种腦脊髓液的小鼠于5—6日内如無腦炎症狀出現, 即牺牲小鼠2—3只, 取腦研磨加肉湯生理食鹽水等份液稀釋至1:10, 以每分鐘3,000轉的速度沉淀5分鐘, 取上清液再腦腔接种小鼠3—5只, 称第1次傳代; 如第1次傳代的小鼠于5—6日内仍無症狀时, 同样再進行一次傳代, 称第2次傳代。第2次傳代的小鼠觀察至第十四日如無病症發生, 与首次接种腦脊髓液的及第1次傳代的小鼠一并廢弃。
4. 病鼠或死鼠傳代: 接种腦脊髓液的小鼠中或第1次第2次傳代的小鼠中于觀察期間內, 如有小鼠出現腦炎症狀或死亡时, 即刻依上法傳遞小鼠3—5只, 逐日觀察至第14日。
5. 鑒定: 分离得到的病毒主要以中和試驗法進行鑒定, 另外以血球凝集抑制試驗輔助之。

中和試驗法系以未經稀釋的已知抗流行性乙型腦炎病毒的高價免疫豚鼠血清，與按 10 倍稀釋的待驗毒株的新鮮鼠腦懸液各 0.25 毫升，在小試管中充分混合，置 37°C 水溫箱內 1 小時，然後接種血清與病毒的混合液至 7—9 克的小鼠腦腔，每只 0.03 毫升；同時以正常豚鼠血清作為對照組，即依同樣方法與病毒混合接種小鼠。每個病毒稀釋度接種小鼠 5 只。觀察 14 日，依 Reed-Muench 氏法^[6]計算中和指數。

血球凝集抑制試驗系採用 Salk 氏法^[7]。血球懸液採用 0.25% 的雞血球^[8]，已知抗流行性乙型腦炎病毒的高價免疫豚鼠血清和免疫小鼠血清事先加 8 倍量的氯仿處理^[8]，以除去血清中非特異性的血球凝集抑制作用。對照組用的正常豚鼠和正常小鼠血清，亦依同法同時處理，與免疫血清同時進行試驗。

結 果

這次採用病人早期腦脊髓液進行腦炎病毒分離共計 67 例，採取腦脊髓液的時間在發病後第 2—8 日，結果有 3 例分離得到病毒。現在把病人情況及分離病毒的結果列如表 1。

第 10 號病例於發病後第 4 日取腦脊髓液，接種小鼠 5 只，除兩只於接種後第 5 日殺死作盲目傳代外，其餘 3 只分別於 5—8 日內發病後殺死或病死，兩只並進行繼續取腦傳代。

第 20 號病例於顯症狀後第 3 日取腦脊髓液，接種小鼠 8 只，其中 3 只解剖作為盲目傳代，其餘 5 只中，發病傳代及病死者各一只。

第 24 號病例的腦脊髓液係在發病後第 2 日抽取的。共接種小鼠 6 只，觀察至第 6 日兩只死亡，兩只發病殺死取腦傳代。

以上三例中凡經繼續傳代（包括盲目傳代、小鼠發病或死亡後傳代）所接種的小鼠，全部於接種後第 4—8 日發病或死亡。所解剖的鼠腦經培養後證明無菌，以後繼續傳遞這三株病毒，受染小鼠於接種 4—5 日內顯病，一周內全部死亡。

這三個毒株定名為 10、20、24。於傳遞 2—3 代即用已知抗流行性乙型腦炎病毒的高價免疫豚鼠血清進行中和試驗，以鑑定病毒的型別。〔試驗結果見表 2。〕已知免疫血清對這三個毒株的中和指數分別為 63,000、200,000 和 16,000，即對這三個新分離的毒株有顯著的中和作用。據此，認為新分離的毒株似與流行性乙型腦炎病毒無異。

這三個毒株於傳遞至第 6—7 代時，再用已知抗腦炎病毒的免疫豚鼠血清和小鼠血清進行血球凝集抑制試驗，結果見表 3。除 10 號毒株的血球凝集價過低（1:20），無法進行血凝抑制試驗外，20、24 號毒株的血球凝集作用顯然能為已知的免疫豚鼠和小鼠血清

表 1 从病人腦脊髓液分离病毒的结果

病例号数 及 采取腦脊 髓液時間	病人情况			病人腦脊髓液接种小鼠的结果		傳代小鼠的结果	
	性別	年齡	結果	接种 鼠号	在观察期內小鼠情况	傳遞 鼠号	在观察期內小鼠情形
10 發病后 第 4 日	男	22	死	1	第 5 日殺死取腦作盲目傳代	5	①④⑤③⑤
				2			
				3	第 5 日顯病取腦傳代	3	⑤⑤⑤
				4	第 6 日顯病死亡	3	⑤⑤⑤
				5	第 8 日顯病死亡	—	
20 發病后 第 3 日	女	22	死	1	第 5 日殺死取腦作盲目傳代	5	④⑤⑤⑤⑤
				2			
				3			
			亡	4	第 5 日顯病取腦傳代	3	⑤⑤⑤
				5	第 8 日顯病死亡		
				6	生存	—	
				7	生存	—	
				8	生存	—	
24 發病后 第 2 日	女	1	恢	1	第 6 日顯病殺死取腦傳代	5	①①④④④
				2			
				3	第 6 日死亡	—	
			复	4	第 6 日死亡	—	
				5	生存	—	
				6	生存	—	

* ○表示小鼠死亡,圈内数字表示死亡日期;□表示小鼠顯病,圈内数字表示顯病及解剖日期。

表 2 中和試驗鑒定結果

毒 株 名 称	使用病 毒代数	使用病毒 滴 定 度 (LD ₅₀)	試驗組小鼠病毒 滴定度 (免疫豚 鼠血清)	对照組小鼠病毒 滴定度 (正常豚 鼠血清)	中 和 指 数
10	2	10—6.0	10—2.0	10—6.8	63,000
20	2	10—6.3	10—1.5	10—6.6	200,000
24	3	10—7.0	10—2.3	10—6.6	16,000

表 3 血球凝集抑制試驗鑒定結果 I
(新分离的毒株与已知的抗乙型腦炎血清試驗)

毒 株 名 称	使用病 毒代数	使用病毒滴 定度 (LD ₅₀)	使用病毒懸 液的血球凝 集价	与免疫豚鼠血清試驗結果		与免疫小鼠血清試驗結果	
				免疫豚鼠血 清血凝的抑 制价	正常豚鼠血 清血凝的抑 制价	免疫小鼠血 清血凝的抑 制价	正常小鼠血 清血凝的抑 制价
10	6	10 ^{-5.0}	1:20	—	—	—	—
20	6	10 ^{-5.4}	1:1,280	1:5,120	1:40	1:80	0
24	7	10 ^{-5.2}	1:5,120	1:1,280	1:320	1:320	0

表 4 血球凝集抑制試驗鑒定結果 II
(已知的乙型腦炎 47 号毒株与抗新分离毒株的免疫豚鼠血清試驗)
(使用的乙型腦炎 47 号毒株懸液的血球凝集价为 1:640)

血 清 种 类	血 清 的 稀 釋 度									血 球 凝 集 抑 制 价
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1,280	1:2,560	1:5,120	
抗10号毒株免疫血清	—	—	—	—	—	—	+	+	+	1:640
抗20号毒株免疫血清	—	—	—	—	—	—	+	+	+	1:640
抗24号毒株免疫血清	—	—	—	—	—	—	—	±	+	1:1,280
抗47号毒株免疫血清	—	—	—	—	—	—	—	±	+	1:1,280
正 常 豚 鼠 血 清	—	—	—	+	+	+	+	+	+	1:80

* +表示血球凝集在管底呈圓盤狀; ±呈环狀; —呈点狀。

所抑制。对 20 和 24 号毒株,免疫小鼠血清的血凝抑制价为 1:80 及 1:320,而对照血清的抑制价为 0,即对未稀釋的对照血清沒有抑制现象。免疫豚鼠血清的血凝抑制价为 1:5,120 及 1:1,280,而对照血清的抑制价为 1:40 及 1:320。

另外,又以这三个毒株免疫的豚鼠血清,与已知乙型腦炎 47 号毒株的病毒進行血凝抑制試驗,結果見表 4。据这个試驗結果可以說明,抗这三个毒株的免疫血清对已知的乙型腦炎病毒的血凝性質也都有相当顯著的抑制作用。得到的血凝抑制价分别为 1:640,1:640,1:1,280。

根据 20 和 24 号两个毒株的血球凝集作用顯然能为已知的免疫血清所抑制,又根据抗这三个毒株的免疫血清都能够抑制已知的乙型腦炎毒株的血球凝集作用,也足以說明 10、20 和 24 号三个病毒是屬於流行性乙型腦炎病毒。

另外,这三个毒株于傳遞至第 5—6 代时,曾用每株的 1:10 的鼠腦懸液各腦腔接种

家兔一只，豚鼠两只，接种量分别为 0.5 及 0.3 毫升观察 21 日。除接种次日动物稍有發热外，在观察期内，并無任何症狀或死亡。这点与家兔和豚鼠对流行性乙型腦炎病毒無感受性的事实也是相符合的。

討 論

以往从腦脊髓液分离腦炎病毒的报告很少。1952 年宋氏等用病人腦脊髓液分离病毒兩次，結果均为陰性^[3]；1952 年在馬來亞从發病后第 4 日采取的腦脊髓液中，曾有一例分离流行性乙型腦炎病毒^[6]，1954 年热河承德防疫站工作同志曾由腦炎患者腦脊髓液中分得病毒一株^[9]。

据这次 67 份腦脊髓液中只有 3 份分离病毒成功。从成功机会上比較，可能沒有采用腦組織分离病毒那样容易；但腦組織只限于病人死亡后才能采取，而采取腦脊髓却不受这样的限制。另外，檢查腦脊髓液几乎是臨床診斷腦炎病例的必然步驟，因此，試从这样的病理材料來進行分离腦炎病毒的工作是完全可能的。

这次分离病毒得到陽性結果的 3 例，都是在用腦脊髓液直接接种的小鼠中即全部或一部發病了；因此根据这次試驗的結果，当分离病毒时，实無連續盲目傳代的必要。

血球凝集抑制試驗法是由 Hirst 氏在研究流行性感冒病毒工作中所發現的^[10]，随后即廣泛应用在流行性感冒的血清試驗中。1950 年 Sabin 等氏报告，在特殊条件下，流行性乙型腦炎病毒也有血球凝集的現象；并利用抑制試驗來測定血清中抗乙型腦炎病毒的特异抗体。國內也有許多實驗室，已在進行这一类工作^[11]。在这次試驗中，我們曾以这个方法來鑒定乙型腦炎病毒，無論是用已知的免疫血清來鑒定未知的病毒，或者是用已知的病毒來鑒定抗未知病毒的免疫血清，都得到初步的成功。

結 論

1. 从 67 病例疑似腦炎病人的腦脊髓液中，分离得到三株病毒，經中和試驗及血球凝集抑制試驗証明是屬於流行性乙型腦炎病毒。
2. 由这次試驗結果說明，病人早期腦脊髓液是分离乙型腦炎病毒來源之一。
3. 血球凝集抑制試驗可以用于乙型腦炎病毒的鑒定。

志謝：蒙北京市傳染病医院吳斌、崔振宇大夫供給病人腦脊髓液，特此志謝。

参 考 文 献

- [1] 黃禎祥、宋 幹、田鳳調:中華医学雜誌, 37:357, 1951.
[2] 黃禎祥、王逸民:中華医学雜誌, 37:280, 1951.
[3] 宋 幹、李鳳筠、黃禎祥:中華医学雜誌, 38:1029, 1952.
[4] Ильенко, В. И. Новости Медицины, 38: 56, 1953.
[5] Peterson, P. Y. et al. *Am. J. Hyg.*, 56: 320, 1952.
[6] Reed, J. E. & Muench, H. *Am. J. Hyg.*, 27: 493, 1938.
[7] Salk, J. E. *J. Immunol.*, 49: 87, 1944.
[8] Sabin, A. B. & Buescher, E. L. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 74: 222, 1950.
[9] 与热河承德防疫站郝玉武同志談及。
[10] Hirst, G. K. *J. Exp. Med.*, 75: 49, 1942.
[11] 朱錫華:微生物学报, 3(1):63, 1954.

ISOLATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS FROM THE SPINAL FLUID

WANG YUNG-CHI AND CHU LIEN-YING

National Vaccine and Serum Institute, Peking

Although the pathological materials usually employed for the isolation of Japanese B encephalitis virus are the nervous tissues, previous reports, especially from the U.S.S.R., have indicated that it is possible to employ the spinal fluid of the patients for this purpose. In the course of our study of the virus, we got some experience in this mode of isolation. The results of such isolation method is here-with reported.

We have examined 67 specimens of spinal fluid taken during the early stage of the disease, and three strains of the virus were isolated therefrom. All were obtained after direct intracerebral inoculation of 0.3 ml of spinal fluid into 5-8 white mice of 7-9 g body weight. When direct inoculation failed to isolate the virus, repeated passages in the mice also failed to recover it. All the three strains were proven by neutralization and hemagglutination, as well as hemagglutination-inhibition test to be identical with the standard Japanese B encephalitis virus.