

# 上海市自然界常見蚊種病毒分離的研究

陳希聲 陸顯新

(上海市衛生防疫站)

關於從自然界蚊體分離日本乙型腦炎病毒的研究，國外學者三田村氏及其共同研究者<sup>[1]</sup>，Petrisheva 與 Schubladze 氏<sup>[2]</sup>，Hammon 氏及其共同工作者<sup>[3]</sup>已有過不少的報告，有不少學者分離出日本乙型腦炎病毒。但一般說來，從自然界捕蚊分離病毒，不是很容易獲得陽性結果的，其中尤其是據 Thomas, Sabin, Hammon, Simpson, Webster 等氏<sup>[4]</sup>先後在日本關島等地做了 36,295 隻蚊子也未分離出病毒。但我國自從黃、鄭兩氏<sup>[5]</sup>在北京從自然界尖音庫蚊淡色變種分離出日本乙型腦炎病毒以後，各地學者們吸取了他們這種經驗，先後有尹、董二氏在瀋陽由尖音庫蚊淡色變種及騷擾伊蚊<sup>[6]</sup>，施氏在南京由尖音庫蚊淡色變種及中華按蚊<sup>[7-8]</sup>，魏氏等在大連由三帶喙庫蚊及尖音庫蚊淡色變種<sup>[9]</sup>分離出流行性乙型腦炎病毒。

我們為想確定上海市流乙腦炎的傳播媒介，自 1954 年開始了從自然界蚊種分離病毒的試驗，但未獲得陽性結果。1955 年繼續了此項研究，分離得 5 株流乙腦炎病毒。茲將試驗方法及結果分別敘述如下。

## 試 驗 方 法

### (一) 採蚊法：

選擇近年來病例發生較多及蚊蟲孳生較多的地方，作為重點捕蚊站，經常派專人在此採集蚊子。此外就當年發現的流乙腦炎陽性病例的病家或附近居民住宅內進行捕蚊。

### (二) 飼蚊法：

將蚊飼養在育蚊室內陶製的大小水缸內，在缸底鋪放 5 厘米厚的黃砂，再加水使砂完全浸沒，在水面放一攔架，飼蚊籠放置攔架上，在水缸上再加黑布被覆。天熱時缸內放置冰塊，使溫度降低，覆布經常保持潮濕。總之，務使缸內溫度保持在 25—28°C 和相對濕度 80—90%，飼料是用滅菌的 10% 葡萄糖溶液，飼養 4—7 天後，再進行蚊種鑑定及病毒分離。

### (三) 檢驗步驟：

用吸蚊管將蚊籠中的蚊蟲吸出，放入平底小玻璃管中，加上木塞，分組，編號；每組

至少 3 隻,至多 50 隻,平均 20 隻左右。放置低温冰箱 ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) 中 10 分鐘使其凍斃。

將蚊放入滅菌的組織磨碎器中,每蚊加 0.1—0.2 毫升 pH 7.8 的牛肉湯,磨碎混合,以每分鐘 3,000 轉離心沉澱 20 分鐘,取上層液每毫升加青黴素 1,000 單位及鏈黴素 0.5 毫克。放置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱 4 小時或過夜,然後將此液接種體重 6—8 克小白鼠 2—5 隻,每鼠腦內 0.03 毫升及腹腔內 0.3 毫升,(但自 1955 年 8 月中旬 249 批開始只注射腦內而不注射腹腔內),同時並作細菌培養試驗。小白鼠觀察 21 日,在接種後第 3 日以後死亡者繼續傳代至第 3 代,如小白鼠發病均呈典型腦炎症狀(如蜷縮,發抖,繞圈,麻痺等症狀)時,則於第 4, 5 代作鑑定的試驗。

試驗用的小白鼠却是在防蚊設備的動物室中育成的,進行病毒分離的工作室與其他病毒檢驗室完全隔絕,担任此種病毒分離的工作人員,在此工作期間不參與其他病毒接種工作(如保存的流乙腦炎病毒及由腦組織新分離病毒之傳代等)。

## 試 驗 結 果

從自然界蚊體分離病毒的試驗,上海市從 1954 年 4 月開始至同年 10 月底止,共採驗了成蚊、蛹和幼蟲合計 281 批 6,119 隻(見表 1),結果未分離出病毒。

1955 年為繼續這項研究,又自 5 月下旬至 9 月中旬止,從本市市區、半郊區及郊區不同住戶及各固定捕蚊站(在本市盧灣、龍華、普陀、真如、榆林五區分設在奶牛棚 4 個,牛棚附近住宅站 5 個,公園廁所 1 個),採得成蚊計 7 種 351 批 6,444 隻(見表 1)。其中吸血並已消化者計 262 批 5,191 隻。蚊種則以尖音庫蚊淡色變種為最多(184 批 3,963 隻),白紋伊蚊次之(94 批 1,255 隻),三帶喙庫蚊又次之(37 批 793 隻)。7 月份

表 1 1954—1955 年採驗上海自然界蚊種及數量

蚊 種	1954						1955			
	成 蚊		蛹, 幼 蟲		共 計		成 蚊		病毒分離陽性者	
	批	隻	批	隻	批	隻	批	隻	批	隻
尖音庫蚊淡色變種	221	4,732	1	22	222	4,754	184	3,963	2	43
三帶喙庫蚊	5	105			5	105	37	793	3	61
二帶喙庫蚊							1	3	0	0
乏倦庫蚊	1	28			1	28				
范氏庫蚊	1	1			1	1				
白紋伊蚊	23	390	13	455	36	845	94	1,255	0	0
杜氏伊蚊	6	132	7	226	13	358				
仁川伊蚊							2	7	0	0
中華接蚊	3	28			3	28	9	100	0	0
騷擾阿蚊							24	323	0	0
共 計	260	5,416	21	703	281	6,119	351	6,444	5	104

採蚊最多為 7 月份 (124 批 2,420 隻), 8 月份次之 (114 批 1,668 隻), 6 月份又次之 (53 批 1,439 隻)。

1955 年從上述 351 批 6,444 隻自然界成蚊中, 共分離出病毒 5 株, 3 株病毒都先後由同一地點的捕蚊站——盧灣區瞿真人路一奶牛棚採集的三帶喙庫蚊 36 批中分離出來的。該站採得的尖音庫蚊淡色變種 9 批 155 隻中, 則未分離出病毒。而從另一捕蚊站——真如區漕陽路一農民的牛棚採得尖音庫蚊淡色變種 21 批 488 隻, 在 7 月份的 12 批 241 隻中分離出 2 株病毒。毒株分離的時間為 7 月上旬 3 株, 同月中旬 2 株 (見表 2), 此時期與上海當年流行開始期正互相一致。

試就蚊體分離病毒各陽性例小白鼠接種及傳代結果來看, 各例從第 1 代接種小白鼠都發病致死, 這與過去三田村氏和其他有些學者們由盲目傳代而分離出病毒的情況是不相同的 (見表 2)。

以下為便於敘述計, 將所採得 5 株病毒分別定名為滬蚊 1 株 (第 92 批), 滬蚊 2 株 (第 104 批), 滬蚊 3 株 (第 125 批), 滬蚊 4 株 (第 127 批), 及滬蚊 5 株 (第 149 批)。

為了更進一步鑑定這些毒株是否流乙腦炎病毒, 做了以下幾種試驗:

(一) 無菌試驗: 經需氣性及厭氣性培養均證明 5 株病毒懸液無細菌生長。

(二) 濾過試驗: 僅將其中 1 株病毒懸液用 Seitz 濾器 E. K. 濾板濾過後, 濾液無細菌生長而仍有引致小白鼠發生腦炎症狀致死的病原性。

表 2 上海市自然界蚊體分離病毒陽性例一覽表

採蚊日期	批號	蚊 種	採蚊地點	檢驗 蚊數	飼養 日數	小 白 鼠 接 種					
						第 1 代		第 2 代		第 3 代	
						死亡數 接種數	死亡天數	死亡數 接種數	死亡天數	死亡數 接種數	死亡天數
7 月 4 日	92	三帶喙庫蚊	盧灣區瞿真人路捕蚊站	21	4	2/2	7, 10	2/2	4, 5	5/5	4, 4, 4 6, 6
7 月 5 日	104	尖音庫蚊 淡色變種	真如區漕陽路捕蚊站	24	6	2/2	6, 6	4/4	4, 4, 5, 6	4/4	4, 4, 4, 4,
7 月 9 日	125	三帶喙庫蚊	盧灣區瞿真人路捕蚊站	20	6	3/3	5, 5, 7	5/5	4, 4, 5, 5, 5	3/3	4, 4, 4
7 月 12 日	127	三帶喙庫蚊	盧灣區瞿真人路捕蚊站	20	4	4/4	5, 5, 5, 6	4/4	4, 4, 5, 5	3/3	5, 5, 5
7 月 14 日	141	尖音庫蚊 淡色變種	真如區漕陽路捕蚊站	19	6	3/3	3, 6, 6	3/3	5, 5, 5	3/3	4, 4, 4

(三) 感染範圍試驗: 所有新分離的 5 株病毒都用小白鼠、家兔、豚鼠及大白鼠四種動物接種腦內, 觀察一個月, 除小白鼠全部死亡外, 其餘 3 種動物均未有發病或致死的。

(四) 交互補體結合試驗:

1. 用已知免疫血清 (抗京衛研<sub>1</sub> 株)<sup>[10]</sup> 測定新分離病毒抗原; 分別接種滬蚊 1, 2, 3, 4, 5 株病毒於各批小白鼠腦內, 採發病小白鼠按批分別用醋酐乙醚浸漬法<sup>[11]</sup> 製成抗原, 以與京衛研<sub>1</sub> 免疫血清採用 Casals 氏小量法<sup>[12]</sup> 作補體結合試驗, 結果證明有 1:8—1:32 的效價 (見表 3)。

表 3 已知免疫血清 (抗京衛研<sub>1</sub>) 與新分離病毒抗原補體結合試驗的結果

病毒抗原 血清	滬蚊 1 株	滬蚊 2 株	滬蚊 3 株	滬蚊 4 株	滬蚊 5 株	京衛研 <sub>1</sub> 株
抗京衛研 <sub>1</sub> 免疫血清	1:16	1:8	1:16	1:16	1:32	1:32
正常豚鼠血清	—	—	—	—	—	—

2. 用已知的流乙腦炎病毒抗原 (京衛研<sub>1</sub>) 測定抗新分離病毒免疫血清: 用豚鼠腦內接種滬蚊 1, 2, 3 株病毒製成抗 1, 2, 3 株各免疫血清與京衛研<sub>1</sub> 株病毒的抗原作補體結合試驗, 結果有 1:16—1:64 的效價 (見表 4)。

表 4 已知流乙腦炎病毒抗原 (京衛研<sub>1</sub> 株) 與未知抗血清補體結合試驗的結果

抗血清 (豚鼠) 抗原	抗滬蚊 1 株	抗滬蚊 2 株	抗滬蚊 3 株	抗京衛研 <sub>1</sub> 株
京衛研 <sub>1</sub> 病毒抗原	1:32	1:64	1:16	1:32
正常鼠腦抗原	—	—	—	—

表 5 已知免疫血清 (抗京衛研<sub>1</sub>) 與新分離病毒中和試驗的結果

病毒株	組 別	LD <sub>50</sub> 效價	中和指數	結果判定
滬蚊 1 株	對 照 組	7.83	2,755	陽 性
	試 驗 組	4.39		
滬蚊 2 株	對 照 組	8	100	陽 性
	試 驗 組	6		
滬蚊 3 株	對 照 組	8	41,690	陽 性
	試 驗 組	3.38		
滬蚊 4 株	對 照 組	8.15	4,898	陽 性
	試 驗 組	4.46		
滬蚊 5 株	對 照 組	8.5	1,203	陽 性
	試 驗 組	5.42		

(五) 交互中和試驗：根據 Casals 氏法作中和試驗<sup>[13]</sup>及 Reed and Muench 氏法<sup>[14]</sup>計算中和指數。試驗結果如下：

1. 用已知的免疫血清(抗京衛研<sub>1</sub>株)測定新分離病毒,由試驗結果可以看出抗流乙免疫血清與新分離 5 株病毒都有中和作用(見表 5)。

2. 用新分離病毒製成的豚鼠免疫血清(只做抗滬蚊 2 株及滬蚊 3 株),及抗京衛研<sub>1</sub>免疫血清與已知流乙腦炎病毒(京衛研<sub>1</sub>株)及新分離病毒作交互中和試驗,結果均交互有中和作用(見表 6)。

表 6 滬蚊 2 株及滬蚊 3 株病毒及抗血清與京衛研<sub>1</sub>株病毒及抗血清交互中和試驗的結果

血 清	滬蚊 2 株 病 毒		滬蚊 3 株 病 毒		京 衛 研 <sub>1</sub> 株 病 毒	
	LD <sub>50</sub> 效價	中和指數	LD <sub>50</sub> 效價	中和指數	LD <sub>50</sub> 效價	中和指數
抗滬蚊 2 株免疫血清	5.49	32.26			4.22	1,413
抗滬蚊 3 株免疫血清			3.38	41,690	4.5	741.4
抗京衛研 <sub>1</sub> 株免疫血清	6	100	4.2	6,310		
正常豚鼠血清	8	—	8	—	7.37	—

根據以上試驗結果,我們推定 1955 年在上海市所採自然界尖音庫蚊淡色變種及三帶喙庫蚊分離出的 5 株病毒都是流行性乙型腦炎病毒。

## 討 論

從自然界捕蚊分離病毒常常不易獲得陽性結果,原因可能很多。據黃禎祥氏等的推論<sup>[5]</sup>將多數蚊蟲混合試驗,尤其在流行末期所採得蚊蟲或許有的吸了有免疫性的血液與帶病毒的蚊蟲混合,以致發生中和作用,可能是其中原因之一,因此主張須將所捕吸血蚊蟲先飼養一個時期,俟血液消化後再進行病毒分離。我們吸取了他們這種經驗,於 1954 年用同樣方法進行了 281 批 6,119 隻蚊蟲分離病毒;但因沒有重視其他因素,結果仍沒有獲得陽性結果。經過詳細檢查失敗的原因,可能是採蚊和飼蚊的方法不够妥當。首先從採蚊地點來看,雖然這是根據 1953 及 1954 年發生流乙腦炎的家屬及其周圍附近地區,但採蚊都是不能及時,即距離發病當時日期較久,很可能較難採得帶病毒的蚊子。

飼蚊方面過去由於地方和其他條件的限制,飼蚊不能經常保持一定的適宜溫度和濕度,即令捕有帶病毒的蚊子,也難使病毒在蚊體內營適當的繁殖,以增強其傳染可能性,這或許也是 1954 年蚊體分離病毒工作失敗原因之一。

1955 年針對着以上兩個缺點,在捕蚊方面採取重點地區設立捕蚊站,經常反覆多次進行採蚊的方法,在飼蚊方面也作了以上的改善。這樣就使得我們能在流行前期由

上述的兩個捕蚊站所採蚊中各分離出 2、3 株病毒。

由於以上的結果，我們深信飼蚊的溫度對於蚊體分離病毒的成敗是一個重要關鍵，而採蚊地點也很重要。上述兩個捕蚊站都是半郊區的牛房，一處是飼養有 53 頭牛的奶牛棚，一處是一農家僅養的 1 隻牛的牛欄，但其附近有另一農家飼養着許多小實驗動物（家兔、豚鼠和小白鼠等）。據南京、大連方面的研究，也都曾從牛房採蚊分離出流乙腦炎病毒，這和我們的研究成績很相一致。所以我們同意許多學者們認為家畜在流乙腦炎病毒的傳播上可能起着臨時宿主作用的說法。

我們所分離出病毒的帶毒蚊蟲都是集中在 7 月上旬和中旬，這正當本市流乙腦炎流行的前期，因據 1955 年上海市疑似腦炎病人血清補體結合試驗及腦組織病毒分離陽性例發病日期來看，前者開始流行為 7 月上旬，最高峯是 7 月下旬，而後者開始是 7 月中旬，最高峯也是 7 月下旬，這三方面可說大體是相一致的。其後在以上兩個捕蚊站自 7 月下旬到 8 月下旬，雖經多次捕蚊的檢驗，仍未能分離出病毒，這和三田村和北岡氏等的經驗，認為在腦炎流行開始之前或方臨開始時從自然界蚊蟲分離出病毒，較易獲得陽性結果是相一致的。

我們所分離出病毒的兩種蚊子，一種是三帶喙庫蚊，一種是尖音庫蚊淡色變種，這兩種也都是國內外學者在各流行地區較易獲得陽性結果的蚊種。相反的，白紋伊蚊雖也是上海常見的一種蚊蟲，但用同樣試驗方法採驗了 94 批 1,255 隻，並未分離出病毒，這可能在採捕時期和方法及飼養方面還存在一些問題，也或許這種蚊子不是本市流乙腦炎的主要媒介，這當然還不能貿然肯定。其餘蚊種如中華按蚊，騷擾阿蚊等雖未分離出病毒，因採驗得太少，更不能肯定它們是否本病的媒介，均有待於今後的研究。

## 結 論

1955 年 5—9 月採驗了本市自然界成蚊 351 批 6,444 隻，由其中 2 批尖音庫蚊淡色變種及 3 批三帶喙庫蚊共分離出病毒 5 株，經補體結合試驗、中和試驗及其他試驗鑑定此 5 株病毒都是流行性乙型腦炎病毒。

我們檢查了 1954 年所以沒有成功，而 1955 年能夠分離出病毒的原因，或許主要是由於採蚊和飼蚊方法的缺點得到了糾正。我們推論在流行前期固定在流行地區幾個多蚊的家畜欄舍反覆多次採蚊檢驗，可能是增加從蚊體分離病毒機會的方法。

## 參 考 文 獻

- [ 1 ] 三田村篤志郎、森和雄、北岡正見、天神智：東京醫事新誌，62：812，1938。
- [ 2 ] Petrisheva, P. A. and Schubladze, A. K.: *Arch. Dis. Sci. Biol.*, 54: 72, 1940.
- [ 3 ] Hammon, W. McD., Tiggerert, W. D., Sather, G., and Schenker, H.: *Amer. Jour. Hyg.*, 50: 51, 1949.
- [ 4 ] Sabin, A. B.: *Amer. J. Hyg.*, 51: 36, 1950.
- [ 5 ] 黃禎祥、鄧雲凱：中華醫學雜誌，37：4，1951。
- [ 6 ] 尹德銘、董國賢：1952年由瀋陽市自然界蚊蟲分離流行性乙型腦炎病毒，流行性乙型腦炎防治資料摘要彙編，中央人民政府衛生部衛生防疫司，1953。
- [ 7 ] 南京中央衛生研究院華東分院年報，1953。
- [ 8 ] 南京中央衛生研究院華東分院年報，1954。
- [ 9 ] 魏文彬、李 劫、張宗葆、孫 鐸：微生物學報，2：2，1954。
- [ 10 ] 黃禎祥、王逸民：中華醫學雜誌，37 (4)，1951。
- [ 11 ] Casals, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 70: 339, 1949.
- [ 12 ] Casals, J. and Olitsky, P. K.: *Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections*, P. 57, 1949.
- [ 13 ] Casals, J.: *J. Exp. Med.*, 79: 341, 1944.
- [ 14 ] Reed, L. J. and Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, 27: 495, 1938.

## ISOLATION OF JAPANESE TYPE B ENCEPHALITIS VIRUS FROM MOSQUITOES IN SHANGHAI

CHEN HEE-SHUN and LOO HSIAN-SING

*Laboratory of Hygienic and Anti-epidemic Station, Shanghai*

1. A total of 281 separate lots of mosquitoes were collected in Shanghai between April and October in 1954, and the isolation for virus by intracerebral inoculation on mice, failed to yield positive result.
2. From May to September in 1955, further experiments were made, and a total of 35 separate lots of mosquitoes were examined. During July two strains of virus were isolated from two lots of *Culex pipiens* var. *pallens* collected from a same cow-shed and three strains of virus were isolated from three lots of *Culex tritaeniorhynchus* collected from another cow-shed.
3. These five virus strains were all identified as Japanese B encephalitis virus by test for animal host range, complement fixation and neutralization tests.
4. It was concluded, that repeated collection of mosquitoes from some animal sheds, in which many mosquitoes may easily be found, in the epidemic district just before or during the early part of the epidemic, may yield better results for the isolation of Japanese type B encephalitis virus in its insect vectors.