

# 流行性乙型腦炎抗原重複 浸漬試驗初步結果

嚴詠楷 羅瑞仙

(中山醫學院微生物學教研組, 廣州市流行性乙型腦炎研究組)

補體結合試驗的應用於病毒性疾病的診斷上, 由於最近數年來在技術上的屢有改進而日見推廣。目前我國對於流行性乙型腦炎的血清免疫學診斷, 廣泛地採用補體結合試驗的方法, 並經宋氏<sup>[1]</sup>證明此反應在診斷上具有高度的特異性, 我們數年來在這一方面的工作亦獲得同樣的結果<sup>[2]</sup>。有關補體結合試驗所用的病毒抗原的製備, 汪<sup>[3]</sup>、吳<sup>[4]</sup>等氏曾按 Casals 氏醋酮乙醚浸漬法<sup>[5]</sup>加以改良, 從而解決製備過程中條件設備的困難以及提高抗原的敏感性。但是國內具有條件製備抗原的機構為數尚少, 對於腦炎抗原的供應尚感缺乏, 因此, 為便於腦炎的調查研究得以廣泛開展, 在不增加人力、物力、以及時間的基礎上, 來進行提高病毒抗原產量的研究更是有特殊意義, 有鑑於此, 我們曾按 Casals 氏<sup>[6]</sup>的方法, 將經醋酮乙醚處理過的病毒鼠腦組織, 重複用生理鹽水多次浸漬, 試驗增加抗原的產量, 結果尚覺滿意, 現將初步試驗結果報告如後。

## 材料及方法

1. 病毒: 採用 1952 年春由中國醫學科學院分給的京衛研<sub>1</sub> 株, 並經鼠腦繼續多次傳代者。
2. 小白鼠: 鼠齡為 3—4 週, 均在防蚊條件下自行飼養。
3. 醋酮及乙醚: 採自上海協心化學廠者, 並經再次重新加以蒸餾。
4. 免疫血清: 係用流行性乙型腦炎病毒京衛研<sub>1</sub> 株注射豚鼠腦內免疫 3 次後, 所獲得的高價免疫血清, 其製備方法詳於“流行性乙型腦炎的防治”一書中<sup>[7]</sup>。
5. 補體結合試驗: 採取 Casals 氏<sup>[7]</sup>微量法, 在試驗中所用的補體係以 10% 的雞蛋白鹽水稀釋。
6. 抗原製造: 按 Casals 氏醋酮乙醚浸漬法<sup>[5]</sup>。
  - (1) 以 10% 乙型腦炎京衛研<sub>1</sub> 株病毒懸液, 腦內注射 3—4 週齡的健康小白鼠數頭, 每鼠 0.03 毫升。
  - (2) 將發病垂死的小白鼠自心臟放血殺死, 用無菌法取出其腦並稱其重量。

(3) 將鼠腦移置於消毒的研體內,加入少量無菌細砂及醋酮,研碎,醋酮加入量為鼠腦重量的 15—20 倍。研磨後將腦組織懸液移入 250 毫升的沉澱瓶內。

(4) 將研碎的腦組織經每分鐘 1,500 轉遠心沉澱 1 分鐘,棄去上清液,再加入 15 至 20 倍腦重的醋酮,以軟木塞將瓶口塞好,放置室溫中 20 分鐘並不時加以振盪。

(5) 照上法遠心沉澱,棄去上清液,再加入 15—20 倍的醋酮與乙醚等量混合液。在室溫放置 20 分鐘,隨時加以振盪。

(6) 照上法遠心沉澱,棄去上清液,繼續照上法用乙醚將沉澱物洗滌 2 次。

(7) 於末次乙醚洗滌後,經 1,500 轉遠心沉澱 1 分鐘,即將上清液棄去,然後將沉渣以抽氣法使所含乙醚排除淨盡。此時沉渣將成纖細粉末狀。

(8) 取沉渣加入 3 倍腦重量的無菌生理食鹽水放置 4°C 中 1 夜,然後取出,經每分鐘 10,000 轉高速沉澱 1 小時,將上層液體取出,此即初次浸漬抗原。

(9) 將經高速沉澱後所剩餘的腦組織沉渣再次加入原 3 倍腦重的無菌生理食鹽水,經搖勻後擱置 4°C 中 1 夜,翌日取出重行高速遠心沉澱,所得上層清液即為第 2 次浸漬抗原,如是按同樣方法處理沉澱後的腦組織,製備第 3 次,第 4 次浸漬抗原。

(10) 同樣按上述方法製備正常鼠腦抗原以作對照之用。

(11) 所有製得的抗原均係保存在 -15°C 冰箱中,於試驗前經溶解後即可應用。

## 試 驗 結 果

於 1955 年 11 月間,我們曾應用上述方法,先後製得 3 批重複浸漬的流行性乙型腦炎病毒抗原。每 1 批次均經抗原抗補體的測定,抗原效價及敏感性的比較,以及抗原特異性的試驗,結果如下:

表 1 流行性乙型腦炎病毒鼠腦重複浸漬抗原抗補體的測定

實 驗 方 法	37°C 水浴中半小時 + 敏感血球 37°C 水浴半小時						先置 4°C 冰箱中 1 夜,然後在 37°C 水浴中半小時 + 敏感血球 37°C 水浴中半小時					
	1:60 補體 (毫升)						1:60 補體 (毫升)					
	0.05	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.05	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16
初次浸漬病毒抗原	—*	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—
初次浸漬正常鼠腦抗原	士	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—
第 2 次浸漬病毒抗原	士	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—
第 2 次浸漬正常鼠腦抗原	3	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—
第 3 次浸漬病毒抗原	2	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—
第 4 次浸漬病毒抗原	4	—	—	—	—	—	4	—	—	—	—	—
初次浸漬與第 2 次病毒浸 漬抗原的等量混合液	2	—	—	—	—	—	3	—	—	—	—	—

\* — 表示完全溶血; 1—3 表示不同程度的不溶血現象; 4 表示完全不溶血。

表 2 各種不同浸漬次數的抗原效價比較

乙型腦炎免疫血清	抗 原 種 類				血清對照	1:4 正常 鼠腦抗原
	初次浸漬乙型 腦炎病毒抗原	第 2 次浸漬乙型 腦炎病毒抗原	第 3 次浸漬乙型 腦炎病毒抗原	第 4 次浸漬乙型 腦炎病毒抗原		
	1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128	1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128	1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128	1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128		
1:4	4*	4	4	4	1:4	1:4 正常 鼠腦抗原
1:8	4	4	4	4	1:4	血清對照
1:16	4	4	4	4	1:4	
1:32	4	4	4	4	1:4	
1:64	4	4	4	4	1:4	
1:128	4	4	4	4	1:4	
血清對照	-	-	-	-	-	

表 3 不同浸漬次數抗原的敏感性測定

血清檢 驗 號	初次浸漬乙型腦炎病毒 抗原 + 血清稀釋倍數		血清對照		第 2 次浸漬乙型腦炎病 毒抗原 + 血清稀釋倍數		血清對照		初次浸漬正 常抗原 + 血 清		第 2 次浸漬 正常抗原 + 血清	
	1:2	1:4	1:4	1:8	1:2	1:4	1:4	1:8	1:4	1:8	1:4	1:8
	1:32	1:64	1:16	1:32	1:16	1:32	1:16	1:32	1:4	1:8	1:4	1:8
1002	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1004	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
京衛研 <sub>1</sub> 腦炎病毒豚鼠免 疫血清	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
京衛研 <sub>1</sub> 腦炎病毒鼠免疫 血清	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
京衛研 <sub>1</sub> 腦炎病毒兔血清 清 (豚鼠眼前房免疫)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
陰 性 血 清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* 見表 1 附註。

1. 抗原抗補體的測定：結果如表 1 所示，鼠腦組織經多次浸漬後，並無非特異性物質的浸出以致發生抗原抗補體現象。

2. 不同浸漬次數的抗原效價比較：在我們所製備的 3 批不同浸漬次數的抗原效價滴定比較中，第 2 次浸漬出的鼠腦病毒抗原，其效價與初次浸漬出者並無顯著差別，此點與 Casals<sup>[6]</sup> 報告者相互符合，但是鼠腦組織經第 3 次、第 4 次浸漬後所得的抗原，其滴度顯然遞減，結果如表 2，按同法各次重複浸出的正常鼠腦抗原與免疫血清滴定結果都呈陰性反應。

3. 重複浸漬抗原的敏感性測定：選用流行性乙型腦炎患者陽性血清 2 例，陰性血清 1 例，及以不同方法免疫動物所得的標準流行性乙型腦炎病毒京衛研 1 株免疫血清，分別與初次及第 2 次浸漬抗原同時進行補體結合試驗，結果如表 3。兩種抗原的敏感性並無差別，而兩例陽性血清，由於保存時間過長，血清稍有抗補體現象，而在兩種不同次數浸出的抗原，進行補體結合試驗，其結果均相互一致。

4. 抗原特殊性試驗：將初次浸漬及第 2 次浸漬的病毒抗原與檢驗梅毒血清反應剩餘的血清標本 85 份，作補體結合試驗，所得結果，23 例血清發生抗補體，3 例顯現不規則結果（見表 4），原因何在尚待進一步的探討，其餘血清均為陰性，另以正常豚鼠血清 3 份同時進行試驗，結果都為陰性。

表 4 華康氏反應的剩餘血清試驗

血清編號	初次浸漬抗原				第 2 次浸漬抗原								血清抗補體對照							
	乙型腦炎病毒抗原				正常鼠腦抗原				乙型腦炎病毒抗原								正常鼠腦抗原			
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16	1:2	1:4	1:8	1:16
K 34	2	±	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	4	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	4	4	4	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 討 論

流行性乙型腦炎在我國流行的歷史相當長久，分佈地區亦頗廣泛<sup>[8]</sup>。宋氏<sup>[1]</sup>用補體結合試驗檢驗患者血清，以鑑定流行性乙型腦炎病原，認為具有高度的特殊性。根據我們 3 年來有關這一方面的檢驗結果分析，亦證明補體結合試驗對流行性乙型腦炎的診斷確是具有相當高的特殊性，且方法簡便。凡具有華氏梅毒試驗條件的醫療機構，如獲得病毒抗原供應，便可進行，如能足量地供應各地乙型腦炎病毒抗原，則對於此病的調查研究工作更能得到廣泛開展。汪氏<sup>[3]</sup>在按 Casals 法浸漬抗原時以普通 3,000 轉沉澱代替高速遠心沉澱的步驟，從而初步解決在抗原製備上條件設備的困難。我們在重

複浸漬抗原結果的比較，當將病毒鼠腦組織經第 2 次浸漬出的抗原效價仍可應用，且無其他非特異性成分的出現，因此在抗原製備上可獲得多一倍的抗原產量，節省許多人力物力及時間，對於乙型腦炎研究工作的開展是具有一定的意義，希望有關製備抗原的單位參考試行並加指正。

## 摘 要

1. 按照 Casals 氏醋酮乙醚浸漬法製備乙型腦炎病毒抗原過程中，將病毒鼠腦組織重複以生理鹽水浸漬製作抗原。
2. 經第 2 次浸出的抗原與初次浸出者分別做補體結合試驗，結果在效價上無顯著的差別亦無抗補體的現象的發生。
3. 此種第 2 次浸出抗原，在抗原敏感性測定及抗原特異性的試驗，均初步證明可供實際補體結合試驗的應用。因而在不增加成本及複雜步驟條件下，可加倍抗原的產量供應。

註：本工作係在白施恩教授領導下進行。

## 參 考 文 獻

- [1] 宋幹等：中華醫學雜誌，38：1033—1037，1952。
- [2] 嚴詠楷、羅瑞仙、白施恩：廣東地區流行性乙型腦炎病原的初步探討。微生物學報 5 (3)：278—288，1957。
- [3] 汪美先等：微生物學報，1 (2)：191—195，1953。
- [4] 吳安然等：微生物學報，1 (2)：196—201，1953。
- [5] Casals, J. et al.; *J. Lab. Clin. Med.*, 37: 663—4, 1951.
- [6] Casals: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 70: 339, 1949.
- [7] 流行性乙型腦炎的防治，健康報社，1952。
- [8] 張乃初：個人通訊。

## THE EFFICIENCY OF SECOND-TIME EXTRACTED JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS ANTIGEN (CASAL'S ACETONE-ETHER EXTRACTED METHOD)

YEN YUNG-KAI and LO JUI-HSIAN

*Department of Microbiology, Chungshan Medical College*

For extensive survey to determine the distribution of Japanese B encephalitis infection, ample supply of specific complement fixation antigen is essential. For increasing its yield, to the acetone-ether extracted (after Casal's method) mouse-brain residue, three times the weight of the residue of physiological saline was added. The mixture was thoroughly shaken and left in ice-box at 4°C. overnight. It was then centrifuged at 10,000 r.p.m.; from the supernatant fluid the "second-time extracted" virus antigen was obtained. The latter has proved to be equally efficient when it was compared with the antigen prepared by the classical method. No anticomplementary properties were encountered. In this way, for more than one year, we have been able to double our antigen production with practically the same previous cost, and the products have been found to be highly satisfactory.