

在不同溫度時流行性乙型腦炎 病毒的穩定性

柳元元 周明先 李佩筠

(中國醫學科學院病毒學系)

過去的報告^[1-3]曾指出, 日本乙型腦炎病毒在 -70°C 、 -20° 到 -30°C 、 0°C 、 37°C 和 55°C 等環境中放置時, 病毒對小白鼠的感染力在前兩種環境中可以保持到一年, 在 0°C 的環境中大約可以保持到三星期, 而在最後兩種環境中則很快被滅活。但是關於在不同的溫度下病毒對小白鼠的感染效價(LD_{50} 滴度)的變動情況目前還缺乏實驗報告。

由於了解在不同的溫度下放置時流行性乙型腦炎病毒感染效價的變動情況, 在進行病毒學的研究和病毒感染的實驗診斷時具有重要的實用意義, 因此我們對一株國內分離的病毒進行了實驗和觀察。

實 驗 的 方 法

(一)病毒株: 流行性乙型腦炎京衛研₁株, 病毒的代數均在 38—44 代之間。

(二)病毒懸液的製備: 將受染的小白鼠腦組織用無菌手續取出, 分別用純脫脂牛奶和含 5% 乳糖的溶液^[4]製成 10% 的懸液(在少數試驗中同時用含 NaCl 0.85% 的生理鹽水製備病毒懸液, 各種稀釋液的 pH 在下面表中標明), 以 3000 轉/分沉澱 30 分鐘後, 將上清液吸出分裝小試管或乾燥管。

(三)病毒材料放置的溫度:

1. 裝病毒懸液的試管在用棉花和石蠟封口後放於下列環境:

- (1) 30°C 的水浴中(一般最高的室內溫度),
- (2) $2-4^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中(普通電冰箱的溫度),
- (3) -15°C 到 -18°C 的低溫冰箱中(普通電冰箱的結冰盒內可能達到的低溫)。

2. 在真空乾燥後分別放於 $2-4^{\circ}\text{C}$ 和 -15° 到 -18°C 的冰箱中。真空乾燥的方法如下: 將盛病毒懸液的乾燥管(每管盛 0.5 毫升)置於 -18°C 的酒精中冰凍。然後在壓力為 0.1—0.2 毫米的真空下乾燥 16 小時(在乾燥進行的前 6 小時內, 乾燥管的外部均浸在 -12°C 的食鹽冰水中), 乾燥後即用烈焰封口。以後每次啓封前均先用真空測定器測定其有無破損。開管後加入無菌蒸餾水到原量然後滴定(用乳糖溶液製備的病毒懸液乾燥

1957 年 8 月 2 日收到。

1) 根據 Hornibrook 1950 年^[4]所用的略加修改: 將 $\text{K}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.35 克, $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.45 克, K_2HPO_4 0.61 克, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.60 克, $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ 1.00 克, 乳糖 50 克依次溶解於 700 毫升的蒸餾水中; 另將 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.79 克溶解於 200 毫升蒸餾水中後再加入前一溶液中, 加入蒸餾水使總量達到 1000 毫升, 用 1N 的 NaOH 或乳酸調整 pH, 過濾除菌。

後很容易重新溶解)。

(四)病毒感效價的滴定：病毒材料在上述環境中放置時，每隔一定時間通過三週齡的小白鼠腦內接種，滴定其病毒的感效價，按照 Reed 和 Muench 的方法計算其 LD_{50} 滴度^[5]。

實 驗 的 結 果

在 30°C 的水浴中放置時，病毒的感效價迅速降低(表 1)；在純脫脂牛奶中病毒的 LD_{50} 滴度的對數平均每 24 小時約降低 1.3，在乳糖溶液中約降低 2.0，在生理鹽水中約降低 3.0，均表現直綫式的下降。

表 1 病毒懸液在 30°C 的水浴中放置時 LD_{50} 滴度的降低情況

稀 釋 液	稀釋液的 pH	試驗 次數		放 置 時 間 (小時)										
				0	4	22	28	46	48	52	72	76	96	120
純脫脂牛奶	7.1—7.2	3	平均 LD ₅₀ 滴度(對數)	7.6	7.6	6.6	6.3	5.4	5.1	4.0	4.0	3.3	2.3	1.2
			平均LD ₅₀ 滴度的降低*		0	1.0	1.3	2.2	2.5	3.6	3.6	4.3	5.3	6.4
乳 糖 溶 液	7.6—8.4	3	平均 LD ₅₀ 滴度(對數)	8.6	8.4	6.5	6.1	5.0	4.2	4.1	2.2	1.5	<0.5	
			平均LD ₅₀ 滴度的降低*		0.2	2.1	2.5	3.6	4.4	4.5	6.4	7.1	>8.1	
生 理 鹽 水	8.0	1	LD ₅₀ 滴度(對數)	8.0	—	5.2	4.0	2.4	1.8	<0.5				
			LD ₅₀ 滴度的降低*			2.8	4.0	5.6	6.2	>7.5				

* 平均 LD_{50} 滴度的降低即各時期實際和開始時的平均滴度的對數的差數。

在 $2-4^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中放置時，病毒的感效價降低較慢(表 2)；在保存 22 週以後在純脫脂牛奶中病毒的 LD_{50} 滴度平均仍有最初的 $1/1,000$ ，在同樣時間以後在乳糖溶液中病毒的 LD_{50} 滴度只有最初的 $1/100,000$ 。在放置 37 週以後這二種懸液中病毒的感染力都幾乎完全消失，在生理鹽水中病毒的 LD_{50} 滴度於放置 10 週時只有原來的 $1/1,000,000$ ，在 13 週後即完全滅活。

將病毒懸液冰凍保存於 -15°C 到 -18°C 的冰箱中，於放置一年後，在純脫脂牛奶中病毒的 LD_{50} 滴度平均仍有最初的 $1/1,000$ 以上，在乳糖溶液中為 $1/10,000$ (表 2)。

用乳糖溶液和純脫脂牛奶製備的病毒懸液經冰凍乾燥後放置在 -15°C 到 -18°C 的冰箱中，於將近二年後滴定其效價，結果前者的 LD_{50} 滴度無明顯的變動，後者略有降低。乾燥後放置在 $2-4^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中於一年後，病毒的 LD_{50} 滴度和放置在 -15°C 到 -18°C 的結果差別雖然不大，但是有一定的降低(表 2)。

試驗的結果還可以看出，用乳糖溶液或純脫脂牛奶從同一批病毒材料製備懸液，在初製成時前者比後者具有較高的滴度(表 3)。

討 論

試驗的結果闡明了在不同溫度環境時流行性乙型腦炎病毒的 LD_{50} 滴度的變動情況。

用乳糖溶液或純脫脂牛奶製備的病毒懸液在冰凍乾燥後放置於 -15°C 到 -18°C 的冰箱中，病毒的 LD_{50} 滴度在兩年內均無明顯的降低，如在 $2-4^{\circ}\text{C}$ 放置一年時， LD_{50} 滴度的降低也不大。因此，在病毒學的研究或進行某些血清學的實驗診斷(如中和試驗)時，

表 2 病毒材料在 2—4°C 及 -15—-18°C 的冰箱放置時 LD₅₀ 滴度的降低情況

病毒材料	放置的溫度	稀釋液	稀釋液的 pH	試驗次數		放置時間 (週)												
						0	1	3	4	7	10	16	22	37	47	52	95	
10% 的懸液	2—4°C	純脫脂牛奶	7.1—7.3	5	平均 LD ₅₀ 滴度 (對數) 平均 LD ₅₀ 滴度的降低*	7.2	6.5 0.7	5.2 2.0	5.2 2.0	5.2 2.0	4.9 2.3	4.5 2.7	4.0 3.2	<1.5 >5.7				
		乳脂液	7.6—8.4	5	平均 LD ₅₀ 滴度 (對數) 平均 LD ₅₀ 滴度的降低*	8.3	7.4 0.9	7.2 1.1	6.1 2.2	5.5 2.8	5.7 2.6	4.8 3.5	3.5 4.8	<1.0 >7.3				
		生理鹽水	8.0	1	LD ₅₀ 滴度 (對數) LD ₅₀ 滴度的降低*	8.0	6.6 1.4	4.6 3.4		3.8 4.2	2.7 5.3	0 8.0						
		純脫脂牛奶	7.1—7.3	5	平均 LD ₅₀ 滴度 (對數) 平均 LD ₅₀ 滴度的降低*	7.2	6.9 0.3	6.6 0.6	6.5 0.7	6.2 1.0	6.4 0.8	6.3 0.9	6.1 1.1	5.3 1.9		4.4 2.8		
10% 的懸液經冰凍乾燥	-15 — -18°C	乳脂液	7.6—8.4	5	平均 LD ₅₀ 滴度 (對數) 平均 LD ₅₀ 滴度的降低*	8.3	7.9 0.4		6.4 1.9	6.5 1.8	6.7 1.6	5.9 2.4	5.5 2.8	5.4 2.9		4.3 4.0		
		純脫脂牛奶	7.1	1	LD ₅₀ 滴度 (對數) LD ₅₀ 滴度的降低*	6.6					6.3 0.3		7.2 -0.6		6.3 0.3	6.2 0.4		
		乳脂液	8.4	1	LD ₅₀ 滴度 (對數) LD ₅₀ 滴度的降低*	8.1					7.8 0.3			8.5 -0.4		7.8 0.3	7.5 0.6	
		純脫脂牛奶	7.1—7.3	3	平均 LD ₅₀ 滴度 (對數) 平均 LD ₅₀ 滴度的降低*	7.3		7.2 0.1		7.4 -0.1	7.3 0			7.1 0.2		7.0 0.3	6.8 0.5	
	-15 — -18°C	乳脂液	7.6—8.4	3	平均 LD ₅₀ 滴度 (對數) 平均 LD ₅₀ 滴度的降低*	8.4		8.4 0		8.6 -0.2	8.4 0		8.3 0.1		8.4 0	8.4 0		

* 同表 1。

表 3 不同的稀釋液對病毒的 LD_{50} 滴度的影響

試 驗 批 次	純 脫 脂 牛 奶		乳 鹼 溶 液		生 理 鹽 水	
	pH	LD_{50} 效 價	pH	LD_{50} 效 價	pH	LD_{50} 效 價
1	7.2	7.6	7.6	8.8	8.0	8.0
2	7.1	7.4	8.4	8.2		
3	7.2	7.8	8.0	8.7		
4	7.3	7.5	7.6	8.2		
5	7.2	6.9	8.0	8.1	8.0	8.0
6	7.2	7.3	8.4	8.3		
7	7.1	6.6	8.4	8.2		
平 均		7.3		8.4		8.0

使用同一批冰凍乾燥的病毒材料除了可以簡化製備病毒材料的麻煩手續和易於掌握試驗的時間外,可能減少由於病毒材料的不同所引起的試驗誤差。

不經冰凍乾燥的病毒懸液在 30°C 水浴中或 $2-4^{\circ}\text{C}$ 和 -15° 到 -18°C 的冰箱中放置時,病毒的 LD_{50} 滴度均逐漸降低,降低的速度和放置的溫度成正比。稀釋劑和 LD_{50} 滴度的穩定性有一定的關係。從試驗的結果看出,病毒的滴度在生理鹽水中降低最快,在純脫脂牛奶和乳鹼溶液中則比較穩定得多,但是當溫度越高時,病毒在純脫脂牛奶中比較在乳鹼溶液中越穩定,這可能是由於脫脂牛奶中的大量蛋白質對病毒具有較好的保護作用。

在 30°C 時病毒平均滴度的降低和時間的關係幾成一直線,但是在 $2-4^{\circ}\text{C}$ 和 -15° 到 -18°C 時滴度的降低在前 6—7 星期最為明顯,在次一階段時比較穩定,在最後階段時又比較迅速地下降。

Duffy 和 Stanley 曾推薦^[6]用 pH 為 8.4 的含有 50% 正常兔血清的生理鹽水或同樣 pH 的純脫脂牛奶保存日本乙型腦炎病毒。我們在實驗中用不同 pH (7.6—8.4) 的乳鹼溶液為稀釋劑,結果所製備的病毒懸液在各種溫度下放置時, LD_{50} 效價的降低都沒有明顯的差別。

用乳鹼溶液製備的病毒懸液在初製成時即比純脫脂牛奶的懸液具有較高的感染效價,這可能是因為病毒在前一溶液中比較容易從組織中釋放,而在純脫脂牛奶中由於牛奶本身的膠體狀態,病毒從組織中的釋放程度便比較差。在生理鹽水中病毒也比較容易釋放,這可能是由於低的離子濃度的關係,但病毒在這種溶液中也容易被滅活。

摘 要

1. 用純脫脂牛奶或一種含有 5% 乳鹼的溶液製備的乙型腦炎病毒懸液在冰凍乾燥後放置在 -15° 到 -18°C 時,病毒的 LD_{50} 滴度在二年內沒有明顯的變動。

2. 在不冰凍乾燥的條件下,在不同溫度時,病毒在乳鹼溶液中比在生理鹽水中較為穩定得多,雖然稍遜於純脫脂牛奶。

3. 京衛研₁株乙型腦炎病毒對溫度的穩定性在 pH 為 7.6—8.4 的環境中,沒有明顯的差別。

參 考 文 獻

- [1] Melnick, J. L.: *J. Inf. Dis.*, **79**: 27, 1946.
- [2] Olitsky, P. K.: *J. Lab. & Clin. Med.*, **34**: 1023, 1949.
- [3] Endo, M.: *Jap. J. Exp. Med.*, **20**: 817, 1950.
- [4] Hornibrook, J. W.: *J. Lab. & Clin. Med.*, **35**: 788, 1950.
- [5] Reed, L. J. and Muench, H.: *Am. J. Hyg.*, **27**: 493, 1938.
- [6] Duffy, C. E. and Stanley, W. M.: *J. Exp. Med.*, **82**: 385, 1945.

THERMO-STABILITY OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

LIU YUAN-YUAN, CHOW MING-SIEN and LEE P'EI-CHUN

Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences

The thermo-stability of a strain of Japanese B encephalitis virus, isolated in Peking in 1949, was studied. It was observed that, when the infectious mouse brain tissue was made into a 10% suspension with skimmed milk or with a specially prepared lactose-salts solution and then freeze-dried under a pressure of 0.1—0.2 mm., both dried materials retained their infective titre almost unchanged after two years of storage at -15 — -18°C , and dropped only slightly when stored at 2 — 4°C for one year.

When the virus suspensions were kept at different temperatures, i.e., 30°C , 2 — 4°C and -15 — -18°C without being previously freeze-dried, less drop of infective titre was found with those kept at the lower temperature. Suspension prepared with skimmed milk was somewhat more stable when kept at those temperatures than that prepared with the lactose-salts solution, while that prepared with physiological saline was the least stable.

The pH of the lactose-salts solution ranging from 7.6 to 8.4 was found to have no influence on the stability of this virus strain.