

# 流行性乙型腦炎補體結合反應之改良

鄧 瑞 麟      周 汝 麟

(武漢醫學院微生物學教研組)

利用血清學反應診斷流行性乙型腦炎，最常用的方法為 Casals 氏微量補體結合反應<sup>[1-4]</sup>。此法在流行病學上有其一定價值，但對臨床方面幫助不大。Смородинцев 氏等<sup>[5]</sup>提出應用大量血清的方法，作補體結合反應，結果較微量法為敏感，檢出病例的陽性率也較高。但在實用上，欲抽取大量血液，尤以對兒童而言，尚有困難。因之欲求得一方法，能使反應更為敏感而又能較早地作出診斷，實有進一步研究的必要。

根據 Дробышевская 氏<sup>[6]</sup>的意見，將 Casals 氏微量補體結合反應方法加以改良，即應用一個確實單位的補體作補體結合反應，結果可較早地發現特異性抗體，因之可試用於作早期診斷。但作者未提及有無抗補體現象發生。本文作者即根據這個原則，感染動物後，定期測定其抗體之產生，以 Casals 氏法作為對照，用一個完全單位補體繼續試驗。又取臨床上診斷為腦炎病人之血清作同樣試驗，進行檢查，再以正常健康動物與武漢市健康人血清作對照試驗，希望能獲得一種簡易有效而可實用的改良方法。

方法簡述：本實驗基本上仍按 Casals 氏法操作，利用醋酮乙醚處理的流行性乙型腦炎病毒京衛研 2 株製備病毒抗原及正常鼠腦抗原並應用微量法。開始在動物試驗時，以三個不同的補體劑量（1、1.5 與 2 個確實單位，部分僅應用 1 及 2 個確實單位）比較其結果。以後因發現應用一個確實單位補體時，抗補體太多，乃改用一個完全單位，而以二個確實單位補體作比較。在病人方面則均應用二個不同的補體劑量（一個完全單位與二個確實單位）的補體進行試驗。大部試驗應用生理鹽水作為稀釋液，發現抗補體現象較多，乃以含有 10% 雞血清的生理鹽水<sup>[7]</sup>代替生理鹽水作稀釋液，結果抗補體現象即見減少。至於補體結合係於 4—10°C 下 18—20 小時，以後按規定加入敏感化的綿羊血球懸液（1%），混合後放入 37°C 水溫箱中半小時後觀察結果。

## 實 驗 結 果

### 1) 動物實驗感染腦炎病毒試驗：

病毒材料：小白鼠腦內接種流行性乙型腦炎鼠腦病毒懸液  $10^{-1}$  0.05 毫升，經 4 日左右發病而出現典型症狀者，以心臟放血法致死後，以無菌手續取出鼠腦，研磨後以 10% 脫脂牛乳製成  $10^{-1}$  懸液，先作無菌試驗，應用時經遠心沉澱後取上清液以感染動物。

實驗動物：係健康豚鼠，於感染前先測定體溫 1—2 日，倘屬正常，方進行感染，動物係選取體重約 450—550 克的豚鼠計 20 頭（個別動物重量超過 550 克），分成兩組，甲組

1957 年 9 月 11 日收到。

關於技術操作部分尚有吳文彬、徐惠堂、韋浩春同志等參加工作，特此致謝。

以上述病毒懸液注射腦內 0.15 毫升; 乙組則用 0.5 毫升作腹腔注射, 二組動物均僅注射 1 次, 以後每日測量體溫 1 次至 10 日, 同時在感染前二日及感染後 2、5、7、10、15、20、60 及 90 日各取血 1 次, 測定其中所含對流行性乙型腦炎病毒抗原的補體結合抗體, 今分述於下:

A) 甲組: 10 頭豚鼠中在進行試驗中有 2 頭死亡, 其中一頭 ( $I_4$ ) 於腦內感染病毒後 7 天, 體溫下降至  $38^{\circ}\text{C}$  以下, 至第 8 日死亡。另一頭 ( $I_7$ ) 於感染 4 天後體溫上升至  $40^{\circ}\text{C}$  以上, 連續維持至第 7 天稍下降, 至第 10 天又上升而動物死亡, 死亡原因不明。其他 8 頭動物, 其中一頭於感染後 10 天測量體溫有一度曾上升至  $40^{\circ}\text{C}$  以上, 以後恢復正常外, 餘者均按上述時間抽血, 進行試驗, 未能立即進行試驗之血清均加入疏柳汞 (0.01%), 保存於  $-40^{\circ}\text{C}$  冰箱內。作補體結合試驗時, 應用生理鹽水作稀釋液, 取出之血清則又分成二部, 一部分加溫  $56^{\circ}\text{C}$  滅活處理 30'; 另一份係以  $37^{\circ}\text{C}$  處理 24 小時, 以後分別應用三種不同補體劑量 (1、1.5 及 2 個確實單位) 進行補體結合試驗。結果動物於感染病毒前抽出之血清均為陰性或抗補體, 於感染後 20 日內抽血所得血清, 以  $56^{\circ}\text{C}$  處理半小時者, 其中僅一份血清 ( $I_9$ ) 於感染後 5 天在補體為 1 及 1.5 單位時已出現陽性反應, 而 2 單位則仍為陰性。餘者 7 份血清則應用三種不同劑量之補體均為陰性或為抗補體, 但於感染 20 日後方出現有明顯的陽性反應, 且對不同的補體劑量出現的陽性率亦不同。應用 2 個確實單位補體者, 結果僅有 1 份為陽性, 而應用 1 個或 1.5 確實單位補體者, 則出現陽性反應者有 6 份, 其反應效價為  $1/4-1/64$  (見表 1 及表 2)。

表 1 豚鼠  $I_9$  腦內感染流行性乙型腦炎病毒後血清中  
出現特異性補體結合抗體效價測定

補體單位 感染後日期 (日)	1	1.5	2
5	1/16	1/4	—
7	1/64	1/64	—
10	1/64	1/64	—
15	1/256	1/128	1/128
20	1/512	1/256	1/128
60	1/256	1/256	1/128
90	1/128	1/16	1/64

至於血清於  $37^{\circ}\text{C}$  下處理 24 小時者, 其中  $I_9$  於感染後 5 天應用補體 1 及 1.5 單位補體時仍出現陽性反應外 (效價  $1/64$ ), 餘者均須最早於感染 20 日方出現陽性反應。其中於補體為 1 單位時有三份血清出現陽性反應而補體為 1.5 單位時則僅有 1 份血清為陽性, 至於 2 單位補體時則均為陰性。

B) 乙組: 豚鼠 10 頭經腹腔注射腦炎病毒鼠腦懸液  $10^{-1}$  0.5 毫升, 其中一頭發現有妊娠未進行試驗外, 另一頭於感染後次日體溫即上升至  $40^{\circ}\text{C}$  以上, 以後維持至第 4 日下降, 至第 10 日死亡, 原因不明。餘 8 頭於感染前及感染後 10 天內每日測量體溫, 均屬正常, 乃於規定時間內抽血作同樣試驗。當血清經  $37^{\circ}\text{C}$  處理 24 小時所進行之補體結合反

應，僅於補體為 1 單位時有 4 份血清於感染後 20 日出現陽性反應，效價為  $1/32-1/64$ ；於 1.5 及 2 單位補體時則均為陰性。餘者在感染後 20 日內抽取之血液，對三種補體劑量均為陰性。以  $56^{\circ}\text{C}$  半小時處理之血清，其所作反應結果與甲組大體相似。在感染後 20 日內之血清對三種補體劑量均呈陰性或抗補體，而至感染後 20 日方出現有陽性反應。其中於補體為 2 單位者，僅有 1 份血清呈陽性反應（效價  $1/8$ ）；而應用補體 1 單位及 1.5 單位者有 5 份血清呈陽性反應（效價  $1/4-1/16$ ）（見表 2）。

表 2 豚鼠感染流行性乙型腦炎病毒後，補體結合抗體出現的最早時期

動物編號		I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	I <sub>9</sub>	I <sub>10</sub>	II <sub>1</sub>	II <sub>2</sub>	II <sub>3</sub>	II <sub>4</sub>	II <sub>5</sub>	II <sub>6</sub>	II <sub>7</sub>	II <sub>8</sub>	II <sub>9</sub>
感染途徑		腦 內 感 染										腹 腔 感 染								
陽性出現最早時間(日)		20	20	20	7	90	20	20	5	20	20	20	20	20	90	20	20	90	20	90
不同補體量的效價	1	$1/64$	$1/64$	$1/16$	—	$1/8$	$1/64$	$1/64$	$1/16$	$1/8$	$1/64$	$1/64$	$1/64$	抗	抗	$1/4$	抗	—	$1/16$	抗
	1.5	$1/8$	$1/16$	$1/8$	—	—	$1/8$	$1/4$	$1/4$	—	$1/8$	$1/8$	$1/16$	$1/16$	$1/4$	—	$1/4$	—	$1/8$	抗
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	$1/4$	—	—	$1/8$	抗	—	—	—	—	—
備 註					7 天死亡				後死								死亡			

與上述試驗操作同時，均以已知之陽性血清及陰性血清作對照，證明試驗所用之抗原與其他條件均合於規定。

另有 4 份血清，原係經流行性乙型腦炎免疫之豚鼠血清，放置時日較久，原來陽性補體結合反應者已均呈陰性反應，當利用 1 個完全單位補體作補體結合反應試驗時，其中有 1 份仍出現陽性反應，效價為  $1/4$ 。

## 2) 正常動物之血清學對照試驗：

為了試驗減少補體量進行補體結合反應是否能產生非特異性的陽性反應起見，另取正常動物包括豚鼠、雞及小白鼠等之血清，作與上相同之試驗。其中一部分雞（公雞）血清係用含有 10% 蛋清的生理鹽水作稀釋液進行者。於試驗開始時仍發現應用一個確實單位補體者，結果抗補體太多，乃採用 1 個完全單位補體，而以 2 個確實單位補體作為對照。在 47 份正常豚鼠血清試驗中，均以生理鹽水作稀釋液，於應用 2 個確實單位補體時發生抗補體者 16 份，陽性者 29 份，2 份為可疑陽性（效價  $1/2$ ）。當應用補體一個完全單位時，抗補體者 39 份，陰性者 5 份，可疑陽性者 2 份，陽性反應者 1 份（效價  $1/4$ ）。小白鼠及雞血清的反應結果見表 3。

3) 臨床上疑似流行性乙型腦炎病人血清之補體結合反應試驗：根據實驗動物試驗結果，將本試驗應用於臨床診斷腦炎，共計檢查血清 153 人份，同時以 2 個確實單位補體與一個完全單位補體作比較。其中 77 人份係用含有 10% 蛋清的生理鹽水作稀釋液進行者，餘者則均用生理鹽水作稀釋液。結果見表 4。

表 3 正常動物血清對二種不同補體量所作之補體結合反應結果

動物血清	應用稀釋液	補 體 結 合 反 應 結 果						總 數
		1 完 全 單 位 補 體			2 確 實 單 位 補 體			
		陰性	陽性與可疑陽性	抗補體	陰性	陽性與可疑陽性	抗補體	
正常豚鼠	生理鹽水	5	3† (1/4, 1/2, 1/2)	39	29	2 (1/2, 1/2)	16	47
正常小白鼠	生理鹽水	2	0	2	4	0	0	4
正常母雞	生理鹽水	1	0	16	16	0	1	17
正常公雞	含10%蛋清的生理鹽水	20	0	0	20	0	0	20

註：† 為陽性及可疑陽性反應 3 份，括號內表示其效價。

表 4 人血清以不同補體量及不同稀釋液作補體結合反應的結果

血 清	補體單位	稀 釋 液	補 體 結 合 反 應 結 果				總數	陽性反應率
			陽性	陰性	部分抗補體	抗補體		
病 人 血 清	1	生理鹽水	5	25	1	45	76	15.6%
		10%蛋白水	20	39	7	11	77	
	2	生理鹽水	2	72	0	2	76	5.2%
		10%蛋白水	6	68	0	3	77	
正 常 人 血 清	1	生理鹽水	1	7		46	54	2.2%
		10%蛋白水	3	98		25	126	
	2	生理鹽水	0	41		13	54	1.1%
		10%蛋白水	2	123		1	126	

註：\* 病毒抗原之補體結合效價與正常抗原及血清對照者不同，前者較後者高 2—4 倍不等，可能為陽性血清。

由表 4 可初步看出應用一個完全單位補體進行補體結合反應試驗時，其陽性率較應用兩個確實單位補體者大 3 倍；其陽性反應之效價亦較高，且出現陽性反應之時間亦較早；最早者有 5 例均於發病 3—5 天即呈陽性反應。而應用兩個確實單位補體時，則均為陰性；其中有一例病人於發病 4 天後呈現陽性補體結合反應，病人隨後死亡，由腦組織中已分離出腦炎病毒。在本實驗中有 14 份病例曾於病中不同時期抽血 2—3 次，進行試驗，結果若用一個完全單位補體作補體結合反應試驗，則此 14 份病例檢出於病後 11—38 天內均由陰性或抗補體轉為陽性反應。但若應用兩個確實單位補體時，則由陰性轉為陽性反應者僅為 4 例。本試驗中尚有許多抗補體及部分抗補體反應發生，尤以應用生理鹽水作試驗時出現抗補體較多，改用含有 10% 蛋清的生理鹽水後，則大形減少（見表 4）。

4) 為了試驗改良的補體結合反應方法在臨床診斷腦炎方面是否有非特異性的陽性反應發生起見，以健康輸血人血清 180 份以本實驗方法作對照試驗，其中有 126 份係應用含有 10% 蛋清的生理鹽水作為稀釋液進行試驗者。結果應用補體兩個確實單位者陰性反應有 164 份，抗補體 14 份，陽性者 2 份，其效價為 1/4 與 1/8；而引用補體一個完全單位時，陰性者 105 份，抗補體者 71 份（其中應用含有 10% 蛋清的生理鹽水作為稀釋液者，

抗補體現象即見減少)，陽性者 4 份，效價為 1/4，試驗中所用抗原及其他條件均符合規定。

## 討 論

Дробышевская 氏提出應用一個確實單位補體以代替 Casals 氏法的兩個確實單位補體，結果較佳，且能作早期診斷腦炎。但作者於實際應用時發現抗補體現象太多，不切實用，即使以含有 10% 蛋清的生理鹽水作為稀釋液以進行試驗，亦不能減少抗補體現象發生。最後採用一個完全單位補體，且以含有 10% 蛋清的生理鹽水作為稀釋液，初步解決了抗補體問題，而對試驗本身尚未發現有何顯著不利的影響。

以改良法試驗武漢市健康輸血者血清，試驗中發現陽性反應較應用 2 個確實單位補體者多 2 例。這是否由於應用補體量不足而引起之非特異性陽性反應，抑為隱性傳染<sup>[7,8]</sup>所致，尚須作進一步研究。

應用改良法出現有部分抗補體及抗補體現象，倘血清先以處理抗補體法處理後，有時出現陽性反應。本實驗因所取血清有限，未能均以處理抗補體法處理，故結果仍以抗補體或部分抗補體報告。

## 總 結

1) 根據初步試驗結果，作者認為用改良法作補體結合試驗檢查病人及免疫動物血清，所得陽性率較高，陽性反應出現時間亦較早，此法可試用於臨床檢查腦炎。

2) 用改良法檢查健康人及正常動物血清所得結果與 Casals 氏法結果相差無幾，故認為改良法所引起的非特異性陽性反應不高，為了作出正確結論，作者擬擴大試驗範圍，作更多和更全面的試驗。

3) 用 1 個完全單位補體之方法如用生理鹽水稀釋血清，抗補體現象較多，但可用含有 10% 新鮮蛋清的生理鹽水作稀釋液，即能減少抗補體現象。

## 參 考 文 獻

- [1] Casals, J. & Paracios, R.: *J. Exper. Med.*, **74**: 409, 1941.
- [2] Casals, J. & Olitsky, P. K.: The diagnosis of neurotropic virus infections, including the viral encephalitides, lymphocytic choriomeningitis & poliomyelitis. Diagnosis of viral & rickettsial infection. 1949.
- [3] Casals, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **70**: 339, 1949.
- [4] 流行性乙型腦炎的防治。
- [5] Ильенко, В. И.: К методике раннего обнаружения антигена в сыворотках животных и людей вирусных энцефалитах. Нейровирусные инфекции, 172, 1954.
- [6] Дробышевская, А. И.: Реакция связывания комплемента в диагностике японского энцефалита. Нейровирусные инфекции, 212, 1954.
- [7] Sabin A. B., Schlessinger R. W. & Ginder D. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **65**: 183, 1947.
- [8] Mitamura T.: *Jintendo Iji Kenkyu Zasshi*. No. 589, 1. 1943.