

流行性乙型腦炎腦外途徑的中和試驗

周明先 宋 幹 林毓純

(中國醫學科學院病毒系)

一般嗜神經性病毒的中和試驗均採用成年小白鼠腦內途徑注射的方法，其陽性結果的中和效價多半較低，尤其低效價的血清抗體常不易查出，陰性和陽性的界限往往不够明顯。在流行病學調查中弱陽性與可疑反應所佔的百分數亦較高^[1]。Lennette 及 Koprowski 二氏指出腦外途徑中和試驗的敏感度及特異性都比腦內途徑者高，但不少嗜神經性病毒對成年鼠腦外途徑不易感，只能用未斷奶的乳鼠做腦外途徑中和試驗^[2,3,4]，而用乳鼠作中和試驗時又必需連同有繁殖力的母鼠一齊使用，因之很不經濟，而且在使用乳鼠進行試驗期中經常發生乳鼠被母鼠殘食的現象，也會影響試驗的結果。過去認為乙型腦炎病毒對成年鼠腦外途徑感染不敏感，但在我們近年的研究中發現京衛研₁株病毒對 3 週齡小白鼠皮下感染有高度的致死力^[5]。本文報告用此株病毒進行了腦外途徑與腦內途徑中和試驗並在人羣不顯性感血清調查工作中作了少數的比較。

材 料 與 方 法

1. 病毒：採用流行性乙型腦病毒京衛研₁株^[6]。實驗前經小白鼠腦內傳代，俟發病後用新鮮鼠腦製備病毒懸液作試驗。
2. 稀釋劑：為 10% 脫脂牛乳生理鹽水。
3. 血清：
 - (1) 雞免疫血清：用中和反應陰性健康萊亨雞，皮下接種 10^{-1} 或 10^{-6} 病毒懸液 0.1 毫升，1 月後抽血，分離血清備用。
 - (2) 人血清：係採自國內某些城市正常居民。
 - (3) 對照血清：為中和反應陰性正常雞血清及兔血清，實驗前經 56°C 加溫 30 分鐘處理。
4. 動物：3 週齡小白鼠，體重 7—9 克。
5. 方法：中和試驗採用稀釋病毒法^[7]，各種途徑注射量每鼠均為 0.03 毫升。接種後觀察 3 週，每日紀錄死亡情況，試驗結果按 Reed 及 Muench 二氏法^[8]計算。

實 驗 結 果

1. 腦內、腹腔與皮下途徑中和試驗的比較：用同一份雞免疫血清做中和試驗，同時用 3 種不同途徑進行接種，結果見表 1。

從表 1 看出，3 種途徑的中和試驗中小白鼠的死亡均甚規律。腦內接種的潛伏期較

表 1 腦內、腹腔與皮下途徑中和試驗的比較用同一份雞免疫血清

	鼠 齡	體 重	接 種 量	接 種 途 徑	病 毒 稀 釋 度										LD ₅₀ 滴度	中 和 指 數
					10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹			
試驗組	3 週	7-9 克	0.03 毫升	腦內	—	—	5.5.5 ⁺ 5.5.	5.5.6 6.6	7.8.8 9.12	7.8.13 A.*A	A.A.A A.A	A.A.A A.A	—	6.16	218	
對照組	3 週	7-9 克	0.03 毫升	腦內	—	—	—	—	4.5.5 5.6	5.5.6 6.6	5.6.6 7.7	6.7.8 8.10	A.A.A A.A	8.50		
試驗組	3 週	7-9 克	0.03 毫升	腹腔	7.8.8 9.10	12.13.16 A.A	11.A.A A.A	A.A.A A.A	A.A.A A.A	A.A.A A.A	A.A.A A.A	—	—	2.38	181,100	
對照組	3 週	7-9 克	0.03 毫升	腹腔	—	—	—	—	7.9.11 11.12	8.10.10 14.16	5.8.13 17.A	18.A.A A.A	9.A.A A.A	7.64		
試驗組	3 週	7-9 克	0.03 毫升	皮下	7.8.8 10.A	7.A.A A.A	8.A.A A.A	A.A.A A.A	A.A.A A.A	A.A.A A.A	—	—	—	1.64	871,000	
對照組	3 週	7-9 克	0.03 毫升	皮下	—	—	—	8.8.10 10.11	8.11.11 11.14	8.9.11 12.17	10.13.14 A.A	12.A.A A.A	9.A.A A.A	7.58		

註 + 表內阿拉伯字表示動物由受注射到死亡的日數。

* “A”表示動物受注射後生活着直到 21 天觀察完畢。

短一般為 4—5 天，中和指數為 218；腹腔及皮下接種的潛伏期較長約在 7—14 天之間，腹腔接種途徑中和指數為 181,100，皮下接種途徑的中和指數為 871,000，為了進一步瞭解腦外接種途徑中和試驗的敏感性，我們又採用了不同滴度的 14 份雞免疫血清同時作腦內與皮下途徑的中和試驗；10 份正常雞血清同時作腦內與皮下途徑的中和試驗，結果見表 2。

表 2 腦內與皮下途徑中和試驗的比較用免疫雞血清及正常雞血清

免疫血清 號數	腦內中和試驗		皮下中和試驗		正常血清 號數	腦內中和試驗		皮下中和試驗	
	LD ₅₀ 滴度	中和指數	LD ₅₀ 滴度	中和指數		LD ₅₀ 滴度	中和指數	LD ₅₀ 滴度	中和指數
6	7.16	29	4.37	4890	1	8.50	1	8.00	2
7	4.20	19,900	<1.00	>1,000,000	2	8.50	1	7.70	4
9	6.00	316	2.64	10,000	3	8.16	2.7	8.24	1.1
10	4.62	9,550	1.50	13,810,000	4	8.33	2	7.50	6
11	5.90	399	3.50	13,800	5	8.30	2	8.10	1
12	7.64	4	5.33	934	63	8.62	<1	>7.50	<6
38	5.60	363	4.62	4,170	80	8.20	3	7.40	7
51	6.73	29	5.50	550	81	7.77	6	7.37	9
83	4.83	2,580	3.83	25,800	87	8.60	<1	8.3	<1
84	5.60	364	4.70	3,470	100	8.50	1	7.64	4.5
94	5.62	347	<3.00	>174,000	平均	8.37	2	7.78	4
95	7.16	7	6.16	121					
99	5.75	258	4.00	13,800					

從表 2 結果看出，皮下途徑的中和指數較腦內途徑的指數增高 10 倍以上，甚至達千倍。其中 12 及 95 號血清腦內途徑中和反應為陰性而皮下途徑為陽性；6 及 51 號血清腦內途徑中和反應為可疑而皮下途徑為陽性。在 10 份正常雞血清中，腦內途徑的滴度 LD₅₀ 在 8.16—8.62 之間，平均為 8.37，如以最高的一個 LD₅₀ 數為陰性對照來計算各份血清的

指數，一般均在 6 以下，平均為 2；皮下途徑的滴度 LD_{50} 在 7.37—8.3 之間，平均為 7.78，同樣計算其中和指數，均在 9 以下平均為 4。由上表的說明皮下途徑中和試驗是特異性的。

2. 應用在流行病學調查研究上：在流行區的正常人顯性感染調查中，我們用少數的血清作了腦內與腦外（腹腔及皮下）中和試驗的比較，結果見表 3。

從表 3 的結果看出，腹腔比腦內的中和指數高，同時亦可以看出皮下比腦內的中和指數有顯著的增高。

討 論

根據實驗的結果，初步認識腦外途徑的中和試驗在反應程度上顯然比腦內途徑要敏

表 3 腦內與皮下及腦內與腹腔途徑中和試驗的比較用流行區正常人血清

血清號	中 和 指 數		皮下/腦內
	腦 內	皮 下	
X—3	<5	<13	<2.6
X—16	62	1,260	20.3
X—29	81	1,350	16.6
X—33	724	7,590	10.5
X—35	81	3,310	40.8
X—39	27	251	9.3
X III—4	47	117	2.5
X III—10	347	427	1.2
X III—14	3800	18,620	4.9
XI—4	132	776	5.9
X V—5	100	5,015	50.2
X V—12	50	630	12.6
X V—19	12	50	4.5
X V—36	20	10,000	500.0
X V—48	100	19,950	199.5
X V—50	20	130	6.5
	腦 內	腹 腔	腹腔/腦內
X—11	794	1,000	1.3
X—17	3	15	5.0
X—21	794	10,000	12.6
X—23	63	158	2.5
X—49	50	>100	>2.0

感，尤其皮下途徑更顯著，同時腦外途徑中和試驗中陰性與陽性界限清楚，少有可疑。如果以反應程度表示靈敏度，那麼可以說皮下途徑的中和試驗為最好，對檢查血清中小量抗體提供了有利條件。近來我們在乙型腦炎不顯性感染的血清學調查中曾廣泛的採用 3 週齡小白鼠 7—9 克作皮下中和試驗並獲得了較為滿意的結果。

在少數正常雞血清及陰性人血清用腦內與皮下途徑作比較檢查的結果並無非特異性反應現象，進一步證明上述腦外中和試驗的優點。

過去在乙型腦炎研究中由於需用乳鼠未能大量及廣泛採用。從上面試驗結果表明，用京衛研₁株病毒接種體重一致（7—9 克）的 3 週齡鼠作中和試驗與採用乳鼠一樣有較高的敏感度和特異性。但必需指出用 3 週齡鼠時也有一定的體重（7—9 克）一致的限制，在大量使用動物時，動物選擇上也會有一定的困難。

嗜神經性病毒在進行神經外的中和試驗時，一方面可能由於機體內有非特異性的防禦機制（如體液內有不耐熱而能中和病毒的

物質以及體溫與血腦屏障等），因此使試管中未被中和的病毒受到破壞，而保護動物不至死亡，因此表現了比腦內中和試驗的效價高。另一方面也可能由於接種在不敏感的組織內，很小量的病毒不易繁殖，這些問題值得進一步探討的。

Lenette 氏^[8]曾討論了估價中和試驗結果的標準，認為腦外法能中和 25 LD_{50} 者可視為確定陽性；而腦內法則需中和 50—100 LD_{50} 病毒時始可認為陽性結果。根據我們的初步實驗，正常血清腦內途徑中和指數平均是 2，一般不超過 6；腦外中和指數平均是 4，

一般不超過9。由此可證明腦外途徑的中和試驗的特異性是肯定的。如按照一般腦內中和試驗結果的解釋方法中和指數1—9為陰性, 10—49為可疑, 50以上為陽性^[7], 上述實驗中正常血清腦內, 腦外途均為陰性。這一結果表明腦外途徑中和試驗結果的解釋亦可採用腦內法的標準。

摘 要

採用1株皮下致死力較高的毒株(京衛研), 實驗動物用3週齡小白鼠而體重需一致(7—9克)作皮下途徑的中和試驗, 結果較腦內途徑的中和試驗敏感。

此種方法適用於檢查抗體含量較少的血清, 例如檢查疫苗注射後的抗體滴度及用於不顯性感染調查研究。

參 考 文 獻

- [1] 朱幹、林毓純、周明先、鄭雲凱: 中國醫學科學院論文摘要, 2: 81, 1956.
- [2] Olitsky, P. K. and Hasford, C. Q., *J. Exp. Med.*, **49**: 173—189, 1938.
- [3] Lennette, E. H. and Koprowski, H., *J. Immu.*, **49**: 375—385, 1944.
- [4] Lennette, E. H. and Koprowski, H., *J. Immu.*, **49**: 175—191, 1944.
- [5] 黃禎祥、周明先: 微生物學報, **6**(1), 32, 1958.
- [6] 黃禎祥、王逸民: 中華醫學雜誌, **37**: 280, 1951.
- [7] 流行性乙型防治手冊, 人民衛生出版社, 1953.
- [8] Lennette, E. H. and Koprowski, H., *J. Immu.*, **52**: 343—353, 1946.

EXTRANEURAL NEUTRALIZATION TEST FOR JAPANESE B ENCEPHALITIS, USING THE PEKING STRAIN OF VIRUS

CHOW MING-SIEN, SUNG KAN and LIN YU-CHUN

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences)

Using a strain (Peking strain) of Japanese B encephalitis virus with high peripheral pathogenicity to albino mice, comparative studies of intracerebral, intraperitoneal and subcutaneous neutralization reactions in 3 weeks old mice were made with sera of different sources.

It was found that the indices of neutralization reactions by the intracerebral, intraperitoneal and subcutaneous routes with the same immune chicken serum were 218, 181,100 and 871,000 respectively, indicating the obviously greater sensitivity of the extraneural neutralization reactions.

In comparison with the neutralization reaction by the intracerebral and subcutaneous routes with 14 sera of chicken immunized with the different doses of the virus, there were 2 negative and 2 equivocal reactions by the intracerebral route while by the subcutaneous route all were positive. This indicates also the higher sensitivity of the extraneural neutralization reactions.

In the course of epidemiological survey of inapparent infections of Japanese B encephalitis, comparison of neutralization tests by the intracerebral and extraneural routes with a limited number of human sera also showed that the extraneural neutralization reactions are superior to the intracerebral one.

The finding of a high peripheral pathogenic strain of virus makes it possible to use freshly weaned mice (3 weeks old, about 7—9 gm in body weight) in the extraneural neutralization tests. This would avoid the difficulties frequently met with in the usual extraneural tests using young unweaned suckling mice, and this in turn allows its wide use in practice.