

流行性乙型脑炎病毒若干生物学性质研究*

李河民 俞永新

(卫生部生物制品检定所)

流行性乙型脑炎病毒的生物学性质曾经有很多学者作过试验^[1-8],但我们认为有必要在上述的材料的基础上,进一步研究乙型脑炎病毒的某一些生物学性质,以便掌握该病毒的试验方法与条件,以及与疫苗生产和检定有关的若干性质。现将试验内容及结果列述于下。

材料及方法

病毒 本试验所用的流行性乙型脑炎病毒株有 P₃、47、P₁、广谭等4株。P₁(京卫研1号)和 P₃株系1949年卫生研究院在北京分离,到本试验时, P₃已传递70余代, P₁传了40多代。47株系1945年在东北分离,1953年自苏联得到,我们使用时又传递了20代多。广谭株系1953年在广东分离的地方毒株,使用时已传递了35代多。

动物 本试验所用动物均系本所动物室自己繁殖饲养的,于试验前领取,在严格防蚊的试验室内进行试验观察。

病毒的传代滴定 病毒传代时将感染乙型脑炎病毒的鼠脑在带玻璃珠的三角瓶内研碎后,按每脑加4毫升2%灭能豚鼠血清林格氏液制成1:10悬液。然后稀释为1:100,经2,000转5分钟离心沉淀后,吸上清,经脑腔注射于10—14克小白鼠,每只0.03毫升。经3—4天发病时,将病鼠用乙醚杀死,用5%来苏尔浸泡5分钟。取脑后,将脑冰冻于-40℃低温冰箱内;并用0.5%葡萄糖肉汤浸洗作无菌试验,观察鼠脑无菌试验经过24小时后方取出使用。

病毒滴定时,将1:10悬液沉淀后,再作10倍递增稀释至10⁻⁸。选择适当稀释度病毒注射小鼠,每稀释度4—6只。成鼠脑腔注射量一般为0.03毫升,皮下、腹腔注射量为0.2毫升。乳鼠脑腔注射量为0.02毫升,皮下、腹腔与成鼠的剂量相同。注射后每日观察小鼠发病情况及死亡数目计14天或21天。按 Reed 和 Muench 氏方法计算50%致死量。

试验和结果

1. 病毒在小白鼠脑内增殖与时间的关系 为了解病毒在脑内增长趋势,将 P₃株病毒鼠脑悬液(1:100)以0.04毫升接种量经脑腔接种10—14克小鼠一批。每日观察小鼠的发病症状,并在注射后24、48、72、96、120小时各取鼠3只,将脑取出,制成不同稀释度的病毒悬液。用10—12克小鼠作病毒毒力滴定。该试验共作3次,其结果可见表1。可

* 1957年12月11日收到。

以提出，病毒接种后，經 96 小时，多数小白鼠均发生毛松，战慄現象；此时，病毒毒力达到高峯。120 小时后，小鼠已成为頻死状态，但病毒毒力未上昇，反而略有下降的趋势。

表 1 病毒(P₃株)在小白鼠脑內增殖与時間的关系

LD ₅₀ 試驗次別	接种后時間 狀	24 小 时	48 小 时	72 小 时	96 小 时	120 小 时
		无 症 状	无 症 状	不活跃， 行动弛緩	松毛，战慄痙攣	頻 死
第 一 次		10 ^{-3.50}	10 ^{-6.0}	10 ^{-7.5}	10 ^{-8.17}	10 ^{-8.0}
第 二 次		10 ^{-4.12}	10 ^{-6.29}	10 ^{-8.0}	10 ^{-8.0}	10 ^{-7.75}
第 三 次		10 ^{-4.83}	10 ^{-6.0}	10 ^{-8.0}	10 ^{-8.48}	10 ^{-8.55}
平 均		10 ^{-4.15}	10 ^{-6.09}	10 ^{-7.83}	10 ^{-8.22}	10 ^{-8.04}

2. 鼠龄、体重及接种途径、剂量与小白鼠对乙型脑炎病毒感受性的关系 动物和接种方法的选择，在乙型脑炎病毒特性的实验研究上具有重要的意义。在我们工作中只为了了解鼠龄、动物体重、接种途径及接种量对病毒毒力测定的影响，进行了以下三种试验。

(甲)不同鼠龄脑腔及腹腔接种病毒与小白鼠感受性的关系——将 P₃ 病毒分别用不同日龄小白鼠的脑腔及腹腔滴定毒力。所选用的小白鼠，經脑腔注射者分 15 天、30 天、60 天日龄三组，經腹腔注射分 15 天、20 天、30 天日龄三组，腹腔和脑腔注射组均用同一份病毒材料同时进行试验。试验共作 5 次。从表 2 可看出无论脑腔或腹腔感染，随着日龄的增长，小白鼠对病毒的敏感性下降，而腹腔感染比脑腔感染时更为显著。用 15 天日龄的乳鼠以脑腔和腹腔滴定病毒时，未发見其間的毒力有意义的差别。

表 2 不同鼠龄脑腔腹腔滴定毒力比較

LD ₅₀ 試驗次別	途 徑 鼠 齡	脑 腔			腹 腔		
		15 天	30 天	60 天	15 天	20 天	30 天
第 一 次		10 ^{-7.17}	10 ^{-6.58}	10 ^{-5.76}	—	—	—
第 二 次		10 ^{-8.0}	10 ^{-9.0}	10 ^{-7.71}	—	—	—
第 三 次		10 ^{-7.64}	10 ^{-7.5}	10 ^{-6.5}	10 ^{-7.8}	10 ^{-7.0}	10 ^{-2.45}
第 四 次		10 ^{-8.0}	10 ^{-7.5}	10 ^{-7.85}	≥10 ^{-9.3}	≥10 ^{-7.37}	<10 ^{-0.83}
第 五 次		10 ^{-8.25}	10 ^{-7.5}	—	10 ^{-7.79}	≥10 ^{-6.25}	≥10 ^{-9.65}
平 均		10 ^{-7.81}	10 ^{-7.42}	10 ^{-6.98}	10 ^{-7.96}	10 ^{-6.87}	10 ^{-3.21}

註：—表示未作試驗。

(乙)相同日龄、不同体重及相同体重、不同日龄小鼠腹腔、皮下接种病毒与小白鼠感受性的关系——为了进一步探討鼠龄及其体重影响动物感受性的程度如何，将 P₃ 株病毒分别用以下二组小鼠同时以腹腔及皮下注射法滴定之。两组小鼠分别为：(1) 日龄相同(26 及 29 天)，而体重不同(5—8 克、8.1—10 克、10.1—12 克)及(2) 体重相同(10—12 克)，日龄不同(22—24 天，25—28 天，29—31 天)者。皮下、腹腔注射量均为 0.2 毫升。注射后观察 21 天。试验中同时用 10—12 克小鼠經脑腔滴定以测知同一材料病毒的毒力。本试验共作 2 次，试验結果见表 3 和表 4。从此二表可看出，在相同日龄的条件下，皮下感

染时,体重小比体重大者对病毒较敏感;以同一体重,不同日龄的小白鼠皮下和腹腔滴定病毒时,日龄幼的比老的动物敏感性较高。

表3 相同日龄、不同体重小鼠腹腔及皮下毒力滴定比较

LD ₅₀ 次 别 日 龄		途 径 体 重 (克)	皮 下			腹 腔			脑 腔
			5—8	8.1—10	10.1—12	5—8	8.1—10	10.1—12	10—12
第 一 次	26		10 ^{-4.58}	10 ^{-5.0}	10 ^{-2.0}	—	—	—	10 ^{-7.33}
第 二 次	29		10 ^{-7.0}	10 ^{-5.88}	10 ^{-6.17}	10 ^{-7.0}	10 ^{-7.23}	10 ^{-7.0}	10 ^{-8.33}

表4 相同体重、不同日龄小鼠腹腔及皮下毒力滴定比较

LD ₅₀ 次 别 体 重 (克)		途 径 日 龄 (天)	皮 下			腹 腔			脑 腔
			22—24	25—28	29—31	22—24	25—28	29—31	(10—12 克)
第 一 次	10—12		10 ^{-5.2}	10 ^{-3.8}	10 ^{-4.5}	10 ^{-6.3}	10 ^{-5.5}	10 ^{-3.33}	10 ^{-3.17}
第 二 次	10—12		10 ^{-5.0}	10 ^{-4.67}	10 ^{-4.5}	10 ^{-5.0}	10 ^{-4.73}	10 ^{-3.33}	10 ^{-3.0}
平 均	10—12		10 ^{-5.10}	10 ^{-4.34}	10 ^{-4.50}	10 ^{-5.65}	10 ^{-5.11}	10 ^{-4.59}	10 ^{-3.08}

(丙)不同鼠龄、不同途径注射不同剂量病毒与小白鼠感受性的关系——选择皮下或腹腔注射感受性差异较大的小鼠两组(12—15日龄及28—30日龄)。每组按不同途径(皮下及腹腔)以不同剂量的病毒悬液(相差10倍)滴定之。本试验中共用皮下感染力强的P₁株及P₃株病毒各作一次,试验结果列于表5。

表5 不同鼠龄、不同途径、不同剂量毒力滴定比较

LD ₅₀ 毒 株		鼠 龄 途 径 剂 量 (毫升)	12—15 天				28—30 天			
			皮 下		腹 腔		皮 下		腹 腔	
			0.1	0.01	0.1	0.01	0.3	0.03	0.3	0.03
P ₁			10 ^{-8.75}	10 ^{-6.62}	10 ^{-8.5}	10 ^{-9.17}	10 ^{-5.14}	10 ^{-3.0}	10 ^{-5.71}	10 ^{-4.0}
P ₃			10 ^{-9.33}	10 ^{-7.48}	≥10 ^{-8.5}	10 ^{-7.67}	10 ^{-3.0}	10 ^{-2.75}	10 ^{-2.75}	10 ^{-3.77}

从表5可看出,无论在乳鼠或成鼠的皮下感染组内以大剂量注射比小剂量注射的病毒毒力显著的高。腹腔感染时,毒力的差异不明显或不规律。

3. 病毒的耐热性试验 将1:10病毒悬液离心沉淀后用50%豚鼠血清林格氏液按10倍递续稀释(如此稀释后每稀释度内所含血清量与中和试验时血清含量相同),每管病

毒悬液放置于 37℃ 水温箱加温。为使加温的条件尽可能一致，将病毒悬液分装于同一规格的小试管内，于一定时间的间隔，选择适当的病毒稀释度，脑腔滴定之。本试验共用 P_3 , P_1 , 47, 广谭 4 个毒株分二次进行，详细结果列于表 6。

表 6 病毒加温后不同时间毒力滴定

毒株 次 别 (LD ₅₀) 加温时间	P_3	P_1		47		广 谭
	# 1	# 1	# 2	# 1	# 2	# 2
未 加 热 前	10-7.67	10-8.0	10-8.5	10-8.9	10-7.67	10-8.33
1 小 时	10-7.67	10-7.75	—	10-8.9	—	—
2 小 时	—	—	10-7.77	—	10-8.0	10-7.66
2½ 小 时	10-7.60	10-7.5	—	10-8.9	—	—
5 小 时	10-8.67	10-8.67	—	≥10-6.5	—	—
17½ 小 时	10-4.55	10-3.83	—	10-6.67	—	—
20 小 时	—	—	10-3.67—10-6.67	—	10-5.25	10-4.67
24 小 时	10-3.5	10-2.77	—	10-4.33	—	—
26 小 时	—	—	10-3.33—10-4.33	—	10-6.33	10-3.33
41 小 时	0	0	—	10-9.67	—	—
47 小 时	0	0	—	0	—	—

从试验结果可见，病毒于加温 1 小时后，毒力无显著变化。到 24 小时，毒力随加温时间的增加而逐渐下降。到 41 小时，除 47 毒株尚有少量病毒存在外，其他毒株未能检出活毒的存在。从未加温至加温 24—26 小时后，各株毒力的对数指数的差别来看，47 为 3.67—3.34； P_1 为 5.23—4.17； P_3 为 4.17；广谭为 4.81。由此试验结果表明，各毒株之间耐热性略有差别而 47 株比其他毒株略高。在另一个工作中，我们反复试验又获得相似的结果。

4. 病毒抗福马林试验 本试验分二部进行：将 P_3 株病毒接种 12—14 克小鼠脑腔，俟其发病，采脑研磨，按每脑加入 4 毫升缓冲生理盐水 (pH7.8) 制成 1:10 悬液，加化学纯福马林溶液使其含量为 0.2% (该含量与现用脑炎疫苗原液内所含福马林量同)。置 4℃ 冰箱减毒，每日摇盪一次。于加福马林后 1、24 小时、5、8、13、15 天取出材料。为不使组织细块影响试验结果，将材料离心沉淀 2,000 转 5 分钟后，吸出上清，10 倍递续稀释。用 12—14 克小鼠及 15 天乳鼠 (4—6 克) 同时进行脑腔滴定，二组脑腔注射量均为 0.02 毫升。试验结果列于表 7。

表 7 病毒加福马林后不同时间毒力滴定

LD ₅₀ 加福马林后时间	体 重	12—14 克 小 鼠	4—6 克乳鼠(15天)
1 小 时		10-6.4	10-6.25
1 天		10-4.0	10-3.4
5 天		10-1.4	10-0.88
8 天		10-1.0	10-0.88
13 天		10-0.75	10-0.60
15 天		10-0.58	0

註：0 表示动物未发病或死亡。

另外按同法制造福馬林病毒悬液,每隔不同時間取出材料,不經沉淀即注射成鼠、乳鼠(日齡与体重同甲項)兩組。成鼠每只注射 0.04 毫升,乳鼠每只注射 0.02 毫升。注射后观察 14 天,計算結果,試驗結果列于表 8。

表 8 病毒加福馬林后不同時間活毒检查

次 別	生 死 鼠 數	滅 毒 時 間	6 天	8 天	9 天	10 天	12 天	13 天	14 天	15 天	16 天	20 天
第 一 次	成 鼠		3/5	—	3/8	—	—	0/4	—	—	0/4	0/5
	乳 鼠		1/5	—	2/8	—	—	1/5*	—	—	0/5	0/3
第 二 次	成 鼠		—	4/5	—	4/5	3/5	—	1/5	—	—	—
	乳 鼠		—	2/5	—	0/5	0/5	—	1/5*	—	—	—
第 三 次	成 鼠		—	—	4/8	—	—	0/4	—	1/5*	—	—
	乳 鼠		—	—	3/10	—	—	0/5	—	1/5*	—	—

* 小鼠未观察到由脑炎病状而死亡。

註 1) 分母表示注射鼠数。分子表示死亡鼠数。

2) —表示試驗未做。

如表 7 和表 8 所示,病毒經加入 0.2% 福馬林再放置 4℃ 后,毒力很快下降。但此后在較長時間內,不稀释的悬液仍能引起动物的脑炎症状,只在 15—20 天后才可完全灭活。从我們的試驗結果同时可看出,检查福馬林病毒悬液中无活毒存在,用 12—14 克成鼠不亚于乳鼠。

5. 病毒的“自家干扰現象”(auto-interference)試驗 为检查大量的灭活病毒在同时注射脑腔后是否有阻止小量的活毒繁殖的能力,将 P_3 株病毒作成 1:10 病毒脑悬液,加 0.2% 福馬林放 4—8℃ 冰箱 15 天。以后将病毒悬液注射小鼠脑腔以检查病毒是否已被灭活,然后用此材料进行病毒的自家干扰試驗。

将 P_3 新鮮鼠脑病毒作成 10^{-4} 病毒悬液。然后用上述經福馬林灭活的病毒脑悬液上清为稀释液,将新鮮病毒再作 10 倍連續稀释作为試驗組。同时用福馬林同样处理过的健康鼠脑悬液上清按同法稀释病毒作为对照。

将以上兩組不同稀释度病毒悬液用 10—12 克小鼠經脑腔及 3—5 天乳鼠皮下滴定。脑腔、皮下注射量每只 0.03 毫升。注射时先注射試驗組,后注射对照组。从結果来看,試驗組与对照組的病毒毒力沒有显著差异。

另外将 P_3 新鮮脑組織制备为 10^{-4} 病毒悬液,然后用上述經福馬林灭活的病毒悬液上清为稀释液将新鮮病毒 10 倍稀释为 10^{-5} 病毒作为試驗組。同时用福馬林同样处理过的健康鼠脑悬液上清按同法稀释病毒作为对照。将兩組 10^{-5} 病毒悬液,按 0.1 毫升注射 9 日鸡胚卵黄囊,放 37℃ 温箱培养。在注射后半小時、一天、二天、三天、四天各取二組活胚 3—4 个,取出胚胎,滴定毒力。滴定結果,兩者之間的毒力未发现有意义的差別。

因此似乎可說明經福馬林灭活的病毒在上述的情况下均不能表现出对微量活毒繁殖的阻抑作用。

討 論

小白鼠对乙型脑炎病毒的敏感性与小鼠的日龄及接种途径有密切关系。这一点我们的试验与 Lennette 和 Koprowski 等氏^[2]的试验基本上是一致的,但是从我们的试验中(表 3 和表 4)更可以看出相同日龄、不同体重或相同体重、不同日龄的小鼠对皮下、腹腔的感受性亦有不同。同时从我们的试验中亦可看出,皮下的注射剂量对小白鼠的发病有影响。因此,如果动物选择条件及注射剂量不一致则试验结果表现有很大出入。然而就是按上述几个条件完全一致的情况下,以小白鼠腹腔、皮下滴定病毒时,动物死亡仍有不规律,毒力表现也不稳定,可见动物的其他个体差异及外界环境对感受性亦有影响。因此,我们认为,用成鼠腹腔或皮下攻击法来进行疫苗效力的检定或病毒中和试验必须严格选择动物和控制试验条件,否则容易造成假阳性结果。

乙型脑炎病毒对热是不大稳定的。根据 Шубладзе^[9]氏乙型脑炎病毒在 37℃ 经两昼夜可使其灭活,这一点与我们的试验结果基本上是一致的。另外,从我们的试验中看出(表 6)不同毒株的耐热性略有差别,但耐热性与毒株对小白鼠的皮下感染力看不出有什么关系,皮下毒力高的是 P₁、P₃ 株(表 9),但其耐热性并不比皮下感染力低的 47 株强。这一点是与黄祯祥氏^[8]的结果不太一致。

表 9 不同毒株对小白鼠(10—12 克)皮下毒力比较

毒 力 注射途径	毒 株	P ₁	P ₃	47	广 岛	备 註
脑 腔		10 ^{-8.32}	10 ^{-8.40}	10 ^{-8.0}	10 ^{-8.23}	注射量 0.03 毫升
皮 下		≥10 ^{-5.0}	10 ^{-6.17}	≤10 ^{-0.75} ●	≤10 ^{-0.75}	同 上

結 論

1. 乙型脑炎病毒 P₃ 株经接种小白鼠脑内后,病毒随培养的时间而逐渐增殖,至第 4 天病毒的毒力达最高峰,此时小鼠出现毛松、战栗的病状。

2. 滴定病毒时,无论是经脑腔或经腹腔,小白鼠日龄愈小敏感性愈高。日龄相同、体重不同的小白鼠、皮下感染病毒以体重小者敏感;体重相同、日龄不同的小白鼠腹腔或皮下感染病毒以日龄小者为敏感。

3. 温度 37℃ 作用 1 小时对病毒无显著影响;作用 41—47 小时病毒完全丧失对小白鼠的致病力。

4. 病毒在 0.2% 福马林的 10% 鼠脑悬液内置 4℃ 后,毒力很快下降;至 15—20 天后才失去对小白鼠的致病力。

5. 经 0.2% 福马林灭活的病毒与小量活毒同时接种成鼠脑内,乳鼠皮下及鸡胚卵黄囊内时未发现前者对后者有阻抑作用。而为检查福马林鼠脑悬液内的活病毒 12—14 克小鼠的敏感性不亚于乳鼠。

参 考 文 献

- [1] Duffy, C. E. and Stanley, W. M.: *J. Exp. Med.* 82: 385, 1945.
[2] Lennette, E. H. and Koprowski, H.: *J. Immunol.* 49: 175, 1944.
[3] Шубладзе, А. К. и Ананьина, М. М.: ЖМЭИ 1943, (10) 11.
[4] McInick, J. L.: *J. Inf. disc.* 79: 27, 1946.
[5] Дробышевская, А. И. и В. Д. Неустроев: Нейровирусные инфекции 1954 г., 199 頁.
[6] 王逸民、柳元元、黃禎祥: 中华医学杂志, 33: 1066, 1953.
[7] 黃禎祥、周明先: 中央卫生研究院科学论文摘要 2: 68.
[8] 黃禎祥等: 中央卫生研究院科学论文摘要 2: 70.
[9] Шубладзе, А. К. и Гайдамович, С. Я.: Краткий курс практической вирусологии 1954 г., 235 頁.

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУСА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Ли Хэ-минь и Юй Юн-синь

В настоящей работе мы исследовали экспериментальные условия белых мышей для вируса японского энцефалита и его такие биологические свойства, как устойчивость к теплу и формалину и явление авто-интерференции.

В качестве вирусного материала использовали 4 штамма: P₃, P₁, 47 и СТ, особенно более детально изучали штамм P₃.

После заражения белых мышей штаммом P₃ в мозг титр вируса постепенно увеличивался и в 4-ый день достигал максимума, при этом у животных клинические симптомы появлялись в виде взъерошения шерсти, тремора и т. д., смерть животных наступала в 5-ый день, когда титр вируса показывал некоторое снижение.

Для внутримозгового или внутрибрюшного титрования вируса белые мыши тем моложе, чем чувствительнее. При подкожном заражении среди мышей одного и того же возраста, но разным весом, животные меньшим весом являлись более чувствительными; среди мышей разного возраста, но равным весом, животные меньшего возраста обладали высшей чувствительностью к данному вирусу.

Действие температуры 37°C в течение 1 часа практически не оказало влияние на вирус, но при удлинении времени нагревания инфекционность вируса постепенно снижалась и исчезала через 41—47 часов.

Добавление 0.2% формалина к 10% вирусодержащей суспензии при 4°C вызывало быстрое снижение титра вируса, который через 15—20 дней терял инфекционность для животных.

При исследовании активного вируса в формалинированной суспензии мыши весом 12—14 гр. не менее чувствительные, чем сосунки. Инактивированный формалином вирус не задерживал активность живого вируса размножаться у мышей и в развивающихся куриных эмбрионах при одновременном заражении.