

豆鼠对流行性乙型脑炎病毒和圣路易 脑炎病毒感受性的比較研究*

王言貴

(山西医学院微生物学教研组, 太原)

圣路易脑炎与流行性乙型脑炎(以下简称乙型脑炎), 在临床、传播媒介、流行季节和病毒性质上都很类似。在免疫血清学上虽有一定区别, 但对实验室常用的动物中, 主要只有小白鼠有高度的易感性, 而在易感程度、感受途径和症状上, 两者都没有显著区别。在免疫血清学方面, 不仅操作比较麻烦, 并且二者的抗原构造也有相似的部分, 出现某种程度的交叉反应。因此, 我们认为进一步寻找对这两型病毒在易感性上有区别的动物种, 对病毒生物学性质的研究以及实际应用都是必要的。

豆鼠(*Citellus mongolicus ramosus* Thomas)是普遍生, 栖于我国东北、内蒙古、河北、新疆等地的可冬眠的一种哺乳动物。它对各种病原体如鼠疫杆菌、结核杆菌、外耳(Weil)氏病钩端螺旋体、流行性及地方性斑疹伤寒立克次氏体、淋巴肉芽肿病毒以及流感病毒等都有很高的感受性。但对各型脑炎病毒的感受性, 文献上很少记载。小笠原氏^[1]虽曾报告过豆鼠对乙型脑炎病毒有感受性, 但其所用动物仅7只, 并且也没有进一步作深入的研究。我们曾于1951年作了有关这方面的初步实验, 发现豆鼠对乙型脑炎病毒的感受性与对圣路易脑炎病毒的感受性有显著的不同^[1]。后又继续研究, 兹将结果报告如下。

一、試驗材料及方法

(一) 試驗动物 豆鼠于捕获后, 在本教研组观察饲养半月以上, 体重250—400克, 不分雌雄。小白鼠在本教研组饲养, 体重12—15克。

(二) 病毒株 乙型脑炎病毒中山株、京卫研株及沈18A株; 圣路易脑炎病毒有Webster株。沈18A株是1950年由沈阳乙型脑炎死者的脑组织分离的, 圣路易脑炎病毒Webster株由北京卫生部生物制品检定所赠给, 其他各株都是从中国医学科学院病毒系得来, 并在本教研组经小白鼠脑多次接种。

(三) 試驗方法 初代接种豆鼠的材料, 是用pH 7.6肉汤制成的10%感染脑炎病毒的小白鼠脑悬液, 并经每分钟3,000转离心沉淀20分钟的上清液。脑内接种病毒悬液0.1毫升。鼻腔感染量为0.5毫升, 腹腔内和皮下接种量各为1.0毫升。同时将该病毒悬液接种于小白鼠脑内以测定其毒力。接种后注意饲养, 仔细观察动物的发病状态及死亡日期。待濒死或死亡后, 立刻将脑摘出, 按上法同样制成10%的脑悬液进行脑内传代。最后将传代所得的豆鼠脑病毒与标准的抗乙型脑炎病毒的家兔免疫血清进行中和试验。中和试验是按Olitsky和Casals^[2]二氏所描述的方法进行的。

若豆鼠在接种后, 经21天以上仔细观察, 还没有中枢神经系统症状时, 就取血作特异的补体结合试

* 本实验是作者在沈阳医学院微生物学教研组工作时完成的, 承景冠华主任校阅, 谨此志谢。

本文1962年10月11日收到。

1) 曾在1952年卫生部脑炎会议及沈阳微生物学会上作过介绍。

驗。补体結合所用的抗原系按 Casals^[3] 氏法制备,試驗操作按 Casals 微量法。

被接种的豆鼠,如初代不发病,則于接种后 6—7 天捕杀进行盲目传代,追察其感受性。每次接种所用的材料,都經過肉湯、血液琼脂斜面及肉渣培养基培养,証实并无細菌生长。

二、試驗 結果

(一) 豆鼠对乙型脑炎病毒的感受性

1. 豆鼠对脑內接种的感受性及脑內传代試驗: 本試驗所用病毒有 18A 株及中山株。豆鼠对这 2 株病毒都有高度的感受性, 18A 株通过豆鼠大脑連續传五代, 中山株則連續传 16 代, 每代用 3—5 只动物, 皆发病死亡, 无一幸免。一般豆鼠接受大脑接种后, 經 3—5 天的潛伏期 (很少在第 3 天, 大多数在接种后第 4、5 天) 发病。首先食欲不振, 立毛, 动作不活泼, 进而后肢先出現輕度麻痺, 身体失去均衡, 步行不圓滑, 有时只用前肢拖行, 繼之后肢完全麻痺不能起立, 不久前肢也出現同样症状。偶亦有痙攣、昏睡者, 但后肢麻痺則是經常出現的症状。另外, 常有流涎、軋齿、尿失禁等症, 故下腹部多湿潤。通常动物在发



图 1 接种乙型脑炎病后发病之豆鼠

表 1 乙型脑炎病毒在豆鼠脑內傳代后的滴度

病 毒 株	豆鼠传递 代数	豆鼠脑病毒的稀释度						LD ₅₀ 的对数值
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
18A 株 ¹⁾	3	4/4▲	4/4	3/4	2/4	1/4	0/4	7.00
中山株 ²⁾	1	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	8.33
”	3	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	7.67
”	6	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4	0/4	7.23
”	9	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	7.50
”	12	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	6.50
”	15	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	7.67

1) 初代豆鼠接种的病毒悬液是从人体分离后, 經小白鼠脑內传 16 代的材料, 对小白鼠的致病力 LD₅₀ 的对数值为 8.00。

2) 該毒株对小白鼠的致病力 LD₅₀ 的对数值为 7.67。

▲ 分母代表接种小白鼠只数, 分子代表小白鼠死亡只数。

病后 24—48 小时内死亡, 偶亦有持續 2—4 天而死的。发病时, 体温也常常随之升高, 可达 40℃, 持續約 1—2 天后則急剧下降, 甚至到正常体温以下而死。也有体温始終不显著升高, 而于发病末期急剧下降以至死亡的 (见图 1)。

为了观察病毒在豆鼠脑内传代后滴度的变化, 取 18A 株第 3 代和中山株第 1、3、6、9、12、15 代等各代发病豆鼠的脑制成悬液, 用小白鼠脑内法滴定其致病力, 以 LD₅₀ 表示之, 結果見表 1。

从表 1 可看出, 各株病毒虽經豆鼠脑内移植累代, 其毒力并无甚大变化。

最后將經豆鼠传代所得的各株病毒, 用 pH 7.6 的肉湯稀释, 每稀释度各加等量未稀释的家兔免疫血清, 放 37℃ 水浴中 2 小时, 然后給小白鼠脑内接种, 进行中和試驗。这两株病毒都被抗乙型脑炎病毒的家兔免疫血清中和, 而没有被正常家兔血清所中和, 故可知传代的病毒确为乙型脑炎病毒。

2. 不同接种途径与感受性: 將乙型脑炎病毒中山株和京卫研株, 按法作成 1:10 的悬液, 再用 pH 7.6 肉湯連續 10 倍稀释, 每稀释度經各种不同途径各接种 4 只豆鼠, 观察 21 天, 死亡时用 Reed、Muench 氏法計算 LD₅₀, 結果列于表 2。

从表 2 可看出, 豆鼠对乙型脑炎病毒無論是中山株或京卫研株, 由于接种的途径不同, 感受性的程度也不同, 脑内接种都有高度的感受性, 經鼻腔則次之, 腹内注射不易感

表 2 豆鼠經各种不同途径注射乙型脑炎病毒后的感受性

病毒株*	感染途径	感染量 (毫升)	病毒的稀释度									LD ₅₀ 的 对数值
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
中山株(第1次试验) ¹⁾	脑内	0.1	4/4▲	4/4	4/4†	4/4	4/4	4/4	4/4			27.50
中山株(第2次试验) ²⁾						4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	8.33
京卫研株 ³⁾						4/4△	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	6.67
中山株(第1次试验)	鼻腔	0.5	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	0/4				4.33
中山株(第2次试验)				4/4	4/4	3/4	1/4	0/4				4.50
京卫研株				4/4	2/4	3/4	1/4	0/4				4.16
中山株(第1次试验)	腹腔	1.0	0/3	0/3	0/3	0/3						—
中山株(第2次试验)			1/4	0/4	0/4	0/4						<0.67
中山株(第3次试验) ⁴⁾			0/4	0/4	0/4	0/4						—
京卫研株			0/4	0/4	0/4	0/4						—
中山株(第1次试验)	皮下	1.0	0/3	0/3	0/3							—
中山株(第2次试验)			0/4	0/4	0/4	0/3						—
中山株(第3次试验)			0/4	0/4	0/4	0/3						—
京卫研株			0/4	0/4	0/4							—

注: * 每株病毒各次試驗各感染途径均接种同一材料。
1) 該株对小白鼠 LD₅₀ 的对数值为 >7.66。
2) 該株对小白鼠 LD₅₀ 的对数值为 9.00。
3) 該株对小白鼠 LD₅₀ 的对数值为 7.50。
4) 該株对小白鼠 LD₅₀ 的对数值为 8.17。
▲ 分母表示接种豆鼠只数, 分子表示死亡豆鼠只数。
† 死亡豆鼠的混合脑悬液, 經中和試驗为阳性, 中和指数为 14.800。
△ 死亡豆鼠的混合脑悬液, 經中和試驗为阳性, 中和指数为 3.467。

受,皮下注射沒有发病的。

在用各株材料給豆鼠脑內接种的同时,以小白鼠作对比試驗,結果两种动物的感受性极近似(見表 3)。

表 3 小白鼠和豆鼠对乙型脑炎病毒脑內接种的感受性的比較

病 毒	接种动物	病 毒 的 稀 释 度									LD ₅₀ 的 对数值
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
中山株 (第 1 次試驗)	小 白 鼠					4/4▲	4/4	3/4	1/4	1/4	>7.66
	豆 鼠	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4			>7.50
中山株 (第 2 次試驗)	小 白 鼠					4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	>9.00
	豆 鼠				4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	8.33
京卫研株	小 白 鼠					4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	7.50
	豆 鼠				4/4	4/4	4/4	1/4	0/4	0/4	6.67

注: ▲分母表示接种动物只数,分子表示死亡只数。

3. 乙型脑炎病毒在豆鼠脑內的繁殖情况:以中山株小白鼠脑 1:10 的病毒悬液接种于豆鼠脑內,每隔 24 小时,无选择地取出 3 只豆鼠,摘出大脑,作成混合悬液,再用 pH 7.6 肉湯連續 10 倍稀释,每稀释度各注射于 4 只小白鼠脑中,以观察病毒在豆鼠脑中的逐日增殖情况。如图 2 所示,在接种后的最初两天,病毒的增殖量并不多,經 48 小时后則迅速上升,于发病初期即第 5 天达最高潮,而于死亡之前或后期,病毒含量似稍下降。乙型脑炎病毒在豆鼠脑內的这种增殖情况与在小白鼠脑內的增殖情形基本上是一致的。

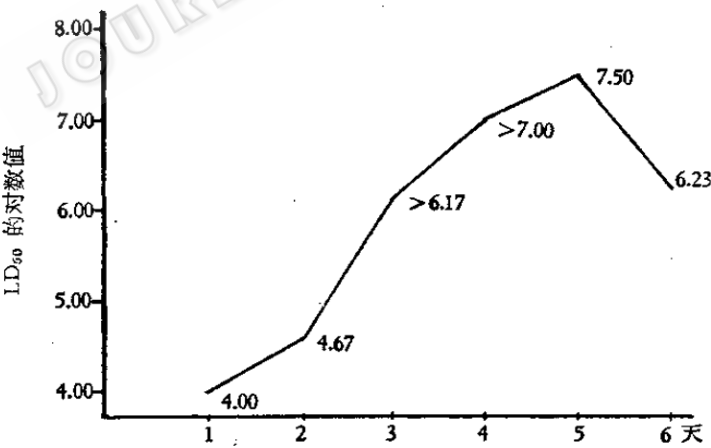


图 2 乙型脑炎病毒在豆鼠脑內的增殖曲線

(二) 豆鼠对圣路易脑炎病毒的感受性

1. 各种不同接种途径与感受性:按制备乙型脑炎病毒悬液的方法作成圣路易脑炎病毒1:10的悬液,經脑內、鼻腔、腹腔、皮下等不同途径各感染 4—6 只豆鼠。結果从表 4 可以看出,豆鼠对圣路易脑炎病毒有很高的抵抗力,所有被接种的动物,无论經任何途径,經 1 个月的观察,沒有 1 只有发病的症象。而該病毒对对照小白鼠的 LD₅₀ 的对数却为 8.17。

表 4 豆鼠对各种不同途径感染聖路易脑炎毒病的抵抗力

病 毒	株	量(毫升)	途 径	
圣路易脑炎病毒	Webster ^x	10 ⁻¹ 0.1	脑內	0/6 [▲]
”	”	10 ⁻¹ 0.5	鼻腔	0/4
”	”	10 ⁻¹ 1.0	腹腔	0/4
”	”	10 ⁻¹ 1.0	皮下	0/4

注：x 对小白鼠的致病力 LD₅₀ 的对数为 8.17。
▲ 分母表示接种豆鼠只数，分子表示豆鼠死亡只数。

2. 脑內传代試驗：从上述試驗看到豆鼠对圣路易脑炎病毒有高度的抵抗力，虽經大腦接种也未能使其感染，为了进一步加以証实，又追試了脑內传代試驗。另取 1 組豆鼠共 6 只，接种材料的制备、浓度、量等均与上述試驗相同。在大脑接种前 1 天，由心脏采血分离血清冰冻保存，备作补体結合試驗之用。接种后經 7 天的观察并无任何症状，于是捕杀 2 只，取出大脑作成悬液，給豆鼠和小白鼠各盲目地传了 3 代；其余 4 只繼續观察仍无变化，在第 25 天采血，与接种前采得的血清一同与圣路易脑炎病毒的交互冰冻融解抗原作特异的补体結合試驗。实验結果說明虽然使用的圣路易脑炎病毒的量很大，对小白鼠致病力 LD₅₀ 的对数为 8.23，但被接种的豆鼠却没有发病，盲目传代亦未能使其感染。并且經 1 代豆鼠用小白鼠繼代也同样沒有发病的。接种前及接种后第 25 天采血所作的补体結合試驗，結果也全呈阴性。

3. 小豆鼠脑內接种試驗：动物的感受性可随年龄的成长而有差异^[1]。如成年的大白鼠对乙型脑炎有抵抗力，而大白鼠的乳鼠經大腦接种則可发生典型传染。为了解这方面的关系，我們选择了 2 只幼齡豆鼠，体重分別为 60 克和 50 克，按法經大腦接种 1:10 的圣路易脑炎病毒悬液 0.07 毫升，虽經 3 周的观察，都健在无恙；而对照的小白鼠均于接种后 4—5 天发病死亡。

从上述的一些試驗可以明显地看出，豆鼠对圣路易脑炎病毒的感受性，与对乙型脑炎病毒不同，具有高度的抵抗力。

三、討論与結論

本文所述的实验結果，可以明显地看出，豆鼠对乙型脑炎病毒有高度的感受性。用中山株或本地流行的各乙型脑炎病毒株，反复試驗的結果均相一致，虽在脑內經久移殖累代，不但其毒力并未減低，而且其在脑內的繁殖程度和其对不同途径的传染性也与小白鼠相同。

許多作者都証明，乙型脑炎病毒和圣路易脑炎病毒极相近似，不仅对实验室常用动物小白鼠、猿等的致病力相同，应用地鼠类研究 B 組脑炎病毒者，Lennette^[5]氏以及 Schabel^[6]氏等都曾証明金黄地鼠（*Cricetus auratus*）对圣路易脑炎病毒和乙型脑炎病毒有同样高度易感性；张氏等^[7]也曾发现中国地鼠（*Cricetulus griseus*）虽对苏联春夏脑炎病毒和西方馬脑炎病毒有高度敏感性，而对乙型脑炎病毒及圣路易脑炎病毒的感受性則是同样都有很強的抵抗力。但从我們的实验中，清楚的証明了乙型脑炎病毒对豆鼠的致病作用和圣路易脑炎病毒完全不同，发现豆鼠对乙型脑炎病毒有高度的感受性而对圣路易脑炎病

毒却有抵抗力,虽曾反复试验和盲目传代,經任何途径都未能引起传染。因此,豆鼠不仅可作为研究乙型脑炎病毒的实验动物,并可利用其感受性来区分乙型脑炎病毒与圣路易脑炎病毒。

参 考 文 献

- [1] 小笠原一夫:医学ト生物学, 1:179, 1942.
- [2] Olitsky, P. K., Casals, J.: *J. A. M. A.*, **134**: 1224, 1947.
- [3] Casals, J.: *J. Immunol.*, **56**: 337, 1947.
- [4] Аробышевская: *Новости медицины*, **38**: 63, 1953.
- [5] Lennette, E. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **47**: 178, 1941.
- [6] Schabel, F. M., *J. Infect. Dis.*, **88**: 32, 1951.
- [7] 张乃初等:中华医学杂志, **9**: 648, 1953.

COMPARATIVE STUDIES ON THE SUSCEPTIBILITY OF GROUND SQUIRRELS (*CITELLUS MONGOLICUS RAMOSUS* THOMAS) TO ST. LOUIS AND JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUSES

WANG YEN-KUEI

(Department of Bacteriology, Shanshi Medical College, Taiyuan)

The ground squirrel was found to be highly susceptible to the intracerebral infection with the Japanese B encephalitis virus (J.B.E.V.) and approximated to that of the mouse. Comparative titration of virus (Nakayama and Peking strains) in both animals gave LD₅₀ titers which were practically identical.

The Nakayama strain was carried through 16 generations and 18 A strain of J.B.E.V. had been passaged serially through 5 generations in the ground squirrel by intracerebral passage. No change in the virulence of the virus for mice was found to occur as the result of such passages.

With the St. Louis encephalitis virus, repeated attempts were also made to infect the ground squirrel by several routes, but the results were uniformly negative.

The possibility of using infected ground squirrel as differentiation for the Japanese B and St. Louis viruses is suggested.