

冬眠豆鼠对流行性乙型脑炎病毒 实验传染的影响

王言贵

(山西医学院微生物学教研组,太原)

近来文献上有不少关于冬眠对节足动物传递性脑炎病毒传染方面的报告。La Motte^[1]曾将流行性乙型脑炎病毒(以下简称乙型脑炎病毒)给蝙蝠皮下接种,虽经107天的长期冬眠,未能在血液中找到病毒,到醒后第二天便出现了病毒血症。Thomas^[2]等也发现,蛇在冬眠时,虽感染了西方马脑炎病毒,在血液循环中找不到病毒,觉醒后,病毒在血液中可达 $10^{6.3}$ LD₅₀。Corristan^[3]等在用委内瑞拉马脑脊髓炎病毒的实验中,也看到了类似的现象。最近, Nosek^[4]等又报告了皮下感染森林脑炎病毒的蝙蝠,在冬眠的第七天以后才能在其血液、脑组织、肝脏中发现病毒。这些实验的结果,充分说明了冬眠对脑炎病毒的传染过程病毒血症的出现是有影响的。但是冬眠对病毒的致死性传染过程的影响研究尚少。本文利用对乙型脑炎病毒有高度感受性的豆鼠(*Citellus mongolicus ramosus* Thomas)^[5],在冬眠状态下进行了有关这方面的初步研究,现将所观察到的结果报告如下。

材料和方法

实验动物 豆鼠,是在夏秋两季从近郊捕获的。实验前曾在实验室饲养两个月以上,选其健康、体重300克左右者,不分雌雄。小白鼠,选10—12克的用来滴定病毒的滴度。

病毒株 实验用的乙型脑炎病毒是中国医学科学院病毒系赠给的中山株,并在教研组内经小白鼠脑多次接种。

冬眠方法 将豆鼠独自分别地放在大的玻璃缸(高2市尺,直径1.2市尺)内,缸内下面垫一层厚的锯末和薄草,然后将其置于安静而较黑暗的冬眠室内。冬眠室内用自动温度描划计测量温度的动摇情况,室内温度保持于 $4 \pm 1^\circ\text{C}$;相对湿度为50%。冬眠期间不特殊给水和食物,只给一根胡萝卜,以便了解冬眠中饮食情况。整个实验过程中,每天检查两次确定其冬眠情况。豆鼠冬眠时的特有体态,如图1所示:眼睑紧闭、呼吸极徐缓、躯体向腹部弯曲呈圆团状。对一般的外界刺激无反应。

实验方法 选熟眠10天左右之豆鼠,为了不影响冬眠,注意保持其特有的冬眠体态,在冬眠室内进行脑内接种病毒悬液各0.1毫升。每个豆鼠接种不超过两分钟。实验反复作了3次:第1次实验接种的病毒悬液(用pH 7.6肉汤制成的10%感染乙型脑炎病毒的小白鼠脑悬液,并经3,000转/每分钟离心沉淀20分钟的上清液)的滴度为9.00(每0.03毫升对小白鼠脑LD₅₀的对数值,下同),第2次实验接种的病毒悬液滴度为8.67,第3次实验用的病毒悬液滴度为7.50。每次实验于豆鼠接种后,分别在10、20、30、50天以内及50天以上等不同时期从冬眠室内取出:一部移入室温(18—23°C)使其觉醒继

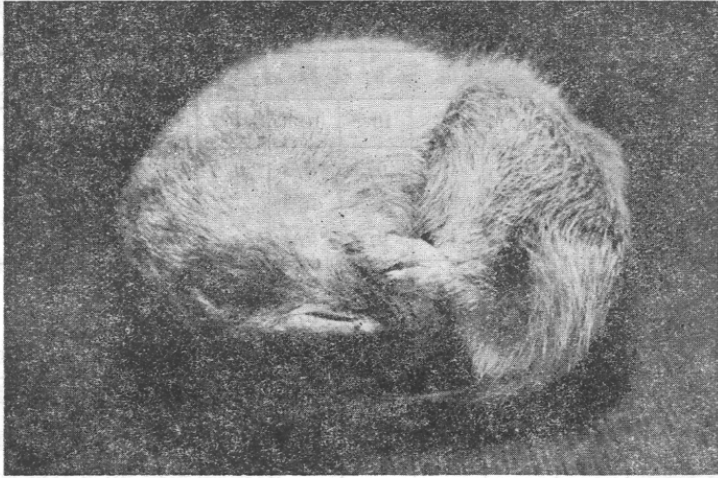


图1 冬眠的豆鼠

续观察,待其发病死后剖检,取脑和肝、脾等脏器滴定病毒的含量;一部立即剖检,取脑和上述各脏器滴定病毒的滴度进行比较。每次实验所用的病毒悬液,在给冬眠豆鼠接种的同时,分别按同法、同剂量、同途径各接种 4 只健康未冬眠的豆鼠,放室温观察以作对照。

豆鼠脑内病毒的滴定按常规方法,取鼠脑权重,用 pH 7.6 肉汤连续 10 倍稀释,每个稀释度接种小白鼠 3 只,每鼠 0.03 毫升脑内注射,观察 14 天,以 Reed-Muench 氏法计算 LD_{50} 滴度。

中和试验按常规方法进行。

实 验 结 果

每次实验中的室温对照未冬眠各组豆鼠,均经 5—6 天的潜伏期,全部呈典型症状死亡。

实验各组豆鼠,除个别豆鼠因接种而觉醒死亡的弃去不统计外,全部呈特有的冬眠体态,在整个冬眠期中无任何临床症状。

为了解乙型脑炎病毒在冬眠豆鼠脑内的繁殖动态,接种病毒后经不同的冬眠期间进行剖检滴定病毒。实验结果证明,在整个冬眠期短的 7 天长的达 44 天的过程中,脑内病毒的滴度最高的是冬眠 8 天的 22 号鼠为 3.25 (对小白鼠脑 LD_{50} 的对数值。以下滴度都用此表示),最低的滴度为 2.37 (冬眠 25 天的 44 号鼠);每次实验中最高和最低的滴度各为 3.00、2.50; 3.25、2.75; 2.75、2.37; 冬眠 10、20、30 以及 50 天以内的各鼠平均滴度各为 2.83、2.83、2.79 和 2.58 (见表 1)。

由此看来,不同冬眠日期的各鼠脑内病毒滴度或各组平均滴度间都没有发现有意义的差距,并与健康未冬眠豆鼠经脑内接种病毒后的滴度相似。这表明病毒滴度在冬眠豆鼠脑内既没有随冬眠日数的增加而上升或减少,而是维持在一定的水平。

为观察传染豆鼠冬眠觉醒后的变化,接种病毒后经不同冬眠期移入室温使其觉醒,待发病致死立即剖检滴定病毒。

从表 2 可见,豆鼠冬眠觉醒后的存活日数与冬眠期的长短似无关系,不管冬眠期长或短,觉醒后均经一个较短的时期,最多不超过 3 天(多为 1—2 天)虽无明显可见的症状,但皆死亡。死亡豆鼠脑内病毒滴度高的达 8.25 (冬眠 8 天和 24 天的 24、19 号两鼠),最低

表 1 感染豆鼠经不同冬眠期后脑内病毒的滴度

实验次别	动物 编 号	冬眠期间 (天)	冬眠豆鼠脑的稀释度						LD ₅₀ 的 对数值	平均值	肝	脾
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶				
1	4	7	3/3 [▲]	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	2.75	2.83	0/3	0/3
2	22	8	3/3	2/3	2/3	1/3	0/3	0/3	3.25		0/3	0/3
3	35	9	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	2.50		0/3	0/3
1	6	16	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3		2.75	2.83	0/3	0/3
2	23	17	3/3	2/3	2/3	0/3	0/3		3.00		—	—
3	42	19	3/3	2/3	1/3	1/3	0/3		2.75		0/3	0/3
1	12	20	3/3	2/3	2/3	0/3	0/3		3.00	2.79	0/3	0/3
2	20	24	3/3	2/3	2/3	0/3	0/3		3.00		0/3	0/3
3	44	25	3/3	1/3	1/3	1/3	0/3		2.37		0/3	0/3
1	9	34	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3		2.50	2.58	—	—
2	28	39	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3		2.75		0/3	0/3
3	41	44	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3		2.50		0/3	0/3

▲ 分母表示接种小白鼠只数,分子表示死亡小白鼠只数。
“—” 未检。

表 2 感染豆鼠经不同冬眠期觉醒后病死豆鼠的脑内病毒滴度

实验次别	动物 编 号	冬眠期间 (天)	觉醒后 存活日 期(天)	豆鼠脑的稀释度						LD ₅₀ 的 对数值	平均值	肝	脾
				10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹				
1	5	7	2	3/3 [▲]	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	7.75	7.66	—	—
2	24	8	1	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	8.25		0/3	0/3
3	40	9	3	3/3	3/3	2/3	2/3	0/3	0/3	7.00		0/3	1/3
1	13	17	1	3/3	3/3	2/3	2/3	1/3	0/3	7.25	7.25	0/3	0/3
2	25	16	2	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	7.75		0/3	0/3
3	43	18	3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	6.75		0/3	0/3
1	8	22	2	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	7.25	7.33	0/3	0/3
2	19	24	1	3/3 ^①	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	8.25		0/3	0/3
3	36	26	2	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3	0/3	6.50		—	—
1	7	34	2	3/3	3/3	3/3	1/3	1/3	0/3	7.00	7.00	0/3	0/3
2	21	35	2	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	7.75		—	—
3	39	45	2	3/3 ^②	3/3	2/3	0/3	0/3		6.25		0/3	0/3
1	10	59	2	3/3 ^③	3/3	1/3	1/3	1/3	0/3	6.37		0/3	0/3

▲ 分母表示接种小白鼠只数,分子表示死亡小白鼠只数。

①②③ 死亡小白鼠的混合脑悬液,经中和试验为阳性,中和指数各为 2754、323.6、1950。
“—” 未检。

的是冬眠 45 天的 39 号鼠其滴度为 6.25。冬眠 10 天以内觉醒致死各鼠的平均滴度为 7.66; 20 天以内的为 7.25; 30 天以内的是 7.33; 冬眠 50 天以内各鼠平均滴度为 7.00; 冬眠日期最长的 10 号鼠的脑内病毒滴度为 6.37。看来,这些滴度都和健康未冬眠的豆鼠传染乙型肝炎病毒致死脑内病毒滴度相近。这表明,病毒能在冬眠觉醒的豆鼠脑内迅速繁殖,最

多经2—3天即可达到致死滴度。

为了解冬眠觉醒致死豆鼠是否为乙型脑炎病毒传染致死的，曾用 19、39、10 号各豆鼠脑致死的小白鼠脑混合悬液和标准的抗乙型脑炎病毒的家兔免疫血清进行中和试验，结果都为阳性（中和指数各为 2754、323.6、1950）。

从实验中可以看出，乙型脑炎病毒在豆鼠脑内的增殖可受冬眠的影响，但与冬眠日期的长短关系不大（见图 2）。即在豆鼠冬眠期中，病毒在其脑内只维持在低的水平，冬眠觉醒后则急剧上升，虽经长短不同的冬眠期，病毒上升的滴度均在 4.00 个对数单位以上。

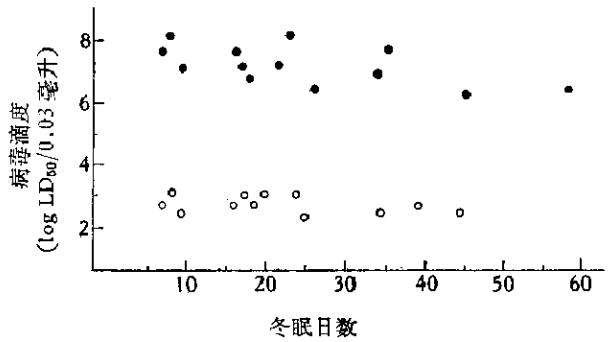


图 2 冬眠中剖检和冬眠觉醒后病死各豆鼠脑内病毒滴度与冬眠日数的关系

○冬眠中剖检豆鼠 ●冬眠觉醒后病死豆鼠

表 1、2 的结果表明，无论从冬眠期中以及从冬眠觉醒后病死的各豆鼠肝、脾脏中，都没有发现病毒。

讨 论

有关冬眠对乙型脑炎病毒引起的传染过程的研究，文献上很少报导。La Motte 证明，皮下接种病毒可阻抑蝙蝠的隐性传染——乙型脑炎病毒血症的出现。但觉醒后病毒血症的出现时间、血中病毒的滴度，都和未冬眠蝙蝠的传染过程相一致。

本实验中，豆鼠在冬眠时，虽经脑内感染了致死量病毒，约经两个月的观察并没有一例发病。病毒在此时，于我们检查的范围内并没有发现其向其他脏器转移，只存于注射的局部，其滴度保持在较低水平（平均滴度在 3.00 以下）。觉醒后则与健康未冬眠豆鼠的传染过程稍不同，进行的极为迅速，仅在 1、2 天内少数的在第 3 天全部死亡，病毒在此时剧增，其滴度平均在 7.00 以上。此点与 La Motte 氏的观察稍不同。

本实验所用的豆鼠与 La Motte 氏所用之蝙蝠不同，对乙型脑炎病毒有高度的感受性，另外，接种途径也不相同，这可能是与其所得结果不同的原因之一。

从本实验中也可看出，经不同冬眠期觉醒后病死豆鼠脑内的病毒平均滴度，随冬眠日数的增加稍有下降；同次和非同次实验中的个别豆鼠之间（冬眠 7 天和 59 天以及冬眠 8 天和 45 天的豆鼠）的病毒滴度也有一定的差距。这种趋势或差距是否会随冬眠日数的再度增加而继续加大，有待进一步的研究。

总 结

冬眠可阻抑乙型脑炎病毒引起的显性传染过程的进行。豆鼠在冬眠时，虽经脑内接种致死量病毒，在 59 天的观察中无一例发病死亡，而对照豆鼠经 5—6 天的潜伏期全部死亡。

冬眠觉醒后，传染过程进展极为迅速，不论冬眠期长短，所有豆鼠都经一短的潜伏期（1—3 天）死亡。

病毒在豆鼠冬眠期中,只潛存于注射的局部,滴度并不增加但觉醒后则急剧增殖。

参 考 文 献

- [1] La Motte, L. C.: *Amer. J. Hyg.*, 67:101, 1958.
 [2] Thomas, L. A. and Eklund, C. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105:52, 1960.
 [3] Corrigan, E. C., La Motte, L. C. and Smith, D. G.: *Fed. Proc.*, 15:584, 1955.
 [4] Nosek, J., Gresikova, M., Rehacek, J.: *Acta Virol.*, 5:112, 1961.
 [5] 王言贵: *微生物学报*, 9:261, 1963.

EFFECT OF HIBERNATION ON THE COURSE OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS INFECTION IN GROUND SQUIRRELS

WANG YEN-KUEI

(Department of Bacteriology, Shansi Medical College, Taiyuan)

These experiments reported were carried out during winter with hibernating ground squirrels, *Citellus mongolicus ramosus* Thomas.

Lethal doses of Japanese B encephalitis virus (Nakayama strain) were inoculated into the brain of soundly torpid squirrels and observed during and after hibernation.

The results were as follows:

1) None of the squirrels exhibited signs of illness and no death could be attributable to the virus infection during 59 days of hibernation.

2) The virus was only found in the brain of individual hibernated squirrels from the seventh up to the 44th day, the LD₅₀ titers (in mice per 0.03 ml intracerebrally) of the virus varied between 10^{-2.37} and 10^{-3.25}. In the liver or spleen, no virus was isolated.

3) After the squirrels were brought to room temperature from the cold cabinet on the seventh up to 59th day respectively, all those waking squirrels succumbed after one to three days. Japanese B encephalitis virus was isolated from the brain of these squirrels and LD₅₀ reached value of 10^{-6.25} to 10^{-8.25}. No virus was isolated from the liver and spleen.