

改進流行性乙型腦炎醋酮乙醚 浸漬抗原之初步研究

吳安然 朱錫華 劉鳳亭 馬連提

(中國協和醫學院細菌科)

一. 前 言

根據本科 1950 年應用苯浸抗原和 1952 年應用醋酮乙醚浸漬抗原作流行性乙型腦炎補體結合試驗之結果^[1]，及 1952 年度全國範圍內應用本科製備的醋酮乙醚浸漬抗原的總結^[2]，發現前者顯較後者為敏感。茲為避免因抗原不夠敏感致使某些陽性反應不能出現，原擬對於這兩種抗原作一系統的比較。唯苯浸法須用低溫真空冷凍乾燥器，而此項設備本院尚未購置，只得致力於提高 Casals 氏醋酮乙醚浸漬抗原法^[3]的敏感度。據 Craigie 氏^[4]的意見 0.004 M 枸橼酸鹼性磷酸鈉緩衝液 pH 7.2 用來作病毒的稀釋液時，不易使病毒產生自家凝集現象，或許可因此而提高抗原的敏感度。於是就比較一下用生理鹽水和用 0.004 M 枸橼酸鹼性磷酸鈉緩衝液浸出的兩種方法。

為了提高抗原的敏感度，我們也曾考慮到如在用鹽水浸出病毒期間，能不斷的振盪以增加浸出液與腦組織接觸的機會，則當能游離出更多的病毒而提高抗原的效價。1952 年度為全國製備抗原時，即考慮到此點，唯當時正在製備中途不便輕意更改，同時更重要的是不了解正常鼠腦組織，經振盪後是否有非特異性的物質被浸出，是以本項試驗延至今年始着手進行。

二. 材料及方法

1. 病毒株：中山株於 1949 年由國外攜回，並曾在本科通過鼠腦繼續傳代多次者。

2. 小白鼠：本院喂養，年齡為 3—4 週，經由顱腔感染 (10^{-1})，劑量為 0.03 毫升，接種後第四天死亡，在臨死前用乙醚麻醉放出心血，取出鼠腦，先在 -15°C

冰箱保存 24—48 小時，腦組織經冰凍後，攪拌時便於磨碎。

3. 醋酮及乙醚：採用北京新華化學試劑研究所出品，經本科試用結果頗好。
4. 0.004M 枸橼酸鹼性磷酸鈉緩衝液(以後簡稱 0.004M 枸橼酸緩衝液) pH7.2。

成份：	0.2M	鹼性磷酸鈉	17.39 毫升
	0.1M	枸橼酸	2.61 毫升
		蒸餾水	45.25 毫升
		總計	65.25 毫升

配製 0.2M 鹼性磷酸鈉時，應先將該鹽置於烤箱中(100°C，不超過 105°C)烤 12 小時除結晶水，否則配製結果 pH 不易準確，須再校正，頗費手續。

5. 補體結合試驗：應用 Casals 氏^[5]的小量法，此法自 1949 年起即在本科使用，結果認為滿意。

6. 免疫血清：按 Hammon 氏^[6]的方法，用荷蘭豬經顱腔免疫注射三次後所獲得之高價免疫血清。

7. 製備抗原的方法：根據 Casals 氏的方法製備了八種抗原。但在最後一步即 Casals 氏用生理鹽水浸漬曾用醋酮乙醚提煉過的乾燥腦組織那一步，我們代之以 0.004M 枸橼酸緩衝液。浸漬時並加以振盪，振盪的時間是 20 小時，溫度為 4°C。下面是我們所製成的抗原：

流乙抗原 5301 (簡稱流 5301)：生理鹽水浸出，不振盪。

流乙抗原 5302 (簡稱流 5302)：生理鹽水浸出，振盪 20 小時。

流乙抗原 5303 (簡稱流 5303)：0.004M 枸橼酸緩衝液浸出，不振盪。

流乙抗原 5304 (簡稱流 5304)：0.004M 枸橼酸緩衝液浸出，振盪 20 小時。

正常腦組織抗原 5301 (簡稱正 5301)：生理鹽水浸出，不振盪。

正常腦組織抗原 5302 (簡稱正 5302)：生理鹽水浸出，振盪 20 小時。

正常腦組織抗原 5303 (簡稱正 5303)：0.004M 枸橼酸緩衝液浸出，不振盪。

正常腦組織抗原 5304 (簡稱正 5304)：0.00M 枸橼酸緩衝液浸出，振盪 20 小時。

三. 試驗及結果

1. 抗原效價的比較：將製就之八種抗原與流行性乙型腦炎病毒的免疫血清作抗原滴定結果如下：

表1 各種不同抗原效價的比較

抗原種類 抗原稀釋液 血清對照	流 5301 (生理鹽水浸出抗原, 不振盪)						流 5302 (生理鹽水浸出抗原, 振盪)						流 5303 (0.004M 枸橼酸緩衝液 浸出抗原, 不振盪)						流 5304 (0.004M 枸橼酸緩衝液 浸出抗原, 振盪)										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
1:2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1:4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1:8	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1:16	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1:32	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1:64	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1:128	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
1:256	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
抗原對照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

四個正常腦組織抗原（正 5301, 5302, 5303, 5304）與免疫血清滴定結果均無滴度。

由上表可以看出流 5304 抗原即 0.004M 枸橼酸緩衝液 pH7.2 浸出，在 4°C 振盪 20 小時者，其滴度顯然較高。

2. 特異性試驗：用以上八種抗原與本科血清室作梅毒血清反應剩餘血清標本 167 份，其中瓦氏反應 1:4 以上者 52 份，瓦氏反應 1:2 者 14 份，瓦氏反應陰性標本 101 份，作補體結合試驗，所得結果如下：

表 2 52 份瓦氏反應 1:4 以上血清的結果
(內 46 份與所有的抗原均為陰性反應)

血清編號	流 乙 抗 原				正 常 抗 原				血清對照	瓦氏反應
	5301	5302	5303	5304	5301	5302	5303	5304		
9190	30	20	10	—	—	—	—	—	—	1:36
8390	20	—	—	—	—	—	—	—	—	1:12
9222	30	20	10	—	—	—	—	—	—	1:4
7869	30	—	—	—	—	—	—	—	—	1:12
9174	40	20	20	—	—	—	—	—	—	1:12
9089	20	—	—	—	—	—	—	—	—	1:4

表 3 瓦氏反應陰性血清結果
(共 101 份，內 98 份與所有的抗原均為陰性反應)

血清編號	流 乙 抗 原				正 常 抗 原				血清對照
	5301	5302	5303	5304	5301	5302	5303	5304	
8445	—	31	—	4±	—	—	—	—	—
9377	—	30	—	—	—	—	—	—	—
8505	—	30	—	20	—	—	—	—	—

結果之解釋：

完全溶血……0。

不完全溶血……按程度分爲 3, 2, 1, ±, 四等。

完全不溶血……4。

血清稀釋自 1 : 4 開始, 每一份血清只作兩個稀釋度即 1 : 4 和 1 : 8。

14 份瓦氏反應 1 : 2 的血清均爲陰性。由上可看出用 0.004M 枸櫞酸緩衝液製備的抗原經振盪後其非特異性至少不比其他的方法高。

四. 討 論

爲了提高醋酐乙醚浸漬法製成抗原的敏感度, 我們用 0.004M 枸櫞酸緩衝液 (pH7.2) 來代替普通生理鹽水浸出抗原, 並用振盪法代替普通浸出法, 以增加腦組織與浸液接觸的機會。比較四種不同方法製就之抗原, 可以看出以普通不振盪方法浸出時, 生理鹽水與 0.004M 枸櫞酸緩衝液無甚差別, 而振盪所產生的效果, 在用生理鹽水浸出時, 不如用 0.004M 枸櫞酸緩衝液浸出時其差別顯著。由此可看出振盪是有其效果的。至於 0.004 M 枸櫞酸緩衝液本身的效用却很不顯著, 而與振盪配合後却有顯著的差別, 此理現尙不明瞭, 當再重覆此類試驗以資證明。

由表 2 和表 3 說明 167 份血清中有 9 份血清滴度達 1 : 4, 內有 6 份是瓦氏反應 1 : 4 以上的血清, 佔瓦氏反應陽性血清的 11.5%, 有 3 份是瓦氏反應陰性的血清, 佔陰性血清的 2.97%, 但各抗原對血清的反應頗不一致, 如在表 2 之 6 份瓦氏反應陽性血清與流 5304 均無反應, 而在表 3 的 3 份瓦氏反應的陰性血清中流 5301 和流 5303 與之亦無反應, 此種不規則的結果甚難解釋, 唯四種正常抗原與上述血清均呈陰性反應, 同時在 167 份血清中亦未出現其他不規則現象, 可說明 0.004M 枸櫞酸緩衝液浸出及振盪的結果與 Casals 氏原來方法初步比較的結果, 敏感度顯然是增高而特異性並不降低。

當然所作的試驗尙不夠全面的, 例如: 0.004M 枸櫞酸緩衝液在常久保存過程中是否發生沉澱, 又如每種抗原效價滴定的比較, 還有新法製成的抗原與各種腦炎的免疫血清 (因免疫血清正在製備中) 特異性的試驗也尙未作。但因本季中央衛生部指派本科製備的抗原是一律採用 0.004M 枸櫞酸緩衝液浸出並在 4°C 振盪 20 小時製成的。爲了使各地腦炎工作者對此改良法有一概念。所以將此初步結果向大家介紹。關於抗原改進工作仍在繼續研究中。

五. 總 結

1. 在用 Casals 氏醋酮乙醚浸漬法製備流行性乙型腦炎抗原時，以 0.004M 枸橼酸緩衝液 (pH 7.2) 代替普通生理鹽水，以振盪代替浸出法所製就的抗原，其效價顯然較高，而在其特異性方面與原來方法所製成之抗原無甚差異。

2. 關於用此種方法製備之抗原尚有許多方面有待進一步的了解。

參 考 文 獻

- [1] 本科資料。
- [2] 1953 年全國第二次腦炎專業會議的資料。
- [3] Casals, J., *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, 1949, **70**, 339.
- [4] Docrr, R. und Hallaner, C., "Handbuch der Virus Chung" Verlag Von Julius Springer, Wien, 1939, 1111.
- [5] Horsfall, F. L., "Diagnosis of Viral and Rickettsial Infections", Columbia University Press, New York, 1949, 57-82.
- [6] Hammon, W. M. and Espana, C., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1947, **66**, 113.

AN IMPROVED ACETONE-ETHER EXTRACTED COMPLEMENT FIXING ANTIGEN FOR THE DIAGNOSIS OF JAPANESE B. VIRUS ENCEPHALITIS

WU AN-JAN, CHU HSI-HUA, LIU FENG-TING and MA LIEN-TI

Department of Bacteriology, Chinese Union Medical College, Peking

This is a preliminary report on the preparation of a more sensitive complement fixing antigen for the diagnosis of Japanese "B" type encephalitides. The procedure is carried out according to that of the casals' acetone-ether extraction, but with the following modifications: firstly, 0.004 M citric acid phosphate buffer pH 7.2 was used instead of normal saline to extract the antigenic substance more completely and secondly, during extraction with citric acid buffer at 4°C overnight constant shaking was employed. Antigen thus prepared gives a higher titer, but without reducing its specificity.