

天津市一例流行性“乙型”腦炎及其病毒的分離與鑑定

鄭武飛

嚴滌

祁敏如

(天津醫學院細菌教研組)

(天津婦幼保健院)

(天津市立總醫院)

自從 Kuttner 和童二氏^[1]在1934年診治了2例流行性腦炎以來，至今將近20年，在這近20年中，幾乎全國各地都有此病發生。在所能查到的文獻中，北京、天津、上海等十多個大城市都先後有關於此病的報告^[2-26]。最近幾年中，每到夏秋之際，這種病是傳染病中較重要的一個，幾年來國內在這方面作了相當多的工作。但病毒分離的報告尚不多，最初在1940年顏氏^[4]曾分離出一株病毒，其他多人，檢驗診斷方面多限於血清免疫學方面^[3,5,6,12,13,23,27]。解放後，由於政府重視衛生研究工作，開始有從腦炎死亡者腦組織分離病毒和鑑定的報道^[10,19,26]，最近我們在天津也曾試作分離過2次，其中1次得陽性結果。在細菌學方面，我們在天津雖祇是開始研究*，但本例又有另一意義，因患者曾經接種過1針腦炎疫苗，因此有發表的意義，以供參考。

病 例 摘 要

患兒王××(住院號6001)，男性，8歲，於1952年8月4日入院，主訴為頭痛6天，嗜睡，嘔吐，發燒3天，患兒於入院前一星期開始頭痛，無其他不適，於入院前4天突於食後嘔吐，並開始發燒。次日神志不清。入院前一天在門診檢查腦脊液，白血球稍增高。注射1針油劑青黴素。於本年5月間注射大腦炎預防針1次。

入院時檢查：體溫39.5°C，營養欠佳，神志半昏迷，瞳孔不對稱，咽充血，頸強直，心肺腹無異常，克氏微陽性。

化驗室檢查：血液白血球19,500，嗜中性多核白血球92%，淋巴球8%。紅血球355萬，血紅素70%。腦脊液細胞總數248(門診時為27)，白血球為94(門診時為25)。潘氏試驗陰性，糖2—6管陽性；糖74毫克%，氮660毫克%。細菌培養陰性。

* 本文完成整理材料時，適值微生物學報2卷1期出版，得知張氏等^[14]於1951年分離成功三株。

入院後治療無效終於第三日下午 5:20 死亡。死後屍體解剖，取腦組織分離病原體。

病毒的分離和鑑定

(一) 分離方法 病人死後 24 小時內即行屍體解剖，用無菌操作方法取得腦皮質一小塊，將腦組織放在滅菌的乳鉢內，磨碎，並加入 10% 滅活正常兔血清生理鹽水溶液，磨勻成 10% 的懸液，接着加青黴素和鏈黴素使最後濃度各為 500 單位/毫升及 280 單位/毫升以防細菌污染。將懸液吸入無菌試管中，置冰箱內，2 小時後以 25,00 轉/分的速度離心沉澱 10 分鐘，取上清液注射 5 個 2 週大小的小白鼠，劑量是腦內 0.03 毫升再加 1 毫升腹腔注射，每日觀察小鼠 3 次，如已發病迴旋試驗陽性時即以無菌操作法取出鼠腦傳代作鑑定之用。

(二) 類型鑑定法

1. 實驗動物感染範圍

將分離出之病毒如上述方法製成 10% 的懸液經臚腔和腹腔同時接種於家兔、豚鼠、大白鼠、地鼠及鴿體內，每種動物注射兩個劑量(表 1)。

表 1 實驗動物感染時所用劑量

注射部位 \ 動物種類	兔	豚鼠	大白鼠	地鼠	鴿
腹 腔 (毫 升)	2	1	1	0.5	0.5
臚 腔 (毫 升)	0.2	0.15	0.05	0.05	0.05

2. 相互補體結合試驗

材料：將待驗病毒按上述分離的方法製成 10% 的懸液，低速離心沉澱後將含有病毒的上清液分出由臚腔感染 3—4 週小白鼠 20 隻，劑量為 0.03 毫升以備日後製備抗原，製備抗原的方法係用丙酮乙醚浸漬法^[28]。唯一不同點乃在最後一步加原容量的生理鹽水，原法為置 4°C 冰箱內，放置一夜，但我們是將該抗原液置 4°C 冰室內振盪器上下左右搖動，這樣能使抗原滴度較高。

將待驗病毒的懸液同時免疫豚鼠兩隻，由臚腔注射 3 次，每次相隔 10 日，劑量為 0.1 毫升，在最末一次注射後 12 天放血，分出血清待驗。

方法：首先用此株病毒製備的免疫血清測定由此株病毒製成的抗原的滴度，然後將此待驗病毒的抗原及免疫血清各與各型標準腦炎(流行性乙型、聖路易型、西方馬

腦脊髓炎)的免疫血清及抗原作相互補體結合試驗。補體結合試驗的操作主要是根據 Casals 氏^[28]的方法,總量為 0.6 毫升,內血清、抗原、溶血素和 1% 羊血球懸液各 0.1 毫升; 10% 蛋白水稀釋的補體 0.2 毫升(避免一部分的抗補體)。在加入致敏羊血球前,將血清——抗原和補體混合物放入 4°C 冰箱內孵育 16—18 小時,第二天取出後放入 37°C 冰箱中孵育半小時後再加入致敏羊血球 0.2 毫升(在加入前 15 分鐘,將等量溶血素及 1% 羊血球懸液混合使致敏),加畢,放入 37°C 水箱中再孵育半小時後讀出結果。在作補體結合試驗時,尚配合適當對照管,計有血清、補體、陽性、陰性、溶血素及羊血球懸液等對照管。

3. 中和試驗

材料:待驗病毒的懸液準備方法如前所述。正常血清用兔血清作為對照,試驗血清是標準的流乙腦炎病毒和西方馬腦脊髓炎病毒株製出的免疫血清,製法亦如上節所述一樣。

方法:中和試驗的方法主要是根據 Casals 氏的方法,所不同的是以肉湯代血清鹽水作稀釋液,其他都和原法相同,觀察 2 週,計算 LD₅₀ 和中和指數。

(三) 試驗結果

1. 實驗動物感染範圍

5 種被注射的實驗動物,觀察了 3 個星期並無死亡或任何不舒服的徵狀。

2. 相互補體結合試驗

補體結合試驗的結果見表 2 及表 3。待驗病毒和聖路易型腦炎及西方馬腦脊髓炎病毒的免疫血清是陰性結果,但和流乙腦炎病毒的免疫血清有 1:8 的滴度,同樣標準各型腦炎病毒製成的抗原中祇有流行性乙型腦炎的抗原能和待驗病毒的免疫血清有陽性結果。

表 2 分離病毒株製成的抗原與標準各型免疫血清的補體結合試驗結果

流行性乙型腦炎	1:8
聖路易士腦炎	—
西方馬腦脊髓炎	—

表 3 標準抗原與分離病毒的免疫血清的補體結合試驗

流行性乙型腦炎	1:64
聖路易士腦炎	—
西方馬腦脊髓炎	—

3. 中和試驗

中和試驗的一部分結果見表 4。

表 4 部分的 LD₅₀ 及中和指數結果

免 疫 血 清	LD ₅₀	中 和 指 數
正 常 兔 血 清 (對 照)	5.25	1
西 方 馬 腦 脊 髓 炎	4.68	3.7
流 行 性 乙 型 腦 炎	2.75	320

(四) 結果解釋

從實驗動物感染結果可以得一初步概念，就是這種病毒株可能是流行性“乙型”腦炎病毒。“流乙”腦炎病毒和聖路易士型腦炎病毒的動物感染範圍大同小異，最大的差別乃在前者能感染猴，而聖路易士型不能感染猴，但一般實驗室很少以猴作試驗者，因為事實上從補體結合試驗和中和試驗的結果配合動物感染範圍的結果就足以確定待驗病毒的類型了。

相互補體結合試驗的結果有力地證明了分離的病毒是流行型“乙型”腦炎病毒，其陽性結果是在有意義滴度以上，同時它和聖路易士腦炎和西方馬腦脊髓炎都無交叉現象。

最後中和試驗的結果也是指出了分離的病毒是流行性乙型腦炎，中和指數的解釋^[29]一般規定是 1—9 表示陰性；10—49 可疑；50 以上陽性。本試驗中待驗病毒株和流行性“乙型”腦炎免疫血清的中和試驗結果是 320。

從三方面進行對分離的病毒鑑定類型，證明了該病毒株是流行性乙型腦炎病毒。

討 論

腦炎病人的實驗室診斷和腦炎病死者致病毒株的鑑定的問題還是比較費時間的，我們似乎應向速成抗原^[11]或改進其他血清或免疫反應^[30—32]代替目前的繁瑣程序。

過去幾年，根據我們所知在天津 1951 年曾分離過 3 株^[14]；1952 年僅分離得 1 株（即本株，我們編號為津醫腦炎—1—52）；1953 年據稱也分離得二株^[33]，詳細結果尚未知；1954 年也分離得一株^[34]；因此進一步的研究是有一定意義的。而本例再有一點即此病人曾於發病三個月前祇注射過 1 針大腦炎疫苗。關於預防注射對於發病率

的減低是已有定言，但是我們願提出來強調一下，大腦炎的預防針也像大多數其他預防針注射一樣，其免疫力是相對的，而需要注射2、3次的預防針者，作衛生宣傳時更有必要說明完成預防注射程之重要性，以便獲得較高的相對免疫力。王氏等^[35]也已證明了腦炎疫苗3次比2次得出較好的結果。

總 結

報告1例“流乙”腦炎，是由分離病毒的動物感染範圍，相互補體結合試驗和中和試驗證明的。死者曾於病前3個月注射過1次大腦炎預防針。討論中強調完成預防注射程以取得一定程度免疫的重要性。

致謝：本文承我組高恩賜主任鼓勵與支持而完成，謹致謝意。

參 考 文 獻

- [1] Kuttner, A.G. & Tung, T. Encephalitis in North China, results obtained with neutralisation test. *J. Clin. Invest.*, **15**: 525, 1936.
- [2] Huang, C.H. & Liu, S.H. Acute epidemic encephalitis of Japanese type, clinical report of 6 proven cases. *C.M.J.*, **58**: 427, 1940.
- [3] Chu, F.T., Wu, J.P. & Teng, C.H. Acute encephalitis in children, a clinical and serological study of ten epidemic cases. *C.M.J.*, **58**: 68, 1940.
- [4] Yen, C.H. Isolation of a virus from an acute encephalitis case in Peiping, *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, **46**: 609, 1941.
- [5] Huang, C.H. Neutralisation of Japanese encephalitis virus by serum. *C.M.J.*, **59**: 34, 1941.
- [6] Sabin, A. B., Schlesinger, R. W. & Ginder, D. R. Clinically apparent and inapparent infections with Japanese B encephalitis virus in Shanghai and Tientsin, *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.*, **65**: 183, 1947.
- [7] 諸福棠：流行性腦炎之臨床觀察。中華新醫學報，**1**: 51, 1950.
- [8] 陳翠貞：腦炎。中華兒科雜誌，**1**: 26, 1950.
- [9] 黃禎祥、宋幹、田鳳調：北京市1948至1950年流行性腦炎（J. B.）流行病學的調查研究。中華醫學雜誌，**37**: 253, 1951.
- [10] 黃禎祥、王逸民：北京市流行性腦炎病毒的分離和鑑別。中華醫學雜誌，**37**: 280, 1951.
- [11] 張乃初、劉鳳亭：流行性腦炎的研究。內科學報，**3**: 905, 1951.
- [12] 宋幹、周明光、沈中：1950年北京流行性腦炎病人血清補體結合試驗。中華醫學雜誌，**37**: 287, 1951.
- [13] 天津市人民政府公共衛生局：天津市1950年流行性腦炎病例總結報告。東北醫學雜誌，**4**: 219, 1951.
- [14] 張乃初、劉鳳亭、屈鴻鈞：苯凝抗原與醣酐乙醚抗原在診斷天津市流行性乙型腦炎敏感度的比較。微生物學報，**2**: 49, 1954.
- [15] Lowenberg, R.D. Notes on encephalitis in Shanghai. *C.M.J.*, **51**: 939, 1937.
- [16] 高鏡朗：兒童之急性腦炎。中華醫學雜誌，**32**: 333, 1946.
- [17] Su, T.E. Encephalitis epidemica in Amoy. *C.M.J.* **50**: 1279, 1936.

- [18] 樊培祿、胡上庸：腦炎在成都流行之概況。中華醫學雜誌，37：308, 1951。
- [19] 沈海波、傅兆麟：小兒流行性“乙型”腦炎的臨床觀察。東北醫學雜誌，(8)：700, 1952
- [20] 孫錫瓌、黃敬三、丁文琛：瀋陽市1950年流行性“乙型”腦炎的流行病學的觀察。東北醫學雜誌，(8)：690, 1952。
- [21] Kan, H.C. An epidemic of encephalitis in Chungking in the Summer of 1944. *C.M.J.* 66: 419, 1948.
- [22] Chen, K.T. & Chang, H.H. Summer encephalitis, a clinical study. *C.M.J.*, 66: 409, 1948.
- [23] 杜淑昭、黃世鑑：重慶所見之流行性乙型腦炎。中華醫學雜誌，(6)：449, 1953。
- [24] 楊顯素：武昌流行性腦炎之病例分析。武大醫訊，1：65, 1950。
- [25] 朱師晦、曾梅輝、張允銘：廣州市發現流行性腦炎之病例報告。中山醫報，5：184, 1950。
- [26] 汪美先、徐漢傑、甄桂芳：西安市流行性“乙型”腦炎病毒的分離與鑑定。微生物學報，1(2)：183, 1953。
- [27] Mitamura, T. Pathogenesis of Japanese B encephalitis. *Jintendo Iji Kenkyu Zasshi*, (589):1, 1943 (見6)。
- [28] Casals, J. Complement fixation test with encephalitis virus. *J. Immunol.*, 56: 337, 1947.
- [29] Am. Pub. Health. Assn. Diagnostic procedure for virus & Rickettsial diseases. N. Y. 1st ed. pp. 187-217, 1948.
- [30] 朱錫華：流行性乙型腦炎病毒血球凝集試驗之初步報告。中華醫學雜誌，(6)：444, 1954。
- [31] 吳安然、朱錫華、劉鳳亭、馬連提：改進流行性乙型腦炎醃酐乙醃浸漬抗原之初步研究。微生物學報，1：196, 1953。
- [32] 張學德、丘福禧、王化成：流行性乙型腦炎之皮膚試驗。中華內科雜誌，(2)：112, 1954。
- [33] 楊敷海：私人通訊。
- [34] 天津醫學院細菌教研組資料。
- [35] 王用楫、戚迦陵、戚景彝、李美容、王欽臣：流行性乙型腦炎疫苗效率的研究。微生物學報，1：97, 1953。

A CASE OF JAPANESE B ENCEPHALITIS IN TIENTSIN WITH ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE VIRUS

CHENG W. F.

YEN D.

CHI M. J.

Dept. of Bact., Tientsin Medical
College, Tientsin

Maternity & Children
Hospital, Tientsin

General Hospital, Tientsin

A case of Japanese B encephalitis, diagnosed by clinical signs and symptoms and by the isolation of the virus, is reported. The virus is identified by animal susceptibility, complement fixation and neutralisation test. The victim, an 8 year old boy, had been vaccinated with one injection against epidemic Japanese encephalitis three months before the onset of the disease. Although the value of encephalitis vaccine is generally accepted, it is felt that a complete prophylactic immunisation course of three injections is necessary for obtaining a more reliable immunity.