

广东省佛山地区一次登革热暴发流行的 病原学及血清学研究

广东省佛山防治登革热协作组

1978年夏秋季节广东省佛山地区发生一次登革热流行。自患者急性期血液中分离得三株登革热 IV 型病毒。通过对 180 例患者双相血清和 109 例患者恢复期血清的血清学调查,也确定本次流行系由登革热 IV 型病毒引起。从健康人群抗体水平调查,提示单相血清补体结合抗体滴度 $\geq 1:32$ 有诊断参考意义。还观察到补体结合抗体在病后一周开始上升,三周达高峰,第二个月开始下降,第三个月降到 $1:64$ 以下。感染的鼠脑悬液冻融三次,离心取上清,用蔗糖-丙酮法提取抗原,进行补体结合试验较好,其非特异性反应较弱。

1978年5—12月间广东省佛山地区发生一次登革热暴发流行,波及附近南海、顺德、三水、四会、江门、广州六县市。自8月中旬至11月上旬在疫区进行病毒分离和检定,及采集各种血清做补体结合试验,现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 材料来源

1. 血清标本: 分离病毒用之血液标本采自临床诊断登革热患者,于发病后4日内采血,共134份,其中44份用全血,其余分离血清待用,其中12份血清接种时以 pH8.0 肉汤作 1:5 稀释。补体结合试验的血清标本中,临床诊断为登革热患者双相血清 180 例取自佛山、肇庆地区;流行前期健康人群血清 80 例,取自南海县南庄公社;流行期健康人群血清 82 例取自佛山市石湾镇;流行区流行中后期动物血清,猪 34 份、鸡 12 份采自南海县南庄公社。

2. 抗原: 登革热 I—IV 型标准抗原,基孔肯亚 (Chikungunya) 抗原及相应的正常抗原按 Clarke, Casals 法^[1]由协作组分六批制备;乙脑抗原由武汉生物制品研究所供应。

3. 标准毒株、免疫血清和溶血素由卫生部药

品生物制品检定所供应。

4. 补体: 采自多只豚鼠心血,分离血清后置 -20°C 低温冰箱备用。

5. 绵羊红细胞: 保存于阿氏液中,用前以生理盐水洗涤三次,末次离心沉淀 (2000 转/分, 15 分钟) 后用巴比妥缓冲液将红细胞配成 1.25% 备用。

6. 稀释液: 补体结合试验中各项预备及正式试验均用 pH7.2 巴比妥缓冲液^[2]作为稀释液。

(二) 方法

1. 病毒分离: 73 份标本接种 1—3 日龄小白鼠,每份标本各接种一窝 (5—8 只),其中脑腔 (0.02 毫升/只) 腹腔 (0.03 毫升/只) 联合接种者有全血标本 38 份、血清标本 12 份。仅脑腔接种者有全血标本 6 份,未稀释血清标本 5 份,1:5 稀释血清 12 份。全血标本均为采血后立即接种,接种后观察三周,48 小时内死亡者弃去。接种后 7—10 日仍未见发病者,每份取两只小白鼠,剖取鼠脑,

本文于 1979 年 9 月 15 日收到。

协作组参加单位: 广东省卫生防疫站、卫生部药品生物制品检定所、佛山地区卫生防疫站、佛山市卫生防疫站、佛山市石湾医院、佛山市第一医院、佛山市中医医院、佛山市向阳卫生院、广州军区医学科学研究所、广东省生物制品研究所。本文由卫生部药品生物制品检定所李雪东同志和广东省卫生防疫站杜福、黄满涛同志整理。

以 pH8.0 肉汤(内含青霉素 1,000 单位/毫升,链霉素 500 微克/毫升)研制成 1:10 鼠脑悬液,脑腔接种 1—3 日龄小白鼠一窝。盲传两代未见发病者作为分离阴性。观察期内发病的小白鼠,剖取鼠脑传代,并做无菌试验。无菌试验阴性而能使乳鼠规律发病者,剖取鼠脑作为可疑毒株于 -20℃ 以下冻存,或置 50% 甘油盐水中低温保存。

另 61 份血清标本接种约 3 日龄原代地鼠肾细胞,每份接种 4 支细胞管(0.2 毫升/支),观察 14 天,至第 14 天未见细胞病变者即行盲目传代,盲传两代仍未见细胞病变者视为阴性。在观察期间出现疑似细胞病变时,再转种 1—3 日龄小白鼠,然后按前述程序传代观察,如小白鼠未见发病作为阴性。

2. 血清学试验:

(1) 中和试验: 按固定血清稀释病毒法,脑内接种 1—3 日龄小白鼠,血清病毒混合后置 37℃ 水浴作用一小时,接种后观察三周。

(2) 补体结合试验: 为去除血清抗补体,每份标本均取 0.2 毫升,加入 0.1 毫升补体,置 37℃ 水浴 60 分钟,然后加巴比妥缓冲液 0.2 毫升(或 1.3 毫升)使血清浓度为 1:4 (或 1:8),置 56℃ 水浴 30 分钟灭活备用。试验按总量 0.6 毫升法进行^[1]。

实验结果

一、病毒分离

用 1—3 日龄小白鼠自两份全血标本中分离得两株病毒(78-42 及 78-56)。另外,用组织培养法经原代地鼠肾细胞盲传二代后的 4 份标本,转种 1—3 日龄小白鼠获得

一株病毒(78-H35)。以 78—56 株为代表进行了生物学性状的检查。

(一) 病毒的一般特性

1. 分离过程: 患者郭某住佛山市,于 1978 年 9 月 12 日发病,次日至佛山市第一人民医院就诊,临床诊断为疑似登革热收治入院。14 日上午取患者静脉血,立即脑腔接种 2 日龄小白鼠一窝(7 只),观察至第 11 天未见发病,即剖取鼠脑两只,盲传 2 日龄小白鼠一窝(3 只),至第 10 天,1 只小白鼠发病(另 1 只健存)。取脑传第三代即全部发病,传至第五代后,潜伏期即稳定在 6—7 天(各代无菌试验阴性)。

2. 滤过性: 1:10 病毒鼠脑悬液以 3000 转/分离心 10 分钟,取上清稀释至 1:100,通过蔡氏滤器及 G6 玻璃滤器,滤液经无菌试验检查为阴性,接种 1—3 日龄小白鼠可引起典型发病。

3. 对去氧胆酸钠(SDC)的敏感性^[1]: 用 0.75% 牛白蛋白磷酸缓冲液(BAPS pH7.4)将 SDC 稀释至 1:500,滤过除菌。以 0.75% BAPS 制备 20% 病毒悬液,10,000 转/分冷却离心一小时。取上清液分成两份,一份混以等量 1:500 SDC,另一份混以等量 0.75% BAPS,置 37℃ 水浴作用一小时,然后脑内接种 1—3 日龄小白鼠,测定其滴度。结果(表 1)表明,SDC 组与对照组之间滴度相差在 1.5 log 以上,可认为 78-56 株对 SDC 高度敏感。

表 1 78-56 株对 SDC 敏感性

稀释度 试验组	死亡比例						LD ₅₀
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
SDC 组	0/4*	0/4	0/4	0/4			≤0.50
对照组			4/4	2/4	0/4	0/4	4.00

* 分母为实验鼠数,分子为死亡鼠数。

表 2 小白鼠与地鼠对 78-56 株的敏感性

动物	1—3 日龄小白鼠			8—10 克小白鼠				乳地鼠
	脑内 0.02 毫升/只	腹腔 0.1 毫升/只	皮下 0.05 毫升/只	脑内 0.03 毫升/只	腹腔 0.5 毫升/只	皮下 0.1 毫升/只	足掌皮下 0.03 毫升/只	脑内 0.05 毫升/只
LD ₅₀	5.50	≤0.83	≤0.50	2.89	≤0.83	≤0.50	≤0.50	≤2.33

4. 对实验动物的致病性:

(1) 小白鼠及地鼠对 78-56 株的敏感性: 由表 2 结果可见, 以 78-56 株乳鼠脑腔 8 代之病毒感染小白鼠时, 其对 1—3 日龄小白鼠脑腔感染之致病性较对 8—10 克小白鼠为高。其他途径均不敏染。足掌皮下感染 8—10 克小白鼠未见局部肿胀及全身症状, 看来鼠痘病毒污染的可能性不大, 大量病毒感染乳地鼠亦可引起发病死亡。

(2) 对其他实验动物的致病性: 曾以 1:10 鼠脑病毒悬液脑内感染 5—10 日龄大白鼠 4 只 (0.03 毫升/只), 离乳幼龄兔 4 只 (0.2 毫升/只) 及 300—350 克豚鼠 7 只 (0.1—0.2 毫升/只), 观察 3—4 周均健存。

5. 对细胞感染力的测定: 将 78-56 株 (乳鼠 5 代) 以 5% 小牛血清 (乙脑抗体检查阴性) 乳蛋白水解物稀释至 1:100, 接种原代地鼠肾细胞, 原代猴肾细胞, 人二倍体细胞株及人羊膜、人胚肾、HeLa、Vero、BHK₂₁ 细胞系。于 37℃ 吸附 1.5—2 小时后, 弃去病毒液, 加入维持液, 置 37℃ 培养。观察 14 天, 无病变者盲传同种细胞。盲传三代后均未见较明显的病变, 将第三代材料脑内接种 1—3 日龄小白鼠, 观察三周亦未见发病。

6. 对鹅红细胞的血凝性: 取 78-56 株发病濒死鼠脑 (第五代) 按蔗糖-丙酮法^[4]提取血凝素, 其血凝效价及最适 pH 见表 3。

表 3 78-56 株对鹅红细胞的血凝性

稀释度 pH	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	对照
6.0	—	—	—	—	—	—
6.2	—	—	—	—	—	—
6.4	—	—	—	—	—	—
6.6	++++	++	—	—	—	—
6.8	++++	++	—	—	—	—

表 4 78-56 株、78-H35 株及 78-42 株病毒鉴定结果

病 毒		血清	登革 I 型	登革 II 型	登革 III 型	登革 IV 型	乙脑
78-56	第一次		0 **	3	0	1,319	未做
	第二次*		8	8	6	537	2
78-H35	第一次		0	3	68	1,000	3
	第二次		未做	未做	未做	589	未做
78-42			10	41	871	≥31,620	1

* 为美国疾病控制中心 (CDC) 制备的各型登革免疫腹水。

** 为中和指数。

7. 电镜及病理检查:

(1) 电镜检查: 取 78-56 株第 8 代发病濒死的乳鼠鼠脑, 经超薄切片进行电镜观察。结果(图版 I-1)表明该病毒为有膜病毒颗粒, 直径 40—50 毫微米, 具有电子致密 (electrodense) 核心。

(2) 病理检查: 78-56 株第 6 代发病鼠脑病理检查结果为重度脑炎典型变化。可见皮层顶部、海马回神经细胞坏死、溶解, 弥散性血管围管浸润及杆状胶质细胞增生。丘脑弥散性围管浸润。脑膜弥散性炎症及充血。对照组鼠脑内无特殊病变。

(二) 血清学鉴定

从表 4 看出 78-42 株、78-56 株、78-H35 株均为登革热 IV 型病毒。

二、血清学检查

(一) 双相血清抗体增长调查

收集 180 例临床诊断为登革热患者的双相血清作补体结合试验, 结果见表 5。

恢复期血清中抗体呈 4 倍以上增长的 169 例中, 除 37 例(21.89%)为单项登革热 IV 型抗体增长外, 其余均伴随有 2 个型别以上的抗体同时呈现 4 倍增长, 其中以登革热 I、II、IV, 登革热 II、IV, 登革热 I、II、III、IV 3 种类型为多见, 结果见表 6。

表 5 180 例患者双相血清抗体增长情况

		血清抗体滴度										≥ 4 倍 增长%	几何平均滴度
		<4	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
D ₁ *	急性期	154	4	20			2						2.46
	恢复期	89	2	9	15	9	24	7	19	6			11.00(4.47)**
D ₂	急性期	147	7	22	2		2						2.59
	恢复期	53		3	12	9	16	37	29	20	1		36.18(13.97)
D ₃	急性期	175	2	1	2								2.08
	恢复期	135	5	4	13	2	11	5	2	3			4.05(1.95)
D ₄	急性期	124	9	41	4		2						3.09
	恢复期	11		1	4	5	9	11	20	33	79	7	335.00(108.4)
乙 脑		180 例全部 <1:4											
基孔肯亚		23 例全部 <1:4											

* 为登革热及型别, 下表同。

** 括号内数字为恢复期比急性期血清抗体几何平均滴度增长倍数。

表 6 各型登革抗体同时出现情况

呈 4 倍或 4 倍以上 增长的抗体型别	D ₄	D _{2,4}	D _{1,2,4}	D ₁₋₄	D _{2,3,4}	D _{3,4}	D _{1,4}	D _{2,3}	总计
例数	37	32	53	31	7	4	4	1	169
%	21.89	18.94	31.36	18.34	4.14	2.37	2.37	0.59	100

表 7 109 例恢复期血清抗体滴度

抗 体 抗 原	血清抗体滴度											几何平 均滴度
	<4	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
D ₁	58	3		6	8	3	7	22	2			11.86
D ₂	39	6	1	1	5	3	12	15	23	4		33.45
D ₃	51	1		4	5	24	5	9	10			15.89
D ₄	14		2	7	4	7	6	6	16	41	6	183.8
乙脑	106			1	1							2.12

(二) 恢复期患者血清抗体调查

收集发病 10 天以上的 109 例患者血清作补体结合试验, 结果见表 7。抗体滴度 $\geq 1:32$ 者中, 登革热 I 型占 38.53%, 登革热 II 型占 55.05%, 登革热 III 型占 40.54%, 登革热 IV 型占 78.90%。其中只呈登革热 IV 单型抗体者有 25 例, 其余均为登革热 IV 型抗体出现的同时伴有其他型抗体出现, 其百分比与双相血清相似。

(三) 登革热 IV 型标准株和 78-56 株
抗原检测患者血清抗体滴度

两株同法制备抗原, 同时和 122 份患者血清 (46 例双相血清, 30 例恢复期血清) 作补体结合试验。结果从表 8 可看出, 血清对 78-56 株和登革热 IV 型标准株的几何平均滴度分别为 48.71 和 47.89 ($t = 0.032$ 、 $p > 0.5$ 、 $r = 0.9520$), 两者无显著差异。

表 8 122 份患者血清对 78-56 及登革 IV 型标准株抗原抗体滴度

78-56 株		血清抗体滴度										
D ₄ 标准株		<4	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
血清 抗体 滴度	<4	16	3	9								
	4		3	1								
	8	8		8		5						
	16				1							
	32		1		1	2		1				
	64					1	2	1	1	1		
	128						1	3	2	2		
	256					1	1	3	2	5		
	512				1			1	1	7	2	
	1024								1	6	8	3
	2048						1				2	4

(四) 抗体消长与病程的关系

发病一周内的 179 份和发病一周以上的 290 份患者血清标本各型抗体的消长与病程关系见表 9。病后一周内的几何平均滴度均 $< 1:4$, 一周后抗体滴度迅速增长, 127

天的一例登革热 IV 型抗体滴度为 $1:64$, 登革热 I 型为 $1:32$, 登革热 III 型 $< 1:4$ 。

(五) 流行前期健康人群抗体水平

流行前期曾收集南海县南庄公社健康人群 80 份血清, 其抗体水平均 $\leq 1:16$ 。见

表 9 各型抗体的消长与病程关系

发病天数 几何平均滴度	类型							
		<一周	二周	三周	四周	31—60 天	61—90 天	91—127 天
D ₁		2.42	11.89	11.49	12.42	11.15	4.39	3.48
D ₂		2.54	28.39	49.92	39.86	31.99	2.46	3.48
D ₃		2.08	3.64	6.48	10.88	11.48	3.03	2.00
D ₄		3.04	255.20	436.40	258.7	183.65	22.62	12.13

表 10 80 份流行前期健康人群抗体水平

例数 型别	抗体滴度			
	<4	4	8	16
D ₁	71	6	3	0
D ₂	55	15	8	2
D ₃	75	4	1	0
D ₄	68	4	3	5
乙脑	77	0	2	1

表 11 82 份流行期“健康”人群抗体水平

例数 型别	血清抗体滴度													
	<4	4	8	16	小计	%	32	64	128	256	512	1024	小计	%
D ₁	64	7	4	4	79	96.35	2	1					3	3.65
D ₂	64	8	5	4	81	98.77	1						1	1.22
D ₃	78	1	3		82	100								
D ₄	56		3	8	67	81.71	5	2	1	3	2	2	15	18.29
乙脑	82				82	100								

表 10。

(六) 流行期“健康人群”抗体滴度

流行期收集了石湾镇 82 份非登革热现症患者的“健康”人血清作补体结合试验,结果见表 11。

(七) 流行区动物血清抗体水平测定

于流行中后期收集流行区猪血清 34 份,鸡血清 12 份作补体结合试验。猪血清抗体均为 1:4。鸡血清抗体除登革 I、II 型各有一份为 1:4 外,其余均 <1:4,是否非敏感动物或中间宿主,尚未找到依据。

讨 论

解放前,在我国东南沿海曾有过登革热流行,但无完整资料^[4,5],解放后国内尚未见发生本病流行的报告。1978 年夏秋季广东省佛山地区曾发生登革热流行。

对 15 份恢复期患者血清测定其对登革 I—IV 型、乙脑和 A 组的 Chikungunya 的血凝抑制试验,结果登革 I—IV 型和乙脑抗体滴度均为阳性,从而排除了 A 组虫媒病毒感染的可能性。

国外曾报道登革病毒可在 HeLa^[6] 和 BHK₂₁^[7] 细胞产生细胞病变, 而我们用 9 种细胞测定新分离的 78-56 株的细胞敏感范围, 均未见有细胞病变, 可能因毒株和细胞系不同及培养条件上的差异, 导致了细胞敏感性的变化。

近年来在登革热病毒分离技术上已有不少改进, 并取得较满意效果^[8-14], 特别是 1979 年 Rosen 教授来我国访问期间介绍了应用巨蚊分离病毒的技术, 该技术敏感性高, 可产生较大量病毒以及安全等优点, 可能是较好的方法。

从此次分离结果看, 用乳鼠分离登革病毒并非一个理想的方法, 但在没有更好的培养模型可提供时, 只要选择的病人适当, 采集标本及接种及时, 还是可分离到病毒的。

根据抗体的消长与病程的密切关系, 我们认为提供双相血清的采血时间, 急性期最好在发病的一周内, 恢复期在病后三周。

流行前期在健康人群血清中, 各型登革热病毒补体结合抗体均在 1:16 以下; 在流行期无登革热临床表现患者血清中产生了登革抗体, 特别是登革热 IV 型, 其抗体水平 $\geq 1:32$ 者占 18.29%, 这种情况可能与流行期间存在隐性感染或轻型表现而未被发现有关。因此, 在没有双相血清的情况下, 单相血清的抗体水平如达 $\geq 1:32$, 在诊断上即有参考意义, 这与 Kymzo 氏的调查基本一致^[15]。

一般认为, 补体结合试验中双相血清有四倍或四倍以上抗体增长即有诊断价

值。但型别之间有相当高滴度的交叉反应, 因此, 在判定型别时, 往往发生困难。对出现多型抗体的看法, 有人认为是 B 组虫媒病毒的重复感染所形成的^[15-17]。这次登革热流行区正是历年的乙脑流行区, 这种现象是符合由 B 组虫媒病毒重复感染的。

参 考 文 献

- [1] Clarko, D. H. and J. Casals: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**: 561—573, 1958.
- [2] 北京协和医院检验科: 《病毒实验诊断手册》, 人民卫生出版社, 北京, 1959, 第 96—106 页。
- [3] Lennett, E. H. and N. J. Schmidt: *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*, 4th Ed. 1969, p. 250.
- [4] 谢国华: 《传染病及其预防》, 人民卫生出版社, 北京, 1957, 第 202 页。
- [5] 俞汝宪: 《实用传染病学》, 上海卫生出版社, 上海, 1958, 第 52 页。
- [6] Buckley, S. M.: *P. S. E. B. M.*, **116**: 354—358, 1964.
- [7] Karabatsos, N. and S. M. Buckley: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **16**: 99—105, 1967.
- [8] Diercks, F. H.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **8**: 488—491, 1959.
- [9] Halstead, S. B. et al.: *Nature*, **202**: 931—932, 1964.
- [10] Russell, P. K. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **15**: 573—579, 1966.
- [11] Paul, S. D.: *Ind. J. Med. Res.*, **56**: 142—149, 1968.
- [12] Chappell, W. A. et al.: *Appl. Microbiol.*, **22**: 1100—1103, 1971.
- [13] Rosen, L. and D. Gubler: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **23**: 1153—1161, 1974.
- [14] Kuberski, T. et al.: *ibid.*, **26**: 775—783, 1977.
- [15] Rymzo, W. T. et al.: *ibid.*, **25**: 136—145, 1976.
- [16] Winter, P. E. et al.: *ibid.*, **17**: 590—599, 1968.
- [17] Tuchinda, P. et al.: *Bull. W.H.O.*, **35**: 71—72, 1966.

ETIOLOGIC AND SEROLOGIC INVESTIGATION DURING AN EPIDEMIC OF DENGUE FEVER IN FOSHAN DISTRICT OF GUANGDONG PROVINCE IN 1978

The Collaborating Group for the Prevention and Treatment
of Dengue Fever, Foshan, Guangdong

During the summer and autumn of 1978, an epidemic of dengue fever occurred in the Foshan District. From blood specimens taken during acute stage of certain patients with clinical manifestations, three strains of dengue virus type IV were isolated. Through a study of 180 acute-convalescent paired sera and a survey of 109 single blood samples of convalescent patients, it has been found that the causative agent was also evaluated to be the same type of dengue virus. By an investigation of the antibody level of normal population of this area, both during the pre-epidemic and epidemic periods, it was found that the an-

tibody titre of 1:32 or lower in a single specimen of suspected dengue fever cases may have diagnostic value. It has also been observed that the complement fixation titre began to rise within a week after the beginning of the disease, and the peak titre was reached by the third week and eventually dropped to 1:64 or lower at the third month. For the complement fixation test, the antigen prepared from brain suspension of infected mice should first be treated with freezing and thawing for three times, and finally extracted by sucrose-acetone mixture to reduce the nonspecific reaction of the crude antigen.

更 正

1. 本刊第 18 卷第 2 期刊登《葡萄球菌类毒素的研究》一文,系两单位合作成果,由于黑龙江省应用微生物研究所的过失而将沈阳军事医学科学研究所漏署,特此更正。

2. 本刊第 20 卷第 4 期刊登《一属罕见的细菌——多孢子菌属》,由于作者不慎,原稿在实验方法(三)中第 3 行,需补“pH7.0、0.1M 的磷酸缓冲液洗三次,移入 1%的钨酸中固定 3 小时,再经”特此更正。

3. 本刊第 21 卷第 1 期刊登《利用液体石蜡产生柠檬酸菌种的研究》一文,在图 6 图注第 4 行“……0.3 毫升”后,由于作者遗漏,需补“无细胞抽取液蛋白质 3.16 毫克,总体积 3 毫升”。另外,第 100 页右侧第二行“异柠檬酸脱氢酶”应为“异柠檬酸脱氢酶”特此更正。