

西安市流行性“乙型”腦炎 病毒的分離與鑑定

汪美先 徐漢傑 甄桂芳

(第四軍醫大學細菌學系)

(西北衛生試驗所)

流行性“乙型”腦炎在我國發現已有三十年的歷史，許多地方都有臨床報告，但是關於分離病毒，作病原方面之研究，解放前僅於1940年顏春暉氏^[1]在北京曾由死亡腦炎患者腦內，分離出一株病毒，鑑定屬於流行性“乙型”腦炎。1949—1950年黃禎祥，王逸民^[2]在北京由死亡腦炎患者腦內，分離出三株腦炎病毒，經鑑定都證明屬於流行性“乙型”腦炎病毒。1951年夏秋中國醫科大學細菌學系^[3]在瀋陽由10例疑似流行性腦炎病屍腦材料中，分離出病毒8例；25例腦脊髓液中，分離出病毒1例；17例血液材料中分離出病毒1例，共分離病毒10例；經動物感染範圍試驗及免疫試驗，確定屬於流行性“乙型”腦炎病毒。同年東北傳染病防治院^[3]在長春，採取疑似腦炎患者腦組織，分離出病毒1例，初次鑑定與瀋陽分離之病毒及北京的流行性“乙型”腦炎同屬一類型。

此外，其他地區還沒有關於這方面的報告。

西安市1951年8月上旬初次發現疑似流行性“腦炎”^[4]，我們曾採取疑似患者恢復期血清作補體結合試驗^[5]，初次提供西安市流行的腦炎是屬於“乙型”腦炎一有力的證據。為了更確實的證明西安市所流行腦炎的類型，自1952年8月10日開始分離病毒，至10月21日共作分離試驗12次，分離出病毒5例，定名為“西北區腦炎研究組一至五號”(簡稱“西北腦研1,2,3,4,5,”)，這5株病毒經鑑定的結果，都屬於“乙型”腦炎病毒。

材料和 方法

(一) 分離病毒

死亡患者家屬同意將屍體解剖的，而由第四軍醫大學病理學系施行，作者親

自前往用無菌操作法，採取腦組織一小塊，放入組織研磨器中，加牛肉湯 (pH 7.8) 製成10%腦組織懸液，用遠心沉澱器每分鐘 2,000 轉沉澱 20 分鐘，取上清液接種 0.03 毫升於健康幼小白鼠 (生後 2-4 週，體重 6-10 克) 腦內，每次試驗 3-6 隻，並作無菌試驗，觀察 3 週，注意有無豎毛，活力減少，不正常的行動，震顫、繞圈、弓背、蜷曲、尾強直或癱瘓等症狀，鼠發病後，即行殺死，取腦傳代並鑑定其類型。

死亡患者家屬不同意將屍體解剖，盡可能爭取延髓穿刺，這樣採取的材料，多由西安市衛生局防疫站李夢初大夫供給。

分離結果：共計作病毒分離試驗 12 例，5 月份 1 例，結果陰性，8 月份 6 例，陽性結果 5 例，10 月份 2 例，都是陰性結果。所分離 5 株病例中，3 株自西安市死亡患者分離，2 株由長安縣死亡患者分離。其中 3 株由屍體解剖採取腦組織分離，2 株由延髓穿刺採取腦組織分離。結果如表 1：

表 1 分離病毒的結果

病例 號數	分 離 日 期	患 者 姓 名	性 別	年 齡	最 後 臨 床 診 斷	採 取 方 法 (日 數)	檢 材 取 取 至 採 料 (小 時)	分 離 病 毒 (幼 小 白 鼠)		病 理 診 斷			
								接 種 途 徑	死 亡 數 / 接 種 數		接 種 至 死 亡 時 間 (天 數)		
1	14/V	張○○	男	一歲六個月	不明	1	屍體解剖	27	腦內	0/5		脊髓前角灰白質炎	
2	10/VIII	牛○○	男	32歲	疑似流行性乙型腦炎	3	同上	9	腦內	5/12	8,9,12,12,13	流行性乙型腦炎十腦包囊蟲病	
3	12/VIII	侯○○	女	12歲	同上	5	同上	8	腦內 腹腔	5/5 4/5	5,5,6,6,6 6,6,7,7	流行性乙型腦炎	
4	15/VIII	溫○○	男	38歲	同上	5	延髓穿刺	3	腦內	6/6	5,5,7,7,8,8		
5	23/VIII	劉○○	女	31歲	同上	6	延髓穿刺	3	腦內	1*/4	4		再傳代 0/4
6	24/VIII	劉○○	男	19歲	敗血症及疑似流行性乙型腦炎	4	屍體解剖	21	腦內 腹腔	5/5 4/5	6,6,6,6,6 6,7,7,8	流行性乙型腦炎	
7	26/VIII	魯○○	男	35歲	疑似流行性乙型腦炎	6	延髓穿刺	1	腦內 第一代 第二代 第三代	1/4 2/3 3/3	11 5,5 4,6,6		
8	14/IX	李○○	女	33歲	同上	7	屍體解剖	20	腦內 腹腔	0/5 0/5		流行性乙型腦炎十腦包囊蟲病	
9	15/IX	張○○	男	2歲8個月	同上	19	屍體解剖	2	腦內 腹腔	0/5 0/5		急性全身粟粒性結核	
10	29/IX	石○○	女	3歲	疑似腦炎或結核性腦膜炎	10	屍體解剖	30	腦內 腹腔	0/3 0/3		流行性乙型腦炎	
11	4/X	黃○○	男	6歲	疑似流行性乙型腦炎	6	延髓穿刺	1	腦內	1*/4	6		
12	21/X	王○○	男	4歲	同上	44	屍體解剖	58	腦內	0/5		流行性乙型腦炎	

* 再傳代 0/4

(二) 鑑定病毒

分離出來的病毒，經小白鼠腦內傳代後，先作動物感染範圍試驗，供初步鑑定；然後作相互中和試驗，相互補體結合試驗，及相互自動免疫試驗，供最後鑑定。

這些方法都根據“流行性乙型腦炎的防治”一書中的類型鑑別方法和血清檢驗法^[6]及黃禎祥，王逸民氏的報告^[2]進行。

鑑定結果

1. 動物感染範圍試驗

取所分離的病毒（西北腦研 1—5）製成 10% 病毒懸液，分別接種於小白鼠腦內，於第 4—5 日發病，接種於豚鼠，家兔腦內，都不發病，初步鑑定了類型。結果如表 2：

表 2 動物感染範圍試驗（腦內接種）

病 毒	小 白 鼠	豚 鼠	家 兔
西北腦研 ₁	5/5	1/2 [⊕]	0/2
西北腦研 ₂	5/5	0/2	0/2
西北腦研 ₃	5/5	0/2	0/2
西北腦研 ₄	5/5	0/2	0/2
西北腦研 ₅	3/3	0/2	0/2
京 奮 研 ₁	3/3	0/2	0/2

⊕西北腦研₁ 腦內接種豚鼠 2 隻，其中一隻於第 10 日死亡，取腦再接種於幼小健康白鼠腦內，觀察 3 週，都未發病。

2. 相互中和試驗

西北腦研₁ 病毒對西北腦研₁ 及乙型腦炎免疫血清，乙型腦炎病毒對西北腦研₁ 及乙型腦炎免疫血清，都有顯著的中和作用。如表 3：

西北腦研₂ 病毒對乙型腦炎免疫血清，乙型腦炎病毒對西北腦研₂ 免疫血清，也都有顯著的相互中和作用。如表 4：

表 3 相互中和試驗 (一)

免疫血清	西北腦研 ₁ 病毒		乙型腦炎病毒	
	50% 致死度	中和指數	50% 致死度	中和指數
西北腦研 ₁	$<10^{-4.0}$	$>100,000$	$10^{-4.67}$	214,000
乙型腦炎	$10^{-5.02}$	95,500	$10^{-5.67}$	21,400
正常血清	$10^{-9.0}$		10^{-10}	

表 4 相互中和試驗 (二)

免疫血清	西北腦研 ₂ 病毒		乙型腦炎病毒	
	50% 致死度	中和指數	50% 致死度	中和指數
西北腦研 ₂	—	—	$10^{-4.84}$	6920
乙型腦炎	$10^{-7.0}$	<1000	—	—
正常血清	$<10^{-9.0}$	—	$10^{-8.68}$	—

3. 相互自動免疫試驗

西北腦研₁ 免疫鼠對西北腦研₁ 病毒及乙型腦炎病毒的保護指數，都在 100,000 以上；乙型腦炎免疫鼠對西北腦研₁ 病毒的保護指數，也在 100,000 以上，都有顯著的相互自動免疫作用。如表 5：

表 5 相互自動免疫試驗

免疫鼠組	西北腦研 ₁ 病毒		乙型腦炎病毒	
	50%致死度	保護指數	50%致死度	保護指數
西北腦研 ₁ (28)	$<10^{-4.0}$	$>100,000$	$<10^{-4.0}$	$>100,000$
乙型腦炎 (16)	$<10^{-4.0}$	$>100,000$	—	—
正常小鼠 (32)	$10^{-9.0}$		$10^{-9.0}$	

4. 相互補體結合試驗：

西北腦研 1—5 及乙型腦炎免疫血清對西北腦研 1—5 及乙型腦炎抗原，相互的進行補體結合試驗，都呈顯著的陽性反應。如表 6：

表 6 相互補體結合試驗

免疫血清	抗					原	
	西北腦研 ₁	西北腦研 ₂	西北腦研 ₃	西北腦研 ₄	西北腦研 ₅	乙型腦炎	正常鼠腦
西北腦研 ₁	1:64	1:64	1:64	1:64	1:128	1:32	—
西北腦研 ₂	1:32	1:64	1:64	1:32	1:32	1:64	—
西北腦研 ₃	1:32	1:32	1:64	1:32	1:32	1:16	—
西北腦研 ₄	1:32	1:32	1:64	1:32	1:32	1:32	—
西北腦研 ₅	1:64	1:32	1:32	1:32	1:64	1:16	—
乙型腦炎	1:32	1:64	1:64	1:8	1:32	1:16	—

〔附註〕

1. 免疫血清都是用乙型腦炎（京衛研₁）及所分離的西北腦研 1—5 病毒，製成懸液，注射家兔腹腔免疫製造而成。
2. 乙型腦炎抗原及正常鼠腦抗原都是由中央發給，為中國協和醫學院細菌免疫學系製造。
3. 西北腦研 1—5 抗原由本組自行製造，按 Casals 氏乙醚醋酐法粗製而成，經檢定並對照試驗結果，可以代替應用。

根據上列試驗結果，西北腦研₁，西北腦研₂，西北腦研₃，西北腦研₄，西北腦研₅，五株病毒，都與乙型腦炎（京衛研₁）在免疫學上有着密切的關係，而同屬一型。

討 論

所有分離及鑑別病毒試驗中所用的小白鼠，都是由我們的動物管理室自行繁殖，室內防蚊設備齊全，鼠罐鼠箱都是用細銅絲所製蓋蓋嚴，沒有昆蟲孳生；並在進行腦炎病毒分離試驗以前，試驗室內沒有腦炎病毒毒種，也未作過任何腦炎病毒試驗，乙型腦炎（京衛研₁）病毒是由 5 株腦炎分離出來後，才由北京要來開啓供鑑別應用，所以這五株病毒不可能因實驗室內不小心而感染，而是由患者腦組織內分離出來的。

小白鼠對乙型腦炎病毒非常敏感，從腦炎死亡患者的腦組織內分離病毒時，第一代即可使小白鼠發病死亡；病毒傳代後，小白鼠的發病及死亡期亦隨之縮短^[2]。15 代之後則潛伏期固定在 3 天左右，小白鼠感染後皆顯示典型的腦炎症狀^[7]。我等在分離西北腦研 1—5 試驗中，極大多數小白鼠在腦內注射後第 5—6 天死亡，僅西北腦研₁自死亡患者延髓穿刺採取腦組織，腦內接種小白鼠 4 隻中，只有一隻在第 11 天死亡，但經鼠腦內一二次傳代後，死亡日期則短縮至 4—5 天（表 1，病例 7）。所有 5 株病毒鼠腦傳代後，潛伏期逐漸縮短，15 代以後則都固定在 3 天左右。

此次分離出 5 株病毒試驗中，3 株病毒由屍體解剖 8 例中採取腦組織分離出來的，2 株病毒是按中央衛生研究院的延髓穿刺術，於 4 例疑似腦炎死亡患者採取腦組織分離出來的。這說明延髓穿刺採取腦組織分離病毒，是可以和屍體解剖同樣得到應有的陽性結果；是符合宋幹、李佩筠、黃禎祥三氏^[8]的說法：在沒有屍體解剖條件的醫院，或死者家屬不同意，無法爭取作屍體解剖時，延髓穿刺術是一種簡易而有實用價值的分離腦炎病毒的方法，是值得推廣採用的。

病毒分離試驗成功與否，要看病人病程的長短，由發病到死亡的時期，如果不超過 5 天，則很容易分離出病毒，其時間愈長，分離病毒的機會也愈少^[9]。黃氏等^[2]分離出的“京衛研 1—3”病毒，2 例病程是 5 天，1 例第 6 天，都是死亡當天作分離試驗的。作者分離試驗 12 例中，其中屍體解剖 8 例中，除有 2 例經郭劉二氏^[10]檢查病理變化結果證明不是腦炎，10 例中 5 例為陽性，陽性 4 例的

病程都在 5 天以內，(3, 5, 5, 4,)，1 例在第 6 天。陰性 5 例中，病程都是超過 5 日，其中 2 例病程都遲至第 19 天及第 44 天，這個結果符合 Hammø 氏的說法。

病毒的鑑別，可以用動物感染範圍試驗來作初步鑑別，用免疫試驗作最後鑑別^[1]；最後鑑別試驗中，用任何一法來作鑑別，都是可靠的^[2]。西北腦研₁ 病毒鑑別試驗中，不論相互中和試驗，相互自動免疫試驗，相互補體結合試驗，都得到一致的結果，證明是屬“乙型”腦炎病毒；西北腦研₂ 經中和試驗和相互補體結合試驗的結果也相同，西北腦研₃，西北腦研₄，西北腦研₅ 僅用相互補體結合試驗來作最後鑑別，結果也是一樣。雖然因條件關係沒有將聖路易型腦炎病毒作對照鑑別試驗，但根據國內根本沒有這種腦炎的報告，和以往學者^[2] 鑑別的結果，以及本次各種鑑別試驗中的效價，都達到顯著的高度，所以西安市所分離的 5 株腦炎病毒，屬於“乙型”是無可疑間的。

西北腦研₁₋₅ 5 株病毒感染小白鼠，發病死亡後，經第四軍醫大學病理學系檢查結果，中樞神經系統病理變化都與人類相同。

結 論

(一) 1952 年由西安市流行性腦炎死亡患者分離出 3 株腦炎病毒，由長安縣死亡患者分離出 2 株腦炎病毒，定名為“西北腦研₁”，“西北腦研₂”，“西北腦研₃”，西北腦研₄”，“西北腦研₅”病毒。

(二) 5 株病毒中，3 株是由屍體解剖採取腦組織所分離，2 株是由延髓穿刺採取腦組織所分離。

(三) 經動物感染範圍試驗，相互中和試驗，相互自動免疫試驗，相互補體結合試驗，都證明“西北腦研₁”屬於“乙型”腦炎病毒，“西北腦研₂”作了相互中和試驗及相互補體結合試驗，“西北腦研₃”，“西北腦研₄”，“西北腦研₅”作了一次相互補體結合試驗，也證明同屬一型。

本試驗由盧璠，劉剛、建武緒等同志協助工作，特此致謝。

參 考 文 獻

[1] Yen C. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1941, 46: 602.

[2] 黃植祥，王逸民：中華醫學雜誌，1951，37:230。

[3] 東北人民政府衛生部：1951 年東北防治流行性“乙型”腦炎總結，(2) 病原的研究，17 頁 1952。

- [4] 西北衛生部材料。
- [5] 汪美先, 徐漢傑, 甄桂芳: 中華醫學雜誌, 1952, 38: 1072—1077。
- [6] 中央衛生部防疫處: 流行性“乙型”腦炎的防治, 1952, 28—67, 健康報社。
- [7] 王逸民, 柳元元, 黃禎祥: 中華醫學雜誌, 1952, 38: 1066。
- [8] 宋幹, 李佩筠, 黃禎祥: 中華醫學雜誌, 1952, 38: 1029—1032。
- [9] Hammon, W. McD. Diagnostic procedure for Virus & Rickettsial diseases, 1st. Edition. P, 187, Amer. Pub. Heal. Ass. 1948.
- [10] 郭鶴, 劉彥仿: 西安市 1952 年流行性腦炎的病理變化。
- [11] 黃禎祥: 腦炎病毒類型的鑑別, 中華新醫學報 1 卷 1 期, 1950。

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS IN SIAN

WANG MEI-HSIEN, HSU HAN-CHI

Department of Bacteriology, Fourth Military Academy of Medicine

CHENG KUEI-FANG

Northwest Hygienic Institute

1. In 1952, it has been successful to isolate three strains of encephalitis virus from patients who died of epidemic form of the disease in Sian, and 2 strains from those who died in Changan. These are labelled N-W encephalitis strains 1-5 respectively.

2. Three of the above strains were isolated from materials obtained from the brain at post-mortem examination, and two isolated from materials aspirated through puncture of the cisterna magna after the death of the patient.

3. All five strains were definitely identified to be Japanese B virus by the following criteria: range of animal pathogenicity, cross neutralization test, cross protection test and cross complement fixation test with the standard Japanese B strain.