

由大連市區住宅與牛舍蚊體中分離出流行性乙型腦炎病毒

魏文彬 李劫 張宗葆 孫鐸

(大連生物製品所病毒研究室及醫學昆蟲研究室)

在流行性乙型腦炎流行期間，由自然界捕蚊分離流行性乙型腦炎病毒，曾有三田村氏等^[1,2]在日本自淡色庫蚊 (*Culex pipiens* var. *pallens*) 及三帶喙庫蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*) 分離出病毒；在蘇聯，Petrisheva 和 Shubladze 二氏^[3]於遠東濱海區自淡色庫蚊及三帶喙庫蚊中分離出病毒；在我國，黃禎祥、鄭雲凱二氏^[4]報告在北京市區內從自然界捕獲之淡色庫蚊蚊體中分離出病毒。在我國，除了北京之外，其他城市或地區還沒有類似的報告。

爲了證實旅大市的自然界成蚊是否同樣的可在乙型腦炎流行期間攜帶病毒，作爲今後我國預防乙型腦炎在撲滅蚊子問題上的根據。本文作者張宗葆及孫鐸二氏^[5]於1953年在大連市區做了各種蚊種季節分佈的調查，並對指定的住宅及牛舍各一處的蚊種季節分佈的情況做了詳細的分析。與這項工作的同時，對捕獲的各種蚊種亦做了分離病毒的試驗。今將分離病毒工作的情況報告如下。

材 料 和 方 法

捕蚊方法

在市區各處選擇合宜而固定的捕蚊站，特別注意於一乳牛場內同一院落的住宅一棟及牛舍一處，規定每天早晨6—7時左右捕捉蚊子一次。在其他捕蚊站的捕蚊工作亦固定在早晨或黃昏。每次捕蚊時間爲半小時左右，在試驗期間每天風雨無阻的去採集，從未間斷。採集蚊子用特製的吸蚊管^[5]；工作時每次攜帶蚊籠一隻，籠外罩以黑布袋。將捕獲之蚊放入籠內，攜回試驗室，按其種類分籠，分別檢查並作記錄。

病毒分離試驗

由各採蚊站收集的成蚊，以 10% 的蔗糖水或蜂蜜水分類飼養於蚊籠中。室溫維持到 20—30°C，蚊籠皆置於大瓦缸內，每缸內約放 10 隻左右，蚊籠上部蓋以濕毛巾或紗布，缸底則鋪潮濕細砂以維持濕度。大缸口則蓋以疏鬆的黑布，如此則溫度及濕度均易維持，同時亦有足夠的空氣，不致窒死蚊子。已吸過血的蚊子須飼養 1—2 週後方開始用作試驗，未吸血或吸血後已消化的蚊，儘速的進行病毒分離工作。

用吸燃的香煙所放出的煙霧將蚊燻死，置於小乳鉢中研磨，按蚊數每隻加 0.3 毫升 pH 7.6 的牛肉湯製成懸液。按懸液的容量每毫升加青黴素 500—1,000 單位及鏈黴素 1,000—2,000 單位以抑制蚊體的雜菌，並取小部分的懸液分別接種瓊脂斜面及肉湯各一管培養於 37°C 孵卵器內。原有懸液則置於 0—5°C 冰箱中過夜，次晨檢查接種之培養基，如無雜菌，則將懸液置離心機中以每分鐘 4,000 轉速度沉澱 20 分鐘，取上清液注射於體重 4 克以上 9 克以下的小白鼠腦腔內，每隻注射 0.03 毫升，此外又注射於腹腔內，每隻 0.3 毫升。每樣品接種小白鼠 3 隻。

小白鼠經接種後觀察 21 天。接種後在 48 小時內死亡的均棄去。接種後 3—21 天，凡呈現震顫、抽風等中樞神經症狀的小鼠即殺死之，並以無菌手續剖取腦組織。在小乳鉢中將鼠腦研碎，加肉湯稀釋之，使其成 10% 懸液，再注射於 3 隻小白鼠的腦腔內，每鼠注射量為 0.03 毫升。如第 2 代的小白鼠潛伏期縮短，發病症狀典型，則繼續傳代 1 次。第 3 代發病的鼠腦即用作製造抗原。抗原之製造法係採用 Casals 氏^[6]交互冰凍融解法。抗原製成後即與流行性乙型腦炎豚鼠免疫血清進行補體結合試驗。第 2 代或第 2 代以後發病的小白鼠則取其腦與標準家兔免疫血清行中和試驗。

成蚊刺咬乳鼠病毒分離試驗

將捕獲的成蚊分類置於蚊籠中，不予喂食。凡未吸血的蚊即儘速進行刺咬試驗，凡已吸了血的蚊等到血液消化後方開始進行試驗。將體重 3—4 克尙未斷奶的乳鼠置於蚊籠中過夜，使餓蚊刺咬，次日晨取出，還置母鼠罐中繼續哺乳。如乳鼠發病則剖取其腦冰凍保存，留待鑑別病毒試驗之用。乳鼠發病的觀察期限為 21 天，到此期限如小鼠未發生任何症狀，不再繼續觀察亦不再進行鼠腦盲目傳代，試驗亦告終止。

已吸過乳鼠血的蚊子，立即研磨，懸液經過抗生素處理後，則注射小白鼠以圖分離病毒。

補體結合試驗的豚鼠免疫血清是用 1952 年由旅大市一腦炎死亡者腦組織中分離出的病毒進行豚鼠腦腔內免疫製備的。該病毒名 # 22^[7]，業經北京中央防疫委員會轉請有關專門試驗室鑑定為流行性乙型腦炎病毒。本篇內所採用的補體結合試驗係 Casals 氏^[8]微量法。

中和試驗的家兔免疫血清是用“京衛研”乙型腦炎病毒注射家兔製備的。該毒種是由瀋陽中國醫科大學取來的，據云最初的來源為北京。中和試驗係採用“流行性乙型腦炎的防治”^[8]一書上所描述的方法。

本試驗所用的小白鼠均係在本所的小動物室內繁殖飼養的，該室有防蚊裝置。我們的兩間進行試驗的試驗室和單獨設立的感染動物室亦裝有防蚊設備。

為了避免試驗室保存的已知乙型腦炎毒種與新由蚊體分離的毒種混淆起見，在工作進行中一切試驗的安排，均有專人負責。

試 驗 結 果

自 1953 年 6 月下旬至 9 月底約三個多月的期間，我們對大連市各捕蚊站、固定的住宅及牛舍各一所所捕獲的成蚊進行了病毒分離試驗。所採用的蚊種有 7 種，庫蚊屬 3 種：三帶喙庫蚊，淡色庫蚊，二帶喙庫蚊；伊蚊屬 3 種：騷擾伊蚊日本變種，東鄉氏伊蚊，點背伊蚊；瘧蚊屬 1 種：中華按蚊。分離病毒試驗採用了兩種方法：（一）研磨成蚊分離病毒試驗——共進行了 190 批試驗，用的蚊數為 6,855 隻，祇在兩批中分離出兩株病毒（表 1）；（二）成蚊刺咬乳鼠分離病毒試驗——共進行了 5 批試驗，用的蚊數為 140 隻，結果全為陰性。合計用此兩種方法分離病毒共進行了 195 批試驗，用去蚊數為 6,995 隻。試驗情形見表 1。

第一株病毒 # 227 分離及鑑定的結果

我們在大連市嶺前區一個牛乳廠的牛舍內進行了捕蚊的工作，對捕獲來的三帶喙庫蚊、淡色庫蚊、二帶喙庫蚊、騷擾伊蚊日本變種 共成蚊 2,100 隻，進行了 51 批研磨成蚊分離病毒試驗。結果由一批（試驗批號 # 227）的 15 隻三帶喙庫蚊中分離出第一株病毒。在上述捕獲蚊子總數內有 1,439 隻三帶喙庫蚊，對此種蚊的病毒分離試驗共進行了 31 批。

表1 分離病毒所採用的蚊種

蚊種	捕蚊地點		牛舍		住宅		其他捕蚊站		總計	
	批數	蚊數	批數	蚊數	批數	蚊數	批數	蚊數	批數	蚊數
三帶喙庫蚊 <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	31#	1,439	—	—	20	1,198	51	2,637		
淡色庫蚊 <i>Culex pipiens var. pallens</i>	2	70	16*	411	50	1,615	68	2,096		
二帶喙庫蚊 <i>Culex bitaeniorhynchus</i>	1	7	—	—	—	—	1	7		
騷擾伊蚊日本變種 <i>Aedes vexans var. nipponii</i>	17	584	—	—	30	1,181	47	1,765		
東鄉氏伊蚊 <i>Aedes togoi</i>	—	—	—	—	14	140	14	140		
點背伊蚊 <i>Aedes dorsalis</i>	—	—	—	—	7	174	7	174		
中華按蚊 <i>Anopheles hyrcanus var. sinensis</i>	—	—	7	176	—	—	7	176		
總計	51	2,100	23	587	121"	4,308	195	6,995		

備註：* 由牛舍內捕獲的1批（# 227）15隻三帶喙庫蚊蚊體中分離出一株病毒，經補體結合試驗及中和試驗證明為流行性乙型腦炎病毒。

* 由住宅內捕獲的1批（# 285）50隻淡色庫蚊蚊體中分離出一株病毒，經補體結合試驗及中和試驗證明為流行性乙型腦炎病毒。

" 其中有5批：三帶喙庫蚊1批、淡色庫蚊3批、騷擾伊蚊日本變種1批，曾做刺咬乳鼠分離病毒試驗，皆為陰性。

捕獲試驗批號 # 227 的成蚊日期為 1953 年 7 月 22 日（大連市腦炎流行前），該批蚊數為 15 隻，經昆蟲學鑑定屬於三帶喙庫蚊，乃於 7 月 24 日進行研磨並注射小白鼠 3 隻。第一隻小白鼠於 7 日後發病（其餘 2 隻小白鼠經觀察 3 週無恙），表現有中樞神經系統患病症狀，乃立即將該小白鼠殺死剖取其腦進行傳代，計用小白鼠兩隻，其一於 4 日後發病，另一鼠於 5 日後發病，病毒傳至此為第 2 代；將第 2 代小鼠腦剖出後再傳代至第 3 代小白鼠，病毒之潛伏期縮短為 3 日。取第 3 代小鼠腦用 Casals 氏交互冰凍融解法製成抗原，如此製成之抗原與乙型腦炎病毒豚鼠抗血清進行補體結合試驗。# 227 鼠腦抗原在 1:8 稀釋度時呈 (+++) 陽性補體結合現象。取第 3 代的小鼠腦經 Seitz E. K. 石綿濾過板

過濾，其濾液注射於小鼠腦腔內，可使小鼠於 3—4 日後發生腦炎症狀而死亡。# 227 傳代至第 7 代的小鼠腦，其毒力以 50% 致死量 (LD_{50}) 計為 $10^{-7.5}$ 。本病毒與抗“京衛研”腦炎病毒家兔免疫血清進行中和試驗，其中和指數為 408。根據這些結果，本病毒 # 227 鑑定的結果為流行性乙型腦炎病毒。

第二株病毒 # 285 分離及鑑定的結果

上一段所敘述的在同一乳牛場的一間住宅內我們亦曾進行了捕蚊的工作，對捕獲的淡色庫蚊、中華按蚊共 587 隻成蚊，進行了 23 批研磨成蚊分離病毒試驗。結果由一批（試驗批號 # 285）50 隻淡色庫蚊中分離出第二株病毒。上述的捕蚊總數內有 411 隻屬淡色庫蚊，用此種蚊進行的分離病毒試驗有 16 批。

捕獲試驗批號 # 285 成蚊的日期為 1953 年 8 月 31 日（正當旅大市 1953 年流行性乙型腦炎流行的中期），該批捕獲的蚊數為 50 隻，因蚊腹無血，當日即進行研磨並注射了 3 隻小白鼠。第一隻小白鼠於 14 日後夜間死亡未曾觀察到發病的情況（其餘兩隻小鼠經觀察 3 週無恙），次晨將死鼠的腦剖出，經培養無細菌生長後，乃傳代至第 2 代小白鼠，小白鼠於 17—19 天後發病；傳代至第 3 代，小白鼠潛伏期為 10—12 天；至第 4 代為 6 天；自第 5 代起潛伏期為 4—5 天。第 3 代小鼠腦曾用 Casals 氏交互冰凍融解法製成抗原。如此製成之抗原與乙型腦炎病毒豚鼠抗血清進行補體結合試驗。# 285 鼠腦抗原在 1:8 稀釋度時呈 (+++) 陽性補體結合現象。# 285 傳代至第 6 代的小鼠腦病毒，其 50% 致死量為 $10^{-7.7}$ ，與抗“京衛研”腦炎病毒家兔免疫血清舉行中和試驗，其中和指數為 1,460。因此 # 285 病毒經鑑定的結果為流行性乙型腦炎病毒。

討 論

1953 年我們在大連市區一牛舍內所捕獲的三帶喙庫蚊蚊體中分離出一株病毒，以後又在與該牛舍毗鄰的人的住宅內所捕獲的淡色庫蚊蚊體中分離出另一株病毒。這一項工作的目的是要瞭解自然界成蚊攜帶流行性乙型腦炎病毒的情況，以供流行病學的參考。我們在進行工作中特別注意到應避免“試驗室內污染”的問題，因此在一切試驗的安排上無論是在人員專責工作方面以及動物室的設備方面都嚴格的與試驗室內已知的流行性乙型腦炎病毒分開，所使用的小白鼠亦係由裝有防蚊設備的動物室供給。由蚊體懸液接種於第 1 代小白鼠即能使一部分小白鼠發病或死亡，使我們相信這兩株病毒的來源係來自蚊體。至於

其餘的小白鼠在第 1 代觀察期間 (21 天) 沒有發病, 可能是因為自然界的成蚊體內病毒含量較低的緣故, 這一點當然有待於試驗的證明, 但亦可從歷來各學者由自然界捕獲的成蚊中殊少分離出病毒的事實來說明。這兩株來自蚊體的病毒經補體結合試驗和中和試驗證明皆為流行性乙型腦炎病毒。由自然界捕獲的三帶喙庫蚊蚊體中分離出流行性乙型腦炎病毒的報告在我國尚為第一次。

1953 年夏秋二季大連市區內曾有流行性乙型腦炎的流行。該次流行的開始日期至遲亦應為 8 月 3 日, 因為我們曾由一位於 8 月 3 日發病 8 月 9 日死亡的腦炎患者的腦組織中分離出 1953 年的第一株人體來源的腦炎病毒; 另外, 1953 年最初兩例陽性補體結合反應的患者的發病日期都是 8 月 9 日, 均較 8 月 3 日為遲^[10]。1953 年 7 月 22 日, 亦就是大連市流行性乙型腦炎流行前的 13 天, 我們在大連市嶺前區一牛舍內所捕獲的 15 隻三帶喙庫蚊蚊體中即已分離出第一株蚊體來源的流行性乙型腦炎病毒。有趣的是我們在腦炎流行中期, 8 月 31 日, 由與該牛舍毗鄰的人的住宅內所捕獲的 50 隻淡色庫蚊蚊體中分離出第二株蚊體來源的腦炎病毒。經調查, 我們發現與這所牛舍和住宅相距約 1 公里的一家住宅內有一位老太太於 8 月 23 日發病, 8 月 27 日死於旅大市傳染病院, 臨床診斷為流行性乙型腦炎, 因死亡患者的家屬不同意做屍體解剖, 未能做分離病毒工作。

根據本文作者張、孫二氏^[5]在此牛舍和住宅調查各種蚊種季節分佈的結果, 發現在牛舍內以三帶喙庫蚊為最多, 住宅內以淡色庫蚊為最多。三帶喙庫蚊在牛舍內的頂峯是在 7 月下旬與 8 月上旬之間, 淡色庫蚊在住宅內的頂峯是在 8 月中旬及下旬之初。我們由這兩種蚊體內分離出兩株腦炎病毒的時間亦恰好在這兩種蚊子的頂峯時間之內, 這在流行性乙型腦炎的流行病學上是有重要意義的。因為根據蘇聯學者列夫 (Лев) ^[11] 的意見, 流行性乙型腦炎的流行有兩個輪環: 動物間流行之環與人羣中流行之環, 前者之流行較後者之流行為早, 而蚊則為其傳播媒介。我們由蚊體分離病毒的工作確已證實了列夫的說法的正確性。我們在以三帶喙庫蚊佔多數的牛舍內亦曾發現淡色庫蚊, 同樣的人的住宅內雖以淡色庫蚊佔多數但亦能發現三帶喙庫蚊, 因此我們推論動物間與人羣中病原體的傳播可能由於此兩種蚊的媒介。

根據蘇聯學者 Петрищева 氏^[12]的意見: 蚊子吸過流行性乙型腦炎病毒可以越冬, 一直到明年春季再刺咬人和動物。最初病毒在蚊體內量少毒力較弱; 等

到天氣逐漸溫暖，蚊子刺咬人和動物的次數逐漸增多，病毒在蚊子體內的量亦就逐漸增多而病毒的毒力亦逐漸增強。因此極易造成流行性乙型腦炎的流行擴張的後果。可惜我們在 1953 年從事於由自然界捕獲成蚊分離病毒工作遲至 6 月方纔開始，沒能在腦炎流行季節很久以前即開始這項工作從而可能由蚊體中分離出一株毒力較弱的病毒。而我們在 1953 年腦炎開始流行前由三帶喙庫蚊蚊體中分離的第一株病毒，其毒力以 50% 致死量計為 $10^{-7.5}$ ，在腦炎流行期中，由淡色庫蚊蚊體中分離的第二株病毒其毒力為 $10^{-7.7}$ 。這兩株來自蚊體的病毒的毒力都是相當強的。本年有的結果不足以證實 Петрищева 氏的說法，我們希望能在另一個年度能有機會多搜集一些資料。

在 1953 年大連市流行性乙型腦炎流行末期中，我們沒能由自然界捕獲的成蚊中分離出病毒，這個試驗結果與 Hammon 氏^[13]、三田村和黃禎祥等的經驗相同。我們同意黃、鄭二氏^[14]的意見和解釋，即當“流行開始以後，動物因得了不顯性感染，同時有免疫力的動物數量也增加了。因此就有許多蚊蟲吸了有免疫性的血清，致形成很多中和病毒的機會”。關於這一點，當然還需要進一步做試驗來證實。

結 論

1. 1953 年於流行性乙型腦炎流行之前，在大連市區自一牛舍內捕獲的三帶喙庫蚊蚊體中分離出一株病毒。在腦炎流行中期，自與該牛舍毗鄰的人的住宅內捕獲的淡色庫蚊蚊體中分離出另一株病毒。此二株病毒經補體結合試驗及中和試驗證明皆為流行性乙型腦炎病毒。

2. 分離此二株病毒的時間與三帶喙庫蚊在牛舍中以及淡色庫蚊在住宅中季節分佈曲線的高峯是一致的，此點在本地區流行性乙型腦炎的流行病學上有重要意義。關於流行性乙型腦炎病毒如何可能藉三帶喙庫蚊及淡色庫蚊在動物間及人羣間傳播，亦有所討論。

3. 本文討論了在流行性乙型腦炎流行的末期未能由蚊體中分離出病毒的理由。

參 考 文 獻

- [1] 三田村篤志郎、森和雄、北岡正見、天神智：東京醫事新誌，1938，62：812。
- [2] 三田村篤志郎、森和雄、北岡正見、天神智：東京醫事新誌，1938，62：820。
- [3] Petrischva, P. A., Shubladze, A. K. *Arch. Sci. Biol.*, 1940, 59: 72.
- [4] 黃韻祥、鄭雲凱：中華醫學雜誌，1951，37：296—299。
- [5] 張宗葆、孫鐸：1953年大連市區住宅與牛舍蚊種季節分佈調查報告。微生物學報，1954，2(2)：125—135。
- [6] Casals, J. *Jour. Immunol.*, 1947, 56: 337-341.
- [7] 待發表材料。
- [8] 中央衛生部防疫處：“流行性乙型腦炎的防治”。1952，38—57，健康報社，北京。
- [9] 袁冠華：個人談話。
- [10] 未發表材料。
- [11] 蘇聯專家列夫氏與作者談及。
- [12] Петришчева, П. А. (Petrischva, P. A.), 1952年演講。
- [13] Hammon, W. McD., Tigertt, W. D., Sather, G., Schenker, H., *Am. Jour. Hyg.*, 1949, 50: 51.

ISOLATION OF JAPANESE TYPE B ENCEPHALITIS VIRUS FROM MOSQUITOES

WEI WEN-PIN, LI CHIEH, CHANG TSONG-PAO, SUN TAO

Virus and Medical Entomology Laboratories, National Serum and Vaccine Institute, Dairen

1. Just prior to an outbreak of Japanese B encephalitis in Dairen, a strain of virus was isolated from a pool of *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes collected in a cow shed in Dairen. Another strain of virus was isolated from a pool of *Culex pipiens* var. *pallens* collected in a human dwelling situated in the neighbourhood of the cow shed during the middle of the epidemic. Both virus strains were identified as Japanese B encephalitis virus by complement fixation and neutralization tests.

2. The time in which the Japanese B encephalitis virus strains were isolated from mosquitoes coincided with the height of seasonal distribution of the mosquitoes in Dairen. These findings had an important bearing on the epidemiology of Japanese B encephalitis in this part of China. The rôle that *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex pipiens* var. *pallens* might play in disseminating Japanese B encephalitis virus among animals and human beings was elucidated.