

長沙市流行性腦炎病原的研究

II. 長沙市 1953 年流行性“乙型”腦炎 患者的血清補體結合試驗

吳潔如 何方麗 陳惠青 劉秉陽

(湖南醫學院細菌免疫學科)

目前鑑定流行性腦炎病原的方法，可依據：(一)從疑似患者的腦脊液、血液或病死者的腦組織中分離病毒，再行鑑定；(二)採取疑似患者的病早期和恢復期的血清，做中和試驗或補體結合試驗。如欲從疑似患者血液或腦脊液中^[1]分離病毒，雖有可能，但受一定限制，陽性率很低。用中和試驗來助診斷，雖屬可靠，但所耗動物甚多，且非一般實驗室的設備所能做到；用補體結合試驗的方法，來確定流行性腦炎的病原，較上述方法為簡便，在國內且經宋氏^[2]等的研究，認為其結果具有高度特殊性，因此大有助於流行性腦炎病原的實驗室診斷。吾人過去二年來的工作經驗亦證實此點。茲將流行中經臨症診斷為腦炎的病例血清補體結合試驗的結果，作一概括性的報導。

材 料 和 方 法

(一) 抗原：用醋酮及乙醚按一般浸漬法^[3,4]製備，但係以每分鐘 4,500 轉旋速離心沉澱法經 2 小時(離心沉澱時，將離心器放置冰箱內)代替每分鐘 10,000 轉旋速離心沉澱 1 小時的常規方法。我們所用的標準“乙型”腦炎病毒是於 1952 年春季中央衛生研究院所分給的毒種。供對照用的正常鼠腦是採用與感染動物的年齡體重相似的動物腦，並以同法製備。抗原製備後，用流行性“乙型”病毒免疫血清滴定其抗原性效價，證明在試驗中最適宜的稀釋度為 1:16 或 1:32，但實際採用的稀釋度為 1:8 或 1:16。

(二) 患者血清：於患者空腹時，用無菌技術採取血液，立即用冷藏裝置送

至實驗室，及時分出血清，於 0—4°C 冰箱中保存之（保存期限，一般不超過 2 星期）。試驗前將血清加熱至 60°C 經 20 分鐘滅能。從大多數患者均採取了兩次以上的血清，但也有因實際困難，不能獲得第二次血清供檢驗的。

(三) 補體：用自豚鼠採取的新鮮血清，以含 10% 雞蛋清^[5]的生理鹽水稀釋之。滴定補體時，加入試驗中所用的抗原，在試驗中補體均用兩個確實單位。

(四) 溶血系統：綿羊紅血球經洗淨血清後，以生理鹽水作成 1% 的稀釋液，溶血素用兩個溶血單位。

(五) 試驗方法：用 Casals 氏微量法^[4,6]進行檢驗，試驗中液體總量為 0.6 毫升，稀釋血清一般由 1:2—1:32，或用更高倍的稀釋。每一患者血清均分別加入“乙型”病毒抗原，正常鼠腦對照和血清對照。每次試驗時都用陽性血清和陰性血清供對照，並用抗原對照包括各種不同單位的補體量（如 0.5 確實單位、1 確實單位、1.5 確實單位和 2 確實單位），溶血系統對照（同樣包括各種不同單位的補體量）及綿羊紅血球對照。

(六) 試驗結果及解釋：

完全不溶血……以“++++”表示。

不完全溶血……各種不同程度的不溶血以“+++、++、+、±”表示。

完全溶血……以“-”表示。

記錄時通常以“++”反應管的血清稀釋度作為滴度記錄結果。

解釋結果時，一般將 1:2 血清稀釋度的陽性反應結果認為可疑，將 1:4 或更高血清稀釋度的陽性反應作陽性結果解釋。

結 果

在 1953 年長沙市腦炎流行中，我們共檢驗疑似患者血清 207 份，凡 113 例，其中經臨症分析最後診斷為腦炎患者的有 66 例（此外尚有 2 例血清為陽性反應，但因臨症方面的分析不詳，未能列入）。在此 66 病例中有 3 例因其血清有抗補體的作用，無肯定的結果，故未列入。下面僅就 63 例臨症係典型腦炎患者的 133 份血清，作為本報告分析的材料。

按照血清採取時患者在病程中的日數分類（見表 1）。由表 1 可見血清補體結合陽性反應出現的時間各有不同，最早的在發病後第 4 日血清中即有特殊性補體結合抗體產生，最遲的至患病後的第 58 日血清中才有可測出的特殊性抗體出

現。但一般說來，患病後日數愈久，血清呈陽性反應的愈多。

表 1 臨床診斷腦炎患者血清補體結合試驗結果
(按血清係於患病日程中採取時間分類)

病程中日數	陽性反應數 (1:4 以上)	可疑反應 (1:2)	陰性反應數	總血清數
0-4	1	0	22	23
5-7	0	0	18	18
8-14	1	0	15	16
15-21	3	1	17	21
22-28	8	3	8	19
29-42	21	1	3	25
43-56	2	0	3	5
57 及以上	3	1	2	6
總反應數	39	6	88	133

若以病例數為標準，按照取血時患者病程中日數分類，當 1 例有兩次以上血清送驗時，如其中有一次呈陽性反應，則按該陽性反應血清採取時患病日數分類；如有兩次以上陽性反應時，則按最先發生陽性反應的血清採取時病程中日數分類；如數次血清反應均為陰性，則按最末一次血清採取時病程中日數分類，結果如表 2：

表 2 臨床診斷為腦炎患者血清補體結合試驗的結果
(依病例為標準按患病日數分類)

患病日數	陽 性 (1:4 以上)	可疑 (1:2)	陰 性			總病例數
			僅取 1 次 血的	死亡過早未取 得第 2 次血的	取血 2 次 以上的	
0-4	1	0	3	4	0	8
5-7	0	0	3	1	0	4
8-14	1	0	2	1	1	5
15-21	3	0	0	0	5	8
22-28	8	0	0	0	4	12
29-42	16	0	0	0	1	17
43-56	1	0	0	0	2	3
57 及以上	3	1	0	0	2	6
總 數	33	1	8	6	15	63

從表 2 可以看出在被檢驗的 63 例腦炎患者中，有 52% 的患者於病愈期及病後其血清呈顯著的陽性補體結合反應。

如以病例為標準，依積累和計算法推算（即如 1 病例在病程中日數少時採取的血清為陽性，在此以後採取的血清也應當為陽性；而在病程中日數多時採取的血清如為陰性，則在此以前採取的血清也當為陰性。按照此理，將陽性反應的血清從患病日數少的向患病日數多的逐次累加；而將陰性反應的血清從患病日數多的向患病日數少的逐次累加）結果如表 3。

表 3 臨床腦炎患者血清補體結合試驗的結果
(用積累和法推算各不同患病期陽性反應可能數)

患病日數	假定病例 總數	可能 陽 性		可能 陰 性	
		例 數	百分數	例 數	百分數
0—4	30	1	3.3	29	96.7
5—7	23	1	4.3	22	95.7
8—14	20	2	10	18	90
15—21	19	5	26.3	14	73.7
22—28	22	13	59	9	41
29—42	34	29	85.2	5	14.8
43—56	34	30	88.2	4	11.8
57 及以上	35	33	94.2	2	5.8
總 計	217	114	52.5	103	47.5

從表 3 可見患者病程中日數愈長，血清補體結合反應的陽性百分率也愈高，並且一般在患病後第 4 週即已有半數以上的患者，其血清呈顯明陽性反應。

為了明瞭陽性反應出現的時期及其強弱與病程的關係，我們在不同的時期由病例中曾採取 2 次以上血清標本作補體結合試驗，結果詳見表 4 及表 5。

由表 4 可知，補體結合試驗在流行性“乙型”腦炎病人中，多於病程第 20 日以後開始陽轉，第 4 週時及以後尤為顯著。但由表 5 所示，於 29 例陰性補體結合反應中有 15 例（51%）曾經 2 次以上檢驗，第 2 次採取標本在病程的第 2 週以後至第 57 日，結果仍為陰性。

為了瞭解患者血清中是否有抗聖路易型腦炎病毒抗體存在，曾採用與“乙型”腦炎病毒抗原呈陽性補體結合反應之患者血清，同時與“乙型”腦炎病毒抗原及聖路易型腦炎病毒抗原（其製備方法與“乙型”病毒抗原同，病毒種係由中央衛生研究院於 1952 年春分給的）進行補體結合試驗，結果見表 6。

表 4 臨床腦炎患者血清補體結合陽性反應及可疑反應
轉變情況與病程日期間關係的分析

患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果		患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果		患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果		患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果		
		血清 反應	解釋			血清 反應	解釋			血清 反應	解釋			血清 反應	解釋	
2	3	—	陽性	17	4	—	陽性	35	5	—	陽性	63	9	—		
	31	1:32			21	1:8			30	1:64			15	—		陽性
3	4	—		19	4	—		36	8	—	陽性	64	5	—		
	14	—	陽性		36	1:16	陽性		24	1:16			14	—		
	28	1:4			51	1:16							21	—		陽性
6	9	—		20	5	—		40	4	—	陽性	106	17	—		
	22	1:32	陽性		15	—	陽性		31	1:8			28	1:2		陽性
	33	>1:64			29	1:32							35	1:4		
7	7	—	陽性	21	8	—		44	22	—	陽性	156	14	—	陽性	
	20	1:8			19	—	陽性		30	1:4			114	1:8		
					28	1:32										
10	4	—	陽性	23	5	—		49	6	—						
	27	1:8			27	1:32	陽性		22	1:2	陽性					
					35	>1:64			31	1:4						
11	3	—		25	3	—		52	4	—						
	17	—	陽性		11	—	陽性		29	—	可疑					
	30	1:4			29	1:8			60	1:2						
15	4	—	陽性	33	6	—		61	15	—						
	29	1:4			32	1:2	陽性		21	1:2	陽性					
					52	1:16			28	1:8						
16	6	—		34	8	—	陽性	62	6	—						
	15	—	陽性		30	1:128			24	1:2	陽性					
	29	1:4							35	1:8						

表 5 臨症腦炎患者血清補體結合陰性反應與病程中日期的分析
(曾送兩份以上血清者)

患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果		患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果		患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果		患者 檢驗號	患病 日數	試驗結果	
		血清 反應	解釋			血清 反應	解釋			血清 反應	解釋			血清 反應	解釋
5	4	—	陰性	65	15	—	陰性	105	4	—	陰性	225	3	—	陰性
	28	—			49	—			16	—			14	—	
14	4	—	陰性	66	5	—	陰性	107	6	—		288	15	—	陰性
	21	—			15	—			16	—	陰性		28	—	
27	3	—		68	10	—	陰性	112	9	—		294	6	—	陰性
	14	—	陰性		34	—			19	—	陰性		28	—	
37	7	—	陰性	102	27	—		113	6	—	陰性				
	18	—			50	—	陰性		16	—					
					61	—									

表 6 患者血清與“乙型”腦炎病毒抗原及聖路易型腦炎病毒
抗原補體結合試驗的結果

患者檢驗號	補 體 結 合 試 驗 結 果			
	與“乙型”腦炎病 毒抗原血清反應	與聖路易型腦炎病 毒抗原血清反應	與正常抗原血清反應	血清對照
35	1:64	1:2	1:2	—
104	1:256	—	—	—
163	1:64	1:4	1:2	1:2

雖然上述實驗中的病例不多，且 # 163 號血清因貯存過久，血清顯抗補體作用，不易獲得正確的結論，但也可初步看出 1953 年長沙市腦炎流行中，在臨症患者的血清裏，並不具有顯著的抗聖路易型腦炎病毒的補體結合抗體。

討 論

用補體結合試驗檢驗患者血清，藉以鑑定流行性“乙型”腦炎的病原，已經宋氏^[2]等的研究，認為具有高度的特殊性。根據上述 63 例臨症腦炎患者血清檢驗的結果分析，也證明了補體結合試驗對流行性“乙型”腦炎的診斷，確具有相當高的特殊性。

補體結合抗體在患者血液出現的時期並不一致，最早者可於患病後第 4 日血清中即已有顯著的特殊性抗體產生，最遲者於患病後之第 58 日血清中始具有可呈陽性反應的特殊補體結合抗體（另有 1 例，至病後之第 60 日血清中才開始呈顯陽性反應的特殊性抗體），但半數以上患者在患病後之第 4 週血清中已具有足量可以測出的抗體。按照累積和法推算，患者病後日數愈多，血清呈陽性補體反應的可能性愈高。根據 63 病例的結果分析，如果用血清補體結合試驗的方結法，來幫助腦炎的診斷以確定病原時，第 2 次採血以在患病後第 4 週至第 6 週之間最為適宜，如此時仍為陰性，最好在患病兩個月後，再行第 3 次取血檢驗。

用“乙型”腦炎病毒抗原及聖路易型腦炎病毒抗原與患者血清同時進行補體結合試驗的結果，證明長沙市 1953 年腦炎流行時的患者血清內的抗體，為對流行性“乙型”腦炎病毒的特殊性抗體。

在 1953 年腦炎流行中，已經從病死者的腦組織中分離出兩株流行性“乙型”腦炎病毒，確定了病原^[7]。由於上述血清補體結合試驗的結果，進一步證實了 1953 年長沙市腦炎流行中所發現的病例絕大多數為流行性“乙型”腦炎。

在 63 例中有 15 例經 2 次以上驗血仍屬陰性，其中有 4 例血液送驗日期，都在患病第 7 週以後（兩例在第 49 日，1 例在第 57 日，另 1 例在第 61 日）。像這樣呈陰性反應的標本，我們從檢驗本身作了反覆的檢查，證明陰性並非由於技術上的差誤所致。因此在研究這些陰性反應所示的意義時，我們必須考慮到兩點：（一）這些人產生抗體的能力可能比較弱些或慢些，在這種情況下，如能在患病兩月後或更遲時，採取血液再作補體結合試驗或同時加作中和試驗，則對於病原的確定將幫助大些；（二）這些人的感染可能不是由於“乙型”腦炎病毒所致，在長沙市“乙型”腦炎流行時，是否尚有其他類型腦炎病毒存在，還待今後進一步研究方能確定。此外在臨床上不易鑑別的非病毒性其他腦系疾病發生於腦炎流行季節中，亦值得吾人注意。

我們試驗中所用的抗原是按照醋酐乙醚浸漬法依我科實驗室的設備條件加以改良自行製備的。抗原製備後經過反覆的滴定並與北京所製的抗原比較，證明自製抗原不僅在試驗中具有高度的特殊性，而且也很敏感。

我們試驗中用含 10% 雞蛋清的生理鹽水稀釋補體，具有適當的優越性。不僅在滴定補體時，補體效價證明較不用此法處理的為高，因此可以節省補體；而且這樣稀釋的補體較為穩定，不致產生不規則的結果，因此保證了並提高了結果

的正確性。

總 結

1. 本文分析了長沙市 1953 年腦炎流行中臨症 63 病例補體結合試驗的結果，證明了絕大多數病例爲流行性“乙型”腦炎。

2. 在檢查的 63 病例中，有 33 例呈陽性反應，其中有 27 例在病初期爲陰性至病癒期轉爲陽性；1 例可疑；29 例呈陰性反應，其中有 15 例是經過兩次以上試驗仍屬陰性的。

3. 根據此次試驗結果分析：患者第 2 次血清的採取，以患病後第 4 週至第 6 週之間最爲恰當，如此時仍呈陰性反應，最好於患病 2 月後，再行第 3 次取血檢驗。

參 考 文 獻

- [1] Hammon, W. McD. Diagnostic procedure for virus and Rickettsial Diseases. 1st. edition. p. 187. Amer. Pub. Heal. Ass. 1948.
- [2] 宋幹、周明先、蘭世雄、黃禎祥：北京市 1951 年流行性“乙型”腦炎病人血清補體結合試驗。中華醫學雜誌，1952，38：1033。
- [3] Casals, J. Acetone—ether extracted antigens for complement fixation with certain Viruses, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949, 70: 339.
- [4] 中央衛生部防疫處：流行性“乙型”腦炎的防治。健康報社，1952，38—57。
- [5] 謝少女、周輯五：林氏細菌學檢查法。健康書店，1951，108。
- [6] 朱幹、周明先、沈中：北京市 1950 年流行性腦炎病人血清補體結合試驗。中華醫學雜誌，1951，37：287。
- [7] 吳潔如、何方麗、劉秉陽：長沙市流行性腦炎病原的研究，I。長沙市 1953 年流行性腦炎病毒的分離與鑑定。微生物學報 2 (2)：145—152。

STUDY ON THE NATURE OF THE EPIDEMIC ENCEPHALITIS IN CHANGSHA

II. BY MEANS OF THE COMPLEMENT FIXATION TEST.

WU, C. J., HO, F. L., CHEN, H. T., AND LIU, P. Y.

Department of Bacteriology and Immunology, Hunan Medical College, Changsha

By means of the complement fixation test, the sera from 63 cases of acute epidemic encephalitis seen in 1953 were examined. Among these, 33 cases showed positive complement fixation test to Japanese B encephalitis virus antigen during convalescence of which number sera from 27 cases were found to be negative during acute stage of the disease. Based from study of this series, second sample of the blood should be best obtained between fourth and sixth weeks after the beginning of the disease and if necessary, a third bleeding is advisable after another month.