

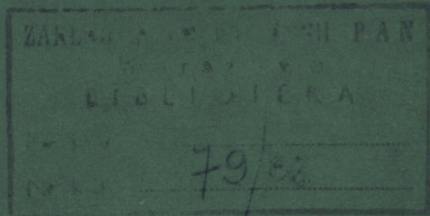
P O L S K A   A K A D E M I A   N A U K  
ZAKŁAD NEUROLOGII W WARSZAWIE

# NEUROLOGIA POLSKA

II INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON ENCEPHALITIDES  
WARSAW 1965

PROCEEDINGS PART I

Arbor – Encephalitides (CEE and Japonica)



TOM IV

1966

ZESZ. 3-4

---

WARSAWA

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom IV

Lipiec – Grudzień 1966

Nr 3-4

## KOMITET REDAKCYJNY

*Maria Faryna-Kobuszevska* (Warszawa), *Przemysław Gabryel* (Poznań), *Andrzej Głuszc* (Łódź), *Janusz Groniowski* (Warszawa), *Józef Kałuza* (Kraków), *Witold Karczewski* (Warszawa), *Jerzy Konorski* (Warszawa), *Zygmunt Kuligowski* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Kraków), *Helena Nielubowiczowa* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Warszawa), *Zygmunt Ruszczewski* (Warszawa), *Stanisław Stefanko* (Kraków), *Lucjan Stępień* (Warszawa), *Henryk Wiśniewski* (Warszawa)

## Przy współpracy

*Ludo van Bogaert* (Antwerpia), *N. J. Graszczekow* (Moskwa), *Igor Klatzo* (Bethesda), *Istvan Környey* (Pecs), *William H. McMenemey* (Londyn), *J. Olszewski* (Toronto), *Franz Seitelberger* (Wiedeń), *Istvan Tariska* (Budapeszt)

## REDAKCJA

Redaktor: *Ewa Osetowska*  
Redaktor Działu Ultrastruktury O.U.N.: *Janusz Groniowski*  
Redaktor Działu Neuroonkologii: *Adam Kunicki*  
Sekretarz: *Henryk Wiśniewski*  
Sekretarz techniczny: *Mieczysław Śmiątek*

## ADRES REDAKCJI

Zakład Neuropatologii Polskiej Akademii Nauk  
Warszawa, ul. Pasteura 3, tel. 22-96-27

Wydawca  
PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH

# II INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON ENCEPHALITIDES

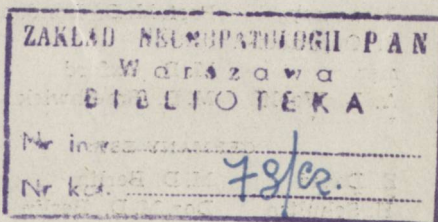
Warsaw 15-16. IX. 1965

Under the Auspices

WORLD FEDERATION OF NEUROLOGY  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES  
ASSOCIATION OF POLISH NEUROPATHOLOGISTS

Organizing Committee:

ASSISTANTS STAFF  
INSTITUTE OF NEUROPATHOLOGY,  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES





## CONTENTS

E. Osetowska: Introduction . . . . .	309
ARBOR — ENCEPHALITIS (CEE AND JAPONICA)	
H. Moritsch: Diagnostic procedures in human cases of TBE . . . . .	313
H. Libíková: Discussion to the lecture of prof. Moritsch . . . . .	319
H. Libíková, A. Króó, J. Tesařová: Immunogenesis of tick-borne encephalitis correlated to the development of clinical course of the infection . . . . .	321
Ch. Kunz: Methods for classification of viruses the TBE complex . . . . .	329
N. Draganescu, Gr. Popescu: Recherches clinico-épidémiologiques et sérologiques dans certains foyers d'encéphalite par le virus à tiques de la République Socialiste de Roumanie . . . . .	333
E. Osetowska, Z. Wróblewska-Mularczyk: Lésions tissulaires dans l'encéphalite à tiques expérimentale . . . . .	345
V. Vince, N. Grčević: Histopathologie der durch in Jugoslavia isolierten Virusstämme verursachten experimentellen Zeckenencephalitis . . . . .	349
J. M. Jabotinski: Distinctions morphologiques entre les infections neurovirales à caractère antigénique proche ou identique . . . . .	359
F. Seitelberger, K. Jellinger: Neuropathologie der Zeckenencephalitis (mit Vergleichsuntersuchung der Arbo-Virus-Encephalitiden und der Poliomyelitis) . . . . .	367
E. Osetowska: Diagnostic neuropathologique d'encéphalite à tiques en Pologne	401
M. Wender: A case of encephalitis with pathological features of the spring-summer and acute disseminated encephalitis . . . . .	411
H. Shiraki: The neuropathology of encephalitis Japonica in humans especially from subchronic to chronic stage . . . . .	419
N. Kusano, Y. Aoyama, A. Kawamura jr., H. Kawashima: The diagnosis of Japanese encephalitis by means of fluorescent antibody technique in autopsy cases . . . . .	449
S. Oyanagi: An electron microscopic study on the fine structures of cerebral cortex in the mice infected with Japanese encephalitis virus . . . . .	457

SPIS TREŚCI

E. Osetowska: Wstęp . . . . .	309
<b>ZAPALENIE MÓZGU WYWOŁYWANE PRZEZ STAWONOGI</b> (Zapalenie mózgu kleszczowe europejskie i zapalenie mózgu japońskie)	
<u>H. Moritsch:</u> Postępowanie diagnostyczne w przypadkach kleszczowego zapalenia mózgu u ludzi . . . . .	313
H. Libiková: Dyskusja do wykładu prof. Moritscha . . . . .	319
H. Libiková, A. Króo, J. Tesařová: Korelacja odczynów immunogenetycznych z przebiegiem klinicznym kleszczowego zapalenia mózgu . . . . .	321
Ch. Kunz: Metody klasyfikacji wirusów kompleksu kleszczowego zapalenia mózgu . . . . .	329
N. Draganescu, Gr. Popescu: Badania kliniczno-epidemiologiczne oraz serologiczne w niektórych ogniskach zapalenia kleszczowego mózgu w Socjalistycznej Republice Rumuńskiej . . . . .	333
E. Osetowska, Z. Wróblewska-Mularczyk: Uszkodzenia tkanki mózgowej w doświadczalnym kleszczowym zapaleniu mózgu . . . . .	345
V. Vince, N. Grčević: Histopatologia doświadczalnego kleszczowego zapalenia mózgu wywołanego przez wyizolowane w Jugosławii wirusy . . . . .	349
J. M. Jabotinski: Różnicowanie morfologiczne infekcji neuro-wirusowych pokrewnych lub identycznych antygenowo . . . . .	359
F. Seitelberger, K. Jellinger: Neuropatologia kleszczowego zapalenia mózgu . . . . .	367
E. Osetowska: Diagnostyka neuropatologiczna kleszczowego zapalenia mózgu w Polsce . . . . .	401
M. Wender: Przypadek zapalenia mózgu z obrazem patologicznym przypominającym wiosenno-letnie i ostre rozsiane zapalenie mózgu . . . . .	411
H. Shiraki: Neuropatologia japońskiego zapalenia mózgu u ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem postaci podprzewlekłych i przewlekłych . . . . .	419
N. Kusano, Y. Aoyama, A. Kawamura jr., H. Kawashima: Diagnostyka japońskiego zapalenia mózgu na materiale autopsyjnym przy pomocy techniki immunofluorescencyjnej . . . . .	449
S. Oyanagi: Badania elektronowo-mikroskopowe ultrastruktury kory mózgu u myszy zakażonych wirusem japońskiego zapalenia mózgu . . . . .	457

СОДЕРЖАНИЕ

Э. Осетовска: Введение . . . . .	309
<b>АРБОР-ЭНЦЕФАЛИТИДЫ (СЕЕ И ЯПОНСКИЙ ЭНЦЕФАЛИТ)</b>	
<u>Х. Морич:</u> Диагностика в случаях клещевого энцефалита у людей . . . . .	313
Х. Либикова: Прения над выступлением проф. Моритша . . . . .	319
Х. Либикова, А. Кроо, Я. Тесажава: Корреляция иммуногенетических реакций с клиническим течением клещевого энцефалита . . . . .	321
Х. Кунц: Методы классификации вирусов комплекса клещевого энцефалита . . . . .	329
Н. Дроганеску, Гр. Попеску: Клинико-эпидемиологические и серологические исследования в некоторых очагах клещевого энцефалита в Румынской Социалистической Республике . . . . .	333
Э. Осетовска, З. Врублевска-Мулярчик: Повреждения мозговой ткани в экспериментальном клещевом энцефалите . . . . .	345
В. Винце, Н. Грчевич: Гистопатология экспериментального клещевого энцефалита вызванного вирусами, изолированными в Югославии . . . . .	349
Я. М. Яботински: Морфологическая дифференциация нейро-вирусных инфекций с антигеновым сходством либо идентичных . . . . .	359
Ф. Зайтельбергер, К. Еллингер: Невропатология клещевого энцефалита . . . . .	367
Э. Осетовска: Невропатологическая диагностика клещевого энцефалита в польском материале . . . . .	401
М. Вендер: Случай энцефалита с патологической картиной, напоминающей весенне-летний и острый диссеминированный энцефалит . . . . .	411
Х. Ширази: Невропатология японского энцефалита у людей с особым учетом субхронических и хронических форм . . . . .	419
Н. Кусано, И. Аойама, А. Кавамура мл., Х. Кавашима: Диагностика японского энцефалита на секционном материале с использованием иммунофлуоресценции . . . . .	449
С. Оианаги: Электронно-микроскопические ультраструктуры мозговой коры у мышей инфицированных вирусом японского энцефалита . . . . .	457

E. OSETOWSKA

## INTRODUCTION

Le Symposium d'Anvers en 1959 mit en vue les différents aspects du problème des encéphalites. Il s'est fait aussi évident, que c'est un problème à l'évolution progressive et qu'une seule réunion même sur échelle internationale ne saura pas épuiser la complexité du sujet. Les conférences du Symposium abordaient toutes les formes des encéphalites, connues en ce moments, avec les contributions neuropathologiques, biochimiques, electro-physiologiques. Il manquait déjà de collaboration étiologique. D'un autre côté la multitude des contributeurs et des communications créa la nécessité de discussion en sections sans la possibilité d'envisager les entités encéphalitiques simultanément par les représentants de différentes techniques et disciplines.

Malgré ces quelques difficultés le Symposium d'Anvers apporta en résultat la première classification des encéphalites actuelles, l'étude assez approfondie des leucoencéphalites sclérosantes subaiguës et de l'encéphalite nécrosante aiguë, deux formes lesquelles, très "en vogue" en ce temps-là dans la littérature mondaine, ont recueilli de nombreuses contributions; et une vraie revue des encéphalites nouvelles, inconnues, atypiques ou limitées géographiquement.

L'expérience d'Anvers convainquit dès le premier moment le Président de la Fédération Mondiale de Neurologie, monsieur le Professeur van Bogaert, que la discussion sur les encéphalites doit continuer sous forme un peu modifiée. Van Bogaert proposa une nouvelle rencontre en 1962 à Prague avec le sujet limité aux encéphalites à tiques de l'Europe et aux formes atypiques omises au Symposium d'Anvers. Faute de dispositions matérielles ce projet ne fut repris qu'en 1964 à réunion à Madrid par le représentant de la neuropathologie polonaise.

Le II Colloque International sur les Encéphalites Actuelles, qui a eu lieu le 15 et 16 septembre 1965 à Varsovie se considère donc comme la continuation directe des conférences anversoises. Les frais d'organisation de la rencontre étaient assurés par l'Académie Polonaises des Sciences, les arrangements extérieurs par l'Institut de Neuropatho-

logie de l'A.P.S et l'Association des Neuropathologistes Polonais. Les contributeurs sont venus sur leurs propres frais et, on doit souligner avec plaisir, l'important pourcentage de participants du Symposium d'Anvers.

L'inspirateur du Colloque à Varsovie, le professeur Ludo van Bogaert était malheureusement en ce temps malade et la présidence scientifique fut aimablement reprise par le professeur W. H. McMenemey. Selon le programme préliminaire on proposait de discuter à Varsovie les encéphalites à tiques de l'Europe, les encéphalites rhumatismales et les encéphalites atypiques, joignant le point de vue neuropathologique et virologique dans les formes à l'étiologie connue. Les matériels reçus ont contraint les organisateurs d'introduire quelques modifications.

Le programme réalisé concernait: les encéphalites à tiques de l'Europe présentées par les neuropathologistes et les virologistes; l'Arbor-encéphalite Japonaise; les encéphalites virales lesquelles n'étaient pas discuté à Anvers où dans lesquelles les recherches récentes ont apportées d'importantes contributions étio-pathogéniques (encéphalite Herpes simplex présentée par le professeur Krücke), les encéphalites atypiques parmi lesquelles on a placé aussi une seule contribution sur les encéphalites rhumatismales. A côté des communications prévues dans le programme il y avait plusieurs intéressantes allocutions à vive voix dans la discussion. On les a incluses dans ce volume pour obtenir un document complet.

Le lecteur de ces rapports cherchera lui même les conclusions qu'inspire cette deuxième revue. Il nous semble cependant utile de souligner quelques points importants.

1. La discussion commune des neuropathologistes et des virologistes mit en évidence l'inseparabilité des propriétés pathogènes des virus et des propriétés individuelles du tissu cérébral. L'étude des virus en conditions expérimentales et l'étude de cerveau en conditions d'infection naturelle complètent les connaissances biologiques d'agresseur et d'hôte.

2. Les encéphalites provoquées par les virus CEE et l'encéphalite japonaise présentent les entités dont l'étude étiologique, épidémiologique, pathogénique et neuropathologique semble être la plus accomplie et d'une façon parallèle.

3. Les images cérébrales de ces encéphalites sont pathognomiques sauf les exceptions extraordinaires (cas d'encéphalite nécrosante de Shiraki).

4. Les encéphalites atypiques présentées au Colloque peuvent être classées en trois grands groupes:



a) les caractères atypiques sont dus à l'importante contribution du facteur vasculogène, c'est que donne aux cas une forte note encéphalopathique;

b) la réponse inflammatoire primaire ou secondaire coïncide avec le processus démyélinisant plus ou moins rapproché de la sclérose en plaque;

c) la réponse inflammatoire est modifiée par l'hypersensibilité du tissu cérébral, s'exprimant tantôt par les caractères exsudatifs et hémorragiques, tantôt par l'excitation granulomateuse.

Dans certains cas l'analyse minutieuse permet de différencier le processus fondamental plus ou moins typique et la complication tissulaire secondaire. Dans les autres la réaction aux composantes complexes donne l'image incomparable aux formes connues.

5. Les encéphalites rhumatismales grâce à la topographie cortico-méningéale et les caractères granulomateux présentent, au moins dans certains cas, la possibilité de diagnostic neuropathologique.

Ces quelques suggestions établies, le Colloque de Varsovie, comme le Symposium d'Anvers engage à suivre les recherches et à confronter périodiquement les expériences et les observations nouvelles.

H. MORITSCH

## DIAGNOSTIC PROCEDURES IN HUMAN CASES OF TBE

Hygiene-Institut der Universität Wien

Human cases of TBE were first described in Central Europe in the district of Neunkirchen (Lower Austria) by Schneider in his monography „Die epidemische Meningitis serosa” in 1932. At that times however, he was not able to prove these suspected cases by specific methods in the laboratory.

In our laboratory, we demonstrated in 1959 by serologic methods, that these cases were actually TBE. Besides, it could be proved that TBE had been present in Lower Austria as early as 1927 (Moritsch, 1959).

We started our systematic investigations on TBE in 1956. Since 1956, we examined in the district of Neunkirchen all human cases of infections of the CNS. As all the cases were hospitalized, it was not difficult to get the necessary samples from every patient. Also, the results can be used as a basis for studies on the morbidity in an endemic area. More recently, we also got some serum samples from patients who were hospitalized in other places in Burgenland, Lower and Upper Austria, and even in Salzburg and in Western Germany. In contrast, to the results in Neunkirchen which can be used for further statistical work in epidemiology all the other proved case of TBE allow us only to draw the conclusion that this disease occurs in those areas too.

For the diagnosis in the laboratory we use the following procedures;

1. In the theoretical state of the first phase of the disease, i.e. the viremic phase, we inoculate the whole blood or the serum respectively intracerebrally into the brains of baby mice. In practice, we had this opportunity of a successful virus isolation twice only in connection with laboratory accidents.
2. After the onset of the disease of the CNS, virus isolations are only performed in case of death (5 times); otherwise we only use serologic methods. In general, we use at least two serum samples; the first is taken as soon as possible after admission to the hospital and the second after

an interval of about 14 days. For our scientific investigations in Neunkirchen, we get serum samples every week till the patient is released from the hospital.

With the first serum sample, we perform either an hemagglutination-inhibition test in a dilution of 1 : 10 and 1 : 20 or a neutralization test in a dilution of 1 : 5 (Kunz 1961).

In the case of a negative reaction, TBE may be excluded. If we can prove antibodies, we examine the first and all the following serum samples in the complement fixation test. The value of this reaction depends very much on the preparation of the antigen. We use now the crude extraction of infected baby mouse brains and get titers of the antigen up to 1:2048.

With these antigens, we usually get a positive reaction in the CF with the first sample. A case is diagnosed as TBE if either CF antibodies exhibit a 4-fold or greater increase in titer during disease or if sustained CF antibody titers of 1 : 64 or greater are found. In all other cases, we only use the term „presumed cases” of TBE when we are not able to prove it exactly. We know however, that as a rule the titers in the CF decrease within one year at least to a quarter of the previous value. Thus we can also prove — if we get another sample after one year — these „presumed cases” in retrospect by a drop in titer (Schneider 1932).

Table 1. Course of Titer of CF antibodies after TBE

CF Titer The acute disease	After years				
	1	2	3	4	5
512	256	32/64*	32/64*	32/64*	n. d.
256	16	16	n. d.	16	n. d.
256	4	4	4	4	n. d.
128	8	8	8	8	n. d.
128	4	8	n. d.	4	n. d.
128	4	4	4	4	n. d.
128	n. d.	n. d.	n. d.	16	16
n. d.	n. d.	16	16	16	16

\* Titer on repeat test

The results of our investigations in the endemic district of Neunkirchen are:

1. From 1956—1964, we got serum samples of 450 patients with infections of the CNS. In 230 cases we could prove TBE.

2. The most striking sign of TBE is the seasonal incidence of the cases.

Table 2. Nonbacterial infections of the CNS in the endemic district of Neunkirchen (Lower Austria) 1956—1964

Year	TBE (FSME)	Other diseases of the CNS
1956	44	36
1957	31	22
1958	14	15
1959	12	10
1960	30	34
1961	40	14
1962	16	10
1963	26	22
1963	17	57
Total	230 = 51.11%	220 = 48.88%

Table 3. Seasonal incidence of nonbacterial infections of the CNS in the endemic district of Neunkirchen 1956—1964

Months	TBE	Other diseases
January	1	8
February	0	0
March	2	4
April	4	8
May	29	8
June	58	17
July	68	45
August	22	40
September	16	34
October	22	26
November	7	19
December	1	11
	230	220

3. It may be of particular interest for the neurologists that TBE, in contrast to all other diseases of the CNS which occur here is not a disease of children and young people.

Table 4. Age-Distribution of nonbacterial infections of the CNS in the endemic district of Neunkirchen (Lower Austria 1956—1964)

Age	TBE (FSME)	Other diseases of the CNS
0—10	16	52
11—20	35	65
21—30	32	43
31—40	30	28
41—50	53	7
51—60	41	16
61—70	18	7
71—80	4	2
81—90	1	—
	230	220

Table 5. Infection rate and morbidity in relation to exposition

	Standardized	
	infection rate in %	morbidity (100000) year
Residents of the endemic district of Neunkirchen	14.06	30.3
Forest workers in endemic districts	41.0	98.0

Average age (TBE) = 38.10

Average age (other infections) = 23.63

t 8.71 p < 0.01

This depends on the one hand upon age of exposure to ticks, and it may be assumed that infected children will become ill but that they only acquire antibodies. The few known cases of overt disease in children had only a mild course.

4. Based on this long period of observation in this systematically examined district, we calculated the following rate of morbidity presented in table 5.

5. Besides the routine diagnostic work, we have been interested in the ratio of infection to morbidity. As we had proved the rate of antibodies among the residents and had come to know the rate of morbidity, we tried to estimate this ratio. We determined that only 8.2% of the infected persons (aged from 0—60 years) came down with manifest disease. It means that from 12 infected persons, only one gets a disease of the CNS (1956).

6. According to our experience, we may accept that TBE occurs widely in Austria, mainly in the eastern and south eastern part. But we could also prove cases in Upper Austria and in the neighboring Bavaria (1964, 1965). In the figure all the hospitals are demonstrated where we have found TBE.



Fig. 1. Geographic distribution of hospitals in Austria with cases of TBE (covers only areas where serologic studies of the Institute of Hygiene in Vienna were carried out).

H. Moritsch \*

## POSTĘPOWANIE DIAGNOSTYCZNE W PRZYPADKACH KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MÓZGU U LUDZI

## Streszczenie

Badania nad kleszczowym zapaleniem mózgu Instytut Higieny w Wiedniu rozpoczął w roku 1956. Od tego momentu badano wszystkie przypadki zapalenia kleszczowego mózgu, jakie wystąpiły w rejonie Neunkirchen.

W I fazie choroby, wiremicznej, krwią względnie surowicą chorych zakażano domózgowo mysie oseski. Z mózgu zakażonych myszy izolowano wirusa. Po rozwinięciu się fazy mózgowej możliwość izolacji wirusa istnieje tylko w przypadkach śmiertelnych — w materiale autora uzyskano go 5 razy, tj. ze wszystkich przypadków śmiertelnych. Poza tym stosowano metody serologiczne, pobierając po dwie próbki krwi: bezpośrednio po przyjęciu chorych do szpitala i w 14 dni później. Stosowano testy hamowania hemaglutynacji oraz neutralizacji. Jeżeli można było otrzymać sprawdzone przeciwciała, stosowano test wiązania dopełniacza. W latach 1956—1964 przebadano 450 pacjentów, w 250 przypadkach otrzymano wyniki pozytywne zakażenia wirusem kompleksu kleszczowego. Kleszczowe zapalenie mózgu praktycznie nie występuje u dzieci i osobników młodych. Jako wiek przeciętny dla tej postaci zapalenia można przyjąć 38 lat. Na 12 osób zakażonych wirusem kompleksu kleszczowego tylko u jednej dochodzi do zajęcia ośrodkowego układu nerwowego.

X. Морич

## ДИАГНОСТИКА В СЛУЧАЯХ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У ЛЮДЕЙ

## Содержание

Исследования над клещевым энцефалитом ведутся в Институте Гигиены в Вене с 1956 г. С этого момента исследовались все случаи клещевого энцефалита наблюдавшиеся в районе Нойнкирхен. В первой вирусемической фазе заболевания кровью либо сывороткой больных инфицировали внутримозговым способом мышцей грудного возраста. В мозге инфицированной мыши изолировали вирус. После развития мозговой фазы возможность изоляции вируса существует только в летальных случаях — по материалу автора это было осуществимо только 5 раз, т.е. во всех летальных исходах. Кроме того применялись серологические методы, определялись две пробы крови: непосредственно после поступления больных в стационар и через 14 дней после поступления. Применялись тесты торможения геммаглютинации и нейтрокизации. Если получали проверенные антитела, тогда применяли тест связывания комплимента. За период 1956—1964 последовали 450 лиц, в 250 случаях были получены положительные результаты инфекции вирусом клещевого комплекса. Клещевой энцефалит практически не наблюдается у детей и у молодых индивидуумов. Средний возраст для этой формы энцефалита можно считать 38 лет. На 12 человек инфекции вирусным комплексом только 1 раз поражается центральная нервная система.

\* Prof. Dr Hans Moritsch, dyrektor Instytutu Higieny Uniwersytetu w Wiedniu, zmarł w niespełna 2 miesiące po Colloquium z powodu zapalenia mózgu, wywołanego przez wirus Herpes Simplex.

## REFERENCES

1. Groll E., Krausler J., Kunz Ch., Moritsch H.: Untersuchungen über die Morbidität und stille Durchseuchung einer Population in einem Endemiegebiet der FSME Arch. ges. Virusfshg. 1956, XV, 151—158.
2. Kunz Ch., Krausler J.: Bildung und Überdauern der komplementbindenden Antikörper nach Infektionem mit Frühsommer-Meningoencephalitis (Tick-borne encephalitis). Virus Arch. ges. Virusfshg. 1964, XIV, 499—507.
3. Kunz Ch., Moritsch H.: Zur serologischen Diagnostik der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) Arch. ges. Virusfshg. 1961, XI, 568—582.
4. Moritsch H., Krausler J.: Serologische Untersuchungen zur Epidemiologie der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME), Zbl. Bakt. 1959, I, 176, 377—384.
5. Moritsch H., Krausler J.: Weitere Untersuchungen über die Epidemiologie der Frühsommer-Meningoencephalitis (Schneiderische Krankheit) in Niederösterreich. Wien. Klin. Wschr. 1959, 71, 766—767.
6. Moritsch H., Kunz Ch.: Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in Österreich 1960—1963. Wien. Klin. Wschr. 1964, 76, 387—389.
7. Moritsch H., Kunz Ch.: Nachweis der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in Österreich 1964. Mitt. d. Österr. San. Verw., 1965, 66, 132—134.
8. Schneider H.: Die epidemische akute „Meningitis serosa“. Verlag W. Maudrich, Wien, 1932.

H. LIBÍKOVÁ

## DISCUSSION TO THE LECTURE OF PROF. MORITSCH

Institute of Virology of Czechoslovak Academy of Sciences Bratislava

Since 1960, the cultures of chick embryo cells (CEC) have been used in the Institute of Virology in Bratislava for isolation of tick-borne encephalitis viruses from both patient's samples and suspensions of ticks (Libíková et al.: Biology of viruses of the tick-borne encephalitis complex, ČSAV 1962, p. 201; Libíková et al., J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol., 1964, 8, 77). The same method was successfully used also in Regional Sanitary-Epidemiological Station in Ostrava in 1965 (Heinz et al., personal communication).

The positive isolation of the TBE virus is indicated in the 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> passage in CEC by its interference with arborviruses A or by inoculation of the cultural fluid intracerebrally into mice. Here positive interference or death of mice prove the positive detection of the TBE virus. The complete isolation experiment lasts for 8—11 days only. Patient's serum and spinal fluid, used as inoculum, exert no toxic effect on CEC. The cytotoxic effect of suspensions from ticks can be diminished or eliminated by removing the inoculum from the tubes after the end of the adsorption period; the cultures are then refed with fresh medium.

The isolation of TBE virus in CEC cultures is relatively more sensitive than in mice, because a larger volume of the inoculum can be inoculated into cell cultures, than into mouse brain.



H. LIBÍKOVÁ, A. KRÓO, J. TESAŘOVÁ

## IMMUNOGENESIS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS CORRELATED TO THE DEVELOPMENT OF CLINICAL COURSE OF THE INFECTION

Institute of Virology of Czechoslovak Academy of Sciences, Bratislava  
and Clinics of Infectious Diseases, Prague

In 1959, we have elaborated and introduced into a routine use a fast method of detection of tick-borne encephalitis (TBE) virus neutralizing antibodies in vitro (Libíková and Vilček 1959). In this method cells of stable lines (e.g. HeLa, SCH or Detroit; Libíková, Vilček 1961) and the selected cytopathic variant of virus as an antigen are used (Libíková 1963). Mixtures of diluted sera and 100 CPD<sub>50</sub> of virus antigen are inoculated into tubes simultaneously with seeding the cells and the cultures are examined after five days for the presence of the cytopathic effect. It is apparent that this procedure is faster and technically simpler than that using the grown monolayers.

This method is in steady use in our laboratories for the purposes of the research as well as for the diagnosis of TBE (Libíková et al., 1960, 1963; Libíková 1964, Grešíková et al. in press, ect.). It was tested and successfully employed also in other virological laboratories in Czechoslovakia (Regional Sanitary-Epidemiological Stations, Bratislava and Ostrava), in Austria (Kunz and Moritsch, 1961), Hungary (Molnárová 1963) and USSR (Minaieva 1964) in serological surveys as well as in the diagnosis of the disease in human population.

As the described method detects the virus-neutralizing antibodies, which are considered as one of the important factors of the immunity, we have taken the advantage of it in studying the immunogenesis of the overt infection caused by tick-borne encephalitis virus.

In 1961 — 1964, patients suffering from the suspected TBE, after being infected probably by a tick-bite in forest areas near Prague, were hospitalized in the Clinics of Infectious Diseases in Prague. Several blood samples were taken during and after the hospitalization and examined serologically for neutralizing antibodies against TBE virus.

During the four years period, 141 cases have been examined clinically and virologically. In this group, the clinical diagnosis of TBE was confirmed serologically in 72 cases and excluded in 69 cases. In the positive cases, the level of antibodies at the end of disease or during the convalescence was always rather high (titers above 1 : 64, at most 1 : 2048, in the majority 1 : 256 and 1 : 512). On the other hand the negative cases showed regularly a negative reaction even with the lowest dilution (1 : 4) of sera. The undiluted or 1 : 2 diluted sera, which were used occasionally, did not give positive results either. The results obtained from this series of experiments led us to a conclusion, that the tick-borne encephalitis virus etiology can be safely excluded, if the examination of the patient's serum taken shortly after the neural phase of the disease reveals no antibodies using the given method *in vitro*.

In the case of positive detection of neutralizing antibodies against TBE virus in the suspect patient, there are several possibilities of drawing conclusions from the serological examination, which is considered in connection with the development of the clinical picture. For an illustration, 18 cases were selected from our materials, which showed a characteristic biphasic course of the disease and which had a complete record of the tick-bite the begin and the end of both phases. The duration of the incubation period and of both phases, as well as the begin of the 2<sup>nd</sup>, neural phase showed a considerable variation, as it is illustrated in Fig. 1.

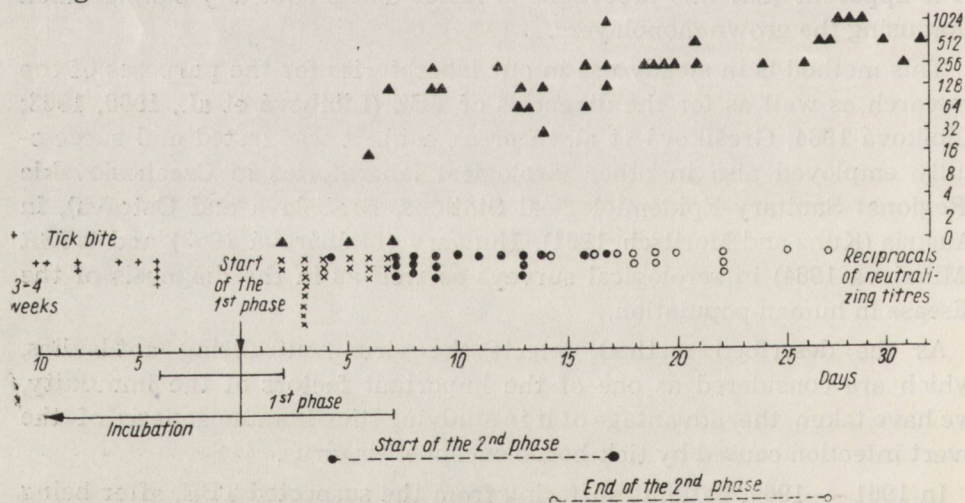


Fig. 1. Clinical course and antibody formation in 18 biphasic cases of tick-borne encephalitis.

As it is shown in Fig. 1 and Fig. 2 we have attempted to analyze the immunogenesis of TBE in connection with three factors mentioned

above important for its pathogenesis: the time of the tick-bite, the begin of the 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup>, neural phase. It can be seen from the first part of the Fig. 2 (analysis of 32 cases of biphasic TBE) that the blood samples

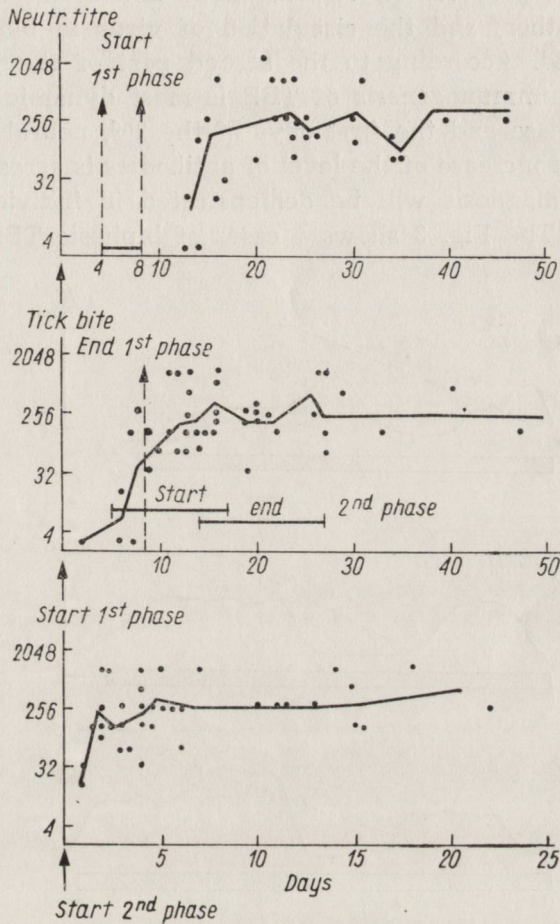


Fig. 2. Immunogenesis in tick-borne encephalitis.

from the incubation period or from the begin of the 1<sup>st</sup> phase were missing in our materials. However, even 13—14 days after the tick-bite (i.e. after the 1<sup>st</sup> phase already began), two patients did not have the antibodies against TBE virus. It is supposed (Blaškovič 1964) that TBE virus, being transferred into the human organism by a tick, begins to multiply in cells of the infiltrate at the site of the bite, even though the multiplication is poor. This weak antigenic stimulus is perhaps not sufficient to induce a formation of measurable level of antibodies, nevertheless, it might lead to a sensibilization of the organisms against the later antigenic

pulse. This view can be supported by the finding of a sharp increase of the level of antibodies after the onset of the 1<sup>st</sup> (i.e. viremic) phase of the disease. It is assumed that during this phase an intensive multiplication of virus proceeds in various tissue and organ cells (perhaps in blood cells either) and the circulation of virus in blood stream is regularly detected. According to the second part of the Fig. 2 it can be said that the immunogenesis of TBE is most dynamic between the end of the 1<sup>st</sup> phase and the first days of the 2<sup>nd</sup>, neural phase of the disease. Then, the increase of the level of antibodies is arrested.

The practical diagnosis will be demonstrated in individual cases of TBE as follows: The Fig. 3 shows 4 cases of biphasic TBE, where the

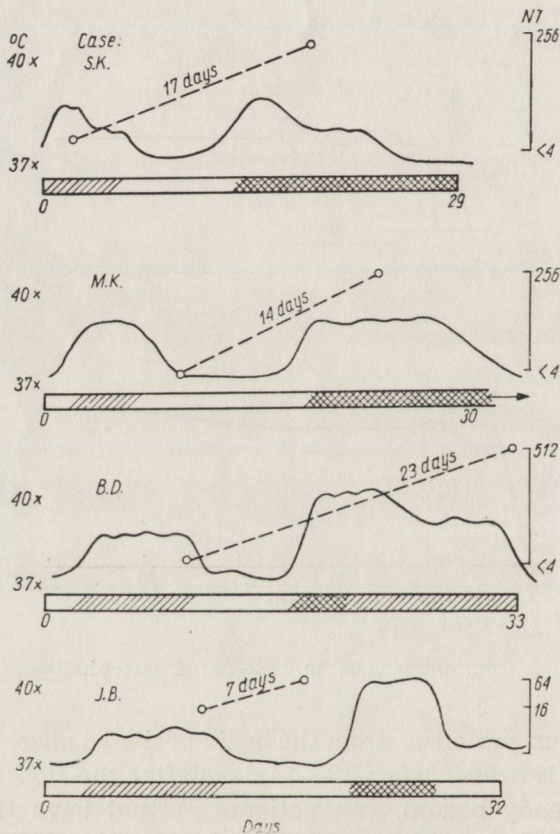


Fig. 3. Serodiagnosis of the tick-borne encephalitis I.

first blood sample was taken during or shortly after the first phase and the second sample was taken 7—23 days later. In all these cases the serological diagnosis gave clearly positive results (conversion or

fourfold increase of the antibody level). The Fig. 4 demonstrates 3 cases, where the first sample comes from the begin of the 2<sup>nd</sup> phase and the second sample was taken after the end of this phase. In 2 cases a significant rise of the level of antibodies was observed in the third case no significant

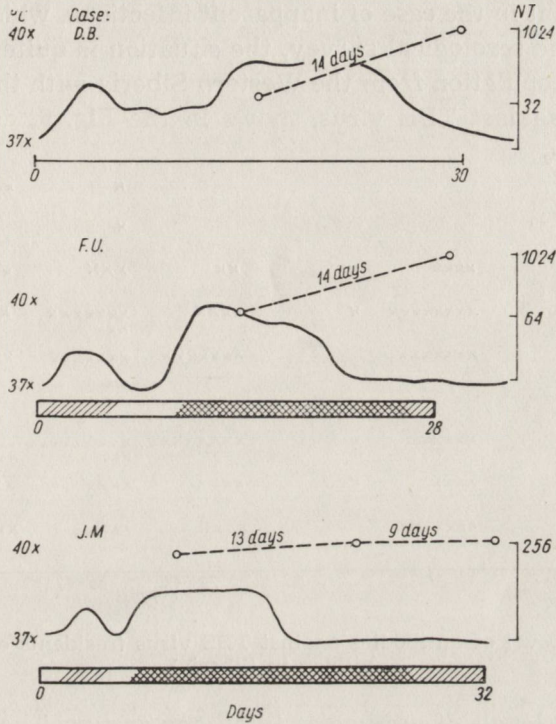


Fig. 4. Serodiagnosis of the tick-borne encephalitis II.

rise of antibodies occurred. In this last type, the serological diagnosis speaks for rather probable but not obvious acute TBE. Nevertheless, the contact with TBE virus occurred here beyond any doubts.

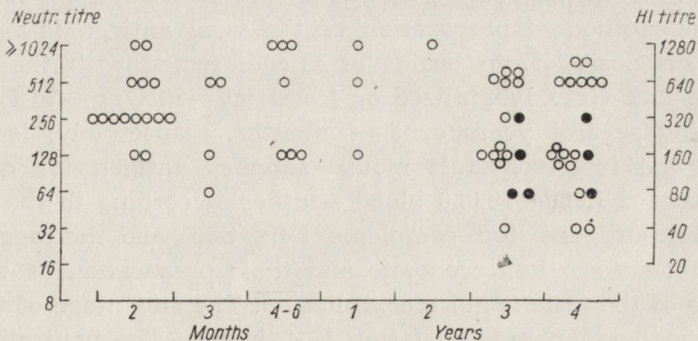


Fig. 5. Levels of neutralizing and HI antibodies against TBE virus in different time periods after overt encephalitis in man.

The Fig. 5, which summarizes the examination of a group of reconvalescents, following an overt TBE after rather long time intervals shows that a marked level of neutralizing (and hemagglutination inhibiting) antibodies is maintained for a long period.

It appears that in the case of inapparent infections, which were detected by means of the serological survey, the situation is quite a different. The survey of the population from the Western Siberia with the 90% occurrence of antibodies against TBE virus, shows in the Fig. 6, demonstrates low

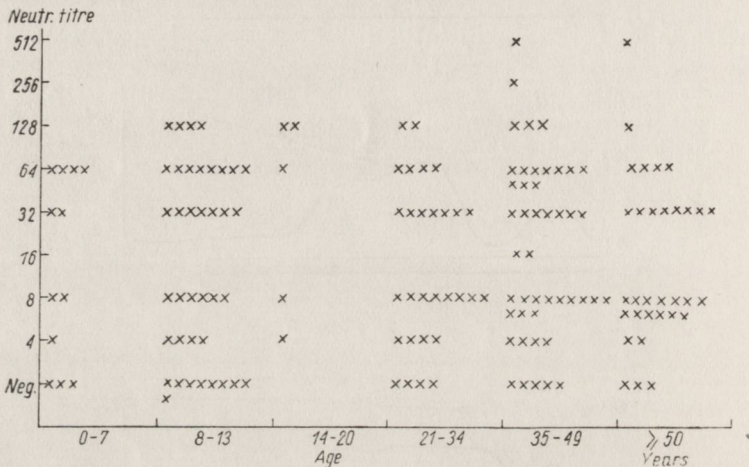


Fig. 6. Level of antibodies against TBE virus (residents of a tayga village in Siberia).

as well as high levels of antibodies in all age groups. The immunogenesis in the inapparent infections is probably more diverse than that in the overt encephalitis.

The results obtained in examinations presented here and those performed earlier are concluded as follows: The described neutralization test in vitro with the TBE virus was proved as suitable for mass routine work. The method of preparation of the viral antigen is very simple: a crude suspension from brains of mice infected with the cytopathic variant of TBE virus, lyophilized or frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-70^{\circ}\text{C}$  (preserved well during several years or 3—4 months, respectively) is used. The brain of one infected adult mouse supplies antigen for quantitative examination of 1,000—10,000 blood samples (according to the cytopathic titre). The antigens for complement-fixation and hemagglutination-inhibition tests are less economic and their preparation as well as the procedure of the tests is more complicated. The advantage of the CF and HI tests is the soon reading (after 1—2 hours). The neutralization test lasts 4—5 days. The test tube cultures are manipulated only once.

because the virus-serum mixture is inoculated simultaneously with the cell seeding. In laboratories with routine cell culture work, the neutralization test with the TBE virus in vitro is so far the simplest, most sensitive and specific test for the serodiagnosis of TBE. The reading can be performed without microscopic examination of the tube cultures in the modification of the test based on metabolic inhibition (color test, Libíková and Vilček 1961).

The advantages of the CF and HI tests might be exploited in mass routine work in the field laboratories only after the establishment of central production of all test components in a satisfactory quality.

H. Libíková, A. Króo, J. Tesařová

#### KORELACJA ODCZYŃÓW IMMUNOGENETYCZNYCH Z PRZEBIEGIEM KLINICZNYM KLESZCZOWEGO ZAPALEŃIA MÓZGU

##### Streszczenie

W rozwoju odczynów immunogenetycznych należy uwzględnić trzy fazy choroby: od ukłucia przez kleszcza do początkowej fazy wirerii uogólnionej, fazę wiremiczną, fazę nerwową. Pierwsza faza jest niezwykle trudna do uchwycenia, w drugiej nie wszyscy mają już odczyny serologiczne. Największe nasilenie reakcji przypada na okres końcowy fazy wiremicznej i początek fazy nerwowej.

W badaniach masowych stosowano testy wiązania dopełniacza i hamowania hemaglutynacji. Autorzy uważają je za godne polecenia w badaniach masowych, pod warunkiem, że produkty (antygeny), na których testy się opierają, mają sprawdzoną i wypróbowaną jakość. Autorzy podają szczegółowe techniczne wytyczne postępowania.

Х. Либикова, А. Кроо, Я. Тесагова

#### КОРРЕЛЯЦИЯ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С КЛИНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

##### Содержание

В развитии иммуногенетических реакций следует учесть три фазы заболевания: с укула клеща по фазу обобщенной виремии, виремическую фазу, нервную фазу. Первая фаза является весьма трудной для диагностики, во второй не у всех имеются уже серологические реакции. Максимальная интенсивность реакции приходится к концу виремической фазы и начало нервной фазы.

В массовых исследованиях применялись тесты связывания комплемента и торможения гемоагглютинации. Авторы рекомендуют эти тесты для массовых исследований, при условии, что качество продуктов (антигенов) на которых основывается тест проверено и испробовано. Приводятся тщательные технические указания по проведению тестов.

## REFERENCES

1. Blaškovič D.: Clinical aspects of Central-European tick-borne encephalitis as representative of the tick-borne encephalitides. Proceedings of the Seventh International Congresses on tropical medicine and malaria, Rio de Janeiro. 1964, 3, 205.
2. Grešíková M., Kožuch O. and Molnárová E.: Detection of tick-borne encephalitis virus and antibodies in human population in Tribeč region. Bull. Wld. Hlth Org. (in press).
3. Kunz Ch. and Moritsch H.: Zur serologischen Diagnostik der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME). Arch. ges. Virusforsch. 1961, 11, 568.
4. Libíková H., Vilček J.: A simple neutralization test for viruses of the tick-borne encephalitis group, depending on a complete cytopathic effect in HeLa cells. Acta virol. 1959, 3, 181.
5. Libíková H., Blaškovič D., Vilček J., Řeháček J., Grešíková M., Mačička O., Ernek E. and Mayer V.: Incidence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in man and domestic animals in a small village in a natural focus of infection. J. Hyg. Epidem. Praha 1960, 4, 327.
6. Libíková H., Vilček J.: Assay of the tick-borne encephalitis virus in HeLa cells. II. Neutralization tests using the cytopathic and metabolic inhibition effects. Acta virol. 1961, 5, 379.
7. Libíková H.: Assay of the tick-borne encephalitis virus in HeLa cells. III. Selection and properties of virus antigens for an in vitro neutralization test. Acta virol. 1963, 7, 516.
8. Libíková H., Grešíková M., Řeháček J., Ernek E., Nosek J.: Imunologické prehľady v prírodných ohniskách klieštovej encefalitídy. Bratisl. lék. listy 1963, 43, 40.
9. Libíková H.: Aperçue immunologique des foyers naturel de l'encéphalite a tiques, in Encéphalites actuelles, ed. by A. Kreindler and G. Usunoff, Izdateljstvo na Bulgarska Akademia na Naukite, Sofia 1964, 66.
10. Minaeiva V. M., Sergeievitsch E. A., Kiprianova N. V.: Results of the application of the neutralization test in tissue cultures in the diagnosis of tick-borne encephalitis (in Russian) in „Tick-borne encephalitis, Kemerovo tick fever, hemorrhagic fevers and other arbovirus infectious”, AMN SSSR Moscow 1964, 98.
11. Molnárová E.: A serological study of the incidence of tick-borne encephalitis in Hungary. Acta microbiol. Acad. Sci. Hung. 1963—64, 10, 365.



CH. KUNZ

## METHODS FOR CLASSIFICATION OF VIRUSES THE TBE COMPLEX

Institute of Hygiene, University of Vienna

A number of different methods are currently available for the identification of freshly isolated tick-borne encephalitis (TBE) virus. In previous years we used the neutralization test, (NT) in our laboratory employing either mice or tissue cultures. Since this is, however, a somewhat costly and time-consuming technique, we have searched for methods which would allow a more rapid classification of new isolates.

It is a well-known fact that many arboviruses can be readily identified with the complement-fixation test (CF). Since 1962, we have successfully used the CF test also for the identification of strains of Central European tick-borne encephalitis (CEE) virus. The test is both simple and economic. Isolation experiments are carried out with baby mice. If the mice develop disease, a few brains are harvested, homogenized in veronal buffer and kept for 1 hour at 4°C. After low speed centrifugation, the supernatant is tested against a mouse hyperimmune serum in a drop-type CF test. Thus, diagnosis is possible within 24 hours after the mice show evidence of a virus isolation.

Apart from the CF, we have also found the fluorescent antibody technique to be a very useful tool for the typing of CEE viruses. In a preliminary study, 7 strains of CEE virus, which had been isolated in 1964, were inoculated into tubes containing HeLa cells grown on coverslips. Twenty-four hours, and in the case of a negative result, again 48 hours after infection, a coverslip was removed, and the cells were treated with a fluorescein labeled CEE antiserum. In all cases, the virus specific fluorescence was observed in the cytoplasm of the infected cells, and thus identification in the first passage in HeLa cells was made. Other than being a more elaborate method, this way of using the immunofluorescent method does not really offer an advantage over the CF. Nothing is gained, for example, as far as time is concerned.

In order to further shorten the procedure of identification, we have attempted to stain the virus-specific antigen directly in smears prepared

from brains of mice showing symptoms of disease. This proved to be a very rapid and sensitive method which provides a result within little more than an hour's time. Although it is not possible to localize the antigen equally well as in tissue culture, clear-cut pictures are always obtained which permit differentiation between positive and negative results. If CEE virus is present in the brain, the smear appears to be flooded with antigen. This correlates well with the fact that CEE viruses reach exceedingly high titers in the brains of baby mice. In Table 1, summary is given of our virus isolations from 1961 through 1965. All 20 strains identified by the fluorescent antibody technique were diagnosed already in the first mouse passage.

Table 1. Virus Isolations 1961 — 1965

Identified by	Source		
	Man	Ticks	Mammals
CF	4	14	1
FAT		20	
Total	4	34	1

In connection with fluorescent antibody studies, it is of interest to which extent one has to consider the possibility of cross reactions of a fluorescein labeled CEE antiserum with group B viruses other than CEE. In practice, this problem is of very little significance. On the European continent, only one additional group B virus, namely, West Nile virus, has been isolated so far. West Nile and CEE viruses show an antigenic relationship in the hemagglutination-inhibition test. We have compared in HeLa cells 2 strains of West Nile virus with CEE virus and could not find any cross-reactions with the direct immunofluorescent method. In both cases, the fluorescein labeled antiserum stained only the homologous and not the heterologous virus. Studies which we have done with viruses of the California encephalitis complex have demonstrated also that immune sera show less cross-reactivity in the direct fluorescent antibody test than in the HI or CF test.

According to our experience, cross-reactions may occur, however, with viruses which are closely related in the CF test. This is true for the viruses of the TBE complex of which the CEE virus is a member. These viruses are so closely related that they were for some time considered an antigenic identity. Their differentiation is not possible with conventional serological methods such as the CF test. Upon investigation of six different viruses of this complex (Central European tick-borne encephalitis (CEE), Russian spring-summer encephalitis (RSSE), louping ill, Omsk

hemorrhagic fever, Langat (TP 21), and Kyasanur Forest disease) with each antigen, the highest intensity of the fluorescence was consistently obtained with the homologous antiserum. Yet, when infected cells were stained with heterologous antisera, specific fluorescence was also seen in most cases. In comparison with the homologous antigen, this fluorescence was weaker. In other words, the difference between homologous or heterologous viruses was indicated by a strong or weak specific fluorescence of the HeLa cells. In a series of experiments, which we have already described in detail elsewhere, we found that the intensity of the specific fluorescence of the infected cells can be measured with a microphotometer. We could thus arrive at a quantitative assay of the cross-reactions (Table 2) and distinguish between the viruses of the TBE

Table 2. Relationship between viruses of the RSSE complex by combined application of fluorescent antibody technique and microphotometry \*

Virus	Serum					
	RSSE	CEE	Li	OHF	LT	KFD
RSSE	97.4	25.4	42.0	11.5	19.6	4.3**
CEE	29.5	24.3	24.8	9.6	3.9**	5.5**
Li	43.2	8.0**	68.2	5.0**	12.0	5.0**
OHF	30.5	1.6**	14.2	34.7	13.3	0.6**
LT	17.8	0.0**	4.2**	9.9	52.7	0.0**
KFD	25.3	2.7**	11.9	0.0**	11.5	49.1

\* To obtain the above results, nonspecific staining properties of each serum were determined by staining noninfected cells; these figures were then subtracted from values obtained after measuring the infected cells. In each case 15 cells were measured and the mean therefrom was determined.

\*\* No distinct specific fluorescence was observed.

complex which were tested. This method proved to be so sensitive that even the two subtypes of the TBE virus, namely, CEE and RSSE viruses were separable from each other (Table 3).

Our studies have shown that both the CF test and the immunofluorescent method can be successfully applied for the rapid identification of CEE virus. Since the fluorescent antibody test offers some advantages, we recommend its use as a standard method. We believe that it may also serve as a valuable tool for the typing of a large number of viruses other than CEE. In addition, our studies have demonstrated that the joint application of this technique and of microphotometry is a simple but considerably more potent test than the conventional serological methods. It may reveal antigenic differences between viruses where conventional methods fail.

Table 3. Fluorescence measurements of HeLa cells infected with CEE and RSSE viruses and stained with anti-RSSE, CEE, Louping ill and Omsk hemorrhagic fever conjugates

Virus	Strain	Conjugate			
		RSSE	CEE	Li	OHF
CEE	Hypr	33.1	22.6	24.8	n.d.
	Will II	27.9	19.8	17.1	8.0
	Will III	30.0	17.1	19.7	6.7
	Scharl	27.3	21.8	n.d.*	n.d.
	Pekets	24.9	23.9	n.d.	n.d.
RSSE	Bars	83.2	20.1	n.d.	n.d.

\* Not done.

Ch. Kunz

#### METODY KLASYFIKACJI WIRUSÓW KOMPLEKSU KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MÓZGU

##### Streszczenie

Autor omawia metody indentyfikacji wirusów kompleksu kleszczowego zapalenia mózgu przy pomocy wiązania dopełniacza oraz w oparciu o immunofluorescencję. Oba testy są dokładne, jako metodę standardową poleca jednak immunofluorescencję. Może ona służyć do określania także i licznych innych wirusów. W połączeniu z mikrofotometrią immunofluorescencja jest metodą bardzo prostą technicznie, a bardziej miarodajną niż konwencjonalne metody serologiczne i może subtelniej ujawniać antygenowe różnice między wirusami, których indentyfikacja serologiczna zawodzi.

X. Кунц

#### METODY КЛАССИФИКАЦИИ ВИРУСОВ КОМПЛЕКСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

##### Содержание

Представлены методы идентификации вирусов клещевого энцефалита с употреблением связывания комплимента и иммунофлуоресценции. Оба теста обладают точностью, однако для стандартных определений рекомендуется применять иммунофлуоресценцию. Она может быть использована также и при определении других вирусов. Вместе с микрофотометрией, иммунофлуоресценция представляется методом очень технически несложным а притом более убедительным, чем конвенциональные серологические методы и в состоянии выявить весьма детальные различия между вирусами, которые при серологических методах неразличимы.

N. DRAGANESCU, GR. POPESCU

RECHERCHES CLINICO-EPIDEMIOLOGIQUES ET SEROLOGIQUES  
DANS CERTAINS FOYERS D'ENCEPHALITE PAR LE VIRUS  
A TIQUES DE LA REPUBLIQUE SOCIALISTE DE ROUMANIE

L'Institut d'Inframicrobiologie de l'Académie de la RSR

Pendant ces dernières années on a fait toute une série de recherches cliniques, anatomo-pathologiques et virologiques sur les encéphalites virales existant dans notre pays. Les données présentées par différents auteurs (4—11, 13—18, 24) ont démontré qu'à l'exception d'une petite épidémie, l'encéphalite par le virus à tiques apparaît sous forme des cas sporadiques.

Les résultats des recherches de laboratoire concernant la présence des anticorps vis-à-vis du virus de l'encéphalite à tiques chez les habitants de différentes régions du pays (7, 12, 20, 22) nous ont décidé d'effectuer une étude régulière sérologique chez les hommes et les animaux de certains foyers de Dobroudja, Transylvanie et Moldavie; ces résultats font l'objet du présent travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Pour le diagnostic des encéphalites par le virus à tiques apparues dans différentes régions du pays, nous avons essayé l'isolement du virus dans les cas surpris dès le début de la maladie; chez les sujets qui avaient dépassé la phase initiale de la maladie au moment de leur hospitalisation on a fait le diagnostic sérologique.

Après avoir établi que dans les régions de la Dobroudja, de la Transylvanie et de la Moldavie il y a des foyers d'encéphalite par le virus à tiques, nous avons effectué une série d'investigations sérologiques chez les hommes et les animaux se trouvant dans ces foyers. Nous avons prélevé 1351 sérums, notamment: 718 de Dobroudja, 237 de Transylvanie et 396 de Moldavie. Les sérums de Dobroudja ont été pris dans les différentes collectivités et fermes zootechniques. De ces sérums, 518 avaient été pre-

levés aux hommes et 200 aux animaux (bovinés). Une partie des sérums humains provient des régions de Hirsova et Adamolisi, situées dans la zone limitrophe aux bords du Danube (où il a été possible d'isoler le virus de l'encéphalite à tiques) et riches en végétation forestière; le reste des sérums provient des zones de „sylvo-steppe” (rayons d'Istria, Negru-Vodà et Medgidia).

Du total des sérums humains, 212 provenaient des ouvriers de fermes zootechniques (25 trayeurs de vaches et de brebis, 91 vachers, 24 pâtres, et autres occupations — 72 preuves).

Les 718 sérums prelevés dans cette région ont été examinés sur la présence des anticorps fixateurs de complément (263 sérums, dont 163 humains et 100 de bovinés), ou sur la présence des anticorps hemagglutino-inhibiteurs (455 sérums, dont 355 humains et 100 de bovinés).

Les 237 sérums de Transylvanie ont été prelevés des familles, provenant des foyers placés dans la zone forestière du nord de la Transylvanie (les régions de Cluj et de Maramures); on les a recueillis chez les membres de familles des malades d'encéphalite à tiques, chez leurs voisins (126 sérums), ainsi que chez le bétail appartenant à ceux-ci (111 sérums).

Les 396 sérums de Moldavie proviennent des places situées dans les zones forestières de Suceava (40 sérums humains) et de Bacau (331 sérums humains et 25 pris des animaux bovinés), notamment de l'une des communes où on a établi les foyers d'encéphalite à tiques (fig. 1).

Les sérums recueillis en Transylvanie, ainsi que ceux de Moldavie, ont été examinés sur la présence des anticorps hemagglutino-inhibiteurs.

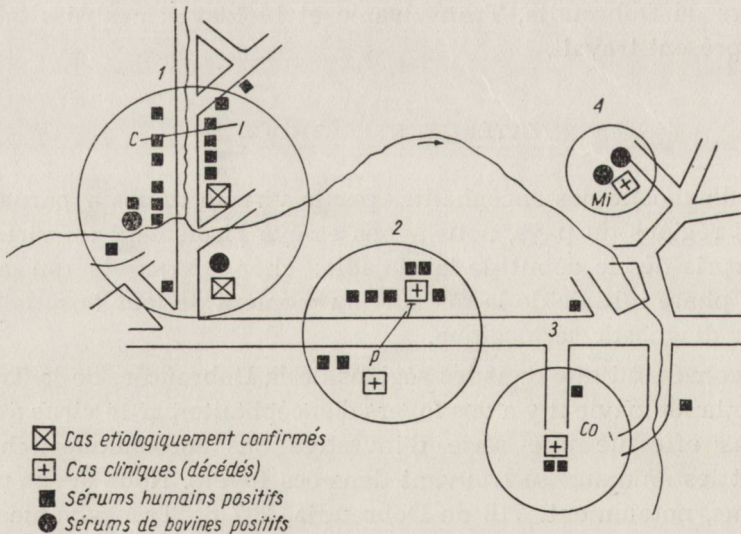


Fig. 1. Schéma topographique des foyers d'encéphalite de Bacau (Moldavie).

**Antigènes.** Pour préparer les antigènes on a utilisé le virus de l'encéphalite à tiques (souche Hypr) mis à notre disposition par l'Institut de Virologie de Bratislava et maintenu dans notre laboratoire par des passages intracérébraux chez la souris. On a préparé deux antigènes: un antigène fixateur de complément d'après la méthode de Casals (1949) et un antigène hemagglutinant d'après la méthode de Casals et Brown (1953), les deux par extraction avec acétone-ether.

**Techniques de la réaction de fixation du complément et d'hemagglutination.** La réaction de fixation du complément a été exécutée d'après la technique recommandée par Slonim (1955), et celle d'hemagglutination-inhibition d'après la technique de Clarke et Casals (1958).

### RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les essais d'isolement du virus de l'encéphalite à tiques ont permis d'obtenir des résultats positifs chez un seul cas de Dobroudja (rayon d'Adamclisi) — un vacher avec l'encéphalite estivale, apparue brusquement sous la forme psychotique.

Les recherches sérologiques ont établi l'infection par le virus à tiques chez 7 cas d'encéphalite apparus en Transylvanie (rayons de Cluj et de Maramures) et chez 2 cas apparus en Moldavie (rayon de Bacau).

Chez les 7 cas de Transylvanie, qui présentaient différentes formes cliniques d'encéphalite à tiques (notamment: méningo-encéphalitiques, polioencéphalitiques, poliradiculonévritiques et formes cliniques de sclérose latérale amyotrophique), les enquêtes épidémiologiques ont établi le début de la maladie au printemps, en été ou en automne; certains de ces malades ont rapporté la consommation du lait cru de la vache ou de la brebis ou la piqure par les tiques.

Chez les deux cas (enfants) d'encéphalite à tiques de Moldavie, caractérisés au point de vue clinique par hyperthermie, agitation ou somnolence, convulsions, troubles végétatifs et signes neurologiques de foyer, on a établi la consommation du lait cru ou insuffisamment bouilli.

Les recherches sérologiques effectuées dans la zone des foyers d'encéphalite à tiques de ces régions (Dobroudja, Transylvanie, Moldavie), ont mis en évidence la présence des anticorps spécifiques dans le pourcentage assez élevé, autant chez les hommes que chez les animaux.

Les résultats obtenus par la fixation du complément, dans les différentes collectivités de Dobroudja, sont présentés dans le tableau 1. Ces résultats montrent que les sérums humains provenant de la zone limitrophe aux bords du Danube ont donné des résultats positifs chez 8 des 45

Tableau 1. La distribution des anticorps fixateurs de complément par zones géo-climatiques de la Dobroudja

Zones étudiées	Nombre des sérums étudiés	Réaction de fixation du complément		% positifs	Taux des réactions positives			
		—	+		1/4	1/8	1/16	1/32
La zone limitrophe aux bords du Danube (rayons Hirsova et Adamclisi)	45	37	8	17.7	1	1	4	2
Zone de „sylvosteppe” (rayons Istria, Medgidia et Negru Voda)	118	113	5	4.2	1	3	1	

sérums étudiés (17,7%), cependant que seulement 5 des 118 sérums provenant de la zone de „sylvo-steppe” (les rayons d'Istria, Medgidia et Negru Voda) ont donné des résultats positifs (4,2%).

Le plus grand nombre de résultats positifs avec la fixation du complément — rapporté par les rayons — a été observé dans les rayons de Hirsova (20%) et Adamclisi (16%), situés au bord du Danube (fig. 2). Dans

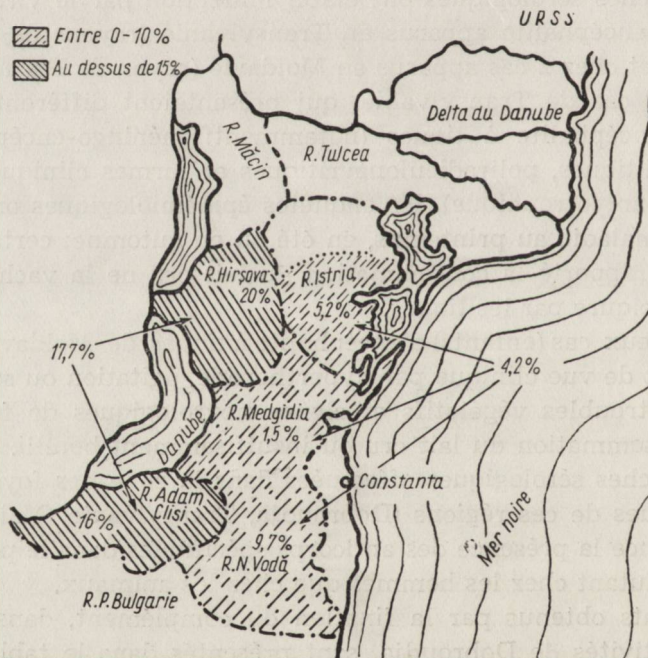


Fig. 2. Pourcentage de positivité des anticorps fixateurs de complément dans les rayons étudiés de la région de Dobroudja.



les rayons de „sylvo-steppe” (voir fig. 2), le pourcentage le plus élevé a été trouvé dans le rayon de Negru Voda (9,7%) en comparaison avec 5,2% des rayons d'Istria et 1,5% de Medgidia.

Les réactions de fixation du complément effectuées avec les 100 sérums provenant des bovinés ont démontré que 8 des 40 sérums recoltés dans le rayon de Hîrsova et 12 des 60 sérums provenant du rayon de Negru Voda, ont des anticorps antiencéphalitiques, le pourcentage étant égal dans les deux rayons (20%).

Les réactions d'hémagglutination-inhibition effectuées avec les sérums humains prélevés dans les collectivités situées près du Danube et dans celles de la zone de „sylvo-steppe”, ont présenté aussi de grandes différences en ce qui concerne la présence des anticorps (16% — 233 sérums dont 38 positifs — dans les collectivités de la zone boisée, par rapport à 6,5% — 122 sérums dont 8 positifs — dans celles de la zone de „sylvo-steppe”). Chez 14 des 100 sérums de bovinés étudiés par la même réaction (HAI), on a mis en évidence aussi la présence des anticorps spécifiques au virus à tiques (14%).

Le nombre élevé de réactions positives chez les bovinés démontre leur infection antérieure; il y a donc la possibilité de contaminer les hommes avec le virus à tiques sur cette voie.

Les résultats obtenus dans chaque collectivité montrent que dans la Dobroudja il y a des zones ayant un potentiel endémique élevé pour l'infection par le virus à tiques (la zone située au bord du Danube, où il a été possible d'isoler le virus) ainsi que des zones ayant un potentiel endémique réduit (les zones de „sylvo-steppe”).

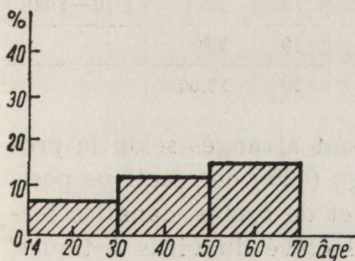


Fig. 3. Incidence des anticorps hemmaglutino-inhibiteurs, par groupes d'âge, dans les localités limitrophes aux bords du Danube.

Dans la figure 3 on observe que l'index de positivité des anticorps hemmaglutino-inhibiteurs, par groupes d'âge, subit dans les zones au potentiel endémique élevé (la zone limitrophe au bord du Danube) une augmentation directement proportionnelle à l'âge. D'ailleurs ce fait correspond aux résultats obtenus par Salminen et collab (1961).

Les résultats de la réaction d'hémagglutination-inhibition effectuée chez le personnel des fermes zootechniques de cette région sont démon-

trés dans le tableau 2. On constate que dans certaines fermes le pourcentage des réactions positives est assez élevé (20 à 40%), par rapport à d'autres fermes de la même région (4 à 16,6%).

Tableau 2. Distribution des anticorps HAI par fermes zootechniques

Fermes étudiées		No. de sérums	Résultat de la réaction HAI		% positifs	Limite des taux des réactions positives
			—	+		
I-Avec un potentiel endémique réduit	Moreni (ferme d'état)	25	24	1	4	1/40
	Cernavoda (idem)	21	20	1	4,70	1/2
	Mircea Voda (cooperative)	10	10	0	—	1/10—1/160
	Mircea Voda (ferme d'état)	22	19	3	16,6	1/40—1/160
	Poarta Alba (cooperative)	13	12	1	7,7	1/320
	Castelu (idem)	11	10	1	9	1/160
	Seimenii mici (ferme d'état)	23	21	2	8,7	1/10—1/40
	Gardes champêtres (rayon de Baneasa)	24	22	2	8	1/20—1/168
Total		149	138	11	7,5%	
II-Avec un potentiel endémique élevé	Dunarea (ferme (d'état)	20	12	8	40	1/10—1/160
	Cochirleni (cooperative)	18	12	6	31,5	1/10—1/160
	Osmancea (idem)	25	20	5	20	1/10—1/80
	Total	63	44	19	30%	
Total serums		212	182	30	13,80%	

D'après le tableau 3, où tous ces résultats sont arrangés selon la profession, il résulte que le plus élevé pourcentage (43%) de réactions positives a été obtenu chez les trayeurs de vache et de brebis, dans les fermes situées dans les zones ayant un potentiel élevé du virus à tiques, par rapport à ceux des zones au potentiel endémique réduit (5,5%).

De l'analyse de nos résultats on peut déduire que dans les zones où les conditions géo-climatiques permettent au virus de se maintenir en nature, les trayeurs de vaches peuvent s'infecter bien plus facilement que les pâtres et les vachers de la même zone.

Dans le tableau 4 sont présentés nos résultats obtenus avec les sérums prélevés chez les familles habitant dans la zone boisée du nord de la Transylvanie avec 7 foyers infectieux.

Tableau 3. Présence des anticorps HAI chez les personnes avec des professions spécifiques au secteur zootechnique

Profession des personnes étudiées	Fermes étudiées	No. sérums	Résultats de la réaction HAI		% positifs	Limite des taux des réactions positives
			-	+		
Personnel effectuant la traite des vaches et des brebis	au potentiel endémique réduit	18	17	1	5,5	1/10—1/80
	au potentiel endémique élevé	7	4	3	43	1/10—1/80
	Total	25	21	4	16	
Pâtres (bergers)	au potentiel endémique réduit	12	11	1	8,3	1/20
	au potentiel endémique élevé	12	8	4	33	1/10—1/160
	Total	24	19	5	20,8	
Vachers	au potentiel endémique réduit	68	62	6	9	1/10—1/320
	au potentiel endémique élevé	23	14	9	29,4	1/10—1/88
	Total	91	76	15	14,2	
Autres professions (ceux qui gardent les porcs, chevaux, volailles et gardes champêtres)	au potentiel endémique réduit	43	40	3	7	1/10—1/640
	au potentiel endémique élevé	29	26	3	10,3	1/10—1/160
	Total	72	66	6	8,2	
	Total sérums	212	182	30	13,82	

Les réactions d'hémoagglutination-inhibition sont positives — 26,2% (34 des 126 sérums étudiés sont positifs), fait qui prouve que les infections inapparentes sont assez répandues dans cette région du pays.

D'ailleurs on sait que l'encéphalite à tiques transmise par la voie alimentaire, par la consommation du lait cru ou insuffisamment bouilli, apparaît aussi par groupes de familles et qu'au point de vue clinique elle revêt l'aspect d'une maladie bénigne, souvent inapparente, suivie par l'apparition des anticorps spécifiques dans le sang (19). Jusqu'à présent

Tableau 4. Résultat des réactions d'hémagglutination-inhibition par familles dans les foyers d'encéphalite de la zone boisée du nord de la Transylvanie

Recherches sérologiques	Territoires étudiés	Localités étudiées	No. sérums étudiés	Réaction HAI		
				négative	positive	% de positivité
Par familles	Zone boisée au nord de la Transylvanie	Almas	25	17	8	
		Bocsa	18	10	8	
		Dingaul Mic	14	12	2	
		Gadalin	15	12	3	
		Morla	23	19	4	
		Poenizagora	17	12	5	
		Viile	14	10	4	
		Total	126	92	34	26,2

nous ne possédons pas de données sur l'isolement du virus du lait des vaches et des brebis provenant de cette zone, cependant la présence des ectoparasites et l'indice très élevé (tableau 5) des réactions positives chez les bovinés de ces foyers (20,5%), par rapport à ceux qui en sont éloignés (14,8%), prouve que les animaux ont subi la maladie antérieurement et l'ont transmise successivement aux hommes.

Tableau 5. Résultat des réactions d'hémagglutination-inhibition chez les bovinés des foyers d'encéphalite du nord de la Transylvanie

Recherches sérologiques	Territoires étudiés	No. sérums étudiés	Réaction HAI		
			positive	négative	% de positivité
Chez les bovinés appartenant aux familles avec des malades d'encéphalite à tiques	zone boisée au nord de la Transylvanie	111	88	23	20,5

Les investigations sérologiques effectuées en Moldavie ont mis en évidence toujours la présence des anticorps hémagglutino-inhibiteurs chez les hommes et les animaux se trouvant dans les foyers d'encéphalite à tiques de Bacau et des zones forestière de Suceava.

Le schéma topographique des foyers d'encéphalite étudiés à Bacau est présenté dans la figure 1; on y voit que les deux malades C. C. et I. M., chez lesquels le diagnostic fut posé cliniquement et sérologiquement (foyer C—I), habitaient le même endroit. Quatre autres cas à évolution léthale proviennent: deux du foyer T—P, et deux sont répartis entre le foyer CO et MI.

Les réactions d'hemagglutination-inhibition ont mis en évidence la présence des anticorps pour le virus à tiques (à un taux de 1/10—1/640) chez 18 (11%) des 159 personnes étudiées dans le foyer C—I, chez 8 (17%) des 18 personnes du foyer T—P et chez 5 (16%) des 31 personnes du foyer CO. Le quatrième foyer, qui est plus isolé, n'a pas été étudié du point de vue de l'incidence des anticorps antiencéphaliques.

Il résulte donc que des 238 personnes des trois foyers, 31 ont eu des anticorps hemagglutino-inhibiteurs (13%). Chez 5% des autres 93 sérums prélevés chez les sujets habitants les différentes régions non définies, on a mis en évidence des anticorps hemagglutino-inhibiteurs.

Le pourcentage des réactions positives, calculé pour toute la commune, atteint 10,5% (331 sérums étudiés, dont 35 positifs).

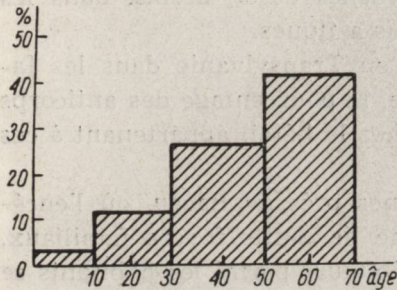


Fig. 4

Fig. 4. Incidence des anticorps hemagglutino-inhibiteurs, par groupes d'âge, dans la commune de la Région de Bacău (Moldavie).

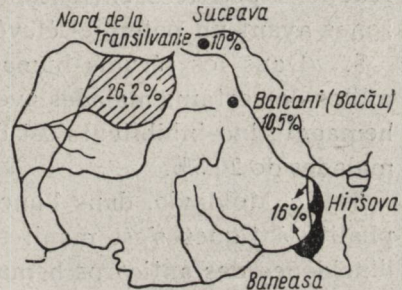


Fig. 5

Fig. 5. Foyers sur le territoire de la RSR étudiés sérologiquement.

Sur la figure 4 on peut voir que dans les 3 foyers étudiés l'incidence des anticorps hemagglutino-inhibiteurs subit une augmentation directement proportionnelle à l'âge.

L'étude des anticorps chez 25 des bovinés a mis en évidence leur présence chez 4 de ces animaux (16%). Les enquêtes épidémiologiques ont établi que trois enfants à provenance des foyers, avec l'encéphalite, buvaient du lait des vaches avec les anticorps spécifiques.

La présence des anticorps chez les habitants de certaines zones forestières de Suceava, était établie dans les 4 des 40 sérums étudiés (10%).

Les résultats obtenus par nous démontrent clairement que dans certaines régions du pays (fig. 5), l'infection par le virus à tiques est présente chez les hommes, et chez les animaux.

#### CONCLUSIONS

1. L'isolement du virus à tiques du malade avec encéphalite habitant la Dobroudja, ainsi que le diagnostic sérologique de l'infection par le

virus à tiques dans une série de cas de méningoencéphalite et d'encéphalomyélite de Transylvanie et de Moldavie, ont mis en évidence l'existence des foyers d'encéphalite à tiques dans ces régions du pays.

2. Les recherches sérologiques effectuées chez les hommes et les animaux de ces foyers ont établi la présence des anticorps spécifiques du virus à tiques aux taux très élevés.

3. Dans certaines collectivités de la Dobroudja, les anticorps fixateurs de complément et les hemagglutino-inhibiteurs ont été trouvés dans un pourcentage plus élevé chez les habitants de la zone limitrophe au bord du Danube (17,7%—20%) que chez ceux habitants la zone de „sylvo-steppe” (4,2% — 5,8%).

4. Dans les fermes zootechniques de cette région, on a trouvé 43% de réactions positives chez les trayeurs de vaches et de brebis, dans les zones ayant un potentiel élevé pour le virus à tiques.

5. Dans les sérums humains prélevés en Transylvanie dans les familles de certains malades avec encéphalite, le pourcentage des anticorps hemagglutino-inhibiteurs est de 26,2% et chez le bétail appartenant à ces malades de 20,5%.

6. En Moldavie, dans l'une des communes près de Bacau, où l'encéphalite à tiques s'est manifesté sous forme de petits foyers familiaux, l'incidence des anticorps hemagglutino-inhibiteurs parmi les habitants se place entre 10% à 17%.

N. Draganescu i Gr. Popescu

BADANIA KLINICZNO-EPIDEMIOLOGICZNE ORAZ SEROLOGICZNE  
W NIEKTÓRYCH OGNISKACH ZAPALENIA KLESZCZOWEGO MÓZGU  
W SOCJALISTYCZNEJ REPUBLICIE RUMUŃSKIEJ

Streszczenie

Badania serologiczne przeprowadzone w gromadach w okolicy Dobrudży, gdzie u poszczególnych osobników wykryto wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, pozwoliły na stwierdzenie obecności przeciwciał wiążących dopełniacz oraz hemoaglutynin, o mianach dużo wyższych u mieszkańców okolic zalesionych, szczególnie nad brzegami Dunaju (17,7% i 16%) niż u mieszkańców okolic stepowo-leśnych (4,2% i 6,5%).

U bydła w tychże okolicach stwierdzono obecność przeciwciał specyficznych dla wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, u dużej ilości zwierząt przebadanych (20%).

W odniesieniu do zawodu badanych, stwierdzono najwyższy odsetek reakcji pozytywnych u dojarzy krów i owiec (43%).

U członków rodziny poszczególnych chorych z zapaleniem mózgu, pochodzących z północnej Transylwanii, wykryto obecność przeciwciał u dużo większego odsetka osób przebadanych (26,2%) niż w gromadach zamieszkujących inne okolice kraju. Również u bydła, stanowiącego własność osób chorych, procent reakcji pozytywnych

był niewspółmiernie większy (20,5%) niż w grupach porównawczych zwierząt badanych w innych częściach kraju. W gromadzie wiejskiej z okolic Baku (Mołdawia), z której pochodziło dziecko z rozpoznanym klinicznie i serologicznie zapaleniem mózgu kleszczowym, stwierdzono u mieszkańców w 11% — 17% badanych obecność przeciwciał hemoaglutyno-inhibitorów. U bydła w tejsze miejscowości przeciwciała specyficzne występowały u 16% przebadanych zwierząt.

Н. Дроганеску, Гр. Попеску

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
В НЕКОТОРЫХ ОЧАГАХ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В РУМЫНСКОЙ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Содержание

Серологические исследования проведенные в деревнях в районе Добруджи, где у отдельных лиц обнаруживали вирус клещевого энцефалита, дали возможность констатировать наличие антител связывающих комплименты и гемоагглютининов более высокого титра у жителей лесных территорий, особенно на побережье Дуная (17,7% и 16%) чем у жителей лесостепных территорий (4,2% и 6,5%).

У скота на этих территориях в 20% обнаруживали наличие антител, специфических для вируса клещевого энцефалита.

Самый высокий процент положительных реакций наблюдался у дояров коров и овец (43%).

У членов семейств, отдельных больных с энцефалитом, проживающих в сырной Трансильвании обнаруживали наличие антител в значительно более высоком проценте (26,2%), чем у жителей других районов страны. Также у скота, принадлежащего к больным, процент положительных реакций был непропорционально выше (20,5%), чем в группах контрольных животных исследованных в других районах страны. В деревенском поселке, района Баку (Молдавия), из которого происходил ребенок с клиническим и серологическим диагностированным клещевым энцефалитом, у исследованных жителей в 11—17% обнаруживали наличие антител гемоагглютино-ингибиторов. У скота в той-же местности специфические антитела наблюдались в 16% исследованных животных.

BIBLIOGRAPHIE

1. J. Casals: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1949, 70, 339.
2. Casals J., Brown L. V.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1953, 92, 83.
3. Clarke D. H., Casals J.: Amer. J. trop. Med. Hyg. 1958, 7, 5, 561.
4. Draganescu N.: St. cerc. inframicrobiol. 1959, 10, 3, 363.
5. Draganescu N.: Rev. Roum. d Inframicrobiol. 1964, 1, 2, 115.
6. Draganescu N., Popescu Gr.: St. cerc. inframicrobiol. 1964, 15, 6, 569.
7. Draganescu N., Popescu Gr., Sorodoc G., in collab. Vasiliu V., Dilgeanu I., Moldoveanu P.: St. cerc. inframicrobiol. 1964, 15, 1, 51.
8. Draganescu St., Draganescu N., Petrescu Ar.: Encefalite virotice umane. Ed. Acad. RPR, Bucuresti 1962.

9. Draganescu St., Draganescu N.: Caracterul clinico-morfologic si etiologic al encefalitelor primitive virotice observate în prezent în RPR. III-ème Congrès International de Pathologie infectieuse, Bucarest, oct. 1962; Draganescu St., Voinescu I., Draganescu N., A III-a sesiune stiint. IMF, Bucuresti 1958, 139.
10. Draganescu St., Draganescu N.: Rev. Neurol. 1960, 103, 2, 138.
11. Draganescu St., Sarateanu D., Draganescu N.: Neurol, psihiat, neurochir. 1958, 2, 16, 3.
12. Duca M., Duca E., Biberi-Moroianu S., Mardari Al., Oana C., Vancea G., Birzu N., Dumitrescu D., Pendefunda G.: Rev. Neurol. 1963, 108, 6, 849.
13. Duma D., Popoviciu L., Taranu Al., Calcianu Gh.: Clujul medical, 1961, 3, 39.
14. Duma D., Popoviciu L., Taranu Al., Boros Tr.: Consideratii asupra panencefalitelor internate în Clinica neurologica din Cluj în ultimii 12 ani. Comunic. II lea Simp. româno-bulgar asupra encefalitelor actuale, Sofia 1962, 19.
15. Façon E., Constantinescu G., Georgescu Tr., Pruskauer-Apostol B.: Neurol., Psihiatr., Neurochirurg. 1961, 2, 143.
16. Façon E., Constantinescu G., Tudor M.: Rev. Neurol. 1961, 104, 1, 32.
17. Minculescu M., Draganescu N., Iliescu Al., Popovici F., Godja E., Marinescu S.: St. cerc. inframicrobiol. 1963, 14, 5, 619.
18. Miskolczy D., Csiky G., Vendeg V., Abraham S., Waitsuk P., Wagner R.: Neurol., psihiat, Neurochir. 1958, 2, 139.
19. Pogodina V. V.: Voprosi virusol. 1959, 4, 4, 429.
20. Popescu Gr., Draganescu N. in collab. Turcu T., Dilgeanu I., Minculescu M: St. cerc. inframicrobiol. 1965, 16, 3, 227.
21. Salminen A., Eriksson A., Oker-Blom N.: Arch Virusfschg. 1961, XI, 2, 213.
22. Sarateanu D., Draganescu N., Lissievici-Oprescu E.: Microbiol., parazitol., epidemiol. 1961, 2, 121.
23. Slonim D.: Csk. Epidemiol., Microbiol., Immunol. 1953, 2, 366; 1954, 3, 35; 1955, 4, 40.
24. Sutu A., Lupu I., Palade V., Maniu J.: Neurol., Psihiatr., Neurochirurg. 1961, 4, 347.



E. OSETOWSKA, Z. WRÓBLEWSKA-MULARCZYK

## LÉSIONS TISSULAIRES DANS L'ENCÉPHALITE À TIQUES EXPÉRIMENTALE

Institut de Neuropathologie, Académie Polonaise des Sciences, Varsovie  
Département de Virologie, Institut d'Hygiène à Varsovie

L'objet principal de cet étude était la comparaison des changements cérébraux obtenus après l'inoculation des souris avec les virus de l'encéphalite à tiques et notamment: avec les virus de l'Encéphalite Européenne Centrale (CEE-virus), souches: polonaise Kłodobok et Czeck-Hypr, le virus de Kyasanur Forest Disease et le virus de Fièvre Hémorragique d'Omsk (OHF). Tous ces virus appartenant au groupe B de Casals, diffèrent pourtant dans leur pathogénie naturelle. Les deux premiers présentent des souches classiques d'encéphalite, les deux suivants provoquent une virémie générale avec des symptômes cutanés hémorragiques.

On a employé dans les expérimentations: le virus Kłodobok, passage 34 et 37; le virus Hypr — passage 48 et 50; virus KFD — passage 16 et 19; le virus OHF — passage 14 et 16. On a préparé l'inculum sous forme de souspension de tissu cérébral des souris dans la solution physiologique avec le 10% du sérum équine. La souspension fut diluée jusqu'à obtenir la concentration du virus à peu près égale aux 1000 LD<sub>50</sub> (0,03 ml. intracérébralement pour la souris).

Les souris adultes, de poids d'environ 15 g, ont été inoculées intracérébralement (0,03 ml) et souscutanément (0,15 ml) dix souris pour chaque virus et chaque route d'introduction. Les souriceaux ont reçu respectivement 0,01 intracérébralement et 0,05 souscutanément dans les groupes correspondants. Les animaux étaient recueillis après les symptômes cliniques apparus, généralement entre 7 et 9 jours après l'inoculation. On a éliminé de la vérification histologique les cerveaux

---

Ce texte constitue le large résumé des travaux de mêmes auteurs publiés dans „Neuropatologia Polska” 1965.III. 231—244 et 1966 IV. 63—82 — pour l'iconographie voir les textes complets. L'étude expérimentale supportée par P. L. 480 U.S. Public Health Program, agrément 227703.

des souris tombées pendant les nuits; on n'a pas obtenu de résultats en certains groupes des souriceaux à cause du cannibalisme des mères et à cause des difficultés techniques d'enlever les cerveaux.

**Technique histologique:** fixation au formol, inclusion à la paraffine, coupes en séries continues, coloration avec l'hématoxiline-éosine et avec le crésil violet.

Les souris adultes, inoculées intracérébralement ont développé la même image pathologique pour tous les virus employés sans la possibilité de différenciation d'un cas à l'autre. La comparaison sommaire entre les groupes entiers permet apercevoir les réactions inflammatoires plus violentes dans le groupe de Hypr et de KFD, avec une participation des leucocytes dans la formule inflammatoire. Au point de vue de la topographie du processus ce matériel est inutilisable à cause de la concentration des lésions sur les niveaux atteints par la technique d'introduction de l'inoculum.

Le groupe adulte avec l'inoculation souscutanée présente les différences quantitatives quand à fréquence de contamination. Le groupe inoculé avec le virus OHF développa l'image d'encéphalite seulement dans un cas; celui de KFD seulement dans trois cas. Les souches de Kłodobok et de Hypr ont provoqué l'encéphalite dans tous les cas, avec certaines différences d'intensité du processus d'un cas à l'autre. L'image encéphalitique évoluée était superposable dans tous les groupes. La structure du processus était aussi similaire dans tous les cas positifs. On observait la prévalence des lésions aux niveaux du thalamus, du mesencéphale et du cervelet avec le tronc cérébral. L'accumulation d'atteinte inflammatoire était toujours plus grande dans les structures grises souscorticales et dans les structures du tronc, quoique l'écorce dans tous les cas était aussi gravement atteinte. La structure du processus était dans tout le matériel similaire: les infiltrations périvasculaires lymphocytaires avec une forte composante microgliale, la microglie toujours dispersée, affluent d'entourage. Dans l'écorce on observait la microglie dispersée en batônnet, presque jamais de nodules neuronophagiques. Les altérations neuronales et les nécroses électives dépassaient régulièrement l'intensité des changements inflammatoires. Les méninges étaient toujours infiltrées.

Le matériel obtenu chez les souriceaux après l'inoculation intracérébrale était en général comparable avec celui des souris adultes mais beaucoup plus abimé par la technique intracérébrale: dans la plupart de cas on n'a reçu que des coupes fragmentaires. Après l'inoculation souscutanée tous les souriceaux ont développé l'encéphalite (à l'exception du groupe OHF, où une souris resta intacte et les autres ont été dévorées

par la mère) avec des lésions aiguës et un peu différentes de groupe adulte. Les infiltrations périvasculaires concernaient surtout les vaisseaux petits et capillaires, formant de minuscules nodules périvasculaires. Dans la formule inflammatoire prévalaient les lymphocytes. Les altérations parenchymales étaient égales à celles du groupe adulte. Au point de vue topographique le processus était accentué dans l'écorce et dans les structures olfactives basales. Les niveaux postérieurs étaient légèrement épargnés en comparaison avec les niveaux antérieurs. Les caractères pathologiques étaient superposables pour tous les virus employés.

Les résultats obtenus semblent prouver que pour les virus apparentés sérologiquement les manifestations histologiques sont les mêmes et dépendent seulement de la route de l'inoculation et des propriétés individuelles du cerveau-hôte.

E. Osetowska, Z. Wróblewska-Mularczyk

USZKODZENIA TKANKI MÓZGOWEJ W DOŚWIADCZALNYM  
KLESZCZOWYM ZAPALENIU MÓZGU \*

Э. Осетовска, З. Врублевска-Мулярчик

ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГОВОЙ ТКАНИ  
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ

---

\* E. Osetowska, Z. Wróblewska-Mularczyk: Neuropatologia doświadczalnego kleszczowego zapalenia mózgu. I. Obraz mózgu po zakażeniu domózgowym myszy dorosłych, Neuropatologia Polska 1965, III, 231—244; 1966, IV, 63—82.

V. VINCE, N. GRČEVIC

## HISTOPATHOLOGIE DER DURCH IN JUGOSLAWIEN ISOLIERTEN VIRUSSTAMME VERURSACHTEN EXPERIMENTELLEN ZECKENENZEPHALITIS

Virologische Abteilung des Instituts für Gesundheitswesen der SR Kroatien, Zagreb  
Neuropathologisches Laboratorium der Medizinischen Fakultät zu Zagreb

Schon seit 1947 wird die in den nordwestlichen Gebieten Jugoslawiens (in Slovenien) regelmässig jede Saison wiederkommende Erscheinung der endemischen oder epidemischen Meningoenzephalitis verfolgt. In 1953 wurde die Klinik, Epidemiologie und Virologie dieser Krankheit zum ersten Mal gründlich studiert und in mehreren Publikationen veröffentlicht (Kmet, 1955; Bedjanic et al. 1956, Vesenjajak-Zmijanac et al. 1955), wobei in 60% der Fälle festgestellt wurde, dass die Infektion von Zecken übertragen wird. Das klinische Bild der Erkrankten zeigt typische Eigenschaften des sogenannten westlichen Typs der Zeckenenzephalitis.

Während der ersten Epidemie in 1953 wurde aus dem Blut eines Patienten in der prodromalen Phase der biphasischen Meningoenzephalitis der infektiöse Erreger isoliert (Vesenjajak-Zmijanac et al. 1955), der nach seinen biologischen und serologischen Eigenschaften in die Gruppe der neurotropischen Viren eingereiht wurde. Der isolierte Erreger unterschied sich antigenisch nicht vom russischen, tschechischen oder österreichischen Stamme der Zeckenenzephalitis und vom Louping-ill-Stamme (Pond et al. 1955, Vesenjajak, 1961). Dieser „Slovenia BS“ benannter Stamm wird als Erreger der Virusmeningoenzephalitis in Slovenien betrachtet. Dasselbe Virus wurde aus der Zecke *Ixodes ricinus* isoliert (Likar et al. 1956, Vesenjajak-Hirjan et al. 1965). Bei der abermaligen Epidemie in 1960 (Bedjanic et al. 1964) wurde aus dem Blut eines Patienten der Stamm „Omerzu“ isoliert, welcher dieselben Eigenschaften zeigte wie der Stamm „Slovenia BS“ (Vesenjajak-Hirjan, 1961). Um eine Einsicht in die biologischen Eigenschaften des Virus zu gewinnen, wurde in 1960 mit dem Stamm „Slovenia BS“ eine Serie experimenteller Inokulationen in weissen Mäusen vorgenommen. Die ersten präliminaren histologischen Analysen des Materials entsprachen den Befunden bei

einer Enzephalitis und Leptomeningitis, bzw. einer Polioenzephalitis und akuter Poliomyelitis (Vesenjok et al. 1961).

Zum Zweck des weiteren Studiums der experimentellen Zeckenzephalitis haben wir eine neue Serie von Versuchen vorgenommen, bei denen wir ausser den „Slovenia BS“ auch den „Omerzu“ Stamm angewandt haben.

Bei unserem Versuch begrenzten wir uns auf die erwachsene weisse Maus, die bei Untersuchungen der Zeckenzephalitis am meisten verwendet wird. Der Schwerpunkt unserer Prüfung in diesem Versuch war auf den histopathologischen Veränderungen im zentralen Nervensystem. Das Virus „Slovenia BS“ wurde aus der zweiundzwanzigsten und „Omerzu“ aus der achten Passage der weissen Maus genommen. Die Inokulation wurde intrazerebral, intraperitoneal und subkutan an Gruppen von je fünf Mäusen, d.h. an insgesamt 15 Mäusen für jeden Stamm in der Verdünnung von  $10^{-1}$  infizierter Mäusegehirnsuspension durchgeführt.\* Die Tiere wurden geopfert, bzw. verendeten im Stadium eines ganz deutlichen klinischen Krankheitsbildes, das dem bekannten Verlauf und der Symptomatologie der experimentellen Zeckenzephalitis an der erwachsenen weissen Maus gänzlich entsprach (Przesmycki et al. 1956, Verlinde et al. 1955, Šublade et al. 1954; Kovac et al. 1959) und bei beiden Gruppen der Mäuse keine signifikante Unterschiede gezeigt hat. Neuropathologische Bearbeitung.

Das Gehirn und das Rückenmark wurden nach Fixierung des Materials in 10%-igem Formalin in Paraffin eingebettet und halbserienweise geschnitten. Die Schnitte wurden mit H+E und Thyonin gefärbt.

#### HISTOLOGISCHE BEFUNDE

Die histologische Analyse zeigte eine Serie mehr oder weniger charakteristischen Veränderungen, die wir einer besseren Anschauung wegen in drei basische morfologische Gewebephänomene zu gruppieren versuchten. Diese Phänomene fanden wir in verschiedenen gegenseitigen Kombinationen und in verschiedener Intensität, doch haben wir wegen der typischen und charakteristischen Erscheinungen jedes Phänomen abgesehen beschrieben und benannt.

Typ I (der „meningo-vasculäre“ Typ der Reaktion) ist durch eine meningo-vasculäre Verteilung von entzündlichen und necrotischen Läsionen

---

\* Die Vorbereitung des Virus und die Inokulation der im Institut gewonnenen Mäusesucht, als auch die Vorfolgung des klinischen Verlaufes der Infektion erkrankter Tiere, wurde von Dr E. Šooš durchgeführt, dem wir an dieser Stelle herzlich danken.

gekennzeichnet. Diese Läsionen stellen eigentlich eine Meningitis dar, mit Verbreitung des Prozesses in Virchow-Robins-Räumen und Einwirkung auf die Gefäßwände (Abb. 1). Neben lymphozytaren und leukozytaren Infiltraten und der Endothel- und Fibroblastenproliferation ist die Erscheinung der Erythrozytenextravasaten typisch, so dass die perivaskulären necrotischen Herde hie und da einen ausgesprochenen hämorrhagischen Charakter darbieten.

Da die Vaskulitis keine Tendenz einer Obliteration aufweist (Abb. 2), sind die nekrotischen Läsionen offenbar die Folge einer unmittelbaren toxischen Wirkung des Virus und weniger die Folge hypoxischer Natur, obwohl auch diese Komponente als Begleitfaktor in Betracht gezogen werden kann. Dieses Phänomen, wenn allein für sich selbst interpretiert, stellt das typische Bild einer disseminierten Entzündung mit starker toxischer Wirkung auf die hämatoenzephalische Barriere und Durchbruch dieser Barriere an jenen Stellen dar, wo die Wand der Blutgefäße durch den entzündlichen und nekrotischen Prozess mehr vulnerabil ist.

Typ II (der „angio-enzephalotoxische“ Typ) ist im Grunde ein unspezifisches, jedoch im Laufe dieses Versuches fast ständig vorkommendes, morphologisches Phänomen. Zum Unterschied vom Typ I, spielt sich dieses Phänomen auf dem Niveau der Vorkapillaren und Kapillaren und weniger im Bereich grösseren Gefäße ab, und hat keine scheinbare Verbindung mit den Leptomeningen. Dessen Hauptmerkmale sind eine maximale Hyperämie mit extensiver Transsudation und Extravasation (Abb. 3). An manchen Stellen in den vom Transsudat durchtränkten perivaskulären Herden kommt eine Nekrose vor, die wegen des kleinkörnigen Kern- und Gewebeerfalls von typischer, staubiger Struktur ist (Abb. 4). Hier wird auch auf das typische Bild eines Status spongiosus gestossen und sogar auf das Bild einer Erweichung, wobei nur eine sehr spärliche oder überhaupt keine zelluläre Entzündungsreaktion vorkommt. Dieser Veränderungstyp erinnert an toxische oder toxoallergische Reaktionen des Gewebes mit grösserer oder kleinerer Erythrozytenextravasation. Vom Aspekt der Entzündung aus betrachtet, würde dies dem Bild einer alterativen Entzündung, dem Stadium einer primären Alteration des Gewebes durch das Virus, mit Hyperämie, seröser Exsudation, und starker fast areaktiver Nekrose entsprechen. Dieser Veränderungstyp kann indessen nicht gesondert betrachtet werden, da er mehr oder weniger mit dem Typ I kombiniert vorkommt, doch war er in manchen Fällen so überwiegend, dass wir ihn als Charakteristikum getrennt haben.

Typ III (der „neurotropische“ Typ) stellt hauptsächlich eine Reihe degenerativer Veränderungen an den Neuronen dar, die mehr diffus vorkommen und keinen Eindruck einer Verbindung mit den perivaskulären

Herden erwecken (Abb. 5, 6). Von diesen Veränderungen sind hauptsächlich grössere Zellen, besonders an prädislozierten Stellen betroffen. Obwohl diese Veränderungen vom Standpunkt der Neuropathologie unspezifisch sind, könnten wir sie in zwei Grundtypen einteilen. Der eine (III-a) ist durch die Homogenisierung des Zytoplasmas und grobkörnigen Zerfall des Kernes und des Zytoplasmas charakterisiert, während es beim zweiten Typ (III-b) in erster Linie zur Vakuolisierung des Zytoplasmas und lythischer Desintegration des Kernes kommt. Im ersten Fall verliert die Zelle ihr normales Aussehen. Die Nisslsubstanz zerfliesst, das Zytoplasma wird homogenisiert und basophil, bricht klumpenweise ab und demarkiert sich vom Kern. Diese „grobkörnige Homogenisation“ führt zu stärkerem Hervorheben der einzelnen Fragmente des Zytoplasmas und des Kernes, was den falschen Eindruck von Inklusionen bieten kann. Echte Inklusionen wurden in unserem Material nicht vorgefunden. Die zweite „vakuolär-lytische Desintegration“ der Zellen kann besonders in Verbindung mit den Gewebeveränderungen des Typus II vorkommen, bei welchen der transsudative bzw. serös-exsudative Faktor das führende Phänomen ist und wir daher der Meinung sind, dass diese Veränderungen in diesem Sinne interpretiert werden sollen.

Die drei angeführten Prototypen der destruktiven Gewebeveränderungen kommen qualitativ und quantitativ in verschiedenen gegenseitigen Kombinationen vor. Die Klassifizierung haben wir nur zum Zweck einer leichteren und übersichtlicheren Interpretation der Ergebnisse aufzustellen versucht, mit dem Wunsch in die histologische Analyse solcher Experimente mehr Schematismus einzuführen.

Ausser diesen wichtigsten morphologischen Phänomenen wird das Bild durch Reaktionen des Stützgewebes, die sich bald nach primären Verletzungen melden, vervollständigt. Diese reaktive Vorgänge sind unspezifisch und entwickeln sich nach den bekannten Prinzipien der Reparation der Verletzung in Nervengewebe und der Entzündung im allgemeinen.

Die Astroglia zeigt an Stellen frischer Läsionen Zeichen der Degeneration mit Klasmatotendrose; es kommt bald auch zur Vermehrung der Zellen vor, die in den ersten Stadien die Alzheimersche Astroglia I und II aufzeigen. Die weitere Phase ist durch Gliose charakterisiert, die immer ein mehr fokales Aussehen behält und besonders mit Läsionen des Typ I verbunden ist. Die Vermehrung der Astroglia bemerkt man besonders im Hirnstamm und im Rückenmark, wo sie sich auch ohne Entzündungsherde melden kann. In solchen Gebieten wirkt die Astroglia mit der Mikroglia bei der Umkreisung der degenerierten Zellen und beim Formieren von Gliaknötchen an Stellen der desintegrierten Zellen.

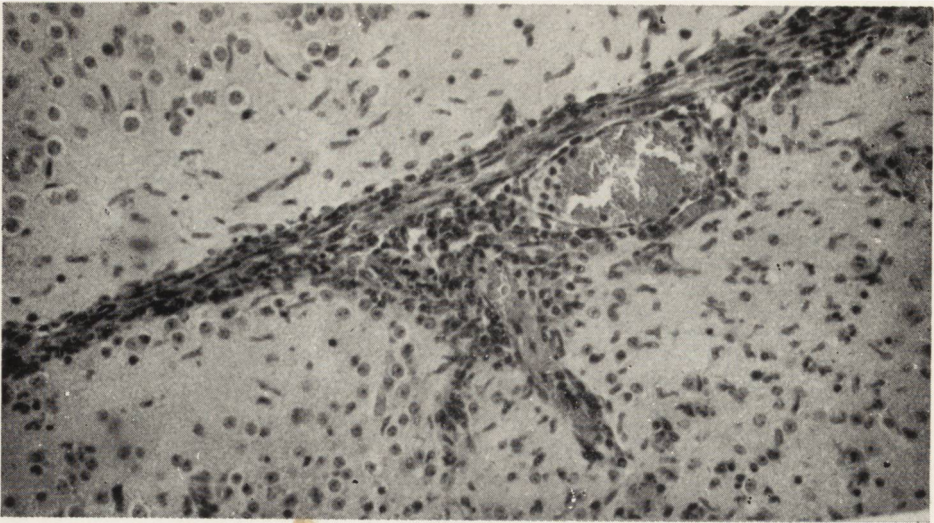


Abb. 1.

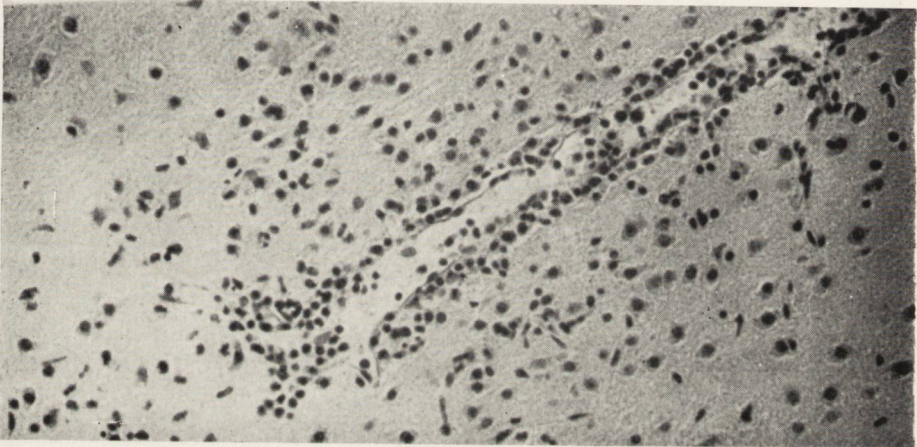


Abb. 2.

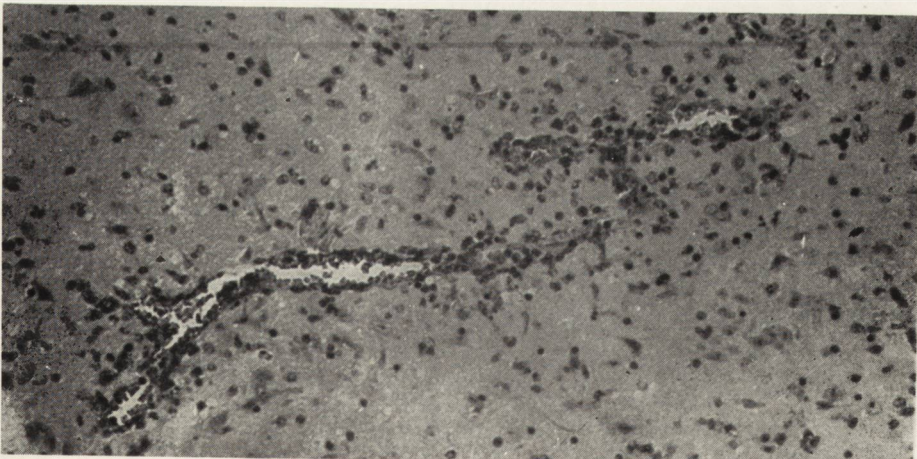


Abb. 3.



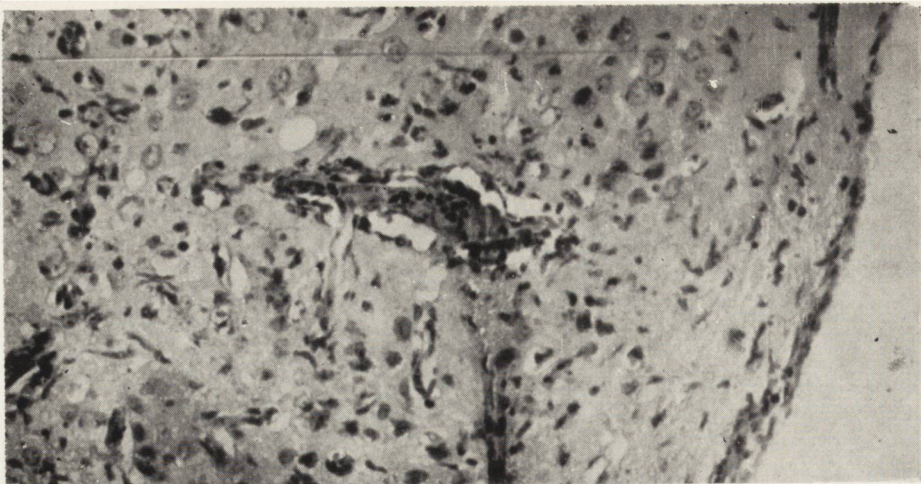


Abb. 4.

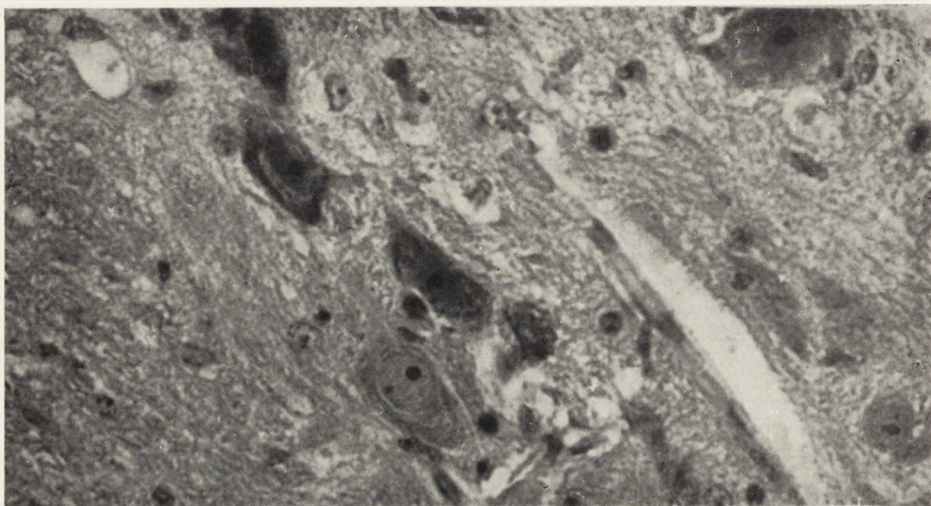
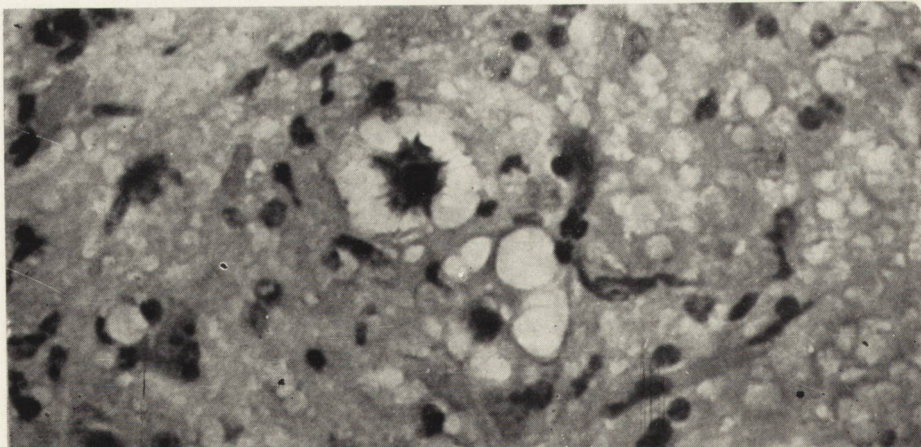


Abb. 5.



Ein kräftiges und früh wirkendes reaktives Element ist die Mikroglia. Sie kommt in der Umgebung perivaskulärer Infiltrate vor, jedoch auch diffus in den subpialen Zonen, regelmässig aber in der Funktion von Phagozyten, degenerierte Ganglienzellen umgebend (Neuronophagie).

In vielen Fällen bemerkt man auch typische mikrogliöse Knötchen. Körnchenzellen wurden in den meisten Fällen nicht bemerkt.

Die Proliferation des Endothels der Blutgefässe und der mesenchymalen Elemente weicher Hirnhäute ist eine regelmässige Begleiterscheinung der Veränderungen in den Herden Typ I. Die Schwellung und Proliferation des Endothels der Kapillaren meldet sich ständing beim Typ II.

Aus den Tabellen die wir darbringen, können wir mehrere Wahrnehmungen machen. Wie aus Tabelle I und II hervorgeht, ist die Anordnung der vertretenen Läsionstypen durch drei verschiedene Symbole für die Typen I, II und III dargestellt. Die Inkubations- und Krankheitsdauer bei den Gruppen „Omerzu“ (Tabelle 1) und „Slovenia BS“ (Tabelle 2) waren am kürzesten bei der intrazerebralen, und am längsten bei der subkutanen Inokulation.

Die Intensität der Veränderungen bei allen drei Typen trat am stärksten in den Gruppen der intrazerebral inokulierten Tieren hervor. Hier herrscht der meningovasculäre Veränderungstyp. Jedoch auch in den Gruppen mit intraperitonealer und subkutaner Inokulation, besonders bei den mit dem Virus „Slovenia BS“ geimpften Tieren, stossen wir auf Fälle, die sich morphologisch von jenen der intrazerebral inokulierten nicht unterscheiden (Nr 7, 13, 22, 25). In manchen Fällen ist der Typ I sowohl bei der intraperitonealen als auch bei der subkutanen Inokulation völlig abwesend. Der angioenzephalotoxische Veränderungstyp, d.h. der Typ II, ist regelmässig vertreten, am intensivsten bei der intrazerebralen, jedoch zuweilen sehr stark auch bei der intraperitonealen und subkutanen Inokulation.

Degenerative Veränderungen bei den Neuronen, d.h. unser Typ III, sind in allen Fällen vertreten. Der Unterschied zwischen der intraperitonealen und subkutanen Inokulation ist nicht signifikant.

In bezug auf die Prädilektion der Veränderungen war unser Material für eine erschöpfende statistische Analyse unzureichend und wir daher diese in einer neuen Versuchsserie durchgeführt werden. Wir haben indessen wahrgenommen, dass in der mit dem „Omerzu“ Stamm inokulierten Gruppen die Tendenz einer Anhäufung von Läsionen in den periventriculären Regionen, im Gehirnstamm und im Rückenmark vorherrscht, während in der mit dem Stamm „Slovenia BS“ inokulierten Gruppe diese Tendenz ausblieb, wo die Erscheinungen mehr diffus, mit mehr kortikalen Veränderungen hervortraten.

Bei einigen Tieren stossen wir auf umfangreiche hypoxische Veränderungen, die offensichtlich durch Ertränkung und Asphyxie hervorgerufen wurden.

Zum Schluss sei bemerkt, dass auf Grund unseres Versuches kaum die Rede vom Tropismus des Virus sein kann, da viszerotropische Reaktionen

Tabelle 1. Mit dem Stamm „Omerzu“ inokulierte Weisse Mäuse übersicht des Experimentes

Art der Inokulation	Nummer	Tag der Erscheinung der ersten Symptomen	Tag der Lebensdauer nach der Inokulation	Typ der Veränderungen	Grosshirnrinde	Hippocampus	Basal Ganglien	Hirnstamm	Kleinhirn	Rückenmark
Intracerebral	1	3	4 1/2	///	●●●● ^>>>>	●●●● ^>>>>	●●●● ^>>>>	●●●● ^>>>>	^^	●● ^>>
	2	3	4 1/2	///	●●●● ^>>>>	●●●● ^>>>>	●●●● ^>>>>	●●●● ^>>>>	^^	●● ^>>
	3	5	5 1/2	///	●●●● ^>>>>	●●	●●●● ^>>>>	●●●● ^>>>>		●● ^>>
	4	5	5 1/2	///	●●●● ^>>>>	●●	○●○ ^>>>>	●● ^>>>>	○	●● ^>>>>
	5	5	5 1/2	///	● ^>>>>		● ^>>>>	○ ^>>>>	^	●● ^>>
Intraperitoneal	6	5	5 1/2	///	●● ^>>>>	●	○●○ ^>>>>	○●○	○●	○●○
	7	5	6	///	●● ^>>>>	○	●● ^>>>>	●● ^>>>>	^^>>	●● ^>>>>
	8	5	7	///	●● ^>>>>	^^	○● ^>>>>	○●○ ^>>>>	○	○ ^>>>>
	9	5	8 1/2	///	● ^>>>>		○ ^>>>>	○ ^>>>>	^^	○ ^>>>>
	10	5	8 1/2	///	●○ ^>>>>	○	○ ^>>>>	○ ^>>>>	^	○ ^>>>>
Subcutan	11	6	7	///	●○ ^>>>>		●○ ^>>>>	○●○ ^>>>>	○●	●○ ^>>>>
	12	6	7	///	○ ^>>>>	○	○ ^>>>>	○ ^>>>>	^	○ ^>>>>
	13	6	8 1/2	///	●● ^>>>>	○	●○ ^>>>>	●○ ^>>>>	●	●● ^>>>>
	14	6	8 1/2	///	○ ^>>>>	○	○ ^>>>>	^	○	○ ^>>>>
	15	6	14	///	● ^>>>>	^		^^	^^>>	^^

Tabelle 2. Mit dem Stamm „Slovenija B.S.“ inokulierte weisse Mäuse übersicht des Experimentes

Art der Inokulation	Nummer	Tag der Erscheinung der ersten Symptomen	Tag der Lebensdauer nach der Inokulation	Typ der Veränderungen	Grosshirnrinde	Hippocampus	Basal Ganglien	Hirnstamm	Kleinhirn	Rückenmark
Intracerebral	16	3	3 1/2		●●●● >>>>	○ >>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>
	17	3	3 1/2		●●●● >>>>	○ >>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	○●○● >>>>	○●○● >>>>
	18	4	5		●●●● >>>>	>>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	>>>>	>>>>
	19	5	6		●●●● >>>>	●●●● >>>>	●●●●○ >>>>	●●●●○ >>>>	○●○●○ >>>>	>>>>
Intraperitoneal	20	3	3 1/2		○ >>	>>>>	○ >>	○ >>>>	>>>>	○ >>
	21	4	5		●●●● >>>>	>>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	○ >>>>
	22	5	6		●●●●○ >>>>	●●●● >>>>	●●●●● >>>>	●●●●● >>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>
	23	4	6		●●●● >>>>	● >	●●●● >>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	○ >>>>
	24	5	6 1/2		●●●● >>>>	○ >>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	●●●● >>>>	>>>>
Subcutan	25	3	3 1/2		●●●● >>>>	●● >	●●●● >>>>	●●●●○ >>>>	>>>>	●●●● >>>>
	26	5	6 1/2		●●●● >>>>	>	●●●●○ >>>>	○●○● >>>>	○●○● >>>>	○●○● >>>>
	27	6	7		●●●● >>>>	>	●●●● >>>>	○●○● >>>>	○●○● >>>>	○●○● >>>>
	28	6	7		●●●● >>>>	>	●●●● >>>>	○●○● >>>>	>>>>	>>>>
	29	6	7		●●●●○ >>>>	>>>>	●●●●○ >>>>	○●○● >>>>	○●○● >>>>	○●○● >>>>

im allgemeinen ebenso oft wie neurotropische vorkommen, insofern es auf Grund einer histologischen Analyse überhaupt möglich ist über den Tropismus des Virus zu diskutieren. Diese präliminaren Ausführungen stellen die histologischen Charakteristiken von Läsionen im Nervensystem mit unserem verwendeten Stämmen fest, während das Studium der Verteilung der Läsionen und der Entwicklung des pathologischen Prozesses in einer anderen Versuchsreihe vorgesehen ist.

V. Vince, N. Grčević

## HISTOPATOLOGIA DOŚWIADCZALNEGO KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MOZGU WYWOŁANEGO PRZEZ WYIZOLOWANE W JUGOSŁAWII WIRUSY

### Streszczenie

Praca stanowi kontynuację badań doświadczalnych prowadzonych w Jugosławii nad wirusami Slovenia BS i Omerzu przenoszonymi przez kleszcze *Ixodes ricinus* i wywołującymi obserwowane w Jugosławii pn.-zach. od 1947 r. sezonowe epidemiczne lub endemiczne zapalenie opon i mózgu. Doświadczenie przeprowadzono na białych myszach. Wirus Slovenia BS pochodził z 22 pasażu, Omerzu z 8. Do inokulacji użyto zakażonej zawiesiny mózgu myszy w rozcieńczeniu  $10^{-1}$ , którą podawano domózgowo, dootrzewnowo i podskórnio w grupach po 5 myszy, łącznie 15 dla każdego szczepu. Po wystąpieniu typowego zespołu chorobowego myszy zabijano. Mózg i rdzeń po utrwaleniu w 10% formalinie zatapiano w parafinie, krojono w serie nieciągłe i barwiono hematoksyliną — eozyną i tioniną.

Obserwowane zmiany morfologiczne można ująć w 3 podstawowe grupy:

Grupa I — „oponowo-naczyniowy” typ reakcji, właściwie meningitis z penetracją nacieków do tkanki wzdłuż naczyń. Nacieki limfocytarne-leukocytarne. Typowo występujące krwinkotoki nadają okołonaczyniowym ogniskom martwicy charakter krwotoczny.

Grupa II — „angio-encefalotoksyczny” typ reakcji z maksymalnym przekrwieniem i rozległymi przesiekami, głównie wokół włóściczek i przedwłóściczek, mniej wokół większych naczyń śródmiąższowych. Miejscami występowały tutaj okołonaczyniowe zmiany gąbczaste lub pełne martwice bezodczynowe albo z minimalną tylko reakcją zapalną. Ten typ zmian przypominał odczyn toksyczne lub toksykoalergiczne.

Grupa III — „neurotropowy” typ reakcji z niespecyficznymi zmianami zwyrodnieniowymi w neuronach, zwłaszcza większych. Zmiany miały charakter homogenizacji z gruboziarnistym rozpadem cytoplazmy i jądra (typ IIIa), albo też wakuolizacji cytoplazmy z kariolizą (typ IIIb). Te trzy typy zmian tkankowych występowały w różnym stosunku jakościowym i ilościowym, w największym nasileniu u myszy zakażonych domózgowo, przy czym w tej grupie dominował oponowo-naczyniowy typ reakcji. II grupa reprezentowana była dosyć regularnie u wszystkich zwierząt z największym natężeniem zmian po podaniu domózgowym. Zmiany zwyrodnieniowe w neuronach obserwowano u wszystkich zwierząt. U myszy zakażonych wirusem Omerzu dominowały zmiany w okolicach przykomorowych, w pniu i w rdzeniu, w przypadku wirusa Slovenia BS były one bardziej rozlane, z większym zajęciem kory.

V. Винце, Н. Грчевич

## ГИСТОПАТОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ВЫЗВАННОГО ВИРУСАМИ, ИЗОЛИРОВАННЫМИ В ЮГОСЛАВИИ

### Содержание

Настоящая работа является продолжением проводимых в Югославии экспериментальных исследований над вирусами Словения BS и Омерзу, переносимыми клещами *Ixodes ricinus* и вызывающими наблюдаемый с 1947 г. в северо-запад-

ной Югославии сезонно-эпидемический и эндемический менингит и энцефалит. Опыты проводились на белых мышах. Вирус Словения BS происходил из 22 пассажа, Омерзу — из 8. Для инокуляции употребляли инфицированную взвесь мозга мышей в разведении  $10^{-1}$ , которую вводили внутримозговым, внутрибрюшинным и подкожным путем в группах по 5 вышей, всего 15 для каждого штамма. После получения типичного синдрома мышей умерщвляли. Головной и спинной мозги после фиксации в 10% формалине заливали парафином, срезали в серии и окрашивали гематоксилин-эозином и тионином.

Наблюдаемые морфологические изменения распределяются по трем основным группам:

Группа I — „менингеально-сосудистая” форма реакции, собственно менингит с проникновением инфилтратов в ткань по ходу сосудов. Лимфацитно-лейкоцитные инфилтраты. Типичные диапедезы придают околососудистым очагом некроза гемморагический характер.

Группа II — „ангио-энцефалотоксическая” форма реакции с максимальной гиперемией и обширными экссудатами, главным образом вокруг капилляров и прекапилляров, в меньшей степени вокруг паренхиматозных сосудов большего калибра. В отдельных очагах наблюдались здесь спонгиозидальные изменения либо ареактивные некрозы или с минимальной воспалительной реакцией. Эта форма изменений была сходна с токсическими либо токсико-аллергическими реакциями.

Группа III — „нейротропная” форма реакций с неспецифическими дегенеративными изменениями в нейронах. Изменения носили характер гомогенизации с крупнозернистым распадом или-же вакуолизации цитоплазмы с кариолизом (форма IIIб). Эти три формы тканевых изменений отличались значительной количественной и качественной неоднородностью, они были наиболее интенсивными у мышей инфицированных внутримозговым путем, причем в этой группе преобладала менингеально-восклюдарная форма реакций. II группа распределялась довольно регулярно по всем животным, с максимальной выраженностью изменений при внутримозговой инфекции. Дегенеративные изменения нейронов наблюдались у всех животных. У мышей инфицированных вирусом Омерзу преобладали изменения в паравентрикулярных областях, в стволе и спинном мозге, при инфекции вирусом Словения BS — они были более диффузными с преобладанием изменений в коре.

#### SCHRIFTTUM

1. Bedjanič M., Rus S., Kmet J., Vesenjāk-Zmijanac J.: Bull. Wrld. Hlth. Org. 1966, 12, 503.
2. Bedjanic M., Jung M., Vesenjāk-Hirjan J., Kmet J., Lesničar J., Jung F., Tovornik D., Snoj B.: Zdravstveni vestnik XXXIII, 1964, 10—11, 245.
3. Kmet J., Vesenjāk-Zmijanac J., Bedjanič M., Rus S.: Bull. Wrld. Hlth. Org. 1955, 12, 491.
4. Kovac W., Moritsch H.: Zentralblatt Bakt. Paras. Infekt. Hyg. I orig. 1959, 174.
5. Likar M., Kmet J.: Bull. Wrld. Hlth. Org. 1956, 15, 275.
6. Pond W. L., Russ S. B.: Bull. Wrld. Hlth. Org. 1955, 12, 591.
7. Przesmycki F., Taitsch Z., Wróblewska Z., Semkow R., Stańczyk R., Kamieniecka Z., Kirkovska-Kicińska H.: Ann. Inst. Pasteur, suppl. 1956, 91, 3.

8. Subladze A. K., Gaidamovič C. J.: Kratki kurs praktičeskoj virusologii. Medgiz 1954, Moskva. 219.
9. Vesenjāk-Zmijanac J., Bedjanič M., Rus S., Kmet J.: Bull. Wrld. Hlth. Org. 1955, 12, 513.
10. Vesenjāk J.: Zeckenezephalitis in Europa. Ausgegeben von H. Libikova, Akademie-Verlag, Berlin 1961, 187.
11. Vesenjāk-Hirjan J., Tovornik D.: Persönliche Mitteilung. 1965.
12. Vesenjāk-Hirjan J., Galinovič V.: Persönliche Mitteilung. 1965.
13. Vesenjāk J., Zimolo A.: cit. in 5.
14. Verlinde J. D., van Tongeren N. A. E., Pattyn S. R., Rosenzweig A.: Bull. Wrld Hlth. Org. 1955. 12, 565.

### OBBILDUNGSERLÄUTERUNGEN

*Abb. 1.* Typischer Herd Typ I in der Hirnrinde. Entzündliche Infiltration und menenchymale Proliferation der weichen Häute und Virchow-Robinsräume mit Durchbruch im Hirngewebe, der Vaskulitis und beginnender Nekrose. H.E. x 240.

*Abb. 2.* Frische entzündliche Infiltrate Typ I am Ende eines perforierenden Gefäßes in der Hirnrinde. Ganglienzellen der Umgebung zeigen akute ischämische Veränderungen (Asphyxie). H.E. x 180.

*Abb. 3.* Nekrotisch-hämorrhagische Veränderungen auf dem Niveau der Präkapillaren, doch ohne entzündliche Infiltrate in Ty II. Starke Hyperämie. H.E. x 160.

*Abb. 4.* Akute nekrotische Vaskulitis mit seröser Exudation und starken Gewebeödem, Extravasation und „staubiger Nekrose“. Veränderungen Typ II. H.E. x 480.

*Abb. 5.* Homogenisierende Degeneration der Ganglienzellen mit grobkörniger Desintegration des Kernes und des Protoplasmas. Typ III-a. H.E. x 840.

*Abb. 6.* Vakuolär-lytische Desintegration der Ganglienzellen. Typ III-b. Vorderkörner des Rückenmarks. H.E. x 840.

J. M. JABOTINSKI

DISTINCTIONS MORPHOLOGIQUES ENTRE LES INFECTIONS  
NEUROVIRALES A CARACTERE ANTIGENIQUE PROCHE OU  
IDENTIQUE

Institut de médecine expérimentale à Léninegrad

Pour se faire une idée plus ou moins juste de l'aspect pathomorphologique de l'encéphalomyélite on ne saurait se borner, sous le rapport autant morphologique que clinique, à étudier une seule ou quelques-unes des régions du système nerveux, mais on devrait plutôt procéder à une exploration globale de l'encéphale et de la moelle, de même qu'à l'examen des certaines régions du système nerveux périphérique, somatique et autonome, des viscères et des tissus. D'ailleurs, le processus infectieux doit être étudié en plein dynamisme, sur un vaste matériel expérimental et/ou anatomo-pathologique, aux différents stades de maladie, l'incubation y comprise. Quant aux recherches morphologiques comparatives, il serait recommandable de les effectuer sur des animaux de différentes espèces, parmi lesquels — ceux que la neuro-infection en question frappe dans des conditions naturelles — isatis, par exemple, lorsqu'il s'agit de la rage arctique (dikovanié) et de la rage.

L'étude du système nerveux en cas des processus pathologiques variés, et notamment en cas d'infections, a démontré qu'on n'arrive pas à déceler des altérations spécifiques dans les neurones ou autres structures morphologiques, mais que l'ensemble de données recueillies sur la nature des altérations et surtout sur leur extension topographique et le dynamisme de leur évolution permet d'établir les caractères morphologiques typiques pour plusieurs maladies infectieuses (encéphalo-myélites transmissibles rage, rage arctique (dikovanié), encéphalo-myélite de Tobolsk etc.), ce qui servirait d'un grand appui à l'analyse pathogénique et à la diagnose différentielle.

Les lésions des neurones ne sont observées que dans des régions ou des noyaux déterminés et parfois nettement délimités, tandis que les autres, tout proches qu'ils soient, restent indemnes, ce qui, avec un certain caractère de réaction inflammatoire et neurogliale, sert à différencier les



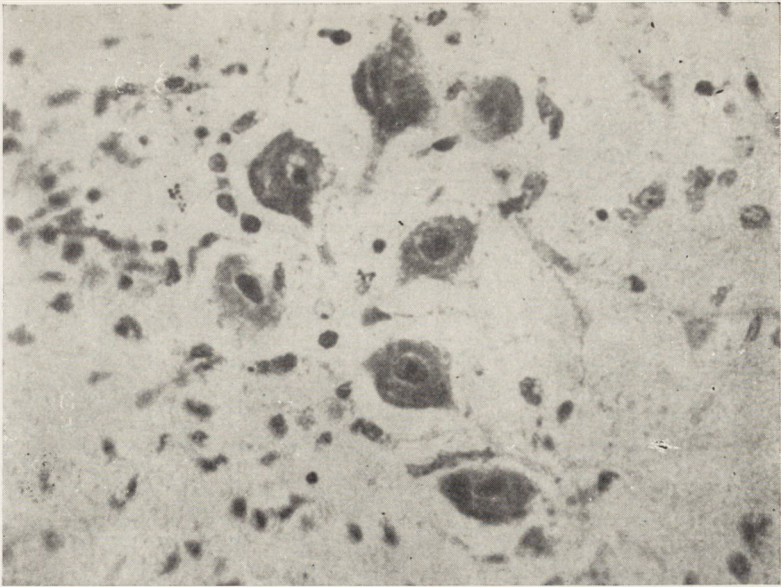
infections neurovirales variées. Nous avons établi cette prédilection des lésions dans le système nerveux au cours de plusieurs encéphalites transmissibles — encéphalites écossaise et japonaise, méningo-encéphalite bi-ondulate (Jabotinski 1938, 1954 i 1957, Sviatoukhina 1957), et aussi en cas de rage (Zoubova 1957, Konovalov 1965), de rage arctique (dikovanié), d'encéphalite de Tobolsk (Konovalov 1964), d'encéphalo-myélite équine (Jabotinski 1938) etc. On trouvera cités dans le présent article quelques exemples des particularités topographiques des lésions dans les régions et les noyaux du système nerveux, surtout — dans le tronc cérébral, décelées au cours des recherches portées sur les infections neurovirales.

Les altérations pathomorphologiques des neurones lors de toutes les infections neurovirales revêtent généralement un caractère homogène (nécrobiotique), avec liquéfaction du cytoplasme, pycnose et désagrégation du noyau, ce qui les rend impropres à servir de base pour une diagnose différentielle de ces infections.

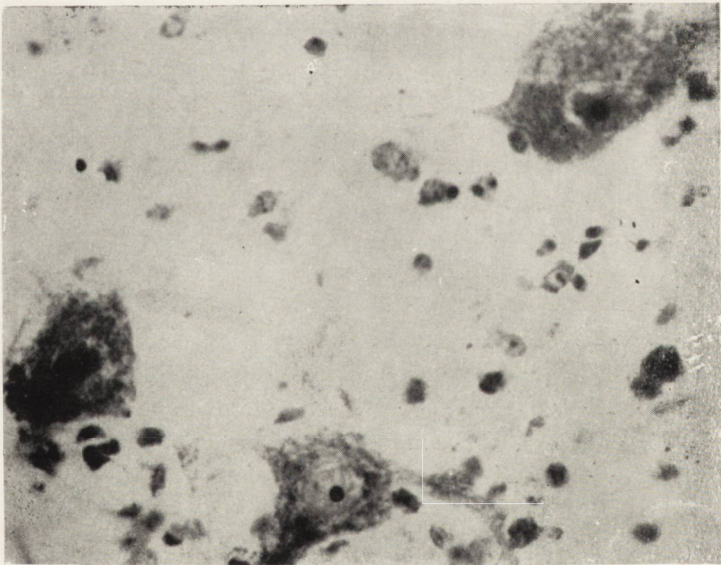
Les recherches morphologiques expérimentales, réalisées pour la plupart sur des souris blanches et des isatis et largement portées sur plusieurs régions du système nerveux, jouent souvent un rôle décisif dans la diagnose différentielle des infections neurovirales à caractère antigénique proche ou identique, dans les cas où cette diagnose n'est pas réalisable à l'aide des méthodes sérologiques et virologiques.

Une vaste exploration des différentes régions du système nerveux révèle une valeur toute particulière pour la diagnose morphologique différentielle des encéphalites neurovirales transmissibles. Toutefois, à cause d'une grande ressemblance qu'offre leur aspect pathomorphologique dans le système nerveux, seules les recherches morphologiques réalisées sur un grand nombre des animaux d'essai (souris blanches), dans des termes variés après l'infection, ont permis d'établir pour ces encéphalites quelques distinctions dans la topographie et l'électivité des lésions et dans la réaction inflammatoire neurogliale et vasculoconjonctive. Les particularités des altérations pathomorphologiques lors des encéphalites neurovirales: encéphalo-myélites écossaise et à tiques, méningo-encéphalite bi-ondulante et d'autres encore, d'une si grande ressemblance sous le rapport antigénique, présentent une valeur considérable quant à la diagnose différentielle, les méthodes virologiques ne permettant pas d'établir des distinctions entre les virus responsables de ces maladies.

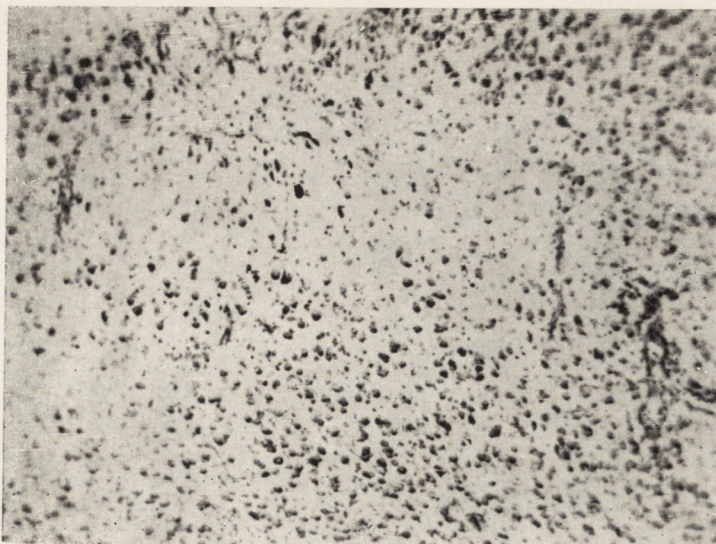
En premier lieu, la dissemblance se traduit par des particularités topographiques dans les lésions graves des neurones au régions et aux noyaux variés du système nerveux. Signalons qu'en n'appliquant que des méthodes histologiques traditionnelles — coloration à l'hématoxyline-éosine, par exemple, — et surtout après la fixation par formol, les chercheurs con-



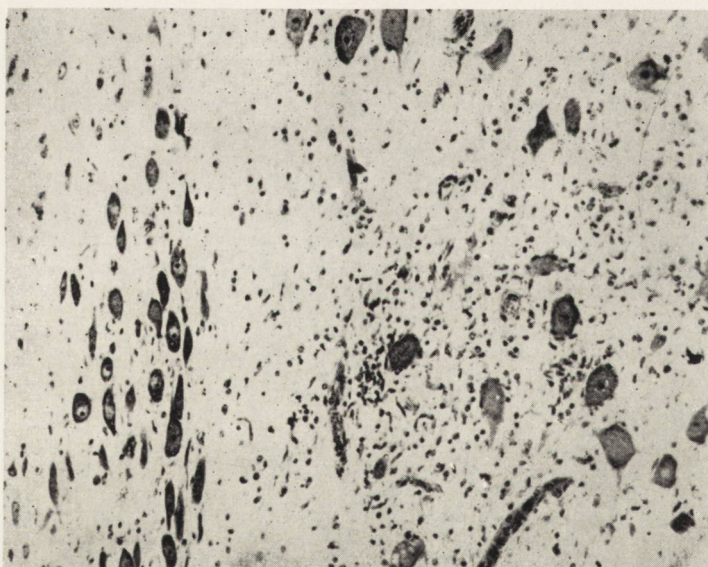
*Fig. 1.* Altérations nécrotiques des cellules motrices dans la région cervicale de la moelle chez une souris blanche atteinte d'encéphalite écossaise. Coloration d'après Nissl.



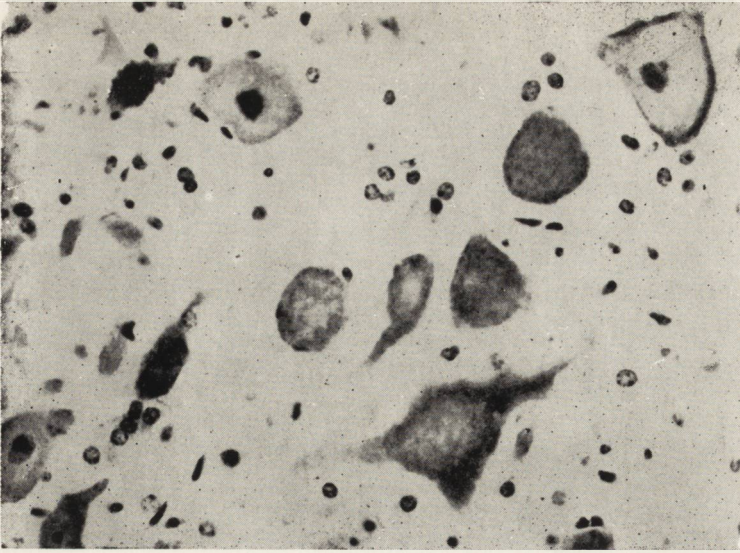
*Fig. 2.* Hyperchromatose nucléaire et liquéfaction du cytoplasme dans les cellules géantes de la formation réticulaire du tronc cérébral chez une souris blanche atteinte de méningo-encéphalite bi-ondulante. Coloration d'après Nissl.



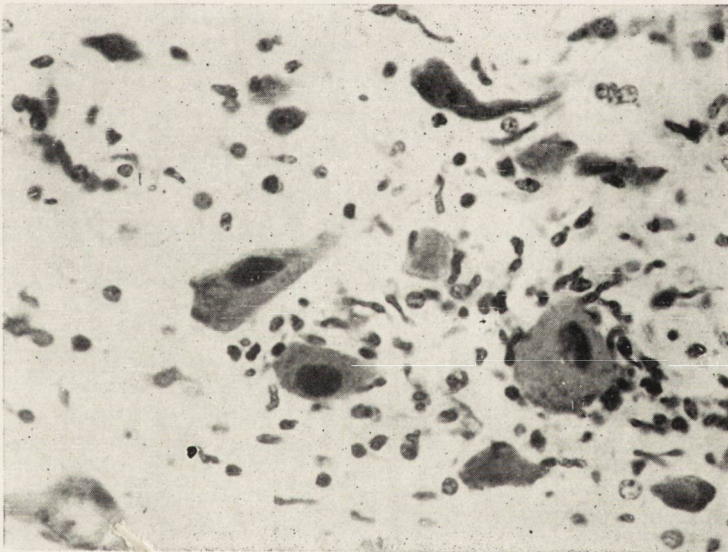
*Fig. 3.* Lieu de perte des neurones dans la deuxième — troisième couche de l'écorce cérébrale chez une souris blanche atteinte d'encéphalite japonaise. Coloration d'après Nissl.



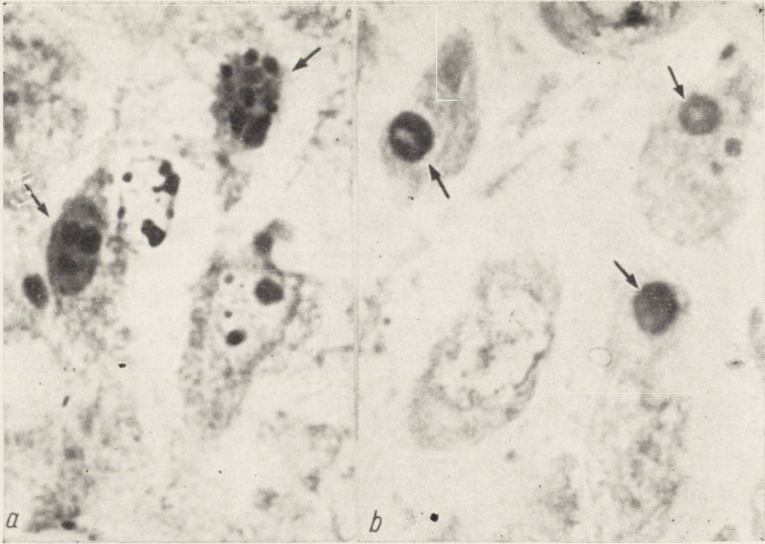
*Fig. 4.* Lésion élective des neurones dans le noyau de l'hypoglosse (à droite), les neurones du noyau dorsal du pneumogastrique gardant leur état normal chez un isatis atteint de rage arctique (dikovanié). Coloration d'après Nissl.



*Fig. 5.* Altérations nécrobiotiques dans les neurones du noyau de Deiters chez un isatis atteint de rage arctique (dikovanié), Coloration d'après Nissl.



*Fig. 6.* Altérations nécrobiotiques dans les neurones du noyau central supérieur de la calotte chez un isatis atteint d'encéphalite de Tobolsk. Coloration d'après Nissl.



*Fig. 7.* Inclusions cytoplasmiques à granulation basophile dans les neurones de la corne d'Ammon chez une souris blanche atteinte de rage arctique (dikovanié) — *a.* Coloration d'après Nissl; Inclusions cytoplasmiques homogènes de Babes-Négri sans granulation basophile dans les neurones de l'écorce cérébrale d'un isatis — *b.* Coloration d'après Dominicci-Pigarevski.

centraient toute leur attention à l'infiltration inflammatoire et sous-estimaient la présence, la gravité et la topographie des lésions dans les neurones. C'était par exemple, le cas de l'encéphalo-myélite japonaise (Kawamura avec colab. 1936, Takaki 1934 et autres). Ces auteurs présumaient à tort que les altérations dégénératives dans les cellules nerveuses jouent un rôle secondaire par rapport aux réactions vasculaire et neurogliale.

Tout le groupe d'encéphalites transmissibles neurovirales étudiées dans notre laboratoire est caractérisé par une lésion qui apparaît dans des conditions expérimentales dans les cellules motrices de la moelle (fig. 1), mais il en est quelques-unes qui offrent quelques particularités. C'est ainsi que dans tous les cas d'encéphalite à tique ou de méningo-encéphalite bi-ondulante, ce ne sont que les cellules motrices qui se trouvent lésées dans la moelle et notamment dans la région cervicale, tandis que lors de l'encéphalite écossaise les altérations de ces neurones sont loin d'être présentes dans tous les cas et, en outre, des altérations sont observées en même temps dans les cellules des cornes postérieures. Dans l'encéphalomyélite japonaise, contrairement aux autres encéphalites transmissibles, les cellules motrices se trouvent entraînées dans le processus morbide d'une façon plus ou moins égale sur toute la longueur de la moelle.

Les plus grandes dissemblances sont observées dans certains noyaux du tron cérébral. Si, par exemple, lors d'une méningo-encéphalite bi-ondulante, les neurones des noyaux moteurs du trijumeau offrent presque constamment de graves altérations, l'encéphalite écossaise, par contre, n'y produit pas généralement de déviations appréciables. Les noyaux sensitifs du même nerf ou les noyaux du raphé du pont de Varole au même niveau ne sont pas altérés. D'ailleurs, au cours de cette neuro-infection-ci, des lésions sont souvent observées dans les cellules géantes de la formation réticulaire (fig. 2) et assez fréquemment — dans celles des noyaux rouges et des noyaux de Deiters. Une moitié à peu près de groupe de souris blanches, sacrifiées à l'état grave, présentaient des altérations considérables dans les cellules de Purkinje du cervelet. Lors de l'encéphalite à tique extrême-orientale printanière et estivale on a décelé chez des hommes de graves altérations dans les cellules de l'olive inférieure et dans celles du plancher du IV ventricule, et notamment — du noyau dorsal du pneumogastrique. Par contre, dans le méningo-encéphalite bi-ondulante expérimentale, les lésions au niveau des olives inférieures ou des noyaux dorsaux du pneumogastrique ne sont guère observées.

L'encéphalite japonaise est caractérisé par une lésion des neurones dans les noyaux du glosso-pharyngien et du facial, noyaux vestibulaires et rouges, noyaux du cervelet, noyaux cunéiformes et ceux du cordon

grêle. Les altérations de ces noyaux sont observées tant au cours des expériences sur des souris blanches que dans les cas où la maladie atteint les hommes. Contrairement à l'encéphalite japonaise, les lésions dans les neurones du facial ne sont pas typique pour l'encéphalite écossaise.

Généralement, les cellules nerveuses de l'écorce cérébrale ne sont que faiblement lésées lors des encéphalites transmissibles, toutefois, dans l'encéphalite japonaise ces lésions sont plus fréquentes (fig. 3). La méningo-encéphalite bi-ondulante ne provoque que bien rarement une lésion dans les neurones de l'écorce cérébrale, mais plus souvent elle englobe dans le processus morbide les ganglions de la base du cerveau.

Les particularités des réactions inflammatoires vasculo-conjonctive et névrogliale, dues aux différentes infections neurovirales, peuvent servir de facteur supplémentaire pour la diagnose différentielle de ces maladies. Contrairement à l'opinion accréditée selon laquelle la présence du processus inflammatoire est typique pour les maladies infectieuses, et notamment — pour les infections neurovirales, nos recherches ont démontré que dans le système nerveux ce processus peut être quasi totalement absent (en cas d'encéphalomyélite équine) ou faiblement exprimé et revêtir un caractère nettement secondaire (par exemple, en cas de méningo-encéphalite bi-ondulante) ou enfin, être très intense, ce qui a lieu en cas de rage.

Les phénomènes réactionnels inflammatoires peu appréciables de la part des éléments vasculo-conjonctifs et de la névrogliie, en présence de graves lésions dans les neurones, observés lors de l'encéphalomyélite équine en URSS, ont premièrement donné lieu à présumer que cette maladie n'était pas due à une infection neurovirale, mais résultait d'une intoxication alimentaire.

Quoique la réaction inflammatoire, souvent observés au cours de l'encéphalite écossaise revête un caractère secondaires par rapport aux altérations des neurones, elle n'en figure pas moins au premier plan du tableau pathomorphologique général. Quant à la méningo-encéphalite bi-ondulante, elle n'offre pas de réaction inflammatoire constante, qui fait complètement défaut dans de nombreux cas et recule toujours au deuxième plan par rapport aux altérations des neurones.

Il existe entre les encéphalites neurovirales sus-mentionnées encore quelques distinctions dans le caractère de la réaction névrogliale et dans le temps qu'elle met à apparaître après l'infection des animaux.

Une diagnose différentielle des infections neurovirales, antigéniquement apparentées — rage, rage arctique (dikovanié) et encéphalo-myélite de Tobolsk s'est avérée réalisable lors d'une exploration morphologique ex-

périmentale du système nerveux, largement portée sur ses régions et effectuée sur des animaux de différentes espèces (isatis, chiens, souris blanches). Il s'est trouvé que les premiers conviennent le mieux pour des recherches expérimentales vu qu'ils sont atteints de rage arctique (dikovanié) et de rage dans des conditions naturelles. Dans chacune de ces infections neurovirales, on observe chez les isatis de différents symptômes pathologiques et des dissemblances bien nettes dans l'aspect pathomorphologique. L'infection de ces animaux avec des virus neurotropes par voie intra-cérébrale ou par voie de masséter provoque des maladies à évolution différente, mais toujours mortelle. En cas de rage arctique (dikovanié), la maladie revêt toujours une forme „tranquille”, sans stade d'excitation, tandis que la rage a une forme „agressive” avec une agitation intense et enfin, l'encéphalite de Tobolsk est caractérisée par des formes „paralytiques” avec des phénomènes ataxiques.

L'extension topographique des altérations des neurones dans toutes les trois infections neurovirales est d'une valeur considérable pour établir les dissemblances morphologiques qui les différencient.

La rage arctique (dikovanié) des isatis est caractérisée par les plus graves altérations dans les neurones au niveau du tronc cérébral, dans les régions cervicale et thoracale de la moelle avec une lésion élective des noyaux moteurs des nerfs crâniens — trijumeau, facial, pneumo-gastrique, hypoglosse (fig. 4), du noyau de la racine mésencéphalique du trijumeau, du locus caeruleus, des noyaux de la formation réticulaire, des noyaux de Deiters (fig. 5), du noyau dorsal interne, du noyau arciforme, des noyaux du cervelet, des cellules motrices des régions cervicale et thoracale supérieure de la moelle, de même que des ganglions spinaux aux mêmes niveaux. Les lésions moins fréquentes et plus faibles sont observées dans les neurones du noyau central supérieur de la calotte, du noyau du nerf oculo-moteur externe, du noyau ventral du tuber etc.

Chez les isatis, lors de la rage, les plus graves altérations des neurones sont décelées dans les différents noyaux de la formation réticulaire, dans les noyaux de Deiters, de la racine descendante du trijumeau, dorsal du pneumo-gastrique, arciforme, dans les neurones des cornes antérieurs et postérieurs des régions cervicale et thoracale de la moelle et dans ganglions spinaux aux mêmes niveaux. Des altérations relativement moins graves sont observées dans les neurones du noyau externe du faisceau cunéiforme, du noyau triangulaire, des noyaux et des cellules de Purkinje du cervelet.

L'encéphalite de Tobolsk est caractérisée par de graves lésions dans les neurones du noyau latéral et des cellules géantes de la formation



réticulaire, du noyau supérieur de la calotte (fig. 6), du noyau lenticulaire, des neurones des cornes antérieures et postérieures des régions cervicale et lombaire de la moelle. Une perte massive des neurones avec la formation des nodules „résiduels” est observée dans les ganglions spinaux. Les noyaux de Deiters et le noyau externe du faisceau cunéiforme portent des lésions moins graves.

Contrairement aux isatis et aux chiens, chez les souris blanches inoculées avec toutes les trois infections neurovirales en question on voyait prédominer le processus inflammatoire, tandis qu'on n'a décelé de graves lésions que dans un nombre très restreint des noyaux du tronc cérébral (noyau de la racine mésencéphalique du trijumeau, noyaux des cellules géantes de la formation réticulaire, noyaux moteurs des nerfs trijumeau et facial).

Le processus inflammatoire observé dans toutes les trois infections est le plus nettement accusé lors de la rage, quelque peu moins — lors de la rage arctique (dikovanié) et n'est que très faible lors de l'encéphalite de Tobolsk.

Quant à la diagnose différentielle de la rage, de la rage arctique (dikovanié) et de l'encéphalite de Tobolsk, c'est l'étude des inclusions cytoplasmiques oxyphiles qui y revêt une valeur extrême. Après l'infection des isatis avec des souches du virus de la rage des rues, on voit se former des inclusions oxyphiles dans les cellules pyramidales de la corne d'Ammon et les cellules Purkinje du cervelet, tandis que chez les mêmes animaux inoculés avec le virus de la rage arctique les inclusions font défaut dans les péricaryones. Ces observations dénotent la différence dans l'action cytopathogène exercée par les virus neurotropes, biologiquement très proches, sur la formation des inclusions oxyphiles.

Chez les souris blanches, contrairement aux isatis, l'infection avec les virus de la rage arctique (dikovanié) et de la rage provoque la formation des inclusions oxyphiles, qui topographiquement sont décelées dans plus de régions du système nerveux central (cellules pyramidales de la corne d'Ammon et cellules de Purkinje du cervelet, neurones de l'écorce des hémisphères cérébraux, du bulbe rachidien et de la région sous-thalamique) que chez les isatis en cas de rage où leur topographie est limitée par les pyramides de la corne d'Ammon et les cellules de Purkinje du cervelet. Ces observations signalent que la répartition topographique des inclusions est différente pour les animaux de différentes espèces inoculés avec le même virus neurotrope. En plus, il a été établi que lors des passages d'isatis à isatis, la fixation du virus de la rage des rues se fait beaucoup plus vite que chez des souris blanches. Lors de ces deux infections neurovirales, les corpuscules oxyphiles présentent chez les

souris blanches une granulation basophile qui est absente chez les isatis (fig. 7 a, b). Il est à signaler que lors de la rage arctique (dikovanié) et de la rage, on observe chez les souris blanches, dans la couche pyramidale de la corne d'Ammon, une „sortie” des corpuscules oxyphiles du cytoplasme des cellules.

En cas d'encéphalomyélite de Tobolsk les inclusions sont absentes tant chez les isatis que chez les souris blanches. Décrits par quelques auteurs, les processus de démyélinisation se déroulant lors de la rage arctique (dikovanié), de la rage et de l'encéphalomyélite de Tobolsk dépendent, selon nos observations, des modifications artificielles dues aux incorrections techniques admises dans l'application de la méthode de Spielmeyer.

Cet exposé sommaire de quelques résultats obtenus dans notre laboratoire au cours des recherches morphologiques portées sur le système nerveux lors des encéphalites neurovirales fait voir ce qu'il y a de productif et de prometteur dans l'application de la méthode morphologique à la diagnose différentielle.

J. M. Jabotinski

#### RÓZNICOWANIE MORFOLOGICZNE INFEKCJI NEURO-WIRUSOWYCH POKREWNYCH LUB IDENTYCZNYCH ANTYGENOWO

##### Streszczenie

Różne zakażenia wirusowe ośrodkowego układu nerwowego różnią się pomiędzy sobą bardzo selektywnym zajmowaniem neuronów, uszkadzając jedne jądra, a oszczędzając inne, położone nawet w bliskim sąsiedztwie. Tego rodzaju wybiórczość uszkodzeń neuronalnych można obserwować w zapaleniu mózgu kleszczowym, w looping-ill, w zapaleniu mózgu japońskim, we wściekłości zwyczajnej i arktycznej oraz w zapaleniu mózgu końskim. Autor omawia szczegółowo właściwości topograficzne tych procesów podkreślając, że selektywne uszkodzenia można zaobserwować szczególnie łatwo w odniesieniu do jąder pnia mózgu. Powinowactwo do niektórych grup jądrowych jest tak subtelne, że pozwala na różnicowanie wirusów należących do tych samych grup serologicznych. Przy badaniu jest istotne używanie właściwych zwierząt doświadczalnych, podatnych na dane zakażenie w warunkach naturalnych. Również i wtręty wśródjądrowe ze swoją zróżnicowaną morfologią mogą być pomocne w ustaleniu czynnika etiologicznego. Wybiórcze uszkodzenie neuronów i specyficzne wtręty są bardziej istotne dla właściwego rozpoznania niż odczynny glejowo mezodermalne, szczególnie zaś bardziej pomocne niż demielinizacje, które mogą być w przebiegu zapalenia zjawiskiem przypadkowym a nawet artefaktycznym.

Я. М. Яботински

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕЙРО-ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ С АНТИГЕНОВЫМ СХОДСТВОМ ЛИБО ИДЕНТИЧНЫХ

### Содержание

Различные вирусные инфекции центральной нервной системы отличаются весьма селективным торможением нейронов, повреждая одни ядра и сохраняя другие расположенные даже вблизи первых. Такая селективность неврологических изменений наблюдается в клещевом энцефалите, в looping-ill, в японском энцефалите. Дается детальное описание топографических свойств этих процессов, подчеркивается, что селективное повреждение относительно ядер мозгового ствола. Сродство с некоторыми группами ядер так специфично, что дает основание дифференцировать вирусы принадлежащие к единым серологическим группам. При исследовании весьма имеет существенное значение подбор соответственных экспериментальных животных, восприимчивых к данной инфекции в естественных условиях. Также и внутриядерные включения со своей дифференцированной морфологией могут оказаться полезными при определении этиологического фактора. Избирательное повреждение нейронов и специфические включения являются более существенными для правильного диагноза, чем мезодермальные глиевые реакции и, тем более, чем демиелинизации, которые в течении воспалительного процесса могут быть случайными или просто артефактами.

### BIBLIOGRAPHIE

1. Jabotinski J. M.: Patomorfologia nervnoj sistemy pri experimentalnom chotlandskom entséfalite. Recueil: „Voprossy patoguénésa i patologuitcheskoj anatomii infectsionyx boleznej. 1957, 107.
2. Jabotinski J. M.: Les altérations histopathologiques du système nerveux des lapins dans l'infection experimental avec le virus de l'encéphalomyélite équine. Ann. de l'Inst. Past. 1938, 60, 451.
3. Jabotinski J. M. i Sviatoukhina O. A.: Patomorfologia dvoukhvolnovovo viroosnovo méninngoentséfalita. Recueil: Néiroviroosnyié infectsii. Léningrad, 1954.
4. Kawamura R. and oth.: Studies concerning the virus of epidemic encephalitis japanese type. Kitasato Arch. Exp. Med. 1936, 13, 281.
5. Konovalov G. V. Sravnitelnoxmorfologuitcheskijé isslédovania tsitopatoguénovo déistvia rodstvennykh viroossov oulitchnovo béchenstva i „dikovania”. DAN URSS, 1964, 1957, 451.
6. Konovalov G. V. and oth: Experimental investigations into rage and rabies in polar foxes natural hosts of the infection II. Acta virologica, 1965, 9, 235.
7. Sviatoukhina O. A.: Morfologuitcheskijé izménénija pri iaponskom entséfalite. Recueil: „Voprossy patoguénésa i patologuitcheskoj anatomii infectsionyx boleznej”. 1957, 128.
8. Takaki T.: Morphologische Studien über die experimentelle epidemische Encephalitis (Sommerencephalitis) II Mitteil. Tr. Soc. Path. jap. 1940, 30, 571.
9. Zoubová N. N.: Morfologuitcheskijé izménénija nervnoj sistemy ou kroupnykh selso-khosiaistvennykh jyvotnykh pri oulitchnom béchenstvú. Recueil: Voprossy patoguénésa i patologuitcheskoj anatomii infectsionyx boleznej. 1957, 151.

F. SEITELBERGER, K. JELLINGER

## NEUROPATHOLOGIE DER ZECKENENCEPHALITIS

(Mit Vergleichsuntersuchung der Arbo-Virus-Encephalitiden und der Poliomyelitis)

Neurologischen Institut der Universität Wien

Unter den in Mitteleuropa und Eurasien epidemisch auftretenden Infektionen des ZNS verdienen durch Zecken übertragene Virusencephalitiden der Arbo-Gruppe B aktuelles Interesse. Während die Poliomyelitis in unseren Breiten dank systematischer Durchimpfung der Bevölkerung in den beiden letzten Jahren kaum mehr in Erscheinung getreten ist, kommt der Zeckencephalitis (Tick-Borne Encephalitis, TBE) mit ihren unter verschiedenen Synonyma beschriebenen Lokalvarianten nach wie vor grosse Bedeutung zu, wie jüngste letale Erkrankungsfälle in Österreich beweisen.

Über die humane Neuropathologie der russischen TBE (RFSE) liegen Untersuchungen aus der USSR (Kestner, Robinson u. Sergeeva, Grashtshenkov, Smorodintsev, Sefer u. Polykovski, Savenko, Semenova-Teansanskaja u. Shapoval, Silber u. Soloviev, Jabotinski u. Sviatuchina, Melnikov u. Makhonkova, Shapoval, Gromov u. Chalisova, Vizen u. Kniazev u.a.) und den USA (Jervis u. Higgins, Haymaker et al.) vor. Morphologische Befunde am ZNS bei zentraleuropäischen TBE-Formen (CEE, FSME, FSEM) aus der CSSR (Bednar, Fingerland u. Vortel), Ungarn (Juba) und Österreich (Grinschgl; Grinschgl et al.; Seitelberger u. Jellinger; Jellinger u. Kovac, Busch u. Hohenegger) ergaben keine grundlegenden Abweichungen gegenüber RFSE sowie seltenen Humanfällen von Louping 111 (Johnson u. Goodpasture), woraus die morphologische Einkeit der TBE als biologisches Faktum abgeleitet wurde. Andererseits wurde wegen formaler und topischer Besonderheiten im morphologischen Substrat der TBE auf ihre prinzipielle Abgrenzbarkeit von anderen neurotrophen Virusinfektionen und in sonderheit von den oft klinisch-epidemiologisch ähnlichen, aber biologisch icht verwandten Enterovirusinfektionen — Poliomyelitis hingewiesen (Bednar, Környey, Seitelberger u.

Jellinger, Juba). Systematische neuropathologische Untersuchungen an einem grösseren Humanmaterial von TBE mit besonderer Berücksichtigung der geweblichen Eigenart sowie der obligaten und fakultativen Ausbreitung des encephalitischen Syndroms mit einem kritischen Vergleich zum Substrat der übrigen Arbo-Encephaliden und anderer heimischer Neurovirusinfektionen standen aber bisher aus.

Nachdem wir vorläufige Vergleichsübersichten der Pathomorphologie der heimischen TBE geben konnten (Jellinger u. Seitelberger 1963; Seitelberger 1964), soll im folgenden eine zusammenfassende Darstellung aufgrund der verifizierten Beobachtungen von Epidemien in Österreich aus den Jahren 1954—1964 und anderer Lokalvarianten der TBE gegeben sowie auf ihre Stellung innerhalb der Arbo-Encephaliden und die Möglichkeit der morphologischen Abgrenzbarkeit von anderen Virusencephaliden kritisch eingegangen werden.

#### MATERIAL UND METHODEN

Wir überblicken dzt 11 letale TBE-Fälle aus Österreich, davon 6 virologisch und 3 serologisch verifizierte sowie 2 Beobachtungen, die trotz fehlender biologischer Sicherung nach epidemiologischen, klinischen und morphologischen Kriterien bei mikrobiologischen Ausschluss von Polio als TBE aufgefasst wurden. Die Fälle entstammen Epidemien der Jahre 1954/56/58 und 1961—64 aus Endemiegebieten in Niederösterreich, Kärnten und Steiermark. 2 weitere verifizierte Todesfälle der heurigen Endemie sind in histologischer Bearbeitung. Die wichtigsten klinisch-biologischen Daten sind in Tab. 1 zusammengefasst\*.

Die Kranken standen im Alter von 21—70 Jahren (Durchschnitt 47 Jahre). Die Übertragung erfolgte durch Zeckenbiss, Genuss roher Ziegenmilch bzw. Kontakt mit Ziegenfleisch oder ist ungeklärt. Der klinische Verlauf war biphasisch mit grippalem Vorstadium und akuter oder protrahierter nervöser Organphase von 3—16 Tagen Dauer. Im Vordergrund der klinischen Symptomatik standen neben Meningismus bei 6 Fällen ein ascendierendes spino-bulbärparalytisches Syndrom mit Arm- und Nackenparesen, zweimal mit Tetraplegie; in 2 Fällen ein aparytisch-encephalitische Bild mit Koma, Nystagmus und Krampfanfällen bzw. einmal mit terminaler Hemiparese und schwerer Elektrolytstörung. Der Tod erfolgte meist durch Atemlähmung; 7 Fälle wurden künstlich beatmet. Im LCR bestand wechselnd starke lymphocytäre Pleocytose und mässige Eiweissvermehrung. Autoptisch boten sich Bronchopneumonie, akuter Milztumor und einmal generalisierte Lymphknotenschwellungen.

\* Ausführliche kasuistische Darstellung der Fälle 1—3 bei Seitelberger u. Jellinger (1960), Jellinger u. Kovac (1960) bzw. Grinschl et al. (1961) sowie des Falles 8 bei Busch u. Hohenegger (1964).

Morphologische Vergleichsuntersuchungen erfolgten an\*:

1. TBE — 2 akute Fälle aus CSSR von 1953/56 (Fall 1 u. 2 — Fingerland u. Vortel 1961) und 1 protrahierter CSSR-Fall aus 1956 (Bednar) sowie Präparaten der Tirgu-Mures-Epidemie (vgl. Miskolczy et al.).

2. MBE (moscito-born encephalitis) — Einzelpräparate je eines akuten und protrahierten Falles von *E. japonica* (Haymaker 1961; Noguchi); 2 Fälle von Western Equine E. (WEE — Baker; Haymaker); Eastern Equine E. (EEE — Haymaker), Murray-Valley Encephalitis bzw. australischer X-Disease (van Bogaert).

3. Poliomyelitis: 20 eigene virologisch verifizierte Beobachtungen — sämtliche des Virustyps 1 — aus einem Gesamt von 30 histologisch untersuchten Fällen von Epidemien 1959—1963 aus Österreich im Alter zwischen 4 Monaten und 38 Jahren. Die Krankheitsdauer betrug 3—23 Tage. Klinisch bestand in 19 Fällen ein ascendierender spino-bulbär-encephalitischer und einmal rein spinobulbärer Verlauf; 15 Pat. waren in der Eisernen Lunge behandelt worden.

In methodischer Hinsicht ist vorzuschicken, dass mit Ausnahme eines TBE-Falles am routinemässig aufgearbeiteten Material keine Serienschnittuntersuchungen durchgeführt wurden, sondern die einzelnen Regionen des ZNS auf gleichgelegten typischen Ebenen — anhand kurzer Stufenserien — untersucht und der Läsionsgrad nach 6 subjektiv beurteilten Intensitätsstufen festgelegt wurde:

Grad I — disseminierte perivasale Infiltrate,

Grad II — starke diffuse Gefässinfiltrate, einzelne Gewebsinfiltrate ohne Parenchymverlust,

Grad III — Gefäss- und Gewebsinfiltration (Knötchen!) mit geringem Parenchymausfall,

Grad IV — Gefäss- und Gewebsinfiltration mit mässiggradigem Parenchymverlust,

Grad V — Gefäss- und Gewebsinfiltration mit starkem Parenchymausfall,

Grad VIa — schwerste Parenchymausfälle bis inkomplette Nekrose

Grad VIb — spongiöse Fokalnekrosen.

#### ART DES ZENTRALNERVÖSEN GEWEBSPROZESSES

Das anatomische Substrat der TBE entspricht einem voll ausgeprägten „encephalitischen Symptomenkomplex“ mit diskontinuierlichem Befall auseinanderliegender Teile des ZNS unter Bevorzugung grauer Areale,

\* Für die Überlassung des Materials sind wir zu Dank verpflichtet: Prof. B. Bednar, Prag, Prof. A. Fingerland, Hradec Kralové; Dr. van Bogaert, Berchen-Anvers; Dr. W. Haymaker, Moffet Field bzw. dem Afip, Washington, Prof. A. Baker, Minneapolis, sowie Dr. Noguchi.

Tabelle 1

Pall	Alter. geschl.	Todes Tag	Epidemie Gebiet	Übertrag- modus	Dauer	Klinischer Verlauf	L.C.R.	Artifiz. Respir.	Virus isoliert	Serol. Reakt.	Körper- sektion
G. Karl 75/58	60 m	20.5. 1954	Steier mark	Zecken- bisse	11/6 d	Biphas. Verl.: Fieber, Parese bd OE (prox.-dist.), Bulbärsyndr. Koma. Exitus: Atemlähmung	160/3 Lymph	+	ZNS +	NT +	Pneumonie
S. Anton 7/59	62 m	11.5. 1956	Neunkir- chen NÖ	Ziegen- fleisch	11/4 d	Biphas. Verl.: Grippales Stad. Meningismus, Parese OE (prox.-dist.) + Nacken- -Mn, Atemlähmung	4325/3 (50% Seg) Pandy ++	+	ZNS +	NT +	Pneumonie
P. Alfred 133/59	26 m	27.7. 1958	Neunkir- chen NÖ	Ziegen- milch	18/8 d	Biphas. Verlauf: Fieber, Vomit. Meningismus, Somnolenz, Koma, Atem- lähmung. Keine Paresen.	2628/3 (88% Ly) Pandy ++	+	ZNS +	NT +	Pneumonie Milztumor Leberdeg.
G. Leop. 119/61	40 w	16.6. 1961	St.Pölten West NÖ	?	?/16 d	Prolong. Verl.: Fieber, Paresen UE, Diplopie, Nystag. Blickkrämpfe, Tetraplegie, Bulbärsyndr.	476/3 Lymph	-	ZNS +	NT +	Pneumonie
G. Rudolf 74/61	61 m	1.7. 1961	Berndorf Wr. Becken	Zecken- bisse	2/3 d	Akuter Verl., Fieber, Algesie, Parästhesien OE, Py-Zeichen, Koma, keine Extr. Paresen.	570/3 Ly 28/3 Sg Pandy +	-	ZNS +	NT +	Pneumonie
K. Leop. 143/62	21 m	8.7. 1962	Neunkir- rhen NÖ	?	?/4 d	Biphas. Verl.: Fieber, Meningismus, periph. VII-Parese, Nystagm Stat. epi. Tetraplegie, Bulb. Syn	2040/3 Lymph Pandy +	+	ZNS +	?	Pneumonie

P. Stefan 114/63	36 m	4.6. 1963	Klagenft Kärnten	?	10/6 d	Biphas. Verl.: Fieber, Cephalea Meningismus, Parese li OE, asc. Landry- Paralyse. Atemlähmung	10/3 Ly 93 mg% EW 46 mg% Zu	+	ZNS +	NT +	Generalis Ly-Knoten- schwellg
K. A. 395/63	49 w	16.8. 1963	Neunkir- rhen NÖ	Zecken- bisse	19/5 d	Biphas. Verl.: Fieber, Me- ningismus. Präterm. akute Hemiparesere, Koma. schw. Elektrolytstörg	620/3 Ly Pandy +	—	ZNS —	KBR+	Hyperämie
M. Albert 97/64	70 m	18.8. 1994	Wr. Neu- stadt NÖ	Zecken- bisse	?/3 d	Biphas. Verl.: asc. Paresen UE Diplopie, Somnolenz, Landry — Paralyse. Ex.: Atemlähmung	903/3 Ly Pandy +	—	ZNS —	NT + HI +	Pneumonie
B. Franz 135/62	56 m	28.6. 1962	Wr. Neu- stadt NÖ	?	7/3 d	Biphas. Verl.: Fieber, Meningismus, VII-Parese, Parese OE (prox.-dist.), Ny- stagn. Bulbärsyndrom	2278/3 Ly Pandy ++	+	Polio negativ 1961 Polio- Schl. Impfg		Pneumonie
P. Josef 140/62	33 w	28.8. 1962	Klagenft Kärnten	?	?/5 d	Biphas. Verl.: Fieber, Pa- resen OE (prox.-dist), Nacken-MM, Koma, Bulbärsyndrom, Atemlähm	176/3 Ly Pandy +	—	Polio negativ		Pneumonie



der von mässiggradiger fleckförmiger lymphoplasmo-histiozytärer Meningitis begleitet wird und somit nach seiner Art und Ausbreitung als „fleckförmige Polioencephalomyelitis mit meningealer Beteiligung“ zu charakterisieren ist.

Das encephalitische Syndrom umfasst 1) eine degenerative Parenchymkomponente, 2) eine am Gefässsystem ablaufende Entzündungskomponente mit infiltrativen und proliferativen Veränderungen in Form perivasaler und knötchen- bzw. fleckförmiger Infiltration, die nicht in strenger Abhängigkeit voneinander auftreten und 3) von regressiven Läsionen nach Art spongiöser Herdnekrosen begleitet sein können.

Ad. 1. Die durch nekrobiotische Nervenzellveränderungen gekennzeichnete degenerative Parenchymkomponente ist ein primäres, pathognomonisches Prozessmerkmal. Sie imponiert als frühestes Läsionsstadium, da man in intakten Populationen und abseits vaskulär-entzündlicher Läsionen degenerierende Nervenzellen mit und ohne Neuronophagien beobachten kann, während sich an Orten starker und fortgeschrittener Prozessaktivität regressive und infiltrative Läsionen meist untrennbar überlagern. Die Parenchymaffektion ist nach experimentell fundierten Vorstellungen über die formale Pathogenese neurotroper Virusinfektionen als Ausdruck einer primären spezifischen Interaktion des Virus mit der Nervenzelle und als Voraussetzung für die am ZNS und seinen Hüllen ablaufenden Entzündungsvorgänge anzusehen, die als sekundäre Prozessphase imponieren und bei den am humanen Autopsiematerial angebotenen Stadien im Vordergrund stehen. In allen erkrankten Regionen treten diskontinuierliche Nervenzellausfälle auf, die an den Prozessschwerpunkten bis zur Parenchymverödung mit dichten infiltrativ-proliferativen Vorgängen reichen. Auch ausserhalb entzündlich betroffener Gebiete finden sich typische Neuronophagien (Abb. 1) und verschiedene Stadien der Parenchymdegeneration von Zellschwellung und Chromatolyse bis Kernschrumpfung und Umwandlung in chromophobe, kernlose Schollen, die zelligem oder humoralem Zerfall anheimfallen.

Neben diesen typischen Läsionen treten einzelne Nervenzellen mit eosinophiler Plasmahomogenisierung hervor, in deren bläschenförmig aufgetriebenem Kern einzelne runde oder unregelmässige, zart eosinophile Einschlüsse paranukleolär nachweisbar sind (Abb. 2A—C). Diese Gebilde zeigen nicht die Merkmale des Inklusionstyps A nach Cowdry, sondern entsprechen atypischen Kerneinschlüssen, die etwa den bei Encephalitis nach Grippe (Jellinger u. Seitelberger 1959) und Rubeolen-Encephalitis (Seitelberger u. Zischinsky 1962) beobachteten Kernveränderungen vergleichbar sind. Ihr Auftreten in regressiv veränderten Neuronen entzündlich affizierter Gebiete ist zwar bemerkenswert, doch dürfen Einschlüsse dieser Art nicht als sicheres Indiz einer virusspezifischen Kernreaktion

gelten. Weder histochemische Befunde (Shiraki et al. 1961) noch immunhistologisch und elektronenoptische Untersuchungen über das Verhalten der Arbo-Viren in der Zelle (vgl. Moritsch, Kunz, Kovac et al., Shiraki et al. 1965) ergaben Hinweise auf Genese und Bedeutung dieser Kerneinschlüsse.

Ein seiner Wesensart gleichfalls unklares Phänomen tritt an einzelnen Purkinjezellen protrahierter TBE-Fälle auf: Das zart eosinophil homogenisierte Zytoplasma der leicht vergrößerten Zelle enthält ein oder mehrere kleine, als Rundzelelemente anzusprechende Gebilde (Abb. 3B, C). Ihr Kern zeigt verschiedene Auflösungsstadien, wodurch diese intrazytoplasmatisch liegenden Gebilde zu Pseudovakuolen transformiert werden (Abb. 3A). Sie zeigen wenig Ähnlichkeit mit den bei subakuter Poliomyelitis in lipodystrophischen Vorderhornzellen beschriebenen intraplasmatischen Inklusionen (Konowalow et al.) und imponieren am ehesten als „Cytophagie“ umliegender Zellelemente durch die alterierte Purkinjezelle. Intrazytoplasmatische Einschlüsse waren ansonst nicht nachweisbar.

Ad 2. Die Entzündungskomponente enthält perivasale und knötchenförmige Gewebsinfiltrate, die fakultativ unabhängig auftreten können.

Die Gefässinfiltrate betreffen vorwiegend Venen und Venolen der grauen und weissen Substanz sowie der weichen Häute. Sie bauen sich aus hämatogenen und adventitiellen bzw. retikulo-histiozytären Elementen — Lymphozyten, Plasmazellen, polymorphen Histiozyten — und spärlich Mikrogliazellen auf (Abb. 4A). Das im Tierversuch beobachtete leukozytäre Stadium lässt sich meist nur aus dem Nachweis oxydasepositiver Granula in wenigen Zellen erschliessen; selten treten segmentkernige Leukozyten stärker auf (Jellinger u. Kovac; Grashchenkov). Bei protrahierten Formen überwiegen grosse Mononukleäre — teils degenerative, morulaartige Plasmazellen (Russell-Körperchen) und histiozytäre vakuolisierte Makrophagen mit feingranulärem Lipoidmaterial (Abb. 4B, C). Die Infiltrate beschränken sich auf den Periadventitialraum oder können unter Durchbrechung der Gefäss-Gliamembran das Gewebe breit invadieren. Oft besteht starke Endothelschwellung und — proliferation ohne Wandinfiltration. Diapedeseblutungen und grosse Plasmatranssudate können insb. in Stammkernen und subkortikalem Mark auftreten.

Die interstitielle Infiltration manifestiert sich in dichten knötchen- und haufenförmigen Zellansammlungen oder lockeren fleck- und schwadenförmigen Anhäufungen vorwiegend mesodermaler Zellen adventitieller Herkunft, insb. polymorphen Histiozyten, und spärlich Plasmazellen und Lymphozyten, kaum segmentkernigen Leukozyten (Abb. 5A, B). Oligodendro- und Mikrogliazellen können vorkommen. Die Silberimprägation

zeigt Hortega-ähnliche Elemente, denen jedoch die charakteristischen Zellfortsätze mangeln (Abb. 5C). Eine diffuse mikrogliöse Stäbchenzellwucherung wird vermisst. Die Entzündungsknötchen zeigen durchweg deutliche Gefäßbeziehung und können zu ausgedehnten, fleckförmigen Infiltraten konfluieren. Von Endothelschwellung vorausgegangene oder begleitete lokale Invasion von Gefäßwandzellen in das Interstitium ist als Vorstadium der Knötchenbildung anzusprechen. Daneben finden sich interstitielle Gewebsinfiltrate ohne sichere Gefäßbeziehung sowie als typische Neuronophagien um degenerierte Nervenzellen. In älteren Infiltratbezirken ist das nervöse Zellparenchym gewöhnlich rarefiziert und die verödeten Gebiete werden von lockeren mesodermal-gliösen Zellanhäufungen eingenommen (Abb. 5D). Die Infiltratknötchen betreffen vorwiegend graue Formationen, seltener subkortikales Mark und weisse Bahnsysteme sowie vereinzelt das perikornuale Rückenmarkswiss.

Das zentralnervöse Entzündungssyndrom läuft nach eigener Erfahrung und einschlägigen Befunden an heimischer und russischer TBE vorwiegend am Gefäßmesenchym bzw. RES mit Hervortreten histiocytärer Elemente bei geringer progressiver Gliareaktion ab, deren Beteiligung aber unterschiedlich beurteilt wird (vgl. Grashtshenkov, Savenko, Jervis u. Higgins, Fingerland u. Vortel, Bednar, Haymaker et al., Melnikov u. Makhonkova, van Bogaert u. Rademecker, Jellinger u. Seitelberger, Busch u. Hohenegger, Osetowska u.a.). Auch bei den Proliferations- und Degradationsvorgängen späterer Prozessstadien nimmt das mesodermale Elemente bei TBE eine bevorzugte Stellung ein.

Das Hervortreten der mesenchymalen Entzündungskomponente neben wechselnder hämatogener Beteiligung mit Übergang der initialen Leukozytose in ein monozytäres Stadium darf darüber hinaus als wichtiges qualitatives Reaktionsmerkmal sämtlicher Arbo-Virus-Encephalitiden gelten (vgl. Haymaker, Baker, Shiraki et al., Herzon et al.).

Hingegen treten bei Enterovirusinfektionen, insb. Poliomyelitis, in den gleichen Prozessstadien gliöse Proliferations- und Abräumungsvorgänge massiv in den Vordergrund (Horanyi-Hechst, Kalm, Pette, Goodpasture, van Bogaert u.a.), woraus wir unter Berücksichtigung eigener Vergleichsbefunde gewisse qualitative Unterschiede der encephalitische Gewebsreaktion zwischen TBE und Poliomyelitis postulierten (Seitelberger u. Jellinger 1960, Jellinger u. Seitelberger 1963). Dem Einwand, diese formalen Abweichungen könnten nur altersabhängige Diskrepanzen der Gewebsreaktion des ZNS zugrundeliegen (Simma; Bogaert, Radermecker) sei die Tatsache gegenübergestellt, dass der qualitative Prozesscharakter bei TBE und Polio nach unseren Erfahrungen jeweils ziemlich uniform ohne Rücksicht auf das Lebensalter innerhalb biologischer Variations-

breiten auftritt. Wir möchten ihm vielmehr eine gewisse pathognomonische Bedeutung im Rahmen der unspezifischen „pleomorphen Gewebsreaktionen“ des ZNS gegenüber viralen Affektionen zuschreiben und dafür spezielle virotoxische und/oder immunpathologische Vorgänge zur Diskussion stellen. Diese Annahme wird unterstützt durch die mit dem Zurücktreten der gliösen Komponente im Substrat der Arbo-Encephaliden einhergehenden spongiösen Gewebsnekrosen, die ein bestimmendes Merkmal dieser Krankheitsgruppe darstellen. Die Deutung zelliger und geweblicher ZNS-Reaktionen als Ausdruck erregerspezifischer Vorgänge erscheint aber nicht begründet, da ähnliche oder gleichartige Zellreaktionen auch bei anderen Viruserkrankungen — etwa der Herpes simplex-Encephalitis (Haymaker et al. 1958, Krücke, Jellinger et al., Zischka-Konorsa et al.) oder Lyssa-Encephalitis (Aksel, Fingerland u. Vortel, Toga) — aufzutreten pflegen.

Formalgenetisch könnte das Überwiegen der mesodermalen Entzündungskomponente im ZNS aufgrund tierexperimenteller Befunde mit der — von Enteroviren offenbar abweichenden — Erregerausbreitung in Beziehung gesetzt werden (Bednar, Moritsch u. Kovac, Miyake, Ogata et al., Shiraki et al.). Diese Vorstellung scheint jedoch ähnlich der Deutung der starken plasmazytären Entzündungskomponente als Ausdruck immunpathologischer Vorgänge, wie sie auch bei der Herpes-Encephalitis diskutiert werden (Zischka-Konorsa et al.), vorerst spekulativ, da sich aus formalen anatomischen Befunden allgemein gültige Reaktionsweisen und pathogenetische Abläufe von Neurovirusinfektionen nur mit grösstem Vorbehalt ableiten lassen.

Ad 3. Als fakultatives Prozessmerkmal imponieren umschriebene regressive Läsionen in Form disseminierter spongiöser Fokalnekrosen, die insb. bei protrahierten Formen vorwiegend im Grau, aber auch im Mark, auftreten können. Ihre Grösse und Verteilung entspricht dem obligaten Muster des knötchenförmigen Entzündungssyndroms, zu dem auch formale Zwischenstufen und Übergänge bestehen. Die scharf begrenzten gefässbezogenen porösen Areale stellen Endphasen eines interstitiellen serös-zelligen Infiltrationsvorganges dar, wie der Nachweis mehrerer, als verschiedene Entwicklungsstadien anzusprechender Herdformen vermuten lässt. Eine mit Endothelschwellung in Kapillaren und Venolen einhergehende Penetration der Gefäss-Hirnschranke durch eiweiss-hältige Flüssigkeit und wenige hämatogene Infiltratzellen mit Vorherrschen hyperplastischer Histiozyten ohne perivasale Gliareaktion markiert die schwer und selten nachweisbare Frühphase (Abb. 6 A.B). Unter zögernden Ausschwärmen mesodermaler Zellen erfolgt bald eine feinporige Grundgewebsauflockerung und Mikroglia-proliferation mit Fettkörnchenbildung bei zunächst kaum affizierter Oligodendroglia, während die

Astroglia reaktionslos verschwindet (Abb. 6 C,D). Nach Zerfall der polymorphen Infiltratzellen und Oligodendroglia gehen die Neuriten zugrunde; (Abb. 6 E) die relativ erhaltenen Nervenzellen zeigen Schrumpfung und Kernpyknose, jedoch keine Neuronophagie. Es resultiert eine von wenigen Gliafilamenten spinnwebenartig durchzogene „Rarefikationsnekrose“, in der einzelne Mikrogliakerne, Phagozyten, regressiv veränderte Nervenzellen und pyknotische Endothelkerne liegen. (Abb. 7 A—C) Eine Gliafaserwucherung fehlt. Spongiose Herde mit lockerem mikrogliahistiozytärem Randsaum oder zentraler poröser Gewebszerfall in fleckigen Infiltraten stellen offenbar Übergänge zu den gemischtzelligen Entzündungsknötchen dar. Andere poröse Herde entbehren jeder zelligen Infiltration und neigen zu Konfluenz.

Nach der morphologischen Verlaufsanalyse halten wir folgende pathogenetische Deutung der spongiösen Läsionen für vertretbar (Jellinger u. Seitelberger 1963; Seitelberger 1965): Es handelt sich um eine im Rahmen des encephalitischen Syndroms erfolgte gefäßabhängige infiltrativ-toxische Schädigung neuroektodermaler Gewebelemente, vorzüglich der Makroglia und der Neuriten bei relativer Verschonung der Perikaryen (subtotale Nekrose) im Sinne eines „mesenchymogenen bzw. dochionogenen\* (vasogenen) Status spongiosus“. Für die deletäre Wirkung verantwortlich erscheint neben serös-toxischen Transsudationsvorgängen vor allem das histiozytäre Infiltrationselement als möglicher Träger virotoxischer oder immunologischer Faktoren. Die spongiöse Rarefikation ist somit als nekrobiotische Pendant zur interstitiellen Knötchenkomponente des Entzündungsprozesse — vielleicht infolge spezieller Virusinteraktionen (Herzon et al., Grashtshenkov) — deutbar. Für eine Beteiligung vasozirkulatorischer Faktoren, wie Gefäßobstruktion (Noran u. Baker), Stase und Kapillarschäden (Weil, Bednar), Vasospasmen (Suwa, Nakata et al., Wake Ito, Shiraki) bzw. Ischämie (Van Bogaert u. Radermecker) ergeben sich u. E. keine schlüssigen morphologischen Hinweise.

Diese „herdförmigen encephalitischen Spongionekrosen“ (Seitelberger) waren in 3 heimischen TBE-Fällen (5—18 Tage Dauer der nervösen Phase) in formaler und topischer Übereinstimmung mit den porösen Fokalläsionen bei protrahierter CSSR-TBE (Bednar) und RFSE (Savenko, Haymaker et al.) nachweisbar, während sie bei den übrigen Arbo-Encephaliden, wie J. E. (Zimmerman, Haymaker, van Bogaert u. Lapeysonnie, Suwa, Shiraki et al.) Murray-Valley-Encephalitis (Garven u. Morgolis), E.E.E. (Dent, Haymaker) sowie insb. der W.E.E. (Haymaker, Baker, Herzon et al.), mit Ausnahme der St. Louis-Encephalitis (Haymaker), in wesentlich stärkerer Intensität und Ausbreitung aufzutreten pflegen.

\* Griechisch *doxeō* or: Blutgefäß.

Diese Rarefikationsnekrosen sind formal und pathogenetisch abzugrenzen von Läsionen durch primär virusbedingte Parenchymzellaffektion und zirkulatorische Sekundärkomplikationen, die bis zu inkompletten Nekrosen reichen; Erstere bedingt bei subakuter Polio spongiöse Läsionen, die neben Restinfiltraten typische gemischtzellige Abbau- und Reparationsvorgänge zeigen (Scharenberg, Noetzel, Ule, Busch) und ähnlich der chronischen RFSE (Golman, Belman, Shapoval, Draganescu et al.) in gliöser Narbenbildung enden (Tuthill, Haddenbrock, Bouttier u. Bogaert, Scheidegger). Ischämische Fokalschäden sind insb. bei Beatmungsfällen von Polio (Baker et al., Matzke u. Baker, Steegman u. Davis, Környey 1965, Simma) wie TBE bzw. RFSE und JE (Sawenko, Shiraki, Jellinger) fassbar.

Sie unterscheiden sich auch von sekundären Markläsionen im Bereich dichter Gewebsinfiltrate bei TBE (Sawenko, Jervis u. Higgins) — Abb. 8A B — und Polio bzw. in perivasalen Gliasäumen (Abb. 8 C), auch bei Polio (Horanyi-Hechst, Peters, Pette, Mollaret et al., Feigin) und Lyssa-Encephalitis (Aksel), die perivenösen Entmarkungssyndromen ähneln. Abzutrennen sind ferner seltene Partialnekrosen bei TBE, die in perivasalen Gewebsinfiltraten mit diskontinuierlicher Axonaufreibung („Axonödem“) bei relativer Markverschönerung einhergehen und an spongiöse Spinalläsionen nach Lyssa-Schutzimpfung erinnern (Shiraki et al. 1961, 1962; Jellinger u. Seitelberger 1963).

Die vergleichende Zusammenschau des Entzündungssyndroms der TBE ergibt ein qualitativ uniformes, nach den geweblichen Reaktionsweisen typisches, aber nicht spezifisches Bild, das die biologisch fundierte morphologische Einheit der TBE bekräftigt, aber auch weitgehende Übereinstimmung mit anderen Encephalitiden der Arbo-Gruppe B aufweist. Gegenüber den meisten Formen der Arbo-Gruppe A bestehen nur unbedeutende formale Abweichungen (vgl. Haymaker), während relativ gute qualitative Abgrenzbarkeit von anderen Neurovirusinfektionen — insb. durch Enteroviren (Poliomyelitis) — besteht. Histologische Entzündungsmerkmale besitzen indes für die Differenzierung viraler Erkrankungen des ZNS vom Typ der „fleckförmigen Polioencephalitis“ nur untergeordnete Bedeutung. Wesentlich erscheint ihr distinktes topisches Ausbreitungsmuster, das pathogenetisch von spezifischen Virus-Zellinteraktionen abhängt und trotz grosser individueller Schwankungsbreite (Jacob) als pathognomonisch für den erregerspezifischen Prozess gelten darf.

#### TOPIK DER ZENTRALNERVÖSEN LÄSIONEN

Das Ausbreitungsmuster der TBE ist in Abb. 21 halbschematisch dargestellt; die Hirnstammschnitte mit Maximal- und Minimalaffektion.

Im Rückenmark besteht konstanter entzündlicher Befall der grauen Substanz mit Prädilektion in Vorderhorn, (Abb. 9) wechselnder, oft kaum geringerer Hinterhornschädigung und relativer Verschonung von Clarke'scher Säule und vegetativem Seitenhorn. Das Mark zeigt ausser radiären Gefäßsäumen vereinzelt lockere Infiltratknötchen mit Markschädigung in den perikornualen Grundstrangbündeln. Der Prozess lässt Asymmetrie und segmentalen Wechsel von Ausbreitung und Intensität mit meist deutlicher Bevorzugung des Hals- und oralen Brustmarks gegenüber der Lumbo-Sakralregion erkennen. (Abb. 9 A, B) Nur leichte Infiltration der Meningen und Wurzelgefäße.

Die Oblongata zeigt obligaten, oft schweren Knötchenbefall der unteren Oliven samt Nebenoliven (Abb. 10 A, B) bei erheblicher, aber inkonstanter Affektion der Haubenkerne mit Schwerpunkt in Hinterstrangkernen, spinalem Trigemini- und Vestibulariskern sowie retikulären Formationen bei wechselnder Beteiligung der übrigen senso-motorischen Kerngruppen.

Im Pons besteht fast obligater disseminierter Befall des Brückenfußgraus, (Abb. 11) der nur einmal vermisst wurde. Schwerpunkt der Haubenschädigung sind Trigemini- und Vestibulariskerne, obere Olive, N. coeruleus und Tectum opticum, geringer retikuläre Formationen (Abb. 13) und übrige Hirnnervenkerne bei nur leichtem Knötchenbefall des periaquäduktalen Graus.

Das Mittelhirn bietet neben konstantem Befall des Tectum opticum erhebliche fleckförmige, meist regellose Ausfälle der Zona compacta nigrae (Abb. 14) bei relativer Verschonung der Zona reticularia. Starker Affektion retikulärer Kerne, geringer des Ruber mit Bevorzugung des parvozellulären Teiles stehen relativ geringe Ausfälle in Okulomotoriuskernen und periaquäduktalem Grau gegenüber.

Das Kleinhirn als konstanter Prozessschwerpunkt bietet neben knötchen- und fleckförmigen Befall der Zahnkerne (oft geringer als untere Olive) und Marklager schwere entzündliche Rindenläsionen ohne Differenz zwischen Wurm und Hemisphären. Die konfluierenden schwadenförmigen Infiltrate in Molekular- und Purkinjezellschicht mit Neuronophagien und Meningitis sind von ischämischen Schäden mit Glia- „Strauchwerk“ gut abgrenzbar (Abb. 12) Bei protrahierten Fällen kommen spongiöse Rindennekrosen und „Cytophagie“ in Purkinjezellen vor (Abb. 9, 6).

Im Zwischenhirn konzentriert sich der Prozess auf Thalamus, Subthalamus und hinteren Hypothalamus. Am schwersten betroffen sind retikuläre Thalamuskern (intralaminäre Kerne, Nucl. reticularis (Abb. 17), ventrikelnahes Grau (Nucl. parafascicularis, Boden des 3. Ventrikels)

sowie Zona incerta, Forel-Felder und Nucl. basalis. Der variable Thalamusbefall zeigt ferner inkonstante Prädilektion für Pulvinar und Ventralkerne, käufig auch Zwischen- und Medialkern, geringer der Dorsalkerne und des Centrum medianum bei relativer Verschonung des Nucl. anterior. Konstanter, aber leichter Befall des Corpus Luysii. Im Hypothalamus zeigen präoptische Kerne, Nucl. paraventricularis und prä-opticus nur geringe Gefäss- und selten leichte Knötcheninfiltrate (Abb. 15 A, B) gegenüber stärkeren, inkonstanten Knötchenbefall der Medialkerne und schwerer Affektion dorsaler und lateraler Anteile (lat. Tuberkerne, Area dorsalis und dorsocaudalis, N. tub. mamill., (Abb. 16) N. mamill. lat) bei praktischer Verschonung des Corpus mamillare.

Der Linsenkern bietet mässige, aber variable Ausfälle im Pallidum (insb. ventrale und laterale Teile) bei fast obligatem mittelgradigen Knötchenbefall des Striatum (Abb. 18) mit etwas geringerer Caudatum-beteiligung, welcher nur in einem Fall heimischer TBE vermisst wurde.

In der Grosshirnrinde besteht disseminierte Knötchenaussaat ohne Prädilektionsareale, doch gehäuft in Frontallappen, (Abb. 20A) Umgebung der Fissura Sylvii, geringer occipital. (Abb. 2. OA) tiefer Inselrinde mit schwerem Befall des Claustrum. (Abb. 19) Geringer Affektion des Hippocampus stehen schwerste Ausfälle im basalen Riechhirngrau (Subst. perf. ant., Subst. innominata) und Amygdala gegenüber.

Das Hirnmark bietet verstreute Entzündungsknötchen subkortikal in allen Abschnitten, in innerer und äusserer Kapsel, Hirnschenkel und Balken. Einzelne Gefässinfiltrate bestehen in N. und Tr. opticus.

Spongiose Herdnekrosen betrafen bei heimischer TBE die Grosshirnrinde aller Lappen mit frontaler Häufung (Abb. 7D) und Verschonung des Ammonshorns, Subkortikalmark, Thalamus, Putamen und Pallidum mit geringer Beteiligung von Z. incerta, Corpus Luys, Claustrum und Nigra sowie die Kleinhirnrinde bei praktischer Verschonung des Hirnstammes.

Unsere Beobachtungen bestätigen die aus humanpathologischen (Robinson u. Sergeeva, Grashtshenkov, Jervis u. Higgins, Haymaker et al., Shapoval, Bednar, Seitelberger u. Jellinger, Melnikov u. Makhonkova u.a.) und tierexperimentellen Befunden (Környey, Juba u. Pinter, Tamalet et al., Osetowska et al. u.a.) bekannte Konstanz des entzündlichen Befalls von Rückenmark, Hirnstamm, Kleinhirn und Zwischenhirn mit inkonstanter, stark variabler Endhirnbeteiligung bei TBE. Übereinstimmend mit der entzündlichen Prozessausbreitung imponieren als Schwerpunkte des Parenchymausfalles: cervikals Vorderhorngrau, retikuläre Thalamus- und Hirnstammkerne, Zahnkern und Purkinjezellschicht des Kleinhirns, Olive, Sub- und dorsaler Hypothalamus, Nucl. interpeduncularis, ba-



sales Riechhirngrau samt Amygdala, motorische und sensible Hirnstammkerne, insb. Vestibularis-, Trigemini- und Hinterstrangkerne, sowie Nigra, während die übrigen Grisea nur mässige bis leichte Nervenzellausfälle erleiden.

Innerhalb dieses obligaten Verteilungsmusters besteht nur individuelle, nicht sicher epidemieabhängige Schwankungsbreite an Intensität und Ausdehnung des encephalitischen Syndroms. Sie manifestieren sich etwa im wechselnden Befall von Basal- und Hirnstammkernen, seltener Verschonung des Brückenfussgraus (Haymaker et al., eigener Fall 7), der Hirnstammhaube bei protrahierten Einzelfällen mit spino-olivo-ponto-basaler sowie di- und telencephaler Affektion (Bednar, eigener Fall 7) oder selten von Grosshirnrinde, -mark und Striatum (Juba, Jellinger u. Seitelberger -Fall 2), während die Kleinhirn- und Oliven-affektion unbedingt als obligates Prozessmerkmal gelten darf.

Die trotz individueller Variabilität gleichartige Prozessausbreitung bei TBE ergibt eine weitere Bekräftigung ihrer biologischen Einheit. Gegenüber anderen Encephalitiden der Arbo-Gruppe B treten nur unbedeutende, im Einzelfall kaum signifikante Abweichungen der Prozessschwerpunkte auf, die etwa im meist stärkerer Schädigung von Nigra, Ammons-horn und Temporalrinde sowie spongiösen Brückenfussläsionen bei J. E. (vgl. Shiraki al.) oder geringerer Cortex- bzw. inkonstanter Kleinhirnbeteiligung bei St. Louis Encephalitis (Haymaker) bestehen. Trotz biologisch-ökologischer Unterschiede der Virusarten besteht daher grundsätzliche Übereinstimmung der neuropathologischen Syndrome innerhalb der Arbo-Gruppe B.

Von den Encephalitiden der Arbo-Gruppe A ergeben sich ausser den erwähnten qualitativen Diskrepanzen nicht unwesentliche topische Prozessabweichungen durch Zurücktreten der polioencephalitischen Komponente in Hirnstamm, Rückenmark und Kleinhirn bei EEE bzw. geringerer Cortexaffektion mit ausgedehnten spongiösen Läsionen bei WEE (vgl. Haymaker), was auf biologische Erregerunterschiede schliessen lässt. Die neuropathologischen Befunde unterstützen somit die bekannten biologisch-ökologischen Abweichungen der einzelnen Arbo-Gruppen.

#### DIFFERENTIALDIAGNOSTISCHE ERWÄGUNGEN

Den vermutlich erregerabhängigen Diskrepanzen im Prädilektionsmuster der Arbo-Encephalitiden kommt bei weitgehender Uniformität des Entzündungssyndroms gewisse differentialdiagnostische Bedeutung zu. Wegen des starken „Lokalisationsfluctus“ sind sie oft nur durch systematische histologische Untersuchung oder vergleichende statistische Schwerpunktstimmung der Läsionen fassbar. In Einzelfall kann aber die

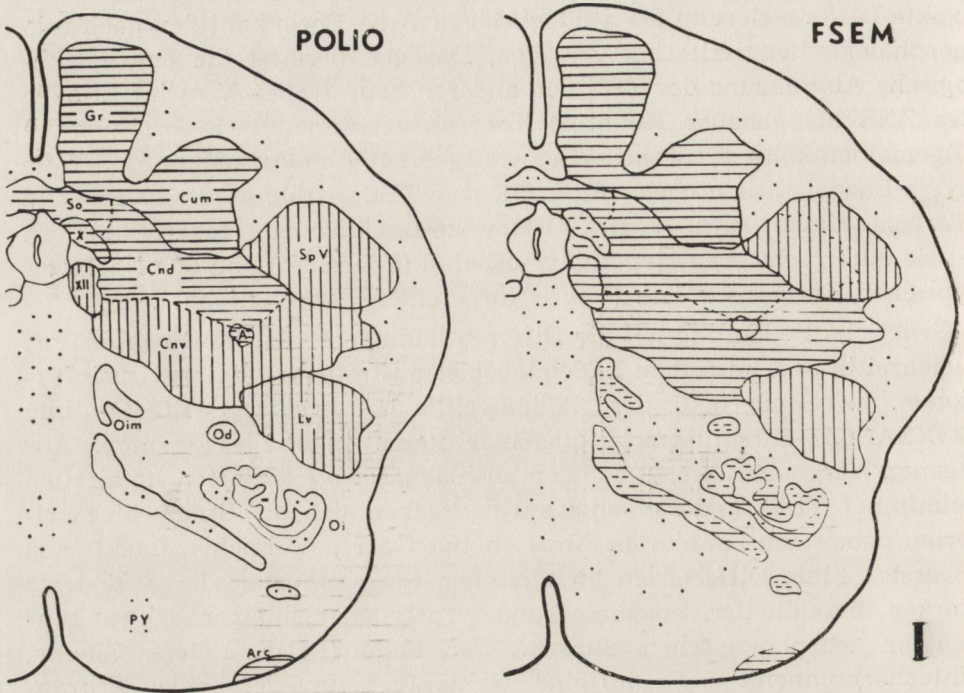
exakte Differenzierung der verschiedenen Arbo-Encephalitiden nach rein morphologischen Kriterien versagen. Dagegen bereitet die neuropathologische Abgrenzung der TBE von anderen neurotrophen Virusinfektionen des ZNS bei genauer Kenntnis ihrer Prozessart und -ausbreitung im allgemeinen keine ernsthaften Schwierigkeiten. Eine Ausnahme bildet die Lyssa-Encephalitis mit einem der JE bzw TBE oft ähnlichen Läsionsbild (Tariska, Fingerland u. Vortel, Osetowska u. Glawidzin, Toga et al.), doch ist sie durch schweren Hypothalamusbefall (Poursines) und den Nachweis typischer Kerneinschlüsse (Negri-Körperchen) gekennzeichnet.

Praktische Bedeutung hat die Differentialdiagnose der TBE von den oft gleichzeitig und im selben Endemiegebiet auftretenden Enterovirusinfektionen, in Sonderheit der Poliomyelitis — während ECHO- und COXSACKIE-Infektionen altersmässig kaum in Frage kommen. Aus eigenen Vergleichsuntersuchungen an biologisch verifizierten Letalfällen heimischer TBE- und Polioepidemien ergaben sich als Unterscheidskriterien neben den erwähnten Abweichungen der geweblichen Reaktionen in erster Linie Differenzen im topischen Läsionsmuster, die u. E. trotz starker individueller, epidemie- und virustypenabhängiger Schwankungen im morphologischen Substrat der Polio (Pette, Peters, Simma, Unterharnscheidt u. Bonin) eine exakte Trennung der beiden Erkrankungen gestatten.

Die aufgrund der eingangs erwähnten semiquantitativen Vergleichsuntersuchungen gewonnenen Erfahrungen hinsichtlich topischer Unterschiede zwischen TBE und Polio in den wichtigsten Regionen des ZNS sind im folgenden zusammengefasst und an Schemata illustriert:

Im Rückenmark gestatten Befallsart und -muster keine Abtrennung: der bei TBE mehr fleckförmige Befall des Graus (Grinschgl) ist in fortgeschrittenen Stadien nicht feststellbar, doch vermisst man bei TBE die schweren Nekrosen mit Fettabbau der Polio (Horanyi-Hechst, Pette, Goodpasture, Busch, Seitelberger u. Jellinger, Környey). Der rostralen Prädilektion bei TBE gegen bevorzugtem Lumbalbefall bei Polio kommt bei den starken segmentalen Intensitätsschwankungen keine Signifikanz zu.

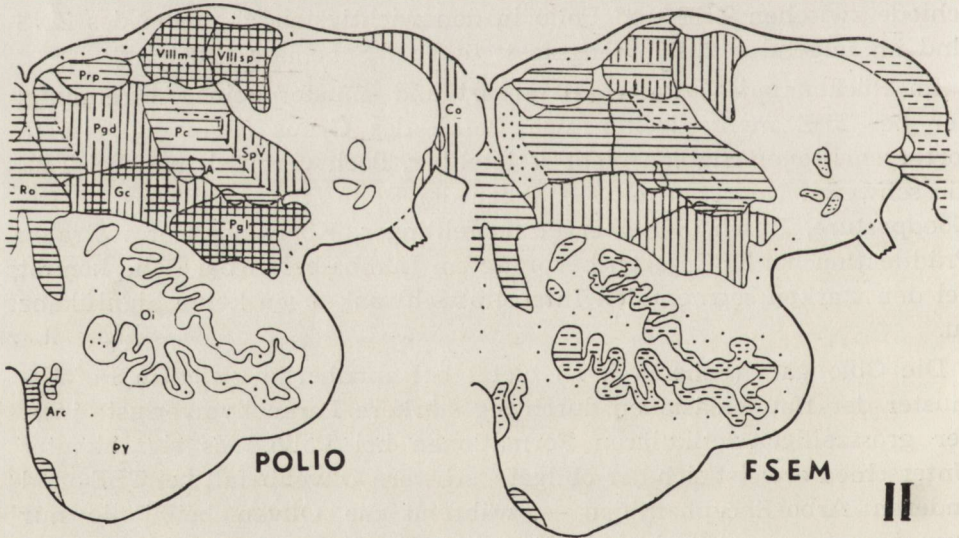
Die Oblongata (Schema I, II) bietet bei annähernd gleichem Befallsmuster der Haubenläsionen durchweg stärkere Parenchymverluste insb. der grosszelligen retikulären Formationen bei Polio. Als signifikanter Unterschied erweist sich der obligate, schwere Olivenbefall bei TBE- und anderen Arbo-Encephalitiden —, während die Oliven bei Polio nur ausnahmsweise und leicht betroffen sind (Kalm, Pette, Baker et al., Van Bogaert, Simma, Környey): wir sahen bei Polio zweimal diskreten Knötchenbefall.



Schema I: kaudale Oblongata.

Legende der Schemata:

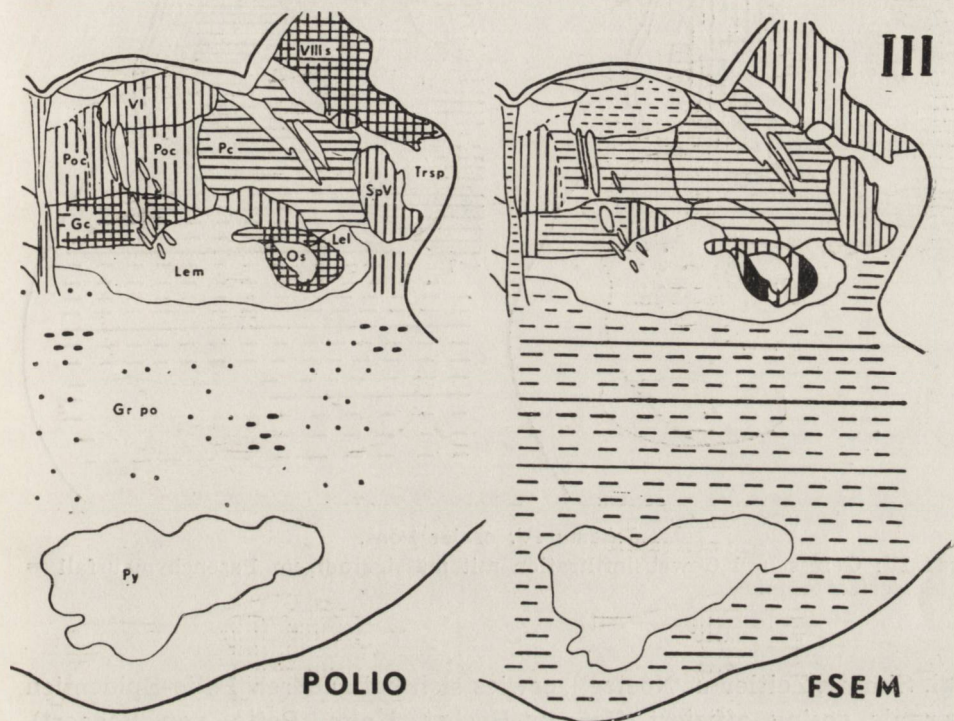
Grad I: disseminierte perivasale Infiltrate = Punkte.



Schema II: orale Oblongata.

Grad II: starke diffuse Gefässinfiltrate, einzelne Gewebsinfiltrate ohne Parenchymverluste = Punktnetz.

Im Pons (Schema III, IV) stehen analogen Abweichungen im Läsionsgrad von Tegmentum und periaquäduktalem Grau zugunsten Polio gleicher Befallsschwere von oberer Olive und Tectum opticum gegenüber. Das Brückenfußgrau ist bei TBE meist schwer; bei Polio nur selten und von wenigen Infiltraten betroffen (Peters, Heinlein, Kalm, Pette), was wir bestätigen können.

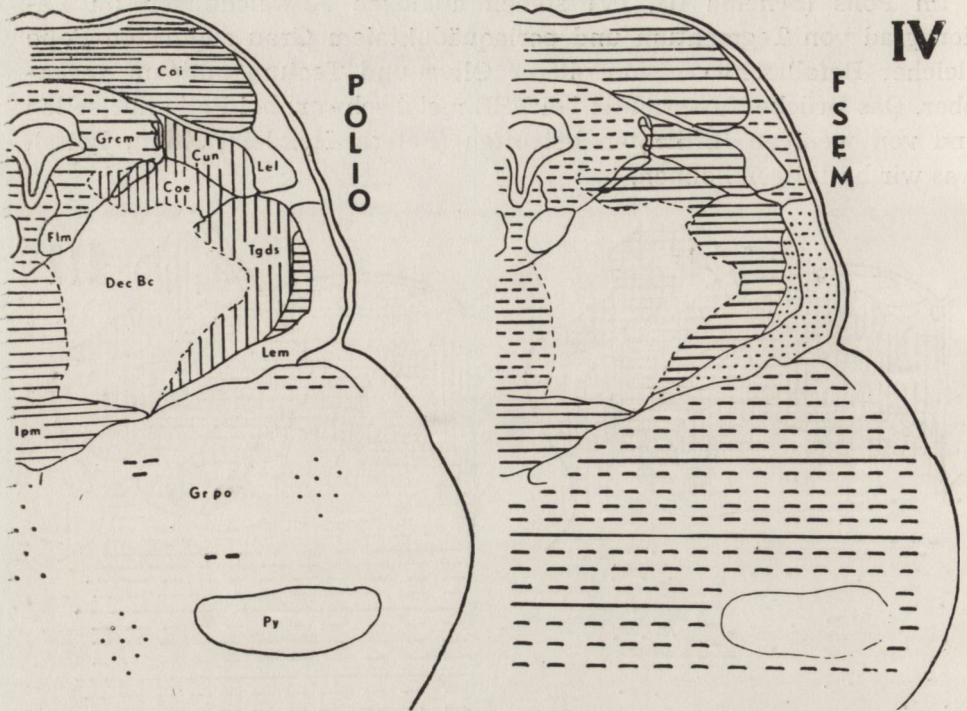


Schema III: kaudaler Pons.

Grad III: Gefäß und Gewebsinfiltration (Knötchen) mit geringem Parenchymsausfall = unterbrochene Horizontallinien.

Das Kleinhirn zeigt distinkte Unterschiede durch Beschränkung der entzündlichen Läsionen auf Zentralkern, Mark und Wurmrinde bei Polio (Peters, Kalm, Horanyi-Hechst, Pette, eigene Fälle) gegenüber diffusen schweren Befall bei TBE. Auch fortgeschrittene ischämische Rindenschäden bei Beatmungsfällen von Polio (Sirma) sind von den primär entzündlichen Läsionen im allgemeinen gut abgrenzbar.

Im Mittelhirn (Schema V) treten bei beiden Krankheiten schwere Ausfälle in Tectum opticum und Nucl. interpeduncularis, geringer im Ruber hervor. Periventrikuläres Grau und Oculomotoriuskerne sind bei TBE meist weniger betroffen. Die Nigra zeigt bei uniformer Verschönerung der roten Zone im eigenen Polio-Material schwerere Ausfälle als bei TBE.



Schema IV: oraler Pons.

Grad IV: Gefäss und Gewebsinfiltration mit mässiggradigem Parenchymsausfall = Horizontallinien.

(vgl. Simma, Zeitler u. Noetzel), erwies sich bei anderen Polio-Epidemien aber als gering affiziert (Horanyi-Hechst, Kalm, Pette, van Bogaert), während bei RFSE Parenchymsausfälle bis 60% auftreten (Haymaker et al.).

Im Zwischenhirn (Schema VI) scheint das Ventrikelgrau bei Polio konstant und schwerer betroffen als bei TBE, während der Thalamus umgekehrtes Verhalten bietet: schwerer Befall bei TBE, aber mitunter fehlende oder geringe Affektion bei Polio (epidemieabhängige Schwankungen). Im Befallsmuster des Thalamus bestehen keine Unterschiede, da die retikulären Kerne stets bevorzugt betroffen und die bei TBE stärker geschädigten Ventrikelkerne auch bei Polio bevorzugt sind. Bei gleichem Befall der Zona incerta scheint das Corpus Luys bei TBE geringer affiziert als bei Polio, kann aber auch bei dieser relativ verschont sein (Baker). Amygdala und Nucl. pontis lat. sind bei TBE schwer; bei Polio kaum betroffen (Pette, Kalm, Simma, Baker, van Bogaert).

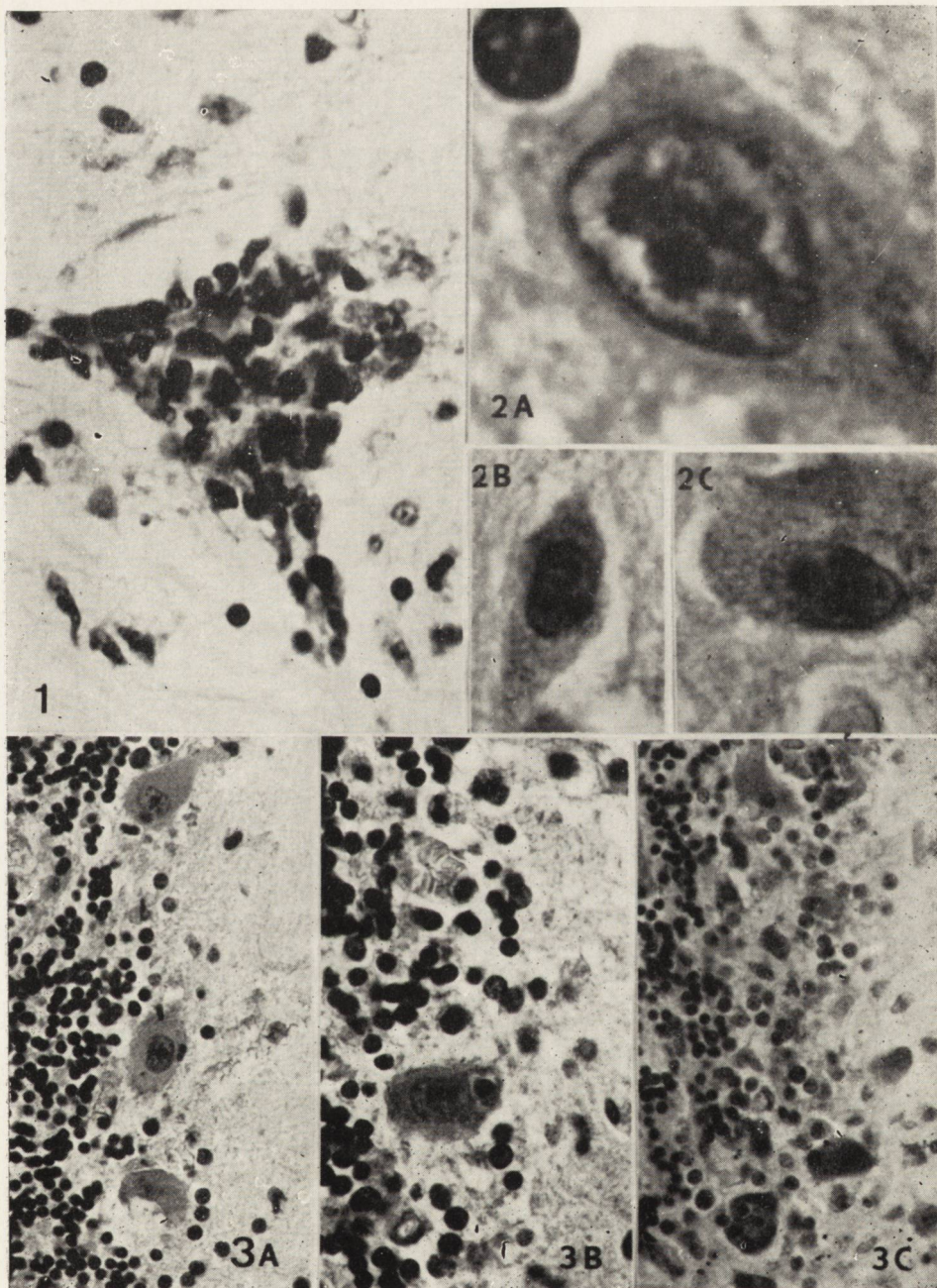


Abb. 1, 2, 3.

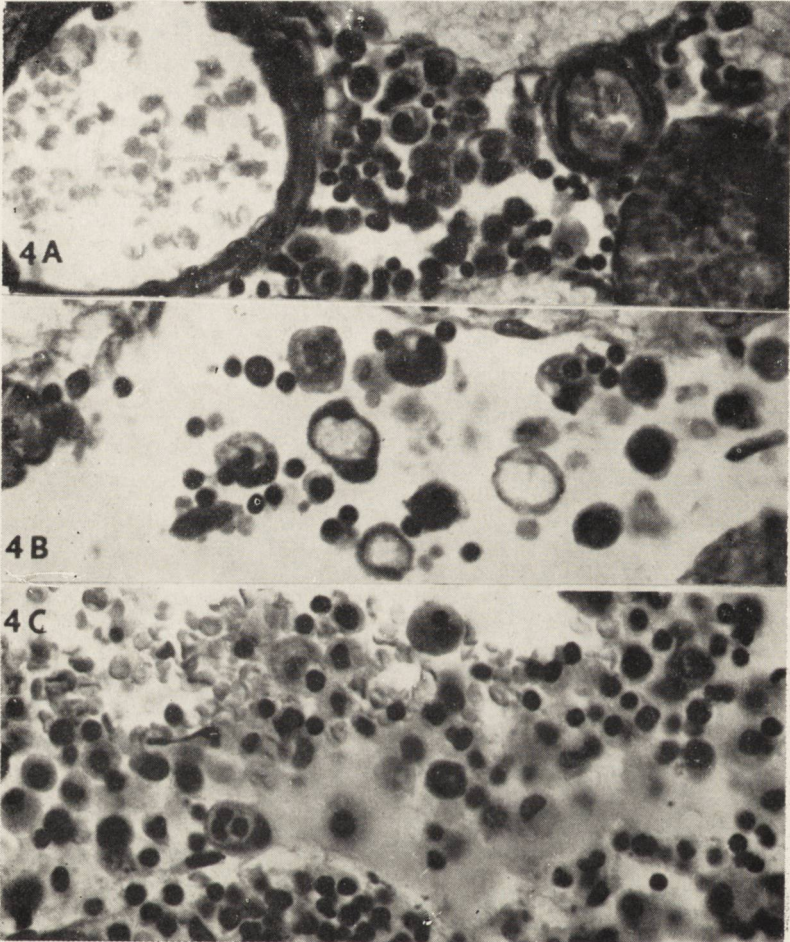


Abb. 4.

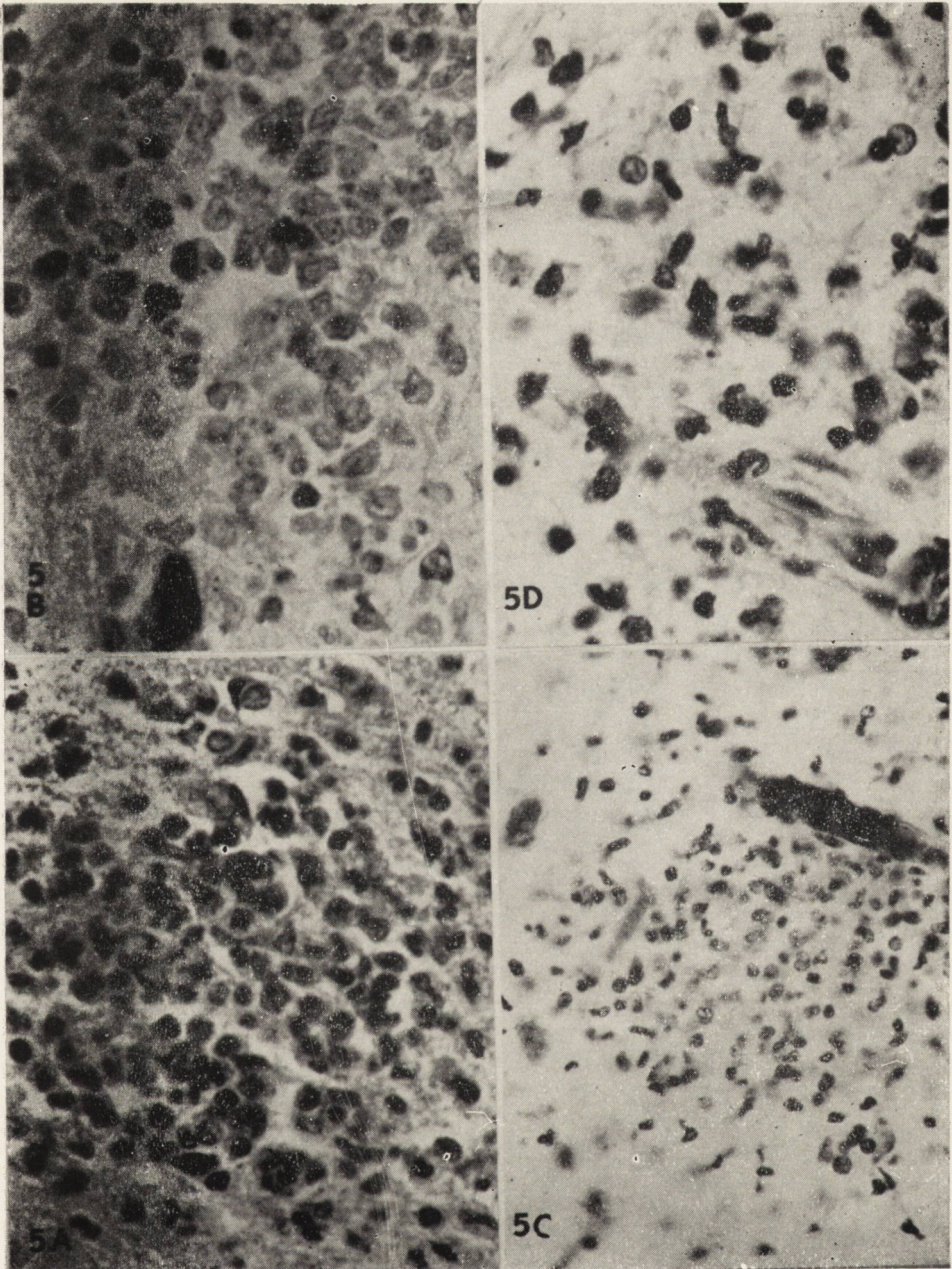


Abb. 5.



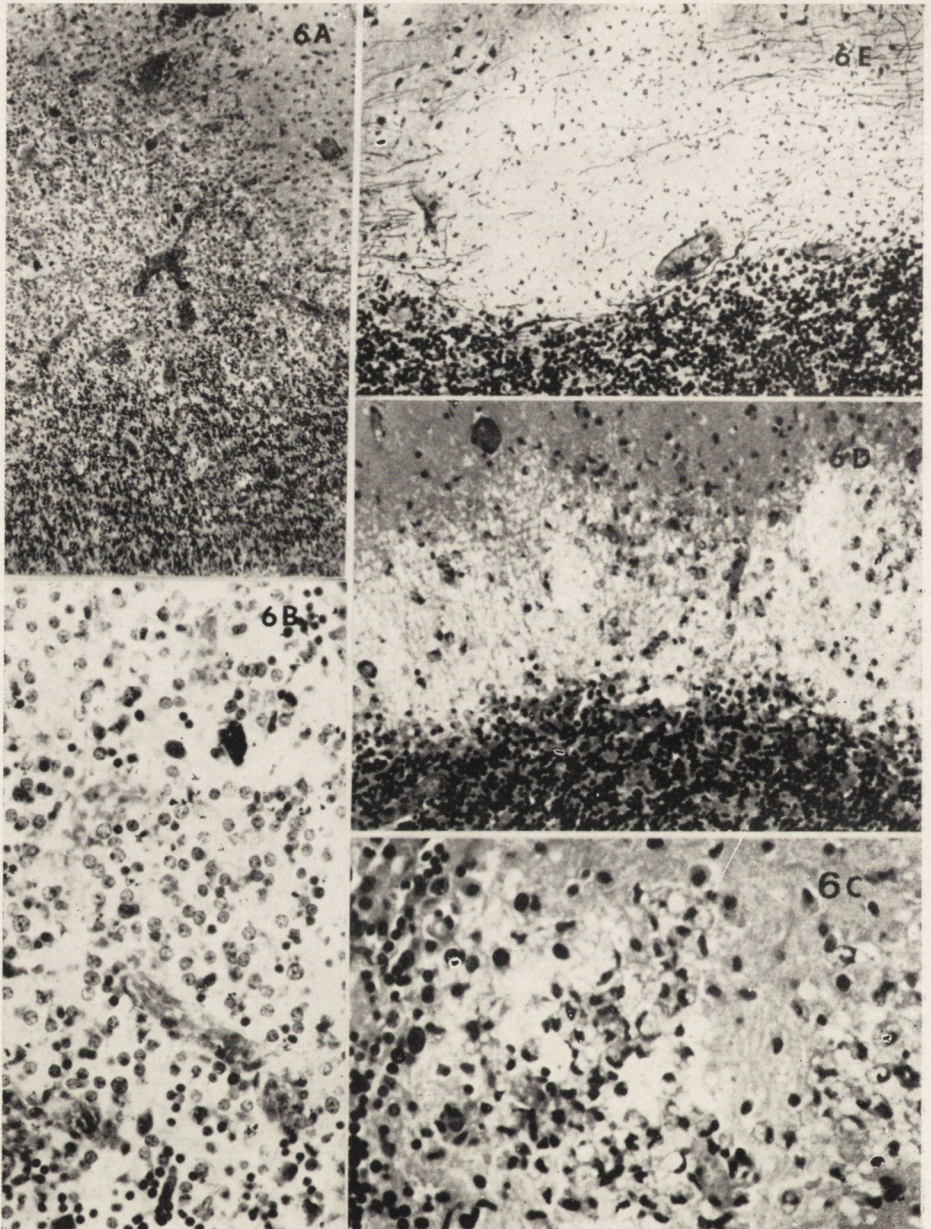


Abb. 6.

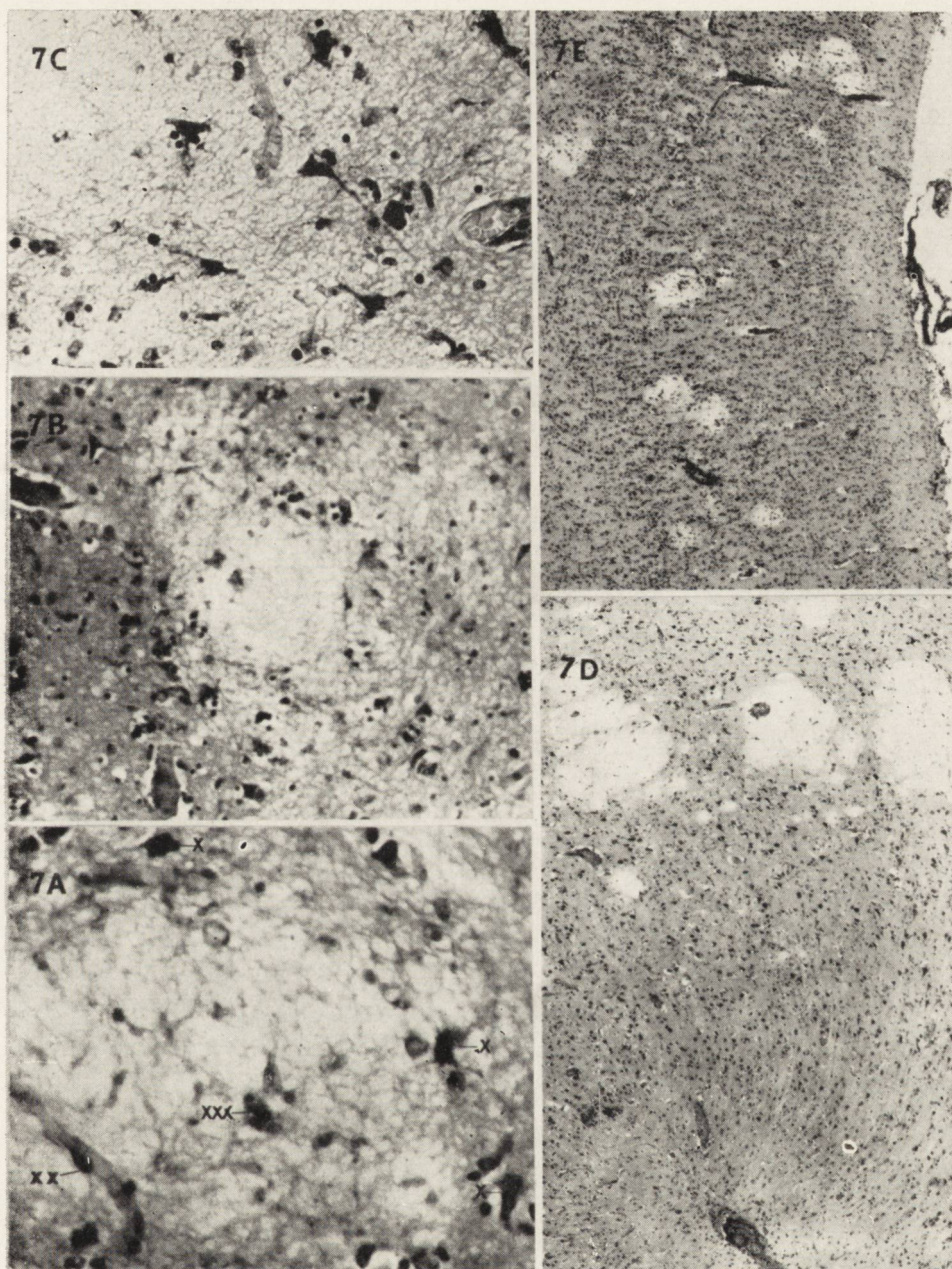


Abb. 7.

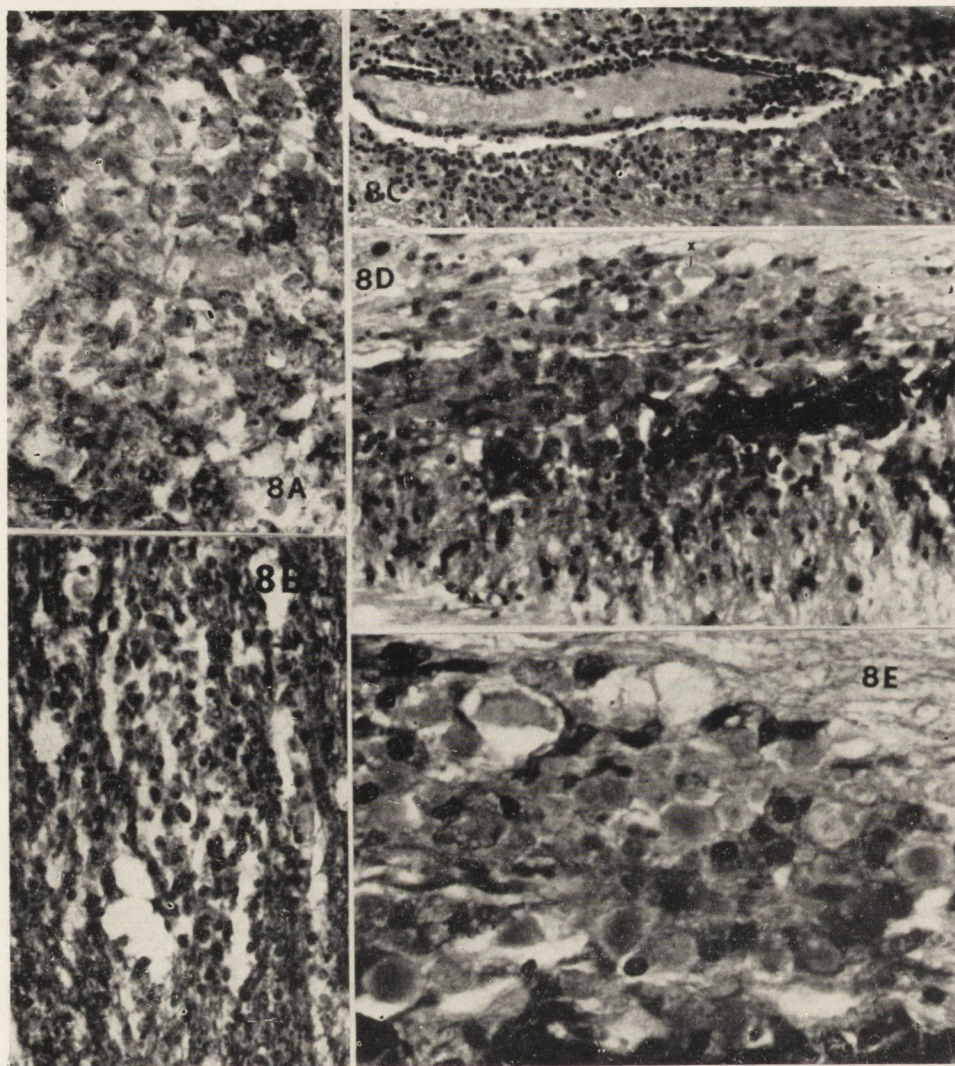


Abb. 8.

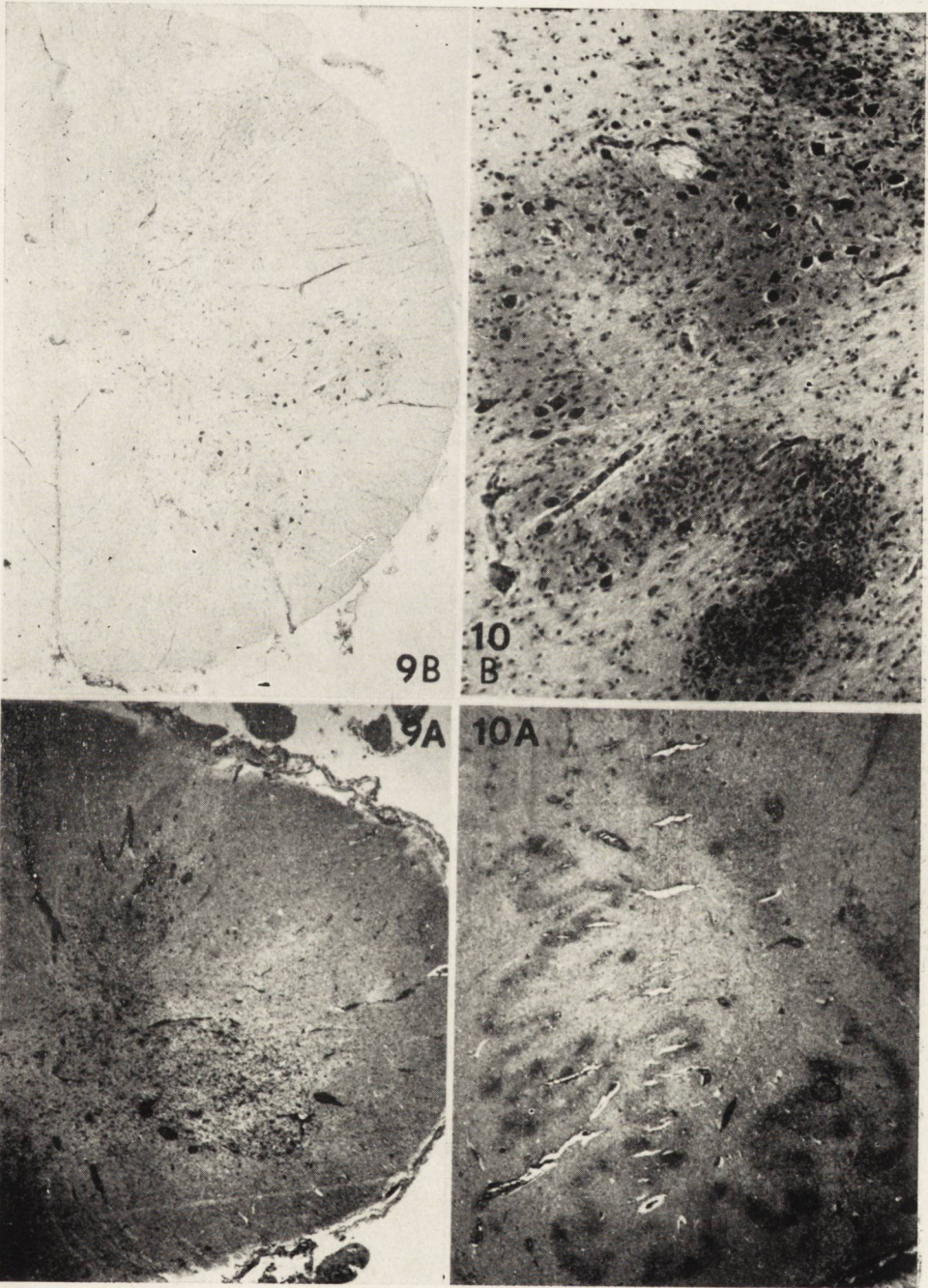


Abb. 9, 10

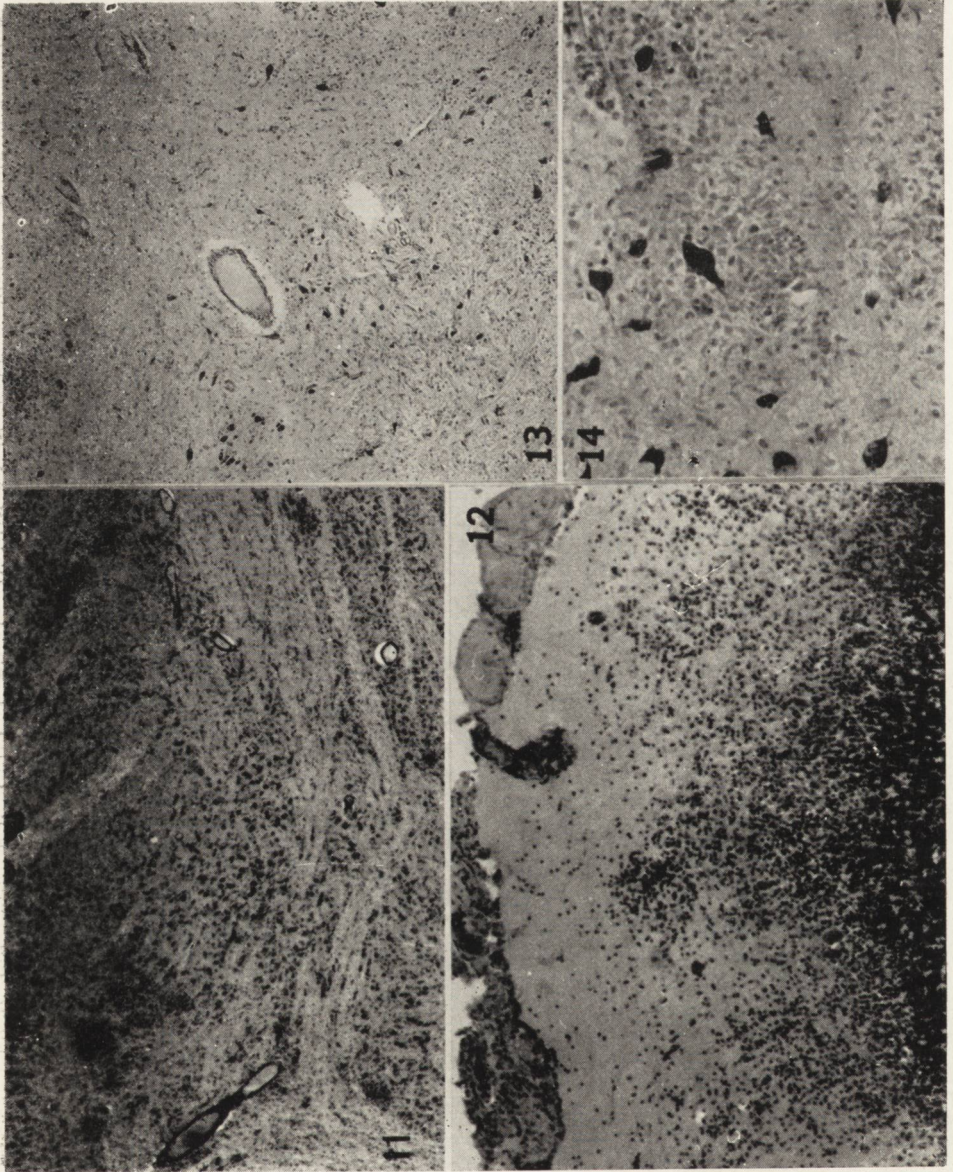


Abb. 11, 12, 13, 14

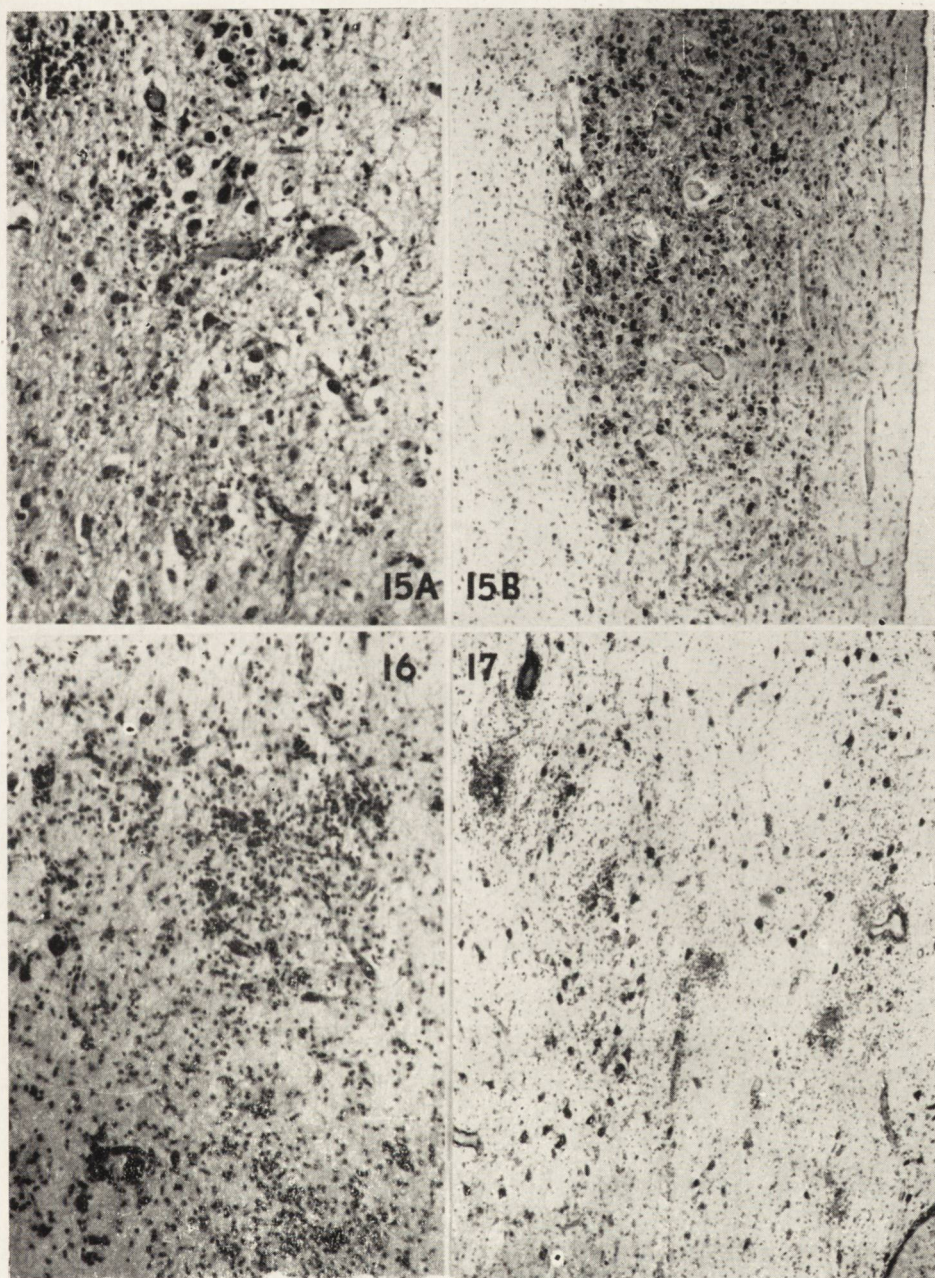


Abb. 15, 16, 17

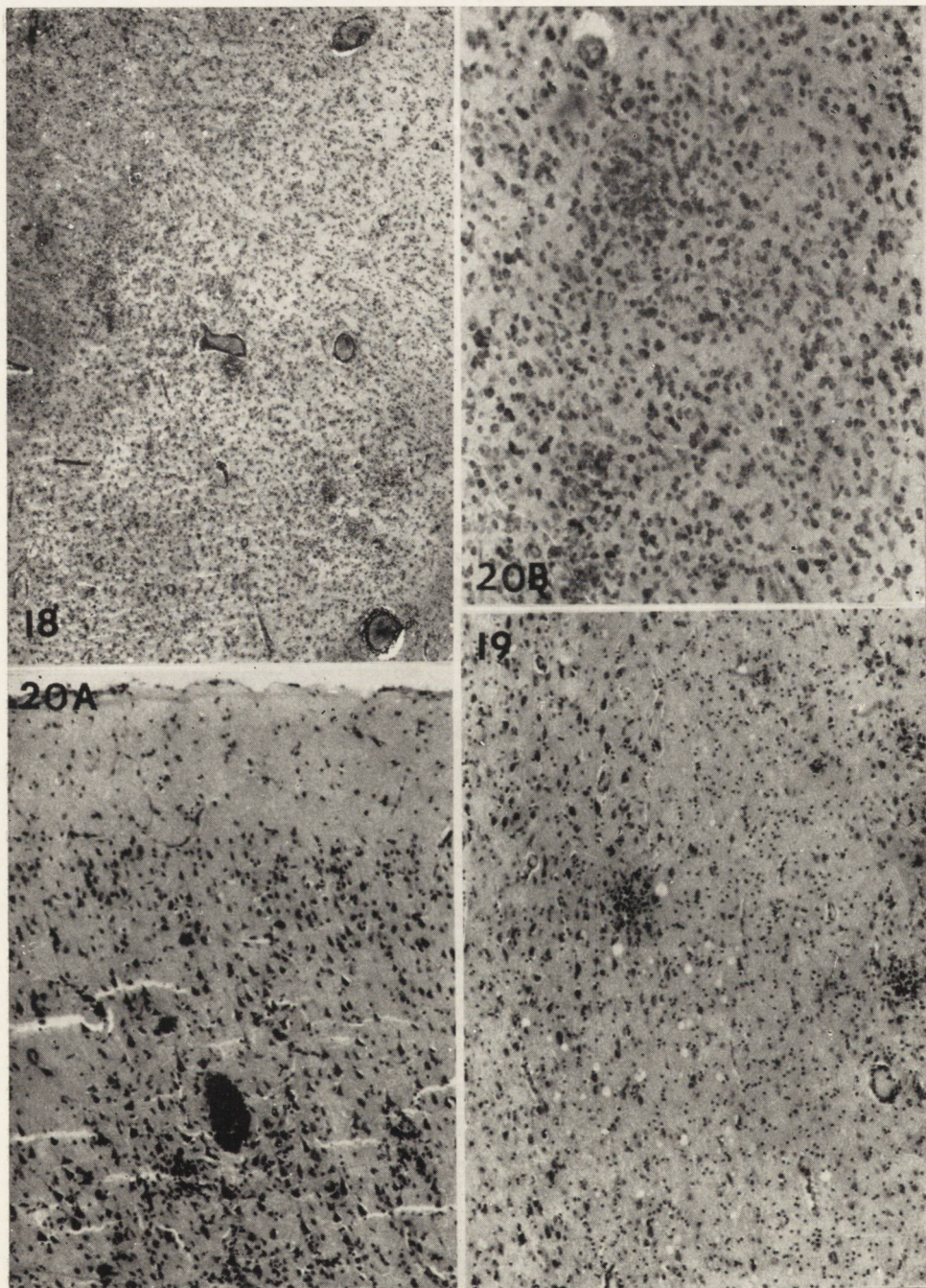
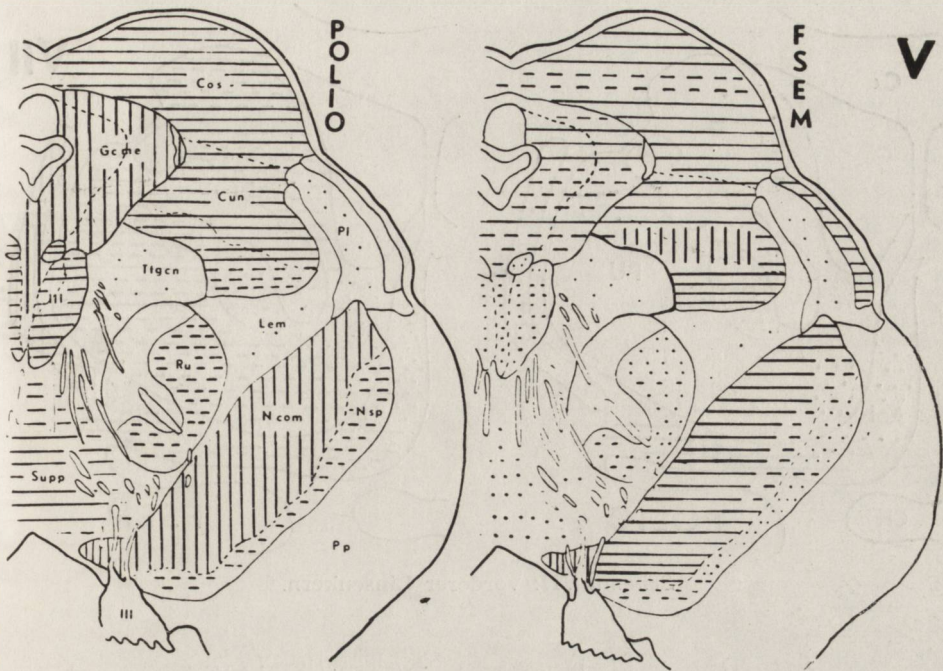


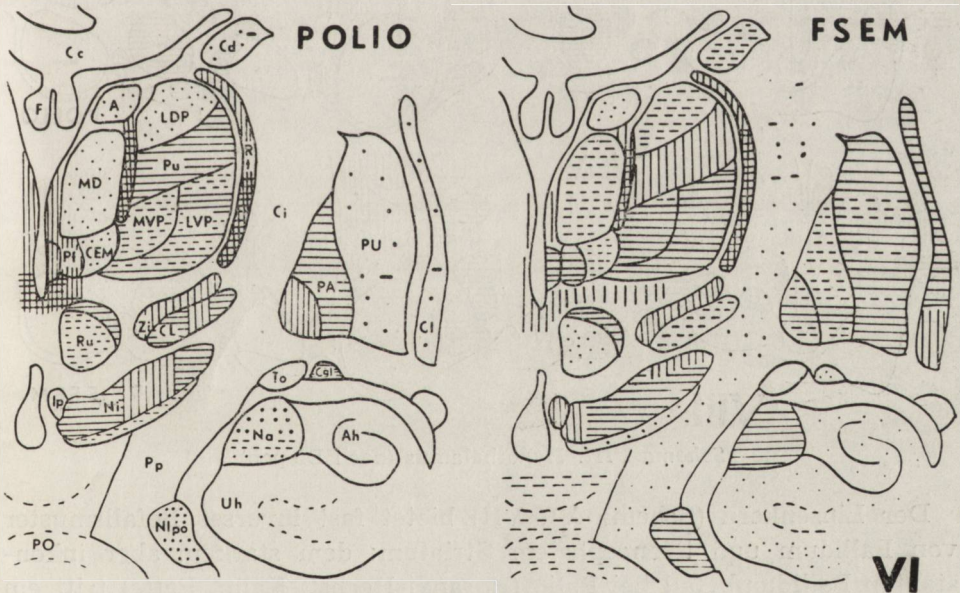
Abb. 18, 19, 20





Schema V: Mittelhirn.

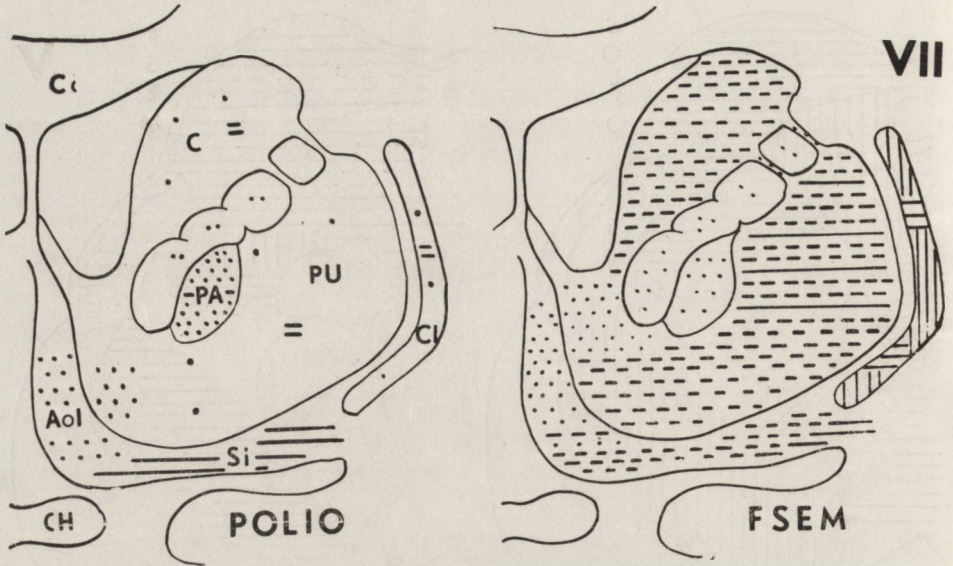
Grad V: Gefäß und Gewebsinfiltrate mit starken Parenchymsfall = Vertikallinien.



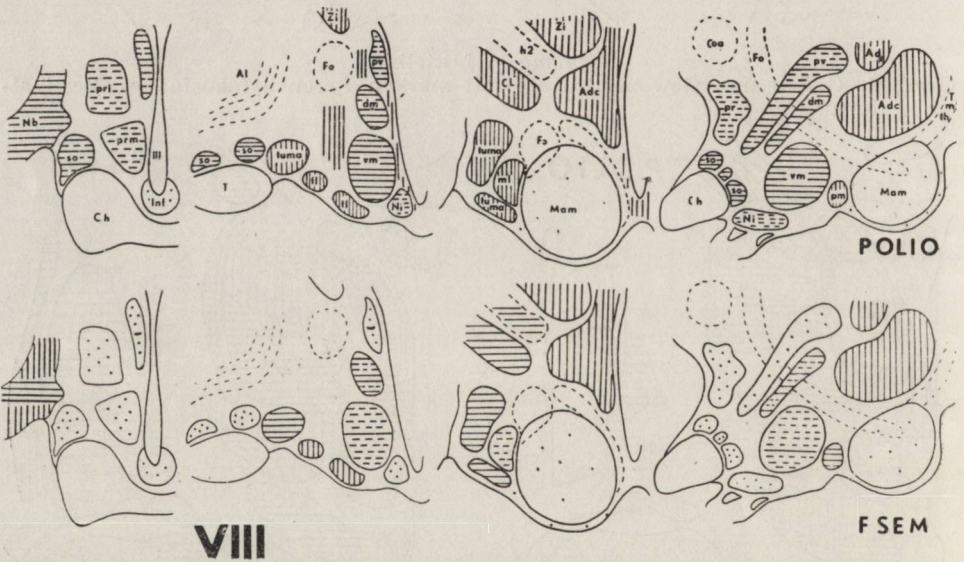
Schema VI: Stammganglien.

Grad VI: schwerste Parenchymsfälle bis inkomplette Nekrose = Liniennetz; spongiöse Fokalnekrosen = schwarze Fleckung.





Schema VII: vorderer Linsenkern.



Schema VIII: Hypothalamus (nach Diepen).

Der Linsenkern (Schema VI, VII) bietet fast inverses Befallsmuster von Pallidum und telencephalem Striatum: dem starken, aber inkonstanten Pallidumbefall bei Polio (Horanyi-Hechst, Kalm, Pette) tritt ein starker Knötchenprozess im Putamen, geringer im Caudatum bei TBE gegenüber, während sie bei Polio kaum oder nur diskret betroffen sind

(Pette). Das bei TBE bevorzugt gefallene Claustrum ist bei Polio meist verschont oder zeigt nur wenige lockere Knötchen. Dem prädilektiven Befall der Subst. perf. ant. bei TBE steht jener der Subst. innominata bei Polio gegenüber.

Im Hypothalamus (Schema VIII) fällt als konstante Diskrepanz eine relative Verschonung von Nucl. paraventricularis und supraopticus bei TBE gegenüber erheblichem Entzündungsbefall bei Polio auf (Kalm, Pette, Baker, van Bogaert). Auch die Medialkerne zeigen Unterschiede zugunsten Polio, während im lateralen und dorsalen Hypothalamus fast gleiche Befallsintensität herrscht. Das Corpus mamillare ist bei beiden meist ausgespart.

Der fakultative Grosshirnbefall bei TBE besteht in disseminierter Knötchenaussaat über Rinde und Subkortikalmark ohne die für Polio typische Einschränkung auf die motorische Rinde (Pette, Kalm, Goodpasture, Horanyi-Hechst, Baker). Eine seltene diffuse Grosshirnaffektion bei Polio (Simma) mit geringer Markbeteiligung war im eigenen Material niemals nachweisbar. Andererseits können die betroffenen Rindenareale bei Polio stärkere Parenchymausfälle mit pseudolaminärer Konfluenz und seltener Bildung spongiöser Nekrosen ähnlich TBE aufweisen.

Zusammenfassend ergeben sich als wichtigste topische und quantitative Läsionsunterschiede des ZNS bei TBE gegenüber Poliomyelitis:

- 1) obligater schwerer Befall des Hirnstammfussregion insb. Oliven,
- 2) schwere disseminierte Kleinhirnaffektion ohne Lokalbeschränkung,
- 3) Vorzugsbefall von Neostriatum und Claustrum gegenüber Paläostriatum,
- 4) schwerer Befall des Riechhirngraus samt Amygdala,
- 5) relative Verschonung ventraler Kerne des markarmen Hypothalamus,
- 6) konstante und stärkere Affektion der grossen Thalamuskern,
- 7) disseminierter, unbeschränkter Befall von Grosshirnrinde und -mark,
- 8) Auftreten spongiöser Fokalneurosen in grauer und weisser Substanz.

Obwohl nicht beabsichtigt ist, eine Diskussion der formalen und topischen Prozessunterschiede zwischen TBE und Polio vorzunehmen, sei auf ihre praktische Bedeutung für die Differenzierung beider Erkrankungen hingewiesen. Man mag einschränken, dass die allen entzündlichen Affektionen des ZNS innewohnende Spektrumbreite von Prozessart und -lokalisation sowie die Folge komplizierender Faktoren im Einzelfall Schwierigkeiten in der Abgrenzung bedingen können, doch gestattet u.E. die systematische neuropathologische Untersuchung im allgemeinen klare Entscheidungen. Im übrigen halten wir mit Környey dafür, dass

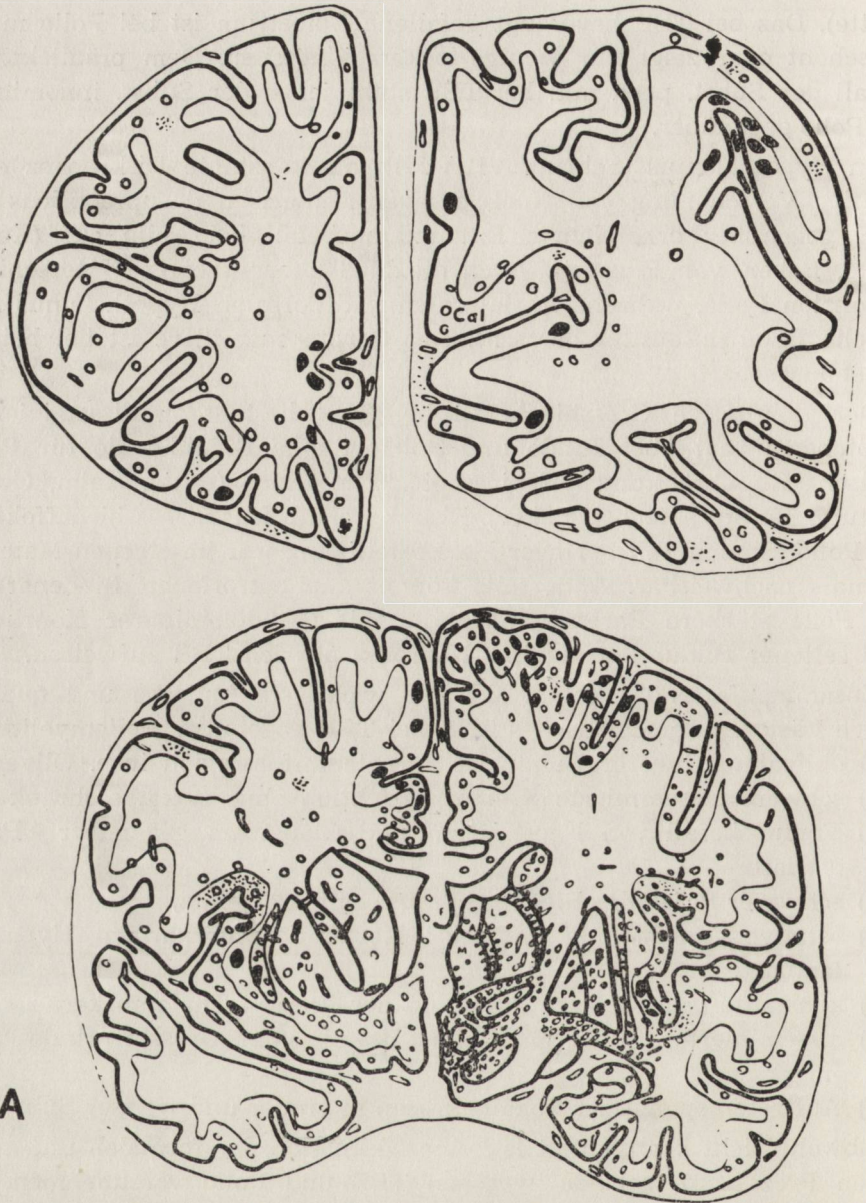


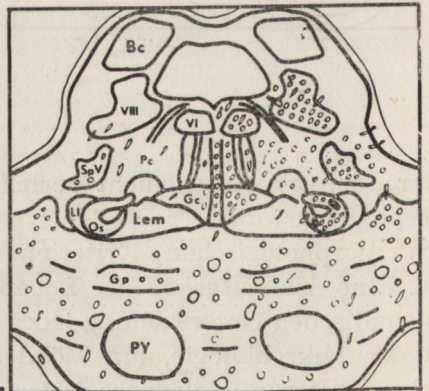
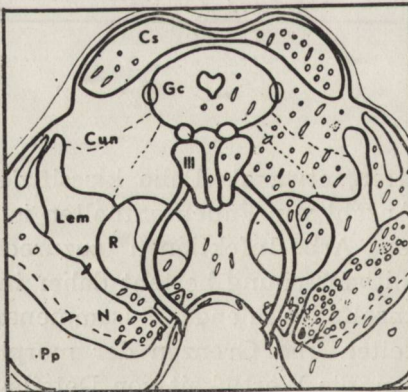
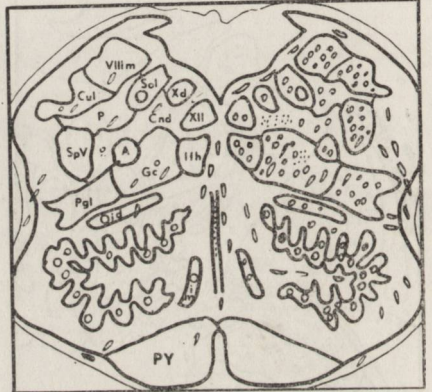
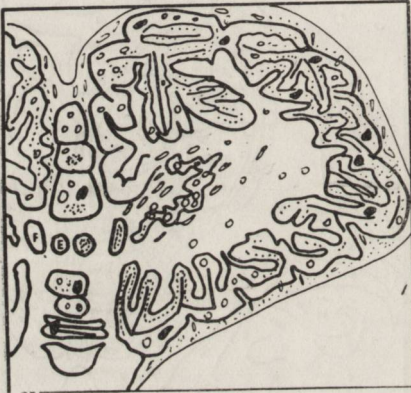
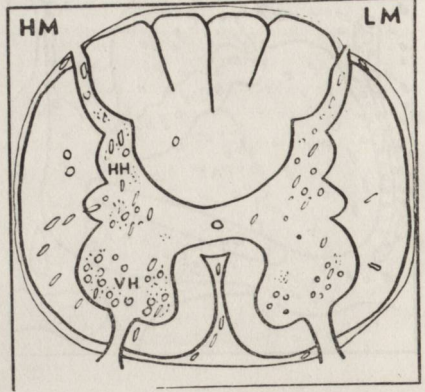
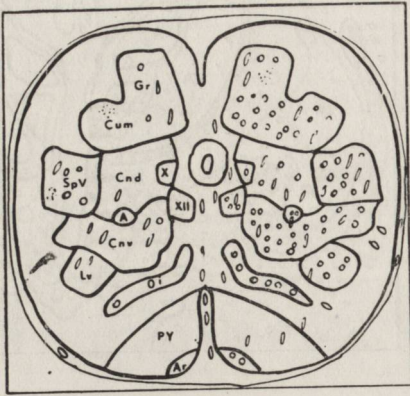
Abb. 21. Schematische Verteilungsmuster der entzündlichen Läsionen bei TBE. Die Hirnstammschnitte geben jeweils Maximalbefall (rechts) und Minimalläsionen (links) an. Legende: Kreise = Entzündungsknötchen; Längsellipsoide = Gefässinfiltrate; Punkte = diffuse Gewebsinfiltrate; schwarze Flecken = Rarefaktionsnekrosen.



B



unter den biologisch nicht verifizierten, etwa als Polio klassifizierten Encephalitiden unserer Breiten eine Anzahl von Fällen enthalten ist, die nach morphologischen Kriterien den Arbo-Infektionen zuzurechnen sind. Eine der Aufgaben der Encephalitisforschung besteht daher in der systematischen Untersuchung jedes Einzelfalles in enger Zusammenarbeit mit der Mikrobiologie, um Möglichkeiten und Grenzen der morphologischen Differentialdiagnose festzulegen, die Wertigkeit von Detailsymptomen zu präzisieren und darüber hinaus Rückschlüsse über die Wesensart der Gesetzmässigkeiten neurotroper Virusinfektionen des ZNS zu gewinnen.



F. Seitelberger, K. Jellinger

## NEUROPATHOLOGIA KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MÓZGU

## Streszczenie

Przedstawiono przegląd zmian neuropatologicznych w kleszczowym zapaleniu mózgu (TBE) na podstawie analizy morfologicznej 11 przypadków własnych, w tym 9 z weryfikacją mikrobiologiczną, pochodzących z epidemii występujących w Austrii w latach 1954—1964, oraz porównano je z tą samą postacią zapalenia w oparciu o materiał pochodzący z innych krajów.

Morfologiczny substrat TBE odpowiada w pełni pierwotnemu zapaleniu wirusowemu o rozprzestrzenieniu zbliżonym do typu „fleckförmige Polioencephalitis” Spatz’a. Zespół zapalny obejmuje pierwotne zwyrodnieniowe zmiany parenchymalne (rozsiane ubytki komórek nerwowych z neuronofagią) i komponentę zapalną występującą głównie w obrębie mezodermy naczyniowej w postaci niezależnie od siebie występujących nacieków w oponach i okołonaczyniowych (o charakterze lymfo-plazmo-histiocytarnych) oraz rozsianych mieszanokomórkowych nacieków śródkankowych (grudki zapalne). Występujące w przebiegu procesu zapalnego gąbczaste ogniska martwicy w substancji szarej i białej patogenetycznie są następstwem naczyniopochodnego, zapalno-toksycznego uszkodzenia elementów neuroektodermalnych (makroglej, neuryty) bez udziału czynnika naczyniowo-krażeniowo-ischemicznego. Zespół zapalny charakteryzuje się patognomicznym układem topograficznym o indywidualnie różnej rozległości. Cechuje go stałe zajęcie rdzenia, pnia mózgowego, mózdzku i międzymózgowia z zawsze obecnymi zmianami w mózdzku i w oliwach dolnych i niejednakowym udziałem w procesie całego kresomózgowia z rozsiewem grudkowym w korze, istocie białej i w neostriatum. Porównawcze badanie morfologiczne przypadków kleszczowego zapalenia mózgu z różnych krajów nie wykazało między nimi żadnych istotnych różnic, co podkreśla biologiczną jedność tej postaci zapalenia. Występujące u pozostałych postaci Arbo-B zapaleń nieznaczne odchylenia anatomiczne przemawiają za ich bliskim pokrewieństwem biologicznym, podczas gdy Arbo-A encefality wykazują znaczne różnice neuropatologiczne.

Dla oddzielenia kleszczowego zapalenia mózgu od Poliomyelitis przebadano porównawczo histo-topograficznie jakościowo i częściowo ilościowo 20 biologicznie potwierdzonych przypadków śmiertelnych z epidemii Polio w Austrii z lat 1959 — 1963. Obok różnic strukturalnych w reakcji tkankowej (udział komponenty glejowej w Polio) stwierdzono wyraźne różnice topograficzne oraz różne miejsca predylekcyjne dla obu postaci. Polegają one, przy podobnym zajęciu rdzenia i pnia mózgowego, na odmiennym zachowaniu się oliw, struktur szarych podstawy mostu, mózdzku i podwzgórza, w mniejszym stopniu wzgórze i podstawnych formacji wędromózgowia, także na odwróconym stosunku zmian w paleo i neostriatum oraz znacznej różnicy w zajęciu kory i istoty białej. Zastanowiono się nad praktycznym znaczeniem faktycznych różnic w obu postaciach zapaleń.

Ф. Зайтельбергер, К. Еллингер

## НЕВРОПАТОЛОГИЯ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

## Содержание

Приводится обзор невропатологических изменений при клещевом энцефалите (ТВЕ), опирающийся на морфологическом анализе 11 собственных случаев,

среди которых — 9 дополняется микробиологической верификацией. Приведенные случаи происходят из австрийских эпидемий, наблюдаемых в периоде 1954—1964 гг. Данные случаи сравниваются с аналогичной формой энцефалита, простиупающего в других странах.

Морфологический субстрат ТВЕ полностью соответствует первичному вирусному воспалению с распространением близким к типу „flockformige Polioencephalitis” Шпатца. Воспалительный комплекс охватывает первичные дегенеративные паренхиматозные изменения (диссеминированные дефекты нервных клеток с нейронофагией) и воспалительный компонент, появляющийся по преимуществу в пределах сосудистой мезодерм в виде независимых друг от друга инфильтратов в мозговых оболочках и околососудистых пространствах (лимфо-плазмо-гистиоцитарного характера) и рассеянных разноклеточных внутритканевых инфильтратов (воспалительные комочки). Спонгиоидальные очаги некроза, появляющиеся в течении воспалительного процесса в сером и белом веществах патогенетически являются последствием вазогенного, воспалительно-токсического повреждения нейродермальных элементов (макроглия, нейроциты) без участия сосудисто-циркуляторно-ишемического фактора. Воспалительный комплекс характеризуется патогномонической топографической структурой с разной индивидуальной распространенностью. Его характеризует постоянное поражение спинного мозга, мозгового ствола, мозжечка и промежуточного мозга с всегда наличными изменениями в мозжечке и в нижних оливах и неодинаковым участием в процессе всего конечного мозга с комочковой диссеминацией в коре, белом веществе и в neostriatum.

Сравнительные морфологические исследования случаев клещевого энцефалита из разных стран не показали существенных между ними различий, что указывает на биологическое единство этой формы воспаления. Наблюдаемые у остальных формы Arbo B воспалений незначительные анатомические отклонения решают о их близком биологическом сродстве, в то время как Arbo A энцефалиты отличаются значительными невропатологическими различиями.

Для разделения клещевого энцефалита от полиомиелита проводились сравнительные гисто-топографические исследования 20 биологически доказанных летальных случаев из эпидемии Полио и Австрии за период 1959—1963. Кроме структурных отличий тканевой реакции (участие глиевого компонента в Полио) обнаруживались отчетливые топографические различия и различные предилективные места для обеих форм. Они заключаются, при похожем поражении спинного мозга и мозгового ствола, в разных изменениях в оливах, серых структурах основании моста, мозжечка и гипоталамуса, в меньшей степени таламуса и основных формациях обонятельного мозга также в обратных пропорциях изменений в Paleo и neostriatum и значительной разнице в поражении коры и белого вещества. Обсуждается практическое значение фактических различий в обоих видах воспаления.

#### SCHRIFTTUM

1. Aksel I. S.: Pathologische Anatomie der Lyssa. In: Hdb. spez. path. Anat. Histol. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, Bd. XIII/2A.S., 417—435.
2. Baker A. B.: Poliomyelitis. XVI. A study of pulmonary edema. Neurology (Minn.) 1957, 7, 743—752.

3. Baker A. B.: Western Equine Encephalitis. In: Encephalitides: Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton, 1961, 33—37.
4. Baker A. B., Cornwell S., Brown J. R.: Poliomyelitis. IV. The hypothalamus. Arch. Neur. Psychiat. (Chic.), 1952, 68, 16—36.
5. Baker A. B., Cornwell S., Tichy F.: Poliomyelitis. II. The cerebral hemispheres. Arch. Neur. Psychiat. (Chic.), 1954, 71, 435—454.
6. Baker A. B., Matzke H. A., Brown J. R.: Poliomyelitis. III. Bulbar poliomyelitis. A study of medullary function. Arch. Neur. Psychiat. (Chic.), 1950, 63, 257—281.
7. Bednar B.: Diagnostic postmortel des encéphalites aiguës en prenant surtout en consideration l'encéphalite à tiques. Cas. lék. Ces. 1955, 94, 133—137.
8. Bednar B.: Tick-borne encephalitis with a protracted course. In: Encephalitides, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton, 1961, 17—22.
9. Belman Ch. L.: Problemes de la localisation dans la clinique de l'encéphalite à tiques. Zh. Nevropat. Psikhiat., 1963, 63, 1670—1672.
10. Bogaert L. van: Polioencephalite antérieure aigue. In: Hdb. spez. path. Anat. Histol, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1958, Bd. XIII/2 A.S., 362—393.
11. Bogaert L. van, Radermecker J.: Pathologie de quelques encéphalites humaines à virus. Rev. Neurol. 1963, 108, 361—384.
12. Bouttier H., van Bogaert L.: A propos d'un cas anatomo-clinique de poliomyélite infantile. Ann. méd. 1924, 14, 89—107.
13. Busch W.: Die Poliomyelitis bei Jugendlichen und Erwachsenen. Arch. Psychiat. Z. Neurol, 1959, 198, 438—455.
14. Busch W., Hohenegger M.: Frühsommer-Encephalomyelitis mit Störung des Elektrolytstoffwechsels. Nervenarzt, 1964, 35, 360—363.
15. Dent J. H.: Pathological changes in the brains of children infected with the virus of eastern equine encephalomyelitis. Bull. Tulane Univ. Med. Fac. 1955, 14, 85—97.
16. Draganescu St., Ionescu I., Voinescu S., Steriade H.: L'encéphalopolio-myélite à virus subaigue. Ses rapports avec la sclérose latérale amyotrophique. St. cerc. neurol. 1956, 1, 21—32.
17. Draganescu St., Draganescu N.: Encefalitele transmise prin arthropode (Encefalite cu arbor-virusuri). In: Draganescu St., Draganescu N., Petrescu A.: Encefalite virotice umane. Edit. Acad. Rep. Pop. Romine 1962, 115—180.
18. Feigin I.: Lesions in the white matter in acute poliomyelitis. Neurology (Minn.), 1957, 7, 399—403.
19. Fingerland A., Vortel V.: Travailes morphologiques chez les morts qui ont succombés aus neuro-infections en 1953. Vojenské z dravotnické lisy 1955.
20. Fingerland A., Vortel V.: Tick Encephalitis. In: Encephalitides, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton, 1961, 23—32.
21. Fingerland A., Vortel V.: A case of clinically undiagnosed rabies of silent type, discovered as a result of virological examination with phase contrast microscopy of Negri bodies. In: Encephalitides, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton, 1961, 60-66.
22. Garven A. K., Margolis J.: A fatal case of Murray vallaey encephalitis occurring at Narrabri in New South Wales. M. J. Austr., 1952, 2, 621—624.
23. Golman S. V.: Chronisch fortschreitende Formen der Zecken- Encephalomyelitis. Nevropat. und Psikhiat. 1951, 10, 36—47; Ref. Zbl. allg. Neurol. 1941, 103, 635.
24. Goodpasture E. W.: The Pathology and pathogenesis of poliomyelitis. In: Infantile Paralysis. Nat. Found. Inf. Par. New York, 1941, 85—125.



25. Grashitschenkov N. I.: Vergleichende Charakteristik der Zecken und Mückenencephalitis. Wiss. Sitzg. Verein Psych. Neurol. Wien 24.6.1963.
26. Grashitschenkov N. I.: Japanese encephalitis in the USSR. Bull. Wld. Hlth. Org. 1964, 30, 161—172.
27. Grashitschenkov N. I.: Tick-borne Encephalitis in the USSR. Bull. Wld. Hlth. Org. 1964, 30, 187—196.
28. Grinschgl G.: Centraleuropäische Enzephalomyelitis. Wien. med. Wschr. 1955, 105, 1042—1045.
29. Grinschgl G.: Virus meningo-encephalitis in Austria. Bull. Wld. Hlth. Org. 1955, 12, 535—564.
30. Grinschgl G.: Zur Neuropathologie der Centraleuropäischen Encephalomyelitis (CEE) unter Berücksichtigung der Differentialdiagnose zu den Virusencephalomyelitiden anderer Genese. Wien. klin. Wschr. 1957, 69, 761—765.
31. Grinschgl G., Kovac W., Seitelberger F.: Spring-Summer Encephalomyelitis in Austria: Encephalitides, Elsevier 1961, 3—16.
32. Gromov S. A., Chalisova K. N.: On the clinical and histological aspects of tick-borne encephalitis. Vop. Psikhiat. Nevropat. 1961, 7, 78—85.
33. Haddenbrock S.: Über schubweis verlaufende „chronische Poliomyelitis“. Z. ges. Neur. Psychiat. 1944, 178, 80—135.
34. Haymaker W.: Mosquito-borne Encephalitides. In: Encephalitides, Elsevier 1961, 38—56.
35. Haymaker W.: Arthropod-borne viral encephalitides. Closing Discussion. In: Encephalitides. Elsevier 1961, 695—701.
36. Haymaker W., Sabin A. B.: Topographic distribution of lesions in Japanese B. encephalitis: Nature of the lesions with report of a case on Okinawa. Arch. Neur. Psychiat. (Chic.) 1947, 57, 673—692.
37. Haymaker W., Sather G. E., Hammon W. Mc D.: Essential Russian spring summer viral encephalitis. Arch. Neur. Psychiat. (Chic.) 1955, 73, 609—630.
38. Haymaker W., Smith M. G., van Bogaert L., de Chenar C.: Pathology of viral disease in man characterized by nuclear inclusions. With emphasis on herpes simplex and subacute inclusion encephalitis. In: Viral Encephalitides, Springfield III C. C. Thomas 1958, 95—204.
39. Heinlein H., Kleinschmidt H.: Die übertragbare Kinderlähmung. Hirzel 1939.
40. Herzon H., Shelton J. P., Bruyn H. B.: Sequelae of Western Equine and other arthropod-borne encephalitides. Neurology (Minn.) 1957, 7, 535—548.
41. Horanyi-Hechst B.: Zur Histopathologie der menschlichen Poliomyelitis acuta anterior. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1935, 137, 1—54.
42. Ito M.: Supplemental pathology of encephalitis japonica, particularly focal tissue necrosis. Kyushu Neuropsychiat. (jap. Ed) 1959, 7, 378—388.
43. Jabotinski I. M., Sviatuchina A. O.: Patomorfologii dvuchvolnovych infekzii Medgkis, Moscou, 1954, 88.
44. Jakob H.: Neuropathologie der Viruserkrankungen des Zentralnervensystems. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1961, 182, 472—491.
45. Jelling R. K.: Läsionen des extrapyramidalen Systems bei akuten und protrahierten Komazuständen. Wien. Z. Nervenheilk. 1965, 23, 40—74.
46. Jellinger K., Kovac W.: Beitrag zur Neuropathologie der Frühsommer-Meningo-encephalomyelitis. Path. Microbiol. 1960, 23, 375—392.
47. Jellinger K., Poetsch F., Seitelberger F.: Akute nekrotisierende Einschlusskörperchen-Encephalitis. Isolierung von Herpes simplex-Virus aus dem Gehirn. Acta Neuropath. Berl. 1964, 3, 278—283.

48. Jellinger K., Seitelberger F.: „Encephalitis“ bei Grippe. Wien. med. Wschr. 1959, 109, 201—207.
49. Jellinger K., Seitelberger F.: Zur Frage der zentralnervösen Komplikationen nach Wutschutzimpfung. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1963, 184, 508—536.
50. Jellinger K., Seitelberger F.: Contribution à l'histopathologie et à la topographie de l'encéphalomyélite verno-estivale en Europe Centrale Rev. Neurol. 1963, 108, 910—917.
51. Jervis G. A., Higgins G. H.: Russian spring-summer encephalitis. Clinico-pathologic report of a case in the human. J. Neuropath. exp. Neurol. 1953, 12, 1—10.
52. Johnston L. M., Goddpasture E. W.: Acute encephalitis in a child with cerebellar lesions like those of louping-ill in monkeys. Amer. J. Dis. Child. 1936, 52, 1415—1423.
53. Juba A.: Klinisches Bild und Histopathologie der im Komitat Békés beobachteten Zeckencephalitis. Acta med. Acad. scient. hung. 1959, 14, 33—49.
54. Juba A., Pinter M.: Histopathologie der mit einheimischem Virus ausgelösten experimentellen Zeckencephalitis. Acta morphol. Acad. scient. hung. 1959, 8, 415—424.
55. Kalm H.: Zur Topik des anatomischen Prozesses bei der Heine-Medinschen Krankheit. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1950, 164, 94—112.
56. Kestner A. G.: Pathological Anatomy and Histology of Spring-Summer Encephalitis. Moscou, Medgis, 1937.
57. Konowalow N. W., Popowa L. M., Chondkarian O. A.: Zur Histopathologie der Poliomyelitis anterior subacuta. Psychiatrie, Neurol. med. Psychol. (Lpz) 1963, 15, 215—226.
58. Környey St.: Zur vergleichenden Pathologie der Zeckencephalitis. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 1955, 61, 231—235.
59. Környey St.: Zur histologischen Differentialdiagnose von Encephalomyelitiden. (Über die Bedeutung der Knötchenbildung in den unteren Oliven). St. cerc. Neurol. 1964, 9, 505—511.
60. Környey St.: Anoxisch-vasale Hirnschädigung bei allgemeinen und neuralen Infektionskrankheiten. Acta neuropath. 1965, 4, 278—287.
61. Kovac W., Moritsch H.: Zur Pathogenese der Infektion der Maus mit dem Virus der menschlichen Frühsommer-Meningoencephalitis. Zbl. Bakt. I. Orig. 1959, 174, 440—456.
62. Kovac W., Kunz Ch., Stockinger L.: Elektronenoptische Darstellung des Virus der Frühsommer-Meningoencephalomyelitis (FSME). Wien. Klin. Wschr. 1961, 73, 393—394. Arch. ges. Virusforsch. 1961, 11, 544—567.
63. Krücke W.: Über Virus-Encephalitiden mit Kerneinschlüssen beim Menschen und die Neuropathologie der experimentellen B-Virusinfektion. Wien. Z. Nervenheilk. 1960, 18, 127—158.
64. Lapeysonie L., van Bogaert L.: On Japanese B encephalitis in India. In: Encephalitides, Elsevier 1961, 57—59.
65. Matzke H. A., Baker A. B.: Poliomyelitis. V. The pons. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.), 1952, 68, 1—15.
66. Melnikov S. A., Makhonkova A. G.: Zur Pathomorphologie der westlichen Variante der Zecken-Encephalitis. Z. Nevropat. und Psikhiat. 1958, 58, 1349—1353. Ref. Zbl. ges. Neurol. 1959, 152, 110.

67. Miskolczy D., Csiki C., Vendeg V., Abraham A., Waitsuck P., Wagner B.: Epidemia de encefalita virotica de sfusit de vara-toamna la Tg Mures in 1955. *Neurol. Psychiat. Neurochir.* 1956, 1, 16—18; 1958, 3, 139—147.
68. Miyake M.: The pathology of japanese encephalitis. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1964, 30, 153—160.
69. Mollaret P., Bertrand I., Mollaret H.: Sur l'existence possible dans la poliomyélite antérieure aigue d'un processus cordonal démyélini-sante et sur son éventuelle signification. *Presse med.* 1951, 59, 1381—1383.
70. Moritsch H.: Durch Arthropoden übertragene Virusinfektionen des Zentralnervensystems in Europa. *Erg. inn. Med. Kinderheilk.* 1962, 17, 1—57.
71. Nakata K., Akamatsu T., Takoka S.: Histopathological study of encephalitis japonica in summer 1936. Takatsuki City. II. On roundlyshaped rarefaction foci of brain. *Acta Path. Jap.* 1957, 46, 432—433, (jap.).
72. Noetzel H.: Über die Rückbildung der Entzündung bei akuter Poliomyelitis. *Beitr. path. Anat.* 1957, 117, 337—342.
73. Noran H. H., Baker A. B.: Sequels of equine encephalomyelitis. *Arch. Neur. Psychiat. (Chic.)* 1943, 49, 398—413.
74. Ogata T., Miyake M., Takaki F.: Patho-histological findings of experimental epidemic encephalitis in monkey. *Tokyo Iji Shinsi*, 1938, 3074, 20—126, (jap. ed.)
75. Osetowska E., Wiśniewski H., Wróblewska-Mularczyk Z.: Topografia zmian tkankowych i umiejscowienie wirusa w kleszczowym zapaleniu mózgu. *Neuropat. polska*, 1965, 3, 35—47.
76. Osetowska E., Glawdzin N.: Possibilities and limits of morphologic diagnosis of rabies (*Encephalitis rabica*). *Polski Tygod. Lek.* 1963, 18, 726—738.
77. Peters G.: Über den Ausbreitungsbereich des Krankheitsvorganges im ZNS bei der Heine-Medinschen Krankheit. *Münch. med. Wschr.* 1938, 73—76.
78. Peters G.: Zur Anatomie der Poliomyelitis 1937—1938. *Med. Welt* 1938, 25, 875—879.
79. Pette H.: Die akut entzündlichen Erkrankungen des Nervensystems. G. Thieme, Leipzig, 1942.
80. Poursines Y.: Atteinte histologique des formations végétatives infundibulo-tubériennes dans la rage humaine. *C. R. Congr. Neurol. Int. Masson, Paris*, 1958, 3.
81. Propper-Grashtshenkow N. I.: Klinik und Histopathologie der Zeckenencephalitis. *Acta med. URSS.* 1940, 3, 202—212; *Ref. Zbl. ges. Neur.* 1941, 99, 681—682.
82. Robinson I. A., Sergeeva J. S.: On the localization of inflammatory modifications in spring-summer-meningo-encephalo-myelitis. *Nevropat.* 1940, 9, 31—37; *Ref. Zbl. ges. Neurol.* 1940, 97, 688—689.
83. Savenko S. N.: C. patologiceskoi anatomii cezonnove entefalite ne Bucovina. *Nevropat. i Psikhiat.* 1949, 18, 22—24.
84. Scharenberg K.: Pathology of poliomyelitis treated in respirator. *J. Neuropath. epx. Neur.* 1955, 14, 297—304.
85. Scheidegger S.: Chronische Verlaufsform der Poliomyelitis. *Arch. Psychiat. Z. Neurol.* 1964, 206, 180—184.
86. Seitelberger F.: Virusencephalitis und vegetatives Nervensystem. *Acta neuroveg.* 1964, 26, 494—509.
87. Seitelberger F.: Problem of spongy state. *Histopathology. Workshop on Brain Edema, Vienna Sept. 11—13, 1965.*

88. Seitelberger F., Jellinger K.: Frühjar-Sommer-Encephalomyelitis in Mitteleuropa. Bericht über verifizierte Beobachtung aus den Epidemien in Österreich. *Nervenarzt*. 1960, 31, 49—60.
89. Seitelberger F., Zischinsky H.: Rubeolen-Enzephalitis. *Münch. med. Wschr.* 1962, 104, 1681—1685.
90. Semenova, Tean-Sanskaja W. W., Shapoval A. N.: Patomorfologia kleschsche-wowo encefalita. *Itogi Sowj. med. w. Welikoj otetschestwnowoine* 1941—1945. 1949, 26, 146—162.
91. Sefer D. G., Polykovski M. G.: Frühling-Sommer-Encephalitis im Ural. *Zh. Nevropat.* 1940, 11, 16—21; *Ref. ges. Neurol.* 1940, 99—290.
92. Shapoval A. N.: Klescevoi entefalit (entefalomielit). *Medgkiz, Moskwa*, 1961.
93. Silber L. A., Soloviev V. D.: Far eastern tick-borne spring-summer (spring) encephalitis. *Am. Rev. Soviet. Med. suppl.* 1946, 6—80.
94. Shiraki H., Goto A., Narabayashi H.: Etat passé et présent de l'encephalomyélite japonaise au Japon. *Rev. Neur.* 1963, 108, 633—696.
95. Shiraki H., Otani S., Tamthal B., Chamuni A., Chitanondh H., Charuchinda S.: Rabies postvaccinal encephalomyelitis and genuine rabies in human beings. *Wld. Neurol.* 1962, 3, 125—148.
96. Shiraki H., Yamamoto T.: Eosinophilic inclusion bodies with especial reference to their histochemistry. *Proc. IV. Int. Congr. Neuropath. Thieme Stuttgart.* 1962, 1, 173—179.
97. Shiraki H.: Neuropathology of encephalitis Japonica with especial reference to the material of the great epidemic in 1948. *Saishin Igaku Tokyo*, 1962, 17, 1285—1311. (jap. edit.).
98. Simma K.: Zur Histopathologie der Heine-Medinschen Krankheit mit besonderer Berücksichtigung der Formatio reticularis des Hirnstammes. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1960, 181, 459—493.
99. Simma K.: Beitrag zur Kenntnis der Kleinhirnbefunde und der Histopathologie der Formation reticularis mesencephali bei der Heine-Medinschen Krankheit. *Psychiat. Neurol. Basel* 1961, 142, 201—218.
100. Smorodintsev A. A.: The spring summer tick-borne encephalitis. *Arch. Virusforsch.* 1940, 1, 468—480.
101. Smorodintsev A. A.: Tick-borne summer encephalitis. In: *Progress in Medical Virology*, Red. E. Berger, J. L. Melnick, Karger Basel-New York, 1958, 216—248.
102. Spatz H.: Encephalitis. *Hdb. d. Geisteskrankheiten*, Bd. XI. *Spez. Teil VII*, Springer, 1930, 157.
103. Steegman Th., Davis H. V.: Anoxic encephalopathy following poliomyelitis. *Arch. Neur. Psychiat. (Chic.)* 1950, 63, 774—789.
104. Suwa N.: Pathomorphology of encephalitis japonica. *Encephalitis japonica* 1948—49. *Probl. Comm. for Encephalitis jap.* 1950, 25—30 (jap. Ed.).
105. Tamalet J. Toga M., Vignoli R.: L'encéphalite verno-estivale russe expérimentale de la souris. *Ann. Inst. Pasteur.* 1961, 101, 259—269.
106. Tariska I.: Beitrag zur Pathogenese und Histopathologie der menschlichen Lyssa. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1941, 152, 133—152.
107. Toga M., Payan H., Orsini A., Bérard-Badier M.: A case of fulminant rabies. Distribution and significance of neurological lesions. In: *Encephalitides*, Elsevier, 1961, 67—72.
108. Tuthill C. R.: Untersuchungen zur Frage „chronische Poliomyelitis“. *Arch. Psychiat. Z. Neurol.* 1962, 203, 293—310.

109. Ule G.: Neuropathologische Aspekte klinischer Verlaufsformen der Heine-Medinschen Krankheit. *Internist* 1961, 2, 304—307.
110. Unterharnscheidt F., Bonin O.: Zur Neurovirulenzprüfung von Poliomyelitis-Lebensimpfstoffen. II. Pathomorphologie der Affenpoliomyelitis durch attenuierte Polioviren nach intralumbaler Injektion unter besonderer Berücksichtigung der Unterschiede zwischen den Virustypen. *Arch. Psychiat. Z. Neurol.* 1965, 206, 454—473.
111. Vizen E. M., Kniazev A. N.: A case of laboratory infection in man with the virus of tick encephalitis. *Zh. Nevropat. Psikhiat.* 1962, 62, 333—338.
112. Wake I., Matsukuma K.: Central nervous system changes due to circulatory disturbance in several meningoencephalitis. *Acta Path. Jap.* 1938, 28, 391—398.
113. Weil A., Breslich P.: Histopathology of central nervous system in North Dakota epidemic encephalitis. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1942, 1, 49—58.
114. Yamamoto T., Shiraki H., Hamad S.: Eosinophilic inclusion bodies in viral infections and non-infectious central nervous system disease with special reference to their histochemistry. *Symp. Cel. Chem.* 1962, 12, 159—182.
115. Zeitler F., Noetzel H.: Über die Beteiligung des Nucleus niger bei Poliomyelitis und das Vorkommen von Parkinson-Symptomen. *Beitr. path. Anat.* 1963, 128, 1—11.
116. Zimmerman H. M.: Pathology of Japanese B. encephalitis. *Amer. J. Path.* 1946, 22, 965—991.
117. Zischka-Konorsa W., Jellinger K., Hohenegger: Zur Pathogenese von Herpesviruserkrankungen mit besonderer Berücksichtigung der Meningoencephalitis herpetica. *Acta neuropath. Wien* (inm Druck).

#### ABBILDUNGSERLÄUTERUNGEN

Abb. 1. Heimische TBE (NI 75/58). Halsmark Typische Neuronophagie einer motorischen Vorderhornzelle. K. V. 560 x.

Abb. 2. Heimische TBE. A — Rp 395/63. Frontalrinde. Unregelmässiger, gelappter paranucleolärer Einschluss in bläschenförmig aufgetriebenem Kern einer Nervenzelle mit erheblicher Homogenisierung des Cytoplasmas. K. V. 2800 x. B, C — NI 75/58. Claustrum. Unregelmässige, teils bohnenförmige paranucleoläre Kerneinschlüsse in Nervenzellen mit eosinophiler Plasmahomogenisierung. H. E. 560 x (B); 1400 x (C).

Abb. 3. Protrahierte CSSR-TBE (Fall Bednar) — A, B. Kleinhirnrinde. „Cytophagien“ in geschwollenen Purkinjezellen. Einlagerung eines rundzelligen Gebildes im Plasma (B) HE 350 x und pseudovakuolige Umwandlung; (A) H.E. 560 x. C — Protrahierte heimische TBE (NI 119/61). Kleinhirnrinde. Einlagerung mehrerer kleiner Rundzellelemente im Plasma geschwollener Purkinjezellen. Vermehrung der Bergmannglia. K. V. 350 x.

Abb. 4. Protrahierte heimische TBE (rp 395/63 — A, B; A — Putamen. Perivassale Infiltrate aus Lymphocyten, grossen Plasmazellen und reichlich teils zweikeimigen Monocyten. H.E. 560 x. B — Grosshirnmeningen. Lockere Einstreuung von Lymphocyten, grossen, teils degenerierten Plasmazellen und vakuolisierten Makrophagen. H.E. 560 x. C — Protrahierte CSSR-TBE (Fall Bednar). Meningen occipital. Infiltrat aus Lymphocyten, Plasmazellen und grossen, teils mehrkernigen Monocyten mit starker Plasmaexsudation, K. V. 560 x.

Abb. 5. Heimische TBE. A — NI 75/58. Claustrum. Knötchenförmiges Gewebsinfiltrat aus polymorphen Histiocyten mit hellem rundlichen Kern, einzelnen Mikrogliazellen mit dunklen, länglichen Kernen und wenigen Plasmazellen. H.E. 560 x. B — NI 7/59. Substantia nigra. Dichtes knötchenförmiges Gewebsinfiltrat aus hellkernigen Histiocyten und einzelnen melaninbeladenen Makrophagen; nur spärlich länglich-kipfelförmige Mikrogliazellen. Intakte pigmenthaltige Nervenzell (x). K.V. 560 x. C — NI 75/58 Inselrinde. Lockeres, gefäßnahes knötchenförmiges Gewebsinfiltrat aus Histiocyten mit hellem rundlichovalem Kern ohne Fortsatzbildung und spärlich länglichen mikroglösen Stäbchenzellen mit stummelförmigen Fortsätzen. Hortega-Penfield 300 x. D — NI 75/58. Rückenmark-Vorderhorn. Im parenchymt-blössten Areal liegen nach Abgang der mesodermalen Elemente diffus proliferierte Mikrogliazellen und wenige plasmatische Astrozyten. K.V. 560 x.

Abb. 6. Heimische TBE (NI 119/61). Kleinhirnrinde — A, B; A — Locker-diffuse Infiltration um dilatierte, blutgefüllte Venolen in Purkinje und Molekularschicht. K.V. 130 x. B — Diffuses Ausschwärmen polymorpher hyperplastischer Histiocyten vermischt mit lockerer Bergmann-Gliawucherung in das leicht aufgelockerte Gewebe. Endothelschwellung. Hyperchrome Purkinjezelle (x). K.V. 320 x. C — Rp 395/63. Kleinhirnrinde. Reichlich Körnchenzellen mit umschriebener poröser Gewebsauflockerung in der Molekularschicht. Astroglia verschwunden. H.E. 360 x. D, E — Protrahierte CSSR-TBE (Fall Bednar). Kleinhirnrinde, D — Grobporöse Gewebsauflockerung in Molekularschicht mit spärlich Phagenzellen, einigen Mikroglia-kernen und pyknotischen Endothelzellen. H.E. 175 x. E — Rarefikationsnekrose mit schwerem Axonzerfall in Molekularschicht mit wenigen Mikroglia-kernen. Bodian 175 x.

Abb. 7. Heimische TBE (NI 119/61). A — Fokale Spongionekrose mit lockerem Gliafilament. Netzwerk, intakter Kapillare mit pyknotischen Endothelkernen (x x) einzelnen geschrumpften Nervenzellen (x) und vereinzelt Phagenzellen (xxx). K.V. 350 x. B — Spongiöser Herd, weitgehend zellentblösst mit einzelnen randständigen pyknotischen Nervenzellen und Mikroglia-kernen. K. V. 175 x. C — Orbitalrinde. Ausschnitt aus spongiösem Herd mit pyknotischen Nervenzellen und einzelnen Mikroglia-kernen. K.V. 250 x. D — Parietallappen. Ausgedehnte cystische, zellarme Rarefikationsnekrosen in tiefen Rindenschichten und subkortikalem Mark. Kleine Spongioseherdchen in mittlerer Rinde. Locker-fleckrörmige Mikroglia-wucherung. Geringe Infiltration der Meningealgefäße K.V. 40 x. E — Heimische TBE (?) — NI 140/62. Calcarinarinde. Reichlich kleine, zellarme Spongioseherde in mittleren und tieferen Rindenschichten. Rundzellsäume um Rindengefäße. K.V. 35 x.

Abb. 8. Akute heimische TBE (NI 94/61). Grosshirnmarklager — A, B; Fleckförmige Marklichtung im Bereich eines dichten knötchenförmigen Gewebsinfiltrats. Kl. Barera 560 x. (A); Kl. Barera 140 x (B). C. — CSSR-TBE (Fingerland 503/53). Dichtes saumförmiges perivasales Gliainfiltrat im Brückenfuß. H.E. 140 x. D, E — Heimische TBE (Rp 395/63). Pes pedunculi; D — Perivasales Rundzellaufbau mit zahlreichen diskontinuierlichen Axonaufreibungen (x). K.V. 220 x. E — Axonaufreibungen mit beginnender spongiöser Integration. K.V. 560 x.

Abb. 9. Heimische TBE; A — NI 114/63. Halsmark. Dichte Gefäß und Gewebsinfiltration in Vorder und Hinterhorn mit inkompletten Nervenzellausfall. Rundzellsäume um radiäre Markgefäße. K.V. 14 x. B — NI 75/58. Lumbalmark. Fleckförmige Gewebsinfiltrate mit partiellem Nervenzellausfall im Vorderhorn. K.V. 12 x.

Abb. 10. CSSR-TBE (Fingerland 503/53). Untere Olive. Zahlreiche knötchenförmige Gewebsinfiltrate und Gefäßsäume — A. K.V. 14 x. B — Heimische TBE (NI 97/64). Untere Olive. Dichte knötchenförmige Infiltrate mit Nervenzellausfall im Zellband.

Abb. 11. Heimische TBE (?) (NI 135/62). Brückenfußgrau. Dichte knötchen und schwadenförmige Gewebsinfiltrate in den Markformationen und Kernen mit Nervenzellausfall. K.V. 35 x.

Abb. 12. Heimische TBE (NI 114/63). Kleinhirnrinde. Geschlossene schwadenförmige dichte Infiltrate in Purkinje und Molekularschicht mit Neuronophagien bzw. Ausfall der Purkinjezellen. Starke Rundzellaufreibungen der Meningen mit Übergreifen auf intracerebrale Gefäße. K.V. 87 x.

Abb. 13. Heimische TBE. (NI 7/59). Brückenhaube. Knötchenförmige und grossfleckige Gewebsinfiltrate mit mässigem Nervenzellausfall in grosszelligen Retikulärkernen. K.V. 50 x.

Abb. 14. Heimische TBE (NI 7/59). Zona Compacta nigrae. Fleckförmige Gewebsinfiltrate mit Nervenzellausfall und Pigmentausstreuung neben intakten pigmenthaltigen Nervenzellen. K.V. 140 x.

Abb. 15. Heimische TBE. Nucl. paraventricularis; A — (NI 74/61). Gewebsauflockerung mit spärlicher interstitieller Infiltration. Entzündungsknötchen im Nucl. perifornicalis. K.V. 87 x. B — (NI 75/58). Intakter Parenchymbestand ohne entzündliche Läsionen. K.V. 52 x.

Abb. 16. Heimische TBE (NI 74/61). Nucl. tuberomamillaris. Dichte fleck- und knötchenförmige Gewebsinfiltrate mit Neuronophagien und Zellausfällen. K.V. 87 x.

Abb. 17. Heimische TBE (NI 119/61). Nucl. reticularis lat. thalami. Zahlreiche fleckförmige Gewebsinfiltrate mit Nervenzellausfällen, dichten Gefässäumen und diffuser interstitieller Infiltration. Nucl. lateralis thalami (rechts oben) nur gering betroffen. K.V. 68 x.

Abb. 18. Heimische TBE (?) — NI 135/62. Putamen. Zahlreiche knötchen- und fleckförmige und Gewebsinfiltrate und Gefässinfiltrate. K.V. 35 x.

Abb. 19. Heimische TBE (?) — NI 135/62. Claustrum-Inselrinde. Verstreute Entzündungsknötchen mit Nervenzellausfall. K.V. 87 x.

Abb. 20. Heimische TBE (NI 114/63). Frontobasalarinde. Gefäss- und locker knötchenförmiges Gewebsinfiltrat mit Neuronophagien und locker interstitieller Gewebsinfiltration in mittleren Rindenschichten — A. K.V. 87 x; CSSR-TBE (Fall Fingerland 77/55). Calcarinarinde. Verstreute Entzündungsknötchen mit Nervenzellverlust und locker interstitielle Infiltration — B. K.V. 140 x.

E. OSETOWSKA

## DIAGNOSTIC NEUROPATHOLOGIQUE D'ENCÉPHALITE À TIQUES EN POLOGNE \*

Institut de Neuropathologie, Académie Polonaise des Sciences, Varsovie

Malgré le progrès et les facilités d'examen virologique existent encore plusieurs circonstances où le diagnostic d'encéphalite à tiques s'appuie uniquement sur la vérification neuropathologique. Dans les conditions polonaises cette nécessité concerne surtout le matériel provenant du dedans de pays. Les petits hôpitaux provinciaux éloignés des stations virologiques, même en posant le diagnostic „d'encéphalite” ont dans l'examen *post mortem* un seul recours de le préciser. Nous avons dans notre archive neuropathologique trois cas reçus des régions du pays reconnues comme le foyer endémique d'encéphalite à tiques. Devant ce matériel de routine souvent incomplet et avec les données cliniques sommaires il se pose la question dans quelle mesure l'étude neuropathologique peut prétendre d'assurer le diagnostic étiologique. Cependant d'après nos connaissances il n'y a dans notre presse médicale aucun cas d'encéphalite à tiques où l'étude virologique et neuropathologique fut faite parallèlement. Nous présentons ci-dessous ces trois observations, dont une (le cas II-me) fut publiée dans la presse polonaise en 1962 (Osetowska, Gławdzin: *Neurol. Neuroch. Psych. Pol.* XII).

**Observation I** (PAN 63/64), date de l'automne 1963. Jeune homme âgé de 24 ans, habitant la région de Bydgoszcz, sans anamnèse familiale et personnelle, devient subitement malade. Après deux jours d'une malaise générale, il développe des maux de tête, un état fébril, des vomissements. Admis dans le service général le troisième jour dès le début d'affection, il présente le syndrome méningé et discrets signes de foyer à gauche. Dans le liquide céphalo-rachdien la pleiocytose 100, lymphocytaire. D'autres examens de laboratoire n'apportent pas de révélations notables. L'état du malade s'aggrave d'un jour à l'autre, il devient somnolent, ensuite comateux et meurt en 17-me jour de l'observation clinique.

\* Ce travail est exécuté avec le support de P. L. 480 U. S. Public Health Service, agrément 227793.



Le diagnostic clinique est celui d'encéphalite virale (sans examen). À l'autopsie générale on trouve la bronchopneumonie disséminée et l'hyperémie des organes internes. L'examen histologique sur les petites coupes: méningo-encéphalite lympho-plasmocytaire. Pour l'examen neuropathologique on a reçu le cerveau coupé transversalement, presque entier (à l'exception de petites coupes prises de l'écorce) fixé au formol. Technique: grandes coupes transversales de quatre niveaux cérébraux, coupes du tronc et du cervelet, de trois niveaux de la moëlle. Inclusion à la paraffine; colorations: Heidenhain, hématoxyline-éosine, crésil-violet. Sur le matériel congelé: colorations de Spielmeyer, Holzer et soudan III.

Topographie du processus: sur la coupe intéressant l'écorce frontale et le commencement des noyaux de la base, on note la présence des champs des infiltrations tissulaires sur le fond spongieux, situées dans plusieurs circonvolutions le long du ruban cortical. Dans l'axe blanc des circonvolutions il y a des infiltrats périvasculaires, qui se font plus rares vers le centre ovale. Les noyaux de la base: la tête du noyau caudé et le putamen sont, sur ce niveau, presque entièrement épargnés. Aux niveaux central et centro-pariétal les nécroses, couvertes par des infiltrations sont plus rares dans l'écorce, elles s'accumulent cependant dans le thalamus, spécialement dans les groupes médians et se prolongent en arrière jusqu'au pulvinar. Le putamen, le noyau caudé, le corps subthalamique du Luys, le corps géniculé latéral sont libres des lésions nécrotiques et infiltratives. Quelques importants infiltrats périvasculaires et des nécroses débutantes se voient dans le pallidum. Aussi dans la région retrolenticulaire et vers les noyaux du hypothalamus on marque l'accentuation des infiltrats périvasculaires. Dans la substance blanche les lésions inflammatoires se trouvent toujours dans la région souscorticale avec une diminution de l'atteinte vers le centre ovale. Dans l'écorce pariétale et occipitale il y a quelques discrets infiltrats autour de petits vaisseaux. Au niveau du mésencéphale, parmi les noyaux du pont on rencontre de nombreuses plages histio-glio-nécrotiques. Dans le bulbe l'atteinte s'accentue dans les circonvolutions olivaires sous forme des plages et des nodules micro-glio-histiocytaires. Au niveau du cervelet il y a des raréfactions spongieuses sans réaction cellulaire. Ces champs sont liés uniquement avec la couche moléculaire de l'écorce cérébelleuse. Dans la substance blanche du cervelet, dans les axes lamellaires et dans les circonvolutions du noyau dentelé on aperçoit des infiltrations intratisulaires diffuses et des nodules glio-histiocytaires semblables aux formations décrites dans le tronc cérébral. Vers la moëlle sousbulbaire le processus inflammatoire s'épuise. On y note encore quelques infiltrats périvasculaires très modestes, tandis que la moëlle thoracale et lumbale est entièrement intacte.

Structure du processus: elle est constituée par les nécroses infiltratives, par les infiltrats périvasculaires, les plages d'infiltration intratissulaire, les nodules mixtes et l'atteinte neuronale. Les nécroses corticales présentent une raréfaction spongieuse du tissu fondamental, couverte par une infiltration des lymphocytes, des histiocytes, parmi lesquels on peut presque toujours déceler un petit vaisseau aux parois plus ou moins désagrégées. Vers ce centre d'accumulation cellulaire afflue d'entourage la microglie en batonnêt, dispersée largement au delà des limites précises de la nécrose (fig. 1). Les nécroses situées au niveau thalamique diffèrent par la faible composante d'éléments hématogènes et la prévalence des corps granulo-graisseux, avec une surcharge visible des débris tissulaires (fig. 2). Les plages et les nodules intratissulaires diffèrent entre eux par les dimensions: les plages sont plus larges avec les limites moins précises (fig. 3). Les nodules beaucoup plus petits ont aussi la structure cellulaire plus compacte. La composition cellulaire est la même: la microglie, les histiocytes, les lymphocytes. On a l'impression que les deux formes de la réponse inflammatoire sont liées avec des vaisseaux — les nodules se voient exceptionnellement autour des neurones, le plus souvent ils sont collés aux vaisseaux capillaires. Les infiltrats périvasculaires concernent avant tout les veines et les venules, les artères sont atteintes plus rarement. Les vaisseaux sont entourés d'un halo d'imbibition sereuse couverte par les cellules infiltratives. Ces dernières — lymphocytes, plasmocytes, histiocytes et microgliales — passent des parois vasculaires dans le tissu d'entourage. L'atteinte neuronale est universelle, grave mais sans forme caractéristique, elle correspond aux altérations neuronales ischémiques, chroniques, homogènes et aux images de la tigrolyse plus ou moins évoluée. La topographie des lésions cellulaires est sans rapport direct avec la topographie des lésions d'ordre inflammatoire; l'atteinte neuronale est beaucoup plus généralisée. Un élément structurel spécial présentent les nécroses spongieuses de l'écorce cerebelleuse — ce sont des champs de raréfaction sans aucune réponse cellulaire. On ne les rencontre que dans cette localisation. La myéline subit une destruction secondaire en voisinage des vaisseaux sous l'influence de l'oedème et de l'imbibition sereuse intratissulaire.

Les réactions de la part de la microglie sont plus visibles que celles de l'astroglie. Le renforcement fibreux se voit uniquement dans les régions sousépendymaires et souspiales. Dans les méninges il y a une infiltration diffuse lympho-plasmo-histiocytaire avec quelques infiltrats plus denses autour des vaisseaux.

Observation II (PAN. N. 30/60). Jeune fille de 19 ans, elle travaille en été 1960 pendant quelques semaines comme ouvrière forestière

dans la région de Bydgoszcz. Subitement, en pleine santé, elle se plaint des maux de tête, elle a des vertiges et des vomissements. Admise dans le service des maladies infectieuses à l'hôpital de Bydgoszcz le 14.IX.1960 elle est déjà inconsciente. A l'examen d'entrée elle présente le syndrome méningé, le nystagme horizontal, la parésie du nerf VI gauche. Tous les reflexes à l'exception du reflexe achilléen gauche sont abolis. Les organes viscéraux sont sans changements notables. Les examens de laboratoire n'apportent pas de données caractéristiques. La pleiocytose 60, lymphocytaire. La malade meurt en état comateux en deuxième semaine d'observation clinique.

À l'autopsie générale on trouve une duodénite hémorragique, qu'on attribue à la thérapie corticoïde.

Pour l'examen neuropathologique on a reçu quelques fragments d'une hémisphère cérébrale avec un prélevement du pont et un du cervelet. Fixation au formol. Technique histologique: congélation; colorations: crésyl-violet, hématoxyline-éosine, soudan IV et par la méthode de Spielmeier.

Avec le matériel incomplet il était difficile de fixer la topographie exacte, cependant on a pu reconnaître la région frontale, pariétale, occipitale, le niveau thalamique des noyaux de la base, le cervelet avec l'écorce et le noyau dentelé, le pont.

Dans l'écorce frontale et centrale on voit les champs nécrotiques et infiltrés à la fois. La structure de ces nécroses est exctement superposable sur celle des foyers nécrotiques vus dans le cas I. On a seulement impression que dans le cas II la destruction tissulaire est plus grave et la participation de la microglie beaucoup plus abondante (fig. 4). Dans chaque foyer nécrotique on peut trouver le vaisseau central presque entièrement détruit. Vers la région pariéto-occipitale les nécroses corticales sont plus rares, par contre en entourage de beaucoup de vaisseaux on peut voir de petites hémorragies par diapédese (fig. 5). Dans le thalamus médian il y a plusieurs champs des nécroses semblables aux corticales mais avec une prévalence des caractères nécrotiques sur l'infiltration cellulaire (fig. 6). La participation des macrophages est assez considérable dans tous les foyers nécrotiques. Dans la coloration avec soudan IV on peut constater leur surcharge avec „la graisse” soudanophile. Dans la substance blanche on note une imbibition sereuse universelle avec rares et discrets infiltrats périvasculaires (fig. 7). Ils sont composés presque uniquement par des lymphocytes. On voit aussi de petites nécroses périvasculaires et des infiltrations discrètes dans les voies optiques. Au niveau du pont quelques plages des raréfactions avec la réaction cellulaire minime; dans la substance blanche du cervelet des plages infiltratives glio-histiocytaires,

avec quelques lymphocytes. Discrète infiltration diffuse dans les méninges. L'atteinte neuronale comme dans le cas I. Les niveaux mésencéphaliques, bulbaires et spinaux — manquent.

Observation III (PAN 158/62) concerne un homme âgé de 59 ans. L'observation clinique à l'hôpital des maladies infectieuses à Olsztyn (région Mazury) durait une semaine. Les données d'anamnèse manquent, le malade arriva dans le service déjà obnubilé.

L'image clinique correspondait au syndrome méningo-cérébral sans signes de foyer. Les organes viscéraux sans changements notables. Le liquide céphalo-rachdien: pleiocytose 413 avec 85% des leucocytes, protéines 0,75%, glucose 68 mg%, chlorures — 730 mg%.

À l'autopsie générale on ne trouve pas de changements caractéristiques. Le matériel reçu pour la vérification neuropathologique comprenait quelques morceaux de l'écorce, des noyaux de la base (sans thalamus), du cervelet et du tronc, fixés au formol.

Technique: inclusion à la paraffine, colorations: hématoxyline-éosine et avec la méthode de van Gieson.

Sur tous les niveaux corticaux obtenables il y a de petits infiltrats péricapillaires lymphocytaires, l'augmentation et le gonflement des endothélium et une raréfaction du tissu de soutien. Ces changements sont en général assez dispersés et dans l'écorce frontale l'atteinte est très discrète. Dans la région pariéto-occipitale on rencontre une accumulation de petites lésions péricapillaires lesquelles confluent en un champs de nécrose inflammatoire débutante (fig. 8). Les infiltrats beaucoup plus nombreux se voient dans la substance blanche où ils présentent les formes périvasculaires avec les transitions vers les plages intratissulaires (fig. 9) et les nodules mixtes. La participation de la microglie à côté des lymphocytes et plasmocytes est dans ce cas exprimée d'une façon très évidente. Une accentuation frappante du processus s'observe au niveau du tronc cérébral et du cervelet. Les plages infiltratives se trouvent parmi les noyaux du pont; les plages, les nodules et les infiltrats périvasculaires dans les circonvolutions d'olive inférieure et dans la substance blanche cerebelleuse avec une accumulation dans le noyau dentelé (fig. 10). Les altérations neuronales sont graves et universelles sur tous les niveaux. Dans l'écorce elles sont accompagnées par les raréfactions cellulaires dues aux changements simultanés de l'artériosclérose. Les noyaux de la base représentés dans le matériel uniquement par la tête du noyau caudé et le putamen montrent des atteintes neuronales, mais ils sont presque entièrement épargnés par le processus inflammatoire. L'infiltration des méninges est modérée, lymphohistiocytaire, diffuse.

## DISCUSSION

Ce que frappe dans ces trois cas, c'est d'abord l'uniformité de l'image clinique. L'âge adulte des malades, le début aigu (incertain mais probable dans le cas III), le syndrome générale méningo-encéphalitique — dès qu'on a exclu à l'examen microscopique l'infection bactérienne, l'encéphalite nécrosante aigüe et l'encéphalite du groupe parainfectieux allergique — ne laissent pas beaucoup de choix à côté de l'encéphalite à tiques. Cette probabilité est renforcée encore par la provenance géographique du matériel mentionnée déjà dans l'introduction. Les caractères cliniques facilitent aussi le diagnostic différentiel avec la poliomyélite antérieure aigüe, rapprochée surtout de formes radiculo-spinales d'encéphalite à tiques (Goralski 1961, Radl 1965, Migdalska-Kassurowa 1963, Borzuchowska, Jeżyna 1963, Vizen 1963, Belman 1963).

La topographie la plus typique d'encéphalite à tiques est connue pour les formes radiculaires et spinales (Grinschgl, Kovac, Seitelberger 1961, Jellinger, Kovac 1960). Mais avec la correction pour le matériel plus ample, elle présente aussi ces accentuations corticales, thalamiques, bulbaires et cerebelleuses (Seitelberger, Jellinger 1965), lesquelles s'imposent dans les observations présentées ci-dessus. Cette topographie est la plus typique dans le cas I, mais c'est uniquement dans ce cas qu'on disposait du cerveau et de la moëlle entière. Dans le cas II l'atteinte corticale et thalamique sont topographiquement typique; on n'y disposait pas de bulbe et seulement d'un fragment du cervelet. Le matériel du cas III-me est depourvu du thalamus, mais il donne une accentuation impressionnante des lésions au niveau du tronc et du cervelet.

Dans la structure du processus on peut énumérer d'après les auteurs mentionnés ci-dessus et d'après les études de Fingerland et Fortel (1961) et de Bednar (1955 et 1961): les infiltrats périvasculaires, les plages infiltratives, les nodules mixtes neuronophagiques, périvasculaires et indépendants des vaisseaux, les nécroses accompagnées des infiltrations et les nécroses spongieuses. La structure de processus jointe à la topographie constitue une image tissulaire assez typique pour permettre un diagnostic différentiel avec les autres encéphalites connues actuellement. Le moment le plus difficile: la différenciation entre l'encéphalite à tiques et la poliomyélite est, dans les cas en question, évitée, grâce à forme clinique. D'ailleurs Seitelberger et Jellinger (1965) ont montré les possibilités d'un diagnostic différentiel très subtil. Il reste quelques points mineurs concernant la composition cellulaire d'infiltrats et l'âge de certaines lésions aperçues dans notre matériel.

Notamment il s'agit de la participation de la microglie, laquelle nous semble très abondante et caractéristique et sur la présence de laquelle

Seitelberger et Jellinger, aussi que Bednar (1961) se prononcent avec les plus grandes réserves. Certes, il nous manque dans nos cas de vérification par l'imprégnation argentée, mais même sur les coupes de routine, les cellules en batonnêt présentent des caractères bien différents des endothèles progressifs (comparer surtout les figures 4 et 9). D'ailleurs dans certaines pièces de leur documentation Seitelberger et Jellinger (1965) reconnaissent aussi la présence de la microglie sur les images bien superposables aux nôtres. Il manque dans nos cas de vrais nodules neuronophagiques, cependant nous les avons vu aussi rarement dans notre matériel expérimental (Osetowska, Wiśniewski, Wróblewska 1965, Osetowska, Wróblewska 1965 et 1966).

L'âge des lésions est discutif en ce que concerne l'apparition des nécroses spongieuses pures. Seitelberger et Jellinger (1965) et Bednar (1961) les considèrent comme le symptôme régressif, réservé aux cas avec la survie prolongée. Elles apparaissent dans le cas I à l'évolution bien aiguë. Les nécroses semblables observées dans l'encéphalite Japonaise (Shiraki 1965) étaient notées aussi dans la phase aiguë.

Le matériel non vérifié virologiquement ne présente pas de base appropriée pour discuter le patho-mécanisme des lésions. Nous nous limiterons à une seule remarque. Il nous semble que l'image typique d'encéphalite à tique caractérisée par la coexistence des nécroses spongieuses avec des infiltrations hématogènes (on doit souligner que toutes ces structures: nécroses, plages, nodules, infiltrats périvasculaires, font l'impression des formes rapprochées, où, avec la prévalence d'imbibition sereuse ou d'infiltration cellulaire, on peut observer tous les degrés de transition d'une forme à l'autre) est due à l'atteinte primaire des parois vasculaires par lesquels les virus passent dans le cerveau en bouleversant dès le premier moment l'équilibre de la barrière hémato-encéphalique (Albrecht 1962). L'influence nocive sur les vaisseaux s'exprime par la transsudation sereuse immédiate et par les infiltrations secondaires. La réponse tissulaire frappante au niveau périvasculaire persiste minime au niveau des neurones où les virus s'accumulent ultérieurement (Osetowska, Wiśniewski, Wróblewska 1965). Cette dissociation entre la localisation du virus et la réponse cellulaire fait une différenciation fondamentale entre l'atteinte cérébrale dans l'encéphalite à tiques et la poliomyélite ou la rage.

Pour revenir à la question principale de notre étude on en peut résumer la réponse en conclusions suivantes: faute de mieux l'examen neuropathologique peut risquer le diagnostic étiologique. L'image tissulaire y permet d'éloigner toutes les encéphalites avec la clinique rapprochée, comme l'ENA, les réponses inflammatoires neuro-allergiques, les encé-

phalites bactériennes. Elle rend possible aussi le diagnostic différentiel subtil avec la poliomyélite et la rage à condition qu'on dispose du matériel cérébral et médullaire complet.

E. Osetowska

## DIAGNOSTYKA NEUROPATHOLOGICZNA KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MÓZGU W MATERIALE POLSKIM

### Streszczenie

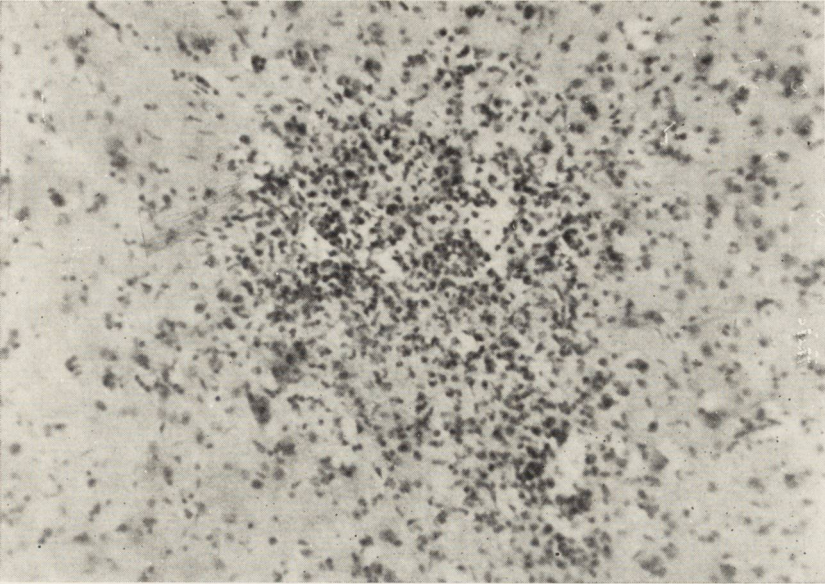
Pomimo postępu badań wirusologicznych w diagnostyce kleszczowego zapalenia mózgu nieraz jeszcze staje się wobec przypadków, w których jedyną możliwością weryfikacji etiologicznej przedstawia badanie neuropatologiczne. W polskim materiale kleszczowego zapalenia mózgu brak jest doniesień, w których materiał byłby opracowany równoległe klinicznie, wirusologicznie i neuropatologicznie. Autor przedstawia 3 przypadki rozpoznane wyłącznie neuropatologicznie, jako zapalenie kleszczowe. Przypadki dotyczą pacjentów w wieku 24, 19 i 59 lat. Przebieg kliniczny we wszystkich przypadkach był ostry, kilkunastodniowy, z zespołem oponowo-mózgowym, bez objawów ogniskowych. W badaniu mikroskopowym stwierdzono obecność nacieków rozlanych na martwiczym podłożu w korze mózgowej i we wzgórzu, nacieków okołonaczyniowych oraz grudek mikroglejowo-histiocytarnych i rozlanych nacieków śródkankowych — głównie w pniu mózgu i w mózdzku. Przeprowadzono porównanie zmian opisanych ze zmianami uznanymi w literaturze za typowe dla kleszczowego zapalenia mózgu. Zestawienie przemawia za uzasadnionym rozpoznaniem kleszczowego zapalenia w przypadkach przedstawionych oraz za możliwością postawienia rozpoznania etiologicznego w oparciu o obraz tkankowy uszkodzeń mózgu i topografię zmian.

Э. Осетовска

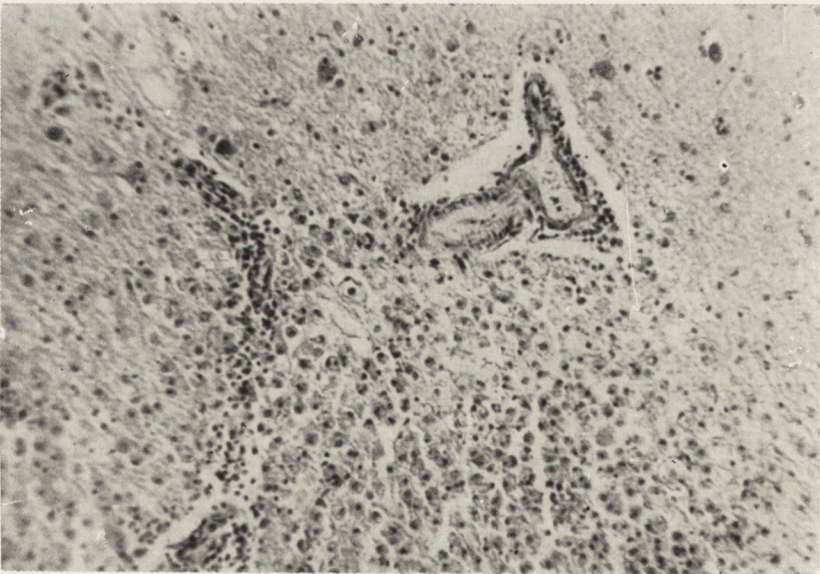
## НЕВРОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ПОЛЬСКОМ МАТЕРИАЛЕ

### Содержание

Несмотря на прогресс вирусологических исследований в диагностике клещевого энцефалита, все еще попадают случаи, в которых единственную возможность этиологической оценки случая создает neuropatologicкое исследование. В польском материале клещевого энцефалита отсутствуют донесения, в которых материал подвергался бы параллельной клинической вирусологической и neuropatologicческой обработке. В работе приводятся три случая диагностированных как клещевой энцефалит исключительно на основании neuropatologicческих данных. Это случаи больных в возрасте 24, 19 и 59 лет. Во всех случаях клиническое течение было острым, непродолжительным (несколько дней), и характеризовалось менингеально-мозговым синдромом без очаговых явлений. Микроскопическое исследование обнаружило наличие диффузных инфильтратов на

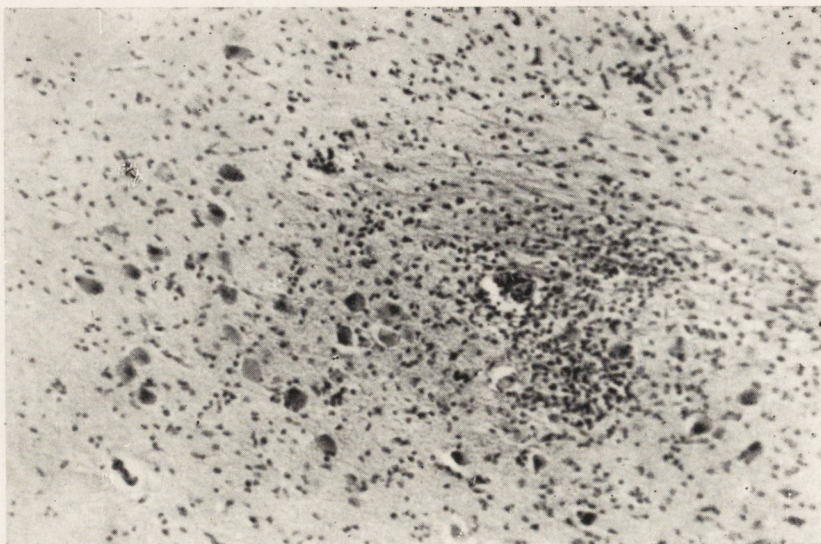


*Fig. 1.* Cas I. Nécrose intracorticale couverte par infiltration hémotogène — microglie affluant d'entourage. Congélation. Hématoxyline-éosine, agr. 150 x.

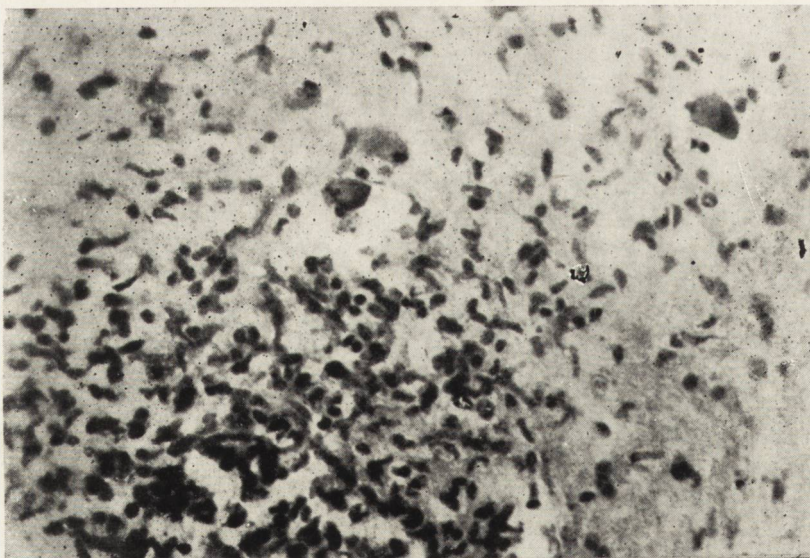


*Fig. 2.* Cas I. Nécrose intrathalamique remplie des macrophages. Paraffine. Hématoxyline-éosine, agr. 300 x.

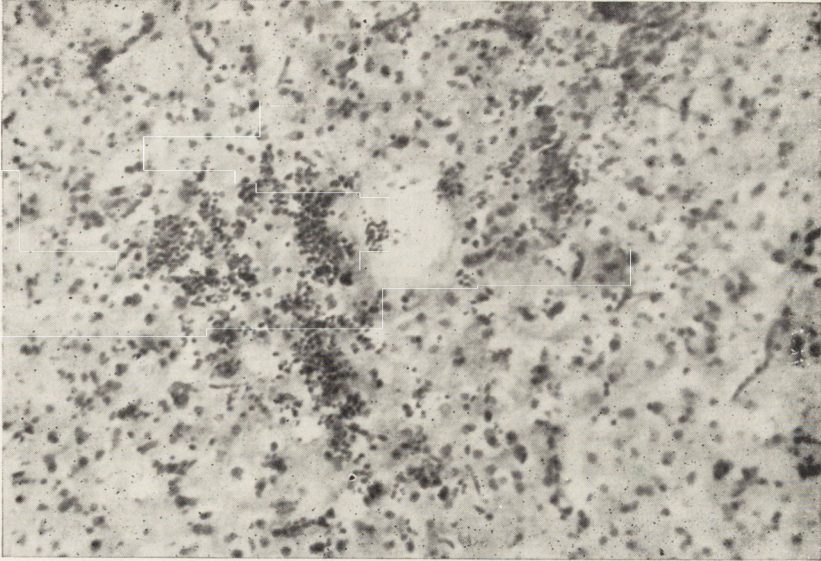




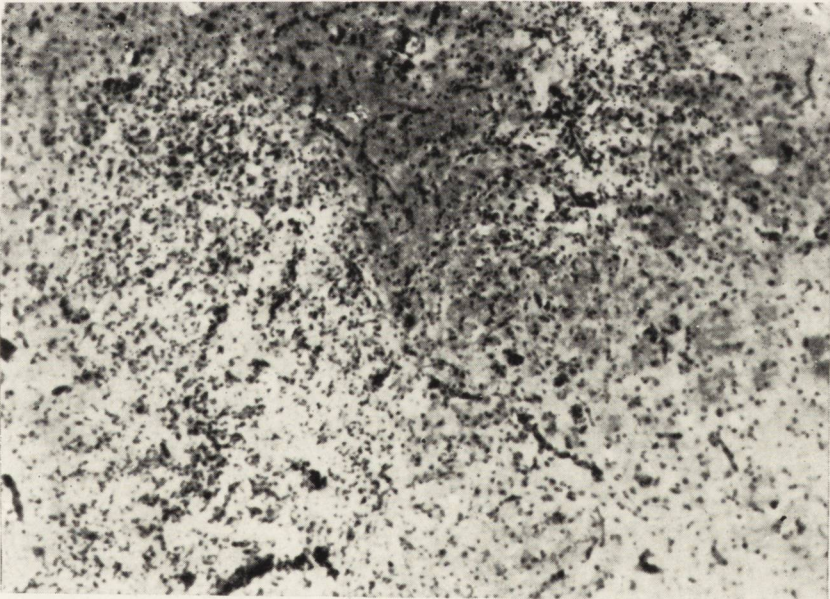
*Fig. 3.* Cas I. Plage infiltrative au niveau d'olive inférieure. Paraffine. Crésyl-violet, agr. 300 x.



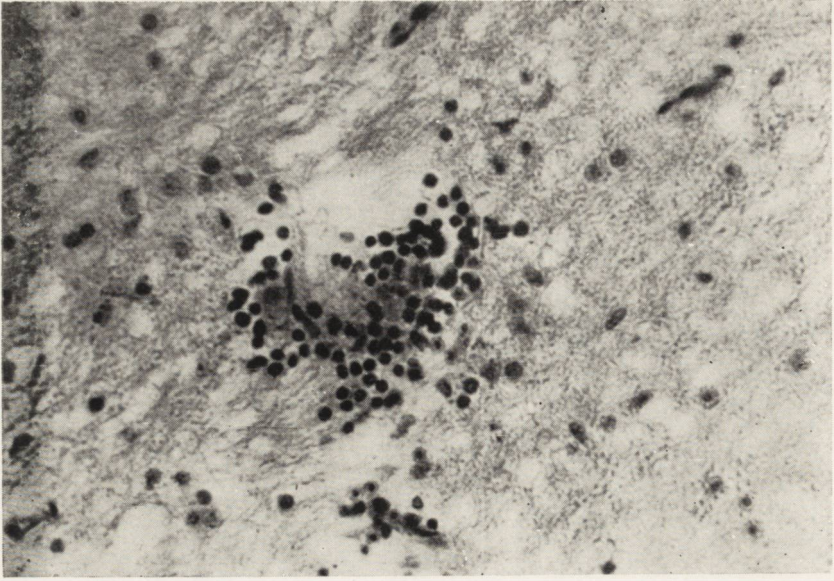
*Fig. 4.* Cas II. Nécrose intracorticale avec importante participation de microglie en batonnêt. Congélation. Hématoxyline-éosine, arg. 300 x.



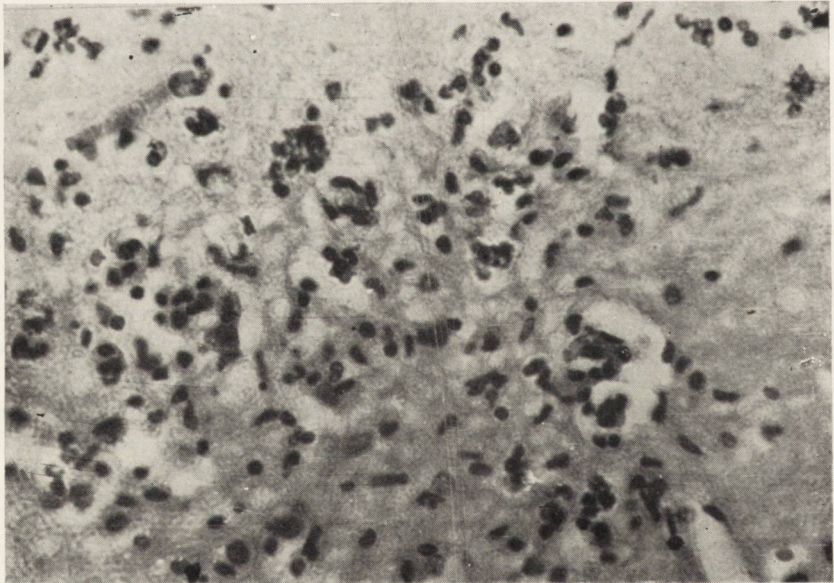
*Fig. 5.* Cas II. Hémorragies par diapédèse dans l'écorce. Congélation. Hématoxyline-éosine, agr. 300 x.



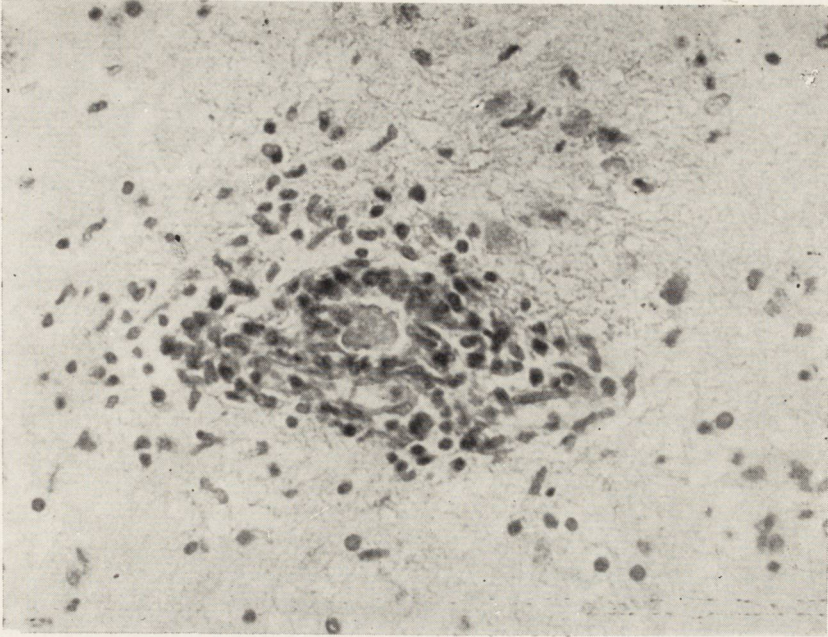
*Fig. 6.* Cas II. Nécroses inflammatoires au niveau du thalamus. Congélation. Spielmeyer, agr. 150 x.



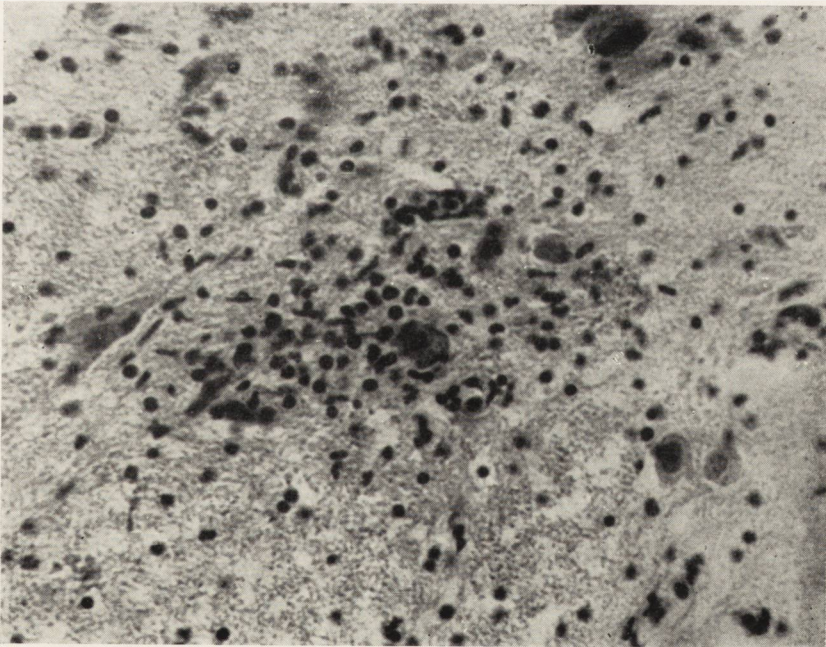
*Fig. 7.* Cas II. Discret infiltrat périvasculaire dans la substance blanche. Congélation. Hématoxyline-éosine, agr. 300 x.



*Fig. 8.* Cas III. Nécrose débutante dans l'écorce occipitale. Paraffine. Hématoxyline-éosine, agr. 300 x.



*Fig. 9.* Cas III. Infiltration périvasculaire au caractère transitoire à plage infiltrative dans la substance blanche. Paraffine. Hématoxyline-éosine, agr. 300 x.



*Fig. 10.* Cas III. Nodule mixte dans le noyau dentelé. Paraffine. Hématoxyline-éosine, agr. 450 x.

некротической основе в коре головного мозга и в таламусе, параваскулярных инфильтратов и микроглиево-гистиоцитарных комков и диффузных внутри-тканевых инфильтратов — главным образом в мозговом стволе и мозжечке. Проводилось сравнение наблюдаемых изменений с типичными для клещевого энцефалита изменениями по литературе. Это сопоставление обосновывает диагноз клещевого энцефалита в представленных случаях и указывает на возможность постановки этиологического диагноза на основании мозга и топографии изменений.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Albrecht P.: Pathogenesis of experimental infection with tick-borne encephalitis virus. Biology of viruses of the tick-borne encephalitis complex. Symposia CSAV. Praha 1962, 247—257.
2. Bednar B.: Diagnostic postmortel des encéphalites aiguës en prenant surtout en considération l'encéphalite à tiques. Zbl. Neurol. 1955, 134, 10.
3. Bednar B.: Tick-borne encephalitis with a protracted course. Encephalitides. Elsevier. Amsterdam 1961, 17—22.
4. Belman Ch. L.: Woprosy lokalizacji w klinice kleszczowego encefalita. Ż. Niewropat. Psych. 1963, 63, 1670—1672.
5. Borzuchowska A. Jeżyna Cz.: Przypadek kleszczowego zapalenia mózgu. Przegląd Lek. 1963, 19, 195—197.
6. Fingerland A., Vortel V.: Tick-encephalitis. Encephalitides. Elsevier. Amsterdam 1961, 23—32.
7. Goralski H.: Une épidémie d'encéphalite à tiques en Pologne. Wrld. Neurol. 1961, 2, 336—342.
8. Grinschgl G. Kovac W. Seitelberger F.: Spring-summer encephalitis in Austria. Encephalitides. Elsevier. Amsterdam 1961, 3—16.
9. Jellinger K., Kovac W.: Beitrag zur Neuropathologie der Frühsommer-Meningoencephalomyelitis. Path. Microbiol. 1960, 23, 375—392.
10. Migdalska-Kassurova B.: Kleszczowe zapalenie mózgu z omówieniem 16 własnych przypadków. Przegl. Epidem. 1963, 17, 277—286.
11. Osetowska E., Wiśniewski H., Wróblewska-Mularczyk Z.: Topografia zmian tkankowych a umiejscowienie wirusa w kleszczowym zapaleniu mózgu. Neuropatologia Polska. 1965, III, 35—48.
12. Osetowska E., Wróblewska-Mularczyk Z.: Neuropatologia kleszczowego zapalenia mózgu: obraz mózgu po zakażeniu domózgowym myszy dorosłej. Neuropatologia Polska. 1965, III, 231—244.
13. Osetowska E., Wróblewska-Mularczyk Z.: Neuropatologia doświadczalnego zapalenia kleszczowego mózgu; obraz mózgu u myszy dorosłych i oseków po zakażeniu obwodowym. Neuropat. Pol. 1966, IV, 63—82.

14. Radl H.: Entzündliche Erkrankungen des Zentralnervensystems in den letzten Jahren. Münch. Med. Wschr. 1965, 107, 2232—2238.
15. Seitelberger F., Jellinger K.: Frühjahr-Sommer-Encephalomyelitis in Mitteleuropa. Nervenarzt. 1960, 31, 49—60.
16. Seitelberger F., Jellinger K.: Neuropathologie der Zeckencephalitis. II Colloquium on Encephalitides. Varsovie, 1965. Neuropat. Pol. 1966, 3—4, en presse.
17. Shiraki H.: The neuropathology of Encephalitis Japonica in humans especially from subacute to chronic stage. II Colloquium on Encephalitides. Varsovie 1965. Neuropatol. Pol. 1966, 3—4, en presse.
18. Vizen E. M.: Ob atypicznych formach kleszczewego encefalita. Ż. Niewropat. Psych. 1963, 63, 1462—1467.

M. WENDER

A CASE OF ENCEPHALITIS WITH PATHOLOGICAL FEATURES  
OF THE SPRING-SUMMER AND ACUTE DISSEMINATED  
ENCEPHALITIS

Department of Neurology, Medical Academy, Poznań (Poland)

This paper deals with a case of encephalitis, which in our opinion has a pathological feature of the spring-summer and acute disseminated encephalitis. Unfortunately the infectious agent could not be identified. Nevertheless, evaluation of the pathological picture in the light of the clinical data of that case may give some opportunities to discuss the problem of demyelination in the encephalitic process.

**History:** The patient, a 31 years old man. The familial history as well as his past personal history revealed nothing of importance. It was not possible to establish a contact with an infectious agent.

His disease begun, 9 days before admission to the clinic; with a slight fever and with a feeling of general weakness. On the third day of illness the fever rose to about 39°C. On the following day there appeared a diplopia, right palpebral ptosis, speech and swallowing difficulties. The patient's general condition deteriorated quickly, he become cyanotic, had severe respiratory troubles, was disorientated, later comatose.

He was admitted to the Department of Neurology, Medical Academy in Poznań in a state of coma and with severe breathing difficulties. Neurological examination revealed, paresis of the IIIrd, central paresis of VIIth, and paresis of the IXth and Xth cranial nerves. The pulse was between 130 and 160 per minute. The leucocyte count in the blood was 20 800/cu mm, 83% of which were polymorph, with a marked shift to the left. The ESR was 4 mm in 1 hour. A chest X-ray showed right paresis of the diaphragma.

During the following hours, the state of his consciousness has slightly improved, but breathing insufficiency was progressing, leading to death within the first day of his stay in the clinic.

**Autopsy:** General autopsy revealed signs of a cerebral death. From other important abnormalities a severe coronal sclerosis was found. The

external aspect of the brain showed an oedema with convolitional flattening and a slight herniation notch. The meninges were severely hyperaemic. On coronal sections the white and grey matter of the brain was hyperaemic. In the neighbourhood of lateral ventricels were visible some small foci of fine reddish colour. The macroscopical aspect of the cerebellum and of cerebral trunk appeared normal.

An attempt to isolate a virus give the negative results.

**Histological examination.** Technics (441) O. E. (Department of Neurology, Poznań). The celoidine slides were stained by Woelcke, Nissl and hematoxyline-eosine methods, the frozen sections were stained by sudan IVth, and Holzer methods.

**Topography of the pathological process.** In sections of the frontal lobe, stained by the Woelcke method there was established a slight enlargement of Virchow-Robin spaces. The Nissl stained slides exhibited a dispersed slight perivascular reaction, intensified at the grey — white matter border. Some perivascular spaces showed the presence of extravasated red blood cells. The cortical cytoarchitectonic was preserved, but the singular nerve cells were degenerated. In the frontal sections, prepared by the Woelcke method, passing through the mammilar body, in the corpus callosum there was visible in some places a perivascular demyelination. A focus of demyelination was present in the neighbourhood of the temporal ventricle horn at the base of gyrus rectus. In the region of basal nuclei there was observed a slight perivascular palor of the myelin.

The slides, stained with cytological methods, demonstrate in the corpus callosum strong perivascular infiltrations and diffuse glial proliferation. These changes are intensified in the neighbourhood of the ventricle lumen. Severe perivascular infiltrations were present in the insular cortex and in the cingular gyrus, at the border between the grey and white matter especially. In the whole cerebral centrum semiovale, there were found dispersed mild infiltrations around the vessels, including some capillaries. This reaction becomes much more stronger around the veins in the neighbourhood of the ventricle temporal horn. A marked perivascular, partly confluent infiltrations, with glial reaction was found in the thalamus and in the medial part of the nucleus basilaris. The putamen showed enlarged Virchow-Robin spaces with serous transudates. In the palidum and putamen there were scattered mild perivascular cuffs. The inflammatory signs were strong also in the leptomeninges. The focus of demyelination above the inferior ventricle horn, visible in the slides stained by the Woelcke method, exhibited a prominent perivascular and



glial reaction, as well as a presence of abundant compound granular corpuscles situated mainly around the vessels. Neuronal destruction paralleled the severity of the infiltrations.

On sections leading through the occipital lobe, stained by the method of Woelcke, there was visible in the neighbourhood of the posterior ventricle horn a relatively sharply limited focus of demyelination. Within it there were preserved some myelin fibres both singular and in the form of small islets. Above the described area there was present a focus of confluent perivenous demyelination. In the whole centrum semiovale some of the vessels demonstrate an enlargement of the Virchow-Robin spaces pushing aside the adjacent nerve fibres.

The slides stained by cytological methods showed within the above mentioned region of demyelination the presence of marked perivascular infiltrations, with diffuse glia proliferation and many compound granular corpuscles.

Around the periventricular veins there were severe inflammatory cuffs. The ventricular ependyma cell layer was in some segments interrupted. The white matter showed some cellular infiltrations around the capillaries and greater vessels and in some places an increase of glia concentration was notable. A part of subcortical vessels demonstrate the presence of red cells in the enlarged Virchow-Robin spaces. The occipital cortex did not reveal any significant inflammatory signs. The leptomeninges were slightly infiltrated and small amounts of blood pigment were visible. The superior occipital gyrus showed in the meninges and in the cortical grey matter a small calcic deposit.

Slides of the cerebellum stained by the method of Woelcke demonstrated a slight diffuse pallor of the central parts of cerebellar white matter, and an enlargement of the Virchow-Robin spaces.

Cellular stains showed marked infiltrations in the leptomeninges, as well as intense perivascular cuffings. A diffuse or nodular glial reaction was observed in the dentate and other cerebellar nuclei and dispersed inflammatory signs were evident in the whole cerebellar white and grey matter. Many nerve cells of the cerebellar nuclei and singular Purkinje cells exhibited degenerative changes.

Slides of the midbrain prepared after the method of Woelcke, revealed no demyelination, cytological stains however showed severe inflammatory lesions in the tegmentum. There was a dense perivascular and interstitial infiltration in the neighbourhood of the aqueduct, with a comprehensible predilection to the grey matter. In the tegmentum there was the damage and loss of ganglion cells, but without any direct relation to the intensity of infiltrative changes.

Myelin sections of the pons revealed no significant changes. In the cellular slides, there were visible numerous inflammatory nodules and vascular infiltrations in the dorso-lateral part of the pons, especially in its grey nuclei. In the pons, just beneath of the fourth ventricle, there also were found serous perivascular transudates and marked petechiae. Extravasated red cells were also present in the basilar part of the pons. A dispersed damage of nerve cells could be evidenced in the vicinity of infiltrates but without a direct connection to the intensity of inflammatory process.

The sections of medulla stained by the Woelcke method did not exhibit any demyelination. The slides stained by the Nissl and hematoxyline-eosine methods revealed marked inflammatory signs (perivascular infiltrations and nodular and diffuse glial proliferation) distributed over the whole section, with a notable domination of those changes in the grey structures. A neuronal damage was observed not only in the vicinity of areas affected strongly by inflammatory changes, but also in other parts of medulla.

The leptomeninges of the cerebral trunk were severely infiltrated mainly around the vessels.

The spinal cord was not examined.

**Structure of pathological process.** The structure of the found pathological process affecting in a multifocal way predominantly the grey matter, is that of an encephalitic syndrome, including infiltrative, proliferative and degenerative changes, as follows.

The perivascular infiltration consists of lymphocytes, plasmocytes and polymorphic histiocytes and in some regions of the cerebellum also of leucocytes. These changes confine mainly to the medium sized and small vessels and in the periventricular regions also to the great veins. The infiltrations are partly restricted to the adventitious spaces, and partly involved also the nervous parenchyma around the vessels.

The nodulous and diffuse infiltrations comprise mainly of the polymorphic histiocytes, micro- and oligodendroglia cells, and few lymphocytes and plasmocytes. Some nodules are situated around the vessels, the other are not clearly related to the vascular system. The nerve cells inside of inflammatory nodules are severely degenerated and some phagocytosis may be seen.

The dispersed damage of neurocytes is not clearly related to the inflammatory process.

The diffuse and perivascular infiltrations in the leptomeninges comprise lymphocytes, plasmocytes and histiocytes.

The second, though probably not unrelated pathological process, is the perivenous and patchy demyelination in the vicinity of the ventricular system. In the areas of demyelination there are present: a diffuse gliosis, severe perivascular infiltrations consisting both of lymphocytes and plasmocytes and abundant compound granular corpuscles.

The destruction of myelin is brought about by the mobile glia to the stage of sudano-positive deposits.

In the demyelinated areas the Holzer stain does not reveal fibrillary gliosis, which would be worth mentioning.

#### DISCUSSION

As the attempts of isolation of an infectious agent proved negative, any discussion as to the differential diagnosis must obviously be restricted to the pathological picture of the lesions.

The presented case demonstrates first of all a morphological syndrome of multifocal polioencephalitis with meningeal involvement. The distribution of the inflammatory process is characterized by lesions dominating in the grey matter of the brain stem, in cerebellar nuclei, in the thalamus and insular cortex. The whole cerebellar white and grey matter is also markedly involved. The patchy inflammation in the telencephalon with the above mentioned exception is very mild.

This pathological picture corresponds well to that one, described in spring-summer encephalitis. From other actual polioencephalitides occurring in Central Europe only poliomyelitis (Heine-Medin disease) may give a similar morphological picture.

The very problem of differential diagnosis, based on morphological aspects, between the spring-summer encephalitis and poliomyelitis is worth discussing.

Seitelberger and Jellinger (1960) emphasize the opinion, that there are not only topographical but also qualitative differences between these two viral infectious; the tissue reaction in spring-summer encephalitis concerns predominantly mesenchymal elements, while in poliomyelitis microglia constitutes the major component of inflammatory reaction. Simma is opposing this view contending that in the very acute cases of poliomyelitis the inflammatory process may involve, also diffusely, the telencephalon as well as the whole cerebellar cortex. Concerning the qualitative differences in tissue reaction Simma (1960) drew attention to the age differences of patients which usually develop these illnesses. Van Bogaert (1961) also sees great difficulties in differential diagnosing of the viral polioencephalitides. According to Bednar (1955) and

Grinschgl (1955 and 1957) the individual differences in the tissue reaction and in the topographical distribution of the spring-summer encephalitis signs are very conspicuous, and this renders the problem of differential diagnosis of this infections very uncertain.

This is why it can only be said, although in the presented case the pathological picture might suggest the spring-summer encephalitis that the causal agent was a nearer nonspecified virus.

However besides the polioencephalitic symptom complex the presented case revealed also the presence of another process i.e. the patchy and perivenous demyelination. The first, found in the vicinity of the ventricle system, strikingly resembled demyelination plaques of the acute disseminated encephalitis i.e. acute multiple sclerosis.

These demyelination plaques, although all of them were fresh, demonstrate the symptoms which proved that they did not appear exactly at the same time.

Therefore, it should be assumed, that in the demonstrated case, we had to deal with a complex pathological process, provoked by an infectious agent, very probably by a virus.

In the literature there are reports about a coincidence of multiple sclerosis and epidemic encephalitis (Kufs, v. Weizsäcken), or multiple sclerosis and poliomyelitis (Wohlwill). But the history of the disease in our case demonstrates an acute course of the disease, and in the past history there is nothing to find, which would indicate a relapse of multiple sclerosis. It should be also emphasized, that the structure of infiltrations in the demyelination foci does not significantly differ from that found in the grey matter.

The nodular infiltration of the grey matter is symptomatic for viral processes, but the demyelination observed in our case, should be explained only by a more complex pathogenesis. It may be assumed, that in some rare cases the virus infection, provokes immunological mechanisms which, due to a hyperergic reaction, bring about demyelination resembling the destruction of myelin found in disseminated encephalitis i.e. acute multiple sclerosis.

M. Wender

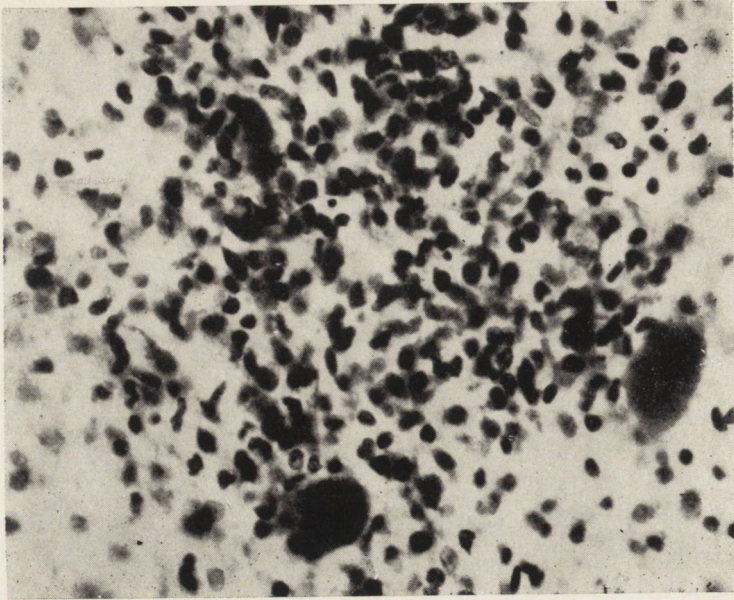
PRZYPADK ZAPALENIA MÓZGU Z OBRAZEM PATOLOGICZNYM  
PRZYPOMINAJĄCYM WIOSENNO-LETNIE I OSTRE ROZSIANE ZAPALENIE  
MÓZGU

Streszczenie

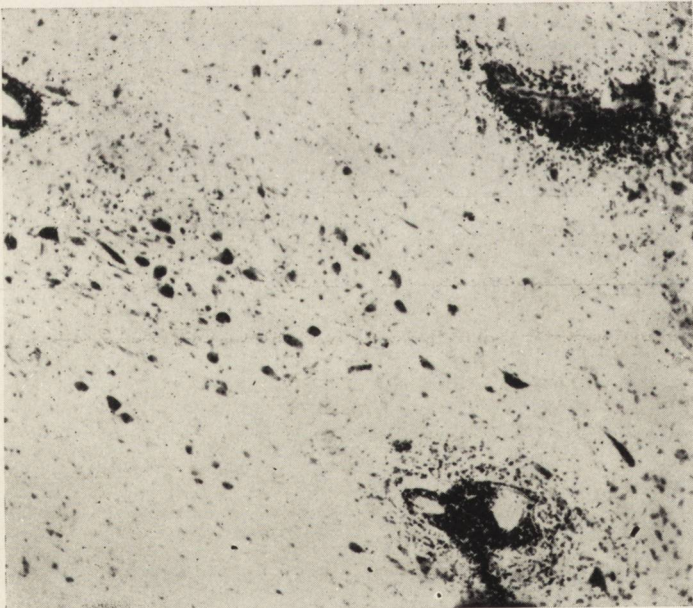
Przypadek dotyczył 31-letniego mężczyzny, u którego wystąpiły objawy ostrej infekcji z towarzyszącymi objawami rozlanego zapalenia mózgu (porażenie nerwów:



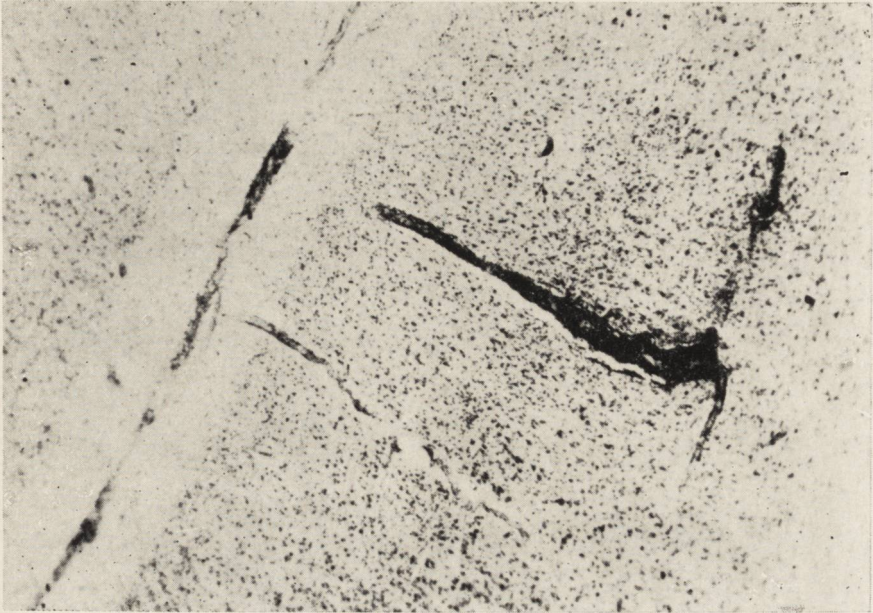
**Fig. 1.** Diagram of topical distribution of the inflammatory reaction; (A schema according to J. Radermecker; *Systématique et électroencéphalographie des encéphalites et encéphalopathies*, Masson & Cie, Paris, 1956).



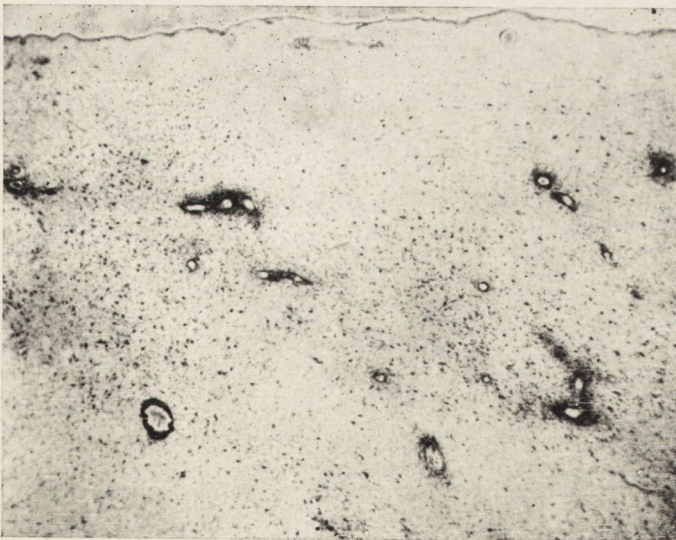
*Fig. 2.* The nodulous infiltrates in the nucleus dentatus, comprised of the polymorphic histiocytes, micro- and oligodendroglia cells, and of a few lymphocytes and plasmocytes. Nissl staining,  $\times 360$ .



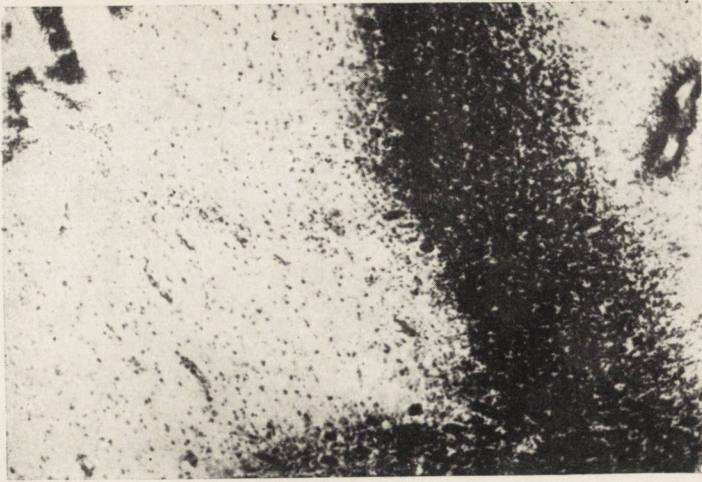
*Fig. 3.* Inflammatory reaction in the medulla. Nissl staining,  $\times 80$ .



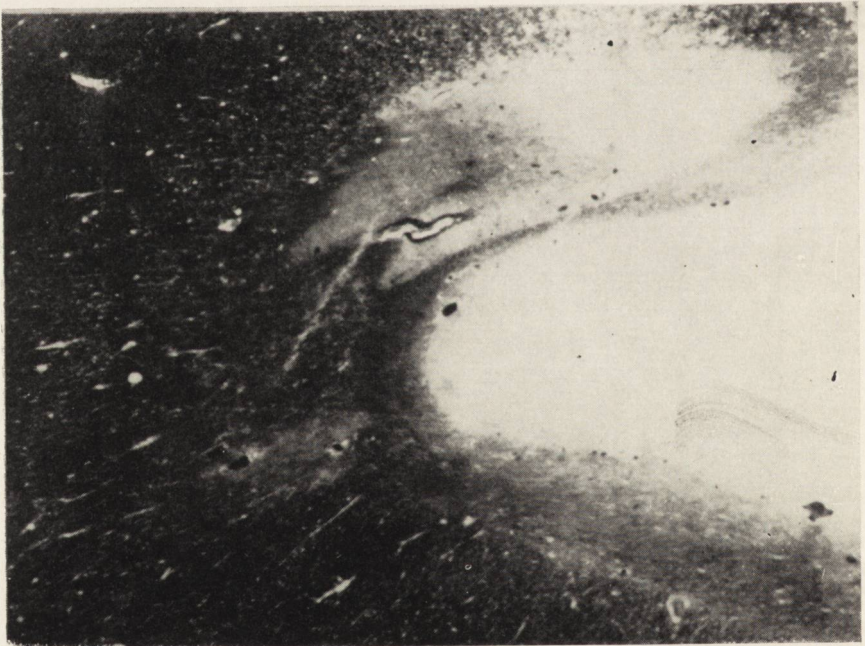
*Fig. 4.* Perivascular infiltrations in the meninges and in the cortex of the insula. Nissl staining,  $\times 40$ .



*Fig. 5.* Important inflammatory activity in the thalamus. Nissl staining,  $\times 20$ .

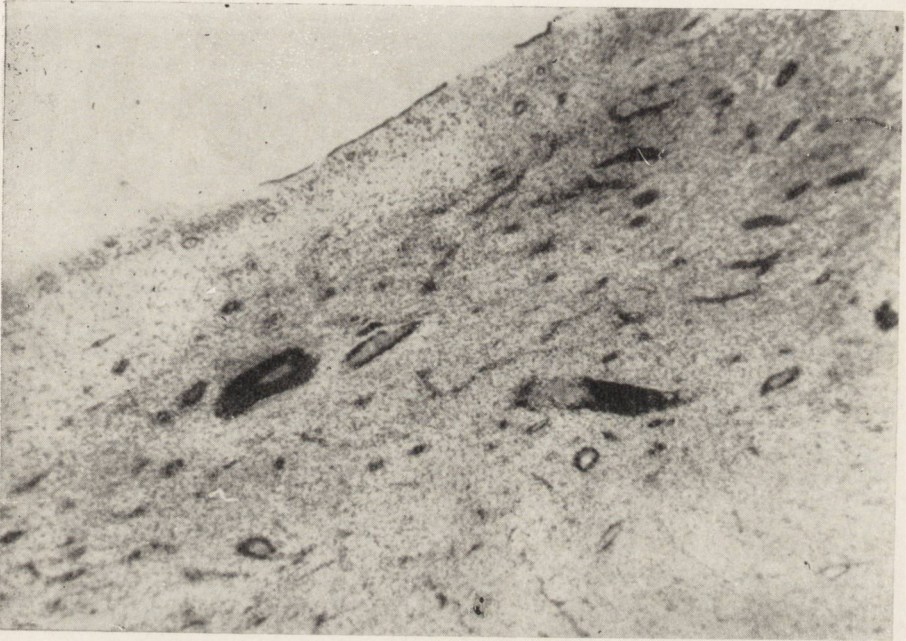


**Fig. 6.** Inflammatory reaction in the cerebellar cortex (vermis). Nissl staining,  $\times 30$ .

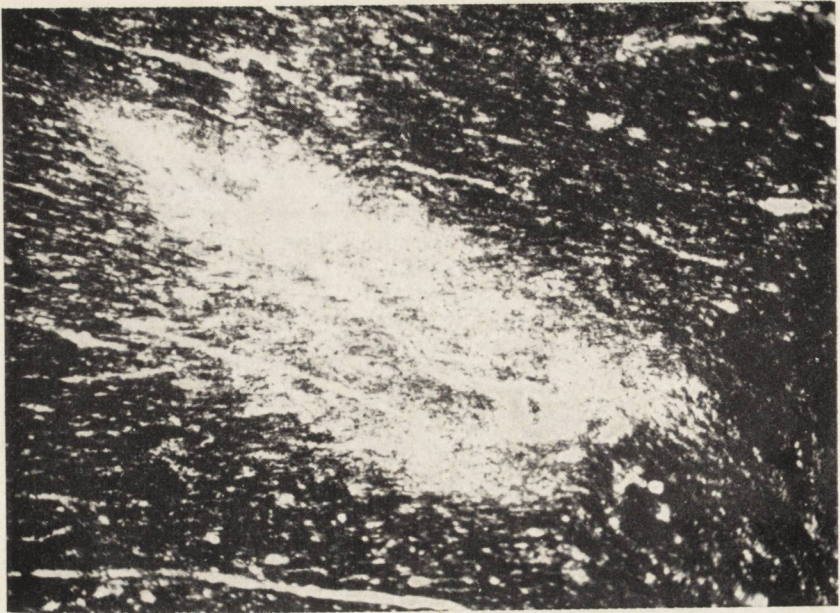


**Fig. 7.** Focus of demyelination in the neighbourhood of the posterior ventricle horn. Above, a smaller focus of confluent perivenous demyelination. Woelcke staining,  $\times 20$ .

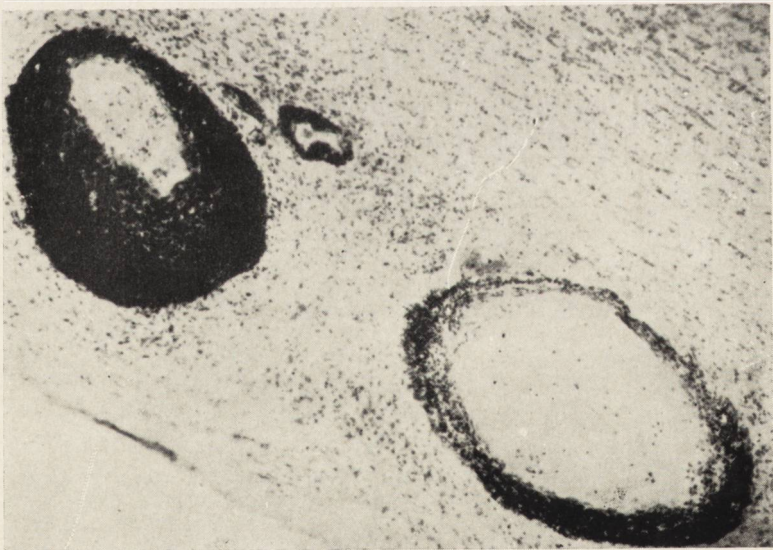




*Fig. 8.* Perivascular infiltrations and glia proliferation inside the focus of demyelination presented in Figure 7. Nissl staining,  $\times 40$ .



*Fig. 9.* Perivascular demyelination in white matter of the occipital lobe. Weelcke staining,  $\times 80$ .



*Fig. 10.* Massive inflammatory cuffs around the subependymal veins in the corpus callosum. Nissl staining,  $\times 80$ .

III, IV, VI, IX, X). W okresie zejściowym wystąpiły zaburzenia oddechowe i śpiączka. Chory zmarł w 10 dniu choroby wśród objawów narastającej niewydolności oddechowej.

Badanie mikroskopowe wykazało masywne zmiany zapalne w oponach i w mózgu, z przewagą uszkodzeń w istocie szarej. Topografia i struktura zmian zapalnych przypominała obraz wiosenno-letniego zapalenia mózgu i rdzenia.

Ponadto stwierdzało się współistnienie drugiej grupy zmian morfologicznych polegających na obecności ognisk demielinizacji w istocie białej, zlokalizowanych głównie w okolicy przykomorowej. Struktura nacieków w ogniskach zdemielinizowanych nie różniła się zasadniczo od obrazu procesu zapalnego w istocie szarej. Badanie wirusologiczne wypadło ujemnie.

Założenie, że proces demielinizacyjny jest niezależny od zmian zapalnych, o przeważającym umiejscowieniu w istocie szarej, wydaje się sztuczne. Autor przypuszcza, że możliwe jest wspólne źródło etiologiczne (wirus) obu procesów. Czynniki ten wywoływał zapalenie istoty szarej mózgu, wyzwalając jednocześnie odczyn hyperergiczny prowadzący do zmian demielinizacyjnych, podobnie jak ma to miejsce w ostrym rozsianym zapaleniu mózgu i rdzenia.

М. Вендер

### СЛУЧАЙ ЭНЦЕФАЛИТА С ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНОЙ, НАПОМИНАЮЩЕЙ ВЕСЕННЕ-ЛЕТНИЙ И ОСТРЫЙ ДИССЕМИНИРОВАННЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ

#### Содержание

Представлен случай 31-летнего мужчины, у которого наблюдались явления острой инфекции с сопутствующими явлениями диссеминированного энцефалита (паралич нервов III, IV, VI, IX, X). В терминальном периоде появились расстройства дыхания и кома. Больной умер на 10-том дне болезни при явлениях прогрессирующей респираторной недостаточности. Микроскопическое исследование обнаружило сплошные воспалительные изменения в мозговых оболочках и в мозге, с преобладанием повреждений в сером веществе. Топография и структура воспалительных явлений напоминала картину весенне-летнего энцефалита и миелита.

Кроме того наблюдалось сочетание второй группы морфологических изменений, заключающихся в наличии очагов демиелинизации в белом веществе, локализованных главным образом в паравентрикулярной области.

Структура инфильтратов в демиелинизированных очагах не отличалась в основном от картины воспалительного процесса в сером веществе. Вирусологическое исследование оказалось негативным.

Предпосылка, что демиелинизационный процесс является независимым от воспалительных явлений с преобладающей локализацией в сером веществе не находит обоснования. По этой причине, высказывается предположение, что возможно существование общего, этиологического источника (вирус) для обоих процессов. Этот фактор вызывал воспаление серого мозгового вещества, способствуя одновременно развитию гиперэрической реакции, приводящей к демиелинизационным изменениям, аналогично как это наблюдается в остром диссеминированном энцефалите и миелите.

## REFERENCES

1. Baker, A.: Western equine encephalitis. *Encephalitides*, Elsevier Publ., Amsterdam, 1961, 33—37.
2. Bednář, B.: Diagnostic anatomique des encéphalites aiguës par rapport spécial à l'encéphalite à tiques. *Cas. Lék. čes.*, 1955, 94, 133—137.
3. Draganescu, St., Voinescu S., Petrescu, A.: Aspects anatomocliniques de certaines encéphalites mal classées et d'encéphalites periveineuses au cours de maladies ayant le caractère des panencéphalites. *Acta Med. Belg.* 1958, 58, 495—511.
4. Horanyi, B., Hechst, B.: Zur Histopathologie der menschlichen Poliomyelitis acuta anterior. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1935, 137, 1—21.
5. Grinschgl, G.: Virus meningo-encephalitis in Austria. *Bull. World Health Org.* 1955, 12, 535—564.
6. Kufs, H.: Zwei abnorme Fälle von Encephalitis epidemica. *Z. Neur.*, 1923, 86, 619—630.
7. Macchi, G. G., Guazzi, S., Battaglia and T. Masini: Postinfluenzal panencephalitis with a mixed nodular perivenous pathological picture. *Encephalitides*, Elsevier Publ., Amsterdam, 1961, 84—88.
8. Mollaret, R., Bertrand, I., Mollaret, H.: Sur l'existence possible dans la poliomyélite antérieure aiguë d'un processus cordonal demyelinisante et sur son éventuelle signification. *Presse med.*, 1951, 59, 1381—1383.
9. Peters, G.: Über den Ausbreitungsbereich des Krankheitsvorganges im Zentralnervensystem bei der Heine-Medinschen Krankheit. *Münc. med. Wschr.*, 1938, II, 1073—1076.
10. Radermecker, J.: Sur une encéphalomyélite atypique, voisine de l'encéphalomyélite periveineuse aiguë, *Rev. neurol.*, 1948, 80, 742—758.
11. Seitelberger, F., Jellinger, K.: Frühjahr-Sommer-Encephalomyelitis in Mitteleuropa. *Nervenarzt*, 1960, 31, 49—60.
12. Simma, K.: Zur Histopathologie der Heine-Medinschen Krankheit. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1960, 181, 459.
13. Wohlwill, F.: Zwei seltene Komplikationen bei multipler Sklerose. *J. Psychol. u. Neur.*, 1929, 37, 408—424.
14. Van Bogaert, L.: Final comments. *Encephalitides*, Elsevier Publ. Amsterdam, 1961, 716—717.
15. Von Weizsäcken, V.: Multiple Sklerose. *Mtschr. Psychiatr.*, 1921, 49, 221—225.

H. SHIRAKI

## THE NEUROPATHOLOGY OF ENCEPHALITIS JAPONICA IN HUMANS ESPECIALLY FROM SUBCHRONIC TO CHRONIC STAGE

(A Contribution to an Understanding of the Prognosis and Neuropsychic Sequelae  
of the Disease)

Division of Neuropathology Institute of Brain Research, School of Medicine  
University of Tokyo

### INTRODUCTION

Encephalitis Japonica of which vector is definitely concluded to be mosquitos, particularly *Culex tritaeniorhynchus*, prevails in mid-summer from July to October, especially in August and September, and comprizes one of the serious diseases caused by arbor virus group in Japan. Since 1873 both endemic and epidemic outbreaks of the disease in Japan have been developing in every year, and even at present stage represent one of the severe viral encephalitides in number and severity. The reasons are summarized as follows:

1. As indicated in Fig. 1A, B the southwestern districts of Japan develop constant endemic in each year, while occasionally epidemic. The disease outbreak in 1961, on the other hand, was predominant in the northeastern districts where had no outstanding disease outbreak in the past (Hirayama 1961). In Hokkaido, most northern Island, a very few suspicious cases of the disease have sporadically been reported before the Second World War. In accordance with the severest epidemic attacked whole territories of Japan in 1948 three years later after the War, the greatest epizootic ever un known occurred in Hokkaido too. Consequently, 5 humans and 789 horses developed the disease which was exclusively restricted to the westsouthern district (Fig. 2A). However, as shown in Fig 2A, C a gradual transition of the disease process, i.e., development of neutralizing antibody among both horses and humans outbreak of epizootic development of protective immunity of aged horses, took place, and both apparent and inapparent infections are now widespread over whole Island (7). Consequently, there exists no virgin area for viral invasion all over Japan.

2. A serious question how virus can survive in winter season remains unsolved, and, thus, there is no fundamental protective method for the disease, except for vaccination which is still unsatisfactory in its effectiveness and control of complication. Besides, effective treatments for the disease at acute stage have never been reported up to date.

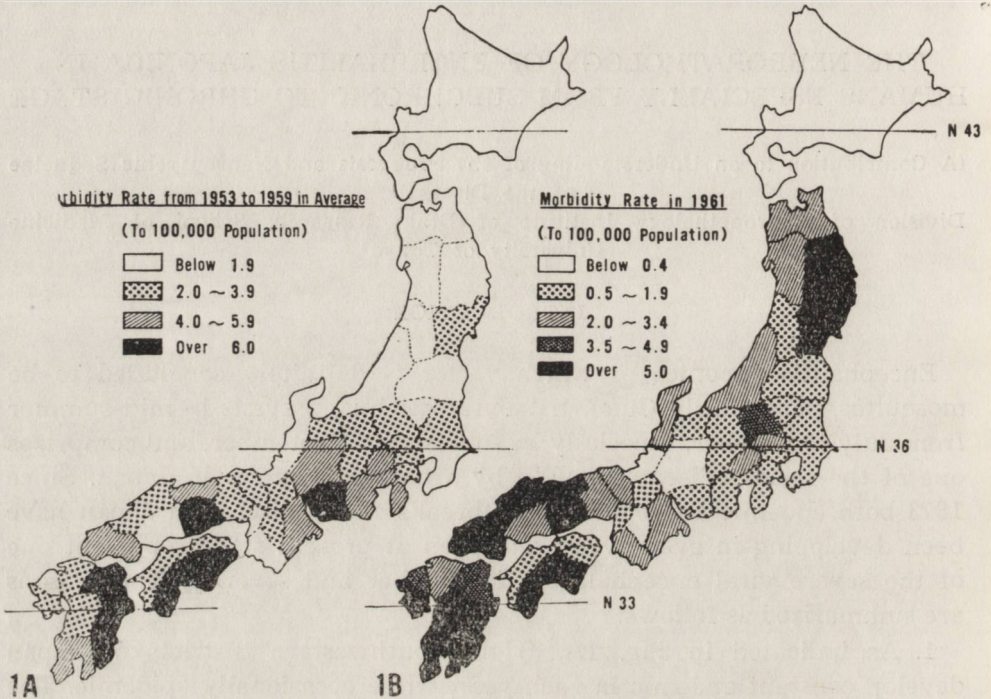


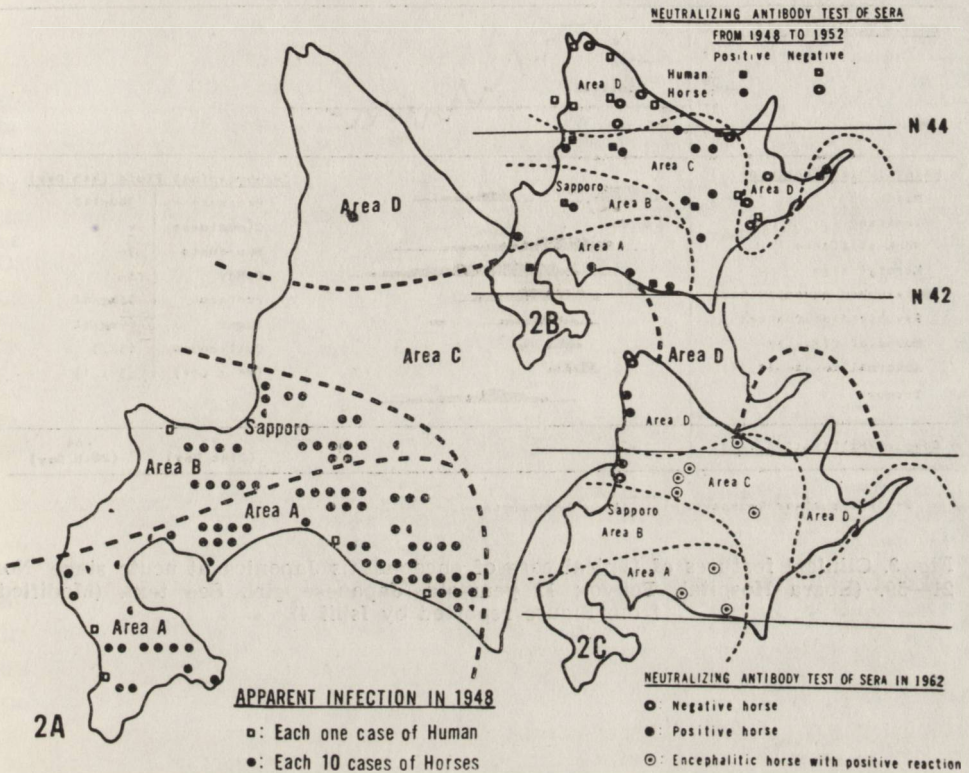
Fig. 1. Morbidity rate of encephalitis Japonica of humans in each prefecture of Japan. A — From 1953 to 1959 in average. Southwestern districts developed, more or less, constant endemics in every year and occasionally epidemic outbreaks. No outstanding disease outbreak prevailed in Hokkaido, most northern Island (See Fig. 2), although the small-scaled but definite ones had been developing since 1939. B — Disease outbreak in 1961 was predominant in northeastern districts in where no outstanding ones had been observed since 1948. (Modified from Tables reported by Hirayama (3).

3. The clinical features of the disease from acute to subacute stage have been investigated thoroughly, but the knowledges on early diagnosis for the disease with laboratory examinations remain still unsatisfactory, because significant positive immunity can only be identified several weeks after onset of the disease (Shiraki 1962) (Fig. 3).

4. The mortality rate of the disease is exceedingly high ranging 24 to 92% since 1924 to 1960<sup>3</sup>. Even when patients can survive, neuropsychic sequelae of the disease are conspicuously malignant, particularly in

childhood, although slight recovery can be expected during longstanding clinical course (1) (Tables 1 and 2).

5. Although a number of excellent works on the neuropathology of the disease from acute to subacute stage have already been published, a comprehensive exploration to its neuropathology from subchronic to



**Fig. 2.** Hokkaido Island. Changes of geographic distribution of both apparent and inapparent infections of encephalitis Japonica in humans and horses. A and B. From 1948 to 1952. In area D (non-epidemic area), sera of 264 humans and 133 horses were examined but all negative; In area C (sub-epidemic area), positive serologic reaction was found in 8% of sera of both humans (20/246) and horses (21/251), but no apparent infection was encountered; In area B (temporary-epidemic area), one human patient with apparent infection was recorded, while no difference of morbidity rates between young and aged horses was identified. So far, aged horses developed no protective immunity against virus infection; In area A (epidemic area), 5 humans with apparent infection and a significant difference of the morbidity rates between young and aged horses, i.e., highest in 3 year-old group and about one half of the latter in over 11 year-old group were found. So far, area A exhibited immuno-epidemiologically similar features to those of the main Island of Japan. In addition, border-line of area D to area C corresponds well with isothermal line of 18°C of mean temperature of July or of 2400°C of cumulative temperature from May to September. C. Hemagglutination inhibition test of sera of both humans and horses against Nakayama antigen in 1962. Both inapparent and apparent infections were now spread in areas C and D. Compare with A and B. (Modified from Figures reported by Miura et al. 6).

chronic stage is absent or exceedingly rare. So far, it is urgent that morphological backgrounds for developmental mechanism of severe neuropsychic sequelae in survivors are established.

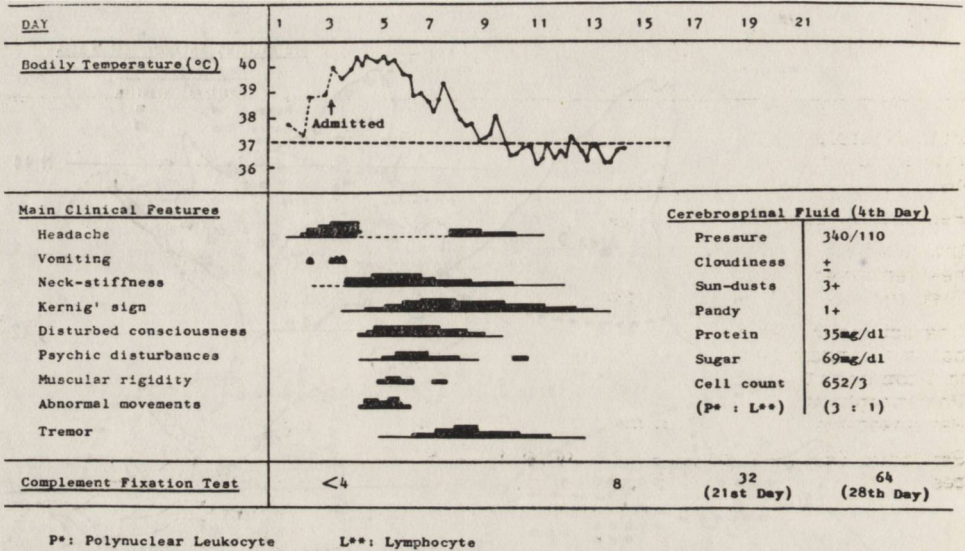


Fig. 3. Clinical features of typical case of encephalitis Japonica at acute stage. No. 21—59, (Ebara Hospital, Tokyo); 12 year-old, Japanese girl. See text. (Modified from Figure reported by Ishii 4)

Table 1. Prognosis of encephalitis Japonica in the survivors at 5th and 10th year observations (Modified from Tables reported by Goto 1)

Prognosis	At 5 Years after Acute Illness		At 10 Years after
	40 Individuals of Selected Group with Severe Disturbances at Acute Stage Actual Number (%)	143 Individuals of Unselected Group Actual Number (%)	Acute Illness 55 Individuals of Selected Group from Survivors with Sequelae at 5th Year Actual Number (%)
Death	4 (10.0)	4 (2.8)	4 (7.3)
With Sequelae	35 (87.5)	108 (75.5)	44 (80.0)
Particularily Severe	22 (55.0)	22 (15.3)	13 (23.6)
Without Sequelae	1 (2.5)	31 (21.7)	7 (12.7)



Table 2. Neuropsychic sequelae of encephalitis Japonica at 10th year observation  
(Modified from Table reported by Goto<sup>1)</sup>)

Sequelae	17 Individuals of Selected Group with Severe Dis- turbances at Acute Stage	48 Individuals of Unselected Group	35 Individuals of Infant Preadolescent below 15 Year-Old	13 Individuals of Adult
	Actual Number (%)	Actual Number (%)	Actual Number (%)	Actual Number (%)
Both Neurologic and Intellectual Disturban- ces	14 (82.3)	13 (27.1)	13 (37.1)	0 (0)
Personality Change	1 (5.9)	14 (29.2)	7 (20.0)	5 (38.5)
Intermediate of Abo- ve-Mentioned Two Disturbances	1 (5.9)	15 (31.3)	15 (42.9)	0 (0)
Characteristic Perso- nality Change as seen in Economo's Type of Postencephalitic Parkinsonism	0 (0)	5 (10.4)	0 (0)	7 (53.8)
Psychotic Disturban- ces	1 (5.9)	1 (2.0)	0 (0)	1 (7.7)

The details of clinico-epidemiology, neuropathology particularly at acute stage, prevention and treatment of the disease have been discussed in our previous publications (Shiraki 1962, Shiraki et al. 1963). The author, therefore, intends to limit his descriptions mainly on the neuropathology of the disease in humans from subchronic to chronic stage.

#### MATERIAL

The material comprizes: 9 cases at subchronic stage with 30 to 138 days duration and 3 to 64 year-old, and the disease onset ranged from August to October in 1948 to 1963; 2 cases at chronic stage with 12 and 8 years duration, and 16 and 18 year-old respectively, and the disease onset was on August in 1950 and 1955. The clinical features of both groups are summarized in Tables 3 and 4.

The details of the neuropathology of the disease from acute to subacute stage have already been discussed in our recent publications (Shiraki 1962; Shiraki et al. 1963). Nevertheless, in regard with a well understanding of the neuropathologic characteristics of the disease from subchronic to chronic stage, the kernels of the former material will briefly be

Table 3. Summarized clinical Features of nine autopsy cases of encephalitis Japonica at subchronic stage in the Japanese from 1948 to 1964

Case Number (Hospital Autopsy Number)	Age (Year) Sex	Total Duration of Illness (Days)	Date of Onset of Illness Death	Main Clinical Features (Progress Hospitalization)	Cerebrospinal Fluid Findings (TS; „Teil Strich”)
1 (PK 2333)	45 M	30	October 1, 1949 to October 30	Chilling, headache, fever Occasional delirium 1+ Fever (39°C), delirium On 4, fever (40°C), delirium, miosis, pupil-stiffness, neck-stiffness, Kerning 1+, muscular rigidity 3+, hyperreflexia, foot clonus Pneumonia, administration of penicillin On 17, normal temperature, fairly improved disturbed consciousness. On 20, marked edema Dyspnea, clouded consciousness.	<b>On 4: Clear, pressure</b> 210/80, Nonne 1+, Pandy 1+, cell count 66/3 (lymphocytes 55, leukocytes 11)
2 (PK 2224)	8 M	31	August 21, 1948 to September 20	Headache, fever, vomiting 1x Anorexia, fatigue, vomiting 1x, diarrhea 1x, fever (38.6°C), clouded consciousness, incontinence Coma On 24, fever (39.5°C), apathetic, nystagmus, miosis, pupil-stiffness, neck-stiffness, Kernig +, bilateral Babinski, frequent convulsions, trism, delirium, urinary incontinence On 28, fever (37.6°C), bronchitis On 29, improved disturbed consciousness, decubiti On September 2, fever (38°C), coughing On 9, fever (37°C), much improved disturbed consciousness On 13, cardiac weakness	<b>On August 24: Clear, pressure</b> 100/50, Nonne 1+, Pandy 2+ protein 1/2 TS, sugar 92 mg/dl, cell count 19/3 /lymphocytes 16, leukocytes 3/, fibrin net 3+
3 (KH 561)	3 F	33	August 11, 1948 to September 28	Fever, tremor? High fever, somnolence. On 14, neck-stiffness, Kernig 1+, hyperreflexia, muscular rigidity On 16, clear consciousness, improvement of above disturbances, fever (37.5° — 38.5°C) On 27 frequent tonic convulsions, fever (39° — 40°C)	—

4 (PK 2513)	27 M	37	September 9, 1951 to October 15	Headache Fever Clouded consciousness, fever (39°C) On 13, fever (39.5°C), soporous, neck-stiffness, Kernig 1+ Xantchromia of CSF Cleared CSF On 18, normal temperature, clear consciousness On October 8, discharged; clear CSF without xantchromia, no neuropsychic disturbances Abnormal feeling of throat, repeated chewings, hypersensitive to exogenous stimuli, no fever, clear consciousness On 12. fever (38°—39°C), repeated chewings, twitching of fingers, slightly clouded consciousness, highly sensitive to exogenous stimuli Convulsion Fever (40°C), frequent convulsions, comatose	On September 13: Clouded slightly hemorrhagic, pressure 200, Sano 3+, Nonne 1+, Pandy 1+, sugar 100—60 mg/dl, cell count 300/3
5 (PC)	15 F	37	August 29, 1962 to October 4	Headache On September 1, delirium, fever (39.8°C) On 2, high fever, delirium On 3, fever (38°—39°C), clouded consciousness, Kernig 1+, neck-stiffness On 4, fever (37°C), improvement of meningitic responses, psychomotor excitement On 18, fever (37°—38°C), anxiety, hyperkinesis, sleeplessness, forced crying, foot clonus On 25, hyperkinesis, negativism, neck-stiffness, Kernig 1+, r-foot clonus, mydriasis, pupilstiffness On 26, psychomotor excitement On 28, fasciculations of facial masseter muscles, opistotonus, slightly clouded consciousness, fever (38°—39°C). On October 2, hypersweating, 1-Rossolimo, 1-foot clonus On 3, vomitings, dyspnea.	On September 3: Clear pressure 200, Nonne 1+, Pandy 14, cell count 168/3 /all lymphocytes/ On 25: Xantchromia, pressure 90/60, Nonne ±, Pandy 2+, protein 33mg/dl, sugar 55mg/dl, cell count 206/3
6 (KH 568)	10 F	50	August 2, 1948 to September 16	Headache, fever (38.5°—40°C), vomiting On 4, clouded consciousness On 6, somnolence, Kernig 1+, neck-stiffness, clonic convulsions, conjugate deviation of eye balls On 8, anisocoria (1 r), cyanosis, contracture of r-leg, decubiti, fever (37°C) On 19, edema of lower limbs, fever (38°—39.5°C), twitching of upper body half On September 13, rigidity of upper limbs On 16, ecchymoses, lung edema	On August 6: Clear pressure 150/120, protein 1/2 TS, cell count 29/3 /lymphocyte: neutrophile = 2 : 1)
7 (PK 2234)	63 F	56	September 21, 1948 to November	Headache Fever (38.8°C), clouded consciousness Fever (40.3°C), coma, urinary incontinence, jerks of r-hand On 24, fever (40°C), comatose neck-stiffness, Kernig 1+, rigidity of upper limbs, tremor of r-hand, occasional conjugate deviation of eye balls, hyperreflexia On October 2, decubiti, tube feeding On 15, dysphagia On November 4, fairly improved disturbed consciousness. On 9, pneumonia	On September 24: Clear pressure 220/80, Nonne 0, Pandy 3+, Protein 1 TS, cell count 25/3 /all lymphocytes/, fibrin net +

8 (PK 2403)	64 F	88	August 21, 1950 to November 16	Fatigue, fever (39°C), clouded consciousness Fever (40°C), delirium, apathetic, neck-stiffness, Kernig 1+, hyperreflexia, r-hemiparesis On 23, delirium, pupil-stiffness, neck-stiffness, Kernig 2+, rigidity of all limbs 1+, urinary incontinence Coma On 25, fever (38°C), tube feeding On 28, improved disturbed consciousness On beginning of September, cystitis On end of September, pyelocystitis, slight fever, improved disturbed consciousness Cardiac weakness	On August 23: Clear, pressure 170/80, Nonne 1+, Pandy 1+, protein 1/3 TS, sugar 74mg/dl, cell count 250/3 /lymphocytes 235, leukocytes 15/
9** (PN)	9 F	138	October 6, 1963 to February 20, 1964	Headache, vomitings, soporous On October 9, 1963, comatose, fever (38°—40°C) On 11, coma, hyperreflexia, rigidity of r-arm 1+, pes equinus On 12, r-conjugate deviation of eye balls, neck-stiffness ±, Kernig 1+, r-Babinski, stridor, coughing 2+, dyspnea 3+ On 13, rigidity of arms (r 1), trism 1+, On 15, tracheotomy, mydriasis, pupil-stiffness On November 1, opisthotonus, trism, decerebration syndrome, coma, decubiti, temporary myoclonic jerk of upper limbs On 3, tonic or clonic convulsions, progressed emaciation, trism, opisthotonus 2+, nystagmus 1+ On 10, generalized low voltage of EEG On middle, slight improvement of disturbed consciousness, able to respond to exogenous stimuli in some degree. From January to February 1964, decelebrating posture of all limbs On February 15, fever (40°—41°C), dyspnea 3+, stridor 3+, emaciation 3+	On October 11, 1963: Clear, pressure 100/70, Nonne 0, Pandy ±, protein 3 TS, tryptophan 0, chloride 415 mg/dl, sugar 95.5mg/dl, cell count 125/3, negative culture of foreign organism On 30: Clear, pressure 140/100, Nonne 0, Pandy 0, protein 1/3 TS, chloride 383 mg/dl, sugar 61.5 mg/dl, cell count 1/3

(PK; Department of Psychiatry, Kyushu University, Fukuoka KH; Komagome Hospital, Tokyo PC; Department of Psychiatry, Chiba University, Chiba PN; Department of Pediatrics, Nippon University, Tokyo —; No information O; Negative ±; Minimal 1+; Slight 2+; Moderate 3+; High M; Male F; Female r; Right 1; Left; Exceed)

Titer of complement fixating antibody of sera for Japanese encephalitis virus

x: On August 28, 32

xx: On October 12, 1963, 8; on November 4, 8

discussed. The material consists of: 25 cases at acute stage with 3 to 9 days duration and 5 to 73 year-old, and the disease onset ranged from July to September in 1933 to 1963; 5 cases at subacute stage with 11 to 18 days duration and 8 to 63 year-old, and the disease onset ranged from July to August in 1948.

#### NEUROPATHOLOGY OF ENCEPHALITIS JAPONICA IN HUMANS

1. *Acute Stage* (Figs. 4—8): Perivascular cell cuffs, cellular nodules (neuronophagias) and focal rarefaction necrotic foci which are mainly restricted to grey matter are of main pathomorphological characteristics at acute stage.

Cell cuffs consisting of lymphocytes, polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells accumulate mainly in perivenous spaces and migrate occasionally into periadventitial parenchyma in a slight degree (Figs. 6B, C F). Polymorphonuclear leukocytes prevail, as a rule, at most initial stage, i.e., 3—5 days, while subside rapidly at subsequent stage. Lymphohistiocytic infiltration in leptomeninges occurs in a great majority of cases, but focally and in a slight to moderate degree (Fig. 6A).

Cellular nodules of a compact nature consist mainly of activated rod cells and less of polymorphonuclear leukocytes (Figs. 6C, D, E). The latter prevail at most initial stage and subsequently subside rapidly. Cellular nodules bear, as a rule, to microscopic verification, and seem to develop freely in parenchyma but a careful microscopic examination reveals their development around capillary wall. Cellular nodules of a loose nature or diffuse cell accumulation distribute in different cortical layers and subcortical grey matter, and are essentially similar to the former in their cellular constituents (Figs. 6E, F, G). Neuronophagias with both leukocytes and activated rod cells are, as a rule, independent of cellular nodules mentioned above (Figs. 6E, G), while tend to coalesce at subsequent stage and become difficult in differentiating from cellular nodules.

Both lesions, i.e., perivascular cell cuffs and cellular nodules, develop concurrently in all cases examined and are predominant in grey matter, while not infrequent and less severely in pericornual white matter. They are widespread from cerebrum to spinal cord, while, generally speaking, most predominant in Ammon's horn, lateral thalamic nucleus, pulvinar and substantia nigra (Figs. 4A, B).

Focal rarefaction necrotic foci which are clearly visualized by a naked eye examination are multiple, sharply-defined, roundly- or ovale-shaped and restricted to grey matter, tend to coalesce and represent frequently

Table 4. Summarized clinical features of two autopsy cases of encephalitis Japonica at chronic stage in the Japanese from 1950 to 1963

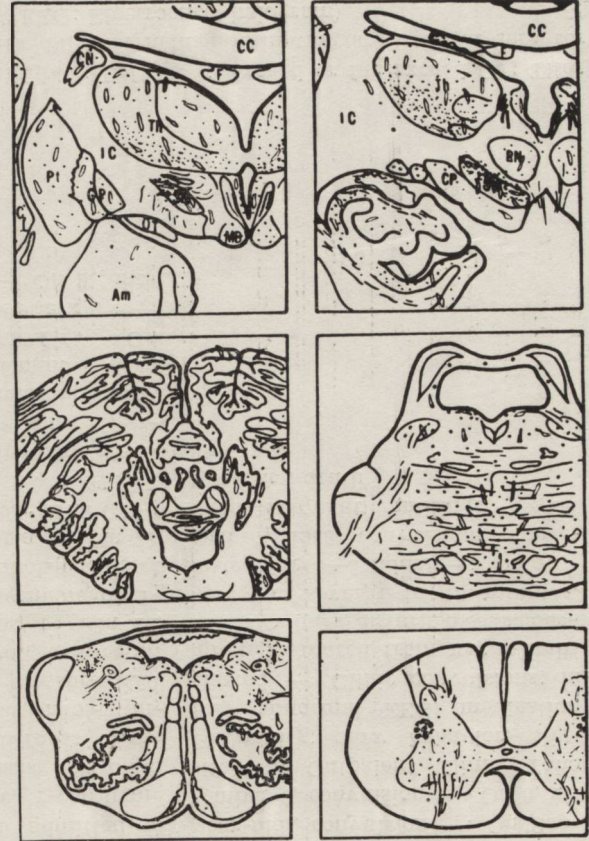
Case Number /Hospital, Admission or Autopsy Number/	Age (Years) Sex	Total Duration of Illnesses		Date at Onset of Illness & Death	Main Clinical Features	
		Acute to Subacute Stage	Subchronic to Chronic Stage		(→ Progress	=> Hospitalization)
					Acute to Subacute Stage	Subchronic to Chronic Stage
1 /Ebara & Matsuzawa, Tokyo No. 830, 1950 & No. 1310, 1961/	16 M	Approximately 20 days	Approximately 12 years	August 15, 1950 to November 1961	On 4 years & 9 months-old, convulsions, fever, somnolence → High fever, clonic convulsions => On August 18, admitted to Ebara Hospital; apathetic, clonic convulsions of 1-body half, neckstiffness 1+, r-Kernig, r-pes equinus, rigidity of r-upper limbs 2+, CF /0/ → Neckstiffness 2+, 1-Schiefhals, convulsions of r-arm → On 21, somnolence, neckstiffness +, Kernig ±, 1-ptosis → On 23, 1-facial paresis, soporous, salivation 2+ → On 26, CF /16/ → On September 4, CSF; clear, pressure 210, Pandy 2+, protein 1/2 TS, cell count 41/3 → On 9, rigidity of r-hand 3+ → On 12, 1-Rosolimo → On 20, somnolence → On 25, 1-spastic paresis, tremor of 1-all limbs → On October 2, clear consciousness, motor aphasia → On 26, discharged; infantile speech	Neuropsychic sequelae; 1-hemiparesis, highgrade mental retardation, petit mal-like seizures 15—20 times/day → Reduced seizures 1—2 times/day after medication → Violent behaviors since 12 year-old => On 15 year-old, admitted to Matsuzawa Hospital; slurred speech, spastic paresis, equinovarus, muscular atrophy & ankylosis of foot joint of 1-lower limbs spastic paresis of 1-upper limbs, rigidity of r-lower limbs, knee jerk 1 >> r, biceps & triceps reflexes 1 > r, 1-Gordon ±, bilateral dysdiadochokinesis, microcephaly, severe imbecilly or idiocy → Epileptic paroxysmal of various natures, psychic seizures, abnormal EEG, violent & infantile behaviors → Fever, decubiti, disturbed consciousness, pyelonephritis, pleuritis Emaciation → 0 November 1961, expired

<p>2 /Ebara &amp; Forensic Institute, Tokyo No. 1161, 1955 &amp; No. 27036, 1963</p>	<p>18 M</p>	<p>Approximately 50 days</p>	<p>Approximately 8 years</p>	<p>August 16, 1955 to August 8, 1963</p>	<p>On 10 years &amp; 3 months-old, headache, delirium, abdominal pain, fever /38.5°C/ =&gt; On August 17, r-tonic convulsions 2x, vomiting, jactation &amp; admitted to Ebara Hospital; apathetic, r-conjugate deviation of eye balls, miosis, horizontal nystagmus, coma, neck-stiffness ±, r-facial paresis, r-hemiparesis, urinary incontinence, CSF; clear, pressure 450, Pandy 3+, sugar 78 mg/dl, cell count 1620/3 /mainly lymphocytes/ → On 18, soporous, involuntary movement of 1-hand → On 19, tonic convulsion, fever /40.8°C/ → On 20, dysphagia → On 23, delirium, hallucination, fever /37.8°C/ → On 26, improved delirium, fever /37.1°C/ On 31, HI /640/ → On September 8, restlessness, fever /39.2°/ → On 14, r-pes equinus → On 27, maslike face, rigidity 1+, athetoid movement → On October 2, echolalia, fever /37.2°C/ → On 11, retrograde amnesia, knee jerk 3+ → On 20, dementia, HI /160/ → On 21, discharged</p>	<p>Neuropsychic sequelae on November 7, 1955; amnesia, knee jerk 2+, no tremor → On July 1962/17 year-old/, convulsion → On September 6, convulsion → On 9, visited to Outpatient Clinic, Toho University; slow behavior, slightly abnormal EEG, medication started → Clinic convulsions; in midnight, march from upper limbs to lower ones, disturbed consciousness for several to 10 minutes, lasted for 2—3 hours → On August 7, 1963, convulsions, subsequent frequent vomitings → On 9, sudden death</p>
--	-----------------	----------------------------------	----------------------------------	--	--	---

(O; Negative ±; Minimal 1+; Slight 2+; Moderate 3+; High M; Male r; Right l; Left ==>; Exceed or far exceed CF; Titer of complement fixating antibody of sera for Japanese encephalitis virus HI; Titer of hemagglutinating antibody of sera for Japanese encephalitis virus CSF, cerebrospinal fluid TS; „Teil Strich” EEG; Electroencephalogram)



4A



4B

Fig. 4. Topographic distribution of lesions in 17 cases of encephalitis Japonica at acute stage in July and August 1948, Tokyo. Oval indicate perivascular cell cuffs, while dots, cellular nodules. A — Cerebrum and diencephalon. B — Brain stem, cerebellum and spinal cord. See text! (Further modified from Figures reported by Shiraki 8.)



a close relationship to arteriolar and precapillary vessel wall of which intimal nuclei occasionally become pyknotic (Figs. 7A—D). They are, as a rule, characterized by fine or coarse spongy tissue disruption, nerve cell disintegration and ischemic-degenerated remainders with occasional neuronophagias and perineuronal incrustation bodies (Fig. 7C). A less number of leukocytic migration and cellular debris are frequently visualized centrally, but inflammatory cells never accumulate in central vessel wall. Foci are predominant in cerebral cortices of which deeper layers are preferentially involved (Fig. 7A). No lesions occur in molecular layer, except for cerebellar cortex in where lesions are never encountered in granular layer.

Severity of foci is in general high in Ammon's horn, succeeded by temporal, frontal and parietal cortices, and slight to moderate in insular, occipital and cerebellar. Severest foci are found in substantia nigra and thalamic nuclei of which lateral and ventro-lateral nuclei, and pulvinar are most susceptible (Figs. 7B, D). Striatum and globus pallidus are also involved. No lesions develop in brain stem and spinal cord, except for red nucleus and pontine basis (Figs. 5A, B). Those necrotic foci are independent of perivascular cell cuffs and cellular nodules mentioned above. For example, in thalamic nuclei the latter two lesions are clearly restricted to septal regions of multiple, coalescent rarefaction necrotic foci, while never observed within necrotic foci (Fig. 7B). Lesions are found in a great majority of cases examined, while not in a few instances. So far, both nature and distribution pattern of necrotic foci are, more or less, differed from those of perivascular cell cuffs and cellular nodules (Compare with Figs. 5A, B to Figs. 4A, B).

Tissue damages due to circulatory disturbances are occasionally combined with. Diapedetic hemorrhages and plasmic or fibrinous transudations are observed in thalamic nuclei, cerebral cortices, meninges and elsewhere or rarely in white matter (Figs. 8A—D). Pseudolaminarily-distributed cortical deterioration rarely occurs but certainly does exist (Fig. 8E).

2. *Subacute Stage* (Figs. 9 and 10): Cellular mobilization in rarefaction necrotic foci becomes pronounced (Figs. 9A, B and 10A), while perivascular cell cuffs and cellular nodules, less conspicuous in both number and intensity at subacute stage. Cellular elements in necrotic foci consist mainly of activated rod cells and phagocytic cells laden with myelinbreakdown byproducts and granules of lipid nature (Figs. 9B, 10B). Thusfar, a softening character of foci becomes prevailed. Plasma cells intermingled with lymphocytes accumulate in perivenous spaces, and a small number of them migrate periadventitially (Fig. 10B). A large num-

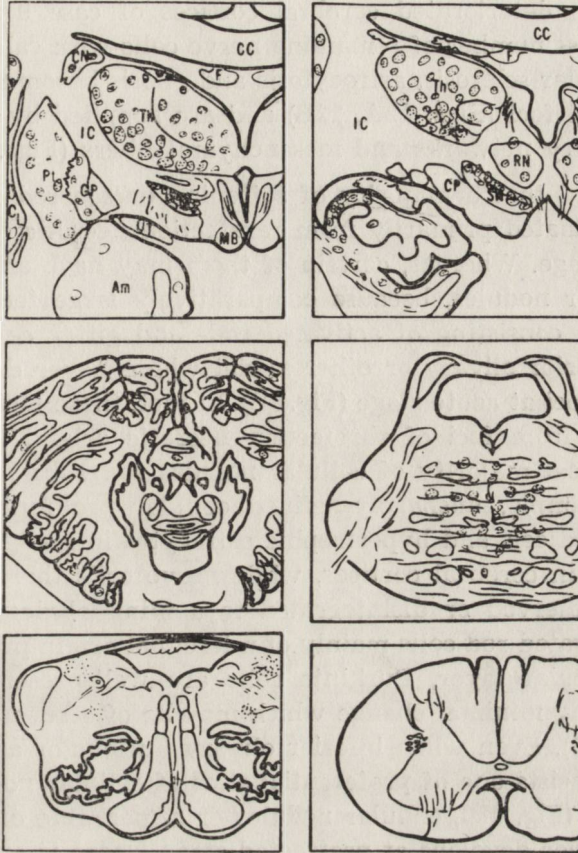


5A

Fig. 5. Topographic distribution of focal rarefaction necrotic foci (ovals with dots) on the same materials in Fig 4. A — Cerebrum and diencephalon. B — Brain stem, cerebellum and spinal cord. See text! (Further modified from Figures reported by Shiraki 8)

ber of exceedingly tiny, pseudocalcareous particles freely in parenchyma or phagocytic cells are, as a rule, present. In a few instances a widespread cortical deterioration of a circulatory disturbance origin is manifested particularly from gyral wall to depth of sulci, while rarefaction necrotic foci with increased cellularity are visualized within the former lesions (Fig. 9A), and, thus, an overlap of two types of lesions becomes pronounced.

3. Subchronic Stage (Table 3, Figs. 11—23): Coalescent tendency of rarefaction necrotic foci at this stage becomes more and more increased, and comparatively sharply-defined softening foci are particularly predominant in lateral, ventro-lateral and dorso-medial thalamic



5B

nuclei (Figs. 16A, 17A, 19A, 22A), pulvinar (Fig. 22C), Ammon's horn and other cerebral cortices (Figs. 11C, 20E, 21E, 22A), and substantia nigra (Figs. 11A, 19B). Pigmented cells in substantia nigra are severely disintegrated, and a large number of phagocytic cells laden with melanin pigments are mobilized (Figs. 11A, B, 19B). In case 9 with the most longstanding duration for 138 days, severe disintegration of pigmented cells and astrocytosis are of main features, and thus, a cleaning process has already been accomplished (Fig. 21A). Necrotic foci are coarsely or finely sponginous or cystic (Figs. 16C; 17A, B; 20A, E, 21E, F, 22A, C), and contain a large number of phagocytic cells laden with fat granules (Figs. 14B, 17B, 21C,D) as well as a different number of multinuclear giant cells of Langerhans'type (Figs. 16B, 17C, 20B, C,D). Giant cells prevail, as a rule, in thalamic nuclei and are particularly abundant in cases 5 and 9, while

occasionally in deteriorated cerebral cortices of case 9 in which they phagocyte a less number of remaining nerve cells with calcification (Figs. 21F, G). Vascular sclerosis, astrocytosis and gliosis become pronounced in those advanced foci (Figs. 12A, 22B) and are supplied by a proliferation of both capillary networks and mesenchymal fibers (Figs. 12A, 22D).

It is assumed that a majority of softening or scurred foci mentioned above are originated primarily from rarefaction necrotic foci from acute to subacute stage. Whereas, certain of them may have an origin of coalescent cellular nodules, because comparatively large foci of a circumscribed nature consisting of activated rod- and gitter cells occasionally prevail in inferior olivary or other nuclei where never develop rarefaction necrotic foci at acute stage (Fig. 5B). In fact, those foci can hardly be differentiated from foci of rarefaction necrotic origin. It, however, is true that a great majority of cellular nodules can subside at protracted stage. For example, unsharply-defined cellular proliferation consisting of activated rod cells and hypertrophic astrocytes in a slight to moderate degree occurs in cerebral cortices, while nerve cells there are comparatively well-preserved or disintegrated to a minimal degree (Fig. 14A). Although activated rod-cells mainly of microglial origin proliferate in cerebellar molecular layer, Purkinje cells are well-preserved and show negative or only minimal change which may be of a reversible character (Figs. 12B, 14C). Even when inferior olivary nucleus or anterior horn of spinal cord consists one of preferential sites of cellular nodule formation at acute stage (Fig. 4B), cellular nodules or remarkable disintegration of nerve cells never develops at protracted stage. There is only diffuse cellular increase in parenchyma, and nerve cells remain to normal configuration (Fig. 12C).

Perivascular cell cuffs, on the other hand, become absent or to minimal degree at protracted stage, although slight one can be observed even in case 9 with 138 days duration (Fig. 21B). It now becomes obvious that a majority or great majority of cellular nodules and perivascular cell cuffs are essentially of a reversible character, while rarefaction necrotic foci, of an irreversible one and can play an important role on the developmental mechanism of severe neuropsychic sequelae in survivors.

Further accentuation of sequelae of the illness, on the other hand, can be attributed to circulatory disturbance processes which, as aforementioned, take place even from acute to subacute stage and may, more or less, be responsible for irreversible tissue damages (Figs. 8A—E, 9E). More widespread cortical deterioration particularly from gyral wall to depth of sulci prevails in a majority of cases at subchronic stage. A lower magnification of those foci and adjacent vicinity seems to develop severe dis-

integration of nerve cells (Figs. 13A, 18A, B). A higher magnification clearly demonstrates that a fair number of ischemic-shrunken nerve cells are still spared in those foci with manifestation of vascular networks (Figs. 13B, 18B, C). Since circumscribed foci with abundant cellularity originated from rarefaction necrotic foci are disseminated within this cortical deterioration and the latter is far widespread than the former (Fig. 18A), this type of diffuse cortical deterioration indicates a different disease process presumably of circulatory disturbance.

In case 6 with 50 days duration, fresh hemorrhages and plasmic transudations in various degree indicating their occurrence at terminal stage are disseminated widely in the severely involved cortices mentioned above and adjacent white matter (Figs. 18D, E). Widespread demyelination of white matter develops too (Fig. 18D), and a higher magnification reveals that multiple cellular nodules of different sizes are disseminated, and the latter consist of periadventitial fibrinous transudation centrally and glial wall formation marginally (Figs. 18F, G). Those lesions mentioned above are most impressive in case 9 in which exceedingly widespread demyelination and gliosis are pronounced bilaterally in white matter of cerebral hemisphere (Figs. 20A, E, 22A, C), and indicate further advance of tissue responses in case 6 mentioned above. In case 9, cortical deterioration with cavity formation and glio-mesenchymal proliferation is also widespread (Figs. 20A, E, 21E, F and 22A — D). A less number of fresh ring hemorrhages are still visualized in white matter of cerebrum and brain stem (Fig. 23C). Coarse spongy tissue disruption presumably due to circulatory disturbance is encountered in subcortical white matter and thalamic nuclei of cases 5, 6 and 7 (Fig. 16C). It, therefore, is conceivable that circulatory disturbances, particularly of impaired blood-brain-barrier, become manifested anew at subchronic stage or are lasting continuously from acute to subchronic stage, and result irreversible tissue damages.

Slight to moderate intimal proliferation, particularly of meningeal arteries, is observed diffusely in case 9 (Fig. 23A). Considering the age of the patient, i.e., 9 year-old, this clearly falls into abnormal range. Laminarity- or pseudolaminarity-distributed cortical deterioration in where slight to moderate disintegration of nerve cells with ischemic-shrunken remainders and fine tissue disruption are of main features is widespread (Fig. 23B). This may be closely related to the intimal proliferation of meningeal arteries mentioned above, and is of a recent origin and clearly contrasted to the afore-mentioned advanced cortical lesions. In this connection, the findings in case 8 with 88 days duration, i.e., slight intimal proliferation of meningeal arteries (Fig. 19F), and hyalinous thickening of vessel walls and related tissue damages in basal ganglia (Fig. 19C, D,

E), may have a certain significance relating to primary disease process which, however, is cautiously interpreted since the age of the patient was 64.

Although the neuropathology of encephalitis Japonica at subchronic stage is actually complicated, two main processes, i.e., primary disease process and circulatory disturbances, can concurrently or co-operatively play important roles to the developmental mechanism of widespread lesions in both grey and white matter. A question then may arise as to whether the latter processes can be attributed to damages of cerebrovascular system directly or indirectly relating to primary disease process, or to those of other organs, particularly pulmo-cardiac arrests. In fact, severe dyspnea and pneumonia signs were observed in case 9 from the beginning and the tracheotomy was performed (Table 3). The findings of diffuse degeneration of both striatum and globus pallidus in this case (Figs. 23D, E) may well be correlated to severe pneumonia change at postmortem (Fig. 23F), because pulmo-cardiac arrests of different origins can cause similar lesions of basal ganglia and cerebra cortices (Shiraki 1965).

It is of interest to note that case 4 with 37 days duration is exceptional and represented almost complete remission one month later after the onset of the illness, but subsequently developed exacerbation simulating tetanus-like syndrome, and expired 7 days later. Neuropathologic examination reveals the following two findings; moderately disintegrated nerve cells of substantia nigra and thalamus, and less severe one in other grey matters, and residual cellular nodules and neuronophagias which may indicate advanced features of encephalitis Japonica process (Fig. 15A); whereas, moderate, focal cellular infiltration in meninges (Fig. 15C), slight to moderate perivascular cell cuffs consisting of lymphocytes and their peri-adventitial migration (Fig. 15B) and a small number of tiny cellular nodules of loose nature together with fresh petechiae at fourth ventricular base (Fig. 15D) are verified in cerebral cortices, substantia nigra and elsewhere. So far, it does need no explanation that the latter findings suggest an exacerbating or re-infectious process of encephalitis Japonica but never deal with tetanus process.

4. **Chronic Stage** (Table 4, Figs. 24 — 28): Two autopsy cases at chronic stage which were definitely diagnosed as encephalitis Japonica from both clinico-epidemiologic and immunologic viewpoints at acute and subchronic stages have been examined.

In case 1, the main sites of lesions are on right hemisphere and consist of substantia nigra and thalamic nuclei. Severely disintegrated pigmented cells with high-grade glio-mesenchymal proliferation are particularly

predominant on cranial part of substantia nigra (Figs. 24A, 25A), while severest scar formation in thalamic nuclei develops in dorsal portion of lateral nucleus, anterior nucleus and medulla laminae of which the latter may be originated from plasmic transudation such as seen in Fig. 8C at acute stage (Figs. 24A, B). This corresponds well with the dominant neurologic impairments on left body half, since no or minimal lesions are found in left hemisphere (Fig. 24D). Severe ulegyric lesions are also found in Ammon's horn and frontal gyri on right side and involve widely both cortices and white matter, and are succeeded by temporal gyri and elsewhere (Figs. 24 A,C and 25B). No inflammatory tissue response is encountered.

A question as to whether those ulegyric cerebral lesions could essentially be attributed to primary disease- or related processes from acute to subchronic stage mentioned above or not may arise. Considering the aforementioned lesions at subchronic stage, particularly those of case 9, such a possibility could exist. The patient, however, developed frequent, severe convulsive seizures, and high-grade mental retardation and personality change during the subsequent longstanding clinical course. So far, secondary-induced „Krampfschädigung” may in part be responsible for the developmental mechanism of those lesions. Actually, pseudolaminarily- or laminarily- distributed cortical deterioration of a comparatively recent origin occurs in temporal and other cortices on right hemisphere, cerebellum, inferior olivary nucleus and elsewhere (Figs. 25B, C). Final conclusion remains to future. Simulating retrograde change of nerve cells of which significance is unknown is particularly pronounced in pontine nucleus and Betz'giant cells (Figs. 25D, E, F).

In case 2, severest scar with central cavity formation and calcified remainders of nerve cells occurs almost symmetrical bilaterally in pulvinar thalami (Figs. 2A — D), and is succeeded by dorso-medial thalamic nucleus (Figs. 27A, B) and substantia nigra (Figs. 26B, E). Sommer's sector of Ammon's horn is slightly and bilaterally involved, while other cerebral cortices are free from lesions, except for those of left hemisphere inwhere a tumor mass is found subpially on inferior parietal gyrus, while widespread softening and cystic cavitation develop mainly in cerebral white matter (Figs. 27C, D, E and 28). The latter two findings may be originated from circulatory disturbance closely associated with an existence of cerebral tumor.

Histopathologically, tumor mass consists of a large number of radiary-arranged, ovoid or spindle-shaped cells with scanty metamorphosis, intracellular collagen fiber proliferation, hyalinously-thickened vessel walls, and pronounced deposition of calcareous particles to hyalinous cord

of connective tissue nature (Figs. 27D, E). So far, it may be of fibroblastic meningioma of a low malignant nature. Besides, perivascular lymphocytic accumulation is pronounced around the tumor mass (Fig. 27 C), and less pronounced but widespread in other cerebral parenchyma. A question then may arise as to whether tumor with marginal inflammatory tissue response of a recent origin could occur prior to encephalitis Japonica at acute stage or subsequently during protracted stage. Tonic convulsions of Jacksonian type which was restricted to right body half at acute stage may well correspond with left-sided localization of tumor, and, thus, may indicate a coincidence of tumor at acute stage of the illness, although this comprizes no definite proof. It, however, might be of interest to assume that tumor could develop after the primary disease process of which viral proliferation in cerebral parenchyma may have a certain significance since multiplication of virus-like particles has recently been identified electromicroscopically prior to development of experimentally-induced brain tumors (Ikuta et al. 1964). No definite conclusion can naturally be drawn at present.

Considering the clinico-epidemiologic and immunologic features from acute to subchronic stage as well as the main sites of lesions in both substantia nigra and thalamic nuclei at postmortem examination, it is no doubt that cases 1 and 2 belong to the category of encephalitis Japonica at chronic stage, although certain unusual features do exist in each.

#### DISCUSSION AND CONCLUSION

As far as our materials of encephalitis Japonica from acute to chronic stage are concerned, the common sites of severe lesions are both substantia nigra and thalamic nuclei, and succeeded by cerebral cortices, in particular Ammon's horn. So far, this comprizes most outstanding characteristics of the disease in its distribution pattern as compared with other types of viral encephalitides, and represents most reliable pathomorphological criteria for diagnosis of the illness. It is emphasized that among them cranial portion of substantia nigra, lateral thalamic nucleus and pulvinar thalami are most susceptible.

Histopathologically, two types lesions, i.e., perivascular cell cuffs and cellular nodules, are found in all cases examined, and comprize kernels of the disease process at acute stage, but are essentially not differentiated those of other vira encephalitides, except for the characteristic distribution pattern of the former. Both lesions have been considered as direct or indirect tissue responses of central nervous system to invasion and multiplication of encephalitis Japonica virus. This concept has been



and is now analysing experimentally using fluorescent antibody technique, and will, to some extent, be discussed in other part of this book (Shiraki et al. 1965).

Another outstanding feature of encephalitis Japonica is a presence and characteristic distribution pattern of widespread, multiple rarefaction necrotic foci which actually develop in a great majority of cases examined, except for a few negative ones. According to Haymaker (1961) severity and frequency of those necrotic foci in Western equine and Murrey valley encephalitides are occasionally identical to those of encephalitis Japonica, while St Louis encephalitis occurs infrequently and less severely similar foci. Exact comparison of those foci among arthropod-borne encephalitides remains to future.

Certain circulatory disturbance process may be responsible for the developmental mechanism of those necrotic foci in the following reasons; close spacial relationship to cortical arterial vessels is frequently identified, while no remarkable change of those vessels, except for pyknotic, degenerated intimal nuclei, is found, and, thus, focal, functional vasospasm may have a significance; severely disintegrated nerve cells with ischemicshrunkened remainders which are not infrequently oppressed to marginal area of foci as well as spongy tissue disruption are visualized within foci. The latter may suggest certain serrophagic process from impaired blood-brain barrier of central vessel. A question then may arise as to whether this type of functional circulatory disturbance could be related to viral multiplication of intracerebral vessel walls or not. As far as the results of experimentally-induced encephalitis Japonica with fluorescent antibody technique (1965) and electronmicroscopic observation (1965) obtained up to date are concerned, virus particles are restricted to cytoplasm of nerve cells, but never found in vessel wall.

As afore-mentioned in detail, perivascular cell cuffs and cellular nodules are, as a rule, of a reversible character, while rarefaction necrotic foci, of an irreversible one which can play an important role for the development of sequelae in survivors. Other types of circulatory disturbances take place from acute to subchronic stage, result irreversible tissue damages not only in grey matter but also in white matter alike, and can cause further accentuation of sequelae of patients. This clearly indicates that active treatments for impaired cerebral circulations from acute to subchronic stage of the disease can contribute to a reduction of sequelae, particularly considering the fact that we at present have had no essential treatments for primary disease process.

Another type of further exaggeration of sequelae may be of re-infectious process, because case 4 with 37 days duration suggests such as possibility clinico-pathologically. However, nothing has been certain as

to a possibility in that attenuated virus of encephalitis Japonica in a form of latent infection can survive for many years in central nervous system of humans and develop occasionally re-infectious process. Parkinsonian syndrome of encephalitis Japonica is, as a rule, stationary or tends to improve even in a minimal degree during longstanding clinical course, and is differentiated from that of postencephalitic process of Economo's type. So far, such a possibility may be less, but still needs further investigation in future.

As has been discussed in our previous publication (Shiraki et al. 1963), there are a number of clinical types of encephalitis Japonica, such as meningitic, abortive, bulbo-paretic, initiated by myelitic disturbances, provoked by trauma and inapparent infection, except for typical type. It has been estimated that 500 to 1 000 inapparent infections can develop for each one case of apparent infection, and, thus, comprize a major portion of iceberg under sea level in number. Neuropathology of those different types of the illness has been absent or exceedingly rare. In addition, it is no doubt that virus of encephalitis Japonica is conspicuously neurotropic, but a question as to whether virus multiplication is restricted to both central and peripheral nervous systems of which the latter neuropathology has been very poorly investigated or can develop in other visceral organs has not yet been settled finally. A comprehensive investigation on both human and experimental materials from those viewpoints still remains to future.

Aknowledgement: The author would like to express his warm appreciation to a number of Japanese scientists: Drs. A. Goto, T. Hirayama, K. Ishii, T. Miura and M. Kitaoka for their kind agreements in using their data. The autor is particularly indebted to Professor S. Takeya, Department of Psychiatry, Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, Dr. S. Totzuka, Department of Psychiatry, Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, Dr S. Totzuka, Department of Psychiatry, Chiba University School of Medicine, Chiba; Drs. T. Ishii and S. Hamada, Division of Neuropathology, Matsuzawa Metropolitan Hospital, Tokyo; Dr. N. Mukai, Forensic Institute, Tokyo and Dr. K. Akai, Department of Pathology, Nippon University School of Medicine, Tokyo, for their kind cooperations in using their autopsy materials.

H. Shiraki

NEUROPATHOLOGIA JAPOŃSKIEGO ZAPALENIA MÓZGU U LUDZI,  
ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM POSTACI PODPRZEWLEKŁYCH  
I PRZEWLEKŁYCH

Streszczenie

We wstępie pracy autor omawia podstawowe dane epidemiologiczne, dotyczące japońskiego zapalenia mózgu w okresie ostatnich lat.

Szczegółowe dane dotyczące epidemiologii choroby, jej obrazu klinicznego i morfologicznego w okresie ostrym i podostrym, oraz leczenia i zapobiegania stanowiły przedmiot wcześniejszych prac autora (Shiraki 1948, Shiraki i współ. 1963). Przedmiotem niniejszego opracowania jest wyłącznie patomorfologia podprzewlekłych i przewlekłych postaci japońskiego zapalenia mózgu, jako przyczynek do poznania podłoża objawów zejściowych choroby.

Omawiany materiał obejmuje łącznie 9 przypadków w grupie podprzewlekłej (1—4 miesiące od zachorowania) i 2 przypadki w grupie przewlekłej (8—12 lat od zachorowania).

Dla całości obrazu autor omawia również patomorfologię 25 przypadków w grupie ostrej (3—9 dzień choroby) i 5 w grupie podostrej (11—18 dzień choroby).

Podstawowym elementem patomorfologicznym w grupie ostrej są okołonaczyniowe nacieki zapalne, grudki glejowe i ogniska martwicy występujące przede wszystkim w istocie szarej.

Nacieki okołonaczyniowe składają się przede wszystkim z limfocytów, wielojądrazstych leukocytów i komórek monocytarnych, zgromadzonych głównie w przestrzeni okołonaczyniowej i rzadko przekraczających jej granice. Obecne są limfocytarne nacieki w oponach.

Grudki komórkowe zbudowane są z pobudzonych komórek Hortegi i w mniejszym stopniu leukocytów (głównie wstępny okres choroby). Są one skupione dookoła naczyń lub leżą luźno w tkance, zajmując przede wszystkim korę i formacje szare podkorowe. Przeważają w korze amonalnej, bocznych jądrach wzgórza i w poduszce oraz w istocie czarnej.

Ogniska martwicy zwykle mają wygląd różnej wielkości zlewających się zgąbceń (widocznych już makroskopowo) wykazujących wyraźny związek z naczyniami. Występują one najczęściej w głębokich warstwach kory (kora amonalna, skroniowa, czołowa, potyliczna) i w mózdzku. Pęczki bywa również zajęte. Pień i rdzeń są zwykle nie zajęte. Często współprzebiegają z nimi naczyniopochodne uszkodzenia tkanki.

Grupę przypadków o podostrym przebiegu cechuje zmniejszenie ilości i natężenia nacieków zapalnych i grudek glejowych, a pogłębienie procesów rozpadowych w ogniskach martwicy do stadium rozbiórki. Pojawiają się komórki plazmatyczne. W obrazie przypadków podprzewlekłych dominują ogniska rozrzedzeń martwiczych, dotyczące przede wszystkim jąder bocznych, brzuszno-bocznych i grzbietowo-przyśrodkowych jąder wzgórza, poduszki, kory amonalnej i innych okolic korowych oraz istoty czarnej. Uderza rozpad komórek nerwowych zawierających melanię. W zaawansowanych ogniskach rozpadu występuje proces glejowacenia. Większość ognisk stanowi zejście martwiczych zmian z okresu ostrego, ale część powstaje z rozpadu zlewających się grudek komórkowych. Zmniejsza się natomiast ilość lub zanikają w ogóle nacieki okołonaczyniowe i grudki komórkowe. Pogłębiają się również uszkodzenia tkanki pochodzenia naczyniowego, a nawet pojawiają się świeże zmiany naczyniopochodne przyczyniając się do dalszego uszkodzenia tkanki nerwowej. Te ostatnie mogą występować w związku z powikłaniami płucno-sercowymi towarzyszącymi zapaleniu mózgu.

Grupę przewlekłą choroby charakteryzuje występowanie rozległych ognisk zbliznowacenia tkanki, z tworzeniem torbieli pomartwiczych. Ogniska uszkodzenia dotyczą głównie wzgórza, istoty czarnej i kory amonalnej. Brak zmian zapalnych. Blizny mają charakter glejowo-mezodermalny.

Autor uważa, że podstawowym morfologicznym kryterium diagnostycznym jest charakterystyczny rozkład uszkodzeń (szczególnie typowe jest zajęcie przedniej

części istoty czarnej, bocznych i poduszkowych jąder wzgórze). Nacieki okołonaczyniowe i grudki komórkowe, nie różniące się morfologicznie od innych wirusowych zapaleń mózgu, są charakterystyczne jedynie pod względem topografii.

Charakterystyczne natomiast są ogniska rozrzedzeń martwiczych. Wydaje się, że za ich pochodzenie odpowiedzialne są zaburzenia naczynioruchowe. Te ogniska martwicy, jak i zmiany o charakterze niewątpliwie naczyniopochodnym, obejmujące zarówno istotę szarą jak i białą, są odpowiedzialne za kliniczny zespół zejściowy choroby, utrzymujący się po ustąpieniu okresu ostrego i podostrego. Jeszcze jednym czynnikiem precypitującym zespół zejściowy może być ponowne zakażenie; choć ta sprawa wymaga dalszych obserwacji.

## X. Ширази

### НЕВРОПАТОЛОГИЯ ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА У ЛЮДЕЙ С ОСОБЫМ УЧЕТОМ СУБХРОНИЧЕСКИХ И ХРОНИЧЕСКИХ ФОРМ

#### Содержание

В введении автор приводит основные данные японского энцефалита за последние годы.

Частные данные по эпидемиологии заболевания, его клиническая и морфологическая картина в остром и подостром периоде, а также лечение и профилактика являлись предметом предварительных работ автора (Ширази 1948, Ширази и сотр. 1963). Предметом настоящей работы является исключительно патоморфология субхронических и хронических форм японского энцефалита, как введение к вопросу о сущности исходных явлений заболевания.

Материал автора состоит вообще из 9 случаев в субхронической группе (1—4 месяца от начала болезни) и из 2-ух случаев в хронической группе (8—12 лет от начала болезни).

Для пополнения картины рассматривается также 25 случаев в острой группе (3—9 день болезни) и 5 — в подострой группе (11—18 день болезни).

Основным патоморфологическим элементом в острой группе являются околососудистые воспалительные инфильтраты, глиевые комки и очаги некроза, расположенные главным образом в сером веществе.

Околососудистые инфильтраты состоят прежде всего из лимфоцитов, многоядерных лейкоцитов и моноцитных клеток, локализованных главным образом в околососудистом пространстве и редко переходящих за его пределы. Лимфоцитные инфильтраты располагаются также в мозговых оболочках.

Клеточные комки состоят из возбужденных клеток Ортеги и в меньшей степени из лейкоцитов (в основном начальный период заболевания). Они концентрируются вокруг сосудов либо свободно лежат в ткани, захватывая прежде всего кору и серые субкортикальные структуры. Преобладают в амональной коре, латеральных ядрах таламуса и в подушке, а также в сером веществе.

Очаги некроза характеризуются обычно разными по величине сливающимися спонгиозными перерождениями (заметными сакроскопически), с отчетливым отношением к сосудам. Они преимущественно располагаются в более глубоких слоях коры (амональная кора, темпоральная, фронтальная, окципитальная)

и в мозжечке. Иногда поражается и стриатум. Ствол и спинной мозг обычно не затрагиваются. Часто им сопутствуют вазогенные повреждения ткани.

Группа случаев с подострым течением характеризуется меньшим количеством и меньшей интенсивностью воспалительных инфильтратов и глиевых комков, но усугублением процессов распада в очагах некроза. Появляются плазматические клетки. В картине субхронических случаев преобладают очаги некротических расслаблений, относящихся прежде всего к латеральным ядрам, вентро-латеральным и дорзо-латеральным ядрам таламуса, подушке, амональной коре и к другим кортикальным областям, а также к черному веществу. Обращает внимание распад нервных клеток, содержащих меланин. В более продвинутых очагах распада формируется процесс глиоза. Большинство очагов представляет собой исход некротических изменений острого периода, однако часть из них образуется из распада сливающихся клеточных комков. Зато уменьшается количество, либо даже вовсе исчезают околосоудистые инфильтраты и клеточные комки. Усугубляются повреждения ткани вазогенного характера, и даже появляются свежие вазогенные изменения, что способствует дальнейшему повреждению нервной ткани. Последние могут появляться в связи с сердечно-легочными осложнениями, сопутствующими энцефалиту.

Хроническую группу случаев характеризует наличие обширных очагов рубцевания ткани, с образованием субнекротических кист. Очаги повреждения имеют отношение главным образом к таламусу, черному веществу и амональной коре. Отсутствуют воспалительные изменения. Рубцы носят глио-мезодермальный характер.

Автор считает, что основным морфологическим критерием диагноза является характеристическое распределение повреждений (весьма типично поражение переднего участка черного вещества, латеральных ядер и ядер подушки таламуса). Околосоудистые инфильтраты и клеточные комки, не отличаются от других вирусных энцефалитов характеристичны только с топографической точки зрения.

Весьма специфичны очаги некротических расслаблений. Следует предполагать, что их наличие обусловлено сосудодвигательными расстройствами. Эти очаги некроза, равно как и истинно вазогенные изменения, охватывающие серое и белое вещества оказывают свое влияние на клинический комплекс конечной фазы болезни, продолжающейся после преодоления острого и подострого периода. Дополнительным фактором предопределяющим исходной комплекс заболевания может являться реинфекция; хотя этот вопрос требует дальнейших наблюдений.

#### REFERENCES

1. Goto, A.: Prognosis of Japanese encephalitis. Follow-up study of the patients in 1948 and 1949. *Psychiat. et Neurol. Jap.* (Japanese edition), 1953, 54, 722—735. Follow-up study of long duration of Japanese encephalitis. *Ibid.*, 1957, 59, 147—182. A long duration follow-up study of Japanese encephalitis. *Ibid.*, 1962, 64, 236—266.
2. Naymaker, W.: Mosquito-borne encephalitides. *Encephalitides*, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Princeton. 1961, 38—56.
3. Hirayama, T.: Epidemiology of encephalitis Japonica. *Saishin Igaku*. (Japanese edition).

4. Ishii, K.: Encephalitis Japonica from clinical viewpoint. Saishin Igaku, 1962, 17, 1312—1320. (Japanese edition).
5. Kitaoka, M., and his arbor virus study group: Sero-epidemiology of Japanese B encephalitis in Hokkaido. Seminar on Japanese B encephalitis and other arthropod-borne virus infections, World Health Organization, November 1962, Tokyo.
6. Miura, T., and M. Kitaoka: Immunological epidemiology of Japanese encephalitis in Hokkaido. Virus. 1955, 5, 62—73. (Japanese edition).
7. Oyanagi, S.: An electron microscope study on the fine structures of cerebral cortex in the mouse infected with Japanese encephalitis virus, II. Colloquium on Actual Encephalitides, Warsaw, Sept. 15—16, 1965. Neuropat. Pol., 1966, IV, 457—463.
8. Shiraki, H.: Neuropathology of encephalitis Japonica with especial reference to the material at the great epidemic in 1948, Tokyo. Saishin Igaku, 1962, 17, 1285—1311. (Japanese edition).
9. Shiraki, H., Goto, A., et H. Narabayashi: État passé et présent de l'encéphalite japonaise au Japon. Revue Neurol., 1963, 108, 633—696.
10. Shiraki, H.: Neuropathology on circulatory disturbances with especial reference to ischemic process. Brain & nerve, 1965, 17, 213—222. (Japanese edition).
11. Shiraki, H., Yamamoto, T., Otand, S., and Kusano, N.: A comparative study of the evolution of viral infection in herpes simplex encephalitis, rabies and encephalitis Japonica by means of fluorescent antibody. II. Colloquium on Actual Encephalitides, Warsaw, Sept. 15—16, 1965. Neuropat. Pol., 1966, IV, suppl.

#### DESCRIPTION OF THE ILLUSTRATIONS

*Fig. 6.* Acute stage. *A* — 59 aged female, 4 days duration, 1948, Tokyo. Moderate lymphocytic infiltration in temporal meninges.  $\times 74$ . *B* — 16 aged male, 4 days duration, 1952, Fukuoka. Putamen. High-grade lymphocytic infiltration in perivenous space.  $\times 68$ . *C* — 10 aged female, 4 days duration, 1958, Fukuoka. Anterior thalamus. Compact cellular nodules, diffuse cell proliferation, slight perivascular cell cuffs, and well-preserved nerve cells.  $\times 65$ . *D* — Higher magnification of cellular nodule in *C*. Cellular elements consisting mainly of slightly activated rod cells and less number of polymorphonuclear leukocytes. Adjacent nerve cell (arrows).  $\times 560$ ; *E* — 11 aged male, 5 days duration, 1948, Tokyo. Substantia nigra. Cellular proliferation of both nodular and loose natures. Still-preserved pigmented cells of which a great majority develop neuronophagia.  $\times 86$ . *F* — 7 aged female, 5 days duration, 1958, Fukuoka. Cervical cord. Perivascular cell cuffs, coalescing cellular nodules and diffuse cell proliferation in entire grey matters, predominant in antero-lateral horns. Less number of them in white matter too.  $\times 9.0$ . *G* — Higher magnification of anterior horn in *F*. Typical neuronophagia consisting mainly of activated rod cells.  $\times 357$ . (*A* — *G* — Thionine).

*Fig. 7.* Acute stage. *A* — 7 aged male, 5 days duration, 1963, Tokyo. Prefrontal lobe. Sharply-demarcated, different-sized, multiple rarefaction necrotic foci restricted to different parts of cortices.  $\times 1.8$ . *B* — (8 aged female, 4 days duration, Tokyo) Multiple, coalescing rarefaction necrotic foci in thalamus, red nucleus (RN) and substantia nigra (SN), particularly predominant in lateral thalamic nucleus (LTh). Perivascular cell cuffs and cellular nodules in other areas.  $\times 3.2$ . *C* — 25 aged female, 5 days duration, 1948, Fukuoka. Parietal cortex. Large rarefaction necrotic focus closely relating to arterial vessel (arrows). Activated rod cells and remaining nerve cells with neuronophagia within the lesion.  $\times 100$ . *D* — Same case as in *A*. Frontal-cut through posterior commissure (PC). Different-sized, multiple necrotic foci in pulvinar thalami (PTh), red nucleus (RN) and substantia nigra (SN). CP; cerebral peduncle.  $\times 3$ . (*A*, *D* — Woelcke myelin. *C*, *D* — H.E.)

*Fig. 8.* Acute stage. *A* — Same case as in Fig. 6C. Multiple, coalescing hemorrhages in anterior thalamus.  $\times 72$ . *B* — 34 aged female, 11 days duration, 1948, Tokyo. Frontal white matter. Periadventitial plasmic transudation on vessel with moderate perivascular cell cuffs.  $\times 150$ . *C* — 9 aged female, 8 days duration, 1948, Tokyo. Border area of dorsomedial thalamus (DMTh) to lateral one (LTh). Band-like hemorrhages and plasmic transudation in medullar laminae in particular (ML).  $\times 47$ . *D* — 17 aged female, 7 days duration, 1948, Tokyo. Hemorrhages in cerebellar meninges.  $\times 68$ . *E* — 7 aged female, 5 days duration, 1948, Tokyo. Pseudolaminarily distributed tissue disruption in upper third layer of temporal cortex.  $\times 57$ . (*A* — *E* — H.E.)

*Fig. 9.* Subacute stage. *A* — 8 aged male, 11 days duration, 1948, Tokyo. Frontal gyri. Coalescing, severe cortical necrosis predominant from gyral wall to depth of sulci. Cellular nodules and perivascular cell cuffs distributed diffusely in both cortices and subcortical white matter.  $\times 2.2$ . *B* — 5 aged male, 9 days duration, 1948, Tokyo. Temporal cortex. Roundly-shaped necrotic focus with pronounced cellular mobilization.  $\times 120$ . (*A*, *B* — Thionine).

*Fig. 10.* Subacute stage. *A* — Same case as in Fig. 9A. Caudal thalamus. Multiple necrotic foci with pronounced cellular mobilization in a coalescence as well as perivascular cell cuffs. CC; corpus callosum.  $\times 4.5$ . *B* — Lower magnification of necrotic focus in *A*. Large number of gitter cells and perivascular cell cuffs mainly of plasma cell nature.  $\times 97$ . (*A* & *B*; Thionine).

*Fig. 11.* Subchronic stage. (Case 1 in Table 3). *A* — Substantia nigra. Large number of phagocytic cells laden with melanin pigments derived from damaged nigral cells. Pronounced proliferation of both rod- and astrocytic cells.  $\times 80$ . *B* — Higher magnification of *A*. Similar to *A*.  $\times 460$ . *C* — Ammon's horn. Circumscribed nerve cell disintegration and cellular proliferation in Sommer's sector and presubiculum.  $\times 9.5$ . (*A* — *C* — Thionine.)

*Fig. 12.* Subchronic stage (Case 1 in Table 3). *A* — Lower magnification of area in Fig. 11C (arrows). Severe nerve cell disintegration, hypertrophic astrocytic- and activated rod cell proliferations, and manifested vessel walls.  $\times 105$ . *B* — Glial shrubberies of activated rod cell nature in cerebellar molecular layer.  $\times 170$ . *C* — Inferior olivary nucleus. Diffuse cell activation in a slight degree, but no particular nerve cell disintegration, except for one neuronophagia (arrow).  $\times 140$ . (*A* — *C* — Thionine.)

*Fig. 13.* Subchronic stage (Case 2 in Table 3). *A* — Frontal cortex. Conspicuously-shrunken nerve cells in all layers and loose cellular nodule (arrows).  $\times 86$ . *B* — Higher magnification of *A*. Darkly-stained nuclei and eosinophilic cytoplasm of nerve cells with dilated perineuronal spaces. Sieve-like, spongy tissue disruption too.  $\times 1100$ . (*A* — Thionine. *B* — H.E.)

*Fig. 14.* Subchronic stage (Case 3 in Table 3). *A* — Third layer of occipital cortex. Obscurely-defined cellular proliferation, diffuse activation of rod cells and relative preservation of nerve cells.  $\times 97$ . *B* — Lower magnification of *A*. Roundly-shaped lesion consisting of activated rod- and granule cells.  $\times 48$ . *C*. Diffusely-activated microglial cells in cerebellar molecular layer.  $\times 56$ . (*A* — H.E. *B*, *C* — Hortega.)

*Fig. 15.* Subchronic stage (Case 4 in Table 3). *A* — Substantia nigra. Moderately disintegrated pigmented cells, fair number of neuronophagia, less pronounced perivascular cell cuffs and diffuse cell proliferation.  $\times 86$ . *B* — Sommer's sector of Ammon's horn. Periadventitial cell migration of both compact and loose natures.  $\times 97$ . *C* — Moderate lymphocytic infiltration in hippocampal meninges.  $\times 130$ . *D* — Fourth ventricular base of mid-pons. Diapedetic hemorrhages in a coalescence.  $\times 74$ . (*A*, *B* — H.E. *C* — Thionine. *D* — Woelcke myelin.)

*Fig. 16.* Subchronic stage (Case 5 in Table 3). *A* — Frontal-cut through red nucleus (RN). Patchy demyelinated foci particularly predominant in dorsal part of lateral thalamus (LTh) (arrows).  $\times 1.9$ . *B* — Higher magnification of focus in *A*. Coarse pseudocalcareous concretions phagocytized by multinuclear giant cells of Langerhans' type. Perivascular lymphocytic infiltration in a slight degree (arrows).  $\times 460$ . *C* — Lower magnification of focus in *A*. Nerve cell disintegration, coarse spongy tissue disruption and minimal perivascular cell cuffs.  $\times 90$ . (*A* — Woelcke myelin. *B*, *C* — H.E.)

*Fig. 17.* Subchronic stage. (Case 6 in Table 3). *A* — Sharply demarcated, large confluent softening foci in lateral thalamus (LTh), with tiny ones in dorsomedial (DMTh) and anterior thalamus (ATH).  $\times 2.1$ . *B* — Lower magnification of foci in *A*. Coarse spongy tissue disruption, and pseudocalcareous deposition on nerve cells and lying free in parenchyma.  $\times 110$ . *C* — Higher magnification of foci in *A*. Multinuclear giant cell and homogeneously eosinophilic body of dystrophic neuroaxonal origin (arrows).  $\times 917$ . (*A* — Sugamo myelin. *B*, *C*, — H. E.)

*Fig. 18.* Subchronic stage (Case 6 in Table 3). *A* — Large necrotic foci with dense cellular accumulation in diffusely deteriorated parietal cortex.  $\times 22$ . *B* — Diffuse nerve cell disintegration in a high degree and manifested vascular network.  $\times 62$ . *C* — Higher magnification of *B*. Still remained, darkly-shrunkened nerve cells.  $\times 1100$ . *D* — Parietal gyrus. Diffuse demyelination in white matter and severely damaged cortical myeloarchitecture.  $\times 2.9$ . *E* — Lower magnification of cortical area in *D* (arrows). Both confluent and tiny hemorrhagic foci of recent origin.  $\times 28$ . *F* — Lower magnification of white matter in *D*. Multiple, tiny cellular nodules relating to vessel walls.  $\times 22$ . *G* — Higher magnification of *F*. Central fibrinous transudation and marginal glial-wall formation.  $\times 460$ . (*A* — Thionine. *B*, *C*, *E*, *F*, *G* — H.E. *D* — Woelcke myelin.)

*Fig. 19.* Subchronic stage. (Case 8 in Table 3). *A* — Both confluent and tiny demyelinated foci in anterior (ATH) and lateral thalamus (LTh).  $\times 46$ . *B* — Substantia nigra. Severely disintegrated pigmented cells and large number of phagocytic cells laden with melanin pigments derived from damaged nigral cells.  $\times 40$ . *C*. Globus pallidus. Confluent demyelinated lesion in dorsal part of outer portion (arrows).  $\times 5.0$ . *D* — Putamen. Circumscribed cystic focus with scanty gitter cell mobilization relating closely to hyalinously-degenerated vessel wall (arrows).  $\times 120$ . *E* — Caudate nucleus. Conspicuously-thickened venous vessel wall of looping nature with scanty cell infiltration.  $\times 92$ . *F* — Slight to moderate intimal proliferation of different-calibered meningeal vessels of arterial nature.  $\times 133$ . (*A*, *C* — Woelcke myelin. *B* — Thionine. *D*, *E*, *F* — H.E.)

*Fig. 20.* Subchronic stage. (Case 9 in Table 3). *A* — Diffuse or patchy, widespread demyelinated foci in white matter and fornix. Severely-disintegrated thalamic nuclei and cystic cavities particularly in dorsomedial (DM). Conspicuous atrophy of cortices and dilatation of lateral ventricles. Cross indicates artefact.  $\times 1.2$ . *B* — Lateral thalamus in *A*. Lesion consisting of coalescent pseudocalcareous concretions centrally and spongy tissue disruption peripherally, surrounded by granulomatous tissue response. Dilated perivascular space filled with lymphocytes and gitter cells.  $\times 140$ . *C* — Higher magnification of area in *A* (arrows). Typical giant cell of Langerhans' type.  $\times 950$ . *D* — Same area as in *B*. Typical, large giant cell of Langerhans' type and small one containing a coarse pseudocalcareous concretion.  $\times 950$ . *E* — Prefrontal lobe. Widespread, diffuse demyelination in white matter and cystic cortical degeneration at latero-dorsal convexity.  $\times 1.3$ . (*A*, *E* — Woelcke myelin. *B*, *C*, *D* — H.E.)

*Fig. 21.* Subchronic stage. (Case 9 in Table 3). *A* — Substantia nigra. Highly-disintegrated pigmented cells, glial cell proliferation and remaining nigra cell (arrow).  $\times 82$ . *B* — Same area as in *A*. Moderate perivenous lymphocytic infiltration.  $\times 120$ . *C* — Two foci in frontal cortex; gliomesenchymal cell proliferation on left and phagocytic cells laden with hemosiderin pigments on right.  $\times 82$ . *D* — Frontal cortex. Two circumscribed foci laden with large number of fat granule cells.  $\times 70$ . *E* — Lower magnification of cortical area in *Fig. 20E*. Sharply-demarcated, coalescent cystic cavities in cortex.  $\times 3.2$ . *F* — Higher magnification of foci in *E*. Less number



of calcified nerve cells.  $\times 160$ . *G* — Higher magnification of nerve cell in *F* (arrow). Calcified nerve cell surrounded by giant cell of which contour of abundant cytoplasm and one of nuclei are indicated by arrows and arrow with cross, respectively.  $\times 1000$ . (*A* — *C, E, F, G* — H.E. *D* — Sudan III.)

*Fig. 22.* Subchronic stage (Case 9 in Table 3). *A* — Lower magnification of dorso-lateral part of prefrontal lobe in *Fig. 20E*. Multiple, tiny, roundly-shaped foci with gliosis presumably originated from rarefaction necrotic foci, and coalescent gliosis and cystic cavities in cortices predominant from gyral wall to depth of sulci. Slight to intense, diffuse gliosis in white matter corresponding to diffuse demyelination in *Fig. 20E*. Crosses indicate anterior horn of lateral ventricle.  $\times 2.0$ . *B* — Higher magnification of focus indicated by arrow with cross in *A*. Central vessel with dilated perivascular space and granule cell accumulation, cavity formation periaxially and astrocystosis with coarse gliofiber proliferation marginally. Intense edge gliosis too.  $\times 100$ . *C* — Higher magnification of focus indicated by arrow with dot in *A*. Pronounced proliferation of glio-mesenchymal elements and granule cell accumulation centrally.  $\times 115$ . *D* — Moderate to intense gliosis in pulvinar thalami, Ammon's horn and temporal white matter. Crosses indicate artefact due to tissue softening. Dilated lateral ventricles (crosses).  $\times 2.0$ . (*A, B, C, D* — Holzer.)

*Fig. 23.* Subchronic stage (Case 9 in Table 3). *A* — Moderate intimal proliferation of meningeal artery.  $\times 83$ . *B* — Frontal cortex adjacent to *A*. Moderate nerve cell disintegration with ischemic-shrunken remainders.  $\times 72$ . *C* — Ring hemorrhage in pyramidal tract of pontine basis.  $\times 110$ . *D* — Globus pallidus. Severe nerve cell disintegration, coarse spongy tissue disruption, glio-mesenchymal fiber proliferation and less of granule cell mobilization.  $\times 100$ . *E*. Medial part of caudate nucleus. Large number of fat granule cells in parenchyma and perivascular spaces.  $\times 86$ . *F*. Lung. Plasmic transudation and migration of neutrophile leukocytes in alveolar structures.  $\times 100$ . *A* — van Gieson-elastica. *B, C, D* and *F* — H.E. *E* — Sudan III.)

*Fig. 24.* Chronic stage (Case 1 in Table 4). *A* — Frontal-cut right hemisphere through lateral geniculate body (LGB). Intense gliosis in anterior (*A*), dorsal portion of lateral (*L*) and dorso-medial thalamic nuclei (*DM*) as well as in medullar laminae. Ventral portion of lateral thalamus and centro median (*CM*) are free from gliosis. Intense gliosis also in Ammon's horn and substantia nigra (arrows), and both cortices and white matter of superior frontal gyri. Moderate to slight one of diffuse character in cerebral white matter too.  $\times 1.3$ . *B* — Pronounced cellular proliferation in medullar laminae. Comparatively well-preserved nerve cells in dorso-medial (*DM*) and lateral thalamic nuclei (*L*).  $\times 89$ . *C* — Lower magnification of superior frontal gyri in *A*. Severe cortical deterioration, particularly predominant from gyral wall to depth of sulci. *D* — Thalamic nuclei on left side. Minimal marmor-like gliosis in medullar laminae. *A*; anterior thalamus *DM*; dorso-medial thalamus *L*; lateral thalamus. (*A, D* — Holzer. *B, C* — Thionine.)

*Fig. 25.* Chronic stage (Case 1 in Table 4). *A* — Lower magnification of substantia nigra in *Fig. 23A*. Severest pigmented cell disintegration and glio-mesenchymal fiber proliferation.  $\times 84$ . *B* — Disintegration of cortical cytoarchitecture and cortical atrophy predominant from gyral wall to depth of sulci. Diffuse cellular increase in white matter too.  $\times 1.8$ . *C* — Frontal cortex at depth of sulcus. Pseudolaminar disintegration of nerve cells of recent origin in upper third later.  $\times 65$ . *D* — Pontine nuclei. Typical retrograde change of all nerve cells.  $\times 100$ . *E* — Higher magnification of *D*. Similar to *D*.  $\times 1100$ . *F* — Suggestive retrograde change of Beetz's giant cell in parietal cortex.  $\times 1050$ . (*A* — *F* — Thionine.)

*Fig. 26.* Chronic stage (Case 2 in Table 4). *A* — Frontal-cut through pulvinar thalami and midbrain. Severely-atrophic demyelinated lesions bilaterally in dorso-medial part of pulvinar thalami.  $\times 1.3$ . *B* — Same area as in *A*. Intense gliosis bilaterally in lesions of pulvinar thalami (*PTh*) in *A*, and slight one in other thalamic nuclei and substantia nigra on right (arrows). *CM*; centro median *LGB*; lateral geniculate body *RN*; red nucleus *CP*; cerebral peduncle.  $\times 1.3$ . *C* — Pulvinar lesion in *A*. Pronounced cellular increase in parenchyma and pseudocalcareous impregnation to remaining nerve cells.  $\times 89$ . *D* — Higher magnification of *C*. Deposition of pseudocalcareous granules in cytoplasm of nerve cells.  $\times 1100$ . *E* — Lateral

part of substantia nigra on right in A. Severely-disintegrated pigmented cells and pronounced focal proliferation of glial nuclei (arrows).  $\times 86$ . A, C, D — Woelcke myelin. B — Holzer. E — H.E.).

*Fig. 27.* Chronic stage (Case 2 in Table 4). A — Irregularshaped demyelination particularly in dorso-medial (DM) and dorsal part of lateral thalamic nuclei (L). A — anterior thalamus.  $\times 2.7$ . B — Same area as in A. Marmor-like intense gliosis corresponding to lesions in A. Slight one in other thalamic nuclei too.  $\times 2.7$ . C — Tumor mass (Tr) taken from left parietal region. Sharply-defined tumor surrounded by high-grade cellular increase and perivascular cell cuffs. Compare with *Fig. 28*.  $\times 2.2$ . D — Inside of tumor in C. Comparatively sharply-defined tumor mass of acinar formation consisting of homogeneously-eosinophilic, trabecular structures and radiary-arranged, fibrocytic cells.  $\times 100$ . E — Other area of tumor in A. Aggregation of fibro-hyalinous, conspicuously-thickened arterial vessel walls, irregular-shaped, calcareous masses and pronounced cellular increase in parenchyma.  $\times 96$  (A — Woelcke myelin. B — Holzer. C — E — H.E.)

*Fig. 28.* Schematic pattern of left hemisphere with tumor frontalcut through pulvinar thalami (Pul). Tumor mass locates subpially in inferior parietal gyrus, and is finger-tip in size, elastic dense, comparatively sharply-defined, surrounded externally by clouded, thickened meninges and internally by softened parenchyma which develops coalescent tissue deficit of artefact nature. Large, single cyst with smooth interior surface is restricted to white matter and spread from centrum semiovale at level of anterior commissure to occipital pole, and communicates with tissue deficit mentioned above (arrows). CC; corpus callosum PHV; posterior horn of lateral ventricle  $\times$  Approximately 1.0.

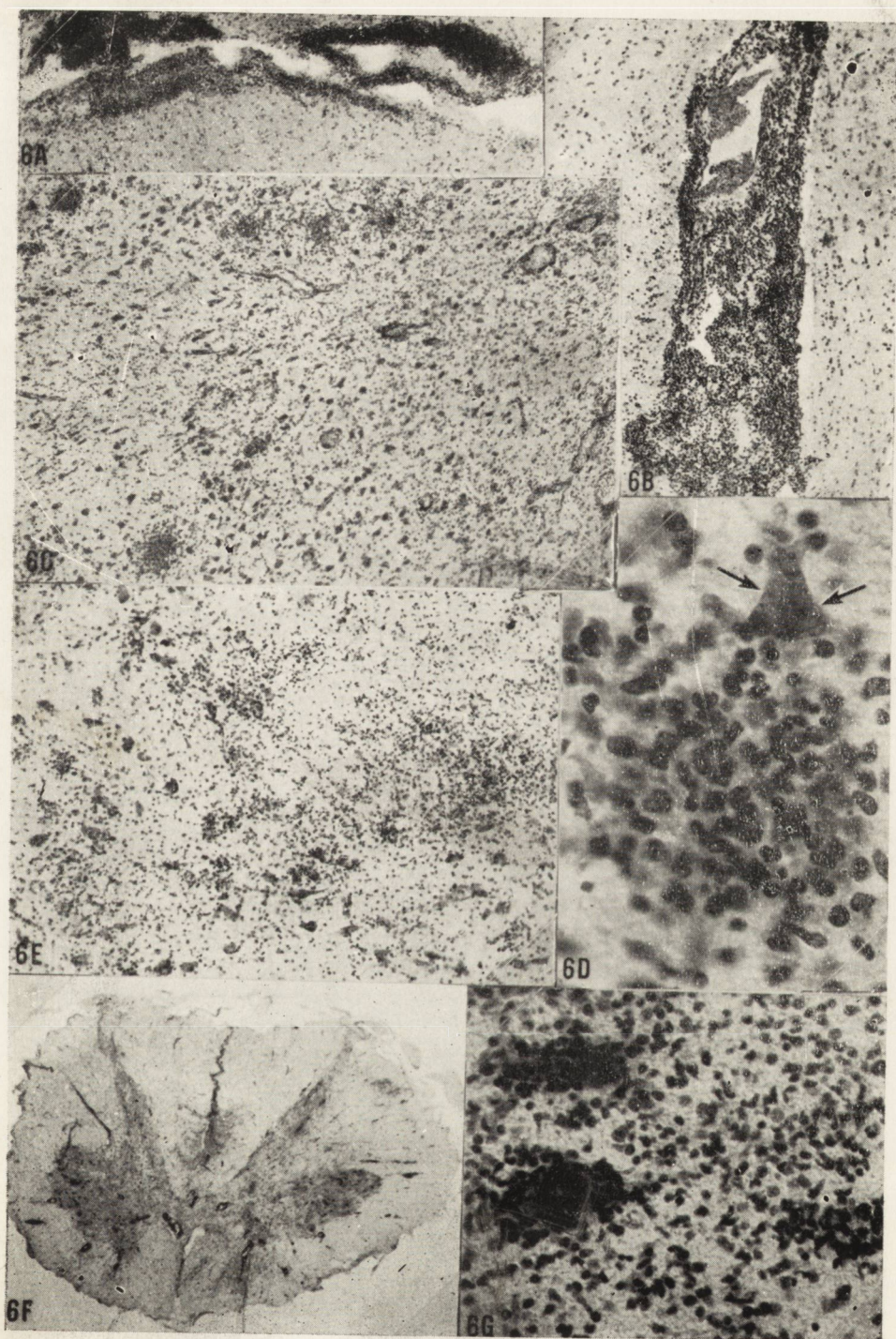


Fig. 6.

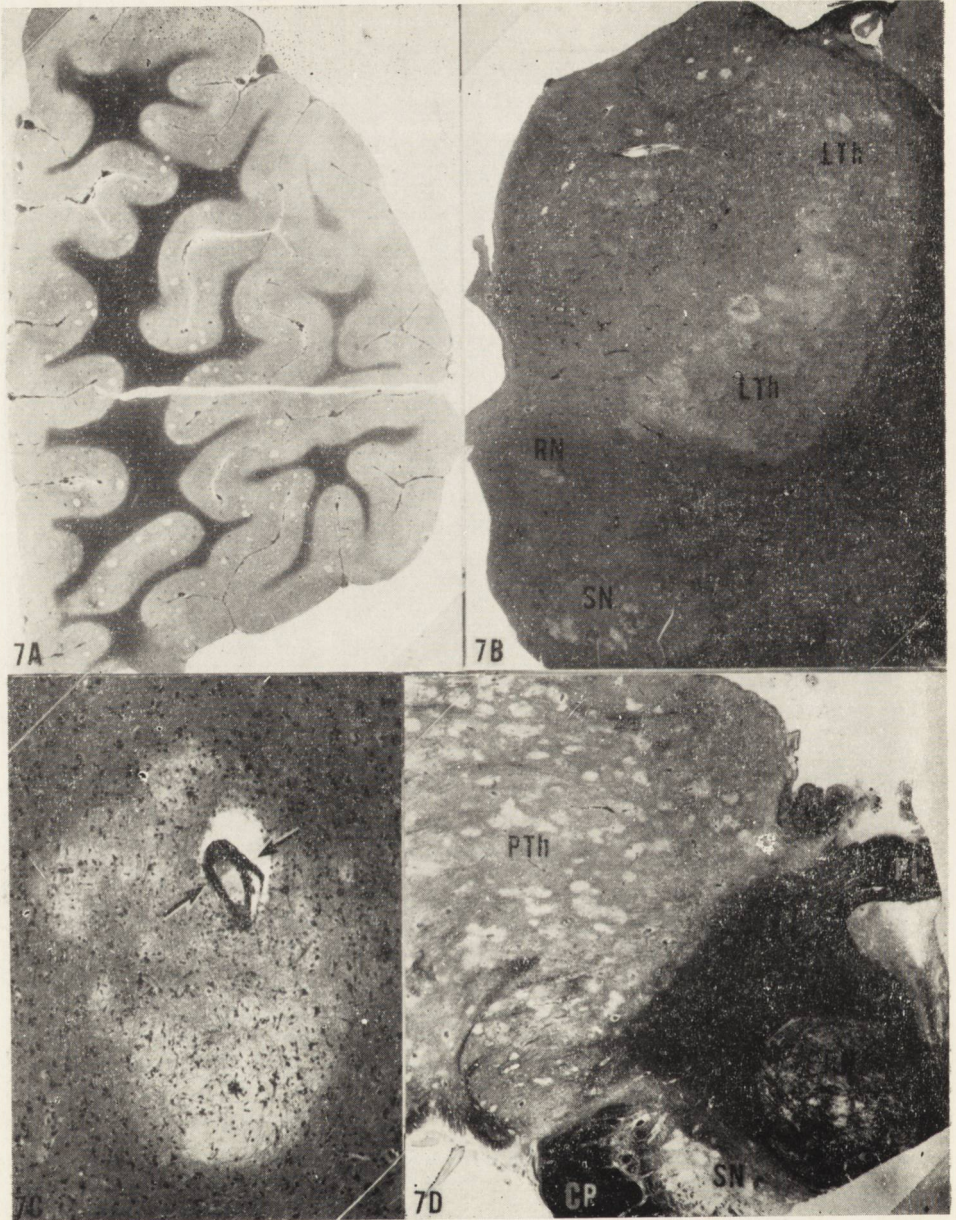
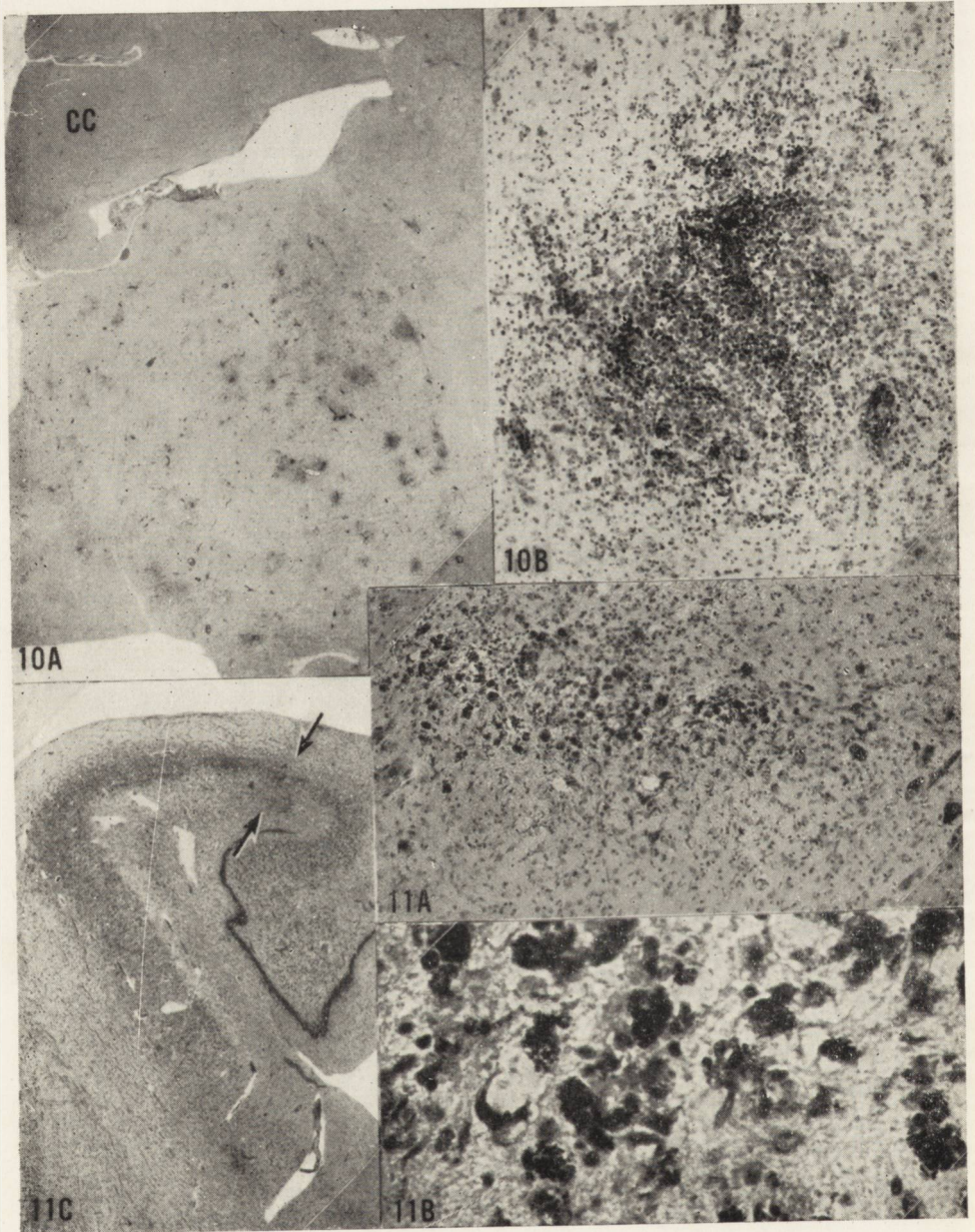


Fig. 7.



Fig. 8, 9.



*Fig. 10, 11.*

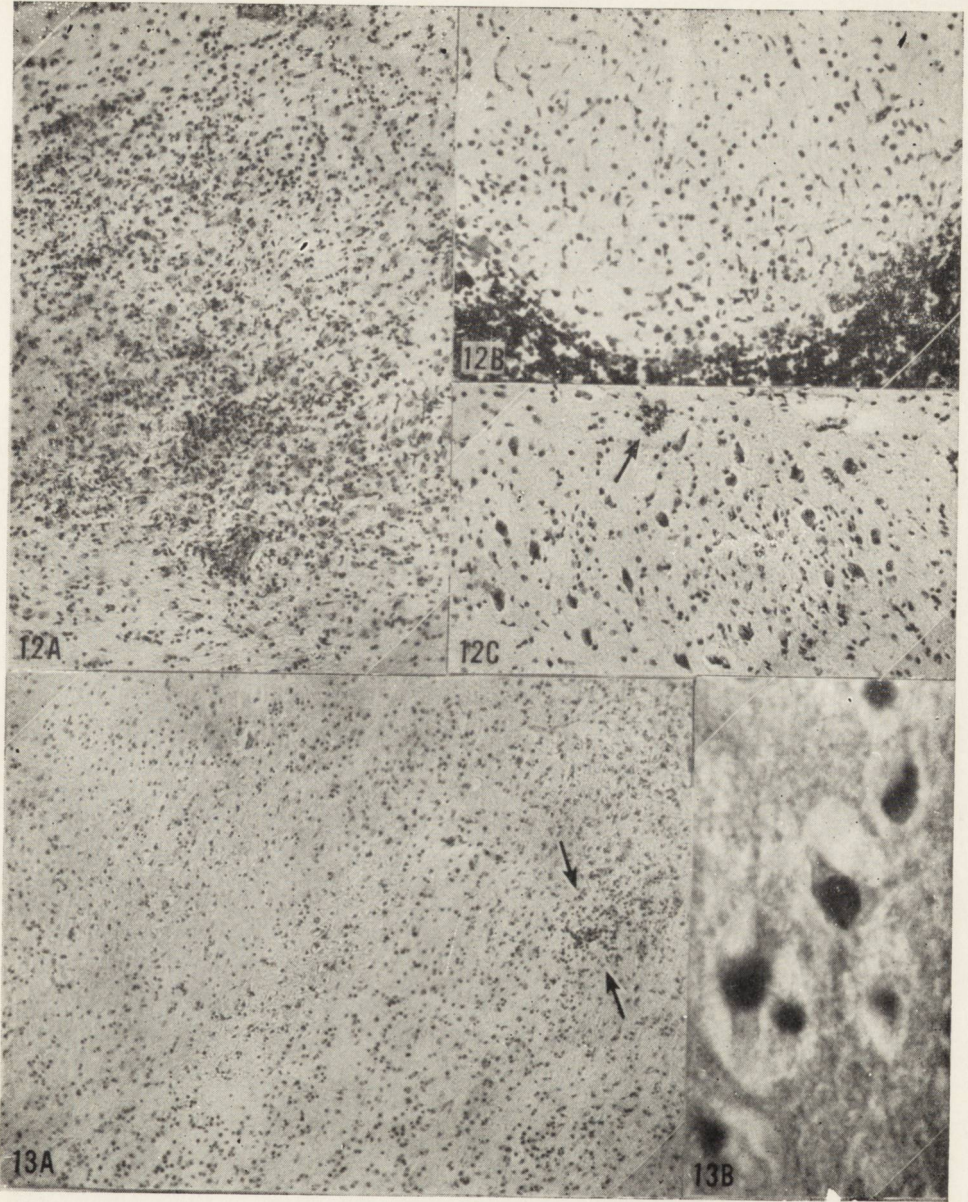
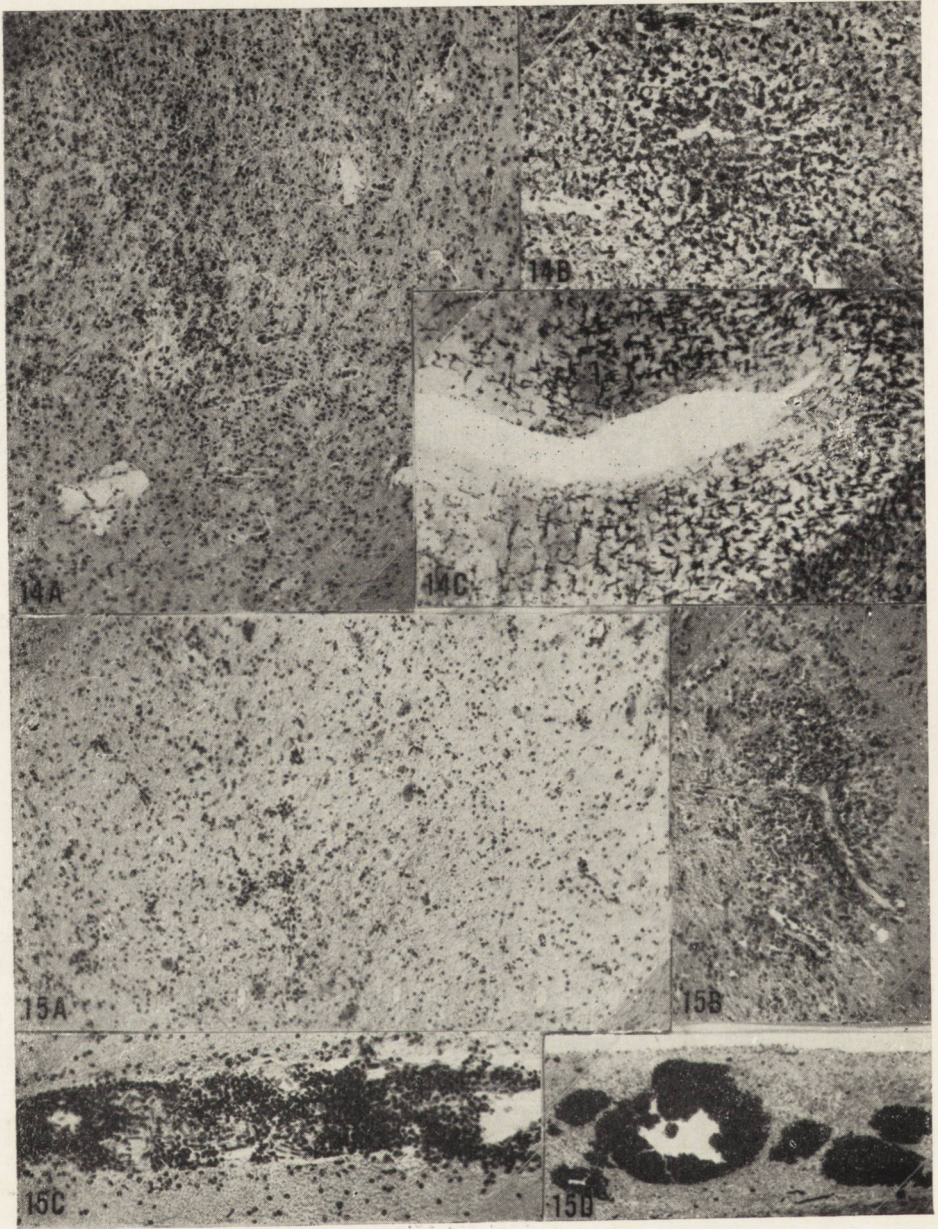


Fig. 12, 13.



*Fig. 14, 15*



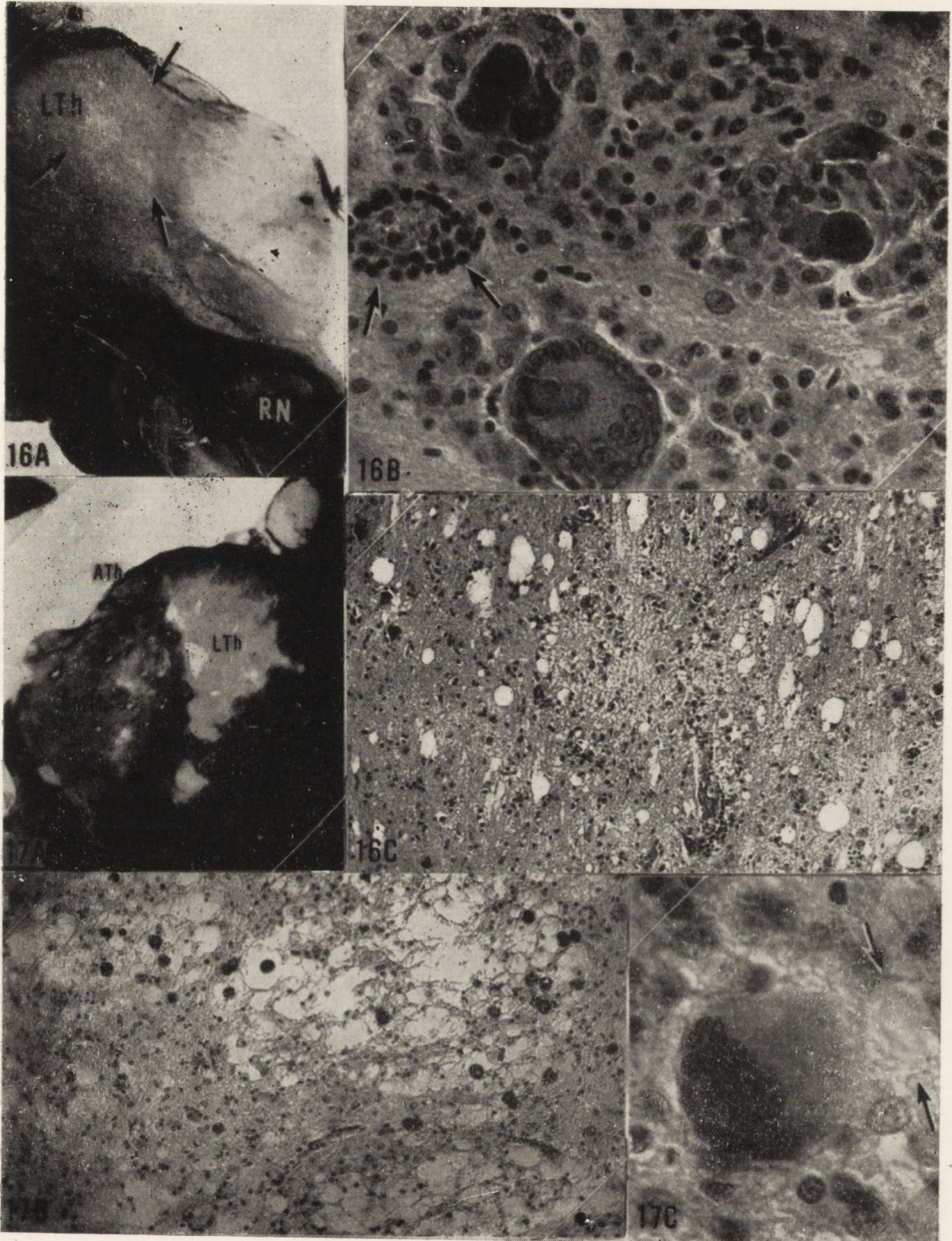
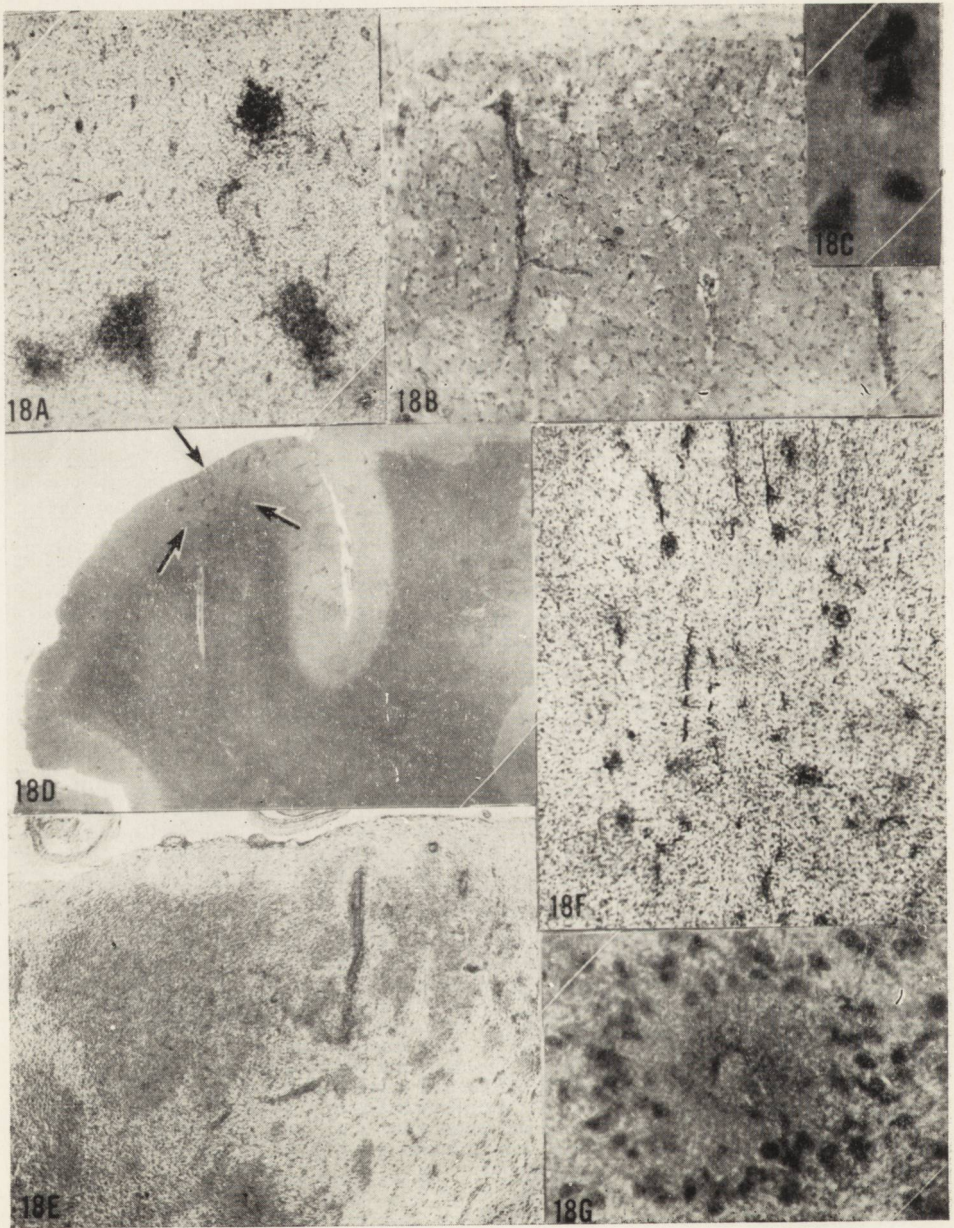


Fig. 16, 17



*Fig. 18.*

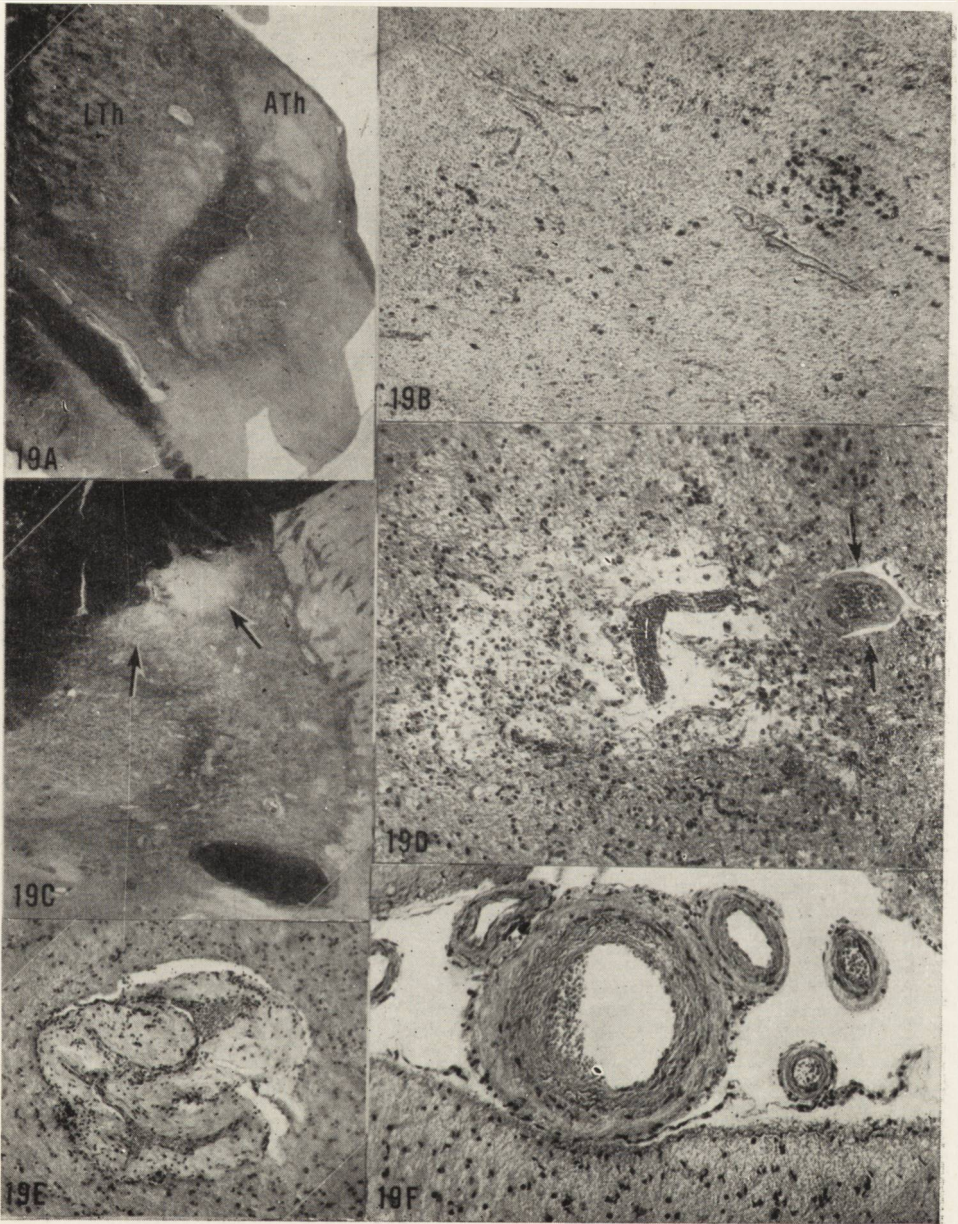


Fig. 19.

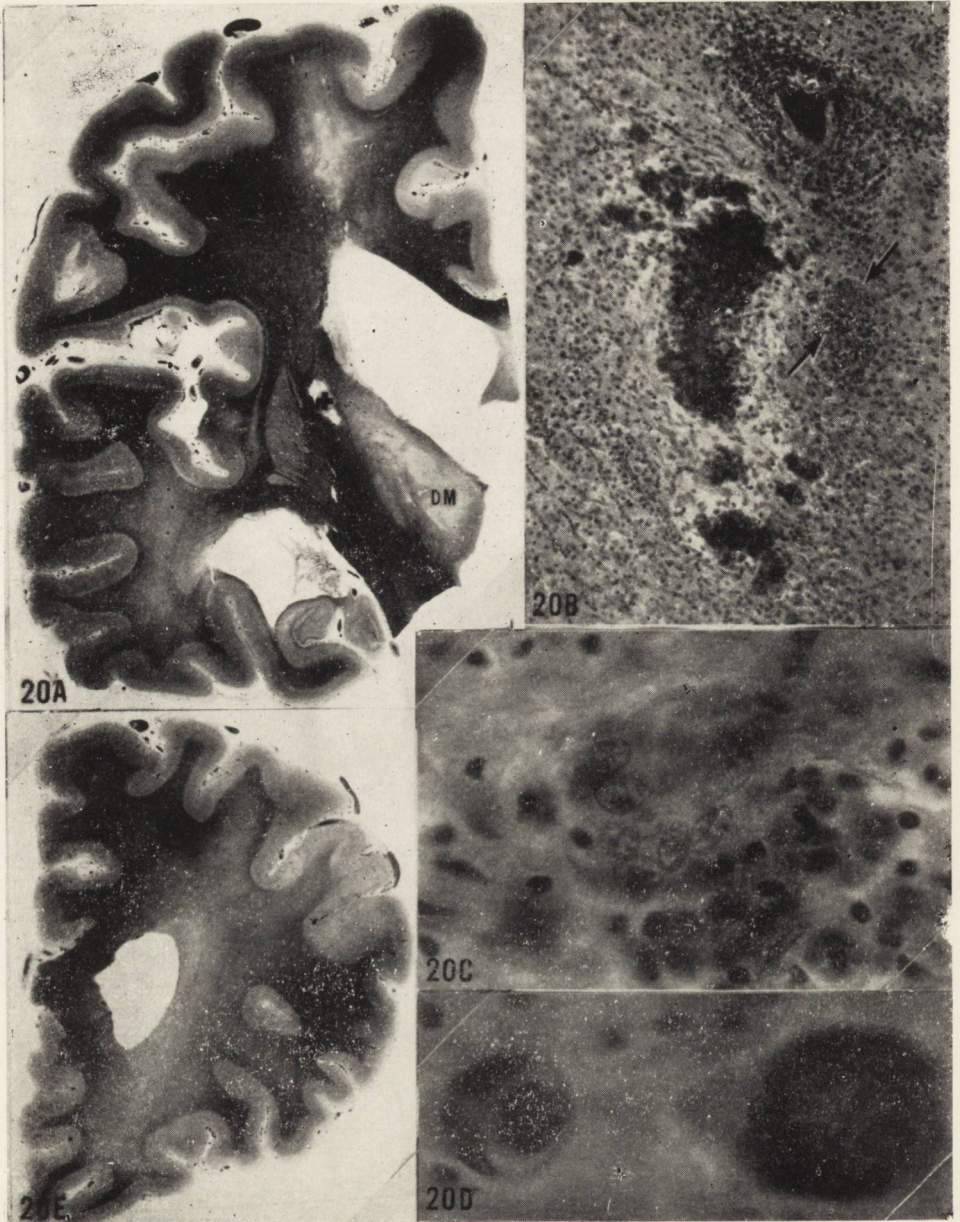


Fig. 20.

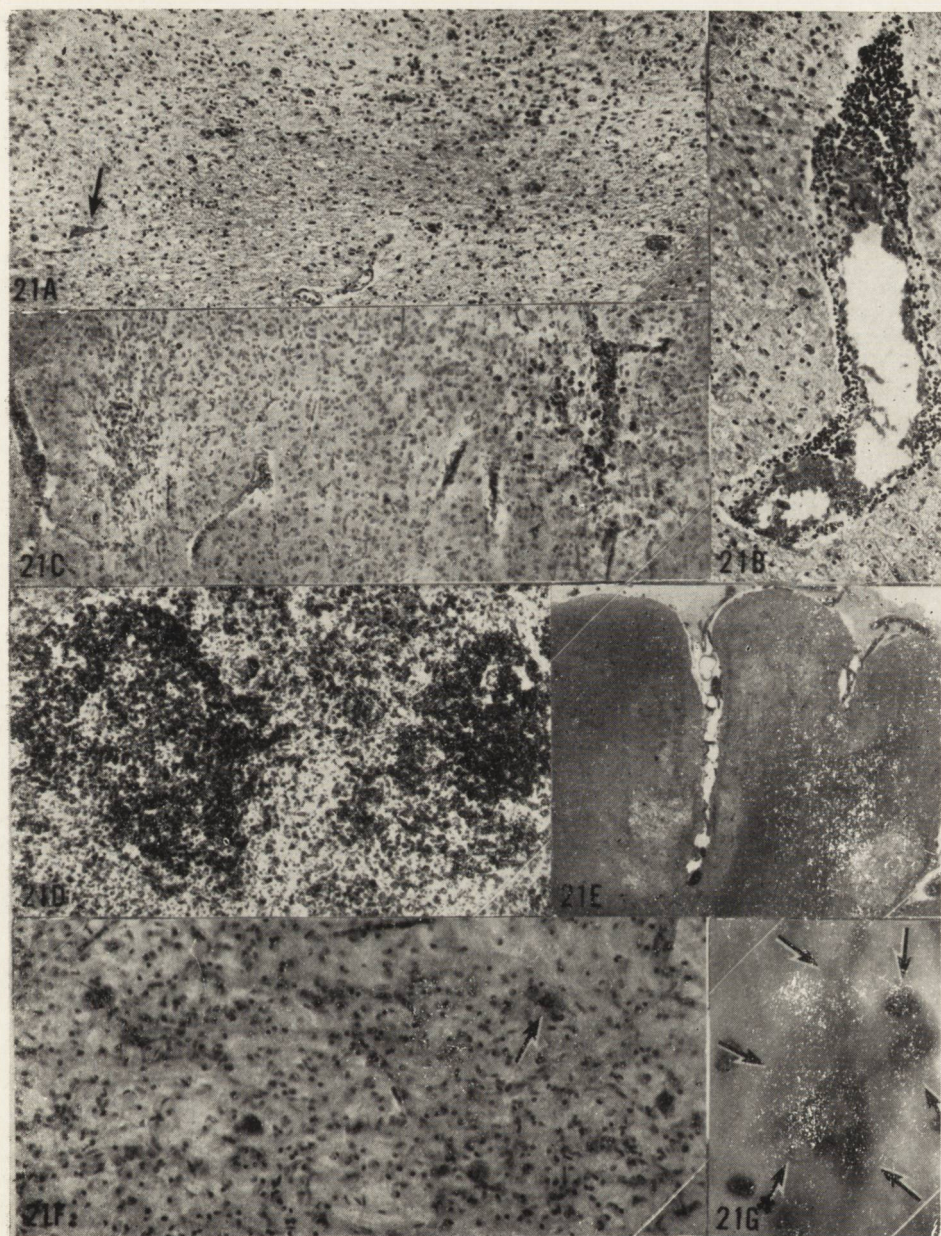


Fig. 21.

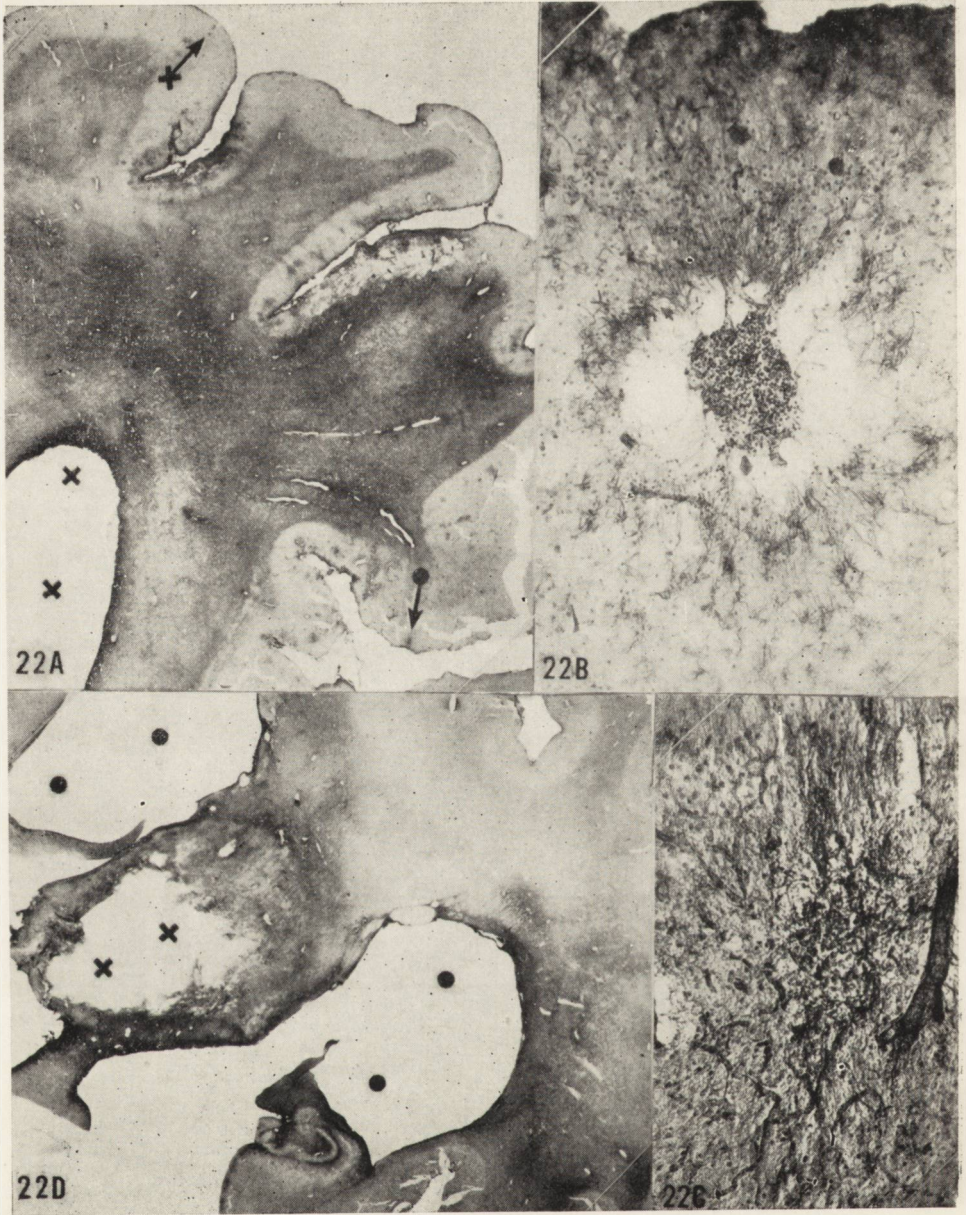


Fig. 22.

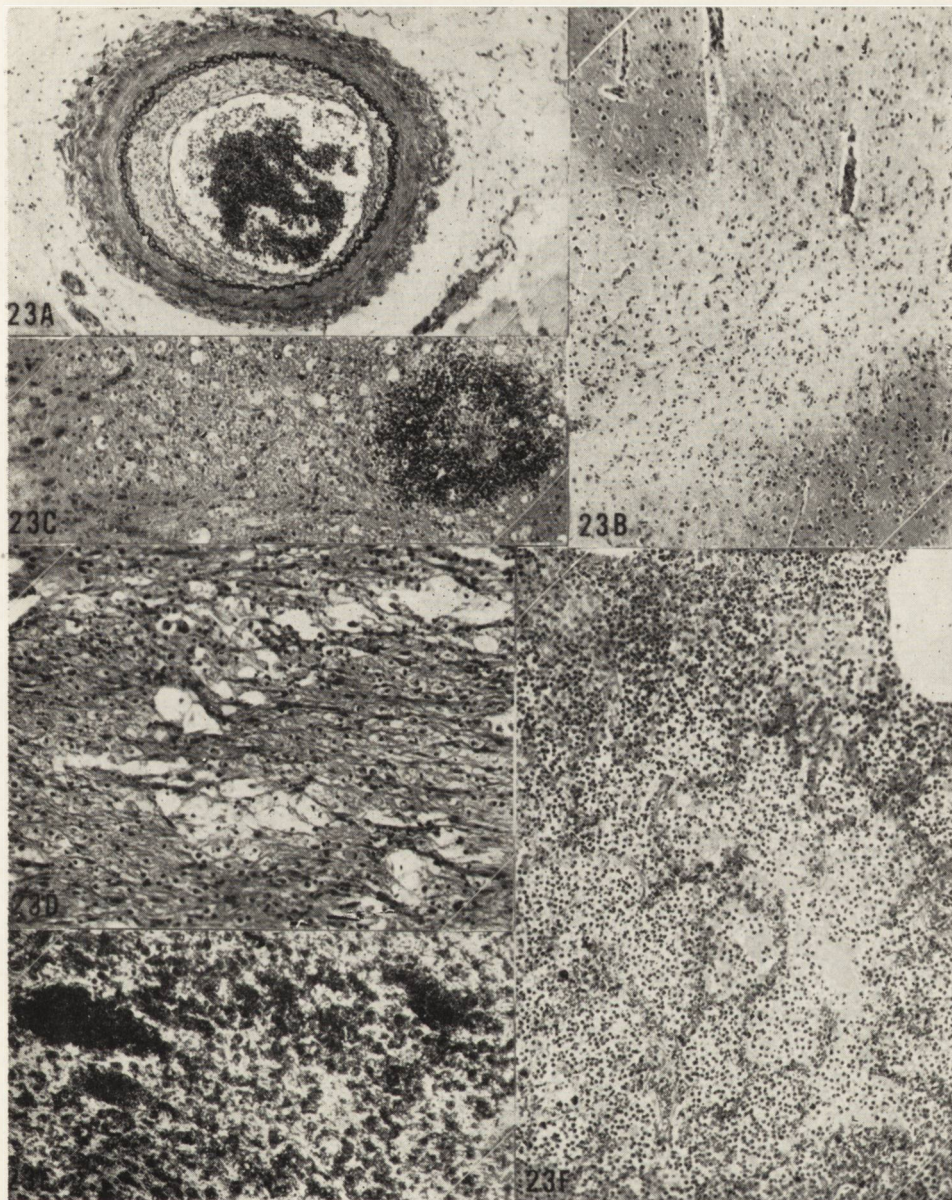
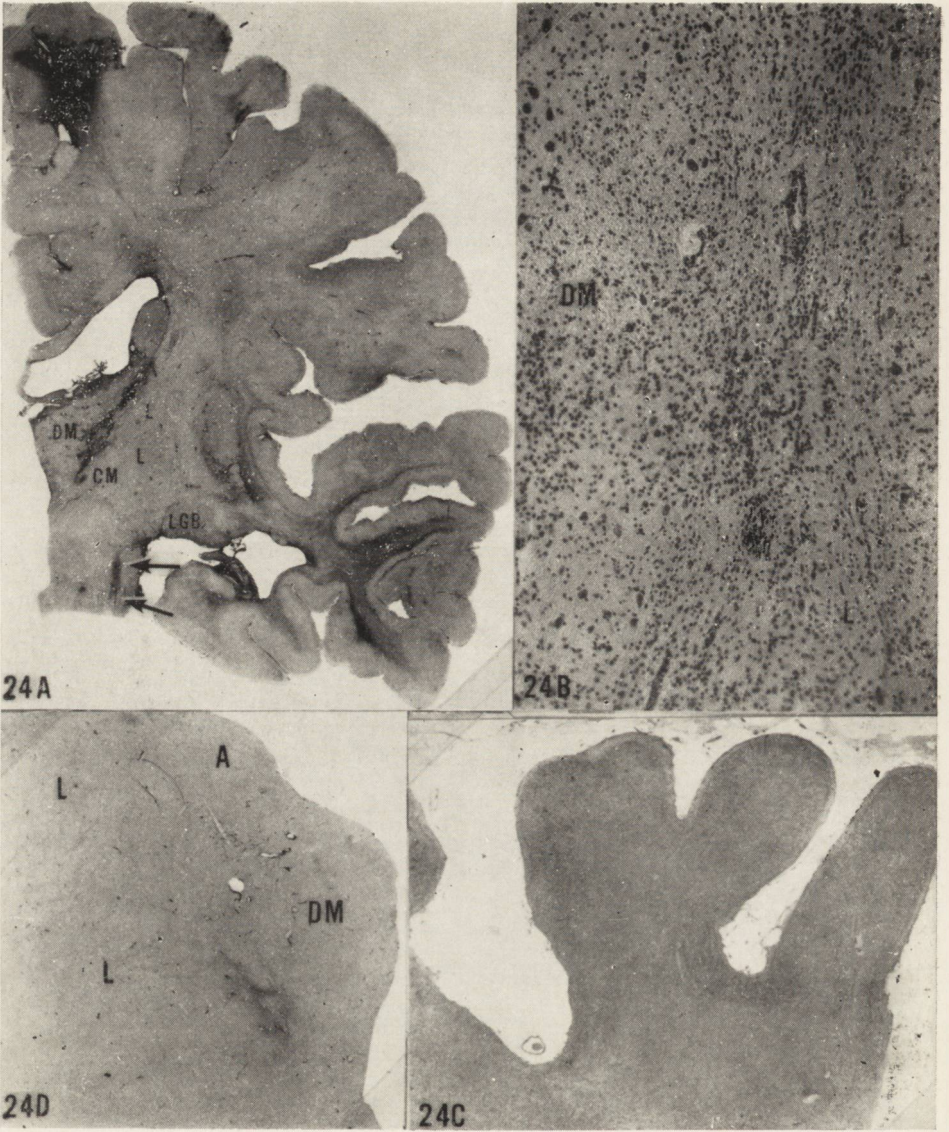
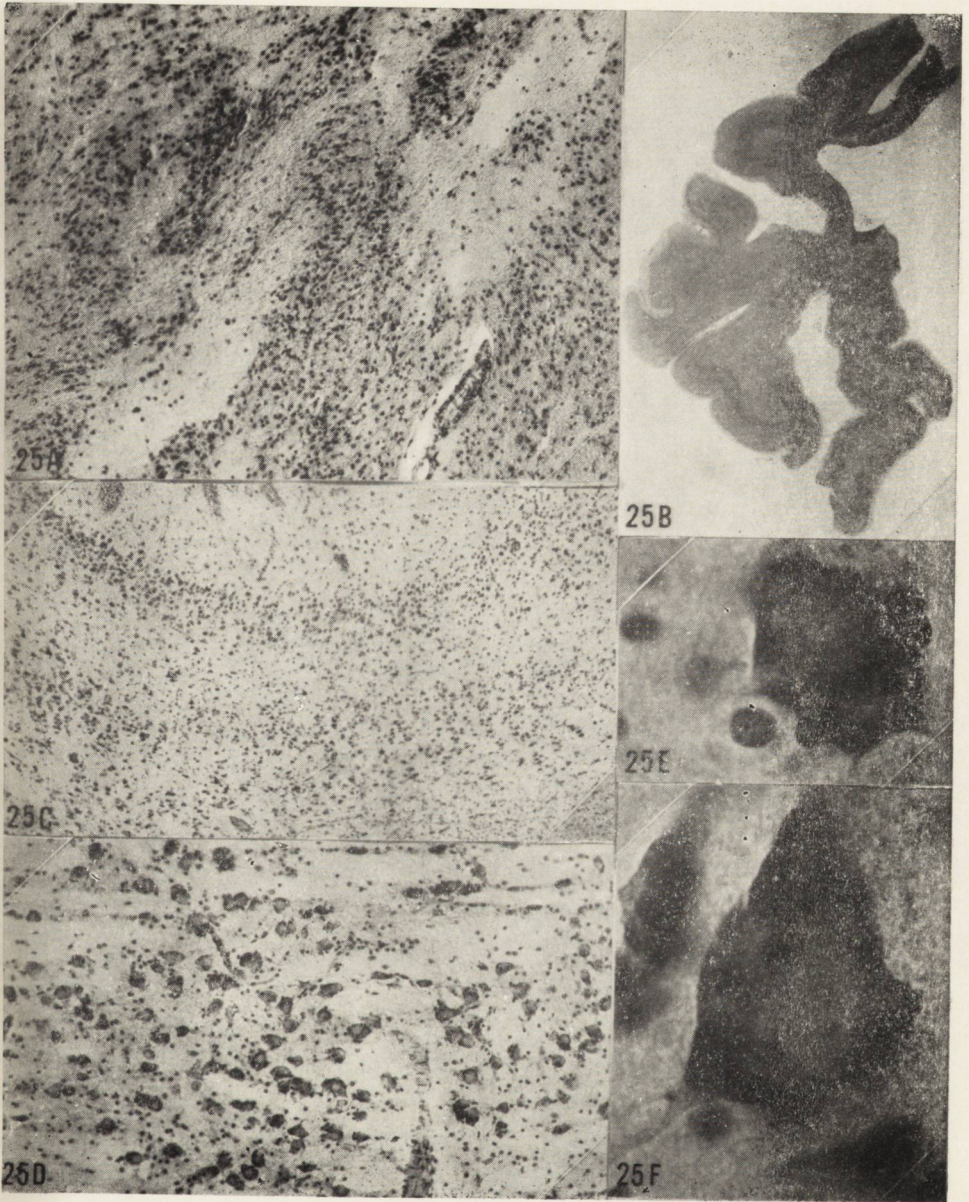


Fig. 23.



*Fig. 24.*





*Fig. 25.*

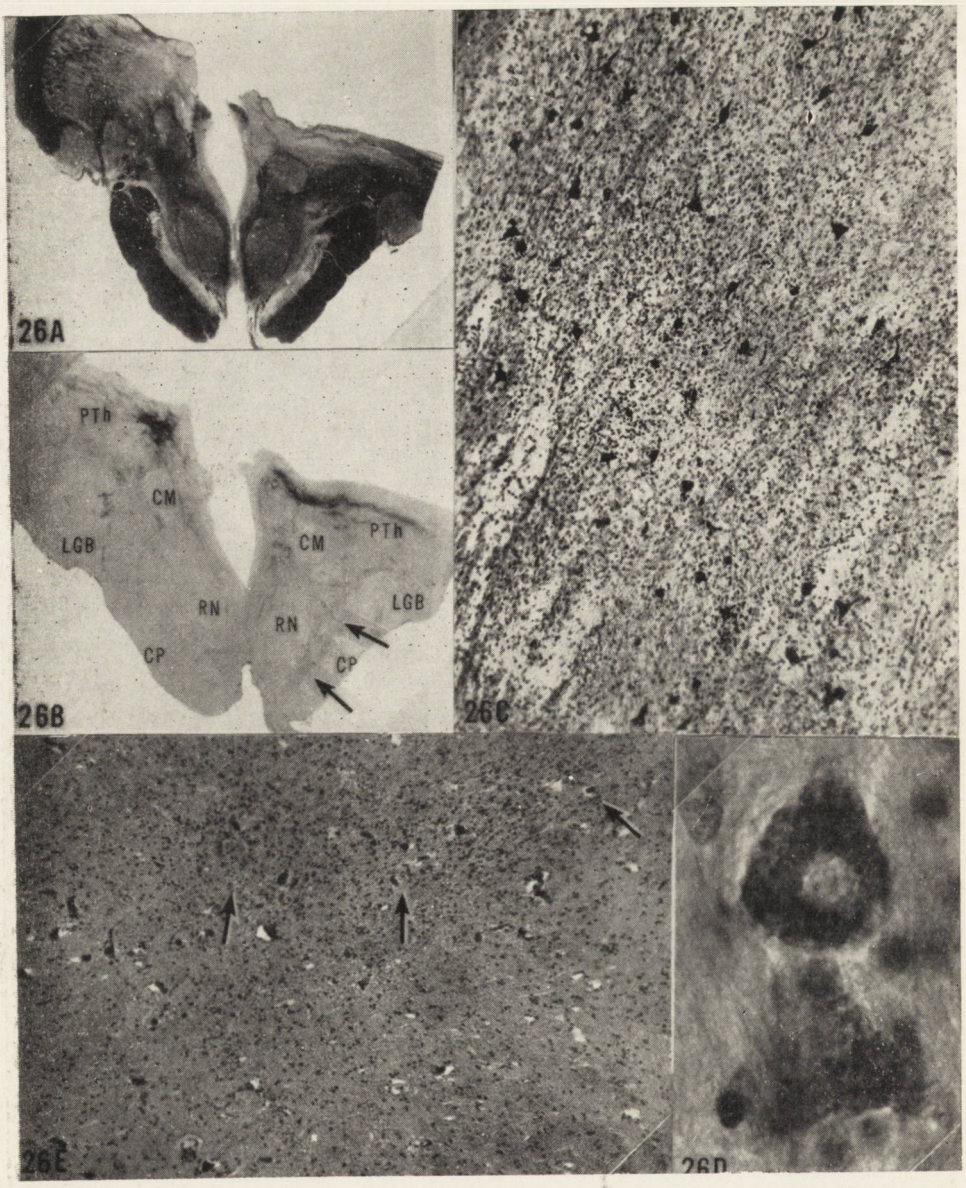


Fig. 26.

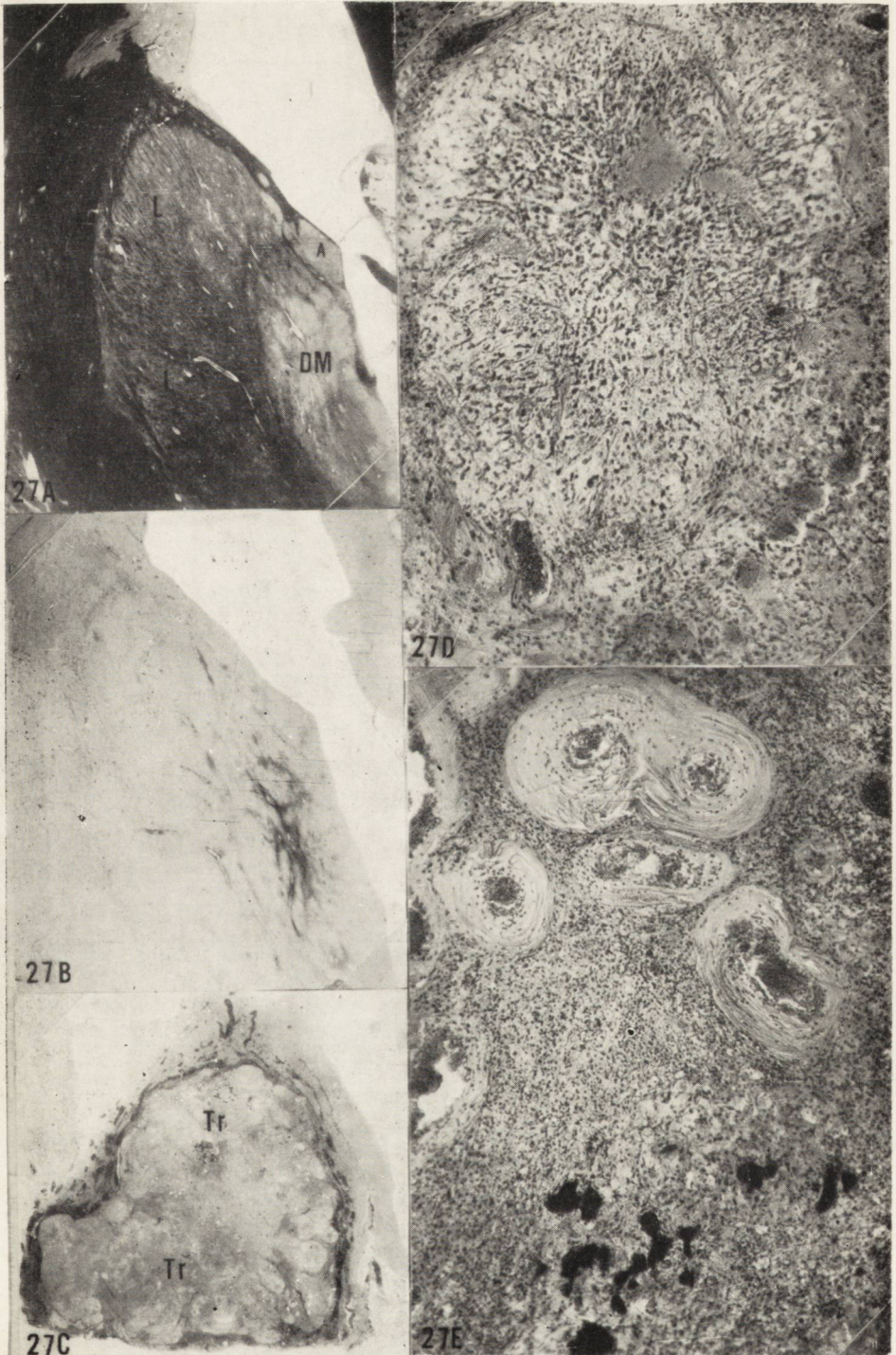
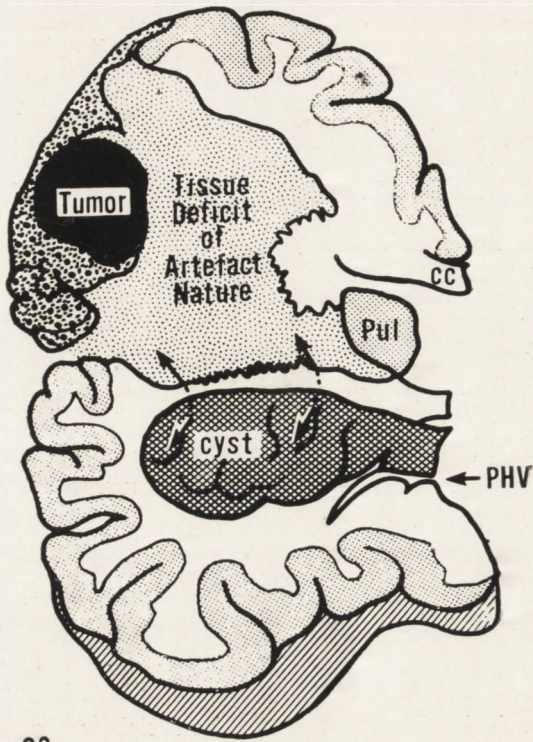


Fig. 27.



28

Fig. 28.

N. KUSANO, Y. AOYAMA, A. KAWAMURA JR., H. KAWASHIMA

## THE DIAGNOSIS OF JAPANESE ENCEPHALITIS BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY TECHNIQUE IN AUTOPSY CASES

The Institute for Infectious Diseases The University of Tokyo

### INTRODUCTION

According to the lack in pathognomonic feature, histological diagnosis of Japanese encephalitis (JE) has encountered with difficulties unless the virus isolated from the autopsy specimen.

When the results of clinical picture, serological reaction, histological findings and isolation of the virus in certain epidemiological circumstance are available and coincide, diagnosis of JE will be established. Currently, in certain number of cases, however, the definitive diagnosis have been so difficult and encephalitis of unknown origin or suspected JE left many problems unsolved.

Since Coons developed fluorescent antibody technique (FAT) based on specific antigen-antibody reaction, diagnosis of viral infection has been improved in accuracy and specificity.

As initial trials employing this technique with mouse experimentally infected with JE virus gave promising results (Kusano 1964), the technique was further extended into materials of human autopsy to establish the definitive diagnosis based on specific immunological reaction.

### MATERIALS AND METHODS

#### 1. Materials from human autopsy:

In 1963 and 1964, twenty eight autopsy cases of the patients diagnosed or suspected as JE by qualified physicians in the Hospitals for Infectious Diseases were collected. This corresponds to about 70% of the fatal cases during the in Tokyo area. Specimens for FAT were collected from brain cortex, thalamus, substantia nigra, pons, medulla oblongata, spinal cord and some organs other than brain and were frozen immediately with

N-hexan maintained in  $-70^{\circ}\text{C}$  with dry ice and acetone. Impression and smear preparations were made simultaneously with these materials. Isolation of the virus was carried out with the specimen from cortex, thalamus and substantia nigra by Dr. Akira Oya, Department of Viruses and Rickettsiae, National Institute of Health, Tokyo.

## 2. Preparation of Labelled JE antibody:

The fluorescent antibody was prepared from convalescent serum of a Japanese monkey subcutaneously infected with JaTH-160 strain of JEV. The serum had a hemagglutination-inhibiting titer of  $1:10^2$  and a neutralizing titer of  $1:10^{4.2}$ .  $\text{A}\gamma_2$ -fraction of the serum was labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) and purified passing through columns of Sephadex G-25 and of DEAE-cellulose, successively.

The fractions with fluorescein-protein molecular ratio of 1.0 to 2.0 were collected. The staining activity of the preparation obtained was shown, at a dilution of up to  $1:32$  when tested with PS (Y-15) cell cultures, a clonal line of porcine kidney cell line, infected with the JaTH-160 strain of JE virus. The conjugate was sufficiently absorbed with acetone dried brain powder of mice, calf and human.

The specificity of the conjugated globulin was carefully examined with PS (Y-15) cells both normal and infected with the JaTH-160 strain, and with frozen sections of mice both normal and infected with herpes, HVJ and JE viruses.

## 3. Procedure of FAT:

The specimen which had been frozen in N-hexan at  $-70^{\circ}\text{C}$  was sectioned at  $2\mu$  thick Pearse SLEE cryostat at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sections fixed on coverslips were pretreated with acetone or cold fluorocarbon at  $5^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes and were dried. They were reacted with labelled antibody at  $5^{\circ}\text{C}$  for 15 hours or at  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes.

The optimal pH in this reaction of JEV was 7.75.

The impression and smear preparations were pretreated and reacted in a similar manner.

The coverslips were rinsed three times phosphate buffer solution (pH 7.75) and finally mounted with buffered glycerol (pH 9.0).

The preparations were observed under dark-field illumination using a high-pressure mercury-vapor lamp, H-250 (Chiyoda Optical C., Tokyo) as UV source with Chiyoda's UV exciter and absorbing filters.

## RESULTS

In 1963 seven cases of encephalitis were examined during a period of three weeks from September 8 to October 2. Isolation of virus was succeeded in only case No. 3 and No. 4 who deceased on the 4th and 3rd

day of the disease. FAT test showed positive results in six of seven cases including case No. 5 and No. 7 died on the 11th day of the disease. Case No. 6 did not give any positive results in isolation of virus, in FA staining and in histological findings. FA technique is thought to be more sensitive and rapid method than isolation of the virus for diagnosis of JE (Table 1).

Table 1. Results of Virus Isolation, Fluorescent Antibody Technique and Histological Findings of Japanese Encephalitis in 28 Cases of Human Autopsy Materials

Autopsy No.	Name	Age	Sex	Date of Death	Days after Onset	Virus Isolation	FAT	Histological Diagnosis as JE
1	K. M.	28	♀	1963 IX. 8	5	—	—	—
2	T. Y.	74	♀	15	8	—	+	+
3	T. I.	72	♂	17	4	+	+	+
4	K. K.	7	♂	18	3	+	+	+
5	T. S.	53	♀	22	11	—	+	+
6	E. A.	53	♂	28	10	—	+	+
7	Y. N.	21	♀	X. 2	11	—	+	+
8	F. S.	22	♂	1964 VII. 25	7	—	—	—
9	H. H.	23	♀	27	4	—	—	—
10	R. T.	19	♂	29	9	—	—	—
11	J. O.	25	♀	VIII. 12	9	—	—	—
12	R. S.	64	♂	16	7	+	+	+
13	N. K.	20	♀	17	6	—	+	+
14	I. O.	11	♀	17	8	—	—	—
15	T. K.	19	♂	17	7	+	+	+
16	S. D.	32	♂	19	4	+	+	+
17	T. U.	24	♂	19	8	—	+	+
18	S. H.	33	♀	26	4	+	+	+
19	M. Y.	17	♀	26	7	—	+	+
20	H. U.	30	♂	27	8	—	—	—
21	T. Y.	26	♀	28	6	+	+	+
22	K. Y.	1	♂	28	7	—	—	+
23	K. S.	34	♂	30	13	—	—	—
24	Y. S.	18	♂	IX. 2	5	—	+	+
25	R. I.	24	♂	3	7	—	—	—
26	O. N.	2	♀	4	4	not done	—	—
27	E. O.	12	♀	9	9	—	+	+
28	C. U.	23	♂	14	11	—	+	+

In 1964, 21 cases of clinically diagnosed or suspected to be JE were examined. JE virus was isolated in 5 cases who died within 7 days after the onset of the disease. FAT gave positive results in 11 cases including one case No. 28, died on the 11th day of the disease. Histological picture of these 11 cases showed characteristic change of JE. In case No. 22, isolation of the virus and FAT result remained negative, but the histological changes of paraffin sections taken from other parts of brain were supposed to have more characteristic feature for JE, as compared with those in cryostat section for FAT (Table 1).

Every case of which the virus was isolated, gave positive results in FAT and in histological picture. In most of ten cases, which showed neither FA staining nor characteristic histological features of JE, degeneration of nerve cells and slight degree of proliferation of glial cells were observed. Diagnosis of these cases could not be decided and left many problems unsolved.

Histological changes observed in FA positive cases would be characterized as degeneration of nerve cells, perivascular cell cuffs, glial nodules and focal rarefied necrotic foci. These characteristic changes were observed in cerebrum, diencephalon, cerebellum and brain stem and were prominent in cerebral cortex, in thalamus and in substantia nigra.

FA positive cells could be observed in the regions described above, but in most cases mainly in thalamus and in substantia nigra. In early stage, as in case No. 3, 4, 16 and 18, FA positive cells were observed also in brain cortex.

All these cells were nerve cells. Their cytoplasm were stained positive while the nuclei remained negative as in the case of PS cells cultured and infected in vitro or of mouse nerve cells infected with JE virus in vivo.

Specific fluorescence was observed as yellowish green fine granules dispersed in cytoplasm and in many cases homogeneous materials without granularity were observed. Perinuclear area did not show peculiar staining. In some cases only fibrous dendrites were stained and the other parts of cells were not stained at all. In such cases too, homogeneous or fine granular fluorescence was observed in contrast to the findings in rabies, measles or mumps in which large droplets were observed.

As compared with the results observed in the mice, number of FA positive cells and intensity of fluorescence were much less than those in the human materials. Autofluorescent granules of yellowish brown colour were often contaminated in cytoplasm of human nerve cells in



which specific staining of yellow green colour were observed. In such cases, these two fluorescences could be easily differentiated in general based on the excited colour, however in a few cases in which small amount of specific fluorescence was intermingled with strong auto-fluorescence, some difficulties arose.

In case No. 16 and 18 which did show intense changes in histological picture, scattered debris of disrupted nerve cells were stained positive by FA.

Cells in perivascular cuff and glial nodule, choroid plexus, menigeal cells, ependymal cells, and endothel of capillary remained negative by FA staining in all cases.

In case No. 27, hemorrhagic necrotizing encephalitis was observed in bilateral temporal area, and encephalitis due to herpes simplex virus was first suspected. In this case however, FA positive cells for JE were observed in necrotic temporal area and in thalamus while staining with FA specific for herpes simplex virus remained negative.

FA staining with impression material gave the coinciding results as observed in frozen section, except in case No. 18 in which the nerve cells did not impressed well on the slide glass due to technical failure.

No positive staining were observed in organs other than brain.

Staining of cells taken from spinal fluid with FA to JE remained negative in all of several cases examined.

#### DISCUSSION

1. Relatively few cases have been reported with human autopsy materials of virus infection stained by FAT in contrast to the reports with that of experimental viral infection employing FAT. Concerning viral encephalitis, the presence of viral antigen in the brain of autopsy case has not been described, except for report on herpetic encephalitis by Sabin et al. (1961).

One of the reasons of the poor staining of brain with FAT would be due to the presence of non specific fluorescence in materials. Employing FITC-conjugated  $\gamma_2$ -fraction prepared from antiserum with high potency, non specific fluorescence was eliminated efficiently. Pretreatment of the nervous tissue with fluorocarbon further contributed in elimination of non specific fluorescence and in improvement of the staining results. Preliminary determination of optimal pH, temperature and time for the reaction increased the sensitivity of FAT in this system.

2. Results with FAT coincide well with those of histological findings. In one preparation of case No. 22, the presence of antigen was not shown by FAT and no histological changes were observed by frozen section.

In this case, however, the paraffin section of the different locus showed a characteristic histological changes of Japanese encephalitis.

3. Observation on encephalitis induced in adult and suckling mice by infection with JE virus intraperitoneally and intracerebrally was reported by us (1964). At the onset of disease (8 — 10th day by intraperitoneally and 3rd day by intracerebrally), about 70% of the nerve cells in the brain cortex and brain stem showed strong fluorescent staining in cytoplasm. Much less staining was observed in cerebellum. No staining was observed in glial cells, meningial cells, ependymal cells or cells in choroid plexus and perivascular cuff. In human cases, virus antigen was observed exclusively in nerve cell by FAT as in the mice, however, number of cells showing positive staining was much less than in the mice. By fluorescent staining, intense and discrete granules were observed in the mice. In human cases dim and diffuse materials were observed and these FAT positive cells were more frequently observed in thalamus or substantia nigra than in brain cortex.

These differences could be due to the more prolonged course of the disease in human post mortem case than that of mice. Positive FA staining in cortex was observed in the cases died in early stage of the disease. In prolonged cases, histopathological changes were observed in brain cortex irrespective of the absence of FAT positive cells. These observations suggest a possibility that in human cases the virus multiplies in nerve cells of brain cortex in early stage and diminish thereafter.

Usually the mice died one to two day after the onset of symptoms, but in rare cases, some of the mice which had been challenged intraperitoneally with a small dosis of the virus survived after manifestation of the encephalitis symptoms. In such mice, sacrificed five to seven days after the onset of the diseases, number of FAT positive cells were much less and FAT positive materials were left longer in the dendrites than in the cytoplasm of nerve cells. These observations showed similarity to that of human cases.

4. Neither isolation of virus nor FAT staining gave positive result in No. 8, 9, 10, 11, 14, 20, 23, 25 and 26. Histological findings also suggest a possibility that these cases are encephalitis other than JE. This would be assumed from epidemiological survey carried out by Dr. A. Oya, too. At the end to July, Jé virus was first isolated from mosquito and on August 3, abrupt increase in antibody titer of pigs was recognized in Tokyo area.

As these cases preceded the initial sign of JE epizootics, JE virus would be excluded as the genesis of these cases of encephalitis.

5. In the cases of JE, virus antigen could not be detected in meningeal cells, ependymal cells or cells in choroid plexus in the infected mice or in autopsy materials of human. Therefore a possibility that cells in spinal fluid show positive FA staining with labelled JE antibody is not to be foreseen. On the contrary, in cases of experimental infection with Cocksackie B-5 or mumps virus, ependymal cells did show positive FA staining at high ratio. In the latter cases, diagnosis by means of FA staining of cells taken from spinal fluid would be expected to be far more possible.

6. In 1964, mortality cases of young adults in the twenties were predominant in contrast to the epidemic in 1963 in which the mortality ratio was much less. Seventy percent of FAT positive cases in 1964 were the people who moved from Tohoku area where incidence of JE have been rare into Tokyo area after 1962. Except one case (No. 27), they did not receive vaccination of JE.

N. Kusano, Y. Aoyama, A. Kawamura jr., H. Kawashima

#### DIAGNOSTYKA JAPOŃSKIEGO ZAPALENIA MÓZGU NA MATERIALE AUTOPSYJNYM PRZY POMOCY TECHNIKI IMMUNOFLUORESCENCYJNEJ

##### Streszczenie

Antygenowe cechy wirusa japońskiego zapalenia mózgu zostały stwierdzone w mózгах myszy w naszych badaniach doświadczalnych nad japońskim zapaleniem mózgu u myszy, prowadzonych przy pomocy techniki immunofluorescencyjnej.

W oparciu o powyższe dane, zastosowano tę samą technikę do badania mózгów chorych, u których rozpoznawano klinicznie lub podejrzewano japońskie zapalenie mózgu, a którzy zmarli w okresie epidemii, jakie miały miejsce w okolicach Tokyo w latach 1963 (7 przypadków) i 1964 (21 przypadków).

Mrożone skrawki kriostatowe, pobrane z kory mózgu, mostu i istoty czarnej inkubowano bezpośrednio w znakowanej surowicy. Otrzymane wyniki konfrontowano z danymi klinicznymi, wirusologicznymi, serologicznymi i histologicznymi.

We wszystkich przypadkach z niewątpliwym rozpoznaniem japońskiego zapalenia mózgu, uzyskano fluorescencję w komórkach nerwowych mózgu.

Fluorescencja była dodatnia w przypadkach do 11 dnia choroby, podczas gdy izolacja wirusa była możliwa jedynie do 8 dnia choroby.

Barwienie uciśniętych preparatów oraz rozmazów tkankowych dało wyniki identyczne jak barwienie skrawków mrożonych.

Technika immunofluorescencyjna może być używana jako wygodna i pewna metoda pośredniego rozpoznawania japońskiego zapalenia mózgu.

Prace nad wykryciem antygeny wirusa japońskiego zapalenia mózgu w komórkach płynu mózgowo-rdzeniowego przy pomocy techniki immunofluorescencyjnej, jak dotychczas, nie dały pozytywnych wyników.

Н. Кусано, И. Аойама, А. Кавамура мл., Х. Кавашима

## ДИАГНОСТИКА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА СЕКЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

### Содержание

Антигенные признаки вируса японского энцефалита были определены на мозгах мышей в исследованиях авторов над японским энцефалитом у мышей, проводимых с использованием иммунофлуоресценционной техники.

На основании вышеуказанных данных иммунофлуоресценционная техника была использована при исследовании мозгов больных, у которых клинически диагностировали либо подозревали японский энцефалит, и которые умерли от эпидемии, имеющей место в районе Токио в 1963 г. (7 случаев) и в 1964 году (21 случай).

Замороженные криостатные срезы, взятые из коры головного мозга, моста и черного вещества инкубировались непосредственно в меченой сыворотке. Полученные результаты сопоставлялись с клиническими, вирусологическими, серологическими и гистологическими данными.

Во всех случаях с несомненным диагнозом японского энцефалита была получена флуоресценция в нервных клетках мозга. Флуоресценция была положительной в случае до 11-го дня болезни, в то время как изоляция вируса была возможной только до 8-го дня болезни.

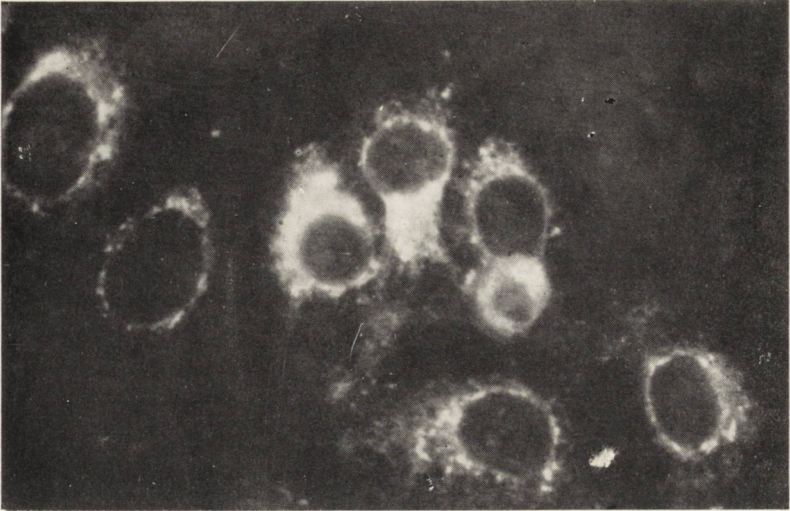
Результат окраски препаратов и тканевых мазков был идентичный с замороженными срезами.

Иммунофлуоресценционная техника может быть использована как удобный и надежный метод для секционной диагностики японского энцефалита.

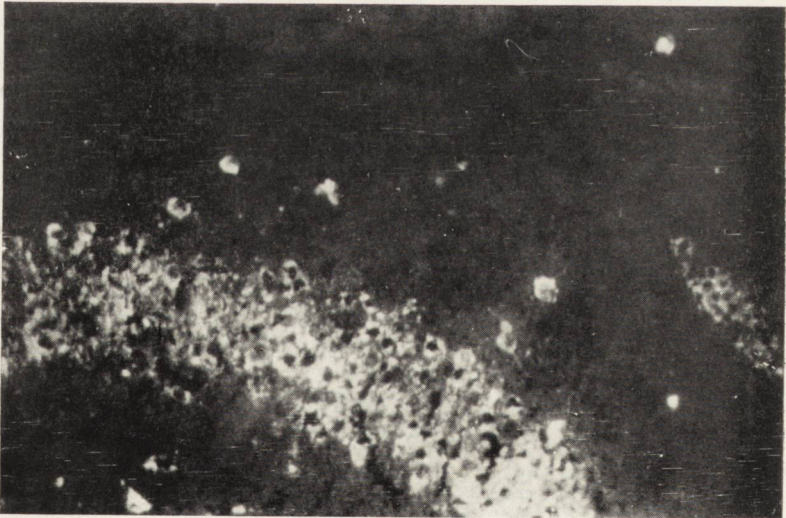
Исследования над определением антигена вируса японского энцефалита в клетках спинномозговой жидкости с помощью иммунофлуоресценции до настоящего времени не дали ожидаемых результатов.

### REFERENCES

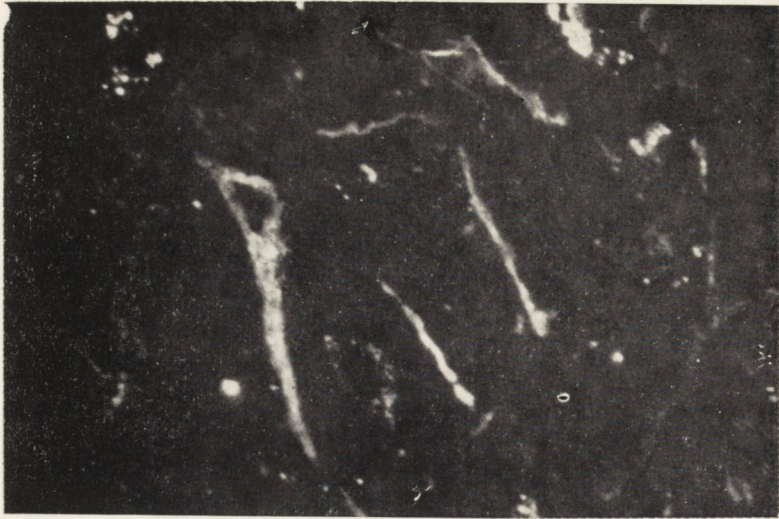
1. Kusano N.: Studies on the pathogenesis of Japanese encephalitis. Acta Path. Jap. 1964, 14, 207—209.
2. Sabin A. B., Messore G.: Fluorescent antibody technique in the study of fixed tissues from patients with encephalitis. In Encephalitides edited by L. van Bo-gaert et al. 1961, 621—626.



*Fig. 1.* PS (Y-15) cells infected with the JaTH-160 strain of JEV (moi 100). Nine hours after infection, specific fluorescence appears in perinuclear region and expands in cytoplasm thereafter. Note the absence of antigen in nuclei. (direct FAT)



*Fig. 2.* Hippocampus of mouse infected with the JaTH-160 strain intraperitoneally seven days prior. In this area, over 80 percent of all neurons showed JE specific fluorescence in their cytoplasm. Note the absence of antigen in cells of choroid plexus and endepidium (upper right).



*Fig. 3.* Neurons of anterior horn in lumbar cord of monkey infected with JaTH-160, ten days after infection intracerebrally, (direct FAT).



*Fig. 4.* Neurons of human autopsy case No. 19 who died on 7th day of disease, however JE virus could not be isolated from brain materials. Note dim and diffuse fluorescent material in cytoplasm. Bright and intense granules in this picture are all autofluorescence in colour of orange, and not specific ones (direct FAT).

S. OYANAGI

## AN ELECTRON MICROSCOPIC STUDY ON THE FINE STRUCTURES OF CEREBRAL CORTEX IN THE MICE INFECTED WITH JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS

Department of Psychiatry, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.  
Department of Anatomy, Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan.

It is well-known that Japanese encephalitis comprises one of the severe viral encephalitides in Japan. However, the kinds of cellular elements of organism in where Japanese encephalitis virus (J. E. V.) can replicate have never been clarified as yet. So far, this has led to a little confusion in an interpretation of histopathological features of the disease with routine examinations such as glial nodules, perivascular cell cuffs, neuronophages, rarefaction necrotic foci etc. In this regard, the electron microscopic observations on the mice brains infected with J.E.V. have been carried out in order to have a well-understanding of etiopathogenesis of the disease.

### MATERIAL AND METHOD

The brain of a mouse at the terminal stage infected with the Nakayama strain of J.E.V. was taken out aseptically and emulsified in physiological saline, and its 0.02cc was inoculated into the frontal lobe of the adult mice of the H-strain weighing 15—20 grams. The LD<sub>50</sub> was determined by inoculating the serial ten-times dilution of the original emulsion and, thus, ranged 10<sup>-6</sup> — 10<sup>-8</sup>/0.02cc. Consequently, the latter mice became sluggish on the 2nd day after inoculation. On the 3rd day, the encephalitic involvements such as hair-rising and crouching posture became pronounced and followed by excitement, convulsion and paralysis of the limbs, and the animals died, as a rule, 4 or 5 days after inoculation. The material for electron microscopy was obtained from the cerebral cortex of parietal lobe at each time interval of 24, 48, 72 and 96 hours after inoculation. The observations were particularly oriented to nerve cells, glial cells and capillary endothels.

Two series of the controls were examined; healthy mice brains those of mice which were inoculated with 0.02cc of a healthy mouse brain emulsion without J.E.V., could survive without encephalitic involvements, and sacrificed at 72 hours after inoculation.

The cerebral cortices were removed as quickly as possible, cut into approximately 1 mm<sup>3</sup> pieces, and fixed in ice-cold 2% OsO<sub>4</sub> buffered at pH 7.3 according to Millonig method (1961, 1962). They were dehydrated for a comparatively short time in a series of graded ethanol, embedded in epon epoxy resin (Luft, 1961), cut with glass knife on a Porter-Blum microtome, stained with lead hydroxide and observed with Hitachi HS-7 electron microscope.

## RESULTS

As far as the present observation is concerned, the characteristic findings which are closely related to a replication of Japanese encephalitis viruses have been only noted in nerve cells at each 72 and 96 hours after inoculation, but not in glial cells and capillary endothels.

At 24 hours after inoculation, there was no noticeable change in their nuclei and cytoplasmic organelles, such as Golgi apparatus, mitochondria, endoplasmic reticulum (e.r.) etc. At 48 hours after inoculation, the vesicles in Golgi apparatus of certain neurones were conspicuously increased, while other organelles remained normal.

After 72 hours after inoculation, approximately 70—80% of nerve cells represented the remarkable changes in their cytoplasm and the latter were summarized as follows; the vesicles within and around the Golgi apparatus, which had already been increased at 48 hours-stage, became more increased; the spherical electron dense particles ranging 38 m $\mu$  to 45 m $\mu$  in diameter — most of them showing 40 m $\mu$  in diameter — became manifested in varying number in those Golgi vesicles and vacuoles as well as the rough-surfaced e.r. (Fig. 1). Those particles were also characterized by the inner structures consisting of a central core with high electron density, 25 m $\mu$  to 30 m $\mu$  in diameter, and an outer zone with lower density surrounding the former core (Fig. 2). Some particles occasionally showed a thin limiting membrane detectable with a high-power magnification; those particles were enclosed in both the smooth — and rough — surfaced e.r. throughout the cytoplasm. They were mainly confined to the Golgi vesicles and vacuoles in the parinuclear region, while less in number in the e.r. of peripheral cytoplasm.

A relationship of those particles mentioned above to the e.r. is summarized in the following patterns:



1. The particles enclosed by the granular e.r. were less in number, i.e., one to several and showed no regularity in their arrangement;
2. The particles in the agranular e.r. were further classified into the following three subtypes: a) the particles in the large vacuoles showed no regularity in their arrangement; b) the particles in the agranular e.r. of tubular form were arranged in a row form at equal distance and, as a rule three to five, the maximum being eighteen, representing an appearance of horse beans in sheath; c) one particle in one vesicle was mainly found in Golgi apparatus, while a part of Golgi vacuole containing many particles projected to the cytoplasmic matrix with single particle, showing a profile as if a vesicle containing single particle was formed from Golgi vacuole.

In all cases, one portion of the membrane of vesicles containing several particles was sectioned as if the content of vesicles was continuous into the cytoplasmic matrix.

A number of vesicles without the particles mentioned above occasionally aggregated together and certain of them seemed to connect with e.r. Besides, a few membranaceous structures of ringlike profiles of different diameters were contained in some e.r., and represented an appearance of the multivesicular body (Fig. 3). The well-developed e.r. characteristic for neurones tend to be diminished, and the nuclei became not infrequently polymorphous and slightly shrunken, but never contained those particles as seen in e.r.

At 96 hours after inoculation, the cytoplasm of nerve cells became entirely occupied with many vesicles and vacuoles inwhere the particles mentioned above, though reduced in number, were still abundant. A great majority of them in the e.r. were found in a form of types 1 and 2a-mentioned above. Although the particles were observed mainly in the perinuclear Golgi vesicles and vacuoles at 72 hours-stage, those at 96 hours-stage were, more or less, widespread in the vesicles and vacuoles dispersed throughout the entire cytoplasm. The rough-surfaced e.r. were extremely diminished in number, the mitochondrias were swollen, and the profiles resembling the multivesicular body were more increased in number. The irregularly-defined nuclei were shrunken.

The characteristic particles mentioned above have never been observed in the neuronal cells of the two control series, although an increase of the Golgi vacuoles of neuronal cytoplasm developed in the control brains at 72 hours after inoculation with the normal mouse brain emulsion without J.E.V. The profiles resembling the multivesicular body could not be detected (Fig. 4).

## DISCUSSION AND CONCLUSION

Friedlaender (1955) emphasized the following three points as the criteria for identification of viral particles under an electron microscope.

1. Particles should show consistent size and shape, and consistent substructures when present, characterizing each particular virus.

2. They should appear in large numbers in infected cells, but should not be present in appropriate controls.

3. Under conditions of fixation with osmic acid, the particles should show an excessive electron density as compared with other cytoplasmic particles of similar size. Further, Higashi (1964) added another criterion in which viral particles should always appear after a consistent period of time after inoculation.

The particles observed here, on the other hand, were confined exclusively to nerve cells at 72 and 96 hours after J.E.V. inoculation, while never found in glial cells and capillary endothels as well as at 24 and 48 hours after inoculation. They were visualized only in the rough- and smooth — surfaced e.r., while never in the nuclei and the cytoplasmic matrix. They were consistent in shape and size, and a majority of them showed electron dense spheres of 40  $m\mu$  in diameter, through varying from 38  $m\mu$  to 45  $m\mu$ . The particles in question represented the inner substructures consisting of a central core with high electron density, 25  $m\mu$  to 30  $m\mu$  in diameter, suggesting a presence of nucleoid of nucleic acid nature and a narrow outer zone of viroplasm presumably of viral protein. All characteristics of the particles mentioned above correspond well with those criteria for identification of viral particles claimed by Friedlaender and Higashi.

Higashi et al. (1963) infected the cultured PS cells with the Mukai strain of J.E.V., and observed the particles, 38  $m\mu$  in diameter, which consisted of a central dense nucleoid, 25  $m\mu$  in diameter, less dense vitroplasm around the latter, and an outermost limiting membrane. The particles were restricted to the vesicles and the matrix area derived from matrix substance. Ota (1964) also observed the similar particles in the cytoplasmic vacuoles of the cultured PS cells infected with the Mukai strain of J.E.V. They were 32  $m\mu$  to 40  $m\mu$  in diameter, and comprized the dense central nucleoid with 25  $m\mu$  in diameter. The characteristics of the particles in the cultured cells mentioned above correspond well with those of the author's observation.

According to Morgan et al. (1961), the virus of Western equine encephalitis in tissue cultured cells was 45  $m\mu$  in diameter with the central core of 30  $m\mu$  in diameter, while Mussgay and Weibel (1962) stated that the virus of Venezuelan equine encephalitis in stated that J.E.V. partic-

les were formed by budding from the wall of cytoplasmic vacuoles located near the central region of PS cells. Whereas, it is commonly accepted that a cellular protein synthesis goes on the rough-surfaced e.r. So far, it may be assumed that viral protein synthesis occurs there, is carried out to Golgi vesicles and vacuoles, and, after being connected with nucleic acid in some way, represents the figures of those particles as observed under an electron microscope.

At 96 hours after inoculation, when the mice are going to die, the major portion of the cytoplasm were filled with vesicles and vacuoles, and the multivesicular body-like ring profiles which may be considered to be a new structure related to J.E.V. infection and identical with the honey-comb structure by Ota (1964) were also conspicuously increased. The latter origin, however, is unknown. Besides, the rough-surfaced e.r. were more and more increased, the mitochondrias with a decreased density of their matrix were swollen, and the nuclei became irregular and shrunken. All these changes may correspond with a degenerative or necrotic process of neuronal cells under a light microscope. It is true that J.E.V. invade neurones, replicate in their cytoplasm and can be released from them. However, a relationship of those findings under an electron microscope, such as glial nodules, neuronophagias, perivascular cell cuffs, rarefaction necrotic foci etc., remains to the future.

S. Oyanagi

BADANIA ELEKTRONOWO-MIKROSKOPOWE ULTRASTRUKTURY KORY  
MÓZGU U MYSZY ZAKAZONYCH WIRUSEM JAPOŃSKIEGO ZAPALENIA  
MÓZGU

Streszczenie

Badania przeprowadzono na dorosłych myszach szczepu H, wagi 15 — 20 gramów. Wirus japońskiego zapalenia mózgu w dawce  $10^{-6}$  —  $10^{-8}/0,02$  ml był wstrzykiwany w okolicę płata czołowego. Do badania mikroskopowego pobierano materiał z kory ciemieniowej w 24, 48, 72 i 96 godzin po iniekcji zawiesiny wirusa. Kontrolne badania przeprowadzono na mózgach myszy zdrowych, oraz na myszach, którym wstrzyknięto 0,02 ml zawiesiny tkanki mózgowej bez wirusa i zabito 72 godz. po iniekcji. Materiał badany przeprowadzono według metody Milloniga, zatapiając w eponie. Skrawki oglądano w mikroskopie elektronowym Hitachi HS-7.

Cząsteczki odpowiadające ultrastrukturze wirusa zaobserwowano po raz pierwszy w komórkach nerwowych w 72 godz. po zakażeniu. Wirusa nigdy nie widziano w komórkach glejowych i śródbłonku naczyń. W neurocytach myszy, które żyły 24 godz. po zabiegu, nie stwierdzono żadnych zmian. Po 48 godz. od chwili zakażenia zaobserwowano znaczny wzrost pęcherzyków aparatu Golgiego. W 72 godziny po iniekcji wirusa około 70 — 80% komórek nerwowych wykazywało zmiany. Charakteryzowały się one jeszcze większym namnożeniem pęcherzyków w obrębie

i dookoła aparatu Golgiego. W obrębie pęcherzyków aparatu Golgiego, w wakuolach oraz w ziarnistej (rough surface e.r.) wewnątrzcytoplazmatycznej siateczce pojawiły się sferyczne elektrono zagęszczone cząsteczki o średnicy 38—45 m $\mu$ . Cząsteczki te miały elektronowo zagęszczone centrum o średnicy 25—30 m $\mu$ , oraz o mniejszym elektronowo optycznym zagęszczeniu halo. W 96 godz. po zakażeniu cytoplazmę komórek nerwowych prawie w całości wypełniały liczne pęcherzyki i wakuole zawierające cząsteczki o opisanej powyżej ultrastrukturze. Nigdy tych cząsteczek nie obserwowano w jądrze komórkowym, lub komórkach leżących luźno w cytoplazmie (cytoplazmie matrix).

Opisane przez autora cząsteczki odpowiadają tym kryteriom, które według Friedlaendera i Higashi są konieczne do identyfikacji wirusa w mikroskopie elektronowym.

C. Oianagi

### ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МОЗГОВОЙ КОРЫ У МЫШЕЙ ИНФЕЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА

#### Содержание

Исследования проводились на взрослых мышах штамма Н, весом 15—20 граммов. Вирус японского энцефалита дозой  $10^{-6}$ — $10^{-8}$ /0,02 мл вводили в область лобной доли. Для микроскопического исследования брали материал из парие-тальной коры в 24, 48, 72, 96 часов после введения вирусной эмульсии. Контрольные исследования проводились на мозгах здоровых мышей, и мышей, которым вводили 0,02 мл мозговой взвеси без вируса, умерщвляемых через 72 часа после инъекции. Исследованный материал обрабатывался по методу Милтонига, с погружением в эпоне. Препараты исследовались в электронном микроскопе Хиташи HS-7.

Элементы, соответствующие ультраструктуре вируса впервые были отмечены через 72 часа после инфекции. Вирус не наблюдался в главных клетках и в эндотелие сосудов. В нейронах мышей, которые прожили 24 часа не обнаружили никаких изменений. В 48 часов с момента инфекции наблюдалось значительное повышение пузырьков аппарата Голджи. В 72 часа — изменения наблюдались в 70—80% нервных клеток. Они характеризовались еще большим количеством пузырьков в аппарате Голджи и вокруг него. В пузырьках аппарата Голджи, в вакуолях и в зернистой (rough surface e.r.) внутрицитоплазматической сети появлялись сферические электроно-концентрированные частицы диаметром в 38—45 m $\mu$ . Последние характеризовались электроно-концентрированным центром диаметром в 25—30 m $\mu$  и меньшей электроно-оптической концентрацией ало. В 96 часов после инфекции цитоплазма нервных клеток почти целиком наполнялась многочисленными пузырьками и вакуолами, содержащими частицы с выше-приведенной ультраструктурой. Последние никогда не наблюдались в клуточном ядре, равно как не располагались свободно в цитоплазме клеток (cytoplasmic matrix).

Описанные частицы соответствуют тем критериям, которые по Фридландеру и Хигаши необходимы для идентификации вируса в электронном микроскопе.

## REFERENCES

1. Friedlaender M.: Studies with the electron microscope of virus-host relationships in Ehrlich ascites tumor cells. 1. The identification and structure of Anopheles A virus. *J. Exper. Med.*, 1955, 102, 361.
2. Higashi N.: Electron microscopic study on viruses. *Electron Microscopy*, Bunkodo, Tokyo, 1964 (Japanese edition).
3. Higashi N. et al.: Electron microscopic study on Japanese encephalitis virus propagated in cultured cell. *Virus*, 1963, 13, 160 (Japanese edition).
4. Luft J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 1961, 9, 409.
5. Millonig G.: Advantages of a phosphate buffer for  $\text{OsO}_4$  solution in fixation. *J. Appl. Physic.* 1961, 32, 1637.
6. Millonig G.: Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions on fixation. *Electron microscopy. Fifth Internat. Congr. Elect. Micro.*, Academic Press, 1962, 2, 8.
7. Morgan C. et al.: Structure of viruses as observed in the electron microscope. V. Western equine encephalomyelitis. *J. Exper. Med.* 1961, 113, 219.
8. Mussgay M., Weibel T.: Electron microscopic and biological studies on the growth of Venezuelan equine encephalitis virus in KB cells. *Virology*, 1962, 16, 52.
9. Ota Z.: Electron microscopic observation on the virus particles of Japanese B encephalitis propagated in PS-cells. *Arch. Histol. Jap.* 1964, 24, 278 (Japanese edition).

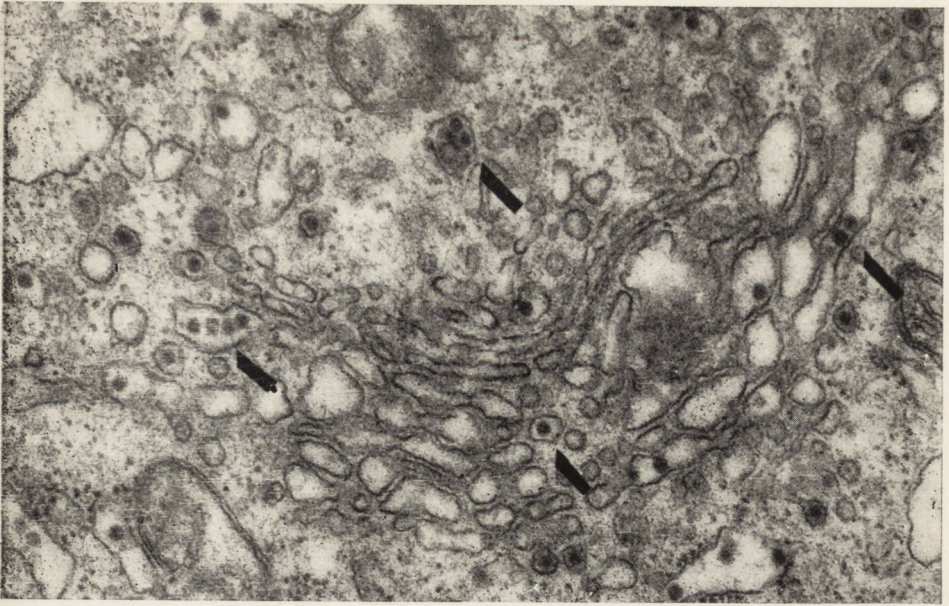


Fig. 1. Golgi apparatus of cortical nerve cell at 72 hours after inoculation. J.E.V. particles are indicated by arrows.  $\times 55\ 000$ .

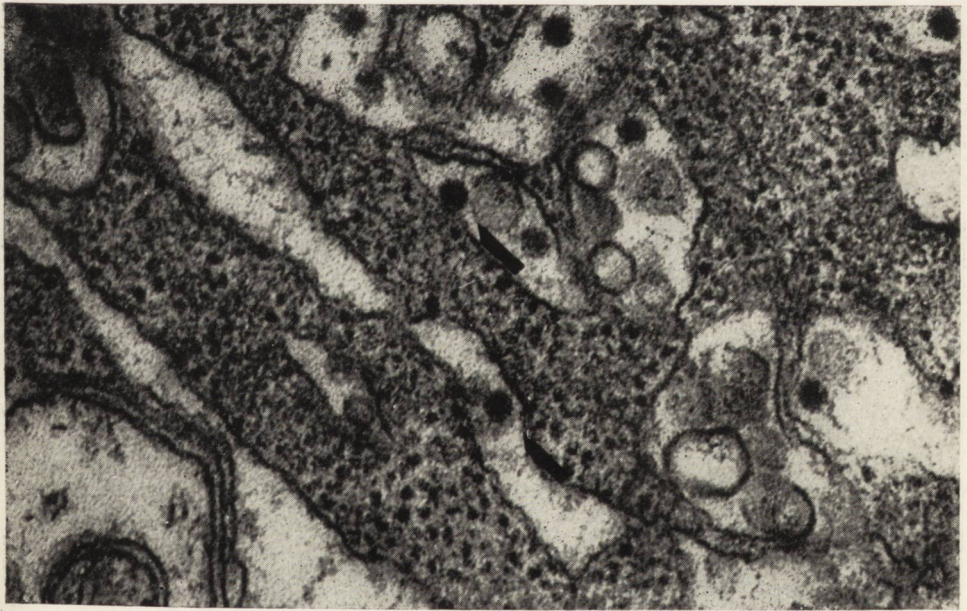
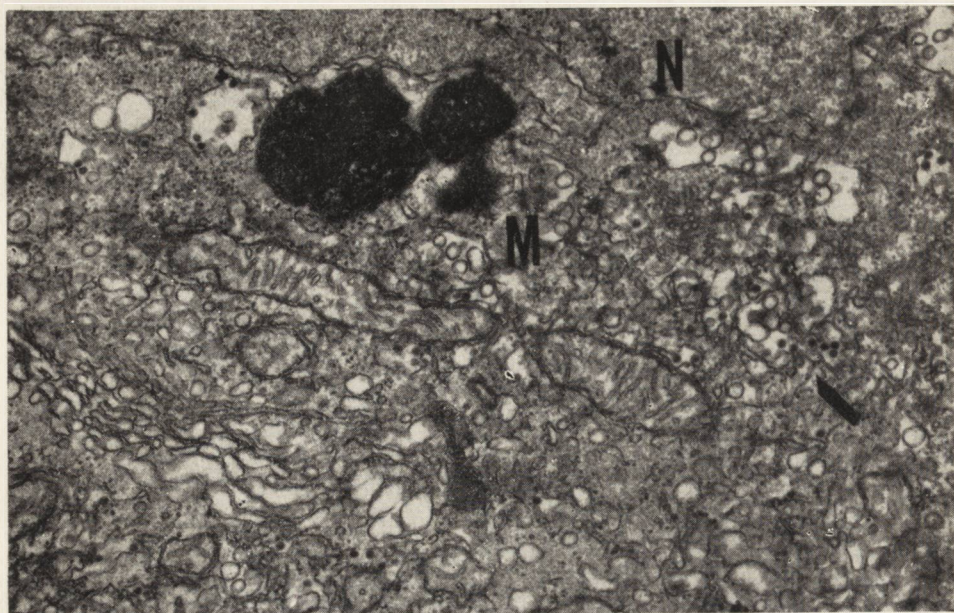
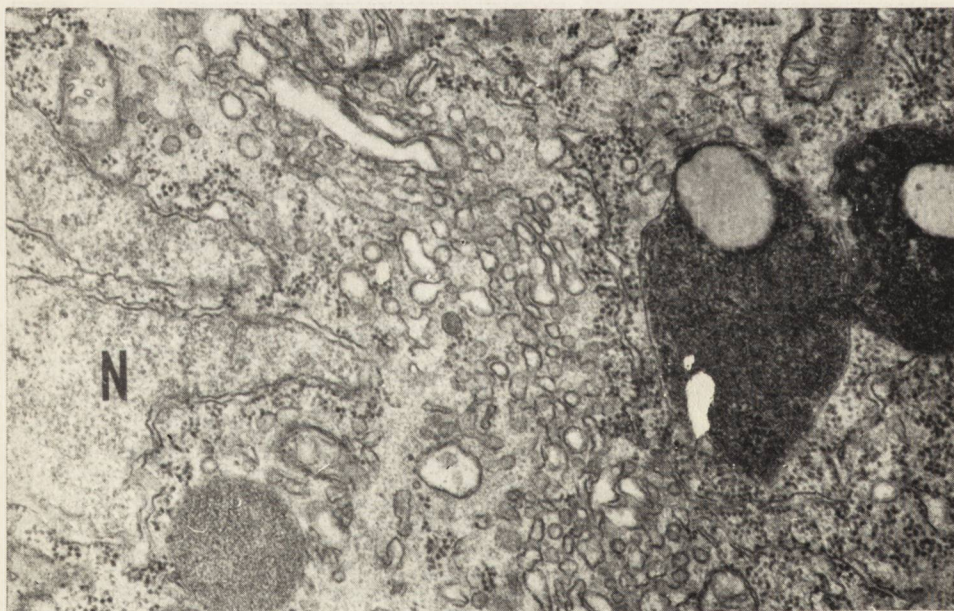


Fig. 2. A portion of the cytoplasm of cortical nerve cell at 72 hours after inoculation. Remark the inner substructures of J.E.V. particles (arrows);  $\times 110\ 000$ .



*Fig. 3.* Cortical nerve cell at 96 hours after inoculation. Vesiculation and vacuolisation of the cytoplasm are noticeable. J.E.V. particles (arrow); *M* — multivesicular body-like structure. *N* — nucleus.  $\times 25\ 000$ .



*Fig. 4.* Cortical nerve cell of the control. Vesicles are, more or less, increased, while J.E.V. particles as seen in Figs. 1, 2 and 3 are absent. *N* — nucleus.  $\times 26\ 000$ .

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

półrocznie	— 50.—
rocznie	— 100.—

Prenumeraty przyjmowane są do 10 dnia miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty.

Prenumeratę na kraj dla czytelników indywidualnych przyjmują urzędy pocztowe oraz listonosze.

Czytelnicy indywidualni mogą dokonywać wpłat również na konto PKO Nr. 1-6-100020 — Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch”, Warszawa, ul. Wronia 23.

Wszystkie instytucje państwowe i społeczne mogą zamawiać prenumeratę wyłącznie za pośrednictwem Oddziałów i Delegatur „Ruch”.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 40% droższa od krajowej, przyjmuje Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch”, Warszawa, ul. Wronia 23, konto PKO Nr 1-6-100024 tel. 20-46-88.

Egzemplarze zdezaktualizowane można nabyć w Punkcie Wysyłkowym Prasy Achiwalnej „Ruch” — Warszawa, ul. Nowomiejska 15/17, konto PKO nr 114-6-700041 VII O/M Warszawa.