

## 海南岛125株登革病毒的分离与鉴定

陈玉本 王 飞 邝继深

刘 跃 陈文洲

(海南行政区卫生防病中心, 海口)

### Isolation and Identification of 125 Strains of Dengue Virus in Hainan Island

Chen Yu-ben Wang Fei Kuang Ji-shen

Liu Yue Chen Wen-zhou

(Hainan District Center for Sanitary and Disease Control, Haikou)

1985年9月儋县发生一次由Ⅱ型登革病毒引起的登革热和登革出血热的爆发流行<sup>[1]</sup>, 至1986年10月疫情已由儋县波及本岛十县二市。根据记载<sup>[2,3]</sup>, 国外登革热流行期间, 常伴多个型别登革病毒同时传播。为掌握本岛此次登革热流行时除Ⅱ型病毒外, 是否尚有其他型别流行, 于1986年1月至10月登革热流行期间, 取十县二市278例急性期病人血清, 接种C6/36白纹伊蚊细胞系, 进行病毒分离, 共获得125株病毒。均用抗登革1~4型病毒型特异单克隆抗体以间接免疫荧光技术鉴定, 其中大部分毒株同时用补体结合试验鉴定, 还选29株病毒进行了细胞中和试验的鉴定, 证实均为Ⅱ型登革病毒, 从而确定此次大流行仅为Ⅱ型登革病毒所致。本文将这些病毒株的分离及鉴定结果报道如下:

### 材 料 与 方 法

**一、标本来源:** 采集临床疑是登革热发病三天内患者静脉血、置冰壶内带回实验室分离血清, 三周后再取第二份血清进行抗体测定。

**二、分离病毒:** 用C6/36白纹伊蚊细胞纯系(简称C6/36细胞), 营养液为10% 1640伊格液, 内含10%胎牛血清, 微量细胞培养。

**三、病毒鉴定:** 1. 登革病毒1~4型抗原和相应的免疫腹水, 为中国药品生物制品检定所虫媒病毒专业实验室提供。抗登革1~4型病毒型特异的单克隆抗体、兔抗鼠荧光抗体由中国人民解放军军事医学科学院五所四室提供。

2. 间接免疫荧光技术: 将感染病毒的细胞悬液(病变+~++)滴于载玻片上,

本文于1987年1月4日收到

冷丙酮固定后, 分别滴加各型单克隆抗体, 经 37°C 反应及洗涤后, 加伊文思兰液 (1:500) 稀释的兔抗鼠荧光抗体 37°C 反应 1 小时后, 洗涤、吹干、荧光显微镜检查。阳性者在细胞浆内出现特异性荧光颗粒, 对照正常细胞无此颗粒。

3. 补体结合试验: 按全量 0.6 毫升法进行。

4. 细胞中和试验: 用 C6/36 细胞, 固定标准诊断血清浓度 (1:8), 稀释病毒于微量培养板进行<sup>[4]</sup>。

## 结 果

### 一、分离病毒:

用 C6/36 细胞培养法, 从十县二市 278 份病人血清标本中分离出 125 株病毒, 结果见表 1。

表 1 海南岛各县、市病人血清标本分离病毒结果

Table 1 The results of isolation of viruses from serous samples of patients in different places of Hainan

标本来源	检查份数	阳性份数
海口市	49	15
三亚市	17	9
儋县	22	15
临高县	27	21
汀迈县	23	12
东方县	55	17
昌江县	10	8
琼山县	49	19
文昌县	7	3
琼海县	10	3
屯昌县	4	1
定安县	5	2
合 计	278	125

### 二、病毒鉴定:

1. 间接免疫荧光法: 新分离的 125 株病毒用 1~4 型登革病毒特异单克隆抗体鉴定。于新分离的登革病毒感染的细胞浆内仅发现与 II 型登革病毒型特异单克隆抗体产生的明亮黄绿色特异荧光, 而对其他各型登革病毒型特异单克隆抗体所见荧光极弱, 与未感染病毒的正常细胞对照无明显差别。结果表明从病人血清中分离的 125 株病毒均为 II 型登革病毒。

2. 补体结合试验: 自已经间接免疫荧光技术鉴定的 125 株病毒中任选 97 株, 用补体

结合试验鉴定。除一例结果为阴性外(用细胞中和试验证实为Ⅱ型登革病毒),其余96株的补体结合滴度均以对Ⅱ型登革病毒免疫腹水者为高,其中7株与其他型免疫腹水相差两倍,其余89株差别均在4倍以上,与标准株间交叉反应基本一致,支持所分离的病毒为Ⅱ型登革病毒的结果。

3.细胞中和试验:从所分得病毒中抽样29株用细胞中和试验进行鉴定,结果见表2。可以看出Ⅱ型登革病毒免疫腹水对29株病毒的中和指数最高,亦证实它们均为Ⅱ型登革病毒。

表2 细胞中和试验结果  
Tab 2 The results of cell neutralization test

病毒株	免疫腹水				病毒株	免疫腹水			
	D-1	D-2	D-3	D-4		D-1	D-2	D-3	D-4
临高 2	3	1000	50	3	文昌175	5	95	1	16
临高 4	7	3163	7	0	文昌193	3	1000	10	3
临高 6	3	468	0	0					
临高 96	3	468	0	10	定安272	10	3162	54	10
临高 97	0	100	0	2	定安273	3	316	27	3
临高137	5	2754	5	3					
临高138	0	6761	10	9	琼海264	10	6761	68	10
					琼海265	5	31620	17	5
儋县 2	5	316	5	0					
儋县 6	21	8710	19	35	昌江 3	100	21380	214	100
儋县 8	1	215	5	32	昌江 4	186	1860	32	19
					昌江 7	3	1698	17	3
汀迈177	16	339	21	10					
					东方 33	10	14800	32	10
琼山173	4	1000	3	4	东方112	10	3162	32	10
琼山179	3	100	2	3					
琼山183	7	316	5	3	三亚129	5	31620	10	10
琼山184	10	316	1	0	三亚134	7	2138	145	7
琼山185	8	100	8	1					

## 讨 论

我国于1978—1981年间连续发生登革热流行<sup>[5,6,7]</sup>,1985年9月儋县北部地区发生疑似登革热病例报告,并从患者急性期血清和当地优势蚊种—埃及伊蚊分离得登革Ⅱ型病毒<sup>[1]</sup>。至1986年10月疫情由儋县逐渐扩散全岛十县二市,为查清这次大流行中除Ⅱ型

病毒外, 是否还有其他型登革病毒同时在流行中起作用。据报道<sup>[2,3]</sup>在登革热流行中, 泰国于1966年曼谷湾苏梅岛流行时, 从病人血清及蚊子分离到登革Ⅱ、Ⅳ型病毒; 柬埔寨1961年从病人血清中分离到登革Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ型病毒; 新加坡1960年流行时从病人血清分离得Ⅰ、Ⅱ型登革病毒; 菲律宾1956年从病人血清分离到登革Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型病毒; 1986年8、9月波多黎各从病人分离得64株登革病毒, 其中登革Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ型病毒分别占38%、9%和53%。1980年海南岛发生登革热流行时, 李福琛等<sup>[8]</sup>自患者分离得一株Ⅰ型登革病毒, 而其他工作者当年所分离的登革病毒, 均为Ⅲ型<sup>[5,9]</sup>, 1981年分离得之病毒亦为Ⅲ型病毒<sup>[10]</sup>, 至1985—1986年Ⅱ型登革病毒流行时仍未分离得Ⅰ型登革病毒<sup>[3]</sup>, 登革Ⅰ型病毒究竟是否为由海南岛外偶然传入, 在当时Ⅲ型登革病毒大量传播时, 由于型间的短期交叉保护作用而未能继续传播, 还是其他因素的影响, 是一个值得研究的问题。我们从各县市新疫区采集病人急性期血清共278份分离得125株病毒, 经过鉴定均属Ⅱ型登革病毒。表明疫情从1985年9月至1986年10月全岛流行的登革病毒型别均为Ⅱ型登革病毒, 未发现其他型别。用C6/36细胞分离登革病毒十分敏感, 同时用抗登革1~4型病毒型特异的单克隆抗体以间接免疫荧光法鉴定登革病毒, 具有敏感性高、特异性强、快速、简便等优点。

### 参 考 文 献

- [1] 陈文洲等, 1986, 中华微生物学和免疫学杂志 6(4):204—206.
- [2] 广州军区后勤部军事医学研究所, 1981, 登革热防治资料选编 85—86.
- [3] San Juan Laboratories 1986, Dengue Surveillance Summary No37.
- [4] 卫生部药品生物制品检定所, 1981, 全国登革病毒检测学习班讲义.
- [5] 李雪东等, 1981, 中华微生物学和免疫学杂志 1(1):7—11.
- [6] 黄满涛等, 1982, 中华微生物学和免疫学杂志 2(3):165.
- [7] 广东省佛山防治登革热协作组, 1981, 微生物学报 21(2):239—246.
- [8] 李福琛等, 1984, 中华流行病学杂志, 5(6):376—377.
- [9] 朱关福等, 1982, 中华微生物学和免疫学杂志 2(4):219—221.
- [10] 陈文洲等, 1981, 海南岛1981年登革热病原学总结, 内部资料.