

383-388

11219(3)

第7卷第4期
1992年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 7 No. 4
Dec. 1992

云南森林脑炎病毒的动物敏感性研究

黄文丽 自登云 侯宗柳

(云南省流行病防治研究所, 大理671000)

R373.31

提 要

本文对分离自云南的森林脑炎病毒进行了动物敏感性研究, 实验证明云南森林脑炎病毒对小白鼠有较强的致病性, 三日龄乳鼠无论经脑内、腹腔、皮下接种均能致病、死亡, 但毒力较国内森林脑炎病毒标准株低; 三周龄小白鼠经鼻腔接种亦能发病致死。对乳大白鼠、幼年豚鼠和金黄色地鼠能引起发病或死亡, 病毒抗原定位主要在脑组织。病理检查表明感染的各种动物脑组织均有明显病变。此外, 对鸡胚敏感, 能引起 BHK₂₁、Vero、Vero-E₁ 等传代细胞及人胚肾、乳猪肾原代细胞的 CPE。结果表明了云南森林脑炎病毒对细胞、动物的致病性与国内森林脑炎病毒标准株相似, 仅毒力稍低。

关键词: 病毒 森林脑炎 敏感性试验

1989年我们从云南西部横断山脉海拔2700—2900米的原始混交林地区采集到的两组卵形硬蜱, 以及一不明热患者血中分离到三株森林脑炎病毒, 从人及动物血清中查到病毒抗体, 证实云南西部存在森林脑炎自然疫源地^[1,2]。云南西部地区属亚热带雨林气候, 与东北地区在地理景观、气候条件和宿主媒介均有较大差异, 为阐明云南森林脑炎病毒的生物学性状以及与国内标准株间的异同, 进而为本病防治及实验室诊断提供科学依据, 本文进行了病毒的毒力试验、动物感染范围和对细胞的致病性研究, 结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、病毒: 选用分离自云南卵形硬蜱 (T₁₀、T₅₇) 和不明热患者血液 (YH) 的森林脑炎病毒及国内森林脑炎标准株 (RSSE, 哈尔滨医科大学公共卫生学院刘瑞璋教授馈赠)。病毒在3日龄小鼠脑内传代, 有规律发病后濒死前取脑供试。

二、细胞: 用传代细胞系金黄色地鼠肾细胞 (BHK₂₁)、绿猴肾细胞 (Vero、Vero-E₁) 及白蚁伊蚊细胞 (C₁/36) 等; 原代细胞系乳猪肾细胞 (SPK)、人胚肾细胞 (HEK)、小白鼠鼠胚纤维母细胞 (MEF)、幼兔睾丸细胞 (YRT), 常规培养。

三、动物: 所用动物均为本所动物室提供。

本文于1991年9月4日收到, 1992年3月25日修回。

致谢: 云南省大理州卫校病理室鲍铭晖同志协助制作和检查病理标本。

四、毒力试验：选用3日龄小白鼠，经脑内、腹腔接种十倍系列稀释的病毒悬液，连续观察14天，按 Reed 和 Muench 法计算 LD_{50} 。

五、动物敏感试验：用新鲜的鼠脑病毒悬液 ($10^{-2}g/ml$)，经脑内、腹腔、皮下接种动物，接种剂量依动物大小、接种途径而定。每天观察，对发病濒死的动物进行解剖，采血，取脏器做病理和抗原定位检查，血清做荧光抗体检查。对不发病的动物观察两个月，于观察中期每组选2只动物处死取脏器和血清进行间接免疫荧光检查^[3]。

结 果

一、动物敏感试验

1. 毒力及发病情况 云南森林脑炎病毒经脑内、腹腔、皮下接种3日龄小白鼠均

表 1. 森林脑炎病毒对乳小白鼠的毒力试验
Table 1. The median lethal dose of suckling mice infected with RSSEV

毒 株 Virus strains	接种途径 Inoculated method	
	脑内 Intracerebral	腹腔 Intraperitoneal
YH	6.50	6.33
T56	8.00	6.00
T57	6.50	6.00
RSSE	10.33	ND*

*ND: not done 未做

能引起发病死亡。潜伏期最早3天，平均4天。症状为离乳、离群、消瘦、抽搐和后肢瘫痪等。3周龄小白鼠经脑内、鼻腔接种病毒亦能发病死亡。毒力测定结果见表1，云南毒株对小白鼠的脑内致病力较腹腔强，但比标准株的毒力低。

2. 对各种动物的敏感性 选用大白鼠、豚鼠、金黄色地鼠、家兔、树鼩及一周龄雏鸡经脑内、腹腔、皮下接种森林脑炎病毒的标准株和云南

株。结果均能引起乳大白鼠、金黄色地鼠及幼豚鼠发病死亡，症状为不食、消瘦、萎靡、耸毛及后肢瘫痪。树鼩经脑内接种能发病，但腹腔和皮下接种则不能，个别树鼩于腹腔接种后二十余天出现后肢瘫痪^[4]。雏鸡对森林脑炎病毒不敏感，但感染后两个月少数小鸡出现瘫痪。乳兔、成年豚鼠及大白鼠接种病毒后无发病，见表2。此外，云南森林脑炎病毒经羊膜腔、尿囊腔、尿囊膜和卵黄囊接种鸡胚均能引起死亡。

3. 抗原定位及血清抗体检测 用 IFAT 检查感染动物脏器内抗原定位结果表明，不同途径感染的动物脑组织内森林脑炎病毒抗原显著高于其它脏器（表3）。各种发病濒死的动物早期血清无森林脑炎病毒抗体，未发病动物于感染后两周的血清多数含有森林脑炎病毒抗体。

IFAT 检查鸡胚羊膜、卵黄囊膜、尿囊膜的森林脑炎病毒抗原均为阳性。

4. 病理检查 所有感染动物的脑组织均出现明显的病理改变，主要为脑膜、脑实质血管扩张、充血，局灶性出血，神经细胞变性坏死，胶质细胞增生等。皮质、特别是白质和延髓可出现明显的坏死灶，脊髓轴索肿胀、弯曲、断裂。其次肺部病变较为明显，出现间质性肺炎，代偿性肺气肿，其它脏器偶有轻微病变。病理改变的部位、轻重与病毒抗原的分布一致（图1—2）。

表 2. 森林脑炎病毒对动物的敏感性试验
Table 2. The sensitisation test of animals infected with RSSEV

动物 Animals	毒株 Virus strains								
	YH			T57			RSSE		
	脑内 IC.	腹腔 IP.	皮下 SC.	脑内 IC.	腹腔 IP.	皮下 SC.	脑内 IC.	腹腔 IP.	皮下 SC.
乳大白鼠 Suckling rat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
金黄地鼠 Golden hamster	+	-*	-	+	+	+	+	+	+
幼豚鼠 Young quinea-pig	+	-	-	+	+	+	+	+	+
树 鼯 Tupaia belangeri	+	⊕*	-	+	-	-	+	-	-
雏 鸡 Chicken	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
家兔、成年大白鼠和豚鼠 Rabbit, adult rat and quinea-pig	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* +: 有急性症状。Acute symptoms are positive. -: 无症状。No symptom.

⊕: 无急性期症状, 但感染后期出现瘫痪。No acute symptom, but paralysis is positive in later period.

表 3. 用 IFAT 检测感染动物的抗原定位结果
Table 3. The antigen located in organism of animals by IFAT

动 物 Animals	器官 Organs										
	脑组织 Brain tissue				肝	脾	肾	胃	肠	淋巴	肺
	Co. ^a	WM.	Ob.	SC.	Liv.	Spl.	Kid.	Sto.	Int.	Lym.	Lun.
乳大白鼠 Suckling rat	+++	+++	+++		+	+	+	+	+		++
金黄地鼠 Golden hamster	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	++
幼豚鼠 Young quinea-pig	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	++
树 鼯 Tupaia belangeri	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	++
雏 鸡 Chicken	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+++
家 兔 Rabbit	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	+

^aCo: cortex; WM: white matter; Ob: oblongata; SC: spinal cord; Liv: liver;

Spl: spleen; Kid: kidney; Sto: stomach; Int: intestines; Lym: lymph; Lun: lung.



图 1. T₅₇V 腹腔接种幼豚鼠的脑组织病变, 血管周围淋巴细胞呈袖套状浸润 (H. E. 高倍)。

图 2. YHV 脑内感染树鼯, 大脑坏死性基质溶解, 神经细胞和神经胶质细胞坏死 (H. E. 高倍)。

图 3. T₅₇V 感染 SPK 细胞产生的细胞病变: 细胞堆聚、圆缩、断裂。

图 4. YHV 感染 BHK-21 细胞产生的细胞病变: 细胞圆缩、堆聚、脱落。

图 5. RSSEV 感染 HEK 细胞, 胞浆内可见较强的特异性荧光。

Fig 1. Lymphocyte around the brain blood vessel of young quinea-pig infected with T57 RSSEV by intraperitoneal

Fig 2. NC and neuroglia cell necrosising and cytoplasmic matrix lyolysizing in the brain of Tupaia belageri by intracerebral YHV

Fig 3. CPE of T₅₇ RSSEV on SPK cell

Fig 4. CPE of YH RSSEV on BHK-21 cell

Fig 5. The viral antigen located in HEK cell by IFAT

二、对细胞的致病变作用

云南森林脑炎病毒能在 BHK₋₂₁、Vero、Vero-E₀ 等传代细胞及人胚肾、乳猪肾、鼠胚纤维母细胞上增殖, 并产生细胞病变 (CPE), CPE 一般于感染后 48 小时出现, 第 4 天约 75% 的细胞出现 CPE, 病变以细胞圆缩、堆聚、脱落和断裂为主 (图 3—4)。用 IFAT 检查细胞内的病毒抗原, 可于细胞浆内看到较强的特异性荧光 (图 5)。病毒不能使 C₆/36、兔肾细胞产生 CPE (表 4)。

表 4. 森林脑炎病毒对细胞的致病变作用和荧光检查结果
Table 4. CPE and IFAT of Yunnan RSSEV

毒 株 Virus strains	细胞 Cells								
	BHK-21	Vero	Vero-E6	C6/36	SPK	HEK	MEF	YRT	
YH	CPE	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-
	IFAT	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-
T56	CPE	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-
	IFAT	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-
T57	CPE	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-
	IFAT	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-
RSSE	CPE	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	-
	IFAT	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	-

讨 论

研究表明, 云南森林脑炎病毒对 3 日龄至 3 周龄小白鼠均有较强的致病力, 故认为乳小白鼠是森林脑炎病毒分离和鉴定的首选动物。病毒从脑内、腹腔和皮下接种均能使乳大白鼠、幼豚鼠、金黄地鼠、树鼩、家兔和雏鸡等动物感染。比较大白鼠、幼年和成年豚鼠的发病情况, 说明动物的发病率与动物年龄有关。随着年龄的增长, 免疫系统日趋完善, 抵抗、清除病毒的能力逐渐增强, 发病率明显降低。本实验结果表明云南森林脑炎病毒对 BHK-21、Vero、Vero-E₆、乳猪肾、人胚肾细胞及鸡胚等均有较强的致病作用, 可用于病毒分离、鉴定和有关实验研究。

根据不同途径的感染动物脏器的病毒抗原定位及病理检查结果, 病毒抗原和病变主要在脑组织, 说明云南森林脑炎病毒为嗜神经病毒; 对神经组织具有亲和力, 并能在神经组织内繁殖, 所以中枢神经系统是森林脑炎病毒的靶器官。

交叉血抑试验和交叉中和试验结果表明, 云南森林脑炎病毒与国内标准株为同一类病毒^[1,2]。森林脑炎病毒属于披膜病毒科黄病毒属蜱传脑炎复合群。毒力试验、动物敏感试验及细胞致病变作用也表明云南毒株虽在毒力上比标准株稍弱, 但其感染性和致病性与标准株是相似的。

参 考 文 献

- [1] 白登云等, 1980, 中华实验和临床病毒学杂志, 4(4): 507。
- [2] 侯宗柳等, 1991, 病毒学报, 7(1): 75。
- [3] 戴华生, 1983, 新实验病毒学, 北京中国学术出版社, 第672页。
- [4] 侯宗柳等, 1991, 中国病毒学, (4): 298—303。

Study on the Susceptibility of Animal to Yunnan RSSE Virus

Huang Wen-li Zi Deng-yun Hou Zong-liou

(Yunnan Institute of Epidemic Diseases Control, DaLi 671000)

In 1989, 3 strains of Yunnan RSSE virus were isolated from 2 groups of *Ixodes Ovatus* (T56, T57) and blood of a female patient with fever of unknown infected with YHV, T56v, T57v by intracerebral, intraperitoneal, nasal cavity and subcutaneous inoculation respectively. The incubation period is 3—4 days. The 3 strains of virus could multiply and caused death of chicken embryo, baby rat, young guinea-pig, golden hamster, tupaia belangeri. After infection, the animals showed anorexia, weak, thin, ruffled fur and paralysis. The virus antigen have been demonstrated in the brain tissue of animals by IFAT. The pathological changes of the brain tissues of the infected animals are hyperaemia, neuron deterioration and necrosis. The 3 strains of virus could readily multiply and induce CPE in BHK-21, Vero, Vero-E6, SPK, HEK, MEF cells.

Key words, Russian spring-summer encephalitis virus Sensitization test