

首次从啮齿类和食虫类动物中
分离到森林脑炎病毒

侯宗柳 黄文丽 自登云 龚正达 雷亚民

R373.31

(云南省流行病防治研究所, 大理671000)

提 要

1988年, 我们从采自云南高黎贡山的卵形硬蜱及患者血液中分离到森林脑炎病毒。1990年, 又从该地区10种95只啮齿类中查到森林脑炎病毒抗体; 并从社鼠 (*R. confucianus*)、小林姬鼠 (*A. sylvaticus*) 和灰腹鼠 (*R. ehaninus*) 等8种啮齿类及食虫类中分离到15株病毒, 选三株用单克隆抗体进行免疫荧光试验, 理化特性、生物学特性及中和试验研究。结果表明, 其病毒的抗原性、生物学特性及理化特性与东北株及从卵形硬蜱、患者分离的森林脑炎病毒一致。从啮齿类及食虫类分离到森林脑炎病毒在国内属首次报道。这项研究结果进一步证明, 啮齿类和食虫类在森林脑炎自然疫源地的保存方面起重要作用。

关键词: 森林脑炎病毒 啮齿类 食虫类

蜱媒脑炎病毒是由蜱传播的一组疾病。云南西部属西部亚热带雨林气候, 动物地理划区为西南山地亚区, 与缅甸相邻的横断山脉地段为原始的针阔叶混交林地区。1989年, 我们以该地区的卵形硬蜱及患者中分离到三株森林脑炎病毒^[1,2]。最近, 又从该地区的8种啮齿类及食虫类中分离到15株病毒, 选三株进行鉴定, 结果报道如下。

材 料 和 方 法

1. 动物材料: 在海拔2700米左右的原始混交林中, 用捕鼠笼法捕捉鼠形动物, 分类鉴定后, 解剖取脑放入液氮保存, 带回实验室进行病毒分离。
2. RSSE株: 由哈尔滨医科大学公共卫生学院刘瑞璋教授提供。免疫血清用病毒免疫家兔而得。YH和T57株分别分离自患者及卵形硬蜱。
3. 乳小白鼠: 采用昆明种小白鼠, 由本所动物室提供。
4. 病毒分离: 用啮齿类、食虫类脑悬液经脑、腹联合接种3日龄乳鼠, 连续观察15天, 观察发病情况, 未发病的盲传三代弃之。

本文于1991年12月27日收到, 1992年4月7日修回。

感谢昆明医学院电镜室张鸿飞教授协助进行电镜检查。

5. 病毒株的鉴定:

(1) 滤过试验: 用EK滤板过滤发病乳鼠脑悬液, 并将滤过液接种3日龄乳小白鼠, 观察是否有规律发病。

(2) 理化特性: 病毒的核酸型和对酸和脂溶剂敏感试验, 参照文献^[3]。

(3) 血凝试验: 血凝素采用蔗糖-丙酮法制备。血球采用鸽血球。血凝试验采用微量法, 以“卅”的凝集为终点。

(4) 电镜观察: 由昆明医学院电镜室协助完成。

(5) 免疫荧光试验: 采用间接法。单克隆抗体A₁由维也纳大学病毒研究所F. X. Heinz博士提供, 为森林脑炎血凝抑制抗体^[4], 以“+”为阳性。

(6) 毒力测定: 用3日龄乳小白鼠, 测脑内半数致死量。用Reed-Muench法计算LD₅₀。

(7) 中和试验: 采用固定血清稀释病毒法, 连续观察15天。用Reed-Muench法计算中和指数, 中和指数大于50者为阳性。

结 果

1. 病毒分离结果: 动物脑悬液接种于乳鼠后, 发病的乳鼠表现为拒食、耸毛、后肢麻痹和抽搐死亡。除R17为第一代第8天发病外, 其它14株均为第二代发病。结果从8种啮齿类及食虫类中分离到病毒15株(表1)。

表 1. 从高黎贡山啮齿类及食虫类动物中病毒分离结果
Table 1. Viruses isolated from the rodents and insectivora of Gaoligong Mountain in Yunnan

毒 株 Virus strains	啮齿类 Rodents	食虫类 Insectivora
R14, R34, R45	滇绒鼠 <i>E. eleusis</i>	
R17, R19	社鼠 <i>R. confucianus</i>	
R21, R31	小林姬鼠 <i>A. sylvaticus</i>	
R26, R33	梵鼠 <i>N. bramha</i>	
R27, R29, R30		中华新猬 <i>N. sinensis</i>
R28	大足鼠 <i>R. nitidus</i>	
R32	褐尾鼠 <i>N. cremoricenter</i>	
R48	灰腹鼠 <i>R. eha ninus</i>	

2. 过滤试验:用EK滤板过滤发病乳鼠脑悬液,能引起3日龄乳小白鼠有规律发病,表明引起小白鼠发病的病原体能通过EK滤板。

3. 理化特性:R17、R31及R46不耐酸,对乙醚敏感,5-氟脱氧尿嘧啶对他们无抑制作用。

4. 病毒血凝素的最适pH测定:从表2可见,三株病毒血凝素的最适pH范围为6.0—7.0。最适pH R17为6.6, R31和R46为6.2。

表 2. 新分离病毒血凝素的最适pH范围

Table 2. Effective pH range of HAN of Russian spring-summer encephalitis viruses from rodents at Gaoligong Mountain

毒 株 Virus strains	pH						
	5.75	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0
R17	-	1:32	1:32	1:32	1:128	1:64	1:4
R31	-	1:128	1:256	1:128	1:128	1:16	1:2
R46	-	1:128	1:256	1:128	1:128	1:64	1:8
RSSE*	-	1:64	1:256	1:512	1:1024	1:32	1:8

* 东北株 North-eastern strain

5. 电镜观察:R17、R31和R46为40—63nm的球形颗粒。有囊膜,囊膜内有25—40nm的电子密度高的核衣壳,囊膜表面纤突隐约可见。病毒颗粒散在于胞浆中(图1)。

6. 毒力测定:R17的LD₅₀为8.0; R31和R46的LD₅₀为6.67;毒力均比RSSE(10.33)低。

7. 免疫荧光:R17、R31和R46都能与森林脑炎病毒单克隆抗体A₁反应,说明抗原性与森林脑炎病毒一致,见图2。

8. 中和试验:从表3可见,R17、R31和R46病毒能被森林脑炎病毒RSSE、YH和R57免疫血清中和,而不与蜱媒脑炎复合群的其它成员如KFD、POW和LGT反应,因此R17、R31和R46的抗原性与森林脑炎病毒一致,属于森林脑炎病毒。

表 3. 从高黎贡山啮齿类分离的森林脑炎病毒的中和指数

Table 3. Neutralization index of Russian spring-summer encephalitis viruses from rodents at Gaoligong Mountain

毒 株 Virus strains	免疫血清 Immune serum							
	RSSE	YH	T57	KFD	POW	LGT	R17	R31
RSSE	6166	12300	2630	ND	ND	ND	ND	ND
R17	316.2	2138	2138	10	6.5	1	1479	ND
R31	177.8	100	100	7.59	1	13.34	ND	316
R46	166	1778	168	38.9	3.84	10	69.18	248

讨 论

森林脑炎病毒属于虫媒病毒披膜病毒科黄病毒属蜱传脑炎复合群。蜱是森林脑炎病毒的传播媒介,啮齿类常是蜱的寄主。1988年,我们从高黎贡山疫源地的卵形硬蜱及患者血中分离到森林脑炎病毒,并系统地做了生物学特性、动物敏感试验及发病机理的研究^[6-7]。1990年,我们又从当地的8种啮齿类及食虫类中分离到病毒15株,经理化特性、生物学特性及中和试验表明,从社鼠(R17)、小林姬鼠(R31)和灰腹鼠(R46)中分离的三株病毒与从卵形硬蜱、患者及东北株森林脑炎病毒的理化特性、生物学特性及抗原性一致,可确定为森林脑炎病毒。从上述三种鼠类中分离到森林脑炎病毒在国内尚属首次报道。

关于啮齿类在森林脑炎病毒中的保存作用,苏联学者B.Д.Соловьёво曾作过阐述,他从花纹鼠及其他许多种啮齿类中分离到森林脑炎病毒。在我国东北地区,辛均^[8]和于心^[9]等报告有鼠类、鸟类和野生动物等20余种不显性感染森林脑炎病毒,并认为鼠类中如林姬鼠、纹纹鼠等是森林脑炎病毒的主要宿主。我们在高黎贡山疫区捕获了10种95只啮齿类,作了血清学调查,发现普遍携带有森林脑炎病毒抗体,说明当地啮齿类及食虫类中普遍感染森林脑炎病毒^[10]。

在捕获的鼠形动物中,发现有相当数量的稚蜱寄生于体内,但未发现成蜱。说明稚蜱阶段在动物体内渡过,当稚蜱成熟后,脱离动物,又叮咬人和其他大型动物,就形成了病毒的循环。我们从啮齿类中分离到森林脑炎病毒,进一步证实了啮齿类和食虫类是其宿主并参与该病毒的循环。

高黎贡山疫区正在中缅边界,为原始森林地带,随着建设的需要和经济的发展,将不断进行开发,人们将不断出入该地区。从我们调查的资料表明,该地区的啮齿类及食虫类、蜱均带有森林脑炎病毒,并从患者分离到森林脑炎病毒,说明该疫源地内森林脑炎病毒流行强度比较大,提示我们应加强宣传和提请有关部门重视,采取必要的预防和防护措施。

参 考 文 献

- (1) 侯宗柳等, 1991, 病毒学报, 7(1): 75—77。
- (2) 自登云等, 1990, 中华实验与临床病毒学杂志, 4(4): 507—508。
- (3) 戴华生等, 1983, 新实验病毒学, 北京中国学术出版社, 617—619。
- (4) Farshed G Uirakho., 1989, *Virology*, 169: 90—99.
- (5) 黄文丽等, 1991, 中国人畜共患病杂志, 5(4): 329—334。
- (6) 黄文丽等, 1992, 中国病毒学, 7(4): 383—388。
- (7) 侯宗柳等, 1991, 中国病毒学, 5(4): 329—334。
- (8) 辛均等, 1985, 流行病学杂志, 3(3): 175—179。
- (9) 于心等, 1986, 流行病学杂志, 2(3): 95—96。
- (10) 侯宗柳等, 1992, 中国媒介生物学与控制杂志, 3(3): 173—176。



图1 R17和R31在电镜下的形态

Fig 1. Morphology of R17, R31

A. R17 感染BHK细胞 (40000 × 2)

A. BHK infected with R17 (40000 × 2)

B. R31 感染BHK细胞 (20000 × 2)

B. BHK infected with R31 (20000 × 2)

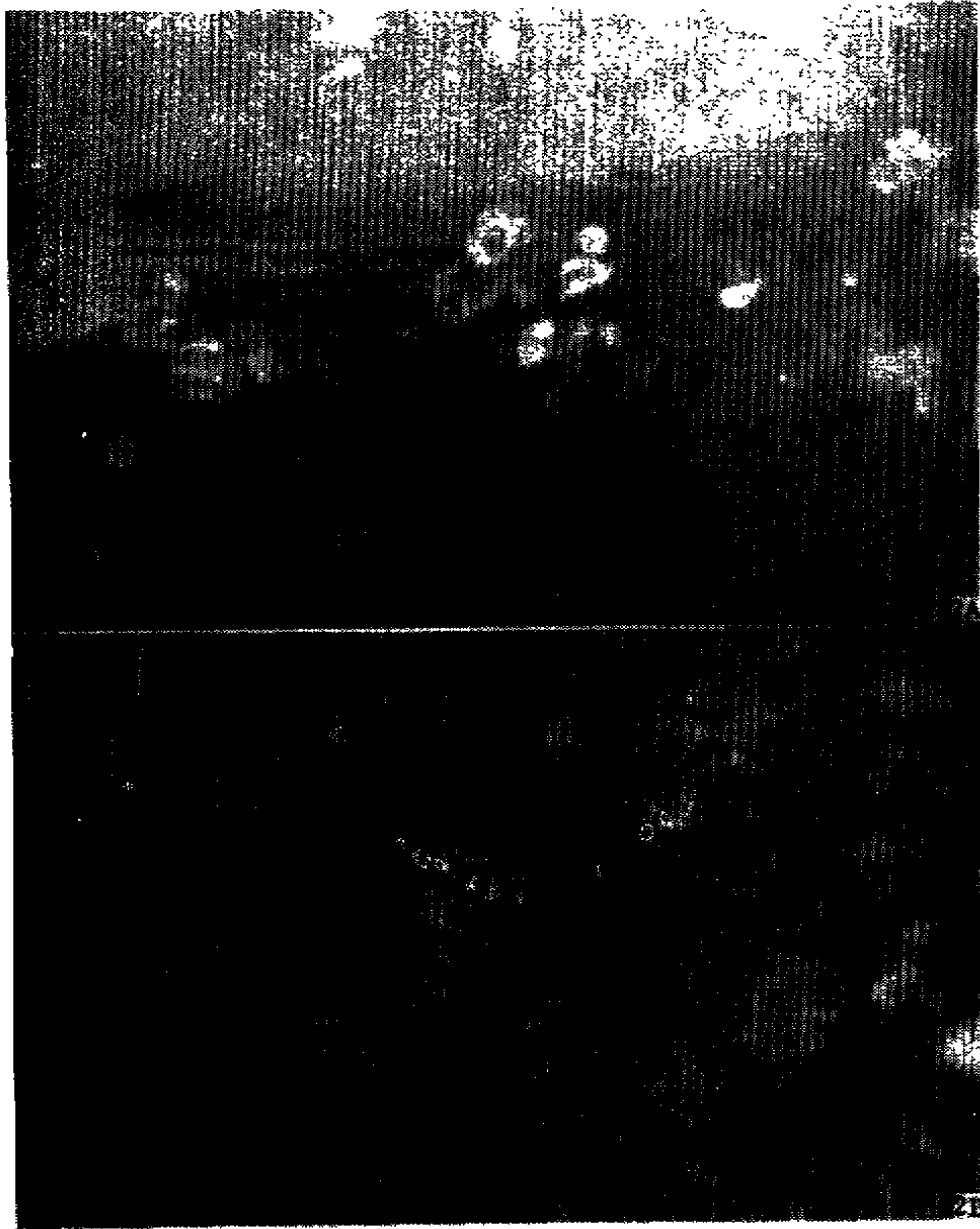


图 2 用单克隆抗体A₁做R17、R31和R46的免疫荧光试验结果

Fig 2. BHK infected with R17, R31 and R46 by IFAT using McAb A1

- A. R31感染BHK细胞
- A. BHK infected with R31
- B. R46感染BHK细胞
- B. BHK infected with R46

First Isolation of Russian Spring-Summer Encephalitis Viruses from Rodents and Insectivora

Hou Zong-liu Huang Wen-li Zi Deng-yun
Gong Zheng-da Lui Ya-ming

(Yunnan Institute of Epidemic Diseases Control and Research, Dali 671000)

In 1988, Russian spring-summer encephalitis viruses were isolated from *Ixodes ovatus* and the patient at Gaoligong Mountain natural focus in Yunnan. In 1990, 15 strains of viruses were isolated from *R. confucian*, *A. sylvaticus*, *R. eha ninus*, *E. eleusis*, *N. bramha*, *N. sinensis*, *R. nitidus* and *N. cremoriventer* and 95 samples of 10 species of rodents were checked out Russian spring-summer encephalitis viruses antibody in the same natural focus. The antigenicity, biological and physical and chemical characteristics of three viruses from *R. confucians*, *A. sylvaticus* and *R. eha ninus* were identified with the viruses from north-eastern of China and *Ixodes ovatus* as well as patient by IFAT using McAb, physico-chemical test, electron microscope and neutralization test. It was first report that Russian spring-summer encephalitis viruses were isolated from rodents in China. It confirmed that rodents play an important role in preserving Russian spring-summer encephalitis virus.

Key word: Russian spring-summer encephalitis virus Rodents
Insectivora