

云南省4种伊蚊的乙型脑炎病毒分离物的研究*

张海林 施华芳[✓] 米竹青 自登云 龚正达
侯宗柳 李兆祥 张云智 张嘉玉 杨兰萍

(云南省流行病防治研究所, 云南大理 671000)

R373.31

R374.1

摘要 在云南省西南边境9县市捕获伊蚊属雌性成蚊16种19367只,用细胞法和乳鼠法分离病毒。从185批6491只白纹伊蚊中分离到病毒2株,从50批1605只刺扰伊蚊中分离到病毒2株,从23批772只窄翅伊蚊中分离到病毒2株,从4批103只阿萨姆伊蚊中分离到病毒1株。其它12种共10396只伊蚊的病毒分离物为阴性。分离到的7株病毒经免疫荧光、酶免疫、血凝抑制和中和试验鉴定,均为乙型脑炎病毒(JE virus)。白纹伊蚊是野外竹林的优势蚊种。分析认为白纹伊蚊在当地乙型脑炎病毒保存和传播中起重要作用,刺扰伊蚊、窄翅伊蚊和阿萨姆伊蚊亦可参与该病毒的传播。

关键词 蚊类,伊蚊属,流行性乙型脑炎病毒,媒介,云南省

国内外在流行性乙型脑炎(简称乙脑)媒介研究中做了大量工作,明确了三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)是本病主要传播媒介,一些库蚊属蚊虫在乙脑病毒传播中亦起重要作用。然而,伊蚊在本病传播中的作用研究较少。为了解伊蚊属蚊虫自然感染乙脑病毒情况及媒介意义,我们在云南省西南部热带地区采集蚊虫进行病毒分离,现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 蚊虫采集 在云南省景洪、勐腊、勐海、河口、孟连、耿马、盈江、潞西和瑞丽9县市的野外竹林和畜圈捕蚊,将蚊虫置低温冻死后分类编号,20~50只一批,放入小瓶内,液氮冻存待检。

1.2 病毒分离 蚊虫经常规处理后,制成接种液,接种于C6/36细胞和乳鼠分离病毒。细胞出现规律病变或乳鼠发病即行鉴定。

1.3 病毒鉴定

1.3.1 抗体 乙脑病毒家兔免疫血清为本室自制;乙脑病毒单克隆抗体是中国预防医学科学院病毒学研究所和中国药品生物制品检定所制品;兔抗鼠荧光抗体和羊抗兔荧光抗体是北京生物制品研究所和兰州生物制品研究所制品;酶标SpA是中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所制品。

1.3.2 抗原 乙脑病毒抗原为鼠脑蔗糖丙酮法抗原,本室制备。

1.3.3 免疫荧光试验(IFAT) 采用间接法。感染细胞培养至第5天,将细胞吹下,滴于玻片,常规染色制片,用OLYMPUS荧光显微镜检查。

收稿日期:1998-02-23,修回日期:1998-04-27

* 云南省卫生厅科研基金资助课题

1.3.4 细胞酶免疫(C-EIA)试验 感染细胞培养于聚苯乙烯塑料板,至第 5 天,常规固定,加各种结合物及样品,用目测法判定结果。方法详见文献[1]。

1.3.5 血凝(HA)及血凝抑制(HI)试验 采用常规微量法。用 0.5% 鸽血球测定。血清用白陶土和鸽血球常规处理,抗原为 4_u。以 50% 的血球凝集被抑制为终点。

1.3.6 中和试验 采用固定血清稀释病毒法。用 3~4 周龄小白鼠测定,观察 14d,按 Reed-Muench 法计算中和指数。

2 结果

2.1 病毒分离

在上述 9 县市共采获伊蚊属雌性成蚊 16 种 19 367 只作病毒分离,从白纹伊蚊、刺扰伊蚊、窄翅伊蚊和阿萨姆伊蚊中分离出病毒 7 株(表 1)。所获毒株均能引起乳小白鼠或 3 周龄小白鼠发病和死亡,亦能导致 C6/36 细胞出现病变,并具有滤过性。

表 1 从云南省 4 种伊蚊中分离乙脑病毒

Table 1 Isolation of Japanese encephalitis virus from four species of *Aedes* mosquitoes collected in Yunnan province

| 蚊种 Species of mosq | 采集地点 Collecting site | 蚊虫只数 No. of mosq. | 批数 Pools of mosq. | 阳性批数 No. of positive pools | 病毒号及阳性蚊采集县 Virus code and collecting counties of positive mosq |
|------------------------------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|--|
| 白纹伊蚊 <i>Aedes albopictus</i> | 竹林 Bamboo forest | 6 491 | 185 | 2 | B88-81 景洪 Jinghong D266 瑞丽 Ruili |
| 刺扰伊蚊 <i>Aedes vexans</i> | 竹林 Bamboo forest 畜圈 Stable | 1 194 411 | 38 12 | 2 0 | B24-5 景洪 Jinghong B86-17 景洪 Jinghong |
| 窄翅伊蚊 <i>Aedes lineatopennis</i> | 竹林 Bamboo forest 畜圈 Stable | 76 696 | 3 20 | 1 1 | D107 盈江 Yingjiang B88-17 景洪 Jinghong |
| 阿萨姆伊蚊 <i>Aedes assamensis</i> | 竹林 Bamboo forest | 103 | 4 | 1 | L99 耿马 Gengma |

其它 12 种伊蚊(伪白纹伊蚊 *Ae. pseudalbopictus*、圆斑伊蚊 *Ae. annandalei*、台湾伊蚊 *Ae. formosensis*、显著伊蚊 *Ae. prominens*、股点伊蚊模拟亚种 *Ae. gardnerii imitator*、白雪伊蚊 *Ae. niveus*、白盏伊蚊 *Ae. alboscuteellatus*、环胫伊蚊 *Ae. desmotes*、侧白伊蚊 *Ae. albo-lateralis*、白带伊蚊米基尔亚种 *Ae. albotaeniatus mikiranus*、爱氏伊蚊 *Ae. eldridgei* 和亚白纹伊蚊 *Ae. subalbopictus*)共 10 396 只蚊虫的病毒分离均为阴性。

2.2 病毒鉴定

2.2.1 免疫荧光试验 分离到的 7 株病毒均与乙脑单克隆抗体或乙脑免疫血清出现特异性荧光反应(表 2)。

2.2.2 细胞酶免疫试验 B₈₈₋₈₁、B₈₆₋₁₇、B₈₈₋₂₁ 和 L₉₉ 株均与乙脑单克隆抗体或乙脑免疫血清产生特异性酶免疫反应(表 2)。

2.2.3 血凝特性 在 pH6.4 条件下,7 株病毒的鼠脑蔗糖丙酮抗原均能与鸽血球出现凝集,滴度为 1:160~1:5 120 之间(表 2)。

2.2.4 血凝抑制试验 所有分离株均能与乙脑病毒产生高滴度的抑制作用,抑制效价高达 1:320~1:2 560(表 2)。

2.2.5 中和试验 B₈₈₋₈₁、B₂₄₋₅、B₈₆₋₁₇、B₈₈₋₂₁ 和 L₉₉ 株对乙脑病毒的中和指数达到 123~1 000

(表2)。

试验证实,分离到的7株病毒均为乙脑病毒。

表2 分离自伊蚊的7株乙脑病毒的鉴定

Table 2 Identification of seven strains of Japanese encephalitis virus isolated from *Aedes* mosquitoes

| 毒株 Virus strains | C6/36 细胞法 C6/36 cell method | | | 乳鼠法 Sucking mouse method | | | |
|------------------------|--------------------------------|-------------------------|---------------------------|---|----------|---------------|--------------------------------------|
| | 细胞病变 CPE | 免疫荧光 JE McAb IFAT | 细胞酶免疫 JE McAb C-EIA | 乳鼠发病死亡 Illness and death of mice tested | 血凝 HA | 乙脑血抑 JE HI | 对乙脑中和指数 Neu. index to JE virus |
| B88-81 | ++ | +++ | ++ | + | 320 | 640 | 794 |
| D266 | ++ | ++ | ND | + | 1280 | 1280 | ND |
| B24-5 | +++ | +++ | ND | + | 640 | 320 | 123 |
| B86-17 | ++ | +++ | ++ | + | 1280 | 640 | 1000 |
| B88-21 | +++ | ++ | ++ | + | 640 | 320 | 1000 |
| D107 | +++ | ++ | ND | + | 160 | 640 | ND |
| L99 | +++ | ++ | +++ | + | 5120 | 2560 | 354 |

ND: 未做(Not done)

2.3 4种伊蚊的分布特点

白纹伊蚊在本次调查的9县市均有分布,其活动生态环境主要在居民点附近竹林和山坡竹林,畜圈和人房内几乎不能捕到该蚊。白纹伊蚊在野外竹林区的构成比为30.46%(7429只/45种24387只),属优势或较优势种。

刺扰伊蚊仅在景洪、勐腊、耿马和河口捕获,主要分布于野外竹林,在该生境的构成比为12.71%(1194只/17种9394只);在畜圈也有分布,构成比为1.26%(428只/20种33929只)。

窄翅伊蚊在景洪、耿马、瑞丽和盈江的畜圈和野外竹林均有分布,畜圈的构成比为2.89%(696只/19种24060只),野外竹林(耿马)的构成比为2.75%(76只/24种2760只),其数量较少。

阿萨姆伊蚊仅在耿马和潞西的野外竹林捕到,构成比为2.21%(103只/24种4656只),该蚊分布较为局限,且数量较少。

3 讨论

白纹伊蚊在云南分布广泛,尤其在本省西南部热带和邻近热带的地区,是居民点附近竹林和山坡竹林区的主要蚊种之一。本次9个县市调查,该蚊为野外竹林区的优势或较优势蚊种。白纹伊蚊分布与人居有一定关系,凡该蚊多的生境,均为靠近村寨的竹林、树林。该蚊嗜血习性较广,并有多次吸血的特性。国外研究表明,白纹伊蚊能感染、传播和经卵传递乙脑病毒^[2-5]。本次从云南自然界白纹伊蚊中分离到乙脑病毒,并证明云南该蚊对乙脑病毒有较高的易感性,还能叮咬传播和经卵传递乙脑病毒^[6,7]。白纹伊蚊在乙脑流行中可与库蚊协同作用,是乙脑病毒重要媒介之一,在自然界乙脑病毒保存和传播中起重要作用。

以往未见从刺扰伊蚊、窄翅伊蚊和阿萨姆伊蚊中分离到乙脑病毒的报道。这次从这3种