维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷1期 中国病毒学 16(1):74-77
2001年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 2001

从云南省蝙蝠脑组织中分离出乙型脑炎病毒*

张海林,张云智,黄文丽,米竹青,龚鹤琴,王静林

(云南省流行病防治研究所,云南大理市 671000)

Isolation of Japanese Encephalitis Virus from Brain Tissues of Bat in Yunnan Province

ZHANG Hai-lin, ZHANG Yun-zhi, HUANG Wen-li,
MI Zhu-qing, GONG He-qin, WANG Jing-lin

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

Abstract: In July 1997, a strain (GB30) of virus was isolated from 60 samples of brain tissues of *Murina aurata* (Chiroptera: Vespertilionidae) collected in Gengma county, Yunnan province, China. Isolation of virus was negative from 4 samples of brain tissues of *Rousettus leschenaulti* (Chiroptera: Pteropodidae) collected in Gengma. GB30 virus strain could regularly cause illness and death in suckling mice, produced evident CPE in BHK21 cells. It agglutinated red blood cells of dove at pH5.75~7.4. This virus has been identified serologically by hemagglutination inhibition and immunofluorescent tests using Japanese encephalitis (JE), dengue (DEN) type 1,2,3,4, and chikungunya (CHIK) viruses monoclonal antibodies, and JE and sindbis (SIN) viruses immune sera. It showed specific reaction to JE virus only and no reaction with DEN 1~4, CHIK and SIN viruses. Therefore it can be identified as JE virus. This is the first report on the isolation of JE virus from *Murina aurata*. The results showed that bats are considered as the reservoir and amplifier host of JE virus transmission in nature.

Key words: Japanese encephalitis virus; Reservoi host; Bat; *Murina aurata*

摘要:为进一步阐明蝙蝠在保存乙脑病毒中的作用,于1997年7月,在云南省耿马县捕捉蝙蝠64只,取脑组织作病毒分离,从一只金管鼻蝠脑组织中分离出1株病毒。该毒株能引起BHK21细胞病变和乳鼠发病死亡,在pH5.75~7.4时能凝集鸽红血球,经用单克隆抗体血凝抑制和免疫荧光试验鉴定,证实为乙型脑炎病毒。进一步证明蝙蝠在乙型脑炎病毒保存和扩散中具有重要作用。从金管鼻蝠体内分离出乙型脑炎病毒属国内外首次报道。

关键词:流行性乙型脑炎病毒;贮存宿主;蝙蝠;金管鼻蝠

中图分类号:R512.32;Q959.833 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)01-0074-04

流行性乙型脑炎(简称乙脑)是一种对人类健康危害较大的自然疫源性病毒病,掌握乙脑病毒在自然界的保存机制,对防治本病有重要意义。此前,我们曾从捕自云南景洪市的蝙蝠脑组织中分离出乙脑病毒[1],为进一步阐明蝙蝠在保存乙脑病毒中的作用,我们在云南耿马捕捉蝙蝠作病毒分离,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本采集

于1997年8月20日至27日,在耿马县芒岗及孟定镇弄门下寨房屋顶棚、竹筒树洞及洞穴中捕捉

收稿日期:2000-01-17,修回日期:2000-10-17

* 基金项目:云南省卫生厅科研基金资助课题(96012)

作者简介:张海林(1952-),男,白族,云南剑川籍,主任医师,主要研究方向为虫媒病毒及相关疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

蝙蝠，分类鉴定后，解剖取脑组织，分别放入塑料小管，液氮冻存待检。

1.2 病毒分离

分别将每份蝙蝠脑组织无菌研磨，加入0.5%乳蛋白Hank's液制成1:10悬液，3 000 r/min离心30 min，上清液接种BHK21细胞，逐日观察细胞病变并盲传3代，出现规律病变者，取细胞液脑腔接种乳小白鼠，观察乳鼠发病情况，有可疑发病者，取脑传代，如出现规律发病即行鉴定。

1.3 病毒鉴定

1.3.1 抗体　乙型脑炎病毒豚鼠免疫血清为中国药品生物制品检定所制品；乙脑病毒单克隆抗体(McAb)为第四军医大学微生物教研室制品；登革(DEN)1、2、3和4型病毒McAb为美国耶鲁大学虫媒病毒研究室主任Robert E. Shope教授惠赠；基孔肯雅(Chikungunya, CHIK)McAb和辛德毕斯(Sindbis, SIN)病毒免疫血清为本室自制；羊抗鼠荧光抗体为华美公司产品。

1.3.2 抗原　乙脑病毒抗原为本室制品。

1.3.3 血凝抑制(HI)试验　采用微量法。在96孔塑料板上测定。正式试验使用8单位血凝素。免疫血清和McAb用12.5%白陶土和鸽血球处理，血清从1:20开始稀释，抗原和抗体室温作用2 h，加0.5%鸽血球后2 h判结果，以50%的血球凝集被抑制为终点。

1.3.4 免疫荧光试验　采用间接法。将分离株病毒悬液感染已长成单层的BHK21细胞，第5天将细胞吹下、滴于玻片，丙酮固定，分步加JE McAb和荧光抗体，PBS洗片，甘油封片，用OLYMPUS荧光显微镜检查。

2 结果

2.1 病毒分离

共捕获蝙蝠64只，其中金管鼻蝠(*Murina aurata*)60只，棕果蝠(*Rousettus leschenaulti*)4只，从一只金管鼻蝠脑组织中分离到1株病毒，编号为GB30。该毒株能引起BHK21细胞病变和乳鼠规律发病和死亡。GB30原始标本接种第一代BHK21细胞出现轻微病变，传至第二和第三代的第4～5天时约50%的细胞有病变，特征为细胞断裂、变圆和脱落等。取GB30第三代感染细胞悬液脑腔接种乳鼠，于第3～5天时被接种的8只鼠先后发病和死亡，至第二和第三代均可引起乳鼠规律发病和死亡，潜伏期3～4 d。症状为离乳、离群、蜷缩、嗜睡、弓背、震颤、行走不稳和后肢瘫痪等，具有典型的嗜神经病毒感染症状。发病后12～24 h即死亡。用GB30第三代发病乳鼠脑悬液接种10只8～10克小白鼠(3～4周龄断乳的小白鼠)，均能导致它们发病和死亡。

2.2 病毒鉴定

2.2.1 滤过试验　将GB30株的第二代发病鼠脑悬液通过EK滤板，滤液能引起乳鼠或3～4周龄断乳小白鼠发病和死亡，表明新分离株为滤过性病毒。

2.2.2 血凝特性　GB30的鼠脑蔗糖丙酮法抗原在pH5.75～7.4时能凝集鸽红血球(表1)，表明该毒株的pH范围较宽，但最适为pH6.2～6.4。

表1　GB30毒株血凝pH范围测定

Table 1　pH range of hemagglutination of GB30 virus strain

血凝滴度 Titer	pH								
	5.75	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4
1:20	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	++	+
1:40	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	−	−
1:80	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	−	−	−
1:160	⧻	⧻	⧻	⧻	⧻	++	−	−	−
1:320	⧻	⧻	⧻	⧻	+	−	−	−	−
1:640	+	⧻	⧻	⧻	−	−	−	−	−
1:1280	−	−	++	⧻	−	−	−	−	−
盐水对照 PBS Control	−	−	−	−	−	−	−	−	−
血球对照 RBC Control	−	−	−	−	−	−	−	−	−

注：⧻：100%红细胞凝集；⧻：75%红细胞凝集；++：50%红细胞凝集；+：25%红细胞凝集；−：红细胞不凝集

Notes: ⧻: 100% RBC agglutinated; ⧻: 75% RBC agglutinated; ++: 50% RBC agglutinated; +: 25% RBC agglutinated; −: No agglutinated

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2.3 血凝抑制试验 GB30毒株的抗原与乙脑病毒McAb(2F2和2H4株)和乙脑豚鼠免疫血清发生高滴度的血凝抑制反应(1:640～1:2560),与CHIK McAb和SIN免疫血清(PcAb)无反应,见表2。

表2 GB30病毒血凝抑制试验结果

Table 2 Results of hemagglutination inhibition test of GB30 virus strain

抗体 Antibodies	血凝抑制滴度 HI titer						
	1:20	1:40	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
JEMcAb 2F2	-	-	-	-	-	+++	+++
JEMcAb 2H4	-	-	-	-	-	++	+++
JE免疫血清 JE serum	-	-	-	-	+++	+++	+++
CHIK McAb	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SIN PcAb	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DEN4 McAb	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
正常 Normal	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

注:-:100%血球凝集抑制;++:50%血球凝集抑制;+++:100%血球凝集。

Notes: -:100% RBC agglutination inhibited; ++:50% RBC agglutination inhibited; +++: No inhibition

2.2.4 免疫荧光试验 GB30病毒和二株已知乙脑病毒与乙脑McAb 2F2和2H4均出现较强的特异荧光反应,而与DEN1、2、3和4型以及CHIK病毒McAb无反应(表3)。

表3 免疫荧光试验结果

Table 3 Results of immunofluorecent test

病毒 Virus	McAb						
	JE2F2	JE2H4	DEN1	DEN2	DEN3	DEN4	CHIK
GB30	+++	++	-	-	-	-	-
HB97(JEV)	+++	++	-	-	-	-	-
HB48(JEV)	++	++	-	-	-	-	-
正常细胞 Normal cells	-	-	-	-	-	-	-

≥++:阳性;-:阴性。

≥++:Positive; -: Negative

以上试验证明,新分离的GB30毒株为乙脑病毒。

3 讨论

国内外学者对乙脑长期宿主和流行预测进行了多方面探索,并认为蝙蝠在乙脑病毒保存和扩散中起重要作用[1-6]。张海林等[1]从采自景洪市的453只棕果蝠(*Rousettus leschenaulti*)脑组织中分离出3株乙脑病毒。袁庆虹等[5]从捕自宾川县的53只棕果蝠脑组织中分离出1株乙脑病毒,79只双色蹄蝠(*Hipposideros bicolor*)脑组织中分离到3株乙脑病毒。本研究再次从云南蝙蝠中分离到该病毒,进一步证明了蝙蝠具有保存乙脑病毒的能力。

国外文献报道从日本的两种蝙蝠(*Miniopterus schreibersi* 和 *Rhinolophus cornutus*)1 406只中分离到24株乙脑病毒[6],随后,又从台湾两种蝙蝠(*Hipposideros a. terasensis* 和 *Miniopterus s. fuliginosus*)中分离到3株乙脑病毒[3]。本次从金管鼻蝠体内分离出乙脑病毒在国内外尚属首次,为蝙蝠作为该病毒宿主的研究领域增加了新的内容。金管鼻蝠主要分布在我省西部地区[7],本次在耿马县调查发现,它主要栖息在居民区房屋瓦缝,屋檐缝隙、竹筒、树洞及岩洞中,与人居和蚊虫关系密切,而且在上述环境中捕到的蝙蝠大多为金管鼻蝠(占93.75%),少数为棕果蝠(占6.25%),表明金管鼻蝠在当地农村为常见蝙蝠种,对它的宿主作用应予重视。

Motte[8]将乙脑病毒实验感染3种蝙蝠,均能产生病毒血症。经口食人感染蚊虫或感染蚊虫带毒叮咬亦可引起蝙蝠感染,蝙蝠还可带病毒越冬,复苏后又可产生病毒血症,扩散病毒。在实验室条件下,建立了该病毒的蚊—蝙蝠—蚊的传播循环。国外和我们的研究资料充分说明,蝙蝠在乙脑病毒保存和扩散中起重要作用。

致谢:耿马县卫生防疫站和耿马县孟定防疫分站参

维普资讯 http://www.cqvip.com

加标本采集;中国科学院昆明动物研究所王应祥研究员和本所杨光荣副主任技师协助鉴定蝙蝠;中国药品生物制品检定所俞永新教授和贾丽丽老师惠赠乙脑豚鼠免疫血清;第四军医大学微生物教研室马文煜主任和肖毅老师惠赠乙脑单克隆抗体,美国耶鲁大学虫媒病毒研究室主任 Robert E. Shope 教授惠赠登革病毒单克隆抗体,特此致谢。

参考文献

[1] 张海林、施华芳,米竹青、等.蝙蝠自然感染乙型脑炎病毒的研究[J].病毒学报,1990,6(3):269-271

[2] Greevarghese G, Banerjee K. Role of bats in the natural cycle of arboviruses [J]. Gurrent Science, 1990,59(1):26-31.

[3] Karabatsos N ed. International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Vertebrates [M]. Third Edition, Am Soc Trop Med Hyg, San Antonio, Texas, 1985: 511-512.

[4] The American Committee on Arthropod-Borne Viruses. 1995-96 Annual Report on the Catalogue Arthropod-Borne and Selected Vertebrate Viruses of the World [R]. Fort Collins: The American Committee on Arthropod-Borne Viruses, 1997.

[5] 袁庆虹、刘行知,李兆祥、等.从云南省宾川县蝙蝠体内分离到乙型脑炎病毒[J].地方病通报,1996,11(2):45-46.

[6] Sulkin SE, Allen R, Miura T, *et al* Studies of arthroppo-borne virus infections in Chiroptera [J]. Am J Trop Med Hyg, 1970, 19(1):77-87.

[7] 云南省地方病防治办公室.云南医学动物名录[M].昆明:云南科技出版社,1989,227.

[8] Motte LC. Japanese B encephalitis in bats during simulated hibernetion [J]. Am J Hyg.1958,67(1):101-108.

(上接第21页)

4.2 参考文献的内容按[序号]顺序集中附在文末。

4.3 参考文献著录格式(*请注意正确使用标点符号*)如下:

英文作者:姓氏(首写字母大写)列前,名缩写以大写字母列后,中间无任何标点,多作者之间用“,”隔开,3名之后的作者用'*et al*'表示,如 Mackay JP, Rossley M, Strobl UZ, et al.

汉语作者:按中文习惯撰写,多作者间用“,”隔开,3名之后的作者用“等”表示

期刊:作者.题名[J].刊名,年,卷:起-止页.

图书:作者.书名[M].版次(初版不写),出版地:出版者,年.起止页.

论文集:作者.题名[A].论文集名[C].出版地:出版者,出版年.页次.

专利文献:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.

学位论文:作者.题名[D].地点:学位授予单位,出版年.

数据库:责任者.联机网上数据库[DB/OL].网址/引用日期.

5 收费规定

5.1 在向本刊投寄稿件时,请向编辑部支付审理费,每篇60元(英文稿审理费80元)。

5.2 稿件一经录用,即向第一作者收取版面费。研究报告和简报分别在4和2个版面内每版120元,超过部分每版增收200元。如需提前发表版面费将加倍收取。彩色图版另加制版费和印刷成本费。

5.3 文章一经刊载,酌致稿酬,稿酬中包括光盘版和网站的稿酬在内。本刊将赠送作者样刊一本,抽印本10份。如需额外样刊,请作者在版面费中增寄所需样刊的费用,或从稿酬中扣除。

6 本刊编辑部地址

邮编:430071 武汉市武昌区小洪山,中国科学院武汉病毒研究所内

(中国病毒学)编辑部。电话:027-87641157;电子信箱:bjb@pentium.whiov.ac.cn

开户行:中国建设银行武汉市小洪山分理处, 帐号:85493892261014460。

汇款时请在汇单附言栏内注明稿件审理费或版面费,编辑部可以开具报销收据,通过银行转帐时请一定注明汇款详细单位及费用名称,以免造成延误。

7 网站信息

我部已创建网页,内容包括自创刊以来发表的全部文章题名、目录、杂志简介、编委会、编辑信箱以及定期预告下一期即将刊登文章的题名,欢迎广大作者查询。网址为 www.whiov.ac.cn/publish.htm