北京地区三带喙库蚊乙型脑炎病毒感染率调查

中国医学科学院病毒学研究所　王逸民　葛继乾　梁雪嘉　陈勤生　刘琴芝

三带喙库蚊是乙脑的主要传播媒介，经常调查其自然感染情况，不仅为该病的生态学研究积累资料，並为流行预测提供必要的依据。

虫媒病毒的分离方法有多种，其中包括三周龄小白鼠和乳鼠接种法、蚊虫接种法、节肢动物及脊椎动物组织培养接种法等。自Bugher(1941)利用乳鼠接种法分离到黄热病病毒以来，至50年代该法已广泛用于分离虫媒病毒的工作，截止目前，绝大多数虫媒病毒都是利用它分离到的[6]。另外，绿猴肾、地鼠肾、猪肾的原代和传代细胞以及鸡胚细胞接种法也都是分离虫媒病毒的敏感方法。

蚊虫组织培养建立以来，Singh和Paul(1967)首先用白纹伊蚊传代细胞分离登革热病毒成功[10]，1978年Igarashi由Singh氏白纹伊蚊细胞筛选出对登革热病毒和Chikungunya病毒都很敏感的C6/36细胞系[8]，用它分离登革热病毒，提高了检出率。

我国早年曾用三周龄小白鼠和乳鼠分离乙脑病毒[1～4]，以后我们曾用鸡胚细胞蚀斑法和地鼠肾原代细胞接种法从蚊子分离病毒，並与三周龄小白鼠脑内接种法比较，观察到鼠脑法的病毒检出率低于蚀斑法，而高于地鼠肾细胞法[5]。

最近我们观察到C6/36白纹伊蚊细胞系对乙脑病毒比其他一些常用的细胞敏感。为了继续改进乙脑蚊媒自然感染的检查方法，1981年我们试用C6/36细胞分离病毒，並与三周龄小白鼠、乳鼠脑内接种法比较。现将结果报告于后。

材料和方法

一、蚊子的采集和饲养

1981年7～9月用光诱蚊器在北京南郊某地的马棚和猪圈内采集雌三带喙库蚊，蚊在养蚊室内饲养2～3天。室内温度为28～30°C，相对湿度为70～80%。

二、实验动物和细胞

三周龄小白鼠和2～4日龄乳鼠由本所动物室供应。C6/36细胞系Rosen教授惠赠，並按Igarashi法[8]在本研究室培养传代。

三、蚊悬液的制备和病毒分离

将蚊子冷冻麻醉后，以50只为1批，按常规法消毒处理[7]，然后用中号组织研磨器将蚊研磨，加入1.0毫升0.5%LH溶液。蚊悬液用4°C离心机10000rpm离心1小时。取上清液，经抗菌素(青霉素1000单位／毫升、链霉素1000微克／毫升)处理后，分别接种C6/36细胞管4支(0.1毫升/管)、三周龄小白鼠4只(脑内，0.03毫升/只)、2～4日龄乳鼠1窝(脑内，0.02毫升/只)。接种的细胞管放28～29°C温箱内吸附1小时，然后补加Eagle's维持液0.9毫升，再置28～29°C温箱内培养和观察10天。动物接种后在单独的实验动物房内饲养观察2周。

当乳鼠或三周龄小白鼠于接种3天后出现活动迟缓、松毛和其它神经症状者，一律取脑保存于－80°C冰箱内，以备鉴定用；细胞于接种3天后，凡出现细胞小片脱落或团聚者，也收存于－80°C冰箱，以备鉴定用。

四、病毒鉴定

1.C6/36细胞阳性标本　将冻存的阳性标本速融，转种正常C6/36细胞，待CPE出现后，用直接荧光抗体鉴定。

将细胞悬液滴在载玻片上，晾干后放入冷丙酮内固定10分钟，取出晾干、滴加1：1～1：4乙脑免疫荧光抗体，置湿盒内，放37°C温

箱作用1小时，然后用pH7.5的PBS洗2次，每次10分钟，再用蒸馏水洗2分钟，晾干后置荧光显微镜下检查。

2.鼠脑阳性标本

(1)蚀斑减数中和试验　按本所常规法操作[7]。免疫血清系京卫研1株乙脑病毒免疫的家兔血清。

(2)直接荧光抗体法　用刀片将鼠脑剖一平面，在载玻片上轻按成一印片，晾干后放入冷丙酮内固定10分钟。以下步骤和操作同前述。

结　果

1981年夏秋季在北京地区检查了168批8400只雌三带喙库蚊，分离到30株乙脑病毒(表1)。病毒检出高峰在7月下旬，最高检出率为58.3%，最高蚊自然感染率为1：86(图1)。全期的病毒检出率为17.8%，蚊自然感染率为1：280。

为了对比三周龄小白鼠、乳鼠和C6/36细胞分离乙脑病毒的敏感性，用三种方法同时检查了112批5,600只蚊子，结果列于表2。C6/36细胞分离到21株乙脑病毒，乳鼠19株，三周龄小白鼠18株，检出率分别为18.75%、16.96%、16.21%。其中有2批仅在C6/36细胞为阳性，另1批在C6/36细胞和乳鼠为阳性。这3份标本经荧光抗体法鉴定，皆证明为乙脑病毒。

表1　从北京地区三带喙库蚊分离乙脑病毒(1981)

采集日期	批数	蚊数	三周鼠 阳性批数/检查批数	三周鼠 检出率(%)	乳鼠 阳性批数/检查批数	乳鼠 检出率(%)	C6/36细胞 阳性批数/检查批数	C6/36细胞 检出率(%)	总计 阳性批数/检查批数	总计 检出率(%)	自然感染率
7.20	11	550	1/11	9.1	0/5	0	1/11	9.1	1/11	9.1	1:550
7.21	7	350	0/7	0	0/5	0	0/7	0	0/7	0	0
7.23	11	550	4/11	36.3	4/11	36.3	3/6	50.0	4/11	36.3	1:137
7.27	13	650	6/13	46.15	2/4	50.0	7/13	53.8	7/13	53.8	1:93
7.29	12	600	6/12	50.0	6/11	54.5	7/12	58.3	7/12	58.3	1:86
8.4	13	650	4/13	30.7	3/12	25.0	4/13	30.7	4/13	30.7	1:162
8.7	13	650	3/13	23.7	3/13	23.7	3/13	23.7	3/13	23.7	1:217
8.10	13	650	2/13	15.4	1/12	8.33	2/13	15.4	2/13	15.4	1:325
8.14	13	650	0/13	0	0/13	0	0/13	0	0/13	0	0
8.17	13	650	1/13	7.7	1/13	7.7	1/12	8.33	1/13	7.7	1:650
8.21	12	600	0/12	0	0/7	0	0/12	0	0/12	0	0
8.25	13	650	1/13	7.7	0/6	0	1/13	7.7	1/13	7.7	1:650
8.28	12	600	0/12	0	—	—	0/12	0	0/12	0	0
9.7	12	600	0/12	0	0/12	0	0/12	0	0/21	0	0
合计	168	8400	28/168	16.6	20/119	16.81	29.160	18.1	30/168	17.8	1:280

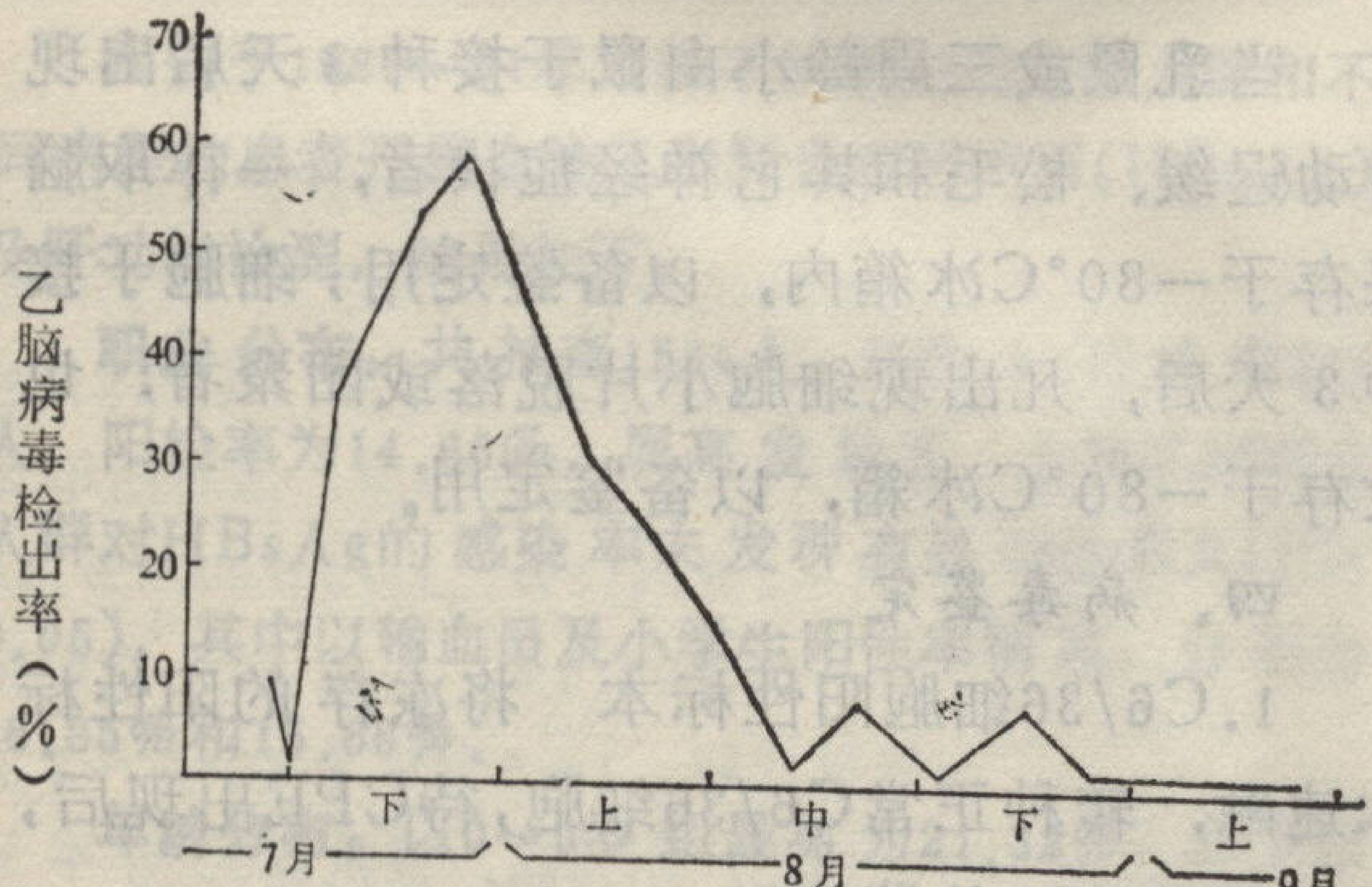

图1　1981年北京地区三带喙库蚊乙脑病毒检出率(批)季节变动曲线

讨　论

1977年Trosper在菲律宾用BHK-21细胞和Vero细胞分离到两株乙脑病毒，但用乳鼠和Singh白纹伊蚊细胞分离的结果为阴性。

Igarashi等(1981)在日本大阪曾同时用

表 2 用三种方法由112批三带喙库蚊中乙脑病毒检出率比较

分离方法	病毒株数	检出率(%)
C6／36细胞	21	18.75
乳 鼠	19	1 .96
三周龄小白鼠	18	16.21

C6/36细胞和乳鼠从三带喙库蚊分离乙脑病毒，其检出率分别为14.3%和9.5%，二者之间有着明显的差别[9]。本实验的结果也同样表明C6/36细胞的病毒检出率高于乳鼠，即使差别不如Igarashi报告的那么大。另外，我们也观察到C6/36细胞对乙脑病毒的强、弱毒株都很敏感，增殖的病毒均能达到较高的滴度，并引起明显的CPE(图2、3)。因此，利用它从蚊子分离乙脑病毒，不仅能更好地反映蚊媒的自然感染情况，而且会增加分离到不同性状毒株的机会。

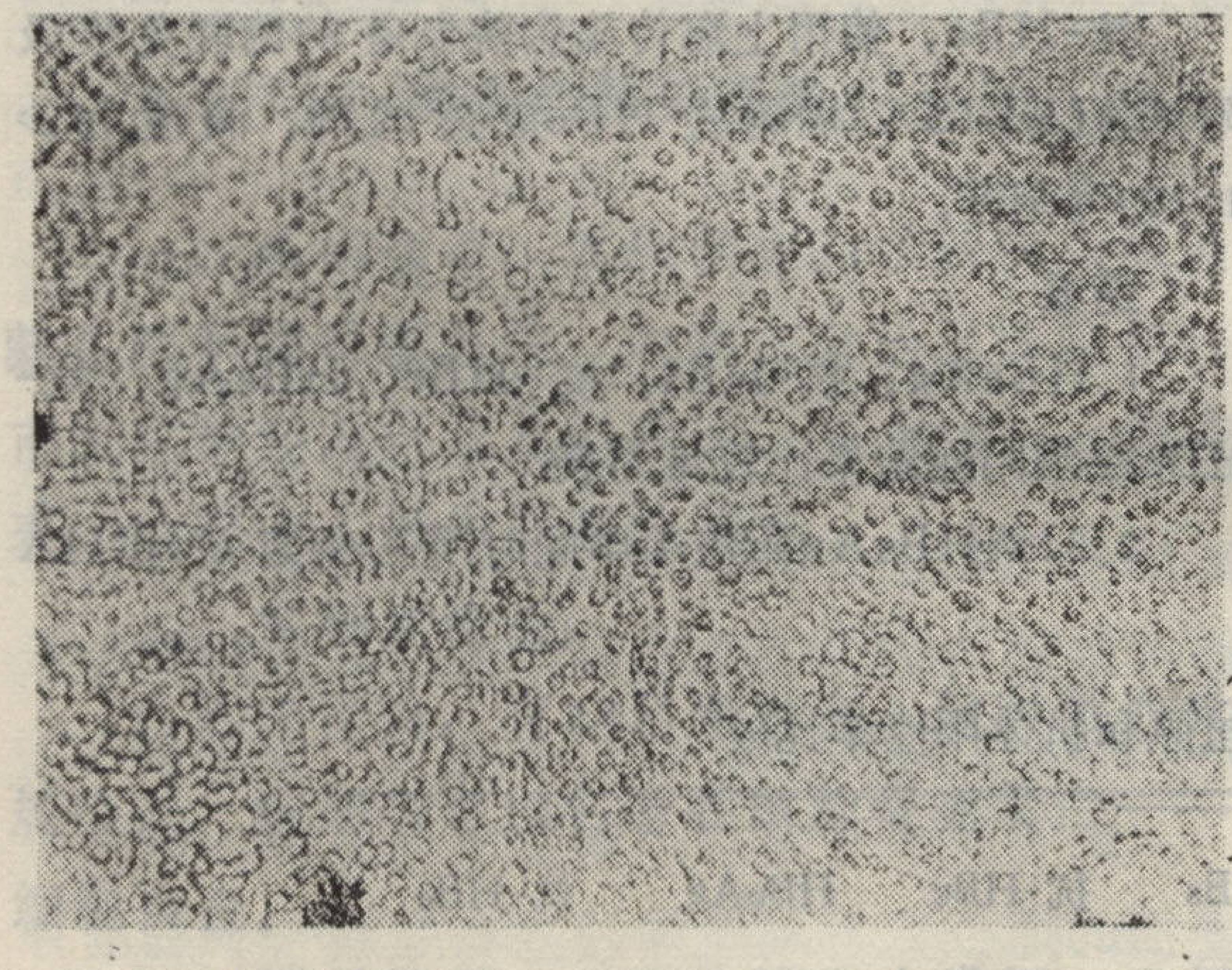

图 2 正常C6／36细胞×132

这次调查中除从三带喙库蚊分离到30株乙脑病毒外，用C6/36细胞还分离到10株其他虫媒病毒，包括小型的核糖核酸病毒和披膜病毒。因此，在虫媒病毒调查中应充分利用C6/36细胞。

三带喙库蚊乙脑病毒自然感染率的高低可能与乙脑的流行程度有着密切的关系，1981年

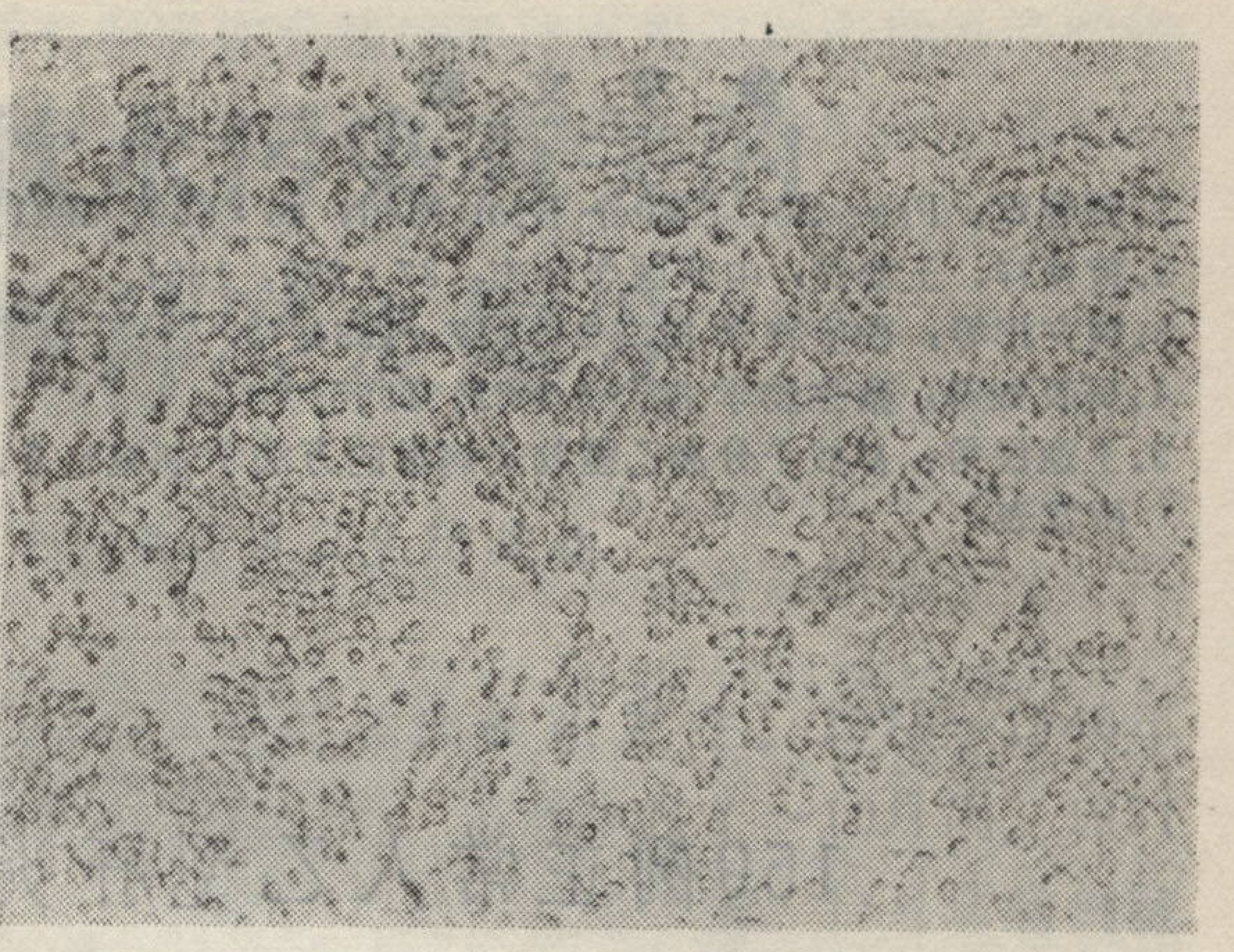

图 3 乙脑病毒在C6／36细胞的CPE×132

北京地区三带喙库蚊的自然感染率较往年高一倍左右，当地居民(未注射疫苗)今年的乙脑发病率是 6 年来最高的一次。

摘 要

1981年夏季，用接种C6/36细胞、乳鼠和三周龄小白鼠的方法从北京地区的三带喙库蚊分离病毒，检查了168批8400只蚊子，分离到乙脑病毒30株。当年的乙脑病毒检出率（批）为17.8%，蚊自然感染率为1:280，病毒检出高峰在7月下旬，最高检出率（批）为58.3%，最高自然感染率为1:86。上述三种方法的乙脑病毒检出率（批）分别为18.75%、16.96%和16.21%。文中还讨论了三带喙库蚊乙脑病毒检出率或自然感染率的高低与乙脑流行程度的关系。

ABSTRACT

During the summer of 1981, thirty strains of Japanese encephalitis virus were isolated from 8400 female Culex tritaeniorhynchus in 168 pools with an isolation rate of 17.8% or a minimal field infection rate (MFIR) of 1 : 280. Mosquitoes were collected at two localities in one suburban area of Beijing. The processed specimens were inoculated into Aedes albopictus clone C6／36 cell cultures as well as into suckling and weanling mouse brains, the isolation rates relating to each of the above methods were 18.75%, 16.96%, and 16.21%. The highest isolation rate (58.3%) or MFIR (1 : 86) was shown on 29 July. The relation between isolation rate or MFIR and incidence of Japanese encephalitis was discussed.

参 考 文 献

1.颜春辉：Proc Soc Exper Biol Med，46：609，1941.
2.黄祯祥、王逸民：中华医学杂志，37：280，1951.
3.魏文彬等：微生物学报，2：117，1954.
4.吴皎如等：微生物学报，5：22，1957.
5.王逸民等：从蚊子分离乙型脑炎病毒的方法学研究Ⅰ.Ⅱ.待发表。
6.王逸民：《虫媒病毒》（讲义），1979。
7.中国医学科学院流行病学微生物学研究所：《常见病毒病实验技术》，科学出版社，1979.
8.Igarashi A：Gen Virol，40：531，1978.
9.Igarashi A et al.：Amer J Trop Med Hyg，30：449，1981.
10.Singh KRP et al：Bull WHO，40：982，1969.
11.Trosper JH et al：Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 74：292，1980.

159例正常人乙型肝炎核心抗体检测结果的报告

解放军94医院　　陈明生　陈致怀

1981年5月，我们对南昌市地区应届高中毕业生报考军校经体检合格者，检测了HBsAg、抗-HBs、抗-HBc、HBeAg、抗-HBe。现将检测结果报告如下：

被检对象：159例全部男性，年龄16～19岁，经体检(包括麝浊、麝絮、SGPT)合格者，检测HBsAg、抗-HBs、抗-HBc、HBeAg、抗-HBe。

HBsAg同时应用三种方法即对流电泳(CIEP)，反向被动血凝(RPHA)对流电泳自显影(LACIEP)。CIEP使用北京生物制品所制备的HBsAg诊断血清。RPHA使用北京生物制品所制备的HBsAg诊断血球，1：16以上为阳性。LACIEP使用中国科学院原子能研究所出品^{125}I-HBAb制备的HBsAg检测药盒。

抗-HBs：使用本院一例患慢性迁延性肝炎患者血清，方法采用CIEP法。

HBeAg和抗-HBe：使用南昌市卫生防疫站制备的血清，方法采用琼脂糖扩散法。

抗-HBc：使用上海传染病院制备的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗-HBc成套试剂，滴度为≥1：100为阳性。

结果

1.HBsAg、抗-HBs、抗-HBc、HBeAg、抗-HBe检测阳性结果比较见附表

2.31例HBsAg阳性组中同时用三种方法RPHA(R)，LACIEP(L)和CIEP(C)，检测结果：(R)阳性而(L)和(C)二项阴性有15例占48.4%。(R)、(L)和(C)三项都呈阳性的有8例，占25.8%，(R)和(L)呈阳性而(C)阴性4例占12.9%。(R)和(C)呈阳性而(L)阴性4例占12.9%。

3.25例抗-HBc阳性组中HBsAg呈阳性19例占76%而阴性6例占24%。HBeAg呈阳性6例占24%，而阴性19例占76%。

4.31例HBsAg阳性组中抗-HBc呈阳性19例占61.3%，而阴性12例占38.7%。HBeAg呈阳性6例占19.4%，而阴性25例占80.6%。

5.31例HBsAg阳性组不同滴度对抗-HBc阳性和抗-HBc阴性检出率的关系为HBsAg阳性滴度≥1：32者抗-HBc(+)13例(56.5%)，抗-HBc(－)10例(43.5%)；HBsAg阳性滴度1:16～1：32者抗-HBc(+)6例(75%)，抗-HBc(－)2例(2.5%)。(χ^2=1.061 P>0.05)。

附表　159例健康人乙型肝炎抗原和抗体阳性率比较

例数	HBsAg			抗-HBs	抗-HBc	HBeAg	抗-HBe
	RPHA	LACIEP	CIEP				
159	31 (19.5)	12 (7.5)	12 (7.5)	0 (0)	25 (15.72)	6 (3.7)	0 (0)