

从三带喙库蚊分离出一株低毒力乙脑病毒的报告

中国预防医学中心病毒学研究所

陈伯权 周国芳 刘琴芝 孟庆荣 吴美英

乙脑病毒在自然界是否存在低毒力的毒株是人们关心的一个问题。委内瑞拉马脑炎，在南美洲的委内瑞拉、墨西哥和美国的德克萨斯州，常引起人、马脑炎的严重流行，而在美国东南部的佛罗里达州却很少有人、马的病例发生。经病毒分离证实在墨西哥等地分离的病毒VEE、IA、ID、IC毒株在人、马产生较高的毒血症，对人、马有较高的毒力，但美国佛罗里达州分离到的ID、IE、Florida II、III毒株对马产生很低的毒血症，对马不致病^[1,2]。

乙型脑炎在流行病学上也有类似情况，在我国、泰国、朝鲜、印度等亚洲国家，乙脑严重流行，但在印尼、马来西亚等一些东南亚国家乙脑病例却很少，虽然在这些地区自然界存在乙脑病毒。Olsen等在印尼从三带喙库蚊分离病毒，其病毒分离率为1/500~700蚊^[3]，这与我国华北地区的病毒分离率^[4]基本一样。Olsen抽查了印尼同一地区的人畜抗乙脑抗体，人群抗体阳性率为30%、马47%、牛22%、山羊29%、鸡8%、蝙蝠7%、小鸡0%，啮齿类动物0%。说明病毒是在自然界循环^[5]，但他在印尼观察了三年只见到二例可疑病例，因此在这些地区是否存在低毒力的毒株？为此目的我们用Olsen在印尼分离到的几株乙脑病毒进行了毒力和免疫力的研究。

材料与方 法

一、毒株：美国耶鲁大学Olsen教授提供：

Jak-1 Lot974 BHK21 P-2 SMB²

Jak-2 Lot2380 Vero P-3 SMB¹
Jak-3 Lot451 Vero P-3 SMB¹
Jak-4 Lot657 Vero P-3 SMB¹
Jak-5 Lot788 Vero P-2 SMB¹

二、空斑试验及挑斑方法见文献^[6,7]。

实验结果

一、各毒株毒力的比较：将病毒在BHK₂₁传一代，在鸡胚细胞作空斑测病毒滴度。同时在三周鼠脑内和皮下测定病毒滴度。空斑滴度/脑内滴度的比值强毒株一般≤1，比值越大其毒力越弱。

表 1 印尼乙脑病毒的毒力比较

毒株 (PFU/ml)	空斑滴度 Log ₁₀	脑内毒力		皮下毒力	
		脑内滴度 Log ₁₀ LD ₅₀	PFU/ LD ₅₀	皮下滴度 Log ₁₀ LD ₅₀	PFU/ LD ₅₀
Jak-1	9.0	6.67	2.23	3.3	5.7
Jak-2	9.0	5.67	3.23	3.3	5.7
Jak-3	8.0	6.50	1.50	5.0	3.0
Jak-4	8.5	7.33	1.17	5.0	3.5
Jak-5	7.5	6.67	0.83	4.3	3.2

从表1结果看出5株病毒中，有2株(Jak-1、Jak-2)脑内病毒的毒力是较低的，PFU/LD₅₀的比值>2。有2株(Jak-3、Jak-4)PFU/LD₅₀>1。

二、利用空斑挑斑法从Jak-2毒株挑斑：Jak-2毒力最低PFU/LD₅₀>3.23，将Jak-2病毒接种鸡胚作空斑，第五天挑斑，选择小的模糊的斑，将鸡胚纤维母细胞增殖一代，同时在鼠脑和空斑进行滴定，挑选毒力弱的毒株再挑斑纯化一代。

表 2 从乙脑Jak-2病毒挑斑

斑号	空斑滴度		鼠脑滴度		PFU/ LD ₅₀
	PFU/ml	Log ₁₀	LD ₅₀ /0.03ml	Log ₁₀	
1	7.00		≥ 3.50		≤ 3.50
2	7.00		≥ 3.50		≤ 3.50
3	7.56		≥ 3.50		≤ 4.06
4	7.19		≥ 3.50		≤ 3.69
5	6.95		≥ 3.50		≤ 3.45
6	7.13		≥ 1.50		≤ 5.63
7	7.13		2.00		5.13
8	7.12		2.00		5.12
9	7.45		2.00		5.45
10	7.16		≥ 3.50		≤ 3.66

第一代斑的PFU/LD₅₀的比值皆大于3.0, 其中6、7、8、9斑的毒力较弱, 其PFU/LD₅₀的比值大于5.00。

从6、7、9斑进一步挑斑, 并测定其毒力, 其获得3个子代斑(6-2、6-5、7-10)对三周鼠脑内注射不致死(LD₅₀ ≤ 0.5Log₁₀), 但PFU滴度大于6.0 Log₁₀。

三、各低毒力毒株的免疫力: 将7-8、7-9、7-10、6-2、6-5、9-10六株病毒作不同的稀释度皮下0.1毫升免疫小白鼠, 两周后用乙脑强毒株A₂株(1000LD₅₀)腹腔攻击和脑内空针刺刺激, 观察能引起50%保护的最小免疫剂量。

表 3 各低毒力的毒株的免疫力

毒株	免前病毒滴度 TcLD ₅₀ /ml Log ₁₀	免疫效果						50%保护 所需病毒 量
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	对照	
7-8	4.5*	0/5	1/5	4/5	3/5	4/5	5/5	10 ^{-3.11}
7-9	4.0*	0/5	0/5	1/5	4/5	5/5	5/5	10 ^{-4.5}
7-10	3.5*	1/5	3/5	2/5	5/5	4/5	5/5	10 ^{-3.74}
6-2	4.0*	0/5	0/5	1/5	3/5	2/5	5/5	10 ^{-5.74}
6-5	4.0*	2/5	4/5	4/5	5/5	4/5	5/5	10 ^{-2.54}
9-10	4.0*	0/5	3/5	2/5	3/5	3/5	5/5	10 ^{-4.45}
6-2	4.5*	0/4	0/4	2/4	2/4	2/4	4/4	10 ^{-5.0}
6-2	7.4*	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	8/8	>10 ^{-6.0}

注: *病毒在鸡胚纤维母细胞繁殖, *病毒在地鼠肾细胞繁殖。

从表3看出6-2株的免疫力相当好, 当

病毒滴度为4.0时, 其引起50%保护的最小免疫剂量为0.00001。当病毒滴度为10^{7.0}以上时, 其引起50%保护的最小免疫剂量为>0.000001。

讨 论

从自然界分离到皮下不致病, 毒力低的乙脑病毒株, 在我国早有报道^[8], 但从自然界直接分离到脑内毒力低的乙脑病毒文献上未见报道, 王逸民等^[9]曾在北京地区从三带喙库蚊用鸡胚空斑法分离到一株毒力较低的第178株, 其空斑滴度/鼠脑滴度(PFU/LD₅₀)的比值为2左右, 但大量的分离到的病毒仍为强毒(PFU/LD₅₀ ≤ 1)^[4]。从本结果看, 从印尼分离的毒株中低毒力的毒株的比例是比较高的, 5株被测的乙脑病毒中有2株PFU/LD₅₀分别为3.23、2.23; 另一株为1.5, 只有2株其比值接近1为高毒力的毒株。这些高比例的低毒力的毒株的存在与当地显性感染低的关系, 以及当地居民大多数为回民, 一般不养猪, 因此猪少与显性感染率低与高比例的低毒力的毒株的存在的关系, 是值得研究的课题。

从目前资料看, 许多毒株的性质不同与地区分布有关, 除前述委内瑞拉马脑炎病毒外, 从北美分离的东部马脑炎病毒与南美分离的性质有明显不同, 远东与欧洲分离到东部马脑炎病毒与北美相同^[10], 从远东地区分离屈曲病毒(CHIK)和从非洲分离的有明显不同^[11]。因此, 研究从不同地区分离到的乙脑病毒的性质在流行病学上可能有重要意义。

Jak-2经空斑挑斑两次就可以挑到对三周鼠脑内不致死的6-2减毒株, 在鸡胚繁殖, 病毒滴度只有PFU4.0对数/代时, 病毒稀释到0.00001仍能保护50%小白鼠, 经受住强毒株的攻击, 当病毒滴度>7.0对数时, 其50%的保护的最小有效免疫剂量为0.000001其免疫力是相当好的, 这种自然界直接获得的减毒株其抗原性可能会比经实验室长期传代获得减毒株变化小些, 有可能通过这个途径获得免疫力好的活疫苗。

摘 要

5株从印尼三带喙库蚊分离的乙脑病毒中,有二株毒力较低,其空斑滴度,鼠脑滴度比值分别为2.23和3.23。经二次空斑选种获得到三周鼠脑内基本不致死的6-2株,当在鸡胚繁殖一代,病毒滴度为Log₁₀PFU_{4.0/ml}和7.0/ml时,用不同稀释度的病毒免疫小白鼠,经强毒株攻击,其保护指数分别为0.00001和0.000001。文中讨论了这种高比例的低毒力的毒株在自然界的存在与当地不显性感染率高的关系,以及可能从自然界获得免疫力好的活疫苗毒株的可能性。

ABSTRACT

A study on the virulence and immunogenicity of 5 strains of JBE virus isolated from *Culex Tritaeniorhynchus* in Indonesia by Dr. Olson were carried out. Two of them showed to have low virulence, their ratios PFU/LD₅₀ (i.c.) titer are 2.23 and 3.23. Using plaque selected method we have got a low virulence strain 6-2 which dose not kill the 3 week-old mice

by i.c. injection.

The minimum dose of 50% protection rate of strain 6-2 against A2 virulent challenging strain is 0.00001 and 0.000001 when the viral titer is PFU_{4.0} and 7.0 respectively.

The relationship between a high rate of low virulent strains existed in nature and the occurrence of inapparent infection was discussed.

参 考 文 献

1. Young NA et al: Am J Epidemiology, 89:286, 1969
2. Ventura AK et al: Am J Trop Med Hyg, 23:507, 1974
3. Olson JG et al: 未发表资料
4. 王逸民等: 流行病防治研究, (2): 133, 1970
5. Olson JG: 未发表资料
6. 陈伯权等: 微生物学报, 9: 53, 1963
7. 许兆祥等: 微生物学报, 11: 108, 1963
8. 黄祯祥: 中华医学杂志, 44: 109, 1958
9. 王逸民: 未发表资料
10. Casals J et al: J Exp Med, 119: 543, 1964
11. Casals J: Tenth Pacific Sci Cong Honolulu, Hawaii, p458, 1961b

儿科病房医护人员手及医疗用具等 轮状病毒的电镜检查

安徽医学院流行病学教研组 文师吾* 祖述宪 吴系科

为了探索轮状病毒医院感染的传播途径,我们于1982年10月至83年1月,对合肥两所医院的儿科病房进行了检查。

一、采样与标本制备:

1. 医护人员的手: 下班洗手前用盐水棉球细致的擦手, 每人一球, 全体当班人员(>30人)的擦手液为一份电镜标本。

2. 医疗用具及床具: 以灭菌镊子夹盐水棉球, 在在听诊器、病历夹、床单等表面拭抹, 以30个棉球制备一个电镜标本。

3. 病房空气: 用国产CD-I型携带式大气采样器和格式小冲击式吸收管采集病房空气样品, 每一标本采集空气300升左右。

4. 实验性空气样品: 将带有大量、典型轮状病毒的干燥纱布, 在室内充分抖动, 而后以上述采样器采

样。

上述采样液先经4,000转/分离心30分钟, 弃去沉淀, 收集上清液再经40,000转/分离心90分钟, 弃上清, 将沉淀物用0.2毫升双蒸水重悬浮, 按作者前法(祖述宪等: 安医学报, 17(4): 26, 1982)制作电镜标本, 进行电镜检查。

二、结果: 轮状病毒阳性份数是: 医护人员洗手1份(1/5), 医疗用具1份(1/3), 床具1份(1/2); 而病房空气7份、实验性空气样品4份均阴性。

三、体会: 采样时正是婴幼儿肠炎流行高峰期, 住院儿童中1/3有腹泻症状, 其中约50%粪检轮状病毒阳性。联系到上述电镜检查结果, 在病房的婴幼儿中, 医务人员污染的手及医疗工具是传播着轮状病毒的重要途径之一。

*已调湖南医学院流行病学教研室