

肾综合征出血热病毒血凝素的研究

I. 病毒血凝活性的初步研究

夏东翔 汪美先 姜绍谅解 马文煜

(第四军医大学微生物教研室, 西安)

倪大石 周 宁

(安徽省医学科学研究所病毒室, 合肥)

提 要

以不同宿主来源的肾综合征出血热病毒(HFRSV)感染乳鼠, 取脑经蔗糖-丙酮法制备血凝素, 对这些毒株的血凝活性和血凝抑制(下称血抑, HI)反应进行了初步研究比较。结果提示受试毒株间血凝活性高低不等, 似与对乳鼠的致病毒力有一定关系, 血凝素抗原与其他病毒的免疫血清无交叉反应, 在血凝活性较高的几个毒株间血凝素抗原性差异不明显, 并找到了一株血抑滴度较高的单克隆抗体(McAb)。

目前, 我国已从多种宿主动物和不同疫区患者血液中分离出HFRSV^[1-3], 并初步证实这些毒株的毒力及抗原性并不完全一致^[4-6]。1984年汤一苇^[7-8] Tsai^[9]等曾报道朝鲜出血热病毒(KHFV)76/118株具有血凝活性, 但对我国分离的HFRSV血凝活性迄今尚未见报道。为了探讨我国不同宿主来源的HFRSV有无血凝活性及其与毒力的关系, 不同毒株血凝素的特异性及其相互关系, 本文对我国内各主要代表毒株和KHFV 76/118株的血凝活性进行了研究。

材料与方法

病毒 用已适应于乳鼠的8个不同来源的HFSV(表1)经脑感染2—4日龄乳鼠(系安徽省医研所动物室自行繁殖的杂种小鼠), 待发病后于濒死状态下解剖取脑, 经蔗糖-丙酮法制备血凝素^[10], 正常鼠脑同法制备, 同时测定这8个毒株对乳鼠的致病毒力(LD_{50})。

本稿于1986年元月6日收到

表 1 试验所用的HFRSV毒株

Table 1. HFRSV Strains tested

毒 株 ^[1~5]	分 离 的		
	年 代	地 区	来 源
野 輓 型	76/118	1978	南朝鲜
	A9	1981	江 苏
	陈	1982	安徽
	H8205	1982	黑龙江
	A216	1983	四川
	C4	1983	安徽
家 鼠 型	R22	1982	河 南
	R27	1982	河 南

血球 以无菌手续自鹅翅下静脉采血，用 Alsever's 液抗凝及保存，用前经葡萄糖-明胶-巴比妥 (DGV) 液洗涤三次，配成10%的悬液，再用各种pH (5.0~6.5) 的0.2M PBS配成0.4%的血球悬液供选用。

血清和单克隆抗体 各种免疫血清和对照血清系自己制备，HFRS病人血清采自安徽疫区。单克隆抗体 5, 19, 25-1, 25-7, 35, R₃₁ 系中国预防医学中心病毒学研究所陈伯权教授提供^[11~12], 3H₄, 4B₆, 5H₅ 系第四军医大制备^[13], 2B₇ 系安徽省医研所制备。对照腹水分别是第四军医大制备的抗HSV-1 McAb^[14] 和预防医学中心病毒所提供的乙脑病毒A₂株免疫小鼠艾氏腹水瘤腹水。血清和腹水分别经丙酮法及鹅血球吸收处理^[15]。

微量血凝试验 用U形底微量血凝板，每孔加2%卵清蛋白的pH9.0硼酸盐水(OABS) 50μl, 各排第一孔加血凝素50μl, 行二倍递增稀释，末孔作为对照，置37℃孵育1.5—2.0小时后，每孔加0.4%鹅血球悬液50μl (各排的血球稀释液的pH不同以便选择)，振匀，于37℃孵育30分钟后观察结果，以呈现“++”凝集的血凝素最高稀释度作为血凝滴度，即为1个血凝单位，选血凝滴度最高的血球悬液pH为最适pH。

微量血凝抑制试验 取经过处理的1:10稀释的血清(或腹水)25μl, 用OABS行二倍递增稀释，加8单位/50μl血凝素25μl, 振匀后置37℃2小时，再加最适pH的0.4%鹅血球悬液50μl，于37℃孵育30分钟观察结果，以血凝完全抑制的血清(或腹水)最高稀释度作为血抑效价。试验同时设血清(或腹水)、血凝素及血球对照。

结 果

1. HFRSV 血凝活性的证实

实验证明，不论自黑线姬鼠、家猫和病人血液分离的 HFRSV 毒株皆具有不同程度血凝活性，血凝活性的高低似与对乳鼠的致病毒力 (LD_{50}) 有一定关系，各毒株间血凝反应的最适 pH 差别不大。但用同样的方法未测出从褐家鼠分离的毒株的血凝活性（表 2）。

表 2. 不同 HFRSV 毒株的毒力和血凝活性

Table 4. Virulence and HA activity of various HFRSV strains

毒 株	经鼠代次	发病天数	LD ₅₀	HA滴度	最适 pH
76/118	7	7	6.5	1:64	5.7
A216	4	11	5.5	1:32	6.1
A9	12	11	3.62	1:8	5.9
陈	9	7	6.75	1:128	5.9
H8205	6	10	4.5	1:32	5.9
C4	10	10	5.53	1:128	5.9
R22	9	15	3.5	—	—
R27	6	11	3.5	—	—
正常乳鼠脑	—	—	—	—	—

2. 血凝素的特异性

各毒株的血凝活性仅可被多种 HFRSV 免疫血清和 HFRS 病人血清所抑制，而不被其他病毒免疫血清和正常动物血清抑制（表 3），说明这种血凝素确为 HFRSV 的特异性抗原，具有严格的特异性。

3. 不同毒株血凝素之间的相互关系及其与 McAb 的反应

选择 4 株具有代表性且血凝滴度较高的 HFRSV 血凝素与相应毒株的免疫血清进行交叉 HI 试验，从表 4 可见它们之间没有明显的抗原性差异。另外这 4 株血凝素仅与受试的 11 株抗 HFRSV McAb 中的一株发生 HI 反应（表 5），HI 抗体的滴度在各毒株血凝素间差别不大。

表 3. 用HI试验测定HFRSV血凝素的特异性
Table 3. Specificity of HFRSV HAN* by HI test

血凝素	各种血清及其HI抗体滴度							
	MFRS 病人血清	免疫兔血清				豚抗JEV	正常对照血清	
		多价HFRSV	R22	R72	Reo-V HSV-1		家兔	豚鼠
76/118	>1:40	>1:40	1:80	1:640	—	—	—	—
陈	>1:40	>1:40	1:40	1:320	—	—	—	—
H8205	>1:40	>1:40	1:80	1:320	—	—	—	—
A216	>1:40	>1:40	未做		—	—	—	—
C4	>1:40	>1:40	1:40	1:320	—	—	—	—

* HAN = hemagglutinin

△ 多价HFRSV免疫兔血清，由野鼠型毒株和家鼠型毒株免疫血清等量混和而成

“—”：HI滴度<1:10

表 4. 四株HFRSV血凝素间的交叉HI反应
Table 4. Cross HI reaction between 4 HFRSV HANs

血凝素	各毒株的免疫血清及其HI抗体滴度			
	76/118	陈	H8205	C4
76/118	1:160	1:160	1:320	1:320
陈	1:160	1:160	1:320	1:320
H8205	1:160	1:160	1:640	1:160
C4	1:160	1:160	1:320	1:320

在H8205和C4之间

$$r(\text{抗原比})^{[16]} = \sqrt{\frac{1/320}{1/640} \times \frac{1/160}{1/320}} = \sqrt{\frac{1}{4}} = 2$$

∴ $1 < r < 4$

∴ 这两个毒株血凝素抗原性差异不显著

表 5. 各毒株血凝素与单克隆抗体的HI反应
Table 5. HI reaction of HFRSV HAN and McAb

血凝素	含McAb腹水的HI抗体滴度										对照小鼠腹水		
	5	19	25-1	25-7	35	3H ₄	4B ₉	4E ₇	5H ₅	2B ₇	R ₃₁	HSV-1 McAb	JEV Ab
76/118	—	—	—	—	1:5120	—	—	—	—	—	—	—	—
陈	—	—	—	—	1:2560	—	—	—	—	—	—	—	—
H8205	—	—	—	—	1:2560	—	—	—	—	—	—	—	—
C4	—	—	—	—	1:2560	—	—	—	—	—	—	—	—

“—”表示1:10无血凝抑制

讨 论

我国目前从流行病学特点、临床表现和疫区宿主动物的不同，将 HFRSV 分成野鼠型与家鼠型^[1,17]。在本实验中，野鼠型毒株的血凝活性皆达到一定滴度，而家鼠型毒株虽未检出血凝活性，但从相应的免疫血清中证实有较高滴度的血凝抑制抗体，说明家鼠型毒株亦有血凝素抗原，只是活性较低，用现有方法尚难以检出。野鼠型和家鼠型毒株血凝活性的差异是与其毒力的差别相一致的，即使是同一动物来源的毒株（如自黑线姬鼠分离的 76/118、A₂₁₃、A₉ 株），血凝活性亦随致病毒力的升高而增高。

业已证实，我国不同宿主来源的毒株，即使来自同一种宿主，经 McAb 分析其抗原性也不完全一致，然而交叉 HI 试验的结果证实四个代表性毒株血凝素之间 HI 反应差异不明显，而且野鼠型毒株的血凝反应能受到家鼠型毒株免疫血清的明显抑制，这就说明 HFRSV 的血凝素抗原具有一定的群共同性。至于 HI 效价高的那株 McAb (35)，可能是一种 HFRSV 血凝素的特异性抗体。

由于国内毒株易于获得，且有的毒株（如陈株）血凝活性较高，感染周期较短；血凝素型别差异不明显，与其他病毒之间无交叉反应，这就可能供作制备血凝素，用于临床诊断和血清流行病学调查。关于 HFRSV 血凝素的本质，有待于进一步深入研究。

（试验中承安徽省医研所何浩、李永珍医师的热情支持，值此致谢）

参 考 文 献

- [1] 宋干, 1983, 全国流行性出血热防治工作座谈会资料汇编 16—23。
- [2] 罗兆庄等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(2):79。
- [3] 汤一苇等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(2):76。
- [4] 倪大石等, 1984, 安徽医学 5(3):1。
- [5] 倪大石等, 1985, 安徽医学 6(3):7。
- [6] 陈伯权等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(3):136。
- [7] 汤一苇等, 1984, 中华传染病学杂志 2(3):197。
- [8] 汤一苇等, 1984, 上海第一医学院学报 11(5):349。
- [9] Tsai, T. F. et al., 1984, *J. Infect. Dis.* 156(6):895。
- [10] 陈伯权等, 1976, 流行病防治研究 (2):114。
- [11] 陈伯权等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志 3(6):366。
- [12] 陈伯权等, 1984, 中国医学科学院学报 6(5):348。
- [13] 安献禄等, 1984, 解放军医学杂志 9:241。
- [14] 高 谦等, 1985, 解放军医学杂志 10(2):91。
- [15] 杜平主编, 1982, 医学实验病毒学 p73, 上海微生物学会。
- [16] 戴华生等编著, 1983, 新实验病毒学 p793—794, 中国学术出版社。
- [17] 宋 干等, 1984, 中华微生物学和免疫学杂志 4:236。

RESEARCHES ON THE HEMAGGLUTININ (HAN) OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME VIRUSES (HFRSV)

I. A PRELIMINARY STUDY ON THE HEMAGGLUTTING ACTIVITY OF HFRSV

Xia Dong-xiang¹

Wang Mei-xian¹

Jiang Shao-zun¹

Ma Wen-yu¹

Ni Da-Shi²

Zhou Ning²

2-4 day old suckling mice were inoculated ic with 8 HFRSV strains (Chen, A₂₁₈, A₉, H₈₂₀₅, C₄, R₂₂, 76/118) respectively. The brain tissue of the mice was harvested immediately before death and prepared into HAN by sucrose-acetone method. The HA activity and HI reactivity were tested. It was demonstrated that the HA activity varied with HFRSV strains and was associated with their virulence (LD_{50}) to the suckling mice. There was no cross reaction between HFRSV-HAN and other viral immune sera. The HA reaction of wild mouse-type HFRSV strains could also be inhibited by rabbit antisera against house rat-type HFRSV strains, and no distinct difference was observed between the HANS of 76/118 Chen, H₈₂₀₅, and C₄ virus strains. In addition, a monoclonal antibody (McAb) with HI titer as high as 1:2560-5120 was found in the test.

1. Dept. of Microbiology, The Fourth Military Medical College, Xi'an

2. Division of Virology, Anhui Institute of Medical Sciences, Hefei