

流行性出血热病毒垂直传播的实验研究

刘江秋 李忠义 沈宝军 温青莉 刘豫秋 金显涛

指导者: 何亦祥

(沈阳军区军事医学研究所, 沈阳)

提 要

本文以 Balb/c 鼠为动物模型用 IF 技术进行 EHFV 垂直传播的研究。结果证实 EHFV 可由孕鼠经胎盘感染胎鼠, 在胎鼠的脏器中不仅能查出和分离出 EHFV, 其血中也可检出 EHF 的 IgG 抗体。并对孕鼠不同时期感染 EHFV 进行观察证实母鼠在妊娠前、后接种 EHFV 均可引起胎鼠感染, 但在妊娠早期和中期对胎鼠存活无影响, 而在妊娠晚期感染 EHFV, 可造成死胎和流产。从而确切地证实了 EHFV 在鼠体内的垂直传播。

1984年末, 我们在流行性出血热病毒(EHFV)活毒接种工作中, 于一只 Balb/c 孕鼠感染 EHFV 19 天后生下的 6 只仔鼠的脑、肺、肝等脏器中均检出了 EHFV 抗原, 并由血中检出 EHFV 抗体。为观察 EHFV 在鼠体内垂直传播的可能, 我们用 EHFV 感染 Balb/c 孕鼠, 定期剖腹取胎鼠用免疫荧光(IF)技术进行抗原、抗体检测与病毒分离。结果证实 EHFV 确可由孕鼠垂直传给胎鼠。现将实验结果报告如下:

材 料 与 方 法

1. 病毒 EHFV H8278 株^[1]系我室 1982 年从长白山区 EHF 病人血中分离, 将其接种于 Balb/c 乳鼠脑内进行传代。取第三代乳鼠脑制成 10% 悬液, 冻融三次, 3000rpm 离心 20 分钟, 上清 10^{-1} 稀释作为感染用病毒悬液。
2. Balb/c 小鼠从中国医科大学动物部引进。
3. 感染将 EHFV 悬液, 皮下注射小鼠, 0.3ml/只。同法将正常鼠脑悬液注射给小鼠做对照。
4. 取材 Balb/c 母鼠感染后不同时间眼球放血, 进行血清抗体检测。同时剖腹, 取胎鼠血及脑、肺、肝、脾、肾、子宫、胎盘等脏器印片^[2], 并做病理切片。对照鼠

本稿于 1985 年 11 月 14 日收到

用同法取材制片。

5. 诊断血清(1)羊抗人 IgG 荧光血清, 美国 Mele 公司购进; (2)兔抗鼠 IgG 荧光血清, 购于北京生物制品所; (3)抗 EHFV 的 4B₉、4E₇、3H₁McAb 系四军医大汪美先教授赠送; 25-1McAb 系由中国医科院病毒所购进; F₇、G₉、D₁₁McAb 由我室制备。

6. 病毒分离将感染 EHFV 的孕鼠剖腹取出胎鼠的脑、肺、肝、脾、肾等脏器, 研磨后制成10%的悬液, 3000rpm离心20分钟, 取上清用 VeroE-6 细胞进行病毒分离和传代^[3], 每代15—20天。用 IF 法进行病毒检测。

7. 免疫荧光染色脏器组织的病理检查、胎鼠脏器印片和病毒的鉴定等方法: 见文献^{[3][4]}。

结 果

1. 孕鼠感染 EHFV 后对胎鼠的影响及脏器的病理学变化:

妊娠不同时期接种 EHFV 的母鼠, 均可造成母鼠和胎鼠感染。在母鼠怀孕前期和中期感染 EHFV, 对胎鼠的存活无明显影响, 但在怀孕后期感染 EHFV, 则可造成死胎和流产。

感染胎鼠脏器组织的病理变化: 脑实质见灶性炎细胞浸润, 以淋巴细胞为主, 其海马回区淋巴细胞呈片状浸润, 毛细血管扩张、充血, 大脑皮层可见灶性坏死及不同程度变性; 肝细胞水样变性, 中央静脉扩张、充血, 肝窦扩张, 枯否氏细胞明显增生, 汇管区结缔组织增生; 肺组织泡壁增厚, 少量淋巴细胞浸润, 血管扩张、充血, 局部灶性出血; 脾窦扩张、充血, 窦内皮细胞增生, 巨核细胞增多; 肾脏近曲小管浊肿, 间质内淋巴细胞浸润, 纤维组织轻度增生。

2. 感染胎鼠脏器中 EHFV 定位情况:

母鼠交配第二天即行感染 EHFV 或先感染 EHFV, 两天后再交配, 分别于不同时间剖取胎鼠的脏器, 进行 IF 检查。

表 1 胎鼠脏器中 EHFV 抗原的检测结果
Table 1 The results of the detection of EHFV antigen in the fetal mice viscera.

感 染 天 数	胎 鼠 数	阳 性 数
孕 后 感 染	5-7天	0
	10-12天	42
	15-18天	53
孕 前 感 染	20天	24

孕鼠感染 EHFV 10天后剖取的胎鼠, 在其脑、肝、肺、胎盘等脏器中均可检出 EHFV 抗原(表 1)。15天后剖取胎鼠的脑、肝、肺为强阳性, 而脾、肾、子宫等脏器中也检

出了EHFV抗原,但远较脑、肺、肝中为少。

胎鼠脏器 EHFV 抗原的特异性鉴定:胎鼠脑、肺、肝、脾、肾等脏器印片经 IF 染色确定为阳性后,再用兔抗EHFV、流感V、HSV、AdV3.7、Reo I、II 免疫血清进行交叉阻断试验,结果除兔抗 EHFV 免疫血清为阳性外,其余均为阴性,进而证实胎鼠各脏器中存在的抗原为 EHFV 特异性抗原。

3. 鼠血清 EHF 抗体的检测:

取孕后和孕前感染的母鼠及其胎鼠的血清,用 IF 法检测其 EHF 抗体,结果如表 2。从表中可看出不同时间感染的孕鼠和胎鼠血清中均存在 EHFV IgG 抗体。

表 2 感染 EHFV 的鼠血清中 EHF 抗体检测结果

Table 2 The results of the detection of EHF antibody in sera from infected mice.

感染 EHFV 的鼠		鼠数	感染后天数	Ab 效价
孕后感染	孕鼠	18	10~18天	1:40~1:80
	胎鼠	86		1:20~1:40
孕前感染	孕鼠	20	19~20天	1:160~1:320
	胎鼠	96		1:40~1:80
正常对照	孕鼠	14		-
	胎鼠	50		-

4. 胎鼠脏器的病毒分离及特异性鉴定:

(1) 孕鼠感染 EHFV 15天后,无菌操作剖取胎鼠的脑、肺、肝等脏器组织进行病毒分离。第一代 IF 检测即可见 EHF 阳性颗粒,随着代数的增多,感染细胞逐渐增加,第三代可达 85% 以上,并可稳定传代。从中选出三株病毒经特异性鉴定^[1],均为 EHFV,(编号为N8508, F8510, G8511)对照正常胎鼠脑、肺、肝连续传 5 代均为阴性,见表 3。

表 3 胎鼠脏器中 EHFV 的分离和传代结果

Table 3 Isolation and passage of the EHFV from the fetal mice.

代数	感染鼠分离物 IF 染色			正常对照鼠分离物 IF 染色		
	脑	肺	肝	脑	肺	肝
1	+	+	±	-	-	-
2	++	++	++	-	-	-
3	++++	++++	++++	-	-	-
4	++++	++++	++++	-	-	-
5	++++	++++	++	-	-	-

(2) 分离株抗原决定簇的鉴定:

分离株 N8508, F8510, G8511 抗原片用国内不同株的 McAb 进行检测, 结果三株均对 F₇、G₉、D₁₁、4E₇McAb 为阳性, 而对 4B₆、3H₄ 和 25-1 未发生阳性反应, 这与原感染株 H82-78 结果相一致。

讨 论

EHF 传播途径的研究, 一直为各国学者所重视。1934 年杨为松等^[5]有一例 EHFV 在人体垂直传播的报告。本文用 Balb/c 孕鼠作为动物模型, 进行 EHFV 垂直传播的研究, 结果证明母鼠于妊娠前、后不同时间接种 EHFV, 均可引起感染。而且可经胎盘感染胎鼠。在胎鼠体内不仅可检出和分离出 EHFV, 同时也可查出 EHF 的 IgG 抗体。并通过特异性阻断试验, 抗 EHF 的 McAb 的检测, 确定了从胎鼠体内检出和分离出 EHFV 的特异性。

研究中发现 EHFV 感染妊娠不同时期的母鼠, 对胎鼠的存活也有不同影响。母鼠在妊娠的早期和中期感染 EHFV, 虽可使胎鼠感染, 但幼鼠可存活。晚期不仅能引起胎鼠严重感染, 而且还可使胎鼠于宫内死亡, 造成死胎或流产。这与 Sangiorgio, P 等(1982) 报告的阿根廷出血热的病原胡宁病毒 (Junin Virus) 垂直传播的实验结果相似。

日本学者川名氏认为^[7], 病毒的垂直传播途径可分为基因性垂直传播, 宫内(经胎盘)垂直传播、产道内感染、经母乳传播。本研究中的胎鼠均系剖腹获得, 可排除产道内感染和经母乳传播, 而基因性垂直传播在动物还未证实, 所以我们认为通过胎盘感染是 EHFV 垂直传播的主要途径。

EHFV 在小鼠体内垂直传播的实验结果, 不仅使我们对 EHF 传播途径有了新的认识, 而且对 EHF 的发病机理和流行病学深入研究具有重要意义。特别是对研究 EHF 自然疫源地的形成, 特点及保存方式具有重要参考价值。

参 考 文 献

- (1) 李锡铎等, 1983, 中华流行病学杂志 4(4):138.
- (2) 何亦祥等, 1984, 中华预防医学杂志 19(2):85.
- (3) 何亦祥等, 1985, 微生物学杂志 5(1):1.
- (4) 李德荣等, 1985, 军事医学科学院刊 (2):179.
- (5) 杨为松等, 1986, 中国公共卫生 (待发表)
- (6) Sangiorgio, P et al., 1983, *J. Med. Virol.*, 11(2):181.
- (7) 川名尚他, 1979, 围产期医学(日文) 3(4):593.

AN EXPERIMENTAL STUDY ON VERTICAL TRANSMISSION OF EHFV

Liu Jiang-qiu Li Zhong-yi Shen Bao-jun
Wen Qing-li Liu Yu-qiu Jin Xian-tao

(*Institute of Military Medicine, Shenyang Military Region, Shenyang*)

This paper is a study on vertical transmission of EHFV. Balb/c mice were used as the experimental animals of EHFV infection and IF technique was adopted. The experiment result showed that the EHFV could be transmitted from the pregnant mice to their fetuses through the placenta. The EHFV could be found in many organs of the fetuses and isolated from them. At the same time the specific IgG antibodies could be detected in the fetal blood. The EHFV isolated from the fetuses was confirmed by specific blocking test of IF at the first time and identified by the specific McAb. It is to verify exactly the vertical transmission of EHFV in animal.

We also observed the EHFV infection in the mice at various gestational periods. It demonstrated that the fetal mice infected with EHFV both before and during pregnancy might transmit the viruses to their fetuses. It showed the infection in the early and middle gestational periods, had no significant influence on the fetuses but EHFV infection in the late gestational period, could cause fetal death and abortion.