

流行性出血热病毒感染家猪的实验

曾贵金¹ 夏占国² 赵云石²
赵冬燕¹ 傅占国²

(¹河南省卫生防疫站, 郑州; ²河南省新安县卫生防疫站, 新安)

提 要

本实验证明猪为流行性出血热病毒(EHFV)的敏感实验动物。从啮齿动物中分离的动物源株(R₂₂)和从EHF患者血中分离的人源株(HB₅₅)都可感染猪,并可在其体内许多组织中复制增殖。家猪在接种EHFV后第6—9天有一个短暂的发烧期,表现出病毒血症。于接种后的第7—11天(R₂₂)和7~20天(HB₅₅)可在组织中、特别是脾和肺中,用直接免疫荧光技术(DFA)很容易地检出EHFV抗原。亦可在感染EHFV的猪血中检出EHFV抗体。从感染后的荧光阳性猪脾、肺可分离出感染性病毒。但R₂₂病毒株在感染猪后的第15天便完全消失,而HB₅₅株在感染后的第20天仍可查见,似乎动物源株(R₂₂)和人源株(HB₅₅)有所差异,然而都对家猪有感染性。从而,首次证实了家猪为EHFV的敏感实验动物,可作为EHFV的分离,增殖及疫苗研制等的新动物模型。这一发现,对EHF的研究将起积极作用,也提示猪在EHF流行病学上的意义不可忽视。

关键词: 仔猪 流行性出血热病毒 敏感动物

近年来,国内外已从30多种哺乳动物体内查到流行性出血热病毒抗原^[1],并已从家猫中检出EHFV抗原、抗体和分离出病毒^[2,3]。为了了解与人类生产、生活都有密切关系的家猪在EHF流行病上的意义,我们于1984年曾通过血清学调查首次证实在家猪体内可检出EHFV抗体阳性率6.97%(23/330)^[4],但猪是否为EHFV的敏感动物有待探讨。为此进行了家猪人工感染EHFV的实验研究,结果发现家猪在感染EHFV后体内多种脏器中可检出EHFV抗原,表明EHFV可在猪体内复制增殖,从而证明家猪是对EHFV敏感的实验动物。现将结果报告如下。

材料和方法

一、材料

(一)动物

1. 家猪:系购自新安县非EHF疫区曹村乡的3.1~3.9 kg的30日龄仔猪,每头于实验前间隔一周采血两次查EHFV抗体,均为阴性。

2. 长爪沙鼠:购自中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所。

本文于1988年10月24日收到

3. 大白鼠乳鼠: 为本实验室繁殖。

(二) EHFV 毒株: R₂₂ 毒株为河南褐家鼠中分离的家鼠型毒株^[5], 由中国预防医学科学院病毒所供给; HB₅₅ 毒株为本实验室从家鼠型疫区 EHF 患者血中分离并经全面鉴定的家鼠型毒株。

(三) 血清

1. EHFV A₀ 25-1 单克隆荧光血清: 系只与 EHFV 发生特异性反应而不与其它病毒发生免疫反应的组特异性抗体⁽⁶⁾, 效价 1: 5120, 由中国预防医学科学院病毒所提供。

2. 羊抗人 IgG 荧光血清: 系北京生物制品所生产。

3. EHF 患者恢复期血清: 采自洛阳市第二医院, 免疫荧光滴度 1: 1280。

4. 酶标记 EHFV 抗体: 系 EHFV 免疫兔血清标记辣根过氧化物酶制备。

(四) EHFV 抗原及抗原片: 系用 R₂₂ 感 Vero-E₉ 细胞制备。

(五) 血凝素: 购自黑龙江省卫生防疫站, 效价 1: 160。

二、方法

(一) 1986 年 4 月和 1987 年 5 月分别购回二批仔猪, 先行耳静脉采血, 用 ELISA 竞争法和血凝抑制试验 (HI)^[7] 检测 EHFV 抗体, 均阴性。并于接种前对仔猪进行三天基础体温测定。

(二) 将 R₂₂ 毒株用大白鼠乳鼠传代, 以所传第七代 (R₂₂ SRP₇) 鼠脑, 用单克隆抗体直接免疫荧光 (DFA)^[8] 检查为 +++~++++ 荧光者, 无菌研磨, 用含 10% 牛血清 Eagle's 生长液稀释成 10% 鼠脑病毒悬液后, 1500 转/分离心 30 分钟, 取上清液采取肺内 0.4 毫升、腹腔 0.6 毫升、皮下 0.5 毫升三种途径感染仔猪。HB₅₅ 毒株用长爪沙鼠传至第五代 (HB₅₅ smP₅) 的鼠脑, 同上法检查有 +++~++++ 荧光者, 研磨、离心、取上清液, 每头仔猪感染途径和量同上。

(三) 症状和体征观察: 接种后每天观察其活动情况, 食欲变化, 皮肤粘膜充血及出血等体征和体温变化等症状。

(四) 病毒检查: 感染 EHFV 的仔猪分别于第 6、7、9、11、15、20、28 天解剖 1~2 头, 取其心、肝、脾、肺、肾、胃、大肠、小肠、膀胱、脑分成二份。一份保存液氮, 一份冰冻切片。用 25-1 单克隆荧光抗体行 DFA 法和用患者 EHFV 血清行 IFA 法^[9] 染色, 以 Olympus 荧光显微镜检查 EHFV 抗原。

(五) 抗体检查: 于仔猪感染 EHFV 后的第 5、7、9、15、20 天, 耳静脉取血, 用 ELISA 竞争法和 HI 法检测抗体。

(六) 病毒分离: 取感染 EHFV 后解剖之猪脾、肺制成 5% 悬液皮下和腹腔注射大白鼠乳鼠或长爪沙鼠, 7 天后取组织进行 EHFV 检查。

结 果

一、仔猪在接种 EHFV 前基础体温为 38~39℃ 之间, 接种后 5 天内体温仍维持在基础水平, 第 6 天体温开始升高 (39.6~40℃), 至第 9 天以后体温恢复到正常范围, 见图 1。于接种后第 5~7 天仔猪食欲稍有减退, 表明家猪在感染后第 6~9 天间有一个明显的短暂发烧期, 并伴有食欲减退, 系感染 EHFV 后病毒血症所致, 提示病毒能在猪体内增殖, 有轻微症状。

二、EHFV 在家猪体内的分布: 家猪感染上 EHFV R₂₂ 和 HB₅₅ 后, 经 EHFV 单克隆抗体荧光结合物 (A₀ 25-1-FITC) 直接检查猪体内各组织 EHFV 抗原的分布。结果在肺 (++)、脾 (++)、肾 (++) 等组织中可查见特异性荧光颗粒, 荧光形态与褐家鼠等体

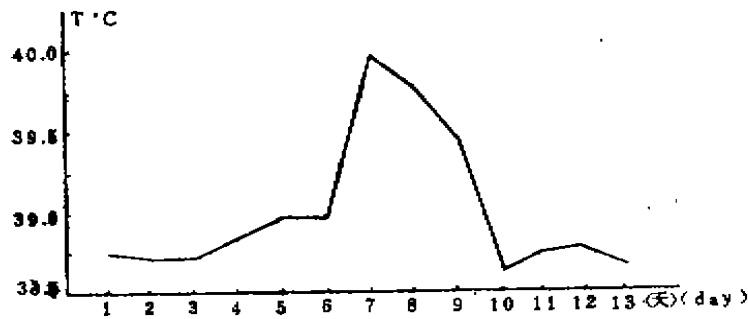


图1 家猪感染 EHFV 后的体温变化

Fig 1 Temperature changing chart of pigs after EHFV inoculation

内所见类似。用患者恢复期血清行 IFA 法检查各组织 EHFV 抗原, 结果相似, 其余组织未查见, 见表 1。

将家猪接种后所查之特异性荧光阳性肺、脾制成悬液, 分别接种大白鼠乳鼠和长爪沙鼠, 均可分离到 EHFV, 而荧光阴性肺、脾用同法分离则为阴性。表明脏器中有 EHFV 的增殖。

表 1 EHFV 在家猪体内的分布

Table 1 Distribution of EHFV antigen in tissues of pigs infected with EHFV strains

Strains	Tested tissues									
	L	S	H	Lv	K	St	Li	Si	U	B
R22	+++	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-
HB55	++	++	-	NT	NT	-	-	-	NT	-

L, lung; S, spleen; H, heart; Lv, liver; K, Kidney; St, stomach; Li, large intestine; Si, small intestine; U, urocyt; B, brain.

The fluorescent reaction was graded as negative (-) or positive (+, ++, +++, +++++) according to the extent of the reaction. NT, not tested.

三、EHFV 在家猪体内的时间分布: 家猪接种 EHFV 后, 于脾、肺、肾组织中查到 EHFV 抗原的时间分布见表 2。

表 2 R22 和 HB55 在家猪体内检出的时间分布

Table 2 Time distribution of EHFV antigen detected in pigs after inoculation of EHFV R22 and HB55

Day after inoculation	R22			HB55	
	Lung	Spleen	Kidney	Lung	Spleen
6	0/2*	0/2	0/2	0/1	0/1
7	1/2	1/2	1/2	0/2	1/2
9	2/3	2/3	2/3	1/2	1/2
11	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1
15	0/3	0/3	0/3	NT	NT
20	0/2	0/2	0/2	1/2	2/2
28	0/1	0/1	0/1	• NT	NT

* No. positive/No. tested, NT, not tested

四、家猪对不同来源毒株的敏感性：家猪接种 EHFV 后，不管是动物源株抑或是人源株均能使家猪感染，见表 2，接种后第 6~9 天都有短暂发烧期，见表 3、图 1，表明家猪对不同来源毒株均敏感。但动物源株 R₂₂ 感染家猪后第 15 天即查不到 EHFV 抗原，而人源株 HB₅₅ 于感染后第 20 天仍可检查出 EHFV 抗原，且脾内抗原消失更慢，表明抗原消失时间二者似有差异，二者均于接种家猪后第 7~9 天即可在血中检出 EHFV 抗体，随着抗体滴度的升高，体内病毒便随之减弱乃至完全消失，其抗体效价可达 1:1280 以上。

表 3 家猪对 EHFV R₂₂ 及 HB₅₅ 毒株敏感性比较
Table 3 Sensitivity comparison of pigs to EHFV R₂₂ and HB₅₅ strains

Origin strains	Positive No. / No. of Test	Antigen detected						Fever (39.6-40°C)	
		Day after inoculation			Persistence days			Animals with fever / Tested animals	Fever days
		S	L	K	S	L	K		
Animal (R ₂₂)	5/5	7th	7th	7th	5-8	5-8	5-8	15/15	3-4
EHF patients (HB ₅₅)	3/3	7th	9th	NT	>14	9-12	NT	8/8	3-4

S, spleen L, lung K, Kidney

讨 论

一、我们曾于 1984 年对 EHF 疫区三县一市的 330 头家猪进行了 EHFV 抗体检查，其阳性率为 6.97% (23/330)⁽⁴⁾，但未从猪肺中检出 EHFV 抗原，可能为检查时机不当。因而本次用人工感染家猪进行实验研究，结果在猪体内查到 EHFV 抗原，并检出 EHFV 抗体，表明家猪在 EHFV 刺激下可产生免疫性抗体，说明家猪能感染 EHFV 并能进行复制增殖，从而首次证实家猪是对 EHFV 敏感的实验动物，是偶蹄目动物对 EHFV 敏感的新发现。仔猪饲养方便，繁殖快，可作为 EHFV 的敏感动物用于 EHFV 的分离、毒株抗原性研究的动物模型，亦可作为 EHFV 抗原和抗血清生产用动物。但是否对其它血清型毒株也敏感有待研究。

二、从接种后体温变化及抗原、抗体检测结果看，表现出与人感染后的短暂自限性感染过程相似。但家猪感染后除发烧外也不表现明显症状和病理损害，与长爪沙鼠、家兔的人工感染情况类似^(9,10)，然而猪体内抗原分布仅只在脾、肺、肾中查出又与长爪沙鼠、家兔不尽相同。作为临床动物模型但不及小白鼠乳鼠脑内感染 KHFV (Hantaan virus) 有价值，后者可引起乳鼠全身感染，具明显症状且导致死亡⁽¹¹⁾。

三、本实验用家猪感染 EHFV 的途径是采用皮下、肺，腹腔注射，而家猪在自然界中经上述途径感染机会少，感染量也可能少，实验中又未做尿、粪等排泄物的病毒分离，所以对家猪在自然状况下的感染途径、带毒、排毒及污染等情况，还需做进一步的

流行病学调查和实验研究,以明确偶蹄目动物、特别是家猪作为宿主动物在本病流行上的作用。

参 考 文 献

- [1] 曾贵金, 1986, 流行性出血热流行病学、病原学研究近况, 河南卫生防疫 1: 111
- [2] 罗兆庄等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(2)
- [3] Desmyter J et al., 1983, *Lancet*, II (8365/8): 1445
- [4] 夏占国、曾贵金等, 1986, 家猪流行性出血热调查初报, 河南省卫生防疫 1: 19
- [5] 宋干等, 1982, 微生物学报, 22(4): 373
- [6] 陈伯权等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志 3(6)
- [7] 严玉辰等, 1985, 安徽医学院学报 12(2): 4
- [8] 宋干等, 1984, 中华微生物学和免疫学杂志 4(4)
- [9] 朱智勇等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(1)
- [10] 朱智勇等, 1984, 微生物学报 24(1): 92
- [11] Tsai T.F, et al., 1982, *Lancet*, II (8296): 503

Studies on Infection of Epidemic Hemorrhagic Fever Virus (EHFV) on Suckling-young Pigs

Zeng Gui-jin¹ Xia Zhan-guo² et al

- (1. Henan Province Health and Anti-epidemic Station, Zhengzhou, Henan
2. Xin-an County Sanitary and Anti-epidemic Station, Xin-an, Henan)

This study confirmed that suckling young pig is a laboratory animal susceptible to EHFV strains R22 and HB55 isolated from wild rodents and patients with EHF. The study showed that EHFV was able to propagate in many tissues of pigs. Viremia appeared in suckling young pigs on 6—9th days after inoculation of EHFV. Specific fluorescence for EHFV antigen was detected in many tissues, especially in spleen and lung on 7—11th and 7—20th day of experimental infection. Pigs infected with EHFV developed high titre antibody in sera. EHFV strains R22 and HB55 could be easily recovered in pigs. Therefore, suckling young pig provides a new animal model for isolation and propagation of EHFV and for test of EHFV vaccine.

Key words: Suckling young pig Epidemic hemorrhagic fever virus
Sensitivity animal