

流行性出血热病毒 (EHFV) 山东地方株特性的研究

张进蛙 隋月兰 元秀兰 成振

(潍坊市卫生防疫站, 潍坊 261041)

提 要

本文介绍应用 Vero-E₉ 细胞直接从 EHF 抗原阳性的褐家鼠肺中分离出 EHFV-R₃₀ 株。形态学鉴定符合 EHFV, 并见到典型的颗粒性 EHFV 包涵体和大小形态类似的 EHFV 样颗粒。分离毒株经 EHFV 单克隆抗体分析, R₃₀ 株 EHFV 的抗原谱不同于我国的 R₂₂ 株, 它既带有家鼠型 R₂₂ 株相似的抗原决定簇, 同时又具有野鼠型抗原决定簇。

关键词: 地方株 流行性出血热病毒

流行性出血热 (EHF) 病原学研究, 近年来国内外均获得重大突破和新的进展^[1-3]。本文介绍 1987 年 4 月我们应用 Vero-E₉ 细胞直接从褐家鼠肺中分离出 EHFV-R₃₀ 株, 并进行了血清学及理化特性的研究。现报告如下:

材 料 和 方 法

一、标本来源: 1987 年 4 月从疫区青州市石埠乡捕获褐家鼠, 现场解剖取鼠肺, 置液氮罐中送回实验室保存。经间接免疫荧光检查为 EHF 强阳性者, 供分离用。

二、细胞系: Vero-E₉ 细胞由山东省卫生防疫站病毒室提供。

三、参考血清

1. 阳性血清: 多价 EHF 兔免疫血清由安徽省医科所倪大石研究员惠赠; 兔抗沟, 免疫血清由上海生物制品研究所病毒室惠赠; EHF 病人恢复期血清采自潍坊市人民医院传染科及安邱县、诸城县人民医院住院典型 EHF 病人。

2. 健康人血清, 采自潍坊市人民医院血库献血员。

3. 其它疾病病人血清: 采自潍坊市人民医院生化室。

4. I—III 型呼肠孤病毒抗血清、特异性单克隆抗体由安徽省医科所倪大石研究员提供。

5. 荧光抗体: 上海生物制品研究所制备, 羊抗人 (兔) IgG 批号 8601, 8602, 本试验使用 4—8 个染色单位。

6. 细胞抗原片: A₀ 抗原片系上海生物制品研究所提供; 陈株抗原片系安徽省医科所提供; R₃₀ 株抗原片由本室自制。

四、细胞传代及维持: 单层细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 用每毫升含有 100 个单位青霉素、链霉素、卡那霉素 Eagle's 液制备成细胞悬液, 生长液中加入 10% 的灭活小牛血清, 维持液中加入 2—5% 的灭活小牛血清, 分装于小方瓶中置 36℃ 培养 24—48 小时, 形成单层后供标本接种。

本文于 1988 年 6 月 7 日收到

本文部分试验经安徽省医科所倪大石研究员、北京病毒研究所周静仪主管技师等大力协助, 特此致谢。

五、病毒分离: 取经免疫荧光检测 EHF 阳性 (卅~卅) 的鼠肺组织, 以冷 Eagle's 生长液研磨制成 10% 悬液, 冻融三次, 3500 转/分离心 15 分钟, 取上清液过滤除菌, 分别吸取 0.5~1.0 毫升接种 Vero-E₆ 单层细胞, 于 36°C 吸附 2 小时, 倒去鼠肺悬液, 用维持液洗三次, 再加入 5 毫升维持液放 36°C 培养, 一般 2~3 天换液一次。第一代培养 3~4 周作常规传代或自身传代^[3], 以后每 2 周传代一次, 并逐代制作点片, 用间接免疫荧光法 (IFA) 进行抗原性检查。点片及 IFA 方法见文献^[4,6], 盲传 6 代后仍未发现特异性抗原, 作为阴性弃去。

结 果

一、病毒分离及传代: 从 7 份 EHF 抗原阳性的褐家鼠鼠肺中分离到一株病毒 (R₃₆ 株), 阳性率为 14.3%, 传至第四代时少数细胞浆内出现微弱荧光颗粒。随着代数增加, 感染细胞也逐渐增多。到第 9 代约 80% 的细胞被感染, 荧光颗粒亮度明显增强。荧光颗粒分布在细胞浆内, 多数呈颗粒状, 也有呈片状或块状 (图 1)。整个分离过程中未见细胞发生病变。

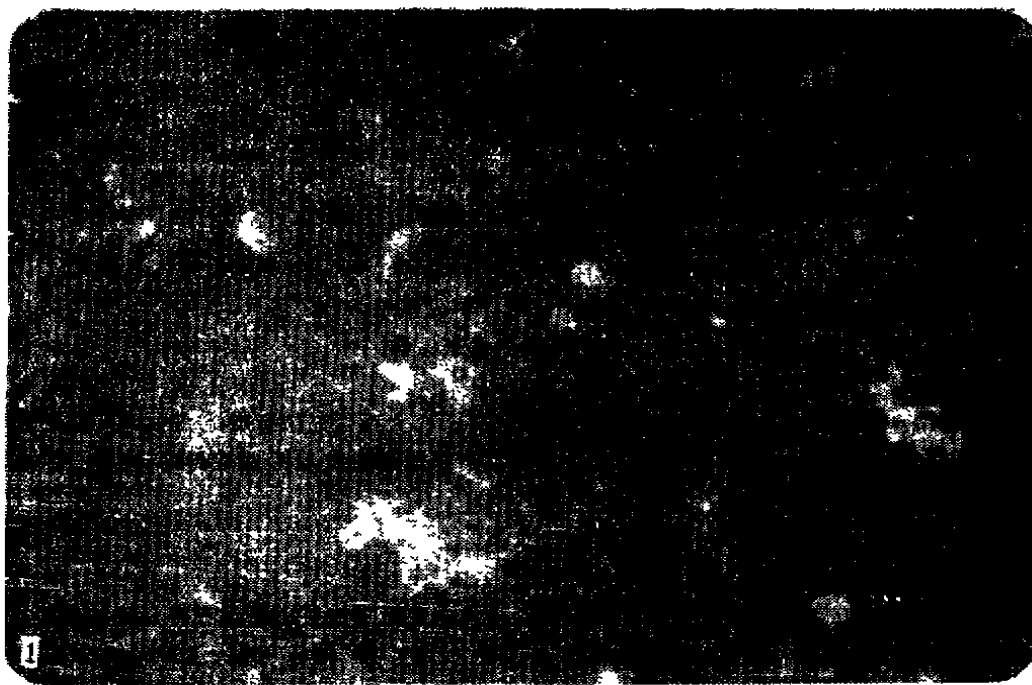


图 1. R₃₆ 株在 Vero-E₆ 细胞中第 5 代荧光图象

Fig 1. Fluorescent photomicrograph of R₃₆ strain passed 5 times in Vero-E₆ cells

二、电镜检查: 用 R₃₆ 株病毒的第 9 代培养物 (接种后培养 16 天), 送中国预防医学科学院病毒学研究所形态研究室作免疫染色超薄切片, 进行形态学鉴定, 结果发现所分离出的病毒, 从形态学上符合 EHFV, 不仅见到典型的颗粒性 EHFV 包涵体 (图 2), 而且见到大小和形态类似的 EHFV 颗粒 (图 3)。

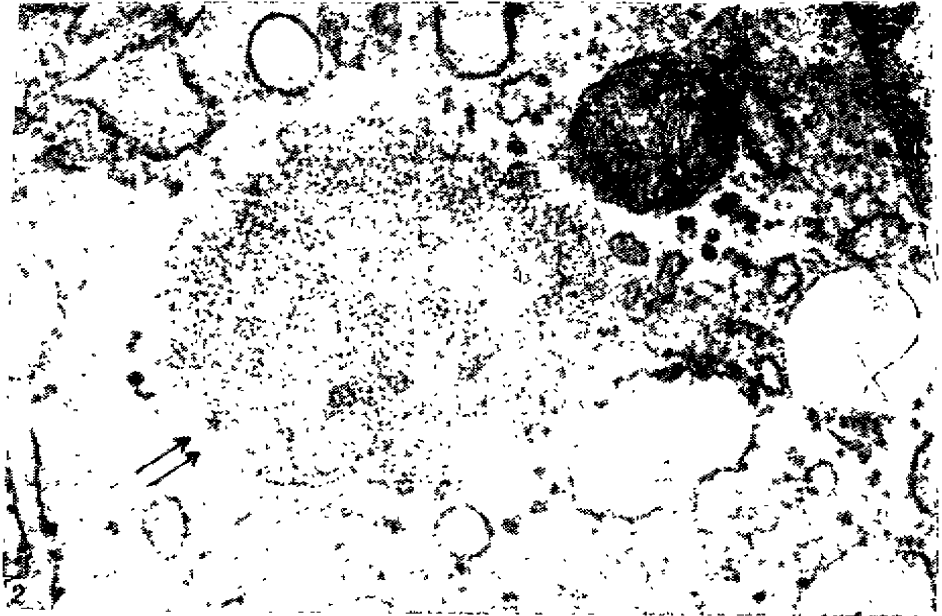


图2. R₃₆株在Vero-E₆细胞中典型的颗粒性EHFV包涵体(↑↑所示).
Fig 2. Typical particulate EHFV inclusion of R₃₆ strain in Vero-E₆ cells (sign: ↑↑)



图3. R₃₆株在Vero-E₆细胞中的大小形态类似的 EHFV颗粒(↑所示).
Fig 3. Particle of R₃₆ strain in size and shape (sign: ↑)

三、血清学试验:

1. R_{36} 株细胞点片时对 6 份 EHF 患者的双份血清用 IFA 进行效价滴定 均有 4 倍以上升高, 证实两者之间有密切的血清学关系(表 1)。

表 1. EHF 患者双份血清测定结果
Table 1. Detecting results of EHF patients' pair sera

血清号	急性期		恢复期		抗体增长 倍数
	病日	滴度	病日	滴度	
1	4	80	13	320	4
2	4	80	18	640	8
3	6	320	20	2560	8
4	4	160	18	1280	8
5	3	160	28	1280	8
6	4	160	28	1280	8

2. R_{36} 株抗原点片及 A_9 、陈株抗原点片检测 EHF 病人恢复期血清 20 份, 非 EHF 病人血清 7 份, 健康人血清 9 份, 结果表明 R_{36} 株仅对 EHF 病人血清呈特异免疫荧光反应, 与 A_9 、陈株国家标准株抗原点片结果一致(表 2、表 3), 血清抗体几何平均滴度达 $1:1236$ 。

表 2. 不同人血清免疫荧光检测结果
Table 2. Detecting results of different population's sera by IFA

血清来源	检 查 数			阳 性 数		
	A_9	R_{36}	陈	A_9	R_{36}	陈
EHF 病人恢复期	20	20	20	20	20	20
* 非 EHF 病人	7	7	7	0	0	0
健康人	9	9	9	0	0	0

* 包括肾病综合症 2 例、肝硬化 1 例、尿毒症 1 例、乙脑 1 例、急性肾衰 1 例、动脉硬化 1 例。

表 3. EHF 病人恢复期血清检测结果
Table 3. Detecting results of EHF patients' sera in convalescence

血清号	滴 度	血清号	滴 度
1	1280	11	2560
2	1280	12	2560
3	2560	13	160
4	640	14	1280
5	2560	15	2560
6	1280	16	1280
7	1280	17	1280
8	160	18	2560
9	640	19	2560
10	1280	20	1280

3. 用 EHFV 多价免疫血清和荧光素标记的兔抗汉坦病毒 (76/118) 免疫血清及兔抗沟, 免疫血清染色, R_{36} 株细胞抗原片中出现特异的荧光颗粒(+++).

4. 用呼肠孤病毒 (Reov) I、II、III 型免疫血清对 R_{36} 株抗原片进行 IFA 检测, 三型病毒血清与该抗原均不起反应, 证实无呼肠孤病毒污染。

5. 用 15 株 EHFV 的单克隆抗体对 R_{36} 株细胞抗原片染色进行抗原分析, 结果见表 4。

表 4. R_{36} 株抗原与 15 种 EHFV McAb 反应结果
Table 4. Results of antigen of R_{36} strain reacted with EHFV
McAb of 15 species

病 毒	A ₅	A ₁₀	A ₂₅₋₁	A ₂₅₋₂	A ₃₅	* R ₃₁	** 5H ₅	4E ₇	4B ₉	3H ₄	H ₁	H ₁₁	B ₉	B ₁₁	F ₃
A ₉	++	+	+++	+	++	-	+	-	++	+	++	++	++	++	+
cben	+	++	+++	+	++	-	+	+	++	+++	+++	+++	+	+	++
R ₂₂	++	++	+++	++	++	++	-	+	-	-	+	-	-	-	+
R ₃₆	++	+	++	++	++	++	+	-	-	-	++	±	-	±	+++

*R₃₁ McAb 为家鼠型特异抗体; **5H₅ 为野鼠型标志抗体。

根据上述抗原分析结果, R_{36} 株 EHFV 的抗原谱不同于我国的 R_{22} 株, 既带有家鼠型 R_{22} 相似的抗原决定簇, 同时具有野鼠型 5H₅ 抗原决定簇。

四、理化特性:

1. 滤过试验: 将感染病毒培养 20 天的细胞在 -70°C 冻融三次, 2000 转/分离心 10 分钟, 取上清液加压通过 0.45 微米孔径滤膜, 其滤液仍使细胞感染。

2. 该病毒在 $56^{\circ}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 中 30 分钟完全灭活。

3. 该病毒对脂溶剂乙醚敏感。

讨 论

一、本试验从褐家鼠鼠肺中分离到一株 EHFV R_{36} 株, 在 Vero-E₆ 细胞上传代未见产生病变, 其生物学特性及血清学试验与文献报道基本相符^(6,10), 可排除呼肠孤病毒, 电镜观察到典型的颗粒性 EHFV 包涵体和大小形态类似的 EHFV 样颗粒。因此, R_{36} 株证实为 EHFV。

二、文献报道^(7,8), 分离 EHFV 盲传 3 代荧光阴性可弃去, 而本实验培养到第五代感染细胞才出现明显的荧光颗粒, 因此, 延长传代次数, 对提高分离阳性率是很有必要的。

三、本次从褐家鼠鼠肺中分离 EHFV, 分离阳性率 14.3%, 明显低于文献报道⁽⁶⁾。分析原因, 可能是由于捕鼠时用鼠夹夹死, 鼠死后发现时间过长所致, 造成分离阳性率偏低。

四、 R_{36} 株 EHFV 的抗原谱不同于我国的 R_{22} 株, 同时具有家鼠型和野鼠型特异的

抗原决定簇, 国内已有报道^[10], 本文再次证实了这一现象。原因可能与 EHF 病毒在宿主动物更迭或不同毒株宿主动物之间互相传播时, 基因片断的互换、增减或病毒的重组有关^[11]。

五、本次分离 EHFV 成功, 对于了解我省的 EHF 抗原结构及今后应用疫苗预防有一定意义, 并且用此方法分离的病毒可作为出血热免疫荧光及 HRP-SPA 的抗原材料。因此, 在出血热的特异性诊断和早期诊断中更有推广和实用价值。

参 考 文 献

- [1] 洪涛等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志 3(2): 69.
- [2] McCormick J.B. et al., 1982, *Lancet*, 1(8275): 763.
- [3] 倪大石等, 1983, 中华医学杂志 63(2): 65.
- [4] 胡广英, 1988, EHF 免疫荧光检测法, 山东省卫生防疫站.
- [5] 廖化新, 1984, EHF 检测技术学习班资料汇编.
- [6] 宋干等, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志 2: 76.
- [7] 黄永进等, 1987, 湖北预防医学 1: 7.
- [8] 何浩等, 1984, 安徽医学院学报 19(3): 185.
- [9] 米尔英等, 1986, 中国公共卫生 5(3): 28.
- [10] 陈伯权等, 1985, 中华微生物学和免疫学杂志 5(3): 136.
- [11] 方国富等, 1988, 上海医学 11(2): 105.
- [12] 中国医学科学院流行病学防治研究所, 1978, 常见病毒病实验技术, 科学出版社.

A Study on Endemic Strain of EHFV(R36) in Shandong

Zhang Jin-sin et al

(Sanitary and Anti-epidemic Station of Weifang, Weifang 261041)

In this paper, it is reported that the result of isolated EHF virus R36 strain directly from the antigen positive lung by using Vero-E6 cell. Morphological identification is corresponding to EHF virus by EM and it is found that typical particle EHF virus inclusion bodies and size similar EHFV-like particle.

By EHFV monoclonal antibody assay this virus strain was different from that of R22 in China. It has rattus R22-like antigenic determinant and apodemus 5H5 antigenic determinant.

Key words: Endemic strain EHF virus