

从实验感染动物粪便中分离出两株 疑似戊型肝炎病毒

陈万荣 田 辛 鲍作义 殷书荣

R37321

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

提 要

用Hep-G₂细胞从肠道传播的非甲非乙型肝炎(ET-NANBH)病人粪便悬液感染恒河猴的潜伏期粪便中分离出两株致细胞病变(CPE)的病毒(R₁, R₂)。用免疫电镜(IEM)观察, 这两株病毒均为球形, 有实心和空心两种颗粒, 直径约27—34nm, 能被新疆和前苏联ET-NANBH急性期血清特异性凝集, 病毒颗粒间抗体桥明显, ET-NANBH急性期血清对这两株病毒亦有一定中和作用, 内地甲肝(HA)病人和正常人血清既不能凝集, 也不能中和, 是否为ET-NANBH病原体尚待进一步鉴定。

关键词: 戊型肝炎病毒 实验动物感染 组织培养 病毒分离

ET-NANBH又称戊型肝炎(Hepatitis E-ET), 主要经粪—口途径传播, 近十多年里, 共报道了30多起HE暴发和流行, 均发生在亚洲、非洲和北美墨西哥, 我国新疆、山东和辽宁等地也发现多起疫情, 和其他病毒性肝炎一样, 也是危害人类健康及生命的重要传染病之一。近几年, 很多实验室对其病原体进行追索研究, 现已确定, 在HE病人潜伏期和急性期粪便、胆汁内发现的能被病人血清凝集的27—34nm球形病毒样颗粒是戊型肝炎病毒(HEV)。许多实验室用HE病人粪便感染动物获得成功, 但用细胞培养分离HEV, 至今未成功。我们用Hep-G₂细胞从实验感染动物的潜伏期粪便中分离到两株疑似HEV, 现将结果报告如下。

材 料 与 方 法

1. **接种材料** 用一例ET-NANBH病人的潜伏期粪便悬液感染的两只恒河猴(R₁, R₂)含有病毒颗粒的粪便悬液和肝组织悬液分别接种第二代恒河猴(R₁, R₂)。分别收集潜伏期粪便, 制成20%悬液, 经IEM检查, 发现能与HE病人血清反应的27—34nm球形颗粒, 悬液经微孔滤膜除菌, 置-80℃备用。

2. **血清** HE病人急性期血清于1987、1990年采自新疆和田和吐鲁番市。苏联HE病人血清是M. S. Balayan惠赠, 甲肝病人和正常人血清采自河北保定市。

本文于1992年5月16日收到, 8月4日修回。

3. 细胞 采用 Hep-G₂ 细胞等, 营养液为含 10% 小牛血清 MEM, 维持液含 2% 小牛血清 MEM。

4. 病毒分离 将细胞培养成致密单层, 接种标本前用 Hank's 液或 PBS 洗 3 次, 然后接种 20% 粪便提取液 0.6—1.0 mL/瓶, 37℃ 吸附 2—3 小时后加入维持液, 置 33℃ 静止培养, 3—4 天换液一次, 逐日观察 CPE。

5. 理化试验 按常规。

6. 中和试验 用稀释血清固定病毒的微量中和试验。将不同稀释度的血清与培养病毒 (100 TCID₅₀/0.1 ml) 等量混合, 33℃ 作用 60 分钟后接种细胞, 33℃ 5% CO₂ 箱培养。中和抗体滴定的计算是以保护细胞不产生 CPE 的血清稀释度。

7. IEM 传至 5 代的细胞, 反复冻化 4 次, 低速离心后取上清 1.0 mL 与 ET-NANBH 急性期血清 (1:100) 1.0 mL 混合, 37℃ 1 小时, 4℃ 过夜, 同时设甲肝和正常人血清同步作为对照, 次日制片染色, 电镜观察拍照。

结果与讨论

1. R₁₀, R₂₅ 恒河猴粪便悬液分别接种 Hep-G₂ 细胞后 9—11 天见到轻微的 CPE, 第二代 5—7 天 CPE 达卅—卅, 传至第五代 CPE 稳定, 病毒滴度达 10⁻⁴—10⁻⁷, -80℃



图 1 R₂₅ 病毒在 Hep-G₂ 细胞中 CPE (400X)

A. R₂₅ 病毒在 Hep-G₂ 细胞中感染 72 小时 CPE.

B. 正常 Hep-G₂ 细胞

FIG 1. CPE caused by R₂₅ virus in Hep-G₂ cell lines

A. CPE caused by R₂₅ virus strain in Hep-G₂ cell lines after 72 hrs inoculation

B. Normal Hep-G₂ cell lines

保存毒力较稳定。R₁₉、R₂₅病毒在Hep-G₂细胞的CPE特征为胞浆内有细小空泡, 细胞拉丝, 有的呈蝌蚪状, 最后细胞团缩逐渐脱落(图1)。接种乳鼠不发病。

2. 理化试验鉴定, 这两株病毒均为耐乙醚、耐酸、不耐热和对最终浓度为50μg/ml的5-氟脱氧尿苷不受抑制。说明R₁₉、R₂₅病毒属无包膜的耐乙醚、耐酸的RNA病毒。

3. 中和试验显示, 新疆和苏联HE病人血清对R₁₉、R₂₅均有明显的中和作用, 中和滴度达1:160—1:320, 而甲肝病人和正常人血清不能中和。用已知标准肠道病毒组合血清(28个型)均不能中和R₁₉、R₂₅病毒株。

4. IEM观察, R₁₉、R₂₅病毒均为球形、大小相似, 直径约27—34nm, 有实心和空心两种颗粒, 与HE病人粪便中见到的病毒颗粒相似, 这两株病毒均能被新疆和苏联HE病人急性期血清特异性凝集, 病毒颗粒间抗体桥明显, 用甲肝和正常人血清和R₁₉、R₂₅反应, 在电镜下看不到特异性凝集颗粒。

综合以上初步结果分析, 我们用Hep-G₂细胞从实验感染HEV第二代恒河猴的潜伏期粪便中分离到两株病毒(R₁₉、R₂₅), 从形态、大小和国外报道的HEV类似, 理化试验, 中和试验和免疫电镜结果表明, 这两株病毒至少在抗原性方面与HEV相关。但也尚不能排除已知其它肠道病毒的可能性, 是否为ET-NANBH病原体或是其它ET-NANBH病原体, 有待于用分子生物学技术等方法的进一步鉴定。

Isolation of Two Strains of Suspected Hepatitis E Virus from Infected Experimental Animal Stools

Chen Wanrong Tian Xin Bao Zuoyi Yin Shurong

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, 100071 Beijing)

The Hep-G₂ cell lines were inoculated for isolating HEV and two strain CPE Viruses (R19, R25) were isolated from experimental infected monkey's acute phase fecal. IEM revealed that the isolated two strain viruses could be aggregated by acute phase sera of ET-NANBH patients from Xinjiang and USSR respectively and there were obvious antibodies and full, spherical 27-34nm virus-like empty particles (VLPS). The two strain viruses could be neutralized by acute phase sera of HE patients. The sera of patients from inland area and of normal people could not aggregate and neutralize the two strain viruses. Whether the two strain viruses are HE etiologic agents should be investigated further.

Key words, Hepatitis E Virus Experimental infected primates
Tissue culture Isolating virus