

## 树鼩类-细小病毒的初步研究

吴小闲 蒋虹<sup>1</sup> 涂新明 张新生\* 施慧君

(中国医学科学院 中国协和医科大学实验动物研究所, 北京 100021)

<sup>1</sup>(成都军区后勤部军事医学研究所, 昆明 650032)

A

**摘要** 从树鼩肾细胞培养物中分离出3株病毒, 嗜在对数分裂期的 TL 细胞上复制, 产生细胞病变和血凝素抗原, 能凝集豚鼠和小鼠红细胞。交互血凝抑制实验表明3株病毒同属一个血清型。免疫酶染色显示抗原首先出现于细胞核。电镜观察负染标本病毒形态近似圆形和六角形, 无胞膜, 直径约 30 nm。血清学检查大多数树鼩血清中含有该病毒抗体, 证明是树鼩的一种潜在病毒。初步鉴定为类-细小病毒。

**关键词** 树鼩, 类-细小病毒, 病毒分离 ~~类-细小病毒~~

细小病毒(Parvovirus)广泛存在于各种属实验动物中, 导致持续性隐性感染或各种临床疾病, 致病性和危害性极大。并且能垂直传播, 抵御外界环境能力强, 给防治工作带来困难, 所以愈来愈受到兽医学家、动物病毒学家的关注。树鼩的病毒国内外已有所研究<sup>[1-4]</sup>, 但尚未见到属细小病毒的, 我们从树鼩肾细胞培养物中分离到3株类-细小病毒, 本文作一初步报道。

## 材料和方法

- 1 动物** 树鼩捕自云南省中部禄劝等县, 饲养于实验室动物房内。制备树鼩肺(TL)和肾(TK)细胞采用幼年或成年动物的组织<sup>[1]</sup>。
- 2 树鼩类-细小病毒(Tupaia Parvo-like Virus, 简称 TPLV)病毒液的制备** TPLV(血凝素滴度 1:32~1:128)接种于对数分裂期的 TL 细胞单层(或细胞悬液)病毒接种量为维持液的 1/10。第 3~4 天换液一次, 第 8~14 天细胞轻度病变(CPE)或无明显 CPE, 但有低滴度(1:2)的血凝素(HA), 将细胞消化传代, 细胞 2 d 长成单层, 3~4 d 出现 CPE 和 HA, 待 CPE 和 HA 达高峰时收获(一般在 4~6 d, HA 可达 1:128~1:256)。此病毒液用于以下各种实验。
- 3 TPLV 免疫血清的制备** 用本所 SPE C57/BL 和 BALB/C 小鼠。免疫用抗原为 PVLT 活病毒液, HA 滴度 1:128~1:256, 免疫剂量为 0.2 mL/ip, 间隔 1 周 1 次共 4 次, 末次免疫后 7 d 处死采血。血清血凝抑制(HI)滴度 1:80~1:160。
- 4 血清抗体检查** HI 实验用 4 个 HA 单位, 1.5% 豚鼠红细胞, 在室温进行。免疫酶染色法(IEA)用 TPLV 感染的 TL 细胞, CPE、HA 阳性时收获细胞涂片, 冷丙酮固定。第二抗体用 SPA-酶。
- 5 电镜观察** 含高滴度 HA 的 PVLT 病毒液, 经超速离心浓缩, 负染, 透射电镜观察。

## 结 果

## 1 树鼩类-细小病毒的发现

在制备和使用 TK 细胞培养物的过程中, 某些第二代的 TK 细胞培养物长成致密单层时出现圆形细胞病变, 迅即全部脱落。将这些培养物转种 TL 细胞, 培养 7~14 d, 部分细胞管细

胞出现退行性变,细胞面拉开,有圆形和不整形细胞,培养液能凝集豚鼠和小鼠红细胞,共获得3株病毒,分别名为TK16、TK20和TK21。

## 2 生物学特性

2.1 培养特性 在TK细胞上(无论细胞原含有病毒或用病毒液转种)部分细胞管(瓶)可出现一些圆形细胞病变或无明显细胞病变,迅即全部脱落,呈散在的悬浮细胞。培养液无可测出的HA。在TL细胞上,接种TPLV病毒液后,37℃培养7~14 d,约半数的细胞管(瓶)出现CPE和HA,无CPE的培养物也可测出低滴度HA。延长培养时间,因细胞自然退变未能获高滴度病毒。上述出现CPE和HA的细胞培养物(培养液和刮下或消化下来的细胞)再接种TL传代的细胞悬液中,细胞长成单层,至7~14 d出现CPE,HA可达1:128。另外,上述无CPE而有低滴度HA的细胞培养物,按常规消化传代,培养2~4 d,细胞长成单层并出现轻度CPE和低滴度HA,至5~6 d CPE加重,HA可达1:32~1:128。以上情况显示PVLV嗜对数分裂期细胞。

2.2 血凝试验 PVLV感染的TL细胞培养液能凝集豚鼠和小鼠红细胞(室温和4℃),滴度相近。不凝集人“O”型、鸡、大鼠和树鼯本身红细胞。HA在TL细胞培养液中的出现早于CPE,并随CPE的加重HA滴度上升。

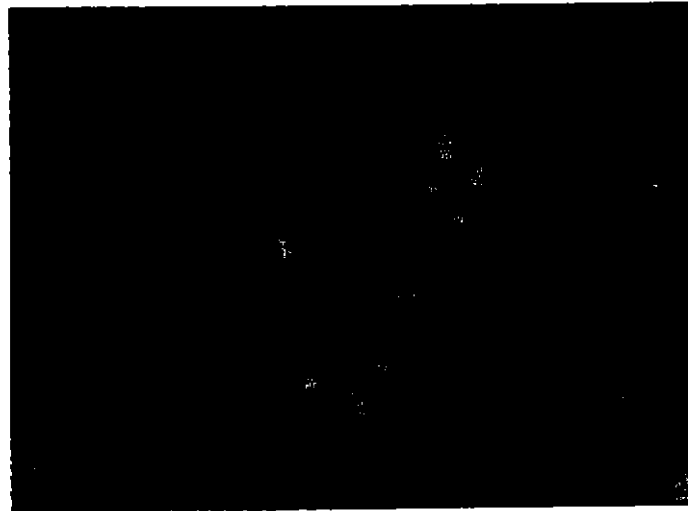
2.3 免疫酶染色检查 TPLV感染TL细胞后细胞内病毒抗原的出现情况 TPLV感染TL细胞后11 d,无CPE,HA 1:20阳性,消化细胞,接种小玻片,2 d细胞长成单层,收获玻片,4 d CPE“+”,HA 1:16阳性,4 d再收获玻片。检查结果,2 d的玻片只有少数细胞核染成棕色,胞浆无色,而4 d的玻片则见有些细胞只核内着色,有些核和浆均着色,有些只是胞浆内有色。表明病毒抗原先出现于核内,然后往外排出而形成各种抗原存在的形式(图1)。



图1 TPLV在TL细胞内抗原存在的形式 IE染色(×400)

Fig 1 Antigen of TPLV appeared in cells IE stain(×400)

2.4 电镜检查 检查了2株TPLV(TK16和TK21)的培养液的负染样品,均显示共同的形态学特征,见到直径约30 nm、无包膜的近似圆形病毒颗粒(图2),有些显示有角,其中一颗典型六角形。

图 2 TPLV 负染透射电镜图象( $\times 200000$ )Fig 2 TPLV negative stain EM( $\times 200000$ )

### 3 TPLV 交互 HI 实验

TK16 和 TK20 分别免疫小鼠获得的免疫血清与 3 株 TPLV 和大鼠细小病毒 KRV 和 H-1 株交互 HI 实验的结果(见表 1),表明 3 株 TPLV 为同一血清型,与大鼠细小病毒无交互反应。

### 4 树鼩 TPLV 血清抗体的检查

树鼩的血清采自从野外捕获到实验室 1 周内者,部分为在实验室饲养一段时间。HI 实验共检查了 78 份标本,其中 27 份同时用 IEA 法进行检查,结果见表 2。两种方法均检出树鼩血清普遍含有 TPLV 抗体,说明 TPLV 为树鼩的潜在病毒。

表 1 TK<sub>16</sub>、TK<sub>20</sub>、TK<sub>21</sub>和 KRV、H-1 的抗原相互关系Table 1 Relationship among TK<sub>16</sub>, TK<sub>20</sub>, TK<sub>21</sub>, and KRV, H-1

免疫血清 Immunized serum	抗原 Antigen				
	TK <sub>16</sub>	TK <sub>20</sub>	TK <sub>21</sub>	KRV	H-1
TK <sub>16</sub>	160*	160			
TK <sub>20</sub>		80	80	<10	<10
KRV		<10		160	<10
H-1		<10		<10	80

\* 抗体滴度的倒数 Reciprocal of antibody titers

表 2 树鼩 TPLV 血清抗体的检查

Table 2 Detection of TPLV serum antibody in tupaia

方法 Method	树鼩检查数 No. of tested tupaia	阳性数 No. of positive	阳性率 %	平均滴度 mean titer
HI	78	78	100.0	1:182
IEA	27	19	70.3	1:31.6

## 讨 论

电镜负染标本显示 TPLV 无包膜, 近似圆形或六角形, 直径约 30 nm。PVLT 嗜在 TL 对数分裂期细胞上复制, 产生 HA, 能凝集豚鼠和小鼠红细胞。病毒抗原首先出现于细胞核, 说明 PVLT 在核内复制。以上这些特性均为细小病毒属的病毒所具有, 故初步鉴定 PVLT 为类-细小病毒。细小病毒分布广, 各种动物均有其本种属的细小病毒, 有不同的致病性。例如: 狗细小病毒引起狗肠炎, 成为狗最常见而又危害大的疾病。猫细小病毒引起猫泛白细胞减少症, 发生全身症状, 死亡率高。大、小鼠的细小病毒常为潜在感染的病毒。本属病毒因能垂直传播, 常引起不孕、胚胎死亡、畸形等种种危害。PVLT 对树鼩的致病性和危害性问题, 尚待进一步观察。

## 参 考 文 献

- 1 吴小闲, 唐恩华, 谢广珍等. 树鼩疱疹病毒的研究 I 病毒分离、生物学性状和血清学研究, 中华微生物免疫学杂志, 1983, 3(1): 33~36
- 2 吴小闲, 唐恩华, 张新生等. 树鼩腺病毒(I和II型)的生物学性状、抗原关系和血清抗体的研究. 中国医学科学院学报, 1990, 12(2): 153~156
- 3 Kurz W, Gelderblom H, Flugel R M *et al.* Isolation and characterization of a tupaia rhabdovirus. Intervirology, 1986, 25: 88~94
- 4 Dara C, Kurz W, Flugel R M *et al.* Isolation and preliminary characterization of tree shrew paramyxovirus. Primatology, 1982, 3: 273~278.

## Preliminary Report of Parvovirus-like Virus in *Tupaia belangeri* (Tree Shrew)

Wu Xiaoxian Jiang Hong Tu Xinming *et al*

(Institute of Laboratory Animal Science, CAMS  
Faculty of Laboratory Animal Science, PUMC, Beijing 100021)

Three viruses were isolated from the kidney cell culture of *Tupaia belangeri* (tree shrew). They would like to replicate in mitosis of TL cells, to produce CPE and hemagglutinin and to hemagglutinate the erythrocytes of guinea pig and mouse. The viruses belong to one serum type by hemagglutination inhibition test. The virus antigen appeared first at the nuclei by immunoenzymatic stain. The morphology of the virus was similar to round and hexagonal without capsule, diameter 30 nm by negative stain under electron microscope. Most number of sera in tree shrews appeared the virus antibody by serological assay. It was proved that the virus was a latent virus in tree shrews and identified preliminarily as parvo-like virus.

**Key words** Parvovirus; *Tupaia belangeri*; Viral isolation