

HFRSV 在平皿表面室温暴露后存活力的定量研究*

李军保 孟令英¹ 周煜 姜黎 阮建春 车凤翔

(军事医学科学院微生物流行病研究所, 北京 100071)

R373.32

摘要 将肾综合症出血热病毒布于玻璃平皿表面, 室温条件下分别暴露 0、30、60、90 和 120 min, 观察病毒的定量存活情况。结果在经过 120 min 的暴露后, HFRSV 的效价仍高达 $10^{4.33}$ TCID₅₀。这一结果为 HFRS 的流行病学及其防治研究提供了重要的基础数据。

关键词 肾综合症出血热病毒、存活力、定量研究 HFRSV

肾综合症出血热(HFRS)是世界性的重要传染病, 每年发病人数 20 多万。我国 1931 年以来累计登记发病人数 100 万有余, 最高年发病人数达到 10 多万人, 至今仍维持 5 万左右的年发病人数^[1]。尽管各国专家就该病病原学、流行病等许多方面进行了大量卓有成效的工作, 但仍有许多环节还有待我们继续研究, 如病原体本身及其在自然界的存活力就是影响其传播、流行的重要一环。就病原体室温暴露后本身的存活能力, 我们进行了一些初步的定量研究, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

所用实验材料包括: Vero-E₆ 细胞, 第 21 代 HFRSV H8205 株乳小白鼠脑悬液, 羊抗鼠荧光血清抗体 FITC 结合物, 1640 细胞培养液和无菌玻璃平皿。

1.2 实验方法

1.2.1 TCID₅₀测定法 将病毒悬液用 1640 生长液作 10 倍系列稀释, 每个稀释度接种 4 支培养管, 每管 0.1 mL, 另外设一管正常对照、一管阳性对照, 接种后的培养物在最适条件下培养 8 d 后, 用间接荧光法检测并计算结果。

1.2.2 HFRSV 悬液的制备及效价测定 用第 21 代感染 HFRSV 的乳小白鼠脑悬液制成了 10^{-2} 浓度的储备液, -75°C 冻存储备。实验当日取冻存液进行 TCID₅₀测定及进行暴露试验。

1.2.3 病毒的暴露方法 无菌玻璃平皿 5 个, 每个平皿表面滴加 10^{-2} 浓度的感染 HFRSV 乳小白鼠脑悬液 0.2 mL, 并用 L 棒涂匀, 室温条件下(温度 27.5°C , 湿球 25.2°C , RH82%)放置 0、30、60、90、120 min 后, 分别用吸管回收于 20 mL 的 5 个大试管中, 再分别用吸管以 1640 细胞培养液 1.8 mL 反复洗涤 5 个小平皿后加入各自对应的大试管中, 混匀后每个试管取其中液体 2 mL 作 10 倍系列稀释($10^{-7} \sim 10^{-12}$), 按上述方法对鼠脑悬液和回收液进行 TCID₅₀测定。

1.2.4 玻璃平皿表面病毒回收率的测定 以 0 min 回收液中 HFRSV 效价除以暴露前 HFRSV 悬液的效价乘以 100%, 即为玻璃平皿表面病毒回收率。

收稿日期: 1998-07-19, 修回日期: 1998-07-19

* 本研究系国家自然科学基金委员会资助项目

2 结果

2.1 HFRSV 悬液暴露前效价的测定

HFRSV 悬液暴露前效价测定结果见表 1。暴露悬液 HFRSV 的效价高达 $10^{9.77}$ TCID₅₀。

表 1 HFRSV 悬液暴露前 TCID₅₀ 测定结果

Table 1 Measured results of HFRSV TCID₅₀

病毒稀释度 Dilution titer	感染细胞分布		累 计		
	Distribution of infection Cell		Cumulation		
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性比 Positive ratio
10^{-1}	4	0	13	0	13/13
10^{-2}	4	0	9	0	9/9
10^{-3}	3	1	5	1	5/6
10^{-4}	2	2	2	3	2/5
10^{-5}	0	4	0	7	0/7
10^{-6}	0	4	0	11	0/11

按 Reed-Muench 法^[2]计算, TCID₅₀ 为 $10^{9.77}$ ($5.88 \cdot 10^9$)。

According to method of Reed-Muench TCID₅₀ = $10^{9.77}$ ($5.88 \cdot 10^9$)

2.2 室温暴露后玻璃平皿表面 HFRSV 的存活情况

HFRSV 在玻璃平皿表面暴露不同时间后病毒的存活情况如表 2 所示。经过 120 min 的暴露, 悬液中病毒含量仍可高达 $10^{4.23}$ TCID₅₀。

表 2 暴露不同时间后 HFRSV 效价测定结果

Table 2 Survival of HFRSV on the surface of glass plate

暴露时间 Exposure time (min)	病毒效价 Virus titer (TCID ₅₀)
0	$10^{9.50}$
30	$10^{7.50}$
60	$10^{6.50}$
90	$10^{5.17}$
120	$10^{4.23}$

图 1 显示了暴露 0~120 min 期间病毒存活的变化趋势, 经过回归分析, 其回归方程(如图 1 所示)的 $R^2 = 0.996$, 说明曲线拟合度甚好。可以看出在 0~30 min 和 90 min 后存在两个明显的病毒快速衰亡期, 而 30~90 min 期间病毒的衰亡相对较慢。

2.3 玻璃平皿表面的病毒回收率

$$\begin{aligned} \text{回收率} &= 0 \text{ 分钟回收液中病毒效价} \div \text{样品中病毒效价} \cdot 100\% \\ &= 3.162\ 277\ 660.17 \div 5.878\ 016\ 072.27 \cdot 100\% \\ &= 53.798\ 4\% \end{aligned}$$

3 讨论

迄今, 肾综合征出血热的流行趋势仍未能得到有效控制。1994 年美国 17 个州发生 68 例

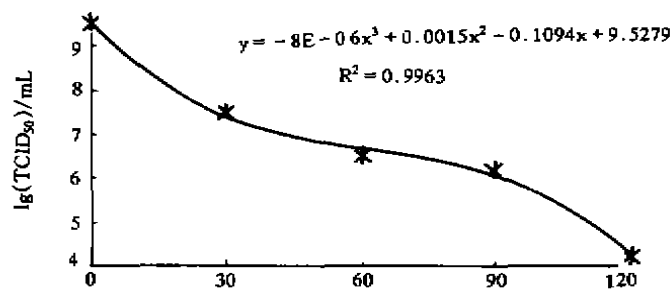


图 1 HFRSV 不同时间的存活情况

Fig. 1 Survival variation of HFRSV

HFRS 病人, 死亡率高达 60% 左右。我国年发病人数仍徘徊在 5 万左右。1995 年继续保持广泛存在和局部高发的态势, 达到了 90 年代流行的高峰期, 疫情波及 1 000 多个县区, 发病率居高不下, 严重威胁着我国人民的生命健康。肾综合症出血热的传播途径较多, 但病毒能在外界存活一定时间, 是多种途径传播的必要条件之一。肾综合症出血热病毒的存活能力严重影响其接触传播、呼吸道传播、消化道传播的能力。

宋干等报道在实验条件下 HFRSV 对热、紫外线、乙醚等均敏感。张云等^[3]报道 HFRSV 阳性鼠血、粪、尿污染布片、纸片和草屑后在 4℃ 48 h、15℃ 24 h 均能使小白鼠乳鼠感染, 在 4℃、15℃ 48 h、25℃ 24 h 能检出 HFRSV 抗原。蔡增林等^[4]报道, 一般室温条件下, HFRSV 在水中及部分食物中(米饭、馒头)可存活 48 h 并仍有传染性。

尽管已经进行了这样一些卓有成效的研究工作, 但由于种种原因, 对本病病原体存活能力的定量研究却极少报道^[5]。本研究利用第 21 代感染 HFRSV 的乳小白鼠脑悬液(每毫升原液含 109.77 TCID₅₀), 进行了玻璃平皿表面 HFRSV 的回收率测定及其在室温条件下的存活力的定量研究, 在经过 120 min 的暴露后, 病毒效价仍高达 104.23 TCID₅₀, 而明显存在 0~30 min 和 90 min 后两个病毒快速衰亡期, 这一结果如果能得到进一步的实验验证, 对流行病学研究可能会有重要的参考意义。至于该病毒在自然界液体中、气溶胶中及干燥状态下最长能够存活多久, 至今仍然未知, 但已有报道其传染性可在中性溶液 37℃ 中维持数小时、低温下维持几天和干的细胞培养基中维持 2 d(Huggins, 未发表, 1994)。我们的另一项研究也证明在温度 18.63℃, 相对湿度 17.28%, 累积光照量 120 卡条件下, 本病原体在鼠粪尿中仍可存活 106 min 以上。但同时我们也发现, 病毒置于鼠粪尿之后; 尽管其效价仍在 10²~10⁴ TCID₅₀ 之间, 但毒力却明显降低, 乳小白鼠脑腔接种原液只有部分乳小白鼠死亡, 其稀释液仅有个别小鼠死亡。与其母液 MIC LD₅₀ 为 0.67 pfu/mouse 比较, 出现了明显的存活力和毒力分离现象。这一现象再次提示我们在进行有关病毒毒力研究时, 必须考虑其毒力和存活力分离的可能, 绝对不能简单地以病毒存活力的高低代表其毒力。

参 考 文 献

- 1 车凤翔, 何亦祥, 李钟铎等. 肾综合症出血热的传播及预防. 第一版, 北京: 中国大百科全书出版社, 1996, 1~2

- 2 黄植祥, 洪涛, 刘崇柏等. 医学病毒学基础及实验材料. 北京: 科学出版社, 1990: 130
- 3 张云, 张炳根, 赵学忠等. 流行性出血热抗原在外环境中抗原性和感染性的实验观察. 解放军预防医学杂志, 1990, 8(1): 21~26
- 4 蔡增林, 何亦祥, 温青莉等. 流行性出血热病毒在水和食物中存活时间的实验观察. 沈阳部队医药, 1991, 4(6): 458~459
- 5 Lee HW, Baek LJ, Seong IW *et al.* Physico-chemical properties of Hantaan virus, II: The effect of temperature and pH on infectivity of Hantaan virus. J Korean Soc Virol, 1983, 13: 23

The Quantitative Study of Survival of HFRSV on Surface of Glass Plate

Li Junbao Meng Lingying Zhou Yu Jiang Li
Lu Jianchun Cheng Fengxiang

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Military Medicine Academy, Beijing 100071*)

Abstract The hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Virus was exposed 0, 30, 60, 90, 120 minutes respectively on the surface of glass plate in the natural condition of indoor (dry bulb temperature: 27.5 °C, wet bulb temperature: 25.2 °C, RH 82%). The survival of them was observed although virus was exposed up to 120 minutes, the potency of HFRSV still reach the level of 10^4 23 TCID₅₀. The work has provided scientific data for the study of epidemiology of HFRS and etiology about HFRSV.

Key words Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Virus, Survival, Quantitative study