

从轻型出血热疫区的褐家鼠分离到与流行性出血热有关的病原因子

宋 干¹ 杭长寿¹ 廖化新¹ 裘学昭² 高广忠¹ 杜永林²
赵君能³ 徐剑钺² 孔碧霞⁴

(中国医学科学院病毒研究所, 北京)

从轻型出血热疫区的褐家鼠肺组织, 用非疫区黑线姬鼠和 E-6 细胞同时分离到与 EHF 相关的轻型出血热的病原因子, 进一步证实褐家鼠为轻型出血热病原的一种重要宿主动物。并证明 E-6 细胞可用来直接从轻型出血热原始标本分离病毒, 为该病病原学诊断、流行病学调查提供了一个简便而又比较安全的试验手段。

流行性出血热(EHF)是由黑线姬鼠等野鼠为其主要传染源的自然疫源性疾, 一般疫区均未发现家鼠在该病传播中有任何明显作用^[1]。日本大阪市中心区曾连续多年发生流行性出血热, 据推测其宿主动物是大家鼠^[2], 但迄今尚缺少病原学证据。

1981 年春, 我国河南省和山西省一些地区暴发一种类似流行性出血热的疾病流行, 经血清学检查证明其病原与流行性出血热病毒相近或一致, 褐家鼠可能为其重要的宿主动物^[3]。为进一步确定褐家鼠与该病传播的关系, 我们用非疫区黑线姬鼠和绿猴肾传代细胞, 从褐家鼠进行病毒分离, 现将分离和鉴定结果简要报告如下。

材料和方法

黑线姬鼠 (*Apodemus agrarius*): 来自陕西省汉中地区 (EHF 非疫区), 由陕西省卫生防疫站提供。

绿猴肾细胞: Vero 细胞, E-6 纯化系(下简称 E-6 细胞), 由美国疾病控制中心 J. B. McCormick 博士惠赠, 朱既明教授提供。

分离标本: 病褐家鼠肺标本 (R_1 及 R_{22}) 由洛阳地区防疫站提供, 经用 EHF 恢复期血清免

疫荧光检查阳性者。

血清: 检测褐家鼠肺 EHF 相关抗原所用 EHF 患者血清采自江苏省丹阳县疫区患者。患者双份血清分别采自江苏及陕西省疫区 (由陕西省防疫站提供) 患者, 以及河南省洛阳地区轻型出血热患者 (由洛阳市防疫站提供)。

分离方法

1. 用黑线姬鼠分离: 鼠肺经剪碎在乳钵内研磨后, 用含 10% 脱脂牛奶 Eagle 氏 MEM 液 (加青霉素 500 单位/ml, 链霉素 500 μ g/ml) 制成 10% 悬液, 3000rpm 离心后, 取上清液, 稀释成 5% 后, 皮下和腹腔联合接种黑线姬鼠, 接种量分别为 0.2ml 及 0.3ml, 间隔 20 天传代一次。

2. 用 E-6 细胞分离病毒: 取上述鼠肺悬液稀释成 0.5×10^{-2} , 接种小方瓶单层细胞, 每瓶 1ml。置 37℃ 吸附 1 小时后, 补加维持液 4ml, 再置 36℃ 培养。每 2—3 天换液一次, 每 2 周左右用 Versene (乙二胺四乙酸二钠) 消化细胞, 分装传代一次。每次传代均取消化的分散细胞涂片作免疫荧光染色观察。

间接免疫荧光法 (IFA): 同前一报告^[4]

本文于 1982 年 5 月 14 日收到。

1. 中国医科院病毒研究所; 2. 江苏省防疫站; 3. 江苏省镇江地区防疫站; 4. 江苏省丹阳县防疫站。

结 果

一、病毒的分离

用对 EHF 恢复期血清反应阳性褐家鼠肺标本 R_1 及 R_{27} , 分别接种非疫区黑线姬鼠及绿猴肾细胞 (E-6 细胞) 传代, 各获得一株与 EHF 有关的病原因子。各代检查结果见表 1。

表 1 从轻型出血热疫区褐家鼠肺 (EHF 免疫荧光阳性) 分离病毒

Table 1 Isolation of virus from the lung tissues of *Rattus norvegicus* captured from endemic area of mild type hemorrhagic fever

代 次 Passage	E-6 细胞 (R_{27}) E-6 cells (R_{27})	黑线姬鼠 (IFA 阳性数/接种动物数) <i>Apodemus agrarius</i> (Number of positive/number of inoculated animal)
1	—	2/4
2	—	2/3*
3	+	3/5
4	+	2/4
5	++++	
6	++++	
7	++++**	
8	++++	

* 1 只接种鼠非特异性死亡, 未计入

One inoculated animal died nonspecifically, not included.

** 病毒滴度 ($TCID_{50}/ml$) 为 $10^{5.33}$

Virus titer ($TCID_{50}/ml$), $10^{5.33}$

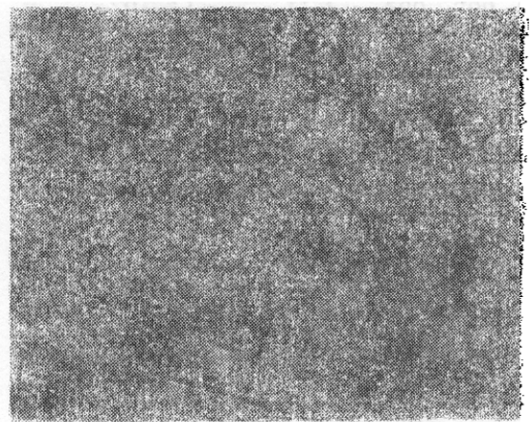
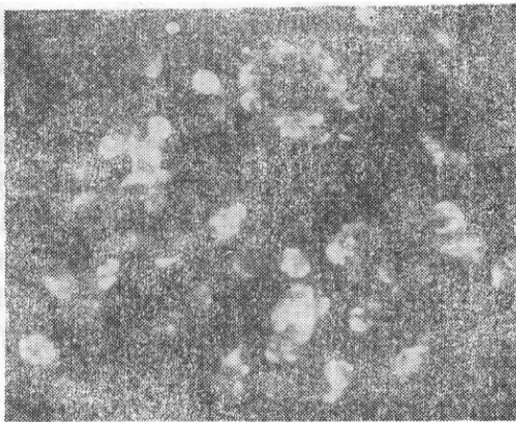


图 1 免疫荧光染色结果

左: 阳性(感染 E-6 细胞涂片, EHF 病人血清 1:40, $\times 320$) 右: 阴性(同上, 但用正常人血清)

Fig. 1 Indirect immunofluorescent staining, positive result (infected E-6 cells, spot cell slide, EHF patient serum, 1:40, $\times 320$) (left); negative control (same as the left except with normal human serum) (right).

此外,用 R_1 鼠肺标本在 E-6 细胞重复分离,亦获得阳性结果。

二、血清学鉴定

取轻型出血热与流行性出血热患者双份血清,用 E-6 细胞分离的病毒株 R_{27} 株 ($R_{27}E_6P_7$) 与对 E-6 细胞适应的 EHF 病毒 A_1 株细胞抗原 ($A_1E_6P_7$) 及其黑线姬鼠传代株鼠肺切片抗原 ($A_1A_2P_{11}$) 进行比较,结果见表 2。

从表 2 可见,10 例患者(包括洛阳市轻型患者 3 例,江苏及陕西省 EHF 患者 7 例)的双份血清,用 3 种病毒抗原检出的抗体滴度基本一致。唯用 $R_{27}E_6$ 株抗原查出的血清滴度有时偏低,尤其早期血清,而黑线姬鼠肺组织 A_1 株抗原检出的抗体滴度又偏高,差异最大为 16 倍,但也有滴度相同的。因此,尚不足以说明其间存在抗原性上的明显差异。

表 2 EHF 相关病毒 ($R_{27}E_6$ 株) 抗原性检查(与两株 EHF 病毒 A_1A_2 株及 A_1E_6 株比较)

Table 2 Antigenic identification of EHF-related virus-comparisons with two strains of EHF virus (A_1A_2 and A_1E_6 strains)

血 清 Sera		用不同抗原检测出血清抗体滴度* Antibody titers obtained with different antigens*		
患 者 Patient	份 次 Phase	$R_{27}E_6P_7$	$A_1E_6P_7$	$A_1A_2P_{11}$
洛 7	1	20	80	320
	2	1280	1280	1280
洛 19	1	20	80	320
	2	320	1280	≥ 5120
洛 33	1	320	1280	1280
	2	1280	≥ 5120	≥ 5120
陕毛	1	1280	≥ 5120	≥ 5120
	2	≥ 5120	≥ 5120	≥ 5120
陕张	1	80	320	320
	2	≥ 5120	≥ 5120	≥ 5120
丹 31	1	320	—	—
	2	≥ 5120	≥ 5120	≥ 5120
丹 32	1	80	1280	1280
	2	1280	≥ 5120	≥ 5120
丹 38	1	320	1280	1280
	2	1280	≥ 5120	≥ 5120
丹 40	1	1280	1280	≥ 5120
	2	≥ 5120	≥ 5120	≥ 5120
丹 50	1	80	320	1280
	2	1280	≥ 5120	≥ 5120

* 以呈现免疫荧光反应阳性的最高血清稀释度的倒数表示。

Reciprocal of the highest serum dilution showed obvious positive immunofluorescence.

此外,用山羊抗呼肠孤病毒 1—3 型多价血清进行阻断试验及用国内从野鼠分离的呼肠孤病毒 1 型及类环状病毒 (8026 株) 抗血清对照试验均为阴性,可初步排除呼肠孤病毒等污染的可能。

讨 论

从轻型出血热疫区捕捉的第一批褐家鼠鼠肺组织检查到 EHF 相关抗原,而且阳性率较高;经用褐家鼠肺 EHF 相关抗原与

EHF 病毒黑线姬鼠肺抗原对比检查一批 EHF 及轻型出血热患者恢复期血清,所测出抗体的滴度相似;证明褐家鼠肺抗原是轻型出血热的特异性抗原,在抗原性上与 EHF 病毒抗原很相近^[3]。此次从疫区褐家鼠肺分离到出血热病毒,为褐家鼠在当地作为轻型出血热的宿主动物进一步提供了直接证据。在不同地区的两个实验室用不同宿主系统同时分离到病毒,而用于黑线姬鼠分离出病毒的褐家鼠肺悬液(R₁) 在 E-6 细胞上重复分离亦获成功,说明所分离的病毒来源于褐家鼠,而非其它实验所污染。

国外曾将 KHF 病毒适应到 Vero、E-6 系细胞培养,我们也成功地将用黑线姬鼠分离的几株病毒全部适应到该细胞培养,证明该细胞对 EHF 病毒有很好的敏感性^[5],而用该细胞直接从褐家鼠原始肺悬液比较容易地分离到病毒,进一步证明该细胞的敏感性。用细胞培养直接分离 EHF 病毒或相关因子,国内外尚未见报道,这一分离病毒方法的建立将为 EHF 及轻型出血热的病原学及血清流行病学调查提供一个简便而又比较安全的试验手段。

1960 年起日本大阪市发生的城市型流行性出血热,据认为大家鼠(褐家鼠和黑家鼠)为病原体的携带者^[2],而近年李镐汪等又证实南朝鲜汉城亦存在以大家鼠为宿

主动物的 KHF 城市型发病,据称从当地大家鼠查到 KHF 抗原和抗体^[6]。日本滨田忠弥亦曾从在新潟海港码头捕捉的褐家鼠血清查见 KHF 抗体(3/15)^[7]。我国迄今尚未证实有城市 EHF 发生,个别地区曾提及 EHF 流行与褐家鼠可能有关。因此,对褐家鼠在 EHF 传布中的作用不应忽视。我国发现轻型出血热的地区黑线姬鼠很少,据山西该病疫区的鼠密度调查未捕到黑线姬鼠,而褐家鼠在家鼠(占 97.6%)及野鼠(占 63.2%)中均为优势鼠种。而且轻型出血热在个别城市也有发生,这与在日本发生的城市型病情较轻及由大家鼠传布相似,很可能它代表了发生在我国的流行性出血热的城市型,值得进一步研究。褐家鼠易于由轮船及火车等交通工具远处携带,证实褐家鼠是轻型出血热的宿主动物,在该病预防上有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 宋干:流行性出血热(有肾综合症)载“流行病学”(耿贯一主编),下册,人民卫生出版社,北京,1980 年,第 59 页。
- [2] Yamura M.: Biken J. 7: 79, 1964.
- [3] 杭长寿等:中华流行病学杂志 3(4): 1982.
- [4] 宋干等:中国医学科学院学报,4: 73, 1982.
- [5] 宋干等:中华微生物和免疫学杂志,2: 1982.
- [6] Lee, P. W.: Report in “Working Group on Hemorrhagic Fevers with Renal Syndrome” WHO, Regional Office for the Western Pacific, Tokyo, Japan, 22-24 Feb. 1982.
- [7] Oya, A.: *ibid.*

ISOLATION OF EHF-RELATED AGENT FROM *RATTUS NORVEGICUS* CAPTURED FROM PATIENTS' HOME IN ENDEMIC AREA OF THE MILD TYPE OF HEMORRHAGIC FEVER

Song Gan¹ Hang Changshou¹ Liao Huaxin¹ Qiu Xuezhao¹
Gao Guangzhong¹ Du Yonglin² Zhao Junneng³ Xu Jiankun² Kong Bixia⁴

EHF-related agent of the mild type of hemorrhagic fever was isolated from *Rattus norvegicus* captured from patients, home in endemic area. This study demonstrated further that *R. norvegicus* is its important reservoir host. It was also shown that E-6 cells can be used for direct isolation of the etiologic agent of the disease from rodent specimens, possibly also for the direct isolation of EHF virus. This technique will provide a simple and much

safer laboratory tool for the etiologic diagnosis and seroepidemiologic studies.

1. Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing.
2. Jiangsu Provincial Health and Antiepidemic Station, Nanjing.
3. Health and Antiepidemic Station of Zhenjiang District.
4. Health and Antiepidemic Station of Danyang County, Jiangsu Province.