



流行性出血热病原学和血清流行病学研究进展

中国医学科学院病毒学研究所 宋 干 杭长寿

流行性出血热是由某些小型啮齿动物携带的一种病毒引起人类的一种急性传染病。长期来因病原分离未成功,影响对其传播机理等一系列问题的解决。自1978年李镐汪等〔1〕用黑线姬鼠分离到朝鲜出血热病毒后,本病的病原学和血清流行病学研究有了较快发展。下面仅就这两方面的研究进展作一简要综述。

病原学方面的研究进展

国外在四十年代初已证明本病的病原是一种病毒。经过近40年的研究,也曾有过几次分离到病毒的报导,但都未能继续传代和重复验证而失败。关键是没有找到适当的分离培养和检查的方法。李镐汪(1978)〔1〕成功地采用非疫区黑线姬鼠传代及用间接免疫荧光法检查分离到朝鲜出血热病毒,这是一个重大的突破。虽然这一工作得到大家的公认,但因尚未在电镜下观察到一定形态的病毒颗粒,故本病毒的分离还不能说已完全解决。

一、相关抗原的发现: 李镐汪等研究本病病毒的分离是从调查疫区黑线姬鼠内脏携带本病相关抗原开始的〔2〕。先是以恢复期患者混合血清做抗体,用间接免疫荧光法检查黑线姬鼠某些内脏和腺体组织,发现肺、肾(主要在肺)等组织中含有对本病恢复期血清发生免疫荧光反应的抗原。即用这种抗原(冰冻肺组织切片)检查患者的双份血清抗体滴度变化以确定其特异性〔1,2〕。1974年普查424份黑线姬鼠不同内脏标本中,88份阳性,经进一步检查证明14份为特异性抗原(9肺、5肾)。1975年普查913份标本中,125份阳性,其中18份证明为特异性抗原〔1〕。可以看出,用混合的恢复期患者血清做调查存在大量的非特异性荧光反应。其后作者用一单份高滴度的患者恢复期血清(1:2048)检查了520只黑线姬鼠标本,73只阳性,而6种其他野鼠共195只全为阴性〔1〕。他们进一步证明,这一抗原是一种可增殖的病毒,定名为“朝鲜出血热病毒”或称Hantaan病毒〔8〕。

我国李法卿等〔3〕应用直接免疫荧光法发现黑线

姬鼠血液白细胞和本病患者血、尿白细胞含有对患者恢复期血清荧光结合物发生荧光反应的相关抗原。检查疫区黑线姬鼠530只,阳性率为11.13%,75例早期(2~5病日)患者血液,阳性率达81.33%,而疫区褐家鼠37只、非疫区黑线姬鼠84只、黑线仓鼠35只和非疫区健康人血液315份均为阴性。而后〔21〕他们用非疫区黑线姬鼠及豚鼠分离病毒,第1代147只黑线姬鼠中有135只获得感染,21只豚鼠中10只获得感染,并在黑线姬鼠中传了8~15代。张越等〔22〕进一步用直接免疫荧光作指标,用黑线姬鼠乳鼠肾原代细胞和仔猪肾传代细胞交替传代分离到3株病毒,但在仔猪肾传代细胞第9代时转为阴性。此外,安徽〔25〕、湖北〔19〕、江苏〔4〕等地区的一些单位,先后用补体结合,琼脂扩散及对流免疫电泳等方法也证明在疫区黑线姬鼠中确实携带有本病的相关抗原。上述这些工作虽在可靠性上尚需进一步证实,然而它们已为我们从疫区黑线姬鼠中来分离本病病毒建立了必要的信念。

二、朝鲜出血热病毒的分离及定性: 流行病学研究早已指出,黑线姬鼠是本病的主要宿主动物,但证实它能用来分离病毒、并在其感染后无任何症状和病理改变的情况下,找到一种检测病毒增殖的方法是李镐汪等在前述工作的基础上解决的〔1,2〕。分离标本采用疫区黑线姬鼠肺脏经免疫荧光选择对恢复期患者血清反应阳性者;实验动物为来非疫区(朝鲜半岛南面的济州岛)的黑线姬鼠朝鲜亚种;接种途径为肺内或皮下。黑线姬鼠感染后不表现任何症状,10天后在其肺泡上皮细胞内可见病毒抗原,20天查到最大量抗原,以后逐渐减少,但60天后仍可能查到。在黑线姬鼠传到第7代时,病毒就能稳定传代,随传代次数增加病毒滴度也逐渐增高(可达 $10^6 \sim 10^7$)。

本病毒可通过0.05~0.1微米(μ)的微孔滤器〔1〕。在电镜下曾观察到直径为50nm的球形病毒样颗粒,呈结晶形排列〔5〕,但这一工作未得到证实。有资料表明〔6〕,此种结晶形排列的病毒样颗粒是Ⅱ型

肺上皮细胞板形小体所分泌的管形髓磷脂,是维持肺脏生理功能的一种正常物质,其横断面的电镜图象呈颗粒形或方体形,此为李等误为病毒颗粒。这种形态的物质在正常大白鼠和黑线姬鼠同样可以观察到。从1978年分离到病毒以来仍未观察到明确形态的病毒颗粒,这是一个难以解释的问题。即使是目前病毒已适应在A549细胞培养,尽管培养物荧光抗体反应很明显,也不能在电镜下看到病毒颗粒。据介绍(Eddy, 1980)〔8〕细胞培养物经浓缩处理后可见到少数直径为80~90nm的病毒样颗粒,有称(李镐汪)曾看到75nm大小的病毒样颗粒。看来,国外对这一问题也未最后确定。

病毒可能对外环境的抵抗力较强,但至今还缺少实验证据。目前只知其对脂溶剂(乙醚、氯仿)敏感,对酸($\text{pH} \leq 5$)不稳定〔7〕。

病毒经多种途径(肌肉、皮下、肺内、鼻内、口)均可使黑线姬鼠感染〔4,8,13〕,但经口及鼻内感染产生的病毒血症滴度较低。肌肉注射后第7天起出现病毒血症,持续约一周,约三周后出现免疫荧光抗体和中和抗体。从其肺、肝、脾、肾及唾液腺均可分离到病毒,在感染后一年内还可从其肺中查到病毒抗原,血中可查见免疫复合物。

李平佑等(1981)〔9〕成功地将朝鲜出血热病毒适应到Wistar和Fisher种大白鼠中传代培养。方法是在接种病毒悬液后,间隔20天左右用间接免疫荧光法检查抗体阳性鼠的肺悬液进行传代。开始大白鼠肺内查不到抗原,仅部分大白鼠产生抗体,适应到第4代后感染的动物全部产生抗体,滴度从1:512~1:4096。第6代时,在感染的6只大白鼠中有1只肺中查到抗原,第7代起所有大白鼠中均能查到抗原。此时在肾、肝、脾及颌下腺组织中也能查见抗原,最强的免疫荧光见于肺及脾。从大白鼠脾中较多查见抗原,这与黑线姬鼠传代中不同。可以看出,大白鼠适应传代包括抗体产生能力和病毒繁殖能力两个方面,前者需4代,而后者需7代。大白鼠肺切片抗原由病毒免疫复合物产生的背景染色比黑线姬鼠肺切片少,此点有利于抗体检查。

除了对黑线姬鼠有感染性和在大白鼠获得传代适应外,本病毒对其他动物是否也能获得类似的结果,尚需做更多的工作。但至少有些动物在感染后可产生抗体,如家兔、猴和狒狒等〔7〕。家兔感染后7天开始出现抗体,14天滴度最高,60天后缓慢下降。制备抗血

清以家兔最好,大白鼠其次,豚鼠最次〔8〕。皮下注射一针(1000ID₅₀)即可产生高效价抗体(1:5000以上)。南美洲的鼠猴(Squirrel Monkeys)对朝鲜出血热病毒有一定敏感性,感染后有发烧、脸红、肾充血及蛋白尿,认为有可能作为一种实验动物模型〔8〕。

最近, French等〔7〕已将朝鲜出血热病毒适应到人肺癌传代细胞A549中。作者用一批感染的黑线姬鼠肺组织混合制成悬液,接种18种原代、双倍体及传代细胞,只有感染的A549细胞能重复查出特异性免疫荧光抗原。荧光灶最早出现于接种后第12天,此时整个细胞内分布有散在的细针尖状荧光颗粒,随后荧光颗粒增多,亮度增加,传至第6代时,100%细胞感染,出现荧光的时间也缩短至3天。感染的细胞不产生细胞病变和包涵体,仍能正常分裂,不丧失其特异性荧光,并至少保持100天。大剂量感染(即保证每个细胞感染),能获最大量病毒产值。A549细胞感染后虽能产生蚀斑,但因蚀斑不清晰,不能用于病毒的定量测定。

本病毒在感染动物细胞内的定位问题,据免疫荧光及免疫酶染色观察〔1,2〕,病毒抗原出现在感染动物肺泡上皮细胞的胞浆内; Brummer-Korvenkontio等〔10〕应用与李镐汪等相似的方法在芬兰疫区捕到的欧洲棕背鼯肺内,除肺泡上皮细胞外,在巨噬细胞样细胞的胞浆内也查见流行性肾病的免疫荧光抗原。李法卿等〔3〕还发现在疫区黑线姬鼠及患者急性期血、尿白细胞内有病毒抗原,说明本病毒不仅定位在肺泡上皮细胞中,还有可能在别的细胞中定位繁殖。

据李镐汪等〔1〕研究,患者发病后最早出现IgM抗体;李钟铎等〔11,12〕利用朝鲜出血热病毒抗原对我国患者血清检查也发现IgM抗体,在病后4~13天的109份血清中,74.3% IgM抗体阳性,最早可在病后第2天出现,故认为检查IgM抗体可作早期诊断。IgG抗体出现较晚,一般在病后一周,二周达高峰,而在一定时间内缓慢下降。Brummer-Korvenkontio等〔10〕研究发现流行性肾病患者早期未产生IgM抗体,而一般抗体产生也较晚,在较长时间内持续升高,此与李镐汪等报导的很快达高峰后缓慢下降不同。不同作者报导,病后10余年甚至36年仍可查见免疫荧光抗体〔13〕。

用朝鲜出血热病毒抗原(感染的黑线姬鼠肺、

Wistar种大白鼠肺或A549细胞)检查不同国家有肾综合征出血热患者血清,发现对苏联、日本、瑞典、芬兰和中国的患者血清均表现有明显的免疫荧光反应〔1,11〕,而且多数抗体滴度较高,证明它们是由同一种病毒引起。其中南朝鲜与中国及苏联远东疫区患者血清反应,从抗体滴度或阳性率均颇为相似,但在日本、苏联欧洲部分疫区及芬兰等国发生的患者血清抗体滴度较低。越来越多的证据表明,朝鲜出血热与流行性肾病可能属于同一病原的不同血清型〔14,15〕。

现已证明本病毒与数种砂粒病毒、马尔堡病毒及埃波拉出血热病毒无血清学关系〔1〕。但它与呼肠病毒的关系却是一个在病原研究中不可忽视的问题。日本Umenai等〔8〕用R66系人胚肺传代细胞从实验室感染出血热患者血清(急性期及恢复期)和被怀疑为传染源的大白鼠粪便、唾液腺中分离到一种病毒,免疫电镜观察证明具有病原学上的特异性,可被朝鲜出血热阳性血清所中和。但从其形态及一些性状上类似呼肠病毒。不过较呼肠病毒大(直径83~92nm),而且对乙醚和氯仿敏感,这与一般呼肠病毒不同。安徽省流行性出血热病原协作组〔17〕曾从疫区黑线姬鼠肺分离到一株1型呼肠病毒,并发现与本病毒在血清学上有一定联系,用免疫荧光法检查患者血清IgG抗体96.2%阳性(滴度不高),双份血清血凝抑制抗体滴度有动态变化。此株病毒对氯仿也敏感,但其抗血清与朝鲜出血热抗原免疫荧光反应阴性。此外,流研所等单位也从疫区野鼠肺脏中分离到电镜下具有呼肠病毒形态的病原因子〔18〕。联系到朝鲜出血热病毒自分离以来仍未见有关病毒形态及其基本性状研究的详细报告,说明其中存在着某些难以用病毒学常识解释的问题。为此,对呼肠病毒与本病病原的关系不应过早排除。

血清流行病学方面的研究进展

一、宿主动物的种类:近年来病原学研究表明,本病病毒是多宿主性的,但自然宿主动物的鼠种特殊而又局限。李镐汪等〔1〕在朝鲜疫区七种野鼠中,仅从黑线姬鼠内脏检查到病毒抗原。520只黑线姬鼠中有73只阳性(14%),而六种其它野鼠195只无一阳性。说明仅黑线姬鼠为本病传染源。日本仙台市东北大学实验室出血热爆发后,血清学调查证明大白鼠为传染源。检查外购在该实验室饲养1个月以上的大白鼠26只,12只有对朝鲜出血热抗体滴度1:512~1:2048,5只为1:32~1:256。日本大阪及南朝鲜汉城存在

有本病的城市型发病。大阪从1960年起,连续11年发生流行性出血热,都是仅存在大家鼠(黑家鼠及褐家鼠等)的城市中心区发生的。据李平佑等〔9〕引证李镐汪的工作,在汉城捕捉的大家鼠血清查到高滴度特异性抗体,提出城市型发病的传染源可能是大家鼠。它可能是从某种野鼠宿主获得感染的继发性宿主。在日本没有黑线姬鼠,当地何种野鼠为本病毒的自然宿主尚不清楚。

如前述,Brummer-Korvenkontio等〔10〕已证明芬兰疫区的欧洲棕背鼯为自然携带流行性肾病相关抗原,其为当地优势种。Gavrilovskaga等〔23〕用酶联免疫吸附测定法(ELISA)及间接免疫荧光法(IFAT)证实欧洲棕背鼯及红背鼯(*Clethrionomys rutilus*)肺组织携带抗原,说明北欧的流行性肾病与苏联欧洲疫区有肾综合征出血热的自然宿主为棕背鼯,而红背鼯也是自然宿主之一。

李镐汪等在对25种动物的感染试验中,起初只在黑线姬鼠查见抗原〔13〕,说明对病毒有易感性的动物种类很少。

二、人群易感性及隐性感染:南朝鲜疫区正常人群,朝鲜出血热抗体阳性率为1%(城市和士兵)及3.8%(农村)。Brummer-Korvenkontio等〔10〕检查31例无流行性肾病史的对照人血清全为阴性。2个与鼯类有10余年接触史的捕鼠者及一起爆发本病的家庭中非发病者无一查到抗体。李钟铎〔12〕等对我国不同疫区的142份正常人血清检查中,全部阴性。陕西对一重发病大队(豆村)的调查〔20〕,30例有过出血热病史者,26例阳性,而31例正常人全为阴性。以上资料表明,本病的隐性感染率很低,人群免疫水平也低,故对本病有普遍的易感性。

三、自然疫源地区分布:从病原学观点看,自然疫源地的存在意味着带毒鼠类的存在。我国汉中地区黑线姬鼠虽多,但无本病,可能是黑线姬鼠不带毒。但反过来,没有发现本病的地区却不一定无疫源地存在。

现已证明发生在苏联、芬兰、瑞典、日本和我国的有肾综合征出血热的病原与朝鲜出血热病毒有非常密切的抗原关系。据报导〔13〕,从来自印度、巴基斯坦、阿富汗、伊朗、希腊的人血清以及来自美洲哥伦比亚和阿拉斯加的人血清发现了抗体,而这些地区人群中从未发现过本病。推测本病可能以尚未认识的形式在世界许多地区发生。

四、有关传播途径的病原学和血清学研究：南朝鲜、日本和我国屡次发生实验室出血热爆发〔16,26〕,分析认为用作实验动物的大白鼠和黑线姬鼠排泄物污染尘埃感染的可能性最大。动物集中饲养,造成大量动物同时感染并排毒,污染的尘埃被人群吸入形成出血热爆发,当然这种推测尚需病原学证据。此外,经皮肤(粘膜)破伤感染,经鼠体寄生虫(螨类)叮咬或污染食物经口感染也不能完全排除。特别是在动物全部迁走或处死,经过很长时间还发生病例,用媒介传播更易于解释。

病原学研究证明,黑线姬鼠肺脏携带最多抗原,这为呼吸道传播提供了直接证据。同时病毒经肺内、滴鼻感染成功及鼠体螨中未查见病毒〔8〕,亦支持存在着呼吸道传播的可能性。

周乐明等〔24〕用非疫区黑线姬鼠为实验动物,以直接免疫荧光法检测白细胞内相关抗原为感染指标,研究了皮肤、伤口、螨媒、尘埃-空气、消化道四种途径传播的可能性,结果:①用阳性鼠的血、尿各感染实验鼠10只,分别有9只和6只鼠转为阳性;②以阳性鼠血感染的格氏血厉螨、厩真厉螨分别叮咬实验鼠18只和11只,各出现2只阳性;③20~30只阳性鼠与13只实验鼠共同放置在一个密闭的玻璃柜中一个月,实验鼠均未被感染。用阳性鼠血、尿分别给实验鼠灌胃,均阴性。这一工作因存在所采用检查指标的特异性问题,尚需进一步证实。

小 结

一、1978年南朝鲜用非疫区黑线姬鼠首次分离到朝鲜出血热病毒,证实不同国家(苏联、日本、瑞典、芬兰和我国)发生的有肾综合征出血热为同一种病原所引起。朝鲜出血热和流行性肾病的病原间存在一定的抗原性差异,可能属同一病原的不同血清型。

二、朝鲜出血热病毒已分别在大白鼠(Wistar和Fisher种)及A549(人肺癌)传代细胞传代培养。

三、国内外应用免疫荧光或对流免疫电泳等方法检查疫区野鼠肺、肾及血、尿携带本病相关抗原,证明黑线姬鼠(朝鲜和我国)及欧洲棕背鼯(在北欧及苏联欧洲疫区)为本病毒主要自然宿主;大白鼠可能为日本出血热实验室感染爆发和日本、南朝鲜城市型发病

的传染源。

四、调查和实验室资料表明,带毒动物排泄物污染尘埃经吸入感染为一重要的可能途径。

五、血清学调查初步证明,疫区人群中本病隐性感染少见,人群免疫水平很低。从无本病发现的一些国家和地区的正常人血清中查见免疫荧光抗体,提示本病分布可能比已知的广泛得多。

六、本病病毒分离并未最后解决,病毒颗粒的形态及其理化、生物学性状尚缺乏充分研究,其它检查方法也需进行研究。

参 考 文 献

1. Lee HW et al: J Infect Dis, 137:298, 1978.
2. Lee HW et al: Korean J Int Med, 19:371, 1976.
3. 李法卿等: 流行病学杂志, 4: 230, 1980.
4. 孟阳春等: 江苏医药, (6): 11, 1979.
5. Lee PW et al: J Korean Med Assoc, 21:404, 1978.
6. 流行性出血热病原研究协作组: 黑线姬鼠肺的超微结构观察, 内部资料, 1981.
7. French GR et al: Science, 211:1046, 1981.
8. 宋干: 国外军事医学资料, (4): 177, 1981.
9. Lee PW et al: Infect Immun, 31:334, 1981.
10. Brammer-Korvenkontio M et al: J Infect Dis, 14: 313, 1980.
11. 李钟铎等: 中华预防医学杂志, 14: 137, 1980.
12. 李钟铎等: 用免疫荧光法对我国出血热病人的血清学研究, 内部资料, 1981.
13. 高守一: 中华流行病学杂志, 2(4): 284, 1981.
14. Chumakov MP et al: Lancet, ii:690, 1980.
15. Svedmyr A et al: Lancet, ii:315, 1980.
16. Umenai T et al: Lancet, i:1314, 1979.
17. 安徽出血热病原协作组: 安徽医学, (1): 47, 1981.
18. 流行性出血热病原研究协作组: 鼠呼肠病毒的电镜观察, 内部资料, 1981.
19. 杨明瑞等: 湖北医学院科技通讯, (4): 9, 1979.
20. 陕西省防疫站: 流行性出血热重疫区人群血清抗体的调查, 内部资料, 1981.
21. 李法卿等: 三种动物实验感染出血热和传代的研究, 内部资料, 1981.
22. 张越等: 流行性出血热病毒分离的初步报告, 内部资料, 1981.
23. Gavrillovskaya IN et al: Lancet, I: 1050, 1981.
24. 周乐明等: 流行性出血热传播途径的实验研究, 内部资料, 1981.
25. 任其文等: 流行病学杂志, (3): 253, 1979.
26. 宋干等: 流行性出血热的实验室感染及其预防, 内部资料, 1981.

(1981年8月2日收稿 1981年10月15日修回)