

# 流行性出血热病原学研究

用A-549细胞从疫区黑线姬鼠肺单层细胞中分离出血热病毒

何浩<sup>1</sup> 杨造伦<sup>1</sup> 陈云华<sup>1</sup> 李永珍<sup>1</sup>  
朱昌福<sup>2</sup> 张式其<sup>3</sup> 杨世庄<sup>2</sup> 彭超德<sup>2</sup>

继1978年Lee HW等用非疫区黑线姬鼠首次分离到朝鲜出血热(KHF)病毒<sup>[1]</sup>之后, French<sup>[2]</sup>及Lee PW等<sup>[3]</sup>已将KHF病毒(76/118/AP24, 76/118/AP27)分别适应于A-549细胞及Wistar大鼠, 并先后证实KHF病毒与我国流行性出血热(EHF)有密切的血清学关系<sup>[4, 5]</sup>。最近国内亦成功地用非疫区黑线姬鼠分离到EHF病毒<sup>[6, 7]</sup>, 并将其适应于A-549细胞<sup>[6]</sup>。但尚未见到用A-549细胞直接从黑线姬鼠肺单层细胞培养物中分离到EHF病毒的报道。

原我省病原协作组曾在黑线姬鼠肺原代细胞中检测到EHF抗原, 但分离未获成功<sup>[8]</sup>。我们于1981年冬季改进了培养方法, 将疫区黑线姬鼠肺单层细胞EHF阳性培养物接种A-549细胞, 结果分离到5株可以在A-549细胞中稳定传代的EHF相关因子, 经间接荧光抗体(IFA)法检查, 显示相关因子对EHF患者恢复期血清具有高度特异性, 对其中ALC96株(第7代)作了系统检查, 证明此因子为EHF病毒。

## 材料和方法

### 一、材料:

1. 荧光素标记血清: 羊抗人及羊抗兔IgG异硫氰酸荧光素结合物, 为上海生物制品研究所出品。

2. KHF阳性血清: 经中国军事医学科学院微生物流行病研究所用KHF抗原片检查, 确定为阳性的典型EHF病人恢复期血清, 其中无呼肠孤病毒抗体和类风湿因子。

3. 呼肠孤I、II、III型抗血清和类环状病

毒抗血清, 由中国医学科学院流行病学微生物学研究所提供。

4. A-549细胞系: 系人肺癌II型肺泡上皮细胞, 由中国医学科学院病毒研究所提供。

### 二、方法:

1. 黑线姬鼠肺单层细胞培养物标本的制备: 从流行性出血热疫区(安徽省凤台县)捕捉黑线姬鼠、编号、在严密隔离的条件下, 以无菌手术取肺, 每只鼠肺分成两份, 一份按常规法略加改进作单层细胞培养, 即以1%胰蛋白酶(Difco 1:250)在37°C水温箱中进行消化, 消化结束时, 加入适量小牛血清终止胰蛋白酶作用, 经Hanks氏液洗涤后, 加入营养液(含5%灭能小牛血清的1640培养液系本室配制), 用滴管吹打, 吸出细胞悬液, 如此反复数次, 直至肺组织块松散为止。每只鼠肺可得细胞悬液3至5毫升, 分装于置有小玻片的链霉素瓶中37°C培养, 细胞贴壁后, 换液一次。培养7~10天, 取出小玻片, 以pH7.6 0.01M PBS漂洗、晾干、冷丙酮固定7分钟, 晾干, 立即进行检查。另一份(1/3~1/2量)置灭菌链霉素瓶中, 存-70°C冰箱。

2. IFA染色法: 将制备好的单层细胞小玻片三张, 用中性树脂固定于载玻片上, 分别加入KHF阳性血清(1:40), 正常人血清(1:20), 呼肠孤I型病毒抗血清(1:40), 置37°C湿盒中45分钟后, 用pH7.6 0.01M PBS漂洗10分钟, 吹干, 再分别滴加相应的荧光素标记血清,

1 安徽省医学科学研究所

2 安徽省凤台县防疫站

3 安徽省凤台县医院

37°C湿盒中30分钟后，复以PBS漂洗10分钟，蒸馏水冲洗一次，吹干，以Leitz ORTHOP LAN落射光荧光显微镜检查。

三、阳性标本的选择与应用：凡与KHF阳性血清产生免疫荧光阳性的黑线姬鼠肺单层细胞培养物(以下简称ALC)作为阳性标本，其冻存的相应肺组织亦作感染标本。而与呼肠孤I型病毒抗血清产生免疫荧光阳性者废弃。取KHF阳性的ALC一瓶，存-70°C，其余作次代培养(传代时瓶中加小玻片)，12天取片，进行IFA检查。

四、感染与传代：A-549单层细胞经0.02% EDTA处理后，加入营养液(含10%灭能小牛血清的199培养液—Difco牌)，吹打分散细胞，然后分装于链霉素瓶，37°C培养，待细胞形成单层后应用。

1. 感染：

①ALC：A-549单层细胞先以Hanks氏液洗一次，将KHF阳性的原代ALC冻融(次代ALC不冻融)三次，每瓶接种0.2毫升，37°C吸附1.5小时，补足维持液(5%灭能小牛血清的199培养液)至1毫升，37°C培养，根据pH变化情况，每隔1~3天换液一次。

②黑线姬鼠肺组织悬液(以下简称ALS)：将KHF阳性的肺组织以营养液制成10%肺悬液，静置使其自然沉淀，取上清，再以营养液作10倍稀释即为接种标本。每小瓶A-549细胞接种标本0.2毫升，37°C吸附2小时，以Hanks氏液洗一次，加维持液至1毫升，37°C培养。两种标本感染的培养管均观察至20天。

2. 传代：

将已观察至20天的A-549细胞培养物冻融三次，按前法接种和培养，随后采用被感染细胞自身传代与经冻融后传代两种方法交替进行，每份标本盲传三代，如无特异性荧光则视为阴性。

五、特异性检查：

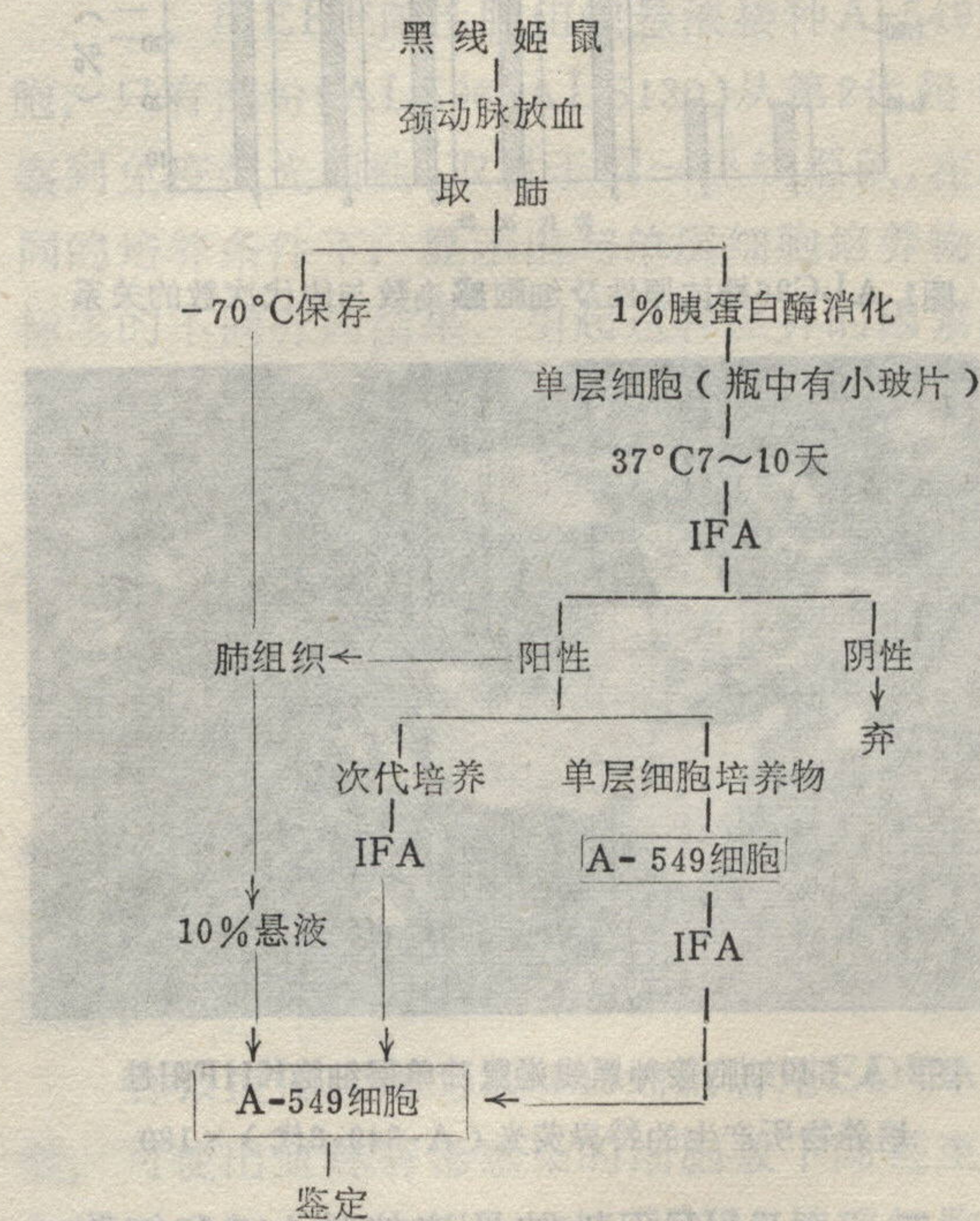
1. 滴片：将每代感染阳性标本的A-549细胞，基本按Friman等<sup>[9]</sup>的方法制作滴片(每

片印10孔)，放平皿，置CO<sub>2</sub>培养箱(5% CO<sub>2</sub>)中培养16至18小时，按前述处理单层细胞片方法冲洗、固定和用IFA染色。

2. 特异性判断：传代中获得的EHF相关因子，用下列血清作IFA检查，①KHF阳性对照血清，②EHF患者恢复期血清(包括双份血清)，③正常人血清及其它疾病患者血清，④呼肠孤I、II、III型病毒抗血清及类环状病毒抗血清。如①②项结果阳性即有50%以上细胞具有特异性荧光且能稳定传代而③④项结果为阴性，即为分离成功。

六、其它检查：对所获得的EHF相关因子进行滤过试验，并按Mary Christensen所述方法<sup>[10]</sup>作乙醚、氯仿、酸(pH≤3.0)、5-碘脱氧尿嘧啶核苷(疱疹净)耐性试验。

七、EHF病原分离程序：



结 果

一、制备134只疫区黑线姬鼠肺单层细胞，其中有121只鼠肺细胞生长良好，经IFA染色，检出EHF阳性细胞24份(19.8%)，将其中10份荧光阳性达“+++”以上的单层细胞培养物接种

A-549 细胞, 从中获得 5 株 EHF 相关因子。ALC41、ALC96、ALC105、ALC106、ALC130 原代细胞培养物接种 A-549 细胞, 在第一代用 KHF 阳性血清检查即发现被感染的 A-549 细胞的胞浆中呈现散在性针尖样荧光颗粒, ALC96、ALC130 次代肺单层细胞培养物不经冻融接种 A-549 细胞, 亦获得阳性结果, 当传至 4 代以上时, 其抗原对阳性血清滴度随代次增加而升高, 感染的细胞数可达 90% 以上(图 1), 荧光颗粒亦较初始代次略粗大(图 2、3)。

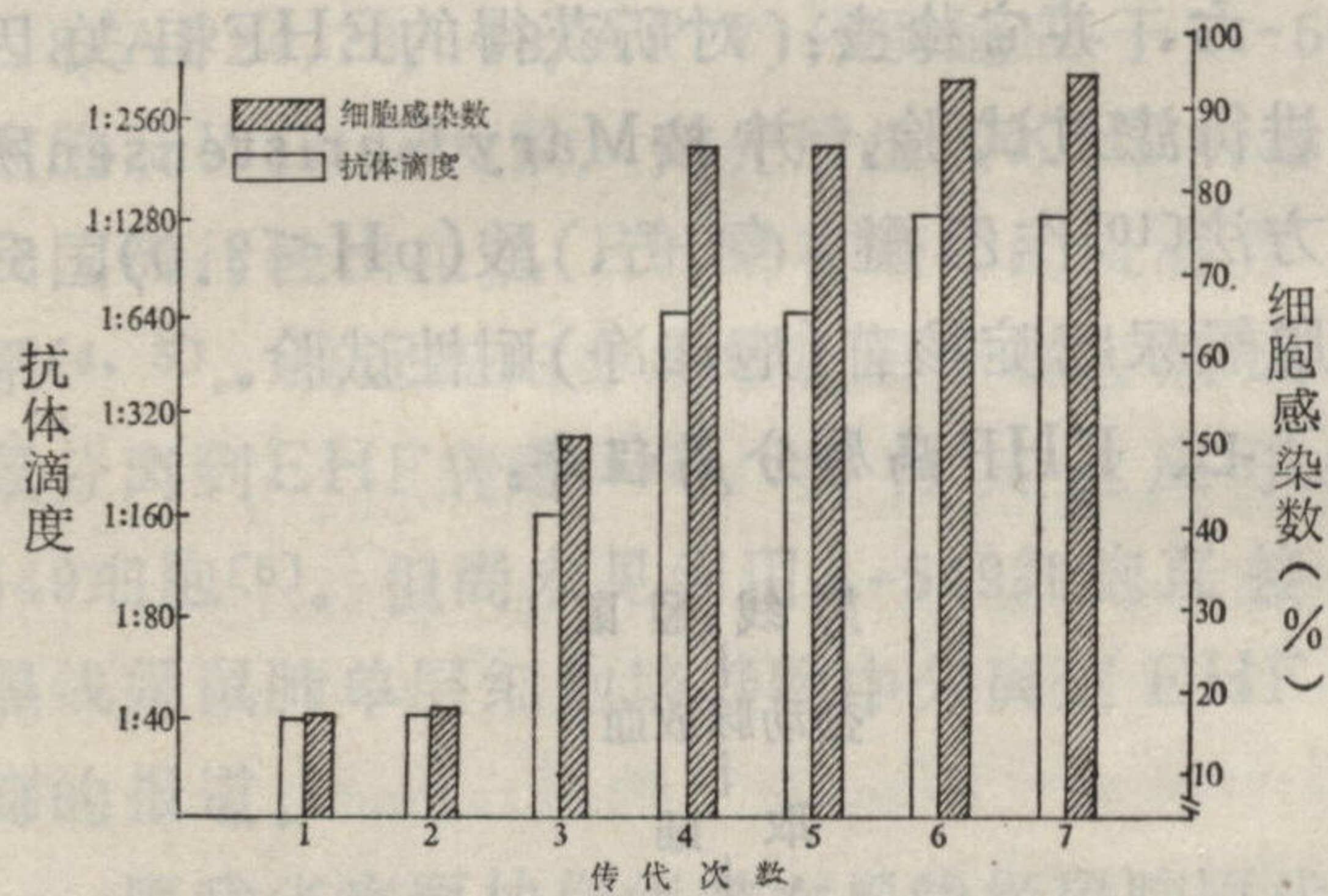


图1 ALC96株抗原性及细胞感染数与传代次数的关系

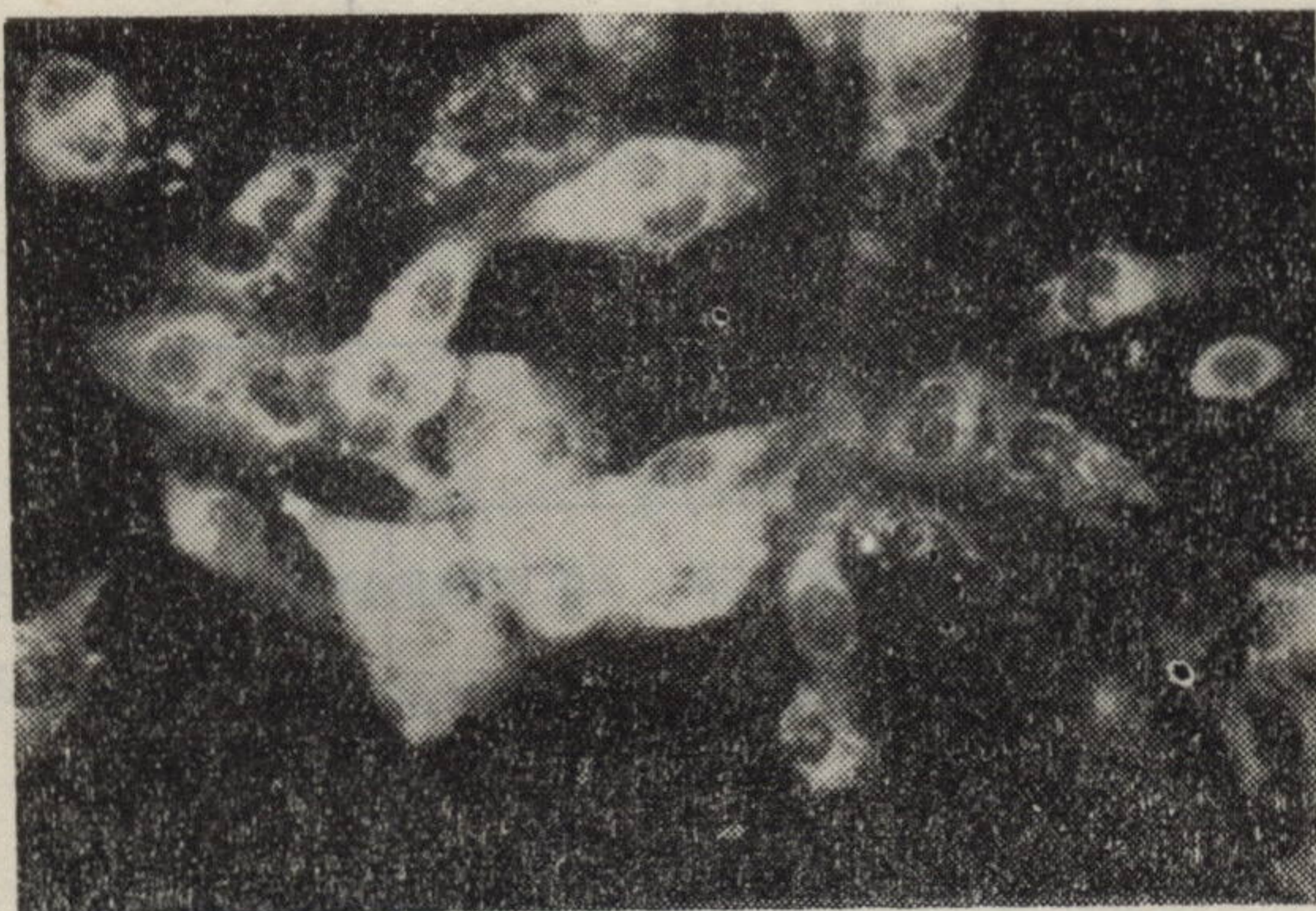


图2 A-549细胞接种黑线姬鼠肺单层细胞KHF阳性培养物所产生的特异荧光(A-549-6代) × 180

二、用 EHF 阳性肺悬液接种 A-549 细胞, 只有 ALC96、ALC130 于第二代时才发现特异性荧光, 但传代不够稳定。

三、理化性状: EHF 相关因子可通过 450 nm 孔径滤膜, 对 5-碘脱氧尿嘧啶核苷(疱疹净)不敏感、不耐酸 ( $\text{pH} \leq 3$ )、对脂溶剂(乙醚、氯仿)敏感(表 1)。

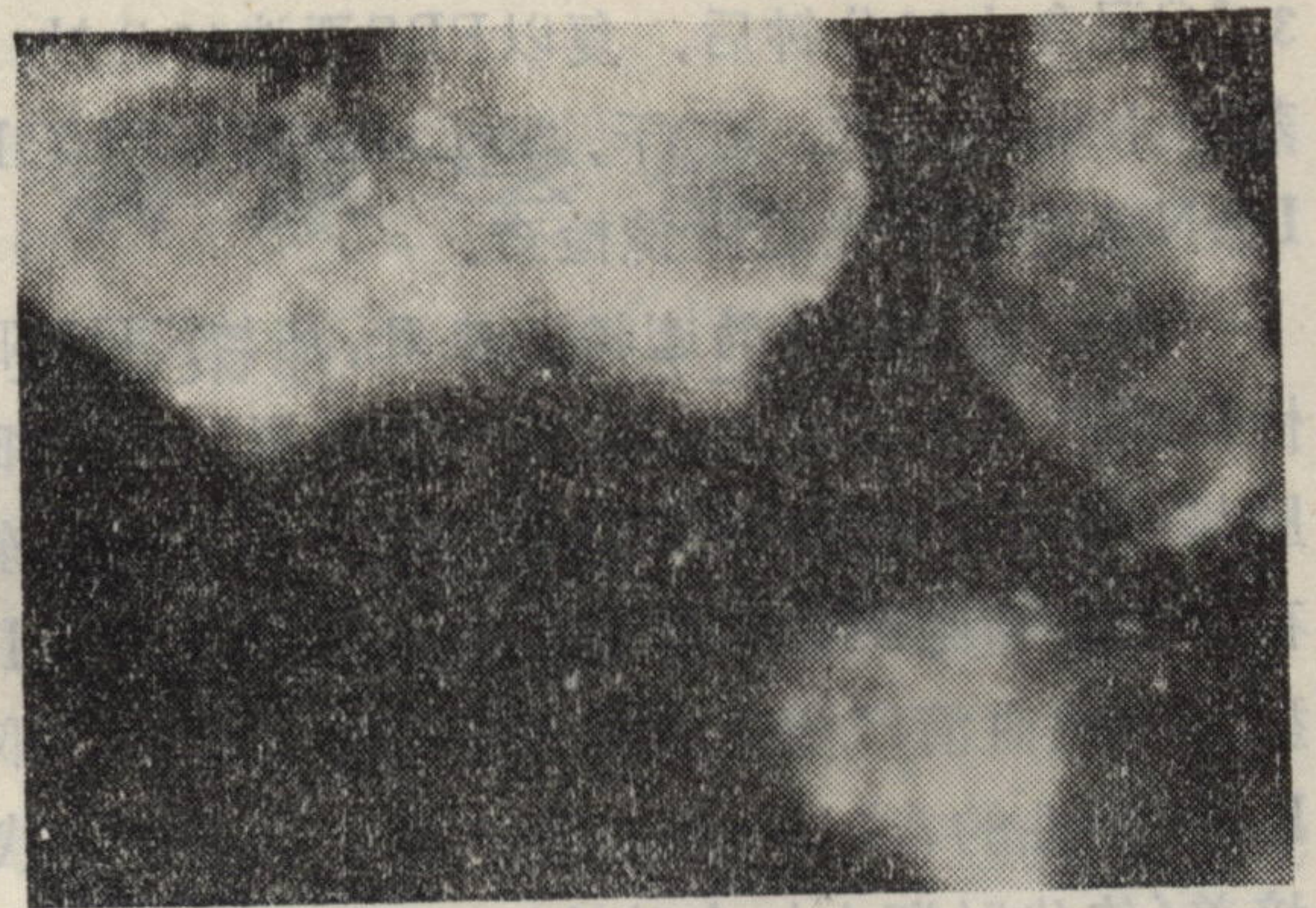


图3 A-549细胞KHF阳性, 放大后免疫荧光颗粒 × 780

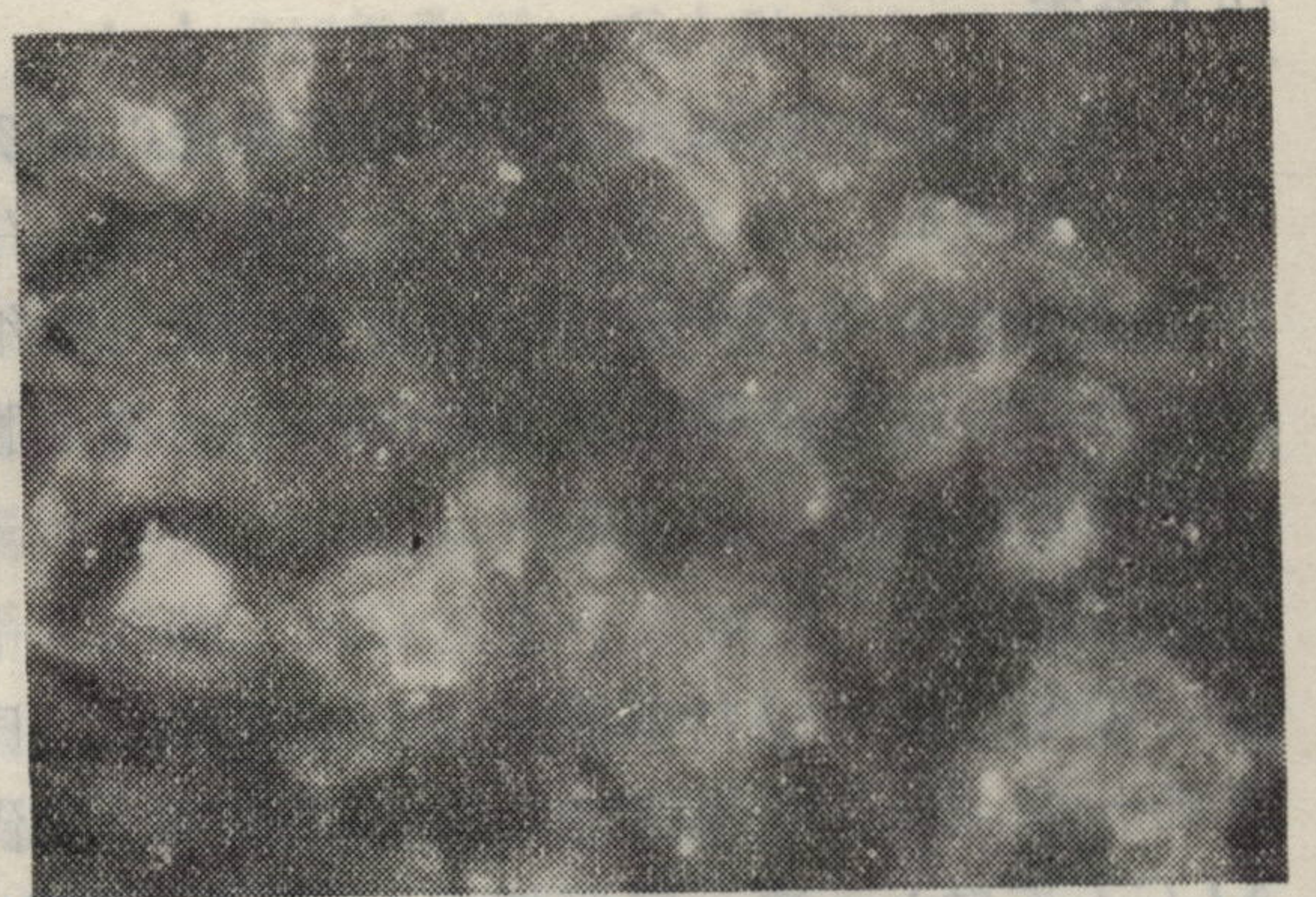


图4 免疫荧光阴性对照的A-549细胞 × 180

表1 ALC96株化学试剂耐性试验

| ALC96 | 50% 细胞感染量(TCID <sub>50</sub> /0.1毫升)* |      |      |      |      |
|-------|---------------------------------------|------|------|------|------|
|       | ALC96 对照                              | 耐酸组  | 耐乙醚组 | 耐氯仿组 | 疱疹净  |
| ALC96 | >3.0                                  | <1.0 | <1.0 | <1.0 | >3.0 |

\*ALC96株第 7 代 TCID<sub>50</sub>/0.1 毫升为 6.0

四、相关因子与 EHF 患者恢复期血清的特异性反应: 5 株 EHF 相关因子均与 EHF 病人恢复期血清产生特异性免疫荧光。用 ALC96 株感染的 A-549 细胞(第 7 代)作为抗原, 以 IFA 法检查 EHF 病人恢复期血清 67 份, 阳性 66 份(98.5%); 检查合肥地区正常人血清(12 份)和其它疾病病人血清 46(伤寒: 5, 病毒性肺炎: 7, 肝炎: 19, 肾炎: 6, 免疫复合病: 1, 发热待查: 8)均为阴性。

检查 10 例 EHF 病人双份血清, 其抗体滴度均有 4 倍以上升高(表 2)。

五、双盲法检查: 10 份 EHF 患者恢复期

表2 ALC96因子对EHF患者双份血清检查结果

| 病例 | 病后天数 |     | 抗体滴度  |        | 抗体滴度升高倍数 |
|----|------|-----|-------|--------|----------|
|    | 急性期  | 恢复期 | 急性期   | 恢复期    |          |
| 1  | 3    | 156 | <1:20 | 1:1280 | >64      |
| 2  | 4    | 156 | 1:20  | 1:320  | 16       |
| 3  | 4    | 20  | <1:40 | 1:640  | >16      |
| 4  | 5    | 156 | 1:20  | 1:320  | 16       |
| 5  | 6    | 158 | 1:20  | 1:640  | 32       |
| 6  | 5    | 156 | 1:20  | 1:1280 | 64       |
| 7  | 6    | 19  | 1:40  | 1:640  | 16       |
| 8  | 3    | 11  | <1:20 | 1:640  | >32      |
| 9  | 6    | 14  | 1:40  | 1:640  | 16       |
| 10 | 5    | 49  | <1:20 | 1:1280 | >64      |

血清, 10份非EHF患者血清编码定性及2份EHF阳性血清定量试验, 结果完全一致。

六、中和试验: 以20个免疫荧光单位的EHF患者恢复期血清(1:64)与100TCID<sub>50</sub> ALC96病毒作中和试验, 其感染性完全被中和而正常人血清(1:4)则无中和作用。

七、用EHF病毒A<sub>1</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>9</sub>株<sup>[7]</sup>的A-549细胞适应株的抗血清<sup>[11]</sup>, 检查ALC96抗原, 均为阳性结果(表3), 以16单位A<sub>5</sub>株兔免疫血清对ALC96进行封闭, 然后用荧光素标记的EHF阳性血清(本室标记)作直接法染色, 结果封闭组阴性, 对照组阳性。用呼肠孤I、II、III型病毒抗血清、类环状病毒抗血清与ALC96株及另外4株EHF相关因子A-549细胞抗原作IFA检查均为阴性。

表3 ALC96株与EHF病毒A<sub>1</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>9</sub>抗血清检查结果

|       | 抗血清滴度          |                |                |
|-------|----------------|----------------|----------------|
|       | A <sub>1</sub> | A <sub>5</sub> | A <sub>9</sub> |
| ALC96 | 1:1280         | 1:2560         | 1:2560         |

### 讨 论

一、疫区黑线姬鼠肺制备的单层细胞, 经KHF阳性血清作IFA法检查阳性, 并排除了呼肠孤I、II、III型病毒的存在, 以此细胞培

养物接种A-549细胞, 分离到ALC96等5株可以稳定传代的EHF相关因子, 已对5株因子作了特异性检查, 亦排除了呼肠孤I、II、III型病毒、类环状病毒污染的可能性, 并对其中ALC96株进行了系统鉴定, 结果证实此因子为EHF病毒。因为: 1. 与KHF阳性血清产生稳定的免疫荧光阳性; 2. 与EHF患者恢复期血清免疫荧光的阳性率可达98.5%(参见表1), 而与正常人及其它疾病病人血清均为阴性反应。测定10例EHF患者双份血清, 抗体滴度均有明显的动态变化(4倍以上升高); 3. 病毒感染性可被EHF患者恢复期血清中和; 4. 与EHF病毒抗血清产生特异性免疫荧光; 5. 可通过450nm孔径的滤膜。对5-碘脱氧尿嘧啶核苷不敏感, 不耐酸, 对脂溶剂(乙醚、氯仿)敏感, 这些与KHF病毒相似。

二、用EHF阳性肺组织悬液接种A-549细胞, 只有两份(ALS96、ALS130)从第2代起观察到免疫荧光阳性, 取材于同一黑线姬鼠, 在相同的培养条件下, 显示出与单层细胞培养物为标本的不同分离结果, 引起这种差异的因素, 尚不十分清楚, 有待进一步探讨。但可以肯定, 从疫区黑线姬鼠肺单层细胞培养物中分离EHF病毒有许多方面的优越性。

三、在病毒分离过程中, 我们观察到EHF病毒感染的A-549细胞中的荧光颗粒图象, 呈针尖样散布于胞浆中, 这与French等<sup>[9]</sup>的描述相一致。但在感染初始代次, 荧光颗粒多接近于细胞核, 随代次增加而扩展至整个细胞浆。

有报道传代用的A-549细胞若用EDTA分散, 可使出血热病毒感染的细胞数下降甚至消失<sup>[6]</sup>。我们一直应用0.02% EDTA处理细胞, 并未见到下降趋势, 这是否为毒株间的差异, 尚待进一步观察。

四、在传代过程中, 我们采用接种后细胞自身传代与经冻融后接种传代两种方法交替进行, 似可较快地提高毒力, 但连续多次自身传代, 往往导致细胞生长不良, 应予注意。

### 摘 要

用疫区黑线姬鼠肺制备单层细胞，经KHF阳性血清作IFA法检查，将10份KHF荧光阳性(卅以上)的单层细胞培养物接种A-549细胞，发现5株可以在A-549细胞中连续传代的EHF相关因子。以其中ALC96株感染的A-549细胞制作抗原片，检查125份血清，67份EHF患者恢复期血清中66份免疫荧光阳性(98.5%)，58份正常人及其它疾病病人血清全部阴性。10例EHF患者双份血清抗体滴度均有4倍以上升高。与呼肠孤I、II、III型及类环状病毒抗血清免疫荧光阴性，与EHF病毒A<sub>1</sub>、A<sub>5</sub>、A<sub>6</sub>株(A-549细胞适应株)抗血清为阳性，其感染性可被EHF病人恢复期血清中和，证明此相关因子是EHF病毒。病毒可通过450nm孔径滤膜。对5-碘脱氧尿嘧啶核苷不敏感，不耐酸(pH≤3.0)，对脂溶剂敏感，这些与KHF病毒相似。

### ABSTRACT

The lung monolayer cell cultures prepared with a podemus agrarius from Epidemic hemorrhagic fever (EHF) endemic area were examined by indirect immunofluorescent antibody (IFA) technique. The sera used cum IFA against KHF virus come from EHF convalescents. A-549 cells were inoculated with 10 cultures in which IFA against KHF are positive. Five transmissible strains of EHF-related agent were obtained. Among them a strain ALC96 was identified and its antigenic specificity was confirmed by the following: Sera of 125 subjects were tested by IFA technique with spot-slides prepared from A-549 cells infected by ALC96. 66 out of 67 serum samples of EHF convalescents are positive (98.5%), 58 serum samples of healthy adults and

non-EHF patients are negative, ten paired sera from patients with EHF showed more than four times rise in IFA titers. The possibilities of other virus infection such as infection of reovirus (I, II, III type) or orbivirus-like agent can be ruled out by negative results of its corresponding antiserum. At the same time, the spot-slides acted with antiserum against EHF virus A<sub>1</sub> A<sub>5</sub> A<sub>9</sub> (adapted A-549 cell strain) gave positive results. The experiments mentioned above confirmed that the ALC96 agent was EHF virus.

The EHF virus is sensitive to lipid-solvents and acid (pH≤3.0), but resistant to idoxyuridene. It is able to pass through bacterial filter with a limiting pore diameter of 450nm. These properties are similar to KHF virus.

### 参 考 文 献

1. Lee HW et al: J Inf Dis, 137(3): 298, 1978.
  2. French et al: Science, 211(4486): 1046, 1981.
  3. Lee PW et al: Inf & Immun, 31(1): 334, 1981.
  4. Lee PW et al: Lancet, 1: 819, 1980.
  5. 向近敏等: 湖北医学院学报, 1(2): 6, 1980.
  6. 严玉辰等: 中国医学科学院学报, 4(2): 65, 1982.
  7. 宋 干等: 中国医学科学院学报, 4(2): 73, 1982.
  8. 安徽省流行性出血热病原协作组: 黑线姬鼠原代肺细胞中朝鲜出血热抗原的检测, 内部资料, 1981.
  9. Friman G et al: Scand J Inf Dis, 13(2): 89, 1981.
  10. Mary Christensen: Basic Laboratory Procedures in Diagnostic Virology, P.33, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois, USA, 1977.
  11. 倪大石等: 流行性出血热病原因子在A-549人肺癌传代细胞中的适应研究, 内部资料, 1982.
- (本文所用KHF阳性血清蒙军事医学科学院微生物流行病学研究所李钟铎大夫协助检查, 文中照片系本所钟明光大夫冲印, 文稿蒙安徽医学院微生物学教研组张泳南副教授审阅, 在此一并致谢)

## 布鲁氏菌性骨膜炎一例报告

甘肃省靖远县卫生防疫站 陈万夫

患者李××, 女, 36岁, 护士。于1967年9月初, 由于给布鲁氏菌病人采血污染手而罹患本病。主要症状为头痛、乏力、发热发冷、四肢关节疼痛, 体温略高, 血清试管凝集反应阳性, 血清试管凝集反应阳性, 血清玻片凝集反应阳性, 确诊为急性布鲁氏菌病。经服用四环素28天后, 体温恢复正常, 上述症状好转。症状好转三个月后, 患者右上肢疼痛逐日加重, 活动

受限, 经X线拍片发现, 右肱骨前缘有较广泛的骨膜增生, 确诊为右肱骨骨膜炎。经溶菌素静脉注射12次后, 疼痛减轻、活动恢复, 全身症状消失, 一年以后完全恢复健康。

(病例诊断承蒙兰州医学院附属一院放射教研组协助, 特此致谢)