

# 在广州市实验大白鼠中发现流行性 出血热病毒抗原和抗体

广州市卫生防疫站 宋益贵 黄桂芬 熊 远

1983年1月,广州市海珠区出现了首例流行性出血热(EHF)病例<sup>[1]</sup>。同年8~9月,经自然疫源地调查,确定了广州市海珠区、郊区有EHF自然疫源地<sup>[2]</sup>。1984年上半年我站进行的鼠间疫情监测,说明广州市其他各区也有EHF自然疫源地<sup>[3]</sup>。同年8~10月,作者在广州市各有关单位采集了实验大、小白鼠,用间接免疫荧光技术(IFAT),检测了鼠肺EHF病毒抗原和血清抗体,发现广州市部分单位的实验大白鼠感染了EHF病毒。未发现小白鼠感染EHF病毒。现将对大白鼠检测的结果报告如下:

## 材料与方法

一、标本采集:实验大、小白鼠,按饲养数的十分之一随机抽样。从1984年8月11日至10月15日,先后到十三个单位,共采集大白鼠296只,每只鼠都采集了肺组织标本,其中233只鼠在采集肺组织标本的同时,采集了血液标本。共采集小白鼠786只,每只鼠只采集了肺组织标本,未采集血液标本。标本的采集、处理、保存方法按文献<sup>[4]</sup>所载。

二、参考阳性抗原和血清:EHF病毒Vero E-6细胞抗原片,由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(简称流研所)和军事医学科学院微生物流行病学研究所制备。尹××和京×× EHF病人恢复期血清由流研所提供;湘×× EHF病人恢复期血清由湖南省卫生防疫站提供;冯×× EHF病人恢复期血清由作者在广州市采集,用EHF病毒Vero E-6细胞抗原片滴定,抗体滴度1:1280(急性期1:20),

送军事医学科学院微生物流行病学研究所分别用EHF病毒不同株感染的Vero E-6细胞抗原片鉴定,为典型的EHF病人双份血清。

三、免疫血清:EHF病毒免疫血清,由流研所提供,经作者滴定效价为1:160;呼肠孤I型和II型病毒单价免疫血清,由中国人民解放军302医院病毒室吴慎主任赠给。

四、荧光抗体:羊抗人IgG异硫氰酸盐荧光素结合物,上海生物制品研究所出品,第一批染色单位1:8~1:16,批号8301-3,有效期1984年10月;第二批染色单位1:10,批号8401-2,有效期1985年7月。试验时两批均用6~8个染色单位。伊文思蓝最终浓度1:8000。兔抗鼠(BALb/c) IgG荧光抗体,系北京生物制品研究所出品,效价1:40,批号84-5,有效期1985年5月。试验时使用6~8个染色单位,伊文思蓝最终浓度1:8000-

五、荧光显微镜:OLYMPUS PM-10 A透射光荧光显微镜。

六、方法:鼠肺EHF病毒抗原和鼠血清EHF病毒抗体的检测,均按文献<sup>[4,5]</sup>所载。

## 结 果

一、大白鼠肺组织中EHF病毒抗原的检测:296只大白鼠肺组织标本, EHF病毒抗原阳性者18只,阳性率6.08%。13个受检单位,有4个单位的大白鼠呈现IF阳性反应,阳性率相差悬殊,高者2/6,低者2/30(6.67%);其余9个单位的大白鼠均未检出EHF病毒抗原(附表)。

对采自广州医学院的30只大白鼠,在检测



附表

广州市实验大白鼠EHF病毒感染情况

单 位	EHF病毒抗原			EHF病毒抗体			总感染情况		
	检测鼠数	阳性鼠数	%	检测鼠数	阳性鼠数	%	检测鼠数	抗原或/和抗体阳性数	总感染率%
中山医学院	80	0		55	4	7.28	80	4	5.00
中山医学院附一医院	6	2		6	4		6	4	
广州市医药研究所	8	0		7	0		8	0	
广州市药品检验所	6	0		3	0		6	0	
广州中医学院	5	0		5	2		5	2	
中山大学生物系	10	0		8	0		10	0	
华南植物研究所	9	0		9	0		9	0	
广州医学院	78	11	14.10	56	14	25.00	78	16	20.21
广州市卫生防疫站	25	3	12.00	25	3	12.00	25	3	12.00
暨南大学医学院	30	2	6.67	28	5	17.86	30	5	16.67
广东省微生物研究所	11	0		10	0		11	0	
广东省人民医院	3	0		3	0		3	0	
第一军医大学	25	0		18	0		25	0	
总 计	296	18	6.08	233*	32	13.73	296	34	11.49

\* 296只大白鼠中，233只采集了血液标本，63只未采集血液标本。

肺组织EHF病毒抗原的同时，检测了其他各种脏器中EHF病毒抗原，结果肺组织EHF病毒抗原阳性的5只大白鼠中，全部肾组织出现灶性分布的IF阳性反应，其中一只鼠的肝、心、膀胱等脏器均出现IF阳性反应。

## 二、大白鼠血清中EHF病毒抗体的检测：

296只大白鼠中采到血清标本的233只，EHF病毒抗体阳性者32只（13.73%）。出现阳性反应的6个受检单位，EHF病毒抗体阳性率有明显的差别，高者4/6，低者4/55（7.28%），其余7个受检单位的大白鼠均未检出EHF病毒抗体（附表）。

32份EHF病毒抗体阳性的大白鼠血清，抗体滴度1:20者14份（占阳性血清43.75%），1:80者8份（25.00%），1:320者7份（21.88%），1:1280者1份（3.13%），未滴定效价者2份。

三、大白鼠EHF病毒总感染率：296只大白鼠，EHF病毒抗原或/和抗体阳性者34只，总感染率11.49%。6个受检单位大白鼠的感染率相差悬殊，高者为4/6，低者为4/80（5.00%）。其余7个受检单位的大白鼠均未检出EHF病毒抗原和抗体。

296只大白鼠，性别不明（乳鼠和未记录性别）者26只，感染EHF病毒者1只，感染率为3.85%；可统计性别者270只，其中雌性152只，感染EHF病毒者24只，总感染率15.79%；雄性118只，感染EHF病毒者9只，总感染率7.63%，雌性EHF病毒总感染率显著的高于雄性（ $\chi^2=4.09$ ， $p<0.05$ ）。

四、大白鼠中EHF病毒抗原和抗体检出的相互关系：同时采得肺组织和血液标本的233只大白鼠，抗原和抗体同时阳性者16只（6.87%），抗原阴性抗体阳性者16只（6.87%），未发现抗原阳性而抗体阴性者，抗原和抗体均阴性者201只（86.27%）。

五、大白鼠肺组织中EHF病毒抗原的特异性鉴定：

1.用典型EHF病人（冯××）双份血清鉴定：从3个受检单位各抽取一份大白鼠肺组织切片，用冯××双份血清鉴定，结果均和阳性对照Vero E-6细胞抗原片一致，恢复期血清抗体滴度均较急性期血清高四倍以上。

2.用不同来源的多份EHF病人恢复期血清鉴定：3份大白鼠肺组织切片，分别用6份EHF病人恢复期血清鉴定，结果均与阳性对



照相同，出现IF阳性反应。

3. 阻断试验：用EHF病毒免疫血清、呼肠孤I型和II型病毒免疫血清，分别进行对大白鼠肺组织切片IF的阻断试验，结果EHF病毒免疫血清明显地阻断其特异的荧光的出现，而呼肠孤两型病毒单价免疫血清均无阻断特异荧光出现的作用，和阳性对照结果相同。

4. 用免疫血清鉴定：抽取三份鼠肺，经军事医学科学院鉴定无疑。

### 讨 论

广州市是EHF新疫区，1983年首次自然疫源地调查<sup>[2]</sup>，确定了广州市存在EHF自然疫源地，初步看出褐家鼠是主要传染源，家鼠型是主要病型，为广州市EHF流行病学监测和防治提供了科学依据。作者本次调查指出，广州市部分单位的实验大白鼠，已经感染了EHF病毒，是本病的另一传染源；而且作者已从这些单位部分大白鼠饲养者血清中查出了EHF抗体<sup>[13]</sup>，可能是大白鼠引起的隐性感染，为广州市EHF流行病学监测和防治提供了新的科学依据。在日本<sup>[6~8]</sup>、南朝鲜<sup>[9]</sup>以及国内山西医学院<sup>[10,11]</sup>等处，都曾发生过由大白鼠引起的EHF爆发，必须引起注视。

作者对广州市实验大白鼠感染的EHF病毒的来源进行了初步调查，这些单位的大白鼠都是自行繁殖的，他们都从未进行过有关EHF病毒的实验工作，可以初步排除外地大白鼠带入和实验室传给。值得注意的是，13个受检单位的动物房，都没有严密的防鼠设施，野鼠自由出入；作者在广州医学院采集大白鼠的1~2个月内，该学院在院内捕获褐家鼠23只，EHF病毒感染率(69.59%)较大白鼠(20.21%)高得多；Lee氏<sup>[12]</sup>的实验证实褐家鼠携带的EHF病毒极易传给大白鼠。这些资料提示，实验大白鼠感染很可能是由褐家鼠传给的。

同时检测EHF病毒抗原和抗体的233只大白鼠，抗原抗体同时阳性者16只(6.87%)，抗原阴性抗体阳性者16只(6.87%)，未发现抗原

阳性抗体阴性者。这和文献<sup>[12]</sup>报道一致。

作者初步观察了EHF病毒抗原在大白鼠各个脏器中的分布，肺脏最易查见大量抗原，这一点和Lee报道<sup>[12]</sup>的完全一致；作者见到肾脏有灶性分布的IF颗粒，未见到脾脏有IF颗粒，这一点和Lee氏报道的不一致，是否与各自观察的大白鼠感染天数不同有关，有待研究。

作者观察到，雌性大白鼠的EHF病毒感染率(15.79%)显著的高于雄性大白鼠(7.63%)，( $\chi^2=4.09$   $P<0.05$ )其原因尚待研究。

### 摘 要

1984年8~10月，作者对广州地区实验大、小白鼠EHF病毒感染情况进行了调查研究，共采集大白鼠296只，每只都采集了肺组织标本，EHF病毒抗原阳性率为6.08%。296只大白鼠中有233只在采集肺组织标本的同时采集了血液标本，EHF病毒抗体阳性率为13.73%。同时采得肺组织和血液标本的233只大白鼠中，EHF病毒抗原或/和抗体阳性者32只，感染率为11.49%，其中抗原抗体同时阳性者16只，阳性率为6.87%，抗原阴性抗体阳性者16只，阳性率为6.87%，未发现抗原阳性而抗体阴性者。发现雌性大白鼠EHF病毒感染率显著的高于雄性大白鼠。对大白鼠感染的EHF病毒来源进行了讨论。采集小白鼠786只，肺组织EHF病毒抗原全部阴性，未采集血液标本检测EHF病毒抗体。

### ABSTRACT

An investigation that EHF virus infected rate on experimented mice and rats in Guangzhou area had been made from August to October 1984. Each lung tissues of 296 rats and 233 blood samples of these rats were collected simultaneously to detect EHF virus antigen and antibody. The result shows that positive rate of the antigen of lung tissues is 6.08 percent and antibody of blood samples is 13.73 percent separately, and that there were 32 rats whose antigen and/or antibody are positive with infection rate 11.49 percent. The rats both antigen and antibody were positive, turned out to be sixteen in Number consisting of 6.87 percent infected rate. 16 rats were detected antigen negative and antibody positive and consisted of 6.78 percent infected rate. The study shows that infected rate of EHF virus is higher in female rats than in male.

All of 786 mice lung tissues collected to detect the antigen, the antigen gave negative result but antibody had not been done.



## 参 考 文 献

1. 刘津成: 全国流行性出血热防治座谈会资料, 1983
2. 郝瑞峰等: 广州医药, 15(2): 7~10, 1984
3. 广州市卫生防疫站: 内部资料, 1985
4. 陈化新: 公共卫生与疾病控制杂志, 1: 1~2, 1982
5. Ho Wang Lee et al: J Infect Dis, 137: 298, 1978
6. Umenai T et al: Lancet, 1: 1314, 1979
7. 宋干: 全国流行性出血热防治座谈会资料, 102~108, 1983
8. 王成怀译: 国外医学, 11: 548, 1979
9. Ho Wang Lee et al: J Infect Dis, 146: 645~651, 1982
10. 王国栋等: 全国流行性出血热防治座谈会资料, 1983
11. 米尔英等: 全国流行性出血热防治座谈会资料, 1983
12. Ho Wang Lee et al: J Infect Dis, 146: 638~644, 1982
13. 广州市卫生防疫站: 内部资料, 1985
14. 刘树国等: 广州市卫生防疫站, 内部资料, 1985

(参加本工作的还有林卓鹰、郭荣同、李钊华、张威等同志。广州医学院等12个单位协助采样。流研所严玉辰副教授, 陈化新副主任进行了技术指导。军事医学科学院五所四室主任李钟铎对本工作结果进行了鉴定。在此一并致谢)

## 介绍一种保存钩端螺旋体毒力的简易方法

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 朱桂凤 聂第楷

如何保存钩体毒力, 是一个急待解决的问题。多年来, 国内外一些学者研究了冷冻真空干燥和液氮保存法。但这些方法需要昂贵的仪器设备, 操作较复杂, 因此未能广泛采用。我们曾就这个问题进行了探索, 目的在于寻找保存钩体毒力的简易方法, 现报告于下。

## 一、培养基:

1. 半固体培养基: 即Терских液体培养基中加入0.25%琼脂, 具体作法是以10%磷酸盐缓冲液为基础, 然后加入琼脂0.25%, 煮沸10分钟, 过滤, 经15磅高压蒸气消毒30分钟, 待冷至56°C时加入预先加热37°C的12%健康灭活兔血清(最好用3只家兔以上的混合血清), 充分混匀, 迅速分装于试管(15×1.5cm), 每管装5毫升, 置37°C孵箱过夜, 无杂菌生长, 备用。

2. 液体培养基: 将上述Терских培养基(不加琼脂)于250毫升三角烧瓶及20×2cm试管中分别分装100毫升及10毫升, 经15磅30分钟蒸气消毒后, 加入10%灭活兔血清, 备用。

二、试验方法: 试验用钩体菌株为黄疸出血群赖型, 菌株的原始来源系自四川钩体病患者赖××血液分离。将该菌株感染金黄地鼠后4~5天发病, 濒死时经无菌手续解剖, 用无菌镊子, 将肝组织挟碎, 用缓冲液培养基制成10%肝悬液。

取1毫升灭菌吸管, 吸取10%肝悬液0.2毫升穿刺接种于半固体培养基中, 置28°C孵箱, 培养5~7天后取出, 当钩体生长丰盛时, 在培养管液面下1厘

米处, 可见钩体生长特有的乳白色光环, 此时, 将试管棉塞换成经过煮沸灭菌的胶塞, 用前烤干胶塞上的水份, 防止试管壁上霉菌生长, 盖严胶塞。置室温(15~28°C)通风的暗处保存。同样, 将上述感染地鼠的肝悬液分别接种于三角烧瓶及试管液体培养基中, 种入量为10%(V/V); 培养及保存条件亦相同。

## 三、结果:

1. 用上述半固体培养基保存的20管黄疸出血群赖型钩体, 经过53个月后, 分别转种于Korthof培养基, 培养结果, 其中10管有钩体生长, 经试管2次转种后, 取第7天培养物1毫升注射于体重80克金地鼠腹腔内, 共注射10只, 感染后4~5天, 全部死亡, 解剖所见, 内脏出血, 尤以肺部出血典型, 腹膜黄染, 钩体病变典型。

与此同时, 将对照组, 即试管内传代(每2~6个月传1次)保存的同型同株钩体接种于体重相同的金地鼠10只, 结果全部存活, 解剖后未见病理改变。

2. 用上述液体培养基保存的10瓶黄疸出血群赖型钩体, 经过30个月后, 分别转种于Korthof培养基, 培养结果, 其中6瓶有钩体生长, 用该菌液攻击金地鼠10只, 4~5天后全部死亡, 解剖所见, 均有钩体典型病变; 但上述液体培养基保存的14管同型钩体, 经过相同时间后, 转种结果, 无1管生长钩体。

试验结果表明, 保存钩体毒力最简单的方法是用半固体培养基在试管内培养和室温保存为佳; 如果用液体培养基, 则以三角烧瓶(250毫升三角烧瓶分装培养基100毫升)进行培养和室温保存为宜。