

新疆出血热病毒在原代小鼠肾 细胞上生长特性

新疆自治区防疫站

冯崇慧 王冬莉 高琦

1980年我们将新疆出血热病毒(XHF)适应于原代幼鼠肾细胞,该病毒能稳定地在幼鼠肾细胞上传代,回接乳鼠能引起典型发病。本文就四株新疆出血热病毒适应传代及病毒在细胞中生长动态作一简要报道。

材料和方法

毒株:从病人血液分离的66019株,75001株和8004株;从亚洲璃眼蜱(*Hyalomma asiaticum*)中分离的66063株,同时用正常乳鼠脑平行传代作为对照。

细胞:2~3周龄幼鼠肾脏按常规消化后分装方瓶或带盖片的小瓶培养。生长液含10%小牛血清199液;维持液含2~3%小牛血清,pH7.6左右。

病毒的接种与传代:用10%感染鼠脑悬液按培养液1/10浓度接种入单层细胞,种毒后于37℃孵育5~8天后传代。传代时倒去上清液,加入1/3新的生长液,冻融三次后取带毒的细胞悬液种入新的单层细胞;正常鼠脑对照按同法传代。

病毒生长的观察:

1.包涵体的产生:逐日或隔日取出种毒的盖片,经甲醇固定后用Giemsa液染色观察包涵体产生的动态。

2.毒力的测定:

(1)对乳鼠的致病力:分别用细胞培养液和细胞冻融液接种1~4日龄乳鼠,观察其发病和死亡的情况。

(2)血清学试验:用反向被动血凝(RPHA)和补结(CF)试验测定细胞培养液中

和细胞内的抗原滴度动态。CF试验株用鼠脑乙醚抗原和细胞冻融上清作为抗原。

直接免疫荧光:以75001株脑腹联合途径免疫15~20克小白鼠,然后取混合的小鼠血清经硫酸铵法提取丙种球蛋白,用异硫氰酸荧光素标化后用于试验。

将种毒后不同时间的盖片取出,经冷丙酮固定后用鼠荧光血清染色,然后在Olympus BH₂型荧光显微镜下观察。试验设感染正常鼠脑细胞和正常小鼠肾细胞的对照。

抑制试验:用阳性免疫血清或恢复期病人血清经适当稀释后滴入细胞片上,于37℃孵育30~45分钟,然后再用鼠荧光血清染色观察。

结 果

一、感染细胞的变化:本次试验共使用不同来源的四株新疆出血热病毒,有的毒株在小鼠肾原代细胞上已传15~30代,虽RPHA的滴度逐渐上升,但始终未查见特异的细胞病变(CPE)。在未染色的标本上,种毒的、接种正常鼠脑的及正常细胞对照无法区别,当用Giemsa液染色时,种毒的细胞中很易找到胞浆内嗜碱性包涵体,它的大小,形态很不规则,一般于种毒后第三天即可找到,至第六~七天达高峰。在传代早期包涵体最先似出现于上皮细胞岛边缘的成纤维细胞中,在该类细胞中呈短杆状或三角形,随后在上皮细胞中逐渐增多,开始呈分散的不规则形的小块,多至十余块,以后逐渐集中增大呈不规则形的团块,有时包绕着核(图1,2)。

包涵体在单层细胞上呈局灶型分布,其数

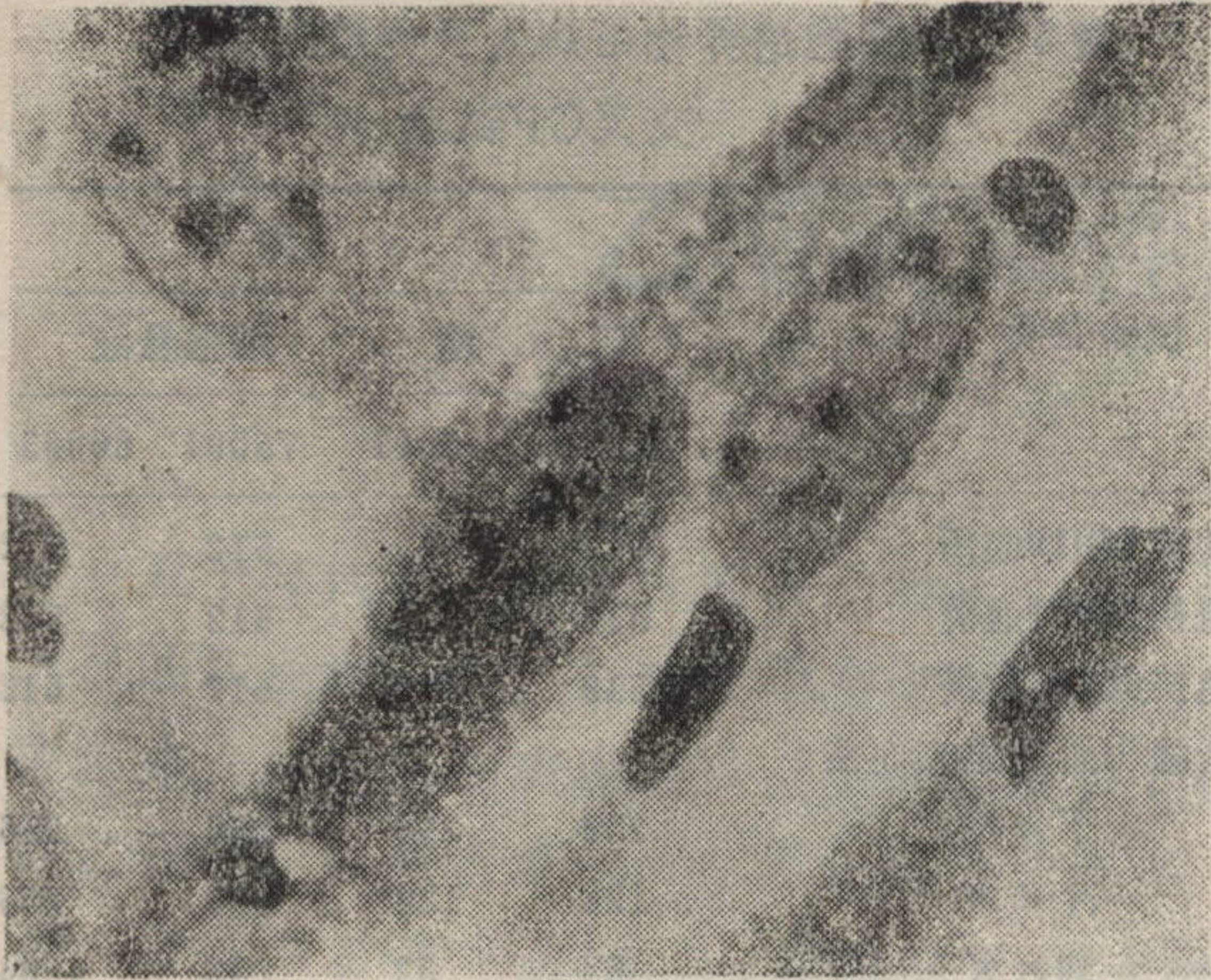


图1 XHF在原代幼鼠肾细胞上的嗜碱性包涵体(10×40)
Giemsa染色

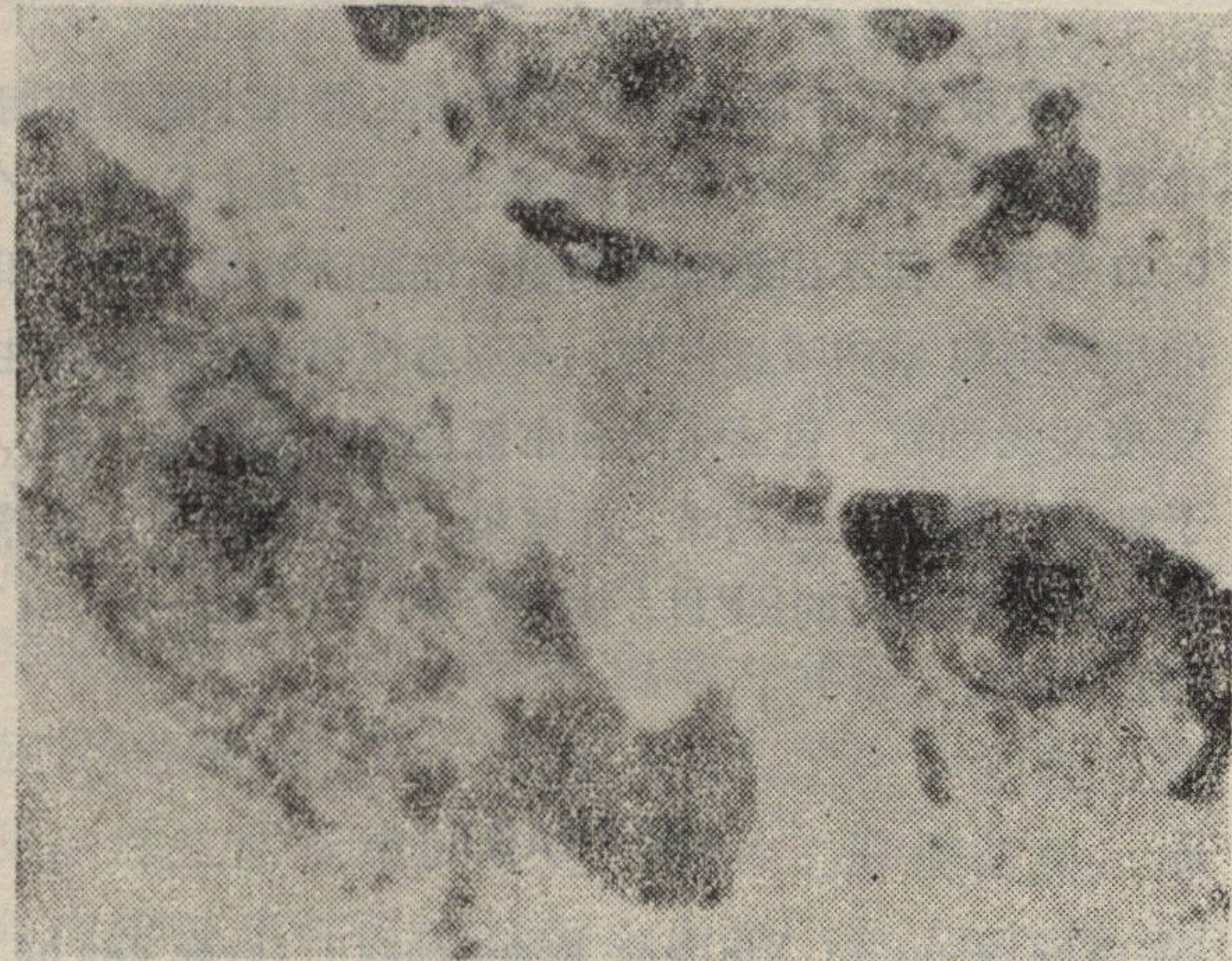


图2 XHF在幼鼠肾细胞上的嗜碱性包涵体(10×100)Giemsa
染色

量和出现的时间随传代次数增加而增多,出现的时间亦提早。75001株第25代种毒后第六天几乎在单层70%的细胞内均能找到包涵体;如果将种毒的细胞冻存或置液氮或冻干后再传代时,则包涵体的数量又减少,经传3~4代后才能恢复。

二、感染细胞中病毒的滴度:

1.在乳鼠中滴定:观察了75001株第23代的种毒细胞内逐日对乳鼠的致病力。试验结果表明细胞于种毒后48小时病毒已大量增殖,能引起乳鼠发病致死。将48小时的标本接种乳鼠六只,于种毒后第六天全部发病死亡。

又观察了第25代种毒后五天的上清培养液

和细胞内的病毒滴度分别为 $10^{-3.6}$ 和 $10^{-4.5}$ /0.01毫升。

2.RPHA滴度的动态:观察了75001株21代和66063株第4代细胞培养上清液中的RPHA滴度,同时用正常乳鼠脑第22代做对照。试验共进行两次,每次每株观察两瓶,取其RPHA的几何平均滴度列入表1。

表1 小鼠肾细胞种毒后上清液中
RPHA滴度动态

种毒后 天 数	RPHA几何平均滴度		
	75001株	66063株	正常鼠脑株
4	—	—	—
5	—	—	—
6	2	3.4	—
7	6	13.8	—
8	8.48	16	—
9	22.6	24	—
10	27.7	27.7	—
11	27.7	未做	—

3.CF滴度:新疆出血热病毒感染幼鼠肾细胞后的CF滴度不高,尤其是培养上清液中,当上清RPHA滴度达1:32~1:64时CF滴度仅1:2,有时甚至仍测不到;而细胞内的病毒滴度一般在1:8~1:16,此时RPHA可达1:1024。

三、小鼠肾细胞上形成的包涵体的特异性:

1.直接免疫荧光:出血热病毒接种于小鼠肾细胞后一般于第三天即能在胞浆中见到明亮的荧光颗粒,早期呈针尖状,散在于胞浆近核周围,有时呈圆形或不规则形,在单层细胞上呈局灶型分布,随着培养时间的增加,荧光颗粒增大,其形态和分布部位与包涵体一致(图3、4),于种毒后5~6天达高峰,此种荧光颗粒可被特异的免疫血清或病人恢复期血清所封闭。

在正常小鼠肾对照中或接种正常鼠脑传代细胞中均未见到类似的荧光颗粒。

2.血清学试验:取75001株及66063株细胞培养物与新疆出血热患者血清及动物免疫血

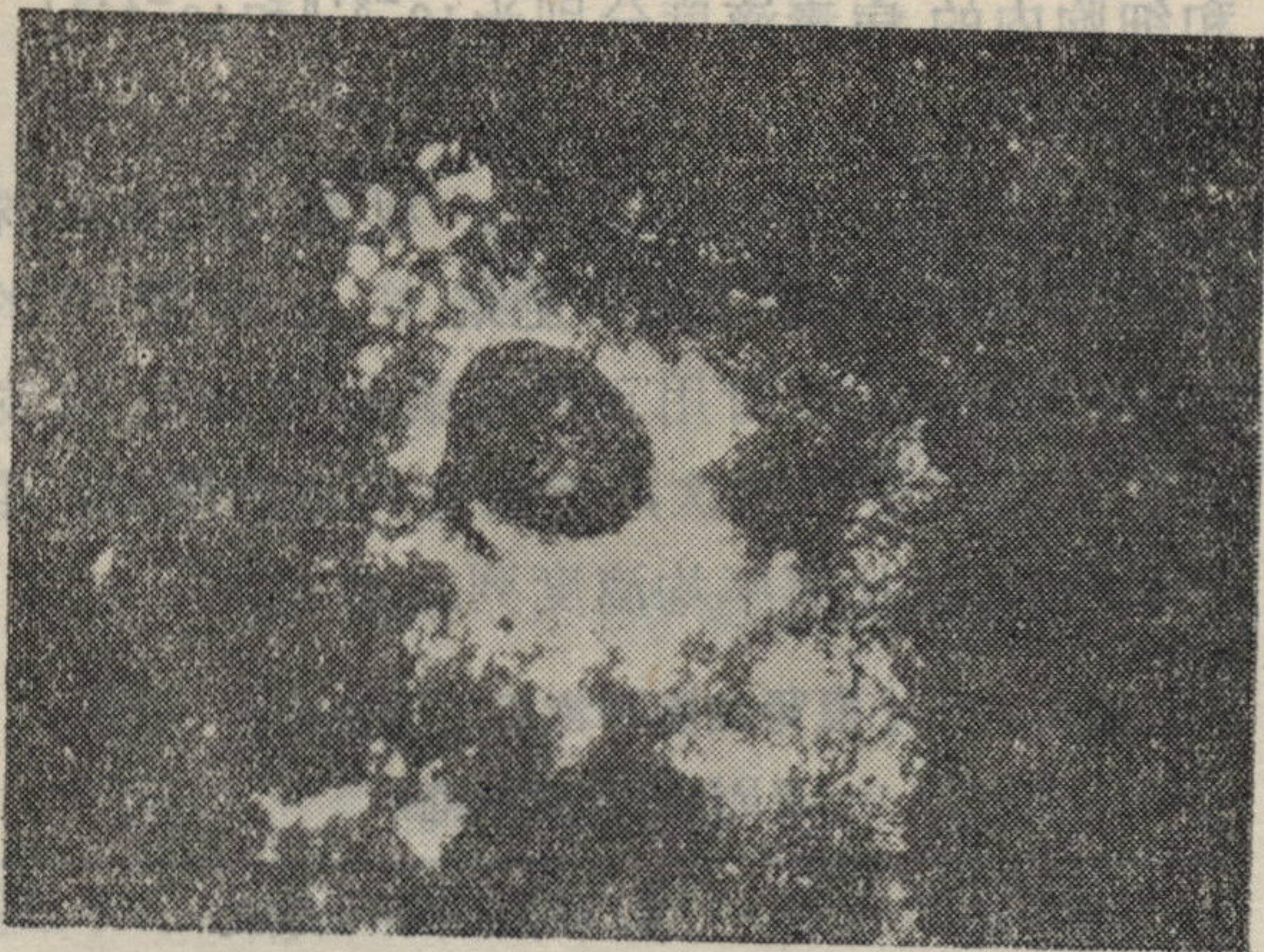


图3 75001株幼鼠肾原代细胞种毒后五天, 直接荧光(小鼠免疫血清)照片



图4 75001株第25代幼鼠肾原代细胞上的荧光颗粒(早期)
10×40

清的RPHI及交叉CF试验结果见表2、3。试验表明能在小鼠肾细胞上传代, 并形成嗜碱性包涵体的因子仍是新疆出血热病毒。

表2 75001株细胞抗原与阳性血清RPHI滴度

试 验 血 清	RPHI滴度
兔抗75001血清	1:16
兔抗66019血清	1:32
兔抗77008血清	1:64
新疆出血热患者血清	
丁××	1:32
冷××	1:16
兔抗正常鼠脑血清	—

表3 细胞培养物与病人及免疫血清的交叉CF试验

试验血清	抗 原			
	乙 醚		细胞悬液	
	66019	75001	75001	66063
兔抗66019血清	512	512	512	512
兔抗75001血清	512	512	512	512
兔抗66063血清	512	512	512	512
新疆出血热患者血清				
丁××	256	256	256	256
冷××	128	128	256	256
刘××	64	32	32	64
兔抗75001细胞株血清	128	64	64	128

摘 要

本文报道了新疆出血热病毒能在原代小鼠肾细胞中复制及传代, 细胞内的病毒滴度可达LD₅₀4.5/0.01毫升, 但不出现细胞病变。细胞于种毒后三天即能观察到胞浆内嗜碱性的、多形态性包涵体和特异性免疫荧光颗粒。包涵体的分布部位与荧光颗粒一致, 于种毒后5~6天达高峰。在感染的单层细胞中, 培养液上清和细胞内的RPHA滴度分别为1:32~1:64和1:1024。

ABSTRACT

The virus of Xinjiang hemorrhagic fever can be propagated and passaged in the primary Mouse Kidney cell cultures (2—3 week old).

The intracellular virus titre reached LD₅₀ 4.5/0.01ml. However, it did not express cytopathic effect. In the infected cells stained with Giemsa there appeared basophilic and polymorphic cytoplasmic inclusions from the third day after inoculation. The coverslip cultures were fixed with acetone and stained by fluorescein-labelled mouse anti-75001 strain antisera. The distribution of cytoplasmic granular fluorescence were the same as the inclusion bodies. The specific fluorescence in plasma of cells were strongest 5—6 days after infection. The antigen titre in culture supernatant and frozen-thawed cell suspension determined with RPHA test were 1:1024 and 1:32—1:64 respectively.