

新疆出血热的病原学与血清学研究

新疆维吾尔自治区卫生防疫站

冯崇慧 柴君傑 韩砚义 李华国 刘远恒 李文惠 吉杏生
刘雄飞 乔永寿 张玉辉 王山·努尔 高琦 刘捷 王冬莉

1965年4至5月在巴楚地区发现了一种原因不明,以发热出血为主要症状的急性传染病,发现病人11例,死亡10例。1966年3月,我站组成了调查组,从临床、病原、流行病学等方面在巴楚县阿克沙克马拉勒地区进行了大量深入的调查研究,详细的观察了五例不同类型的病人。分离到了14株对新生小白鼠(以下简称乳鼠)致病的因子。多年来在巴楚、阿克苏、巴州等地区又分离到了相同的病原,本文就新疆出血热病毒的生物学性状和血清学特点的研究作一简要的报道。

一、病毒分离概况:1966年4月下旬至6月底在巴楚县阿克沙克马拉勒地区采集了急性期病人血液,尸检肝、脾、肾、淋巴结,亚洲璃眼蜱等76份标本,用1~4日龄乳鼠分离病原,共分离到14株对乳鼠致病的因子。自1966年以后在南疆地区陆续进行防治工作中,从不同年份、不同地区的出血热患者血液以及疫区绵羊、野生动物等标本中又分离到28株病毒(表1)。我们将引起巴楚地区人类出血热的病原定名为新疆出血热病毒,病毒的编号以分离地点的缩写、分离年份及标本号表示,并以1966年巴楚县首例病人血液分离的BA66019株做为本病毒的原型株(Prototype)。这些毒株经初步血清学试验证明其抗原性与BA66019株基本一致。

二、对实验动物的致病性:

1. 新生小白鼠:新疆出血热病毒最敏感的实验动物是1~4日龄乳鼠,初代分离均用脑腹联合接种(脑内0.01毫升,腹腔0.03~0.05

表1 历年来新疆出血热病毒分离情况

| 分离年份 | 标本数 | 标本来源 | | | | | 分离地点 |
|------|-----|--------|------|-------|----|------|------|
| | | 急性期病人血 | 尸检脏器 | 疫区绵羊血 | 硬蜱 | 野生动物 | |
| 1966 | 14 | 4 | 6 | — | 4 | — | 巴楚 |
| 1968 | 6 | 2 | — | 2 | 2 | — | 巴楚 |
| 1969 | 4 | 4 | — | — | — | — | 巴楚 |
| 1973 | 5 | 5 | — | — | — | — | 巴楚 |
| 1975 | 3 | 3 | — | — | — | — | 阿克苏 |
| 1976 | 3 | 2 | — | — | 1* | — | 阿克苏 |
| 1977 | 3 | 3 | — | — | — | — | 阿克苏 |
| 1979 | 2 | 1 | — | — | — | 1 | 巴楚 |
| 1980 | 2 | 2 | — | — | — | — | 巴楚 |
| 总计 | 42 | 26 | 6 | 2 | 7 | 1 | |

注:—未分离 *巴州地区

毫升)。血液标本用肝素抗凝,脏器或节肢动物标本制成10~20%的悬液经低速离心后取上清接种。初代感染后潜伏期4~10天发病,经传2~3代后潜伏期缩短为4~5天,发病规律,死亡整齐;感染乳鼠先呈现兴奋、惊跳、弓背、平衡失调等,继而出现侧卧、衰弱、皮肤苍白而死亡。

2. 豚鼠:曾将首例出血热患者急性期血液腹腔接种350克左右的雄性豚鼠两只(每只1.0毫升),其中一只于接种后第八天发热(39.7℃)持续两天,并伴有松毛,不活泼,食量减少等症状,取其心血接种乳鼠仍能引起典型发病;另一只无症状,于接种后三周血清CF抗体达1:64以上。证明本病毒能引起豚鼠轻型或不显性感染。

3. 其他动物:对成年恒河猴、家兔腹腔或静脉注射只引起轻度不适。本病毒能在鸡胚

卵黄囊中生长增殖,引起胚胎死亡,但病毒滴度仅达Log LD₅₀4.0/0.3毫升。

4.细胞培养:新疆出血热病毒能稳定地在原代小鼠肾细胞上生长并传代,感染细胞于种毒后第三天用Giemsa染色可见到胞浆内嗜碱性包涵体,其形态多种多样,分布呈局灶型。包涵体分布的部位与免疫荧光所见的荧光颗粒部位一致。

三、病毒的某些生物学性状:

1.滤过性:曾将BA66019、BA66063、BA68037、BA68038、BA79121等毒株进行滤过试验,取典型发病的乳鼠脑组织制成20%悬液通过蔡氏滤器EK滤板,然后收集滤过液再接种乳鼠。试验证明本病原体能通过EK滤板,例如BA79121株滤前及滤后对乳鼠的滴度分别为Log LD₅₀7.0和2.84。

2.对脂溶剂的敏感性:试验用BA66019株发病乳鼠10%脑悬液分别与1/10容积的氯仿,1/5容积的乙醚及等量0.2%去氧胆酸钠混合振摇,置室温30分钟后接种乳鼠。结果试验组病毒滴度均≤Log LD₅₀1.0,对照组为6.0,证明本病毒对脂溶剂敏感。

3.温度:本病毒对温度的变化很敏感,于56℃30分钟可完全灭活,置4℃24小时后感染滴度显著下降;在低温状态下病毒比较稳定,鼠脑在50%中性甘油中置冰箱冰盒可保存6个月以上,冷冻真空干燥后放4℃可保存10年以上。

4.其他:以BA66019, Ha75001, BA66063等毒株感染的乳鼠脑悬液,按Clarke氏等法未查到血凝素。

5.电镜形态观察:用感染乳鼠脑海马回及原代小鼠肾细胞标本制备的超薄切片,经电镜观察其形态与布尼亚病毒科(Bunyaviridae)相似。

四、血清学性质:

1.CF抗体:新疆出血热患者病后可查到CF抗体,动态明显,于恢复期滴度上升可达16~64倍。但病后CF抗体出现晚,一般于

两周后才能测出,2~3个月达高峰,以后逐渐下降并维持在较低水平,可达6~7年以上(表2)。故CF抗体的测定只能用于临床的追溯诊断或血清流行病学调查,没有早期诊断意义。

表2 几例新疆出血热患者CF抗体持续时间

| 患者 | 发病年份 | 采血年份 | CF滴度 | 持续时间 |
|------|------|------|------|------|
| 70-1 | 1970 | 1975 | 1:8 | 五年 |
| 73-1 | 1973 | 1982 | 1:8 | 九年 |
| 76-1 | 1976 | 1982 | 1:4 | 六年 |
| 74-2 | 1974 | 1979 | 1:4 | 五年 |

2.中和抗体:1966年详细观察的五例病人双份血清中和试验,采用稀释病毒,固定血清于37℃水浴中和1小时后脑腹联合接种法,其结果见表3。试验表明中和抗体出现早,上升快,于病后第六天已能测出,至两周已达高峰。自1968年后均用乳鼠脑内途径做中和试验。1968年两例病人血清中和抗体一直很低,病程90天中和指数仍<50,而1966年的一例(66-3)在病后2年其中和指数仍达158.5,这可能与1968年后大剂量持续的使用皮质激素抢救治疗有关。

根据我们多年来的观察,一般轻型病人中和抗体均能测到,且能维持至少五年以上,而有些重型病例中和抗体的确不易测到(表4)。

五、与其他病毒的关系:

1.与乙组虫媒病毒的关系:将1966年从病人血液和亚洲璃眼蜱分离的四个毒株及其相应的豚鼠免疫血清与乙脑P₃株、森脑Coφ株和森脑新疆地方株作交叉补结试验和交叉中和试验,证明新疆出血热病毒与乙组虫媒病毒间没有抗原关系。

2.与淋巴脉络膜脑膜炎(LCM)病毒的关系:将LCM的E74001株蔗糖丙酮抗原及其豚鼠、家兔免疫血清与BA66019抗原、免疫血清和恢复期病人血清进行交叉补结试验,结果表明二者无关。

3.与CCHF病毒关系:以BA66019株的

表3 五例出血热患者双份血清中和试验结果

| 患者 | 试验毒株 | 病毒滴度 (Log LD ₅₀) | 双份血清中病毒滴度 | | 诊断依据 | 转归 |
|------|---------|---------------------------------|---------------|--------------|------------|----|
| | | | 第一份 | 第二份 | | |
| 66-1 | BA66019 | 5.36 | 5.33 (4天)* | 1.83 (6天) | 病毒分离 阳性 | 死亡 |
| 66-2 | " | " | 1.60 (7天) | 1.5 (19天) | 临床确诊 | 痊愈 |
| 66-3 | " | " | 4.5 (5天) | ≤1 (14天) | 病毒分离 阳性 | 痊愈 |
| 66-4 | " | 4.60 | 4.52 (2天) | / | 病毒分离 阳性 | 死亡 |
| 66-5 | BA66038 | 5.40 | 3.17 (9天) | / | 病毒分离 阳性 | 死亡 |

注: * 采血时发病天数; / 未做。

表4 七例出血热患者恢复期血清中和抗体的测定

| 患者 | 发病 年份 | 试验日期 | 病程 经过 | 病毒滴度 Log LD ₅₀ | 血清中病毒 滴度 | 中和指数 |
|------|----------|-------|----------|------------------------------|-------------|--------|
| 75-1 | 1975 | 病后35天 | 轻型 | 6.487 | 4.125 | 230.1 |
| 75-2 | 1975 | 病后13天 | 轻型 | 6.487 | 3.60 | 770.9 |
| 70-1 | 1970 | 病后5年 | 轻型 | 6.487 | 3.875 | 409.2 |
| 74-1 | 1974 | 病后1年 | 重型 | 5.8 | ≥4.5 | ≤19.95 |
| 74-2 | 1974 | 病后1年 | 重型 | 6.487 | ≥4.5 | ≤97.05 |
| 76-1 | 1976 | 病后3年 | 轻型 | 6.14 | 4.0 | 138.0 |
| 73-1 | 1973 | 病后6年 | 轻型 | 6.75 | 4.5 | 177.8 |

抗原与CCHF的刚果病毒免疫腹水K₂/61进行了CF、RPHI及ELISA双抗体夹心抑制试验,结果表明二者在抗原性上相似属内罗病毒属(Nairovirus genus),而与Bunya病毒属无关。

摘 要

本文报道了1966年在新疆巴楚县阿克沙克马拉勒公社一起出血热的爆发流行中,首次从病人血液、尸检脏器、亚洲璃眼蜱中分离到一种病毒,后来又继续从不同地区的类似病人,疫区绵羊及野生动物中分离到了多株抗原性相同的病毒。本病毒对新生小鼠致病,能引起规律死亡,潜伏期5天左右,其脑内滴度达LogLD₅₀6.5/0.01毫升;在原代小鼠肾细胞上形成嗜硷性包涵体。新疆出血热病人恢复期血清中可测到CF及中和抗体,二者可维持5~9年以上。血清学试验证实与乙脑、森脑、LCM病毒无关;用CF、RPHI及ELISA法证实与CCHF病毒抗原性相似,电镜形态学观察属布尼亚病毒科(Bunyaviridae)。

ABSTRACT

This paper describes the first isolation of a virus from the blood of patients, visceral materials on autopsy and from *Hyalomma asiaticum* during an outbreak of hemorrhagic fever which occurred in the commune of Akeshakemalale Bachu, Xinjiang, in 1966. The subsequent isolations of a number of virus strains with the same antigenicity were found from similar patients, sheep and wild animals in various affected areas. The virus isolated was pathogenic to new-born sucker mice and caused their regular deaths, with an incubation period of about five days and an intracerebral titre of-log LD₅₀=6.5/0.01ml. It formed basophilic inclusion bodies in the primary mouse kidney cell cultures. Both CF and neutralizing antibodies were detectable in the convalescent phase sera of patients with hemorrhagic fever, persisting over a period of 5-9 years or more. No serological relationship was demonstrated with Japanese encephalitis, spring-summer encephalitis or LCM virus; its antigenic similarity to CCHF virus was revealed by CF, RPHI and ELISA. The morphological observations by electron microscopy showed evidence that this virus was a member of Bunyaviridae.