

从病人分离的肾综合症出血热 (HFRS) 病毒的形态学研究

军事医学科学院微生物流行病学研究所

余澄之 王宏霞 李予川 何锦芳 宋光昌 李德荣 李钟铎 朱关福

1982年McCormick等及White等^[1,2]曾报道用梯度离心法提纯朝鲜出血热(KHF)病毒(Hantaan病毒76—118株)的细胞培养物,经负染色后在电镜下见到类似布尼亚病毒形态的颗粒,并用免疫电镜证实与KHF病毒有关。最近洪涛等^[3]用酶标记免疫电镜超薄切片技术观察到用Vero E-6细胞从我国黑线姬鼠和褐家鼠中分离到的中国流行性出血热病毒,并认为可能是一种类布尼亚病毒。我们应用铁蛋白标记抗体和酶标记抗体免疫电镜技术对用Vero E-6细胞从病人血液中直接分离到的肾综合症出血热病毒的形态作了观察,报道如下:

材料及方法

一、病毒及细胞

H-8205株及H-8278株病毒是用Vero E-6细胞分别从我国东北牡丹江地区和延边地区病人血液中分离,经免疫荧光特异性鉴定为HFRS病毒^[4]。

上述二株病毒感染的Vero E-6细胞经自身带毒传代(第14至第23代及第14至24代毒种接种Vero E-6细胞,浓度为 10^{-1} 至 10^{-3} , 0.5 ml/瓶)。感染后第15~20天取感染细胞作免疫荧光间接法检查为强阳性时,再用作电镜标本。

二、HFRS恢复期病人血清及标记抗体

病人血清取自302医院一名HFRS恢复期患者石××,荧光抗体滴度为1:2560。

羊抗人IgG免疫血清由本所免疫室提供,琼脂双扩散效价为1:64,经硫酸铵盐析法纯化后使用。

铁蛋白(上海生化所产品)标记羊抗人IgG免疫球蛋白结合物按Otto(1974)介绍的戊二醛二步法制备^[5]。

辣根过氧化物酶(美国Sigma厂产品, VI型)标记羊抗人IgG免疫球蛋白结合物按Avrameas(1971)介绍的戊二醛二步法及Nakane等(1974)介绍的过碘酸钠氧化法制备^[6,7]。

三、电镜标本

从培养瓶上刮下细胞,低速离心使细胞呈小团块,缓慢加入过碘酸钠—赖氨酸—多聚甲醛(PLP)固定液,固定一小时, PBS洗涤并浸泡二小时后,加1:10稀释的HFRS恢复期病人血清在37℃孵育一小时, PBS冲洗三次,加标记抗体37℃孵育一小时, PBS冲洗三次, 3.1%戊二醛固定一小时。酶标记抗体染色标本则用0.05% 3,3-二氨基联苯胺(DAB)作用半小时,再用0.05% DAB—0.03%过氧化氢作用半小时。以下均按常规电镜标本制作法: 1%锇酸后固定一小时,依次丙酮脱水,环氧树脂812包埋,超薄切片,铅铀复染(部分酶标记染色标本仅作铅染), Philips400-T电镜观察拍照。

四、对照

①正常Vero E-6细胞; ②感染的Vero E-6细胞, ③感染的Vero E-6细胞+正常人血清+标记抗体。

实验重复进行三次。

结 果

在电镜下见到多数细胞呈不同程度的超微

结构改变：内质网扩张，高尔基氏器增生及扩张，糖原颗粒聚集，病变严重者，胞浆致密，或胞浆疏松，空泡化，最后细胞膜破裂，细胞崩解，细胞碎片散布于细胞之间。在细胞表面可见为免疫复合物及铁蛋白或酶反应沉淀物所包绕的单个病毒颗粒（图2,5），偶尔也有多个病毒颗粒聚集在一起。在崩解的细胞残片中及附近则常见多个病毒颗粒聚集的现象（图1）。这些颗粒呈圆形或卵圆形，偶呈不规则状，有双层膜结构，表面有不明显的突起。有的颗粒呈现不连续囊膜，有小孔通过其间（图1）。我们测量了32个清晰的颗粒大小，平均直径为108nm，最小的一个铁蛋白标记颗粒仅50nm，最大的有156nm，其余的均在84nm至140nm之间，100nm以下的颗粒占1/5。颗粒内部为疏松的细颗粒及微管状结构，依切面的不同呈小圆圈状或条管状（图1,5）。在解体的细胞基质中及靠近细胞表面的空泡内也见到少数铁蛋白或酶反应阳性颗粒（图4,6）。两株病毒在形态上未见差别，仅H-8278株可见的病毒颗粒数比H-8205株要少。对照组均未查见铁蛋白或酶反应阳性的类似颗粒。

讨 论

自1978年Lee等从黑线姬鼠肺组织分离出朝鲜出血热病毒并传代成功之后，肾综合症出血热病毒的研究才获得突破。而该病毒形态学的研究除了有将肺Ⅱ型上皮细胞内的晶状结构、污染的肠道病毒和支原体误判为肾综合症出血热病毒颗粒的报道已被否定外，其他报道尚未得到进一步证实。

在对肾综合症出血热病毒的形态学研究刚刚开始，且培养物内的病毒滴度很低的情况下，以常规电镜技术来确认病毒显然有一定困难。我们应用铁蛋白及酶标记抗体免疫电镜技术，既可通过病毒颗粒的抗原性来识别少数的病毒颗粒，又可观察到病毒颗粒本身的形态特征，还可见到病毒颗粒与感染细胞之间的一些关系。对从病人血清中直接分离到的两株病毒

（H-8205及H-8278株）的形态学观察结果表明，所见颗粒均与HFRS病人恢复期血清呈特异性阳性反应，并具有在超薄切片上所见病毒颗粒的基本形态。因此，我们认为所见颗粒为肾综合症出血热病毒。

我们所见到的病毒颗粒较文献中报道的布尼亚病毒要大^[8]，比洪氏描述的颗粒又略小^[3]。颗粒的大小变动范围则更大。从颗粒的大小及变动范围来看介于布尼亚病毒和沙粒病毒之间，但颗粒内部未见沙粒样结构特点，也无从表膜芽生的图象^[9]。

布尼亚病毒的特点之一是通过高尔基氏器囊泡或内质网池芽生成^[10]，在我们的观察中未能见到。这可能与病毒滴度低、标记抗体穿透完整的膜结构困难等因素有关。不过我们见到了在解体的细胞基质内及靠近表膜扩张的空泡内有被标记了的病毒颗粒，说明病毒颗粒有可能是通过芽生而进入空泡内的，所见颗粒结构也与布尼亚病毒相似^[11]。但要从形态上确定本病毒的分类还需要作进一步的研究。

摘 要

应用铁蛋白和辣根过氧化物酶标记抗体间接法染色免疫电镜超薄切片技术对经Vero E-6细胞从HFRS患者血清中直接分离出的二株病毒（H-8205及H8278株）的形态作了观察。在细胞胞浆基质内、胞浆空泡内及细胞外可见为铁蛋白颗粒或酶反应沉淀物附着的病毒颗粒，圆形或卵圆形，平均直径108nm，颗粒有双层膜及表面突起，膜上有小孔，颗粒内部为疏松的细颗粒状及微管状。两株病毒形态上无差别。对照组阴性。颗粒结构及在细胞内生长的特点与布尼亚病毒相似。

ABSTRACT

The morphological characteristics of two strains of HFRS virus (H-8205 and H-8278) were studied by indirect immunocytochemical staining with ferritin and horseradish peroxidase-labelled antibody on the ultrathin section by immunoelectron microscopy. The virus strains were isolated directly from patients suffering from hemorrhagic fever with renal syndrome in cloned vero (E-6) cells.

The virus particles were shown to be attached to the

ferritin particles and enzyme precipitate in the cytoplasmic matrix, intracellular vesicles and extracellular spaces. The average diameter of the virus was 108 nm. They were circular or oval in outline and coated by envelopes with many surface projections. In the viroplasm fine granular and microtubular structures were found. They had the Bunyavirus characteristic configuration. No morphological difference was found between these two strains. The control groups were negative.

参 考 文 献

1. McCormick JB et al; Lancet, 1 (8275):765, 1982
2. White JD et al; Lancet, 1 (8275):768, 1982

3. 洪涛等: 中华微生物学和免疫学杂志, 3(2):69, 1983
4. 李钟铎等: 中华流行病学杂志, (4):198, 1983
5. Otto H; J Immunol Meth, 3:137 1973
6. Avramcas S; Immunochemistry, 8:1175, 1971
7. Nakane PK et al; J Histochem Cytochem, 22:1084, 1974
8. Murphy FA et al; Intervirology, 1:297, 1973
9. Murphy FA; Comparative Diagnosis of Viral Diseases Vol 1 p 759-788 Academic Press, New York, 1977
10. Bishop DHL; Comprehensive Virology, 14:3, 1979
11. Ellis DS et al; Arch Virol, 70:189, 1981

(本文承蒋豫图教授, 黄志尚副教授审阅, 谨此致谢)

海南岛五指山地区恙虫病立克次体分离报告

海南黎族苗族自治州卫生防疫站 林世平 林一曼*

本地区位于五指山下, 属亚热带, 雨量充沛, 一年四季都有恙虫病病例发生, 但病期多集中于6~10月份, 8~9月份为高峰。海南岛地区自1956年开始报告有恙虫病以来, 累计病例近万例, 多以临床学、血清学证实, 特别在我州尚无病原体分离报告。

病例: 1984年8月2日发现一广东籍岛外战士樊某上山砍柴后突然发病, 热度达38.7~40.2°C, 右腋有一焦痂, 腋下淋巴结肿大, 肝于锁中线肋下约2.5厘米, 血清OXk \geq 1:320, 其余检验和临床表现均符合

恙虫病。

立克次体分离: 患者发病后一小时采静脉血接种小白鼠, 接种后第8天小鼠出现症状, 第10天病死, 腹膜涂片Giemsa染色, 见大单核细胞核旁胞浆内有聚集或分散之立克次体, 取肝脾腹水传第2代小鼠, 均于第7天呈典型发病, 初步判定分离株为恙虫病立克次体。后送广州军区卫生防疫所进一步鉴定为恙虫病立克次体。

*现调深圳市卫生防疫所

鲍氏14型志贺氏菌引起的腹泻一例报告

山东省卫生防疫站 刘齐家

我们于1982年9月从省千佛山医院肠道门诊患者中分离出一株鲍氏14型志贺氏菌, 患者男性, 30岁, 于9月9日因腹痛、腹泻、来院就诊, 实验室检查: 粪便稀, 直接镜检无异常发现, 取粪便标本接种EMB琼脂培养基37°C 18~24小时, 有少许透明、无色、较小的菌落生长, 移种到克氏双糖铁琼脂斜面18~24小时培养, 反应为-/+; 硫化氢阴性; 发酵葡萄糖产

酸不产气, 不发酵甘露醇、乳糖、蔗糖、水杨苷、卫矛醇、鼠李糖; 靛基质试验阴性; 动力阴性; 不分解尿素; 不利用枸橼酸盐; 甲基红试验(+); VP(-)。与兰州生物制品研究所出品之志贺氏菌属分型血清的鲍氏多价Ⅲ及鲍氏14型血清发生强凝集反应, 与其它因子血清呈阴性反应, 从而确定为鲍氏(Boydii)14型志贺氏菌。

从病人分离的肾综合症出血热 (HFRS) 病毒的形态学研究

(正文见119页)

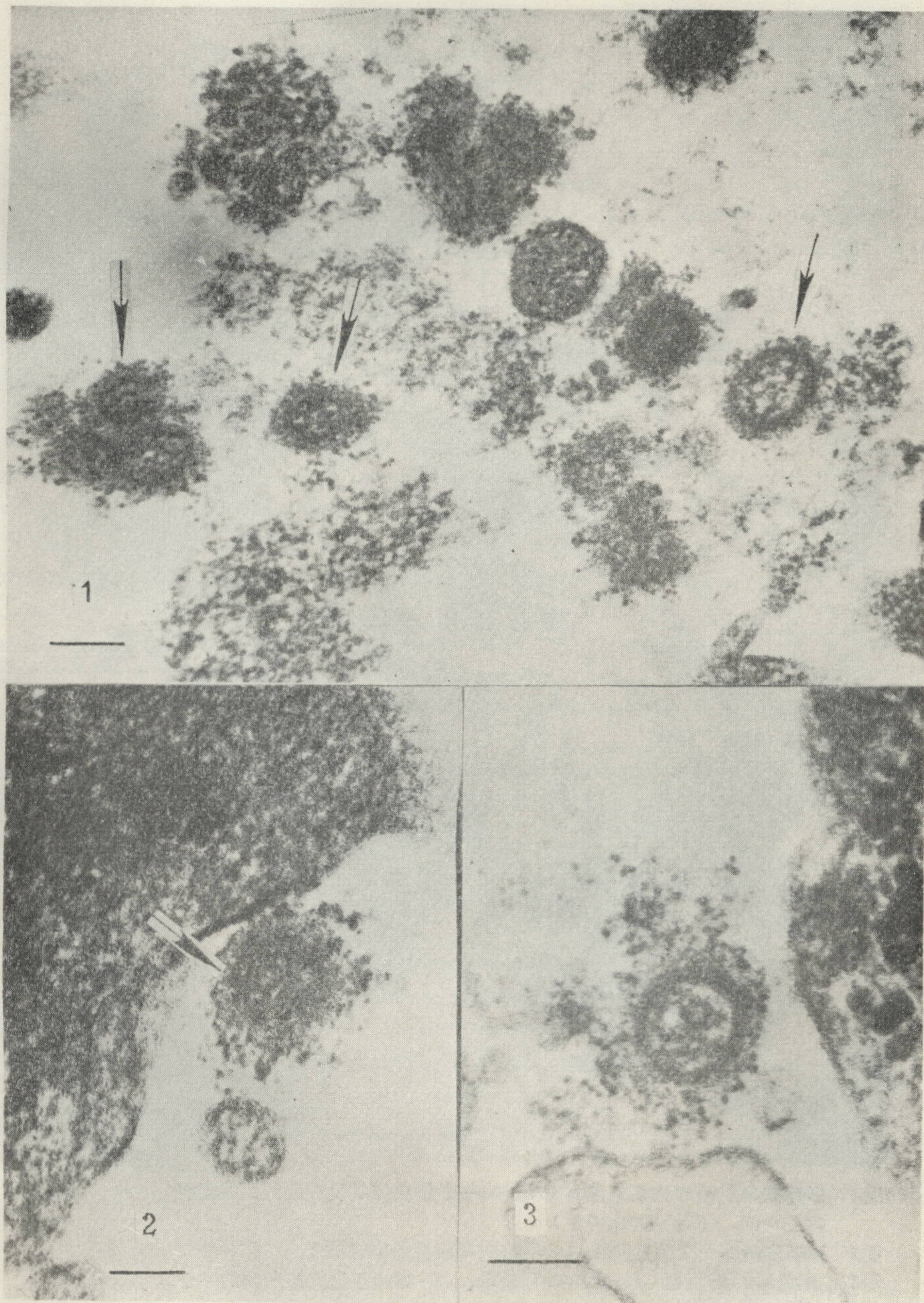


图1 细胞外数个呈免疫铁蛋白反应阳性的肾综合症出血热病毒颗粒 (→) 右侧一个可见囊膜不连续, H-8205株。
图2 细胞表面的一个呈免疫铁蛋白反应阳性的病毒颗粒 (→)
图3 一个免疫铁蛋白阳性反应的病毒颗粒, 图中标尺均为100nm

(正文见119页)

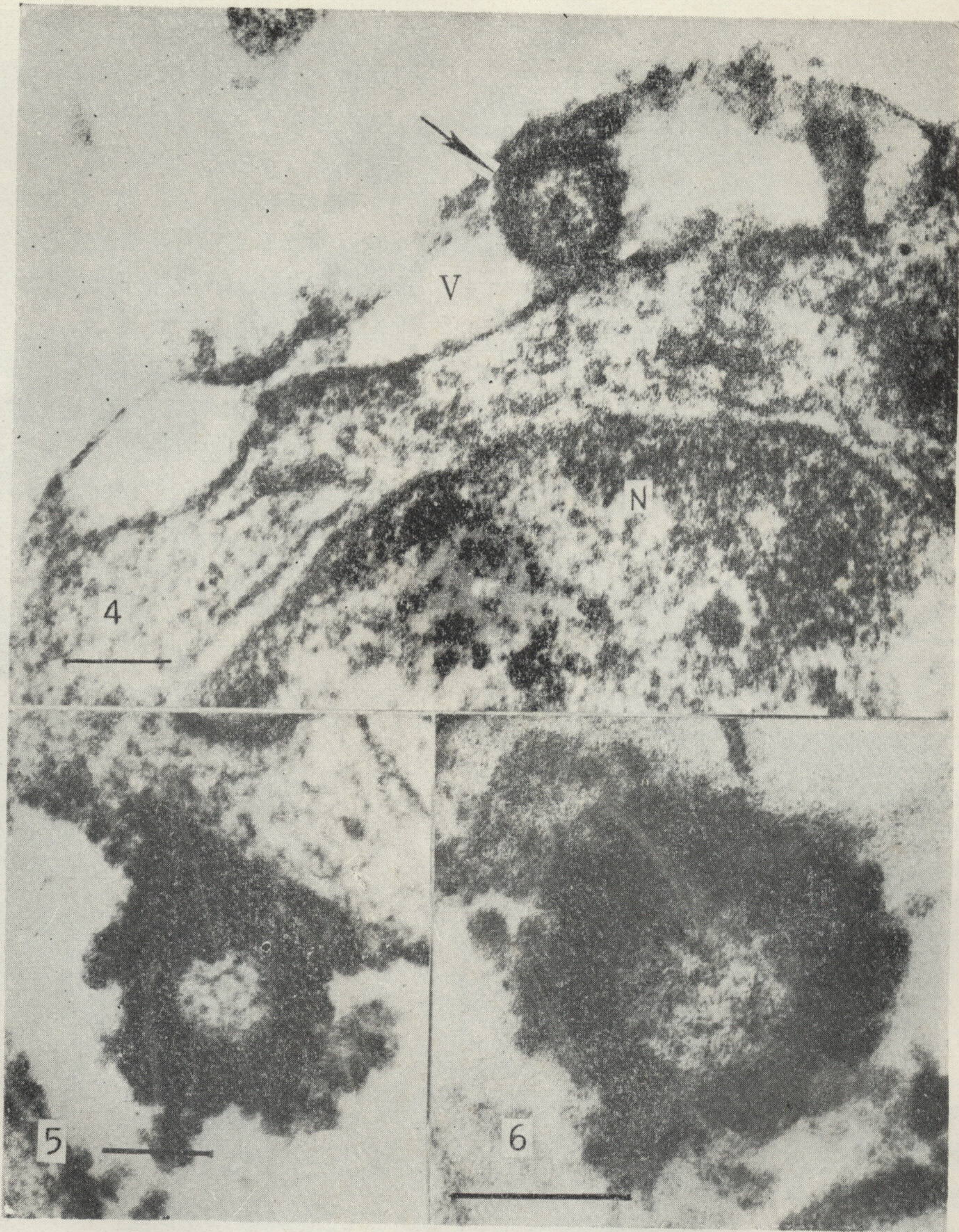


图4 靠近细胞表面的胞浆空泡内 (V) 的一个呈免疫酶反应阳性的肾综合症出血热病毒颗粒 (→), 下为细胞核 (N)

图5 细胞表面的一个免疫酶反应阳性的病毒颗粒 (单铅染)

图6 感染HFRS病毒 (H-8278株) 的Vero E-6细胞胞浆基质内的一个呈免疫酶反应阳性的病毒颗粒。