

海捕毛蚶中分离到甲型肝炎病毒

山东省卫生防疫站* 李爱萍 谢慰杖 赵世立 陈伟 宋伟涛 王宇露 王少军

提要 应用电镜和超薄切片技术、免疫荧光(IF)试验、酶联免疫试验、核酸分子杂交技术、病毒感染滴度测定及中和试验等方法,直接从海捕毛蚶中检测和分离到三株甲肝病毒(HAV),并在人二倍体(2BS)细胞上稳定传代,感染滴度在 $4.0 \sim 5.0 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 之间。初步结果证实,海捕毛蚶受污染并携带甲肝病毒,可成为甲肝流行的潜在危险因素。

关键词 HAV 毛蚶

经对73份海捕毛蚶标本的甲肝病毒检测,分离到甲肝病毒三株,证明海捕毛蚶产区有甲肝病毒污染。因此,应重视毛蚶的捕捞、销售和食用,以杜绝由食用毛蚶而导致甲肝的传播。

材料与方 法

一、标本来源及处理:毛蚶标本采自某沿海区域不同的40个点。三批共采集毛蚶73份,每20~30只毛蚶为一组,单只毛蚶平均重量约为15~20克。洗净外壳后取腮研磨制成30%的匀浆,经二次离心去沉渣上清液加等量氯仿反复提取浓缩,用 0.45μ 的微孔滤膜除菌,冰冻保存。

二、细胞:供分离病毒所用细胞为二倍体(2BS)细胞株。按常规法培养及传代。

三、HAV的分离及传代方法:见参考文献^[3]。

四、病毒检测与鉴定:病毒检测和鉴定试验主要采用电镜观察、间接免疫荧光(IF)试验、酶联免疫试验(双抗体夹心法测甲肝抗原)、核酸分子杂交技术、病毒感染滴度测定及中和试验等。

五、甲肝病毒株对温度的适应性:将病毒感染的2BS细胞放置 37°C 、 35°C 和 32°C 中培养,定期用IF检查。

结 果

一、病毒分离培养与传代:将毛蚶提取液用ELISA法或电镜负染观察到27nm大小甲肝病毒颗粒的四份标本,接种2BS细胞维持培养至50天,IF法检查阴性,感染细胞冻融后盲传第二代,培养到4周时IF法检测,发现有三份标本(标本号为8、19、25号)的部分感染细胞浆内出现甲肝病毒砂粒样荧光颗粒,至5周时荧光颗粒强度达++,阳性细胞广泛度约60%。8、19号标本第三代接种感染后2周,荧光强度为++,广泛度为60%。而25号标本接种感染3周后出现荧光颗粒,强度为++,广泛度为50%。三份标本经传代于4周后,荧光检查细胞感染率可达90%以上(附表)。

附表 三株病毒在第三代2BS细胞上检测结果

毒株编号	接 种 周 数				
	1	2	3	4	5
8	-	++	+++	+++	+++
19	-	++	+++	+++	+++
25	-	+	++	+++	+++

分离到的三株病毒在2BS细胞均能稳定传代,潜伏期5~7天,增殖高峰期3~4周,病毒增殖仅局限于细胞浆内,培养过程中未见细胞

病变，用酶联免疫试验检测细胞培养上清液未检测出甲肝病毒抗原。

二、病毒感染细胞增殖动态观察：将培养物接种2BS细胞，每隔4~5天换液并观察，定期用IF法测定。结果：在细胞感染后第2周开始出现荧光颗粒，第3~4周病毒增殖迅速，第4~5周后病毒感染达到高峰。培养时间延长病毒产量无明显变化。

三、核酸分子杂交试验：由中国预防医学科学院病毒研究所提供检验结果。共计27份，阳性5份。所分离的三株病毒，核酸分子杂交皆阳性。表明病毒分离与核酸分子杂交试验结果一致。

四、病毒特异性鉴定：分离出的三株病毒与病人恢复期血清作中和试验，其中有二株(8、19号)中和抗体滴度为1:80，另一毒株为1:20。

五、甲肝病毒温度适应性：将感染的2BS细胞置37℃、35℃和32℃中培养，经30天细胞形态良好，定期用IF观察，荧光强度都在+++以上，感染率95%以上。

六、电镜观察：在电镜下可观察到大量直径为27nm的甲肝病毒颗粒。超薄切片电镜下可见感染细胞胞浆空泡内有典型的27nm大小空心或实心的甲肝病毒颗粒，并观察到许多病毒成分成团聚集在空泡边缘部位。

讨 论

本文报告我省首次应用细胞培养从海捕毛蚶中分离出能稳定传代的甲肝病毒，该病毒在长期传代培养中不引起细胞病变，培养上清液病毒测定阴性，病毒经传代适应后其繁殖周期逐步缩短，这些特点与国内外的有关报告一致。

免疫荧光观察，病毒增殖部位在胞浆内，清晰明亮的特异性荧光颗粒多聚在核周围。培

养获得的毒株，在电镜下观察到的形态特征与提取液中的形态完全相同，病毒颗粒大小为27nm，有空心或实心。

为研究所获毒株的感染力，我们采用了免疫荧光技术作了感染力测定。实验结果表明，甲肝病毒在2BS细胞中的感染力最初较低，随着传代增加，其感染力也逐渐增强。从病毒感染细胞增殖动态曲线观察，在第二周开始上升，第五周达高峰。在通常情况下，于接种后第三、五周进行病毒传代或判定血清学结果较为恰当。

从海捕毛蚶中培养分离到的三株甲肝病毒，在细胞培养上增殖潜伏期短，适应生长快，感染滴度较高，目前在人二倍体细胞上已稳定传五代，这对研究和预防由食用污染毛蚶致甲肝流行有重要意义。此项工作还表明，电镜技术用于贝类生物传播病毒性疾病的早期诊断方面具有一定价值。

(承蒙中国预防医学科学院病毒研究所刘崇柏、李景元、汪元提供核酸杂交试验结果，特此致谢；参加本项工作的还有张延学、桑卫兵、苏胜利、张理)

Isolation of HAV from Sea Clam *Li Aiping, et al., Shandong Provincial Hygiene and Epidemic Prevention Station*

Three strains of HAV were isolated directly from clams (*Arca Subcrensta Lischke*) collected from sea with cell culture and identified by electron microscopy, immunofluorescent test, ELISA, HAV-cDNA hybridization and neutralization test. The strains were stably passed in 2BS cells with the titer of 4.0~5.0 TCID₅₀/ml. Results indicated that the clams were contaminated by HAV and may cause an outbreak of hepatitis A.

Key words HAV Sea Clam

(1991年8月15日收稿，同年12月1日修回)