

流行性出血热疫区黑线姬鼠带毒检查及鼠肺抗原在诊断中的应用

陈化新^{*} 唐文廷^{**} 刘学礼^{***} 严玉辰^{*} 纪绍忠^{*} 姜克俭^{##}
张桂云^{*} 李大勤^{*} 李燕婷^{*} 李泽林[#] 唐家权^{*} 高守一^{*}

我国学者自50年代开始,对流行性出血热(EHF)流行病学和黑线姬鼠的生态学进行了调查分析,提出黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)与EHF流行有密切关系^[1,2],这种鼠是本病的传染源或主要贮存宿主^[2~4]。但由于EHF病毒难以分离培养,长期缺乏特异性诊断方法,对本病流行病学上提出的一些推测(如传染源和传播途径等)也得不到证实,对于预防措施的采取更缺乏针对性。1978年李镐汪等首次从南朝鲜出血热(KHF)疫区黑线姬鼠朝鲜亚种(*Apodemus agrarius coreae*)分离到KHF抗原^[5]。我国也用黑线姬鼠、A-549细胞和Vero细胞分离传代EHF病毒成功^[6~9]。为了从病原学上证实疫区黑线姬鼠的流行病学意义,探索血清流行病学调查和临床诊断方法,我们用间接荧光抗体技术(IFAT),对四川省达县EHF疫区黑线姬鼠淡色亚种(*Apodemus agrarius pallidior*)作了携带EHF病毒抗原的检查,发现14.8%的鼠阳性。为确定鼠肺EHF抗原的特异性,做了免疫荧光(IF)阻断试验。同时利用这种鼠肺抗原和A-549细胞抗原对EHF病人血清进行血清学诊断的比较研究。

材料和方法

一、黑线姬鼠来源:于1980年12月EHF流行高峰时,在四川达县疫区用挖洞法捕获活的黑线姬鼠,立即送到解剖室用乙醚麻醉剖取肺脏,放无菌试管内封口,置-196°C液氮冷藏罐中保存,共捕获406只黑线姬鼠。用IFAT逐个检查每只鼠肺的冷冻切片,IF阳性鼠肺切片用作抗原。

二、A-549细胞抗原:用IF阳性的EHF疫区黑线姬鼠(陕西周至县捕获)肺组织悬液,通过非疫区黑线姬鼠传至第8代,取肺组织悬液感染A-549细胞,获得A9株EHF病毒细胞抗原。A-549细胞的病毒感染率达到50%以上。

三、人血清:EHF病人血清来源于陕西省、四川省和吉林省疫区。正常人(包括非出血热病人)血清来自首都医院和河南省巩县、登封县等。

四、病毒免疫血清:抗KHF病毒免疫血清和抗呼肠孤病毒I、II、III型混合血清,分别来自美国卫生研究院和美国疾病控制中心,均由医科院病毒所提供。抗类似环状病毒血清由本实验室制备。

五、鼠肺抗原制备:将黑线姬鼠肺组织包埋在切片机之冷冻台(-20~-40°C)上,切成4~5微米厚的薄片,将薄片贴附在印有10个圆区(孔)的载玻片上,干燥后用冷丙酮固定7~10分钟,以pH7.2~7.4的0.01M冷PBS洗3次,再用无离子水洗2~3次,于室温吹干后装入标本盒,保存-70°C冰箱中备用。

六、IFAT:在10孔抗原载玻片上,逐孔滴加不同稀释度血清(出血热病人血清和正常人血清),置于37°C水浴中30~45分钟,取出用冷PBS洗3次,每次3~5分钟,再用无离子水洗2~3次,吹风使之迅速干燥,再逐孔滴加标记异硫氰酸荧光素的羊抗人IgG(上海生物制品研究所1980~81年出品,用4~8

*中国医学科学院流行病学微生物学研究所

**四川省达县卫生防疫站

***黑龙江省卫生防疫站

**陕西省卫生防疫站

*吉林省延边朝鲜族自治州卫生防疫站

个染色单位),该稀释的荧光血清中含1:2000伊文思兰。37°C水浴中结合30~45分钟,取出用PBS洗3次,再用无离子水洗3次,干燥后用Leitz的Orthoplan荧光显微镜,落下光系统观察。

结 果

一、疫区黑线姬鼠EHF病毒抗原的检查:

1980年12月下旬,在四川省达县亭子公社捕获黑线姬鼠202只,用IFAT检查每只鼠肺的冷冻切片,发现其中26只鼠肺组织中带有EHF病毒抗原,阳性带毒率为12.9%;在达县安仁公社捕获204只,34只阳性,阳性率为16.7%。两公社共检查406只黑线姬鼠的肺组织切片,计发现60只鼠带有EHF病毒抗原,平均阳性率为14.8%(表1)。镜检发现特异性荧光颗粒主要在肺泡上皮细胞质内,围绕细胞核外缘颗粒性荧光是主要的(图1),很少见到颗粒性荧光的融合现象。在强阳性的切片中,一个视野可

表1 疫区黑线姬鼠出血热病毒带毒率的检查

鼠来源	鼠种	被检数 (只)	阳性数 (只)	阳性率 %
疫区 A(亭子)	黑线姬鼠	202	26	12.9
B(安仁)	"	204	34	16.7
非疫区 A(汉中)	黑线姬鼠	23	0	0
B(内蒙)	长爪沙土鼠	31	0	0

以见到70%以上的肺泡上皮细胞出现特异性荧光颗粒;呈广泛性分布。在中等强度切片中,可见到10~50%细胞带有荧光颗粒;而往往呈灶性分布。弱阳性的片子中,一般仅见到5~10%细胞带有颗粒,但每个阳性细胞质内荧光颗粒并不少。阳性切片同正常人血清作对照检查,细胞中没有发现荧光颗粒(图2)。

二、确定鼠肺抗原特异性:

1. 利用鼠肺抗原检查EHF病人双份血清:在检出阳性鼠肺抗原之后,我们利用此抗原检查52例EHF病人双份血清,其中阳性43例,阴性9例,阳性率为82.7%(表2)。

从表2可见,5病日以内的急性期血清1:20

表2 鼠肺抗原对EHF病人双份血清的检查

地 区	病例	第一份血清		第二份血清		滴度 升高 倍数
		病日	抗体 滴度	病日	抗体 滴度	
四川 25例双份 血清,其 中6例阴 性	1	7	1:320	55	1:5120	16
	2	4	<1:20	40	1:1280	>64
	3	5	<1:20	41	1:80	>4
	4	6	1:20	34	1:320	16
	5	5	1:20	37	1:1280	>64
	6	6	1:20	42	1:320	>16
	7	3	1:80	46	1:1280	16
	8	9	1:80	42	>1:5120	64
	9	3	1:5120	41	>1:5120	
	10	5	1:20	49	1:1280	64
	11	3	<1:20	30	1:80	>4
	12	4	<1:20	41	1:320	>16
	13	4	<1:20	49	1:320	>16
	14	8	1:20	49	1:1280	64
	15	2	<1:20	41	1:1280	>64
	16	6	1:20	41	1:320	16
	17	5	<1:20	29	1:80	>4
	18	6	1:20	23	1:1280	64
	19	不明	1:80	不明	1:5120	64
吉林延边 11例双份 血清其中 3例阴性	1	7	1:20	18	1:1280	64
	2	5	<1:20	18	1:1280	>64
	3	4	<1:20	15	1:5120	>256
	4	6	<1:20	17	1:1280	>64
	5	8	1:80	19	1:5120	64
	6	4	<1:20	14	1:320	>16
	7	3	<1:20	14	1:80	>4
	8	5	<1:20	16	1:80	>4
陕西 16例双份 血清全为 阳性	1	5	1:320	28	1:5120	16
	2	5	<1:20	15	1:320	>16
	3	5	1:320	18	1:5120	16
	4	5	1:320	19	1:5120	16
	5	5	1:80	17	1:320	4
	6	6	1:20	20	1:1280	64
	7	5	1:320	19	1:5120	16
	8	5	1:20	20	1:1280	64
	9	5	1:20	15	1:1280	64
	10	5	1:20	14	1:320	16
	11	不明	<1:20	不明	1:320	>16
	12	"	<1:20	"	1:320	>16
	13	"	<1:20	"	1:1280	>64
	14	"	1:80	"	1:5120	64
	15	"	1:80	"	1:1280	16
	16	"	1:80	"	1:5120	64

稀释一般为阴性,或为弱阳性;5日以上

者抗体水平迅速增高, 14~30天达较高水平。43例IF阳性的双份血清中, 抗体滴度增高16倍以上者有36例, 占阳性总数的83.7%, 增高64倍以上者19例占44.2%。4倍增高者6例占13.95%, 1例由1:5120增至>1:5120。

为了证实上述结果的特异性, 用同一鼠肺抗原, 检查了57份正常人(包括非EHF病人)血清, 各种不同稀释度均为阴性。

2. IF阻断试验结果: 为了确定鼠肺EHF病毒抗原的特异性和排除黑线姬鼠体内一些潜在病毒的可能, 用抗KHF病毒免疫血清和呼肠孤病毒I、II、III混合免疫血清以及类似环状病毒免疫血清, 做了IF阻断试验, 结果见表3。试验结果证明, 制备的鼠肺抗原是EHF病毒抗原, 排除了呼肠孤病毒和类似环状病毒。

3. EHF病毒鼠肺抗原和A-549细胞抗原

表3 鼠肺抗原免疫荧光阻断试验

阻断试验用 免疫血清	阳性血清稀释度				
	1:20	1:80	1:320	1:1280	1:5120
抗KHF病毒免疫血清	+	+	±	±	±
阳性血清*	+++	+++	+++	+++	+++
呼肠孤病毒I、II、III型 混合免疫血清	+++	+++	+++	+++	+++
阳性血清	+++	+++	+++	+++	+++
类似环状病毒免疫血清	+++	+++	+++	+++	+++
阳性血清	+++	+++	+++	+++	+++

* 阳性血清均系吉林省延边朝鲜族自治州地区典型EHF病人韩仁淑的血清

的比较: 两种抗原同时对EHF病人双份血清作检查, 结果(表4)表明, 黑线姬鼠鼠肺抗原与EHF病毒A9株的A-549细胞抗原对病人双份血清均有明显的动态表现, 说明两抗原具有相同的特异性, 其效果基本一致。而且细胞抗

原免疫荧光特点也为颗粒状^[8,9]与鼠肺抗原一致, 均系EHF病毒抗原。

讨 论

鼠肺冷冻切片的IFAT检查证明, 四川达县于EHF高峰期(12月)捕获的406只黑线姬鼠中, IF阳性鼠有60只, 阳性率为14.8%。李等报告南朝鲜KHF流行高峰在11月, 黑线姬鼠带毒率为7/60, 流行前期9月检查黑线姬鼠带毒率为26/71^[5]。中国四川流行高峰在12月份, 可以推测, 如果在流行前期捕检, 其阳性率可能更高。苏联学者在秋季捕检的欧洲棕背鼯, 带毒率达30%^[10]。

我们用疫区IF阳性黑线姬鼠肺切片作为抗原对52例EHF病人双份血清进行检查, 结果43例阳性。病人恢复期血清的抗体水平相当高, 比急性期血清抗体滴度高4~256倍, 增高16倍以上的占阳性例数的83.7%, 其中增高64倍以上的占44.2%。这与我国EHF病人血清用KHF抗原检查的结果一致^[11,12]。还可看出, 5病日以内病人血清1:20稀释多数为阴性,

表4 鼠肺抗原与细胞抗原比较

病 例	黑线姬鼠鼠肺抗原		A9株A-549细胞抗原	
	血清*	血清**	血清*	血清**
14	<1:20	1:320	1:20	1:320
15	<1:20	1:320	1:20	1:320
16	<1:20	1:1280	1:20	1:1280
17	1:320	1:5120	1:320	1:5120
18	1:80	1:1280	1:20	1:320
19	<1:20	1:5120	1:80	1:5120
20	<1:20	1:80	1:20	1:80
21	1:20	1:320	1:80	1:1280
22	1:320	1:5120	1:80	1:5120
23	1:20	1:1280	1:20	1:1280
24	1:1280	>1:5120	1:1280	>1:5120
25	<1:20	1:320	1:20	1:320
26	<1:20	1:80	1:20	1:320
27	<1:20	1:320	1:20	1:320

* 第一份血清 ** 第二份血清

5病日后抗体水平迅速上升,14~30天即可达到高峰。这与Friman等报告的结果基本一致[13]。早年的人体试验证实,5病日以内的血液具有感染性[14]。用病人血液分离病毒,应注意在5病日内采取血标本。

我们用A9株EHF病毒A-549细胞抗原和鼠肺抗原,同时对病人双份血清作检查,证明两种抗原具有相同的特异性。

研究结果表明,不论鼠肺抗原还是细胞抗原均可用于血清流行病学调查和本病的诊断。IFAT是特异性较高快速简便的方法。但是,患者血清特别是经过稀释的血清,反复冻融后抗体水平可大幅度下降,如不注意这一点,有时会得出错误的结果。高质量的羊抗人IgG荧光抗体和荧光显微镜是发现EHF病毒抗原的重要条件。

小 结

从四川省达县EHF疫区捕获406只黑线姬鼠,经鼠肺冰冻切片IFAT检查,发现60只鼠带有EHF病毒,阳性率为14.8%,证明黑线姬鼠淡色亚种是EHF重要传染源。EHF鼠肺抗原与A-549细胞抗原比较,以及IF阻断试验证实其特异性,并可排除其他一些已知病毒。

将EHF病毒鼠肺冰冻切片抗原用于病人血清诊断取得了满意的结果。共检测的52例

EHF病人双份血清,阳性率达82.7%。恢复期血清抗体滴度比急性期增高16倍以上者达83.7%,64倍以上者达44.2%。由此可见,疫区自然感染EHF病毒的黑线姬鼠肺抗原可用于病人血清诊断和血清流行病学调查。

(本文照片由军事医学科学院照像室摄制,特此致谢)

参 考 文 献

- 1.黄祯祥:流行性出血热调查研究资料汇编,中国林业出版社,1~96,1956。
- 2.中国医学科学院流行病学微生物学研究所等:流行性出血热疫区灭鼠方法的初步探讨,内部资料,1974。
- 3.谭明文等:淮南出血热流行区黑线姬鼠的数量变动及种群年龄组成,内部资料,1973。
- 4.中国医学科学院流行病学微生物学研究所等:九种毒鼠药毒杀黑线姬鼠的实验研究,内部资料,1976。
- 5.Lee HW et al: J Infect Dis, 137: 298, 1978.
- 6.流行性出血热病原研究协作组:流行性出血热病原学研究Ⅲ。流行性出血热病毒分离和初步鉴定,全国流行性出血热防治科研工作座谈会资料汇编,1981。
- 7.宋干等:中国医学科学院学报,4(2): 73, 1982。
- 8.严玉辰等:中国医学科学院学报,4(2): 67, 1982。
- 9.严玉辰等:中华流行病学杂志,3(4): 197, 1982。
- 10.Носков ФС и др: Вopr Вирuсол, 2: 207, 1981.
- 11.Lee PW et al: Lancet, 1: 819, 1980.
- 12.Lee PW et al: Lancet, 1: 1025, 1980.
- 13.Friman G et al: Scand J Infect Dis, 13: 89, 1981.
- 14.Smorodintsev AA et al: Etiology & Clinics of Hemorrhagic nephroso-nephritis, p 26-47, Moscow Medgiz, 1944.

浦江县前吴等三个公社华支睾吸虫病的初步调查

浙江省浦江县卫生防疫站

楼来德 潘心悟

金华地区卫生防疫站

王爱华 徐卸佐

1981年4~5月,对前吴、花桥、朱桥三个公社的人、鱼、猫、狗作了华支睾吸虫病的调查。结果表明:

1.人群感染情况: 前吴公社一个大队检查332人,检得虫卵阳性者9人;花桥公社一个大队检查188人,检得虫卵阳性者2人。此外还检查了其它大队具有消化道功能紊乱的患者150人,检得虫卵阳性者12人;

2.鱼类的调查: 在水库内及水库周围的溪、塘、

渠、沟等处捕到21种鱼类共214条,结果在鲤鱼、鲫鱼等10余种鱼的肌肉中检查到了囊蚴,其中有些感染率高达100%;

3.保存宿主的调查: 解剖2岁以上的家猫21只,检获成虫13只;解剖家犬3只,有成虫者2只。

以上结果表明,浦江县有华支睾吸虫病自然疫源地存在,并在人群中有一定程度的流行。

流行性出血热疫区黑线姬鼠带毒检查及鼠肺抗原在诊断中的应用

正文见193页



图1 EHF疫区黑线姬鼠淡色亚种肺组织细胞质中显示的EHF病毒抗原特异性荧光颗粒 $\times 400$



图2 鼠肺抗原与正常人血清结合不出现荧光颗粒(对照) $\times 400$

一种轻型出血热的病原学研究

正文见204页

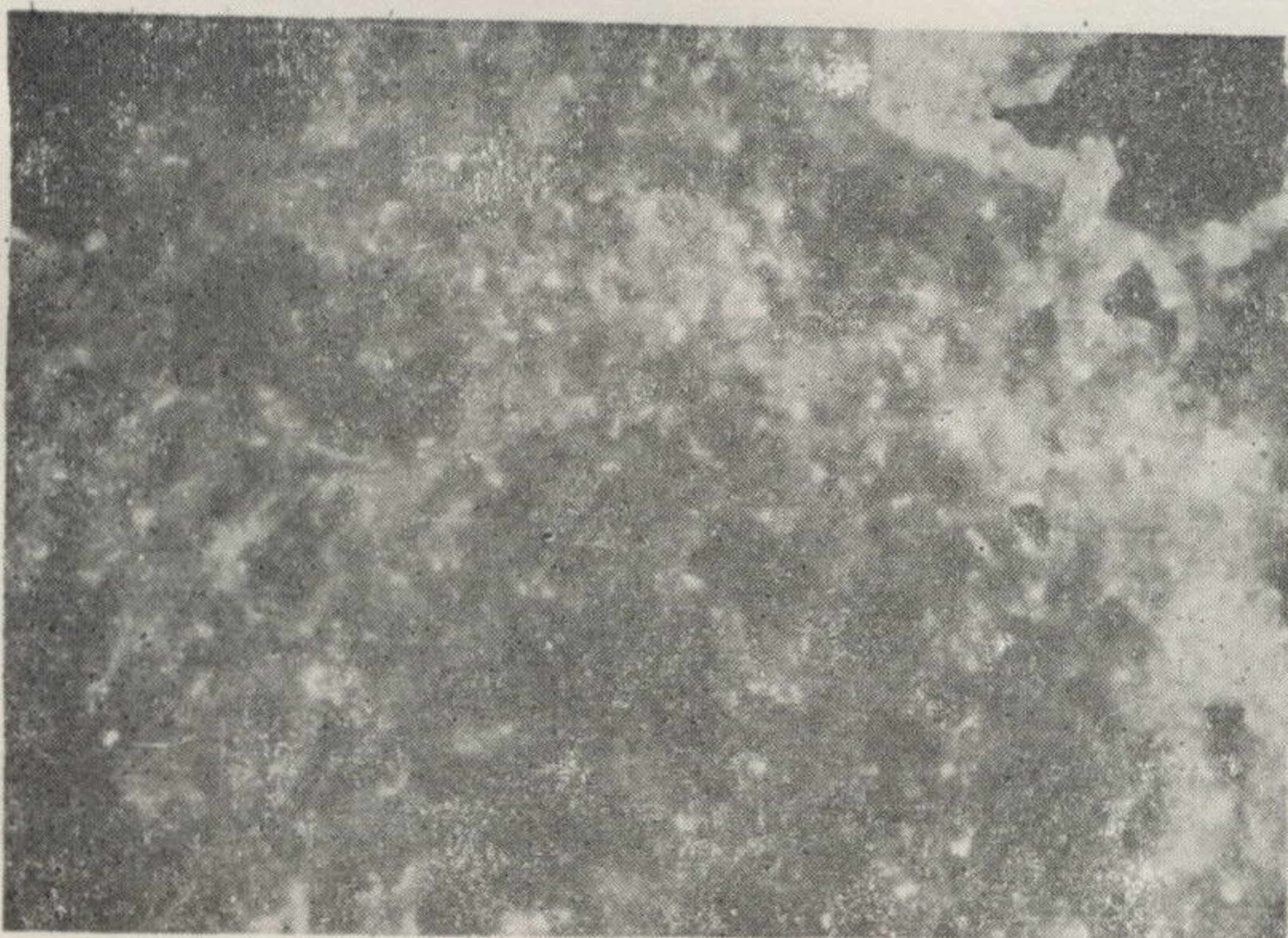


图1 褐家鼠肺切片免疫荧光阳性
 $\times 320$



图2 褐家鼠肺切片免疫荧光阴性(对照)
 $\times 320$