

新疆出血热病毒特性的研究

II 新疆出血热病毒的物理化学性质

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

严玉辰 孔令雄 蔡保健* 李 烽 张玉琴 高守一

为了阐明新疆出血热(XHF)病毒的归属,我们对其进行了理化特性的研究。

材料和方法

一、病毒: BA68037和BA68038株病毒系自病人血液分离, 试验用23代乳鼠脑病毒, LD₅₀/0.02毫升为 $10^{-6} \sim -6.5$; HY-68013为自亚洲明眼蜱(*Hyalomma asiaticum*)分离, LD₅₀/0.02毫升为 $10^{-5.5}$; C-68031为从绵羊血液中分离, LD₅₀/0.02毫升为 10^{-6} 。后二株病毒均为18代乳鼠脑病毒。将鼠脑病毒用含2%牛血清白蛋白的pH7.2 PBS制成10%病毒悬液, 放-70°C冰箱保存, 用时在-4°C下4,000 rpm离心20分钟, 取上清做病毒理化性质试验。

二、间接荧光抗体技术(IFAT): 第一抗体为XHF病人BA68037和BA68038恢复期血清(CF抗体滴度为1:128~1:256)。CCHF病毒(K₂/61株)小鼠免疫腹水(MIFA)系美国耶鲁大学医学院虫媒病毒研究所R.E. Shope教授惠赠(CF抗体滴度为1:64~1:128)。IFAT第二抗体为马抗人IgG异硫氰酸荧光素结合物, 上海生物制品研究所产品; 兔抗鼠IgG荧光抗体为北京生物制品研究所产品。

三、细胞培养和感染病毒: 将VeroE₆细胞培养在50毫升培养瓶内, 形成单层后, 将10%鼠脑病毒做10倍递增稀释, 以每个稀释度0.5毫升感染细胞, 于35~36°C培养6天, 经消化后将带毒的细胞滴在有10孔的载玻片上, 再放5%CO₂中培养16~20小时, 用IFAT测定病毒的TCID₅₀。

四、病毒的理化性质试验:

1. 病毒核酸型试验: 用每毫升含50微克5-碘-脱氧尿嘧啶核苷(IUDR)199维持液。将不同稀释度病毒接种于瓶内, 经6天培养, 用IFAT测定。试验组比对照组感染滴度低2个对数以上为DNA病毒, 相等为RNA病毒。

2. 耐乙醚试验: 取病毒悬液0.8毫升, 加分析纯乙醚0.2毫升, 充分振荡, 置4°C冰箱过夜后除去乙醚, 再将病毒10倍递增稀释, 接种于细胞瓶内, 与对照组感染滴度相差2个对数以上者为不耐乙醚病毒, 相等者为耐乙醚病毒。

3. 耐酸试验: 取1.0毫升病毒悬液, N/10盐酸调至pH3.0, 置37°C水浴1小时, 将pH调至与对照组相同, 两组同时接种细胞瓶进行滴定, 与对照组滴度相差2个以上对数者为不耐酸病毒, 相等者则为耐酸病毒。

五、病毒颗粒浮力密度测定: 将感染的细胞经-70°C冻融三次, 经10,000rpm离心30分钟, 取上清再经40,000rpm离心120分钟, 弃上清, 将沉淀悬浮在pH7.2PBS中(比原液浓缩100倍), 将已浓缩的病毒悬液置于预制的20~60%的蔗糖梯度中, 100,000g离心18小时, 用自动收集器分管, 每管0.5毫升, 用电子显微镜追踪病毒颗粒。

六、XHF病毒分子量: 根据病毒的浮力密度和颗粒直径按以下公式计算病毒的重量[1]。

颗粒重量 = $N \cdot (4/3\pi a^3) \cdot \rho$ (符号注解见后)。

*现已调卫生部药品生物制品检定所。

结 果

一、XHF病毒对乙醚和酸的稳定性试验：从附表可见，本病毒不耐酸和乙醚，IUDR不能抑制病毒合成，故为RNA病毒。如果增加乙醚量(1:1)，则病毒完全丧失感染活性。在pH3.0下作用90分钟则病毒感染活性被灭活。

二、XHF病毒浮力密度测定：经电镜追踪病毒颗粒，在40%蔗糖梯度中发现病毒，在35%和45%的梯度中没有发现病毒。因此本病毒的浮力密度为1.16~1.18。

附表 XHF病毒理化性质

病毒株	Log TCID ₅₀					
	IUDR		pH3.0		乙 醚	
	处理	对照	处理	对照	处理	对照
BA68037	8.0	8.0	3.0	8.0	3.0	7.5
BA68038	8.0	8.0	3.0	8.0	3.0	7.5
HY-68013	8.0	8.0	3.0	8.0	3.0	7.5
C-68031	8.0	8.0	3.0	8.0	3.0	7.5

三、病毒颗粒分子量：根据颗粒重量 $=N \cdot (4/3 \cdot \pi a^3) \cdot \rho$ 的公式计算，N为Avogadro常数(6.02×10^{23})， $\pi=3.1416$ ，a为XHF病毒半径($45 \sim 55 \times 10^{-7} \text{cm}$)， ρ 为本病毒的浮力密度($1.16 \sim 1.18 \text{g/cm}^3$)，所以XHF病毒重量为 $3.26 \pm 0.46 \times 10^8$ 道尔顿。

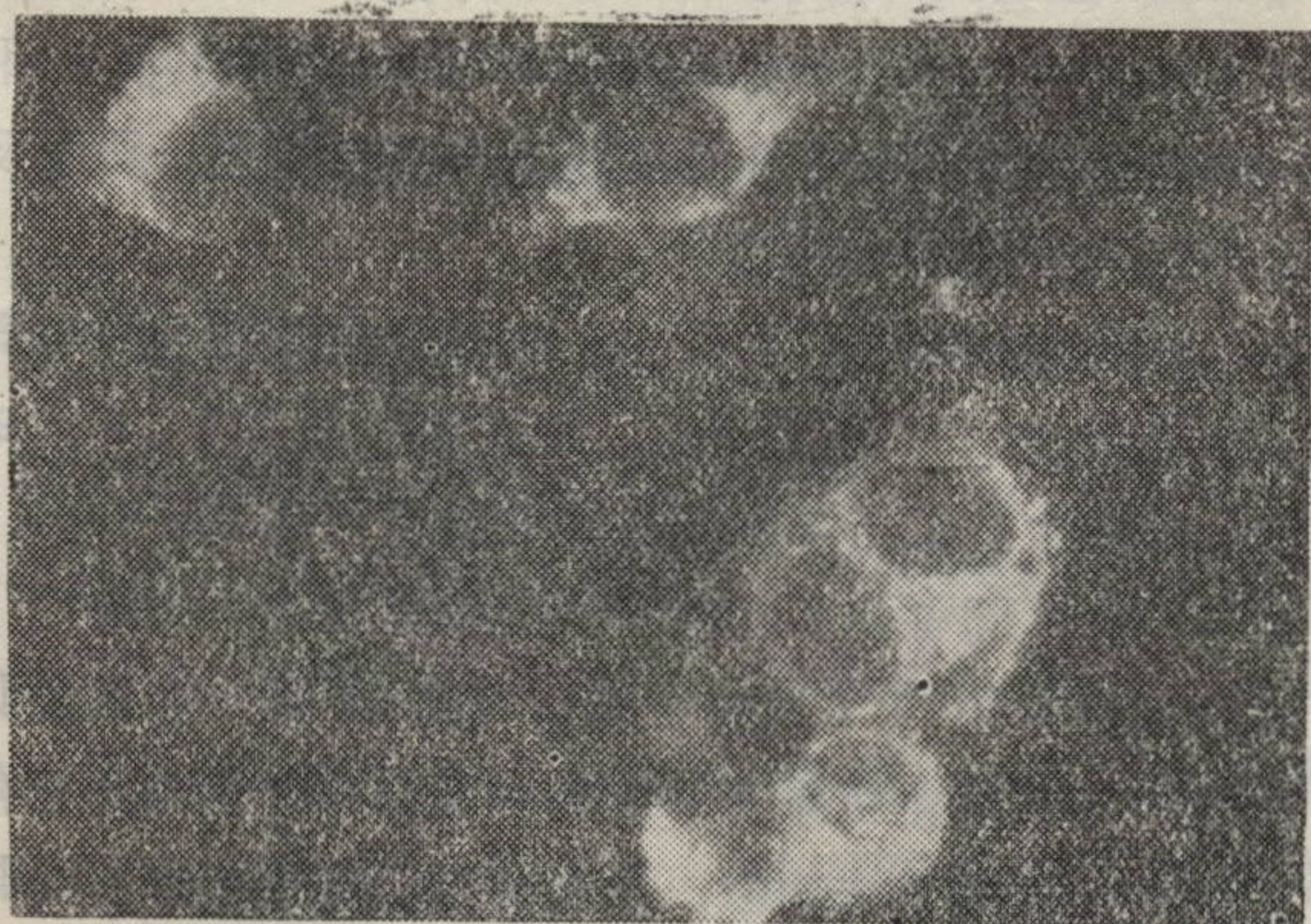


图1 XHF病毒BA68038株与CCHF病毒K₂/61株小鼠免疫腹水间接免疫荧光染色 ×800

四、用IFAT测定病毒感染细胞滴度：从图1、2可看出整个细胞质内充满颗粒荧光，



图2 XHF病毒BA68038株与XHF病人恢复期血清间接免疫荧光染色 ×800

但将这种细胞的超薄切片在电子显微镜下观察，见到有病毒颗粒的细胞并不多，即使见到，成熟的病毒颗粒也非常之少[2]。另外，发现在出现100%感染时，培养液中的病毒也非常少，只有大量病毒培养液经高度浓缩(100倍)才能见到病毒颗粒。

讨 论

XHF病毒为一种不耐酸不耐乙醚的RNA病毒，在蔗糖梯度中的浮力密度为1.16~1.18。病毒颗粒为圆形或椭圆形，直径为92~105nm[2]。分子量约为 $3.26 \pm 0.46 \times 10^8$ 道尔顿，这些特征和国外研究者报道的CCHF病毒一致[3,4]。尤其是苏联学者Donets等[1]在1977年将克里米亚出血热病毒(3株)和刚果出血热病毒(2株)同时进行了理化、形态等特征的比较研究，结果两种病毒特性基本一致，病毒颗粒为圆形或椭圆形，大小为85~105nm，浮力密度为 1.17g/cm^3 。XHF病毒的理化性质也与此基本一致。本项研究第一部分已指出，用CCHF病毒免疫小鼠腹水与XHF病毒的免疫血清做了比较试验，证实两种病毒在血清学上和抗原性上是相一致的[5]。

根据XHF病毒对脂溶剂的敏感性、病毒的核酸型、形态、颗粒大小、重量、浮力密度，尤其是与CCHF病毒的血清学关系，可以认为XHF病毒和CCHF病毒是不同地理分布的同一种病毒，同属于布尼亚病毒科，内罗病

毒属[6]。

免疫荧光染色可见大量特异性荧光充满细胞质，而电子显微镜下只见到少量病毒颗粒，说明病毒感染细胞能产生大量的特异性抗原，但只有少数能装配成病毒颗粒。利用IFAT测定病毒毒力(TCID₅₀)优于小鼠乳鼠，特别是作为细胞中和试验指标，IFAT所受外界影响因素少，尤比乳鼠为优。

XHF病毒浮力密度在1.16~1.18g/cm³的范围，即在35~40%蔗糖梯度中，这可能是由于样品过浓和病毒颗粒大小不同所致。

摘 要

根据XHF病毒与CCHF病毒理化特性一致，病毒形态和在细胞内装配部位也基本一致，特别是二者在血清学和抗原性上一致，可以认为XHF病毒和

CCHF病毒同属布尼亚病毒科、内罗病毒属。

ABSTRACT

The physicochemical characteristics of XHF virus were studied. The virus was an acid-sensitive, ether-sensitive, RNA virus. This buoyant density in sucrose was 1.16~1.18/cm³. By means of the buoyant density value and the diameter of virus particles, the weight of virus particles of XHF was calculated approximately as $3.26 \pm 0.46 \times 10^8$ daltons. The data revealed that XHF virus were similar to that of CCHF (Family *Bunyaviridae*, Genus *Nairovirus*).

参 考 文 献

1. Donets MA et al: Intervirology, 8: 294, 1977.
2. 李烽等: 中华流行病学杂志, 4(3): 135, 1983.
3. Kovolev MB et al: Acta Virol, 5: 169, 1976.
4. Jelinkova A et al: Acta Virol, 19: 396, 1975.
5. 严玉辰等: 中华流行病学杂志, 4(3): 129, 1983.
6. Bishop DHL et al: Intervirology, 14: 125, 1980.

用蔗糖密度梯度超离心纯化钩端螺旋体抗原

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

张荣珍 罗金海 赵春玉

钩端螺旋体(以下简称钩体)菌型繁多,我国目前就有50多型。正确及时鉴别各种检材中钩体的型别,无疑对本病的防治及科研工作均很重要。但目前国内外均没有研究出简便、可靠鉴别型别的方法。1976年Kida及1980年Fathalla采用蔗糖密度梯度超离心方法来纯化钩体抗原,然后用分离出的各部分抗原检查感染动物血清中钩体抗体的型别,得到了较满意的结果。国内尚未见有关报道。我们利用Fathalla改进的小量方法纯化钩体抗原,旨在测定出具有型特异性部分的抗原,以便进一步鉴定钩体的血清型别。

本研究中使用了3群6型钩体菌株:黄疸出血群中哥本哈根型(M₂₀株);赖型(70091株)及布达佩斯型(PV-1株);致热群阿不赖姆斯型(Abraham株);波摩那型(波摩那株);非致病性钩体Patoc

I型。这些钩体株的十二烷基硫酸钠(SDS)提取的抗原,用10~40%(W/V)蔗糖、日本日立生产的80P-7型超速离心机,RP40T转头,39,500转/分,离心90分钟。密度梯度离心所得到的10部分抗原,用补体结合试验(CFT)分别检查与同群同型、异型及不同群不同型抗血清滴度。

试验结果表明,第7、8、9部分抗原混合后与同型抗血清的CFT滴度较高,如哥本哈根型7、8、9部分的混合抗原与本型抗血清的滴度可高达1:6400,而与同群不同型和不同群不同型滴度在1:800以下。其余的钩体株CFT试验结果均与此相似。这就说明用这种方法纯化抗原有一定的分离作用,但与其它有关纯化抗原的方法相似,当血清在低倍稀释时不同群和不同型之间均有一定程度的交叉反应。