

用Vero E-6细胞从病人血中分离 有肾综合征出血热病毒的研究

军事医学科学院微生物流行病研究所 李钟铎 宋光昌 李德荣 何锦芳
沈阳军区后勤部军事医学研究所 何亦祥 李忠义 任丽源 刘江秋

有肾综合征出血热(以下简称HFRS)病原自1978年Lee等用黑线姬鼠分离传代成功之后^[1],我国学者宋干、严玉辰等人最近也从黑线姬鼠中分离到出血热病原的相关因子^[2~4],并适应在A549及Vero E-6细胞中^[3,5],但从当前文献报告中尚未见用Vero E-6细胞从患者血清中直接分离出出血热病毒的报道。

本文介绍1982年4~12月我们用Vero E-6细胞直接从病人血清或全血中分离HFRS病毒及其鉴定结果。

材料和方法

一、早期病人血清和全血标本:1982年6月我国东北地区局部爆发流行性出血热时期,在牡丹江地区采集早期HFRS病人血清2份,全血4份,在延边地区采集17份血清,共23份皆用于病毒分离,全部患者临床诊断和血清抗体检查证实为HFRS。

二、Vero E-6细胞来源及培养:细胞由美国陆军传染病医学研究所(USAMRIID)Eddy及French二博士赠送,1981年底引进,在本实验室进行适应性传代,细胞培养采用199及Eagle培养基等量混合作为基础培养基,加10%小牛血清作生长液,细胞形成单层后用含2~4%小牛血清的基础培养基作维持液(pH 7.2~7.6)。

三、病毒分离方法:取病人血清(或全血)标本0.5~0.9毫升接种在含单层Vero E-6细胞的小方瓶中,在37°C温箱中吸附1~4小时后加细胞维持液3毫升,37°C培养约24小时换新鲜维持液。以后每15至20天进行一次细胞

带毒传代,每代细胞均作滴片,作免疫荧光检查。传6代检查仍为阴性,定为阴性。培养期间隔4天换一次新鲜维持液。

四、特异性鉴定试验:

1.免疫荧光技术:按1980年李等报告的方法进行^[6],试验中使用的羊抗人IgG荧光抗体效价1:128;羊抗兔效价1:64;兔抗豚鼠为1:8;皆由本室自制。

使用德国Orthoplan荧光显微镜落下光装置观察标本。

2.鉴定病毒株的选择:根据荧光形态及标本采集地区选择两株病毒进行系统鉴定。

H8205株病毒系分离自牡丹江地区病人全血标本,患者杨××,1982年6月3日下午发病,5日下午采血,临床诊断为轻型HFRS,第5病日血清抗KHF抗原(美国抗原片)的IgM抗体阳性。该标本盲传至第4代后胞浆内出现特异性荧光,7代后稳定,荧光呈多形态片状。

H8278株病毒系分离自延边地区病人血清标本,患者姜××,临床诊断轻型HFRS,恢复期血清抗KHF的IgG抗体阳性。患者6月12日发病,13日采血,用血清接种细胞,在第二代细胞浆内可见少数中等亮度的颗粒状荧光,第6代后几乎全部细胞被感染。

3.鉴定用Vero E-6细胞滴片标本的制备:按李等报告的方法^[8],用HFRS H8205株及H8278株感染的Vero E-6细胞进行滴片,作为免疫荧光染色使用。

五、免疫荧光染色中使用的血清来源:

1.HFRS病人的急性期及恢复期血清:本

次分离病毒时采集过标本的病人及1981年沈阳地区的病人双份血清。另外有1980年本室测定我国HFRS病人血清抗体时从各省、市收集的一部分病人血清及健康人血清^[7]；部分为其它单位送检的血清及参加1982年全国HFRS免疫荧光学习班时学员们带来的试验血清。

2.其他血清：豚鼠抗新疆出血热免疫血清，补结效价1：128，由本院基础医学研究所陈德蕙副研究员赠给。兔抗呼肠病毒(Reo V) I、Ⅱ型，兔抗疱疹病毒(HSV) I型免疫血清，由302医院吴慎主任赠给。兔抗登革热病毒(De-nV)抗血清由本室制备；其他正常人及非HFRS病人血清从301及307等医院收集。抗HFRS A 5株免疫兔血清，由安徽省医学科学院倪大石主任赠给，荧光抗体染色效价1：5120。

3.免疫荧光直接染色法使用的血清：豚鼠抗HFRS荧光抗体，为南京军区军事医学研究所送检材料，荧光抗体染色效价1：160。

六、电镜观察：对荧光抗体染色阳性的各代标本都采用超薄切片后染色电镜观察。

结 果

一、病毒的分离及荧光抗体染色的特点：从19份早期病人血清，4份全血中分离出21株病毒，分离阳性率为91.3%(表1)。其中少数标本第一代时能见到微弱的个别可疑荧光点，随传代次数的增加和培养时间的延长荧光阳性的细胞数量增多，亮度增强，阳性标本数也增加。21份阳性标本中有15份荧光呈胞浆内颗粒状，6份为不规则片状也分布在胞浆内(图1、2，见插图第7页)。

二、分离物的特异性：1.滴片标本分别用辽宁、黑龙江、陕西等12个省、市的HFRS病人血清及正常人和非HFRS病人的血清作免疫荧光染色，证明分离物抗原只对HFRS病人的血清呈特异性反应，在140份HFRS病人血清中有46份曾于1980年用美国A-549细胞KHF抗原检查，与这次分

表 1 采集标本的时间与分离病毒的结果

标本采集时间	标本数	分离阳性数
潜伏期内	2	2
发病当天	1①	1
发病后1天	10②	10
发病后2天	2③	2
发病后3天	4	4
发病后4天	1	1
发病后5天	3	1
合 计	23	21

注：①全血；②含1份全血；③全血。

离物细胞滴片染色结果一致。在正常人和非HFRS病人的血清中未发现荧光抗体阳性者(表2、3)。

表 2 不同地区HFRS病人血清免疫荧光检查结果

血清来源	检查数	阳性数	阴性数
辽 宁	30	28	2
黑 龙 江	17	15	2
吉 林	10	7	3
河 北	2	2	0
山 东	5	3	2
北 京	2*	2	0
安 徽	9	6	3
湖 北	6	5	1
浙 江	20	20	0
陕 西	21	19	2
四 川	12	12	0
河 南	6	6	0
合 计	140	125	15

*两例患者为疫区来京后发病的人员。

表 3 免疫荧光法对不同人血清检查的结果

血清种类	检查数	阳性数	阴性数
HFRS病人	140	125*	15
森脑病人	8	0	8
乙脑病人	18	0	18
类风湿患者	6	0	6
其他病人	7	0	7
正 常 人	65	0	65*
合 计	244	125	119

*含1980年检查过的46份HFRS病人血清和34份正常人血清。

2.用不同免疫血清对分离病毒株荧光抗体染色，只发现HFRS A-5株免疫血清呈阳

性, 其他用抗呼肠Ⅰ型、Ⅱ型、抗疱疹Ⅰ型、抗登革热Ⅱ型、抗新疆出血热等病毒的免疫血清染色全部为阴性(表4)。

表4 不同免疫血清对分离病毒株的染色

免疫血清种类	荧光血清种类(FA)	结果
兔抗HFRS(A-5)株	羊抗兔IgG FA	4+
" Reo I	"	—
" Reo II	"	—
" HSV I	"	—
" Den II	"	—
豚鼠抗新疆出血热	兔抗豚鼠IgG FA	—

3. 阻断试验: 选用表4所列全部免疫血清(1:40)37℃先作用于细胞抗原片45分钟, 冲洗后用豚鼠抗HFRS荧光抗体(1:80)染色, 经HFRS A-5株免疫血清作用的标本荧光强度受到明显抑制; 如果用1:10的A-5株血清或HFRS病人血清处理标本可达完全阻断的效果。

4. 双盲法染色: 试验由三组人员组成, 本组工作人员取HFRS病人及正常人的血清各10份, 并编好顺序号, 第二组人员将这些血清重新编号, 第三组人员负责染色和观察, 最后三组人员共同核对, 双盲法染色结果完全符合。

5. 病人双份血清效价测定: 用1981年沈阳市的HFRS病人双份血清染色, 测定各血清效价, 除一份81-9号的双份血清效价小于1:40之外, 其它血清都有4倍以上增高(表5)。

表5 HFRS病人急性期及恢复期血清效价

病人血清号	血清效价 (H8278株)	
	急性期	恢复期
81-4	1:320	1:1280
81-5	1:320	1:1280
81-9	1:40	1:40
81-13	1:80	1:5120
81-17	1:320	1:1280
81-19	1:640	1:10240
81-21	1:80	1:1280
81-22	1:320	1:5120
81-24	1:160	1:5120
81-26	1:640	1:10240

表6 不同抗原用牡丹江、延边地区病人血清染色的结果

血清来源	抗原种类及血清效价		
	H8205株	H8278株	76-118株
牡 82-05	1:320	1:320	1:320
丹 82-04	1:160	1:640	1:320
江 82-06	1:320	1:640	1:320
延 边	82-78	1:160	1:320
	82-21	1:2560	1:5120
	82-29	1:2560	1:5120

用分离出病毒的患者恢复期血清同时在3种抗原滴片上测定效价, 3种抗原无明显差别(表6)。

6. 电镜观察: 在荧光抗体检查阳性的标本中, 特别是本次试验系统鉴定的两株病毒中, 经多次超薄切片染色及免疫电镜观察, 目前还未找到明确的HFRS病毒颗粒, 也未发现呼肠及其他病毒。

讨 论

1982年Lee报告用黑线姬鼠从105例病人血清中分离出19株KHF病毒, 分离率为18.1% [9], 在我们的试验中用Vero E-6细胞从急性期病人血清及全血中都分离出HFRS病毒, 分离率较高(21/23)。最近Gajdusek教授讲到南朝鲜Lee HW也曾用细胞从病人全血中直接分离出KHF病毒, 但认为从血清中分离出病毒来不容易, 我们能够从血清中分离成功, 可能与Vero E-6细胞对HFRS病毒有较高的敏感性, 分离病毒的标本采集及时和传代次数较多有关(传6~7代)。

虽然1981年Lee等报告过用A-549细胞可以从病人急性期血清中(6日内)分离出KHF病原体 [10], 国内也有人用A-549细胞从病人血清中分离出HFRS病毒 [11], 但是对Vero E-6细胞是否能直接从病人血液标本中分离HFRS病毒尚有不同看法。

试验中共分离出21株病毒, 15株呈颗粒状

荧光与国内外学者们利用黑线姬鼠或A-549细胞所分离到的病毒特点一致。另外6株呈不规则片状荧光,当用高稀释度的抗体染色时可见荧光呈丝状、肾状或弧形状等。目前我们只能肯定它对HFRS的特异性,至于它与颗粒性荧光抗原的关系如何、其细微结构如何正在研究中。Gajduseh教授讲述他用不同KHF病毒和不同美国鼠类病毒(pH)制备的单克隆抗体检查同一株病毒标本时也发现过这样两种形态(片状及颗粒状)荧光;这两种荧光形态都是特异性的,他认为形态上的差别可能是由于抗体不同的缘故^[12]。而我们的结果似乎支持和病毒株有关,至于最后结论还有待进一步研究。

在对选择的两株病毒进行系统鉴定时不仅使用了病人、正常人、非出血热病人血清进行免疫荧光染色,而且还使用了国内从黑线姬鼠分离的病毒株制备的免疫血清及其他病毒的免疫血清进行了染色。排除了Reo、HSV、新疆出血热(布杨病毒科)病毒和森林脑炎病毒等。

最近McCormick和White等报告在感染76-118株的细胞悬液中发现布杨病毒科样病毒,并用免疫电镜证实与KHF病毒有关^[13,14],在我们进行的电镜观察中尚未发现这类物质,也未发现呼肠等常见病毒颗粒存在。

摘 要

用Vero E-6细胞接种有肾综合征出血热(HFRS)病人的早期血清或全血标本23份,从中分离出21株与HFRS相关的病原体。用感染细胞制成的滴片标本经免疫荧光染色检查,在21株分离阳性的材料中发现颗粒状(15株)及片状(6株)两种形态的特异性荧光。从这些分离出的病毒株中按形态等不同条件选择两株作系统鉴定,排除了呼肠、疱

疹、新疆出血热、森林脑炎等病毒,结果证明这两种形态的荧光都是分离出的HFRS病毒所引起。

ABSTRACT

HFRS virus was isolated by direct inoculation of Vero E-6 cells with acute stage serum and/or whole blood (only in a few cases) taken from Patients with HFRS. Twenty-one strains of this virus were obtained from 23 HFRS Patients' specimens. The viruses were detected by immunofluorescent technique on spot slide antigen made from the isolated virus. The results showed that 15 strains were of fine Particle-like fluorescence, while the other 6 strains were of multiform Patchy fluorescence. These two types of fluorescent morphology were found to be specific for HFRS virus. Other viruses such as Reo I, II, HSV I, TBE and Xin-Jiang HF viruses had been excluded.

参 考 文 献

1. Lee HW: J Inf Dis, 137(3): 298, 1978.
2. 宋干等: 中国医学科学院学报, 4(2): 73, 1982.
3. 严玉辰等: 中国医学科学院学报, 4(2): 67, 1982.
4. 何浩等: 用A-549细胞从疫区黑线姬鼠单层细胞培养中进行流行性出血热病原分离的研究, 内部资料, 1982.
5. French GR et al: Science, 211(4486): 1046-48, 1981.
6. 李钟铎等: 中华预防医学杂志, 14(8): 137, 1980.
7. 李钟铎等: 中华预防医学杂志, 16(2): 68, 1982.
8. 李钟铎等: 中华流行病学杂志, 3(6): 铜板第3页, 1982.
9. Lee HW: Virological and Immunological Test of KHF, WPR/WG/RPD(HFRS)/1982, 4, Tokyo Japan.
10. Lee HW et al: Lancet, 1:8229: 1070-1072, 1981.
11. 倪大石等: 流行性出血热病原因子在A-549人肺癌传代细胞中的适应研究, 内部资料, 1982.
12. Gajdusek: 个人通讯, 1983.
13. McCormick JB et al: Lancet, 1:8275: 765-778, 1982.
14. White JD et al: Lancet, 1:8275: 768-771, 1982.

(在工作中得到302医院吴慎主任, 安徽医学科学研究所倪大石主任, 军事医学科学院陈德惠副研究员及301、307等医院的检验科提供鉴定用的血清。蒋豫图教授帮助从美国引进对HFRS病毒敏感的Vero E-6细胞等, 在此一并致谢)

用Vero E-6细胞从病人血中分离有肾综合征出血热病毒的研究

李钟铎 等

正文见198页

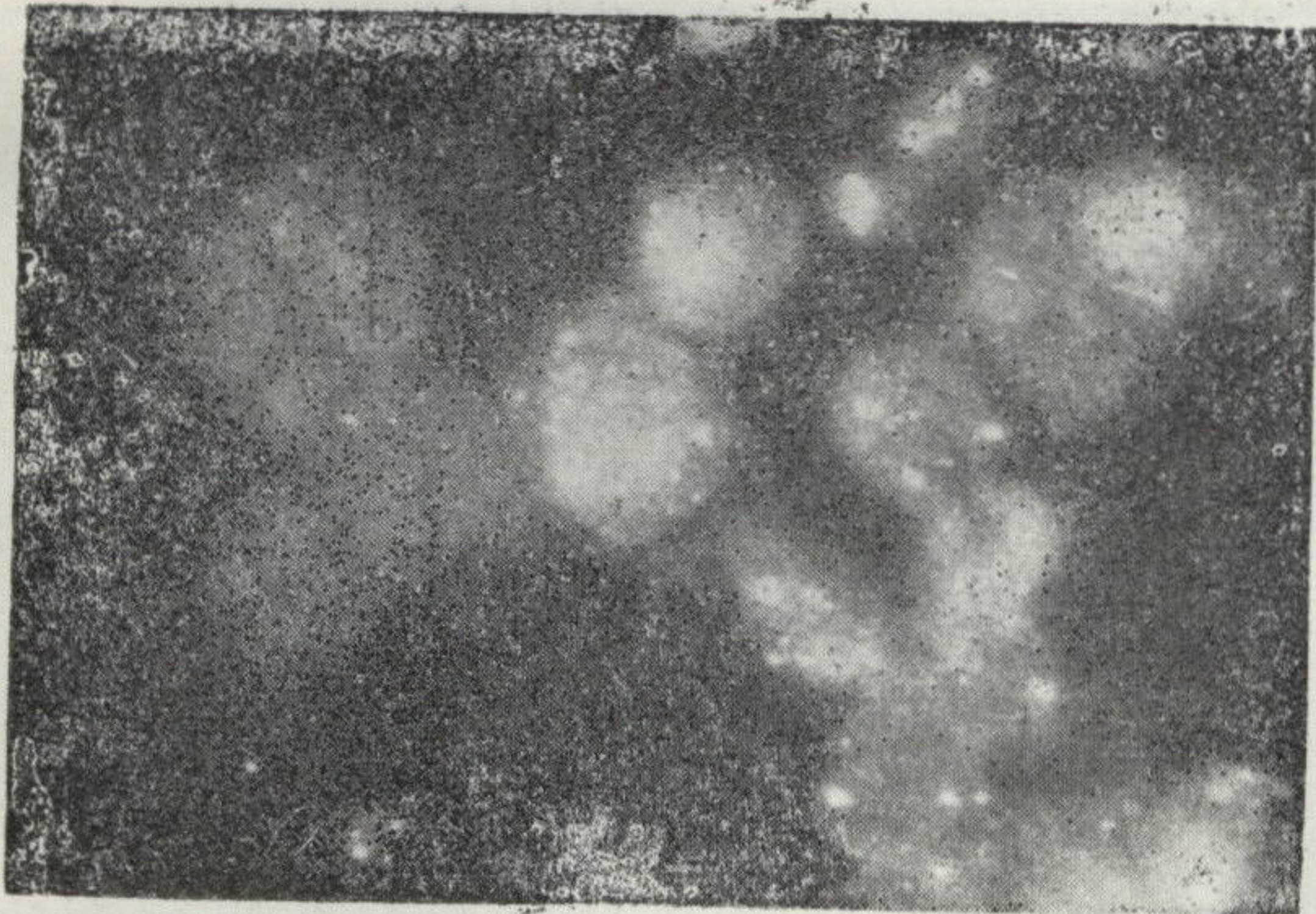


图1 感染H8278株病毒的Vero E-6细胞浆内颗粒荧光

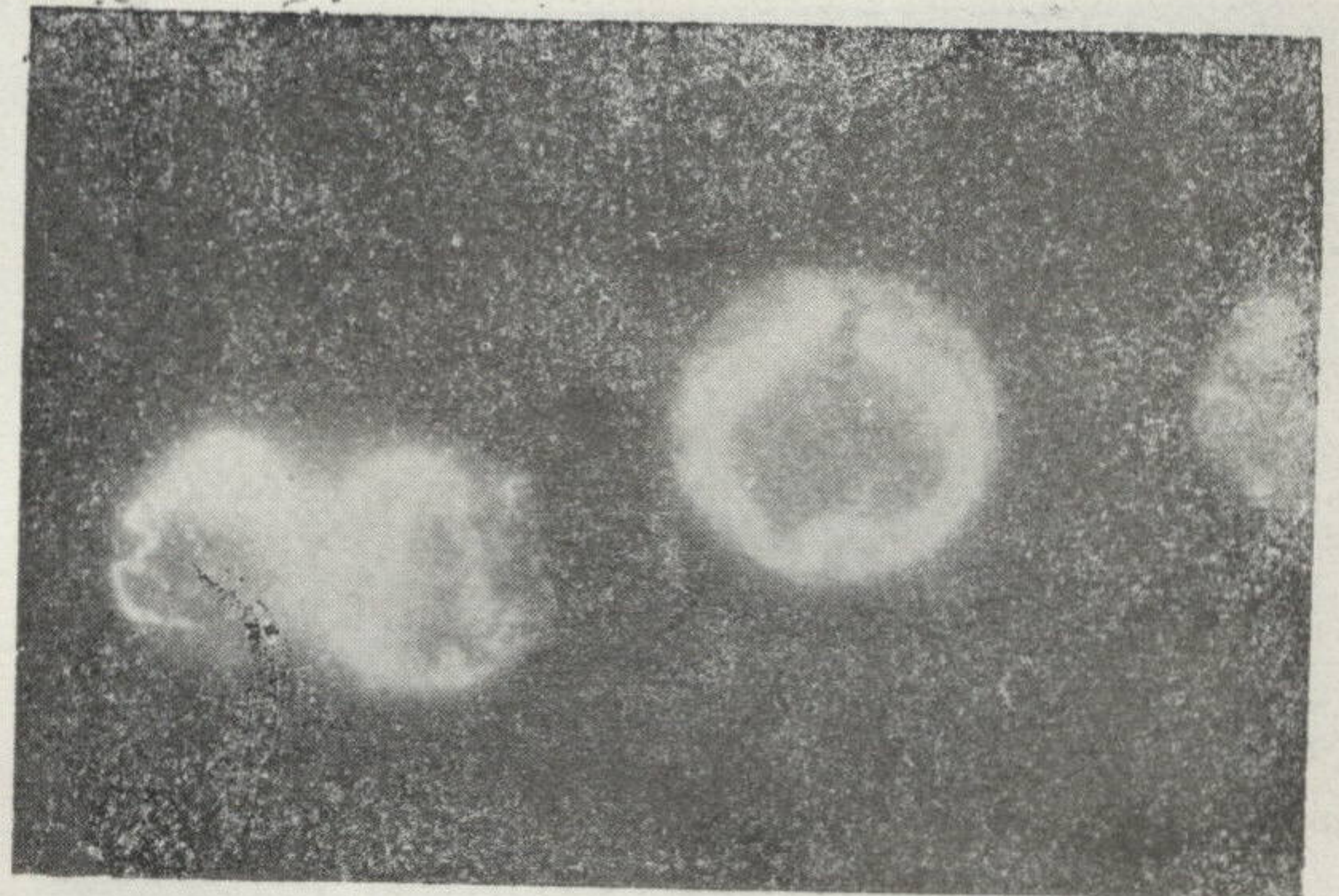
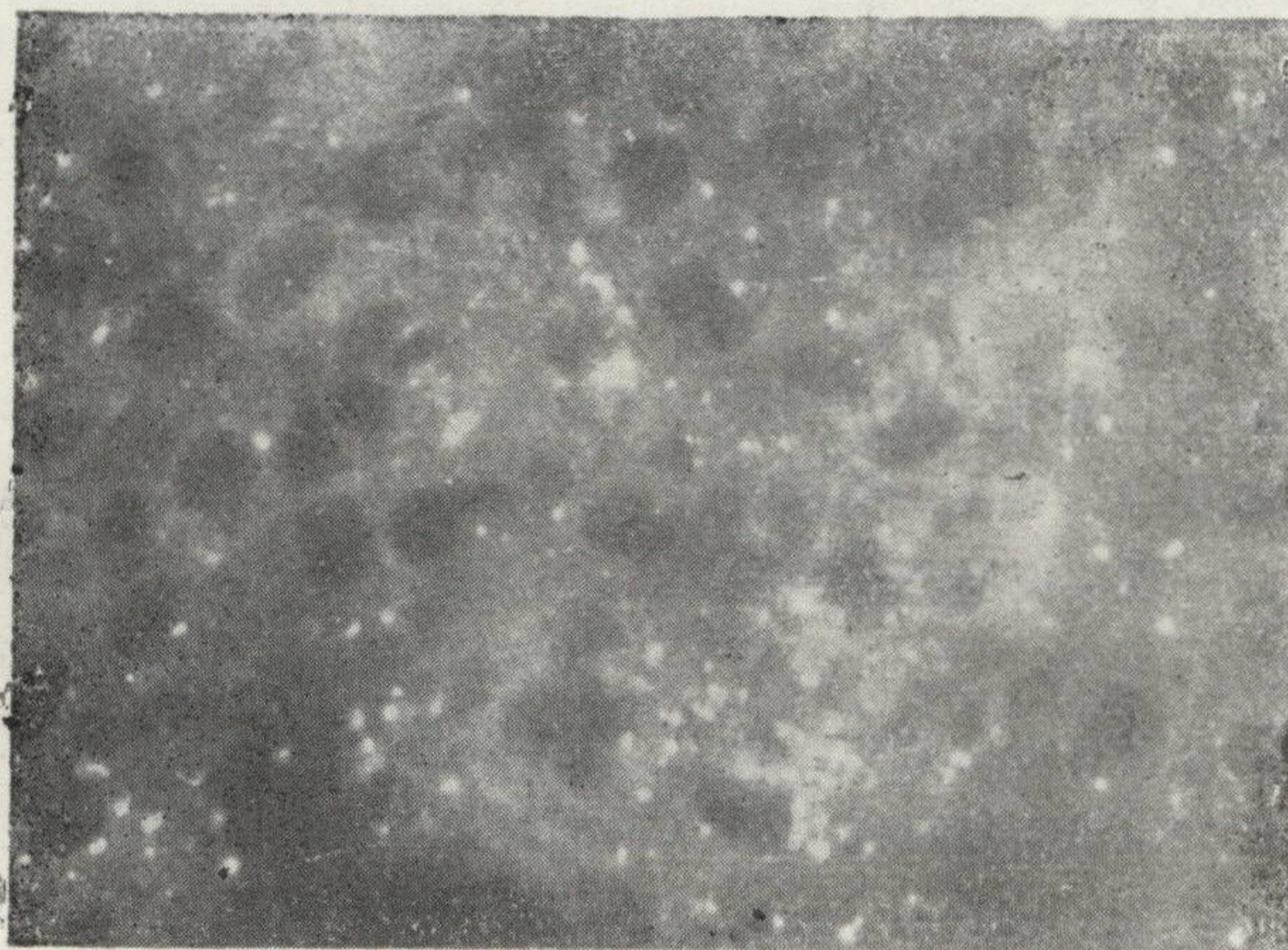


图2 感染H8205株病毒的Vero E-6细胞浆内多形态片状荧光

鼠类携带有肾综合征出血热病毒抗原检测及血清流行病学调查

李泽林等

正文见202页



附图 黑线姬鼠肺泡上皮细胞质内HFRS病毒抗原显示的荧光颗粒 480×