

# 马疱疹病毒 1 型的分离和初步鉴定

刘景华 郝 崇 袁肇敏

(中国人民解放军兽医大学军马卫生研究所, 长春)

在 1980 年初和春季, 从东北两个马场采得的 10 份自然流产胎儿标本中, 分得 5 株马疱疹病毒。根据培养特性和形态学观察, 以及人工感染牲畜等试验结果, 确定这些毒株就是致发自然流产的病原因子。按当前公认的分类标准, 这些毒株属于马鼻肺炎病毒, 即马疱疹病毒 1 型 (简称 EHV 1), 它是致发妊马流产和驹子鼻肺炎的病原体。至于这些毒株各方面的特性及其与国外标准毒株的关系, 均有待于进行深入研究。这是首次在我国从马流产胎儿分得马疱疹病毒 1 型的报道。由于拿到了病毒, 为开展本病的全面研究提供了前提。

从多年的观察中发现, 很多马场虽然连年接种马流产沙门氏菌菌苗, 但大批传染性流产仍不时发生, 尤其是从妊娠中、后期的流产胎儿, 既分离不出马流产沙门氏菌和其它病原菌, 也找不到别的原因, 流产率可高达 30%, 甚至 50% 以上。过去, 有些研究单位<sup>[1]</sup>, 曾在流产胎儿肝和肺等相应细胞发现过核内包涵体。但至今还没见到有关病原分离的报道。从国外资料看, 马鼻肺炎病毒性流产广泛发生于世界各地, 据 Bagust<sup>[2]</sup> 氏统计, 已有近四十个国家报道有本病发生。为明确本病在我国的存在情况, 从 1980 年起, 我们在对东北地区三个马场的流产情况进行调查的同时, 重点开展了病原分离工作。从两个马场的 10 份流产胎儿标本, 分到 5 株马疱疹病毒, 经过系统检查证明, 均属于马鼻肺炎病毒。但因未引进国外标准毒株, 无法做直接的比较试验。

## 材 料 和 方 法

### (一) 标本

从三个马场, 先后共采得 17 个流产胎儿的肺、肝和脾等组织, 保存于含 20% 犊牛血清 pH

7.2 的 Hank 氏液中 [含青、链霉素各 500 单位 (mg/ml)], 装入冰筒带回实验室。组织块经 Hank 氏液冲洗后, 制成 10% 乳剂, 经 3,000 转/分离心 20 分钟, 其上清即为分离病毒的接种物, 接种量为 10%。在采取标本同时, 做粗略的眼观病理学检查。

### (二) 分离病毒

应用约周龄的乳金黄地鼠肾原代单层细胞 (按常规方法制备) 进行病毒分离, 连传三代不出现细胞病变 (CPE) 时废弃。个别标本, 曾同时用猪胚肾原代单层细胞作病毒分离。培养温度 37℃。待细胞长成单层后进行接种。观察约 10 日。在分离病毒前, 全部标本均作细菌学检查。

### (三) 细胞感染范围试验

应用全部分得毒株, 同时以从健马白细胞分得的马疱疹病毒 2 型毒株 (又名马巨细胞病毒, 为我所自行分离和鉴定的) 作对比, 共用三种传代细胞 (PK<sub>1</sub>, BHK<sub>21</sub> 和自行培育的驴胚皮肤传代细胞) 和两种原代细胞 (乳地鼠肾和乳兔肾) 作细

本文于 1980 年 7 月 23 日收到。

在我们采集标本过程中蒙张正雅、王赞山和周洪斌等同志热情支持, 在病理和电镜等检查工作中蒙陈斯义、贾补年、尚建勋、金言、梅祥林、杨永金和张喜明等同志大力协助, 深表感谢。

1) 1957 年农业部兽医药品监察所和 1967 年兽医大学病理组, 均有从马流产胎儿相应组织细胞观察到核内包涵体的报道。

胞感染范围试验。接毒量均为 10%, 以 CPE 为指标, 观察 7—10 日, 培养温度 37℃。

#### (四) 人工接种妊娠试验

为了观察分得毒株的病原性, 分别以各种毒株的乳地鼠肾单层细胞培养物 3—10 ml, 通过子宫或胎儿体内途径, 接种妊娠中、后期母驴作人工感染流产试验。其中 0102 号毒株, 还以同样途径接种一匹妊娠约七月龄的母马(第一次接种 10 ml, 间隔 10 日又接种 10 ml)。同时用未接种病毒的乳地鼠肾细胞培养物, 以同样途径接种妊娠一头, 作为对照。接种后逐日测温。对接种马还做了常规血液学和免疫扩散试验检查(基本按马传贫的标准检查方法, 以病毒的兔肾细胞培养物为抗原), 并对流产胎儿进行了全面的病理学检查和部分回收病毒试验。

## 结 果

### (一) 分离病毒

从甲、乙两个马场的 10 份标本中, 分

出病毒 5 株。但从丙马场的 7 份标本中, 没有分出病毒, 分到 3 株马流产沙门氏菌, 结果见表 1。

从分出病毒的流产胎儿月龄看, 4 株来自 10 月龄胎儿, 1 株来自 8 月龄胎儿。这些胎儿都有不同程度的出血和黄疸变化。母马都是突然发生流产, 随后很快复原。这些情况都同鼻肺炎病毒性流产相符。

用原代乳地鼠肾细胞分离病毒结果, 五分之四的标本(肺)能在接种后 5—6 日出现 CPE, 只一份标本(0317)是在盲传第二代时才出现细胞病变。从 0102 号标本看, 原代猪胚肾细胞分离病毒的效果也不差。另外, 从肺和肝的病毒分离情况来看, 肺在初代即出现 CPE; 而肝在盲传第二代时才出现, 表明肝脏的病毒含量不如肺脏高。这种情况同 Shimizu<sup>[2]</sup>氏和川上氏<sup>[3]</sup>等

表 1 全部标本病原分离结果

Table 1 Results of isolations

标本号 Sample	来源 Source	流产胎儿月龄 Age of aborted fetus	病原分离结果 Agents isolated	
			马鼻肺炎病毒 EHV1	马流产沙门氏菌 <i>Sal. abortus</i> equi
0102	甲马场二队	8	+	-
0131	甲马场二队	9	-	-
0330	甲马场二队	10.5	+	-
0413	甲马场二队	11	-	-
0416	甲马场二队	11	-	-
0317	乙马场二队	10	+	-
0318	乙马场二队	10	-	-
0319	乙马场二队	10	-	-
0321	乙马场二队	10.5	+	-
0324	乙马场二队	10.5	+	-
0322	丙马场二队	10.5	-	+
0326	丙马场二队	10.5	-	-
0328	丙马场二队	10.5	-	+
0403	丙马场二队	10.5	-	-
0412	丙马场二队	10	-	-
0414	丙马场二队	10.5	-	-
0415	丙马场二队	10.5	-	+

表 2 病毒分离及前三代增殖情况

Table 2 Virus propagation and CPE of cell cultures in first 3 passages

毒株 Strains	接种标本 Inoculum	原代 BHK 培养物出现 CPE 的天数(days) CPE in PBHK after inoculation			原代猪胚肾第一代出现 CPE 的天数 CPE in PPK after inoculation (days)
		第一代 1st passage	第二代 2nd passage	第三代 3rd passage	
0102	肺 lung	5	2	2	5
	肝 liver	无	5	3	—
0317	肺 lung	无	6	3	—
0321	肺 lung	6	4	3	—
0324	肺 lung	6	5	3	—
0330	肺、肝、脾混合乳剂 mixture of lung, liver & spleen	6	2	2	—

“无”未出现 CPE。  
no CPE produced.

“—”未做。  
not done.

的报道一致。病毒分离结果见表 2。

全部分离毒株，随着在细胞培养物上传递代数的增加，出现 CPE 所需的时间明显缩短，在接毒量 10% 时，到第三代，所有毒株于 2—3 日均出现 CPE，3—5 日即达收毒程度。初期 CPE 肉眼观察，有如疏松的纱布状，继之网眼不断扩大，最后直至细胞全部脱落，瓶壁变为一致透明。显微镜下观察时，首先见局部细胞圆缩，折光性增强，逐渐形成葡萄状和带状集聚，伴随细胞

脱落形成的空隙区逐渐扩展，2—3 日后大部细胞脱落(图版 1-1、2)。经 HE 染色的细胞培养物，可见到核内嗜酸性包涵体(图版 1-3)。

### (二) 细胞感染范围试验

全部分得毒株对三种传代细胞和两种原代细胞都能产生明显的 CPE，表现出一致的培养特性(表 3)。马巨细胞病毒对 PK<sub>15</sub> 不产生 CPE，对其余四种细胞虽能产生 CPE，但出现 CPE 的时间要推迟 2—3

表 3 细胞感染范围试验

Table 3 Range of susceptible cell culture

细胞 毒株 cell culture strains	PK <sub>15</sub>	BHK <sub>21</sub>	驴胚皮肤细胞 DES	原代乳地鼠肾细胞 PBHK	原代兔肾细胞 PRK
0102	+	+	+	+	+
0317	+	+	+	+	+
0321	+	+	+	+	+
0324	+	+	+	+	+
0330	+	+	+	+	+
马巨细胞病毒 Equine cytomegalovirus	—	+	+	+	+

DES—Donkey embryo skin

PBHK—primary baby hamster kidney

PRK—primary rabbit kidney

表 4 人工接种妊娠试验结果  
Table 4 Results of artificial inoculations of pregnant mares

畜号 Animal No.	毒株 Virus strain	剂量 Dose (ml)	从接种到流产的天数 Days between inoculation and abortion	流产胎儿月龄 Age of aborted fetus	病理形态学变化 Pathological changes		从流产胎儿肺回收病毒结果 Virus isolation from lungs of aborted fetus
					肉眼 Gross	显微镜 Micro.	
Donkey 1 驴	0102 BHK 2代 2nd passage	10	3	10.5	+	+	+
驴 2	0102 BHK 2代 2nd passage	10	8	10	+	+	+
驴 3	0317 BHK 3代 3rd passage	3	7	7	+	+	+
驴 4	0321 BHK 4代 4th passage	10	57日正产	瘦弱死后 20小时死亡	+	(-)	(-)
驴 5	0324 BHK 3代 3rd passage	3	6	11.5	+	+	+
驴 6	0321 BHK 4代 4th passage	10	2	11.5	+	+	(-)
驴 7	0330 BHK 3代 3rd passage	10	2	11	+	+	(-)
驴 8	无毒对照 BHK 3代 Uninoculated control, 3rd passage	10	35日正产				
Horse 8 马	0102 BHK 2代 2nd passage	1-10 2-10	11*	7	+	+	(-)

\* 指第一次接种后到流产的天数。(一) 未做。

Days between 1st inoculation and abortion. Not done.

日,且能看到较多的多核巨细胞。上述结果显现出马鼻肺炎病毒较马巨细胞病毒的细胞感染范围宽扩且出现 CPE 较快。这与过去一些外国<sup>[4,5]</sup>研究者的观察是一致的。

所有分得毒株的细胞培养物,经电镜检查发现,全呈现典型的疱疹病毒形态,带囊膜成熟病毒粒子的直径约 200nm,核衣壳直径约 100nm(图版 I-4、5)

### (三) 人工接种牲畜试验

经各毒株 2—4 代乳地鼠肾原代细胞培养物接种的牲畜,除 4 号驴出生后很快死亡(只存活 20 小时)的弱驹外,全部致发流产;接种无毒对照培养物的 8 号妊娠,无异常表现,于接种后 35 日正产。从而可明确肯定全部分得毒株有致发妊娠流产的致病性。结果见表 4。

从上述结果看,当进行子宫或胎儿体内接种时,所有分得毒株都能致发妊娠流产,平均潜伏期 4 天。这一结果,同 Doll<sup>[6]</sup>氏等用 51 匹马作的人工流产试验结果近似。其中 4 号驴没有流产,于接种后 57 日正产,但驹子甚衰弱,不能站立吸乳,勉强存活 20 小时死亡。剖检发现严重出血和轻度黄疸等变化。之所以出现这种结果,可能与接种部位不准确有关。当病毒接种到子宫以外部位时,虽然致发胎儿感染,但为了克服母体的屏障保护作用,则需时较长;同样,8 号马潜伏期较长的原因,可能也与接种部位有关。全部流产胎儿均呈现不同程度的黄疸和出血变化,8 号马流产胎儿的变化尤为严重。部分胎儿的肝脏包膜下可检出坏死灶。在肝和肺等脏器的相应细胞内,均检出了核内嗜酸性包涵体(图版 I-6、7)。

从已经作过培养的 1、2、3 和 5 号驴流产胎儿回收病毒试验结果表明,所有检样均在第一代乳地鼠肾细胞培养物出现明显的 CPE,很容易从流产胎儿内脏回收病

毒。另外,从正在进行的血清学检查来看,初步发现大部人工接种流产后母畜的血清,能与 0102 号(从甲马场分得)和 0321 号毒株(从乙马场分得)所制备的琼脂扩散抗原,呈现阳性免疫扩散反应。0102 号毒株来源的流产母马血清(甲马场二队 546 号母马),能与 0102 号毒株制备的琼脂扩散抗原呈阳性反应。

对 8 号妊娠马的临床和血液学检查发现,在接种后 7—10 日间,妊娠马不时流出少量浆液性鼻汁,10—11 日间出现体温轻度升高,与此同时,白细胞总数和淋巴细胞数都出现明显下降,尤其后者更为显著。这些变化都同马鼻肺炎病毒的致病性相符合。另外,从接种后 10 天到 4 个月采集的血清,均能与 0102 号和 0321 号毒株制备的抗原呈现阳性琼脂扩散反应。初步看到从两个不同马场分离的毒株间有共同的抗原成分。人工接种妊娠马未发现临床和体温变化,未进行血液学检查。

## 讨 论

当前对马疱疹病毒已公认分为三个型<sup>[4,7]</sup>。马疱疹病毒 1 型即马鼻肺炎病毒,是致发马鼻肺炎和妊娠流产的病原因子。对本型病毒可区分为两个亚型的实验研究<sup>[8—12]</sup>日趋增多,并已取得可分为胎儿亚型 1 和呼吸系统亚型 2 初步一致的意见。亚型 1 病原性强,是引起流产的主要病原;亚型 2 主要引起呼吸系统症状,但有时也能致发流产。马疱疹病毒 2 型近似巨细胞病毒,虽也有从患鼻肺炎驹子分出本型病毒的报道<sup>[13]</sup>,但主要是健康带毒,据 Kemeny<sup>[14]</sup>氏报道,健马带毒率高达 80% 以上。据殷震等报道<sup>[5]</sup>,我国马匹健康带毒率同国外近似。我们也从 3 匹健康马(白血

1) 1972 年殷震等从我所 15 匹健康马、骡、驴的白细胞中,分离出马疱疹病毒 2 型 11 株。

胞) 中的 2 匹分到了此型病毒。Gleeson<sup>[4,5]</sup>氏用本型病毒做妊马人工接种(子宫内)试验, 结果妊马正产, 证明它没有致发流产的病原性。马疱疹病毒 3 型又名马交媾疹病毒(Equine coital exanthema virus), 是致发马交媾疹的病原因子, 主要引起外阴局部病变。目前仅见于美洲、欧洲少数国家以及澳大利亚和日本。此型病毒只能在马属动物的组织细胞培养物内增殖<sup>[1,16]</sup>。

这次分离的 5 株病毒都是从妊娠期后期马流产胎儿分得的, 流产胎儿呈现不同程度的黄疸、出血变化。分得毒株的形态与马疱疹病毒相符。各毒株的组织培养物接种妊马均能引起流产, 流产胎儿呈现不同程度的黄疸、出血等变化, 且在肝细胞内都出现了核内嗜酸性包涵体。应用组织培养方法从做过检查的 4 个胎儿都分离出了原来接种的病毒。流产母畜的血清中出现了相应的抗体。这些毒株有较广泛的细胞感染范围。上述试验结果表明, 这些毒株的基本特性同马疱疹病毒 1 型相符, 就是致发流产的马鼻肺炎病毒。可以排除 2 型和 3 型的主要依据是: 2 型不能致发流产, 对细胞的感染范围也较 1 型窄; 3 型不仅不能致发流产, 同时也不能在马属动物以外的组织细胞培养物内增殖。至于这些分得毒株属于 1 型的哪个亚型, 尚不清楚, 有待于引进国外已知标准毒株做对比鉴定。从其具有较强的致发流产的病原性来看, 属于亚型 1 的可能性似乎较大。

由于从流产马胎儿分离出马鼻肺炎病毒, 也就确证了本病在我国的存在, 并初步看到其危害的严重程度, 从而解决了多年来的怀疑, 证实了以往病理学方面的观察。从丙马场的 7 份标本中分得 3 株马流产沙门氏菌, 表明沙门氏菌性流产在该场严重存在, 但由于标本采集的数量和范围有限, 因此不能得出这个场就没有马鼻肺炎病毒

性流产的结论。

国外的一些研究者<sup>[7]</sup>常用马肾细胞作病毒的分离培养。我们这次用原代乳地鼠肾细胞分离病毒(连传三代)同样达到了目的, 获得了较高的分离率。此外, 我们部分地试用了原代猪胚肾细胞和自己培育的驴胎皮肤继代细胞, 同样获得了良好效果。

从国内外的资料中, 我们尚未发现用驴做人工感染试验的报道。通过实践表明, 对中后期妊马作子宫或胎儿体内接种时, 获得了同感染妊马一样准确的结果, 从而为此项实验提供了价廉易得的动物模型。因胎儿对本病毒甚为易感, 故此采用子宫或胎儿体内接种, 人为地为病毒克服了母体的屏障和保护作用。

## 参 考 文 献

- [1] Bagust, T. J.: *Vet. Bull.*, 1: 79, 1971.
- [2] Shimizu, T.: *Japan J. Exp. Med.*, 29: 643, 1959.
- [3] 川上善三等: 日本家畜卫生实验场《研究报告》, 51: 1, 1965.
- [4] Studdert, M. J.: *The Cornell Vet.*, 64: 94, 1974.
- [5] Koch, H.: *Zentbl. Vet. Med.*, 14B: 493, 1967.
- [6] Doll, E. R. et al.: *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 141: 351, 1964.
- [7] Gutekunst, D. E. et al.: *Archives of Virology*, 56: 33, 1978.
- [8] Burrows, J. T. et al.: Proc. Third International Conf. on Equine Infectious Disease, Paris, 1972, 306.
- [9] Studdert, M. J. et al.: *Aust. Vet. J.*, 55: 488, 1979.
- [10] 川上善三等: 日本家畜卫生实验场《研究报告》, 昭和 41 年, 210, 1968.
- [11] 川上善三等: 《日本兽医师会雜誌》, 32: 317, 1979.
- [12] Bryans, J. T.: Proc. Third International Conf. on Equine Infectious Disease, Paris, 1972, 322.
- [13] Plummer, G. et al.: *Virology*, 19: 412, 1963.
- [14] Kemeny, L. T. et al.: *Canad. J. Comp. Med.*, 34: 59, 1970.

- [15] Gleeson, L. T.: *Aust. Vet. J.*, 53: 360, 1977.
- [16] Girard, A.: *Canad. J. Comp. Med.*, 32: 603, 1968.
- [17] 川上善三等: 日本家畜卫生实验场《年报》, 昭和42年, 119, 1967。

## ISOLATION AND PRELIMINARY IDENTIFICATION OF EQUID HERPESVIRUS 1

Liu Jinghua Hao Cong Yuan Zhaomin

(The Research Institute of Changchun Veterinary College, Changchun)

In spring of 1980, 5 strains of herpesvirus were isolated from 10 aborted fetuses from two horse ranches in the northeast of China. On the basis of the evidence obtained from electron microscopy, cultivation studies in cell cultures and inoculation test on pregnant mares and donkeys, the isolates were identified as Equid herpesvirus 1 and

considered to be the causative agent of the natural outbreaks or abortion in mares in the above areas.

This is the first report of isolation of Equid herpesvirus 1 in China and thus providing a possibility for more detailed studies on the virus and disease caused by it.