

长爪沙鼠是流行性出血热病毒敏感的实验动物

朱智勇 姚顺荣 付桂明 翁景清

(浙江省卫生防疫站, 杭州)

1978年李镐汪等^[1]用黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)作实验动物,分离到朝鲜出血热病毒后,非疫区的正常黑线姬鼠在研究流行性出血热病毒(EHFV)的工作中,受到高度重视。但该鼠的来源,包括人工饲养和繁殖等许多问题较难解决。最近,我们发现长爪沙鼠(下称沙鼠)(*Meriones unguiculatus*)对 EHFV 甚为敏感。本文报道 EHFV 在沙鼠体内的某些生物学特性。

材料与方 法

(一) 沙鼠

由我站动物室和浙江人民卫生实验院动物室提供,体重 30—50g,雌雄均可使用。

(二) 非疫区黑线姬鼠

捕于本省黄岩县院桥公社野外。

(三) EHFV 毒株

R₁, R₂ 株系 1981 年从本省嵊县疫区黑线姬鼠肺中分离; R₁₀ 株系 1982 年从本省天台县疫区黑线姬鼠肺中分离^[2]; B₁ 株系 1982 年从嵊县出血热病人血液分离; R₁₁ 株系 1983 年从本省开化县疫区大足鼠(*R. nitidus*)肺中分离;陈株^[3], H₁₁₀,^[4] AI^[5], ALc96 株^[6] 分别从安徽、东北病人血液,江苏、安徽黑线姬鼠肺分离,由安徽省医学科学研究所提供;76-118 株^[1] 来自美国疾病控制中心,由徐志一副教授提供。

(四) 鼠肺标本

R₁, R₁₀, R₁₁ 系自然感染 EHFV 的黑线姬鼠肺(捉自本省建德县更楼公社); R₁₁, R₁₁ 系自然感染 EHFV 的褐家鼠(捕于杭州市)。

(五) 不同途径接种

每只鼠接种 1% EHFV 阳性鼠肺悬液,肺内 0.1ml,皮下 0.3ml,腹腔 0.5ml,肌肉 0.2ml,口腔 0.1ml(滴入),鼻腔 0.05ml(滴入),8 天后杀鼠取肺检查。

(六) 病毒分离

将荧光阳性的鼠肺制成的 1% 悬液或发热期的 EHF 病人血液,肺内(0.2ml)和皮下(1ml)接种沙鼠,经 7—20 天后杀死,取肺检查。

(七) 血清

EHF 阳性参考血清:金××血清,经朝鲜出血热(KHF)抗原片(来自美国陆军传染病医学研究所,由军事医学科学院提供)和浙江、安徽 EHFV 抗原证实为荧光阳性反应;EHF 病人双份血清系采自嵊县;呼肠弧多价兔抗血清(I—III 型)和 EHFV A1 株兔抗血清由安徽省医学科学研究所赠送;马抗人 IgG 荧光血清和兔抗黑线姬鼠 IgG 荧光血清及 EHFV R₁, B₁ 株兔抗血清,由本站制备。

(八) EHFV 陈株感染的 A₁₁₀ 细胞抗原涂片由安徽省医学科学研究所赠送。

(九) 间接荧光技术

按常规方法进行,第一抗体和第二抗体均作用 30 分钟。

(十) 抗体测定

接种 EHFV 的沙鼠经不同时间剪尾取血,在 EHFV 陈株感染的 A₁₁₀ 抗原涂片上测定其滴度。

结 果

(一) 各种实验动物对 EHFV B₁ 株的敏感性

长爪沙鼠、豚鼠、大白鼠、小白鼠、金黄地鼠、棉鼠、兔子接种 R₁ 株后 21 天,解剖取肺检查, EHFV 抗原均阴性。鉴于 B₁ 株在黑线姬鼠体内 4 天即可检出,我们将上述实验动物接种 B₁-P₁ 株(B₁ 株在黑线姬鼠体内传 3 代)后 7 天取肺,结果仅在长爪沙鼠体内检出 EHFV 抗原,并可连续传代,现已传 7 代。

本文于 1983 年 5 月 25 日收到。

表 1 不同 EHF 毒株经肺接种沙鼠后肺中检出抗原的动态变化

Table 1 Time distribution of various EHFV antigens in lungs of *M. unguiculatus* after inoculation

| 毒 株 | 接种后天数[阳性数(只)/接种数(只)] | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 |
| B ₅ -P ₆ | 0/1 | 1/2 | 2/2 | 2/2 | | 2/2 | | 0/2 | 0/3 | | |
| R ₃ -P ₂₂ | | | | | 3/3 | 2/2 | | | | | 0/2 |
| R ₇ -P ₁ | | | | | 2/2 | | | | | 0/2 | |
| R ₁₀ -P ₁ | | | | | 2/2 | | | | | 0/2 | |
| R ₁₁ -P ₀ | | | | | 1/1 | | | | | | 0/1 |
| R ₁₆ -P ₀ | | | | | 0/1 | | 1/1 | | | | |
| R ₁₈ -P ₀ | | | | | 1/1 | | 1/1 | | | | 0/1 |
| R ₁₉ -P ₀ | | | | | 1/1 | | 1/1 | | | | |
| R ₂₃ -P ₁ | | | | | 1/1 | | 1/1 | | | | |
| 陈株 | | | | | 2/2 | 1/1 | | | | | 0/2 |
| H _{8.05} | | | | | 1/1 | 1/1 | | | | | 0/1 |
| A1 | | | | | 1/1 | | | | | | 0/1 |
| ALC ₉₆ | | | | | 2/2 | | | | | | 0/1 |
| 76-118 | | | | | 1/1 | | | | | | 0/1 |

表 2 EHF 病毒 B₇ 株经不同途径感染沙鼠的情况Table 2 Detection of the EHFV antigens with different parts of infection using EHFV (Strain B₇)

| 接 种 途 径 | 阳性数(只)/接种数(只) |
|---------|---------------|
| 肺 内 | 2/2 (+++ ++)* |
| 皮 下 | 2/2 (++) |
| 腹 腔 | 1/2 (+++ -) |
| 口 腔 | 2/2 (++) |
| 鼻 腔 | 1/2 (++) |
| 肌 肉 | 2/2 (++) |

* 荧光强度: 根据荧光亮度和范围区分+, ++, +++, -表示阴性(下同)。

表 3 接种 B₅-P₆ 的 3 只沙鼠血中 EHFV 抗体的动态变化Table 3 Detection of antibodies in sera from three *M. unguiculatus* after inoculation with EHFV (strain B₅)

| 接种后天数 | 抗 体 滴 度 | | |
|-------|---------|--------|--------|
| | 鼠 1 | 鼠 2 | 鼠 3 |
| 4 | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| 6 | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| 8 | 1:80 | 1:80 | 1:80 |
| 10 | 1:1280 | 1:1280 | 1:320 |
| 14 | 1:5120 | 1:5120 | 1:1280 |
| 23 | 1:5120 | 1:5120 | 1:1280 |

表 4 EHFV 抗原在两种鼠体内的分布

Table 4 Distribution of EHFV antigens in *A. agrarius* and *M. unguiculatus* tissues of infected with EHFV

| 动物 | 肺 | 脾 | 肾 | 小肠 | 大肠 | 肝 | 胃 | 膀胱 | 唾液腺 | 泪腺 | 脑 | 心 | 睾丸 |
|------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|--------------|--------------|-------------|-----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| 长爪沙鼠 | 2/2 (+++ ++) | 2/2 (+++ ++) | 2/2 (+++ ++) | 2/2 (+++ +++) | 2/2 (+++ +) | 2/2 (+ +) | 1/2 (+-) | 1/2 (+-) | 2/2 (+++ ++) | 2/2 (+++ +) | 0/2 (--) | 0/2 (--) | 0/2 (--) |
| 黑线姬鼠 | 2/2 (+++ +++) | 2/2 (+ ++) | 2/2 (++ +) | 2/2 (+++ ++) | 2/2 (++ +) | 2/2 (+ +) | 2/2 (+ +) | 1/2 (+-) | 1/2 (++ -) | 2/2 (+ +) | 0/2 (--) | 0/2 (--) | 0/2 (--) |

(二) 沙鼠对 EHFV 不同毒株的敏感性和检出的动态变化

用 R₃、R₅、R₁₀、R₁₅、R₁₆、R₁₈、R₁₉、R₂₃、B₃ 株的 1% 鼠肺悬液(约 1000ID₅₀)和陈株、H₂₂₀₅、Al、ALC₀ 株的细胞悬液经肺内接种沙鼠后 7—9 天, 均可在肺中检出 EHFV 抗原, 10—14 天后大部转阴性反应(表 1)。

(三) 不同途径接种沙鼠后的感染情况

用 B₃-P₄ (B₃ 株在黑线姬鼠体内传 4 代) 1% 肺悬液经各种途径接种沙鼠, 均可感染成功, 以肺内和腹腔接种的荧光阳性最强(表 2)。

(四) 抗体反应

用 B₃-P₄ 接种 3 只沙鼠, 经不同时间采血测定抗体, 结果表明: 接种后 8 天有 EHFV 抗体产生, 14 天可高达 1:5120(表 3)。

(五) EHFV 在沙鼠和黑线姬鼠体内的分布

以 B₃-P₄ 感染沙鼠和黑线姬鼠, 各取 2 只检查体内抗原分布的情况, 见表 4 及图版 1-A—E。结果表明 EHFV 在这两种鼠体内的分布相似, 但在黑线姬鼠体内的分布与国外报道的有所不同^[4,7]。

(六) 沙鼠肺中病毒滴度的测定

取经 B₃-P₄ 株感染的沙鼠肺, 其荧光强度中等(++)和强阳性(+++)的各一个, 在沙鼠中测定的滴度分别为 10^{-6.1} 和 10^{-6.1}, 在黑线姬鼠中测定的滴度分别为 10^{-6.1} 和 10^{-1.0}, 说明此毒株对两种鼠敏感性相似。

(七) 沙鼠接种 EHFV 后的反应

沙鼠接种 EHFV 后与黑线姬鼠一样, 除在体内各脏器中检出 EHFV 抗原外, 未出现有发热、出血、食欲改变等现象, 为无症状的病毒感染。

(八) 沙鼠排泄物和血液中 EHFV 的分离
沙鼠经 B₃ 株接种后 6 天, 粪便和尿中均可分离到 EHF 病毒。

(九) 病毒分离

用沙鼠已在 2 份褐家鼠肺中分离到 2 株 EHFV; 4 份黑线姬鼠肺中分离到 3 株; 2 份大足鼠肺中分离到 1 株和 3 份 EHF 病人全血中分离到 1 株。

讨 论

长爪沙鼠为啮齿目仓鼠科沙鼠亚科内的一个种, 分布于我国新疆、内蒙、甘肃、山西、河北等地, 国外分布于蒙古和苏联。它能传播鼠疫, 可作为马来丝虫的动物模型^[8]。它具有驯服, 易饲养, 繁殖力强, 实验方便等优点。

实验结果表明, 沙鼠对流行性出血热病毒甚为敏感: 1. 对我省自然感染 EHFV 的黑线姬鼠、大足鼠和褐家鼠肺悬液或经人工在黑线姬鼠中或细胞中传代的来自黑线姬鼠或病人血液的国内外某些 EHFV 均敏感, 肺内接种几乎可使全部沙鼠感染; 2. 六种途径接种, 第一代即可感染, 无需传代适应; 3. 脏器内检出特异性荧光的部位与黑线姬鼠相同, 胃肠道组织中同样也有 EHFV 的增殖, 这方面未见有报道; 4. 接种 EHFV 后有明显的抗体反应; 5. EHFV 能在鼠体内连续传代; 6. 在经接种 EHFV 的沙鼠排泄物和血液中均可分离到病毒。

EHFVB₃ 株(+++)接种沙鼠后 4 天, 即可在肺内查到, 5—7 天最强, 但第 10 天即消失。第 13 天取肺分离 EHFV 即呈阴性。从而找出了一年前我们用 R₃ 株在沙鼠中传代失败的原因(当时按

21 天传一代)。

实验证明,当沙鼠感染 EHFV 后产生抗体不久,病原就很快消失,此急性感染过程与人体相似。这显然与抗体和病毒长期并存的黑线姬鼠不同,造成两者之间差别的原因,有待进一步研究。

Tsai 等证明,用 KHFV 76/118 株经脑内接种可使小白鼠乳鼠感染,但对成鼠仍不敏感,也未报道对其他毒种的敏感性^[10]。最近,李镐汪等报道可用 Wistar 大白鼠来分离城市中野鼠体内的 EHFV,但该鼠对来自 KHF 病人的 Han/AP₁ 株和来自黑线姬鼠的 76/118 株均不敏感^[11],这表明 Wistar 大白鼠用于分离 Hantaan 病毒有一定的局限性,可能不如沙鼠敏感性强。另外,我们发现沙鼠乳鼠对国内外各种来源的 Hantaan 病毒也很敏感,并且具有与成鼠许多不同的特点。试验结果表明,沙鼠可用于多种宿主动物体内 EHFV 的分离,且在较短的时间内即可获得毒株,而获得的毒

株可用于疫苗的研制。这些均优于传代细胞。

参 考 文 献

- [1] Lee, H. W. et al.: *J. Inf. Dis.*, **123**: 248, 1978.
- [2] 朱智勇等: 中华微生物学和免疫学杂志, **3**: 73—75, 1983.
- [3] 倪大石等: 中华医学杂志, **63**: 65—68, 1983.
- [4] 李钟铎等: 中华流行病学杂志, **4**: 198—201, 1983.
- [5] 宋 干等: 中国医学科学院学报, **4**: 75—77, 1982.
- [6] 何 浩等: 中华流行病学杂志, **4**: 148—152, 1983.
- [7] Lee, H. W. et al.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**: 1106, 1981.
- [8] 遵义医学院寄生虫组: 动物学报, **23**: 219, 1977.
- [9] Tsai, T. F. et al.: *Lancet*, **II**(8296): 503, 1982.
- [10] Lee, H. W. et al.: *J. Inf. Dis.*, **146**: 638, 1982.