

# 兔出血症病毒的分离和血清学性质的研究

孙富林 赵林 宋宝云 黄学明

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

1986年2月28日, 武汉市第二制药厂的试验用家兔突然口鼻渗出鲜血, 几乎全部猝死。因发病急, 前兆出现短暂, 未能及时进行防治。我们观察罹病死亡的症状, 认为此病例与黄印尧等<sup>[1]</sup>报道的雷同。湖北省中医药研究院也相继发生此种病的流行。我们对这两个不同来源的病料进行了相同的处理。从出血症死亡兔的肝、脾脏等组织提取病毒粗纯物, 回接同种动物后, 可引起同样典型的发病症状。进一步将死亡兔的肝、脾等脏器组织匀浆, 经低速、高速、超速和蔗糖梯度离心后制样, 电镜观察可见典型的病毒粒子。而部分纯的含病毒粗制品, 可与南京农业大学分离的兔出血症病毒的抗血清, 产生琼脂糖免疫扩散沉淀反应。因此, 根据该病毒的某些特性, 它与南京农业大学分离的病毒株为同一种血清型。

## 材料和方法

### (一) 病毒株

1. 由南京农业大学兽医微生物教研组赠送的兔出血症病毒毒株。

2. 从武汉市第二制药厂和湖北省中医药研究院的病兔的脏器分离的病毒株。

### (二) 病毒的增殖、分离和提纯

将上述病料用生理盐水进行10倍稀释, 匀浆, 室温低速离心30分钟, 每只2kg左右的健康大耳白兔注射2ml, 试验兔约在48小时左右死亡。取人工接种病毒致死兔的肝、脾、肺等脏器进行血球凝集试验, 测定其血凝效价。选择高效价的病料(一般在1:640以上), 用两倍的生理盐水稀释, 高速组织匀浆器匀浆, 1—20,000r/min 5分钟, 再以 $21,500 \times g$  8℃离心30分钟。取上清液经滤纸过滤, 加入4℃等体积的氯仿, 置4℃10分钟, 摇动3次。再以 $17,200 \times g$  8℃离心30分钟。取水相, 以 $56,577 \times g$  13℃离心5小时, 取沉淀, 加少量TE缓冲液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 匀浆悬浮。进一步采取15—50%不连续蔗糖梯度离心, 最上层铺1ml病毒悬

液, 以 $170,000 \times g$  8℃离心150分钟。分别吸取上下两区带, 经两倍TE缓冲液稀释, 再以 $56,577 \times g$  13℃超速离心5小时。其沉淀用少量TE缓冲液稀释, 匀浆悬浮, 再以 $21,500 \times g$  8℃离心30分钟, 其上清病毒悬液作为电镜观察材料, 置冰箱备用。

### (三) 电镜观察

取病毒悬液一滴, 滴在火棉胶碳膜铜网上, 5分钟后用滤纸吸干, 加2%的磷钨酸负染, 于JEM-100C电镜下观察记录。

### (四) 血清学试验<sup>[2,3]</sup>

1. 用南京农业大学的兔出血症病毒株作为标准株制备抗血清: 取南京农业大学的兔出血症病毒, 人工感染健康大耳白家兔。取病死兔的肝脏, 测血凝效价。用高效价的肝等脏器制作疫苗(方法另文报道)。经无菌检查, 安全试验和效力试验合格后, 即可使用。

每只健康家兔注射上述疫苗2ml, 7天后将同种病毒致死的兔肝, 用两倍生理盐水稀释, 匀浆, 室温低速离心15分钟。取上清液加等量福氏完全佐剂, 在兔背部皮下三点注射。每周注射一次, 注射3次。最后一次用不含佐剂的病毒悬液, 耳静脉注射4ml, 一周后采血。G5细菌漏斗过滤除菌, 分装小瓶, 置-20℃冰箱备用。

2. 琼脂糖双扩散试验: 在pH8.4 0.015M巴比妥钠缓冲液中加入1%琼脂糖, 加热融化倒平板, 打梅花形孔, 中间孔加入抗血清, 周围小孔加入抗原, 置37℃24小时进行扩散反应。

## 结果和讨论

### (一) 病毒的分离

在病毒分离提纯过程中发现, 具有血凝活性的病死兔脏器组织经提纯后, 在电镜下可见有典

本文于1987年3月7日收到。

承本所技术室协助进行电镜观察和超速离心, 特此致谢。

型的病毒粒子。反之,不具血凝活性的脏器组织,经同法分离提纯后,则未见病毒粒子。试验结果表明,该病毒能与人的“O”、“B”及“AB”型红血球发生凝集反应。而这种血凝活性与病毒粒子密切相关。

## (二) 症状

人工感染试验结果表明,该病毒潜伏期短,发病急,一般 24 小时后体温即升高约  $1-1.5^{\circ}\text{C}$ , 48 小时后死亡,急性型能重复出现典型症状,口鼻渗血。亚急性型患者口鼻不渗血,72 小时左右死亡。缓解型患者体温能逐渐恢复正常,并产生抗体。亚急性型患者,经解剖观察,内部脏器有大量淤血斑块,与刘胜江等<sup>[4]</sup>的报道一致。试验结果表明,这种病毒可以通过兔连续传代。但耐过自然感染和人工感染的兔,具有较高的血凝抗体,可耐受高剂量高浓度同种抗原的攻击。

## (三) 病毒形态

电镜观察发现,有大量形态大小一致的病毒颗粒,与余锐萍等<sup>[5]</sup>的报道类似。病毒粒子直径为  $33-40\text{nm}$ , 无囊膜,呈 20 面体。超速离心后的病毒悬液,经蔗糖梯度离心,分成两条区带。上层为空壳病毒粒子(可能为流产病毒或称不成熟病毒粒子)(图 1),下层为完整病毒粒子(图 2)。完整病毒粒子经  $2\text{M}$  醋酸胺释放后,可见大量核

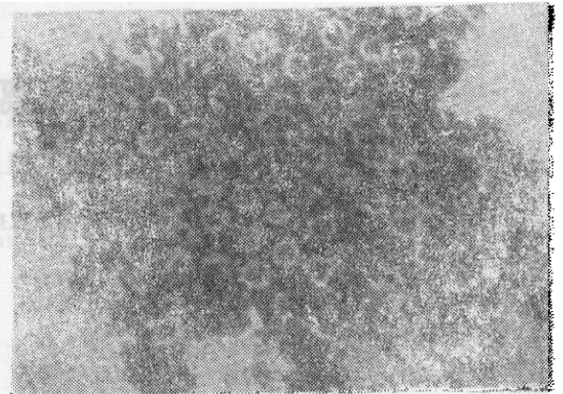


图 1 大量空壳病毒粒子 ( $102,000\times$ )

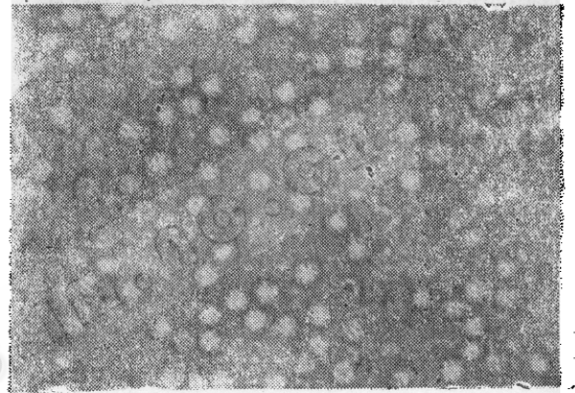


图 2 完整病毒粒子 ( $67,000\times$ )

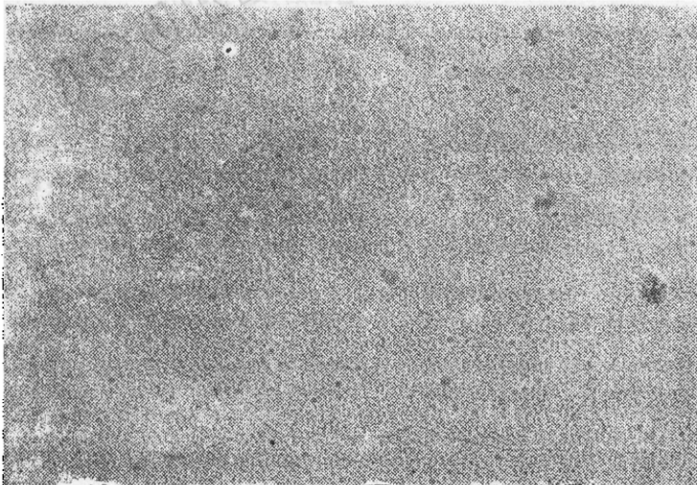


图 3 线性核酸 ( $30,000\times$ )

酸(图 3)。

## (四) 病毒免疫扩散试验

从图 4 可见,我们从武汉市第二制药厂和湖北省中医药研究院分离的病毒株和南京农业大学的兔出血症病毒株及其血清,进行琼脂糖免疫双

扩散试验,出现明显沉淀线。沉淀线的两端相互融合,无任何交叉反应出现。证明它们具有相同的抗原性,应属于同一血清型病毒。

关于该病毒的核酸类型,文献报道不一。邓

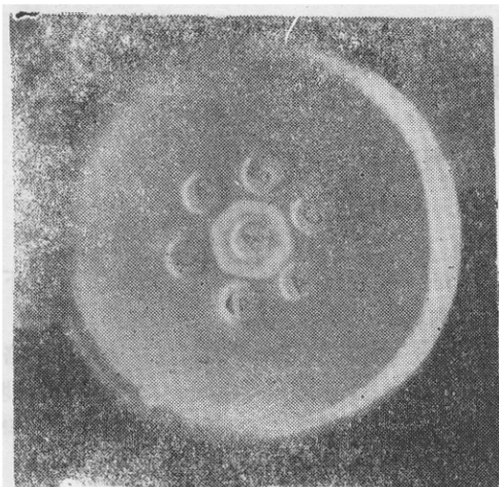


图4 琼脂糖免疫双扩散试验图

中心孔: 南京农业大学的兔出血症病毒抗血清 周围孔: A. 南京农业大学的兔出血症病毒株抗原 B. 武汉市第二制药厂病毒株抗原 C. 湖北省中医药研究院病毒株抗原

正文等<sup>[6]</sup>和杜念兴等<sup>[7]</sup>报道该病毒核酸为 RNA。周燧等<sup>[8]</sup>认为其核酸为 DNA。这三株病毒的核酸性质及其在分类学的地位, 目前正在进行深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] 黄印尧等: 福建畜牧兽医, 7(3): 10—11, 1985。
- [2] Ackroyd, J. F.: Immunological Methods. 61 1st, Oxford, pp. 56—57, 1964.
- [3] Oss, G. J. et al.: Method in Immunodiagnosis, pp. 1—30, 1973.
- [4] 刘胜江等: 畜牧与兽医, 16(17): 253—255, 1984。
- [5] 余锐萍等: 中国兽医杂志, 12(9): 2—4, 1986。
- [6] 邓正文等: 实验生物学报, 16(1): 137—141, 1986。
- [7] 杜念兴等: 病毒学报, 2(2): 145—151, 1986。
- [8] 周 燧等: 病毒学报, 2(3): 269—270, 1986。