

鸭中人肠道病毒的分离与鉴定

陈美光 孙玉清 谢秋莲 李延军 王国汉*

(河南省卫生防疫站, 郑州)

人肠道病毒属于微小核糖核酸病毒科 (Picornaviridae) 肠道病毒属 (*Enterovirus*) 的病毒^[1]。其自然宿主主要是灵长目动物。其他动物如牛、猪、鼠、苍蝇、蟑螂等有携带这类病毒的现象, 但没有证明它们是自然宿主。文献报道^[2], 人的柯萨奇 B₁ 和猪的水泡病病原, 两者的同源物有 50% 相同, 彼此的抗原性无区别, 因此认为人的柯萨奇 B₁ 就是猪的水泡病病原。

从鸭中可分离到鸭肝类病毒、禽脑脊髓炎病毒^[3]、甲型流感病毒等, 但未见报道分离到人肠道病毒。我们从鸭中分离出 4 株致细胞病变因子 (编号: D₂、D₇、D₁₉ 和 D₃₆), 经酸和乙醚试验, 证明其中 3 株 (D₂、D₇、D₁₉) 属肠道病毒, 另一株 (D₃₆) 为其他病毒。现将 3 株肠道病毒的分离与鉴定结果报道于下。

材料和方法

(一) 材料

1. 鸭肛拭子标本: 1983 年 8、9 月间于南阳地区的淅川、西峡、邓县、唐河和桐柏 5 县采集鸭肛拭子标本 69 份, 每份由 5—6 只鸭肛拭子组成。鸭肛拭子放入无菌 Hank's 液内浸洗, 使成悬液, 冻融 2 次, 4,000rpm 离心 30 分钟, 取上清液加入 3 种抗菌素 (最终浓度: 青霉素 1,000u/ml, 链霉素 1,000 μ g/ml, 卡那霉素 200 u/ml) 处理, 无菌试验阴性后接种细胞或动物。个别标本污染霉菌, 加两性霉素 B (最终浓度 10 μ g/ml) 处理。

2. 细胞: 用 Vero 和 Hep-2 两株细胞, 营养液为 MEM 88%、小牛血清 10%, 三种抗菌素和谷胺酰氨分别为 1%, pH7.2。维持液成分同营养液, 小牛血清改加 2%。

3. 肠道病毒诊断血清: 肠道病毒单价免疫血清 (购自医科院医学生物研究所) 使用时按 Lim 氏法组成 8 个血清组, 组合血清 (0.1ml) 中每一单价血清含 80 个中和单位。

脊髓灰质炎病毒免疫血清 (购自同一单位) 单价和三价血清 (0.1ml) 中的各型抗血清含 80 个中和单位。

4. 动物: 小白鼠: 出生 24 小时以内的乳鼠; 雏鸭: 1 周龄的雏鸭, 共 11 只, 平均体重 40.6g。

(二) 方法

1. 病毒分离:

(1) 用细胞分离病毒: 采用单层 Vero 和 Hep-2 细胞, 每份标本接种 2 支细胞管, 每支加 0.8ml 维持液和 0.2ml 标本液。放 37°C 温箱中静置培养, 于 1、2、3、5、7、9、12、14 (天) 观察细胞病变。第一代观察 14 天, 以后各代观察 9 天。盲传 3 代, 阳性者放 -20°C 冰箱保存, 待鉴定。

(2) 用乳小白鼠分离病毒: 通过细胞没有分离出病毒的标本, 再经乳鼠盲传 2 代。按分离肠道病毒的方法接种: 每只乳鼠颅内 0.01 ml; 皮下 0.03ml; 腹腔 0.03ml, 观察 14 天。用发病乳鼠制成 20% 组织悬液, 4,000rpm 离心 30 分钟, 上清液留作传代或鉴定。

2. 家鸭带毒时间的测定: 实验用 D₂、D₇、D₁₉ 三株病毒, 以无菌 Hank's 液稀释成 0.1ml 含 1000TCID₅₀, 采取一次性接种, 每只雏鸭接种病毒悬液 0.2ml, 用导尿管由口直接导入喙囊内。

* 河南省南阳地区卫生防疫站

(1) 鸭便收集及 20% 悬液的制备: 全部实验共收鸭便 9 次: 接种前 1 次, 接种后 4 小时、1、2、3、5、7、9、15 天各采 1 次。按组收集鸭便, 每组收 2—5g。每收便一次后洗净铁笼和接使用具, 经火焰消毒后再用。鸭便用含三种抗菌素的 Hank's 液制成 20% 悬液, 冻融 3 次, 离心去沉淀, 上清液按常规在 Vero 细胞上滴定 TCID₅₀, 换算成 TCID₅₀/g 便。

(2) 鸭血采取: 在接种后 20—30 天, 由鸭足静脉采血 0.25ml, 加入 0.25ml 抗凝剂, 2,000 rpm 离心 20 分钟, 取上清置 -20℃ 冰箱保存, 用前于 56℃ 水浴灭活 30 分钟。

(3) 鸭组织的采取: 于实验的第 20 天, 各组杀死一只鸭, 以无菌手续取出脑、心、肝、肺、小肠、盲肠、胰等脏器, 再取各脏器 1—2g 组织, 用 Hank's 液制成 20% 悬液, 3,000rpm 离心 30 分钟取上清加三种抗菌素, 接种细胞做病毒分离。

3. 病毒鉴定: 用血清中和试验法, 按肠道病毒鉴定常规进行, 用 100TCID₅₀/0.1ml 的病毒量。

结 果

(一) 病毒分离

1. 69 份鸭肛拭子标本通过 Vero 细胞分离出病毒 4 株, 分离率为 5.8%。其中 3 株为肠道病毒, 肠道病毒的分离率为 4.3%。3 株肠道病毒在 Vero 细胞上第一代 CPE 出现一般在 3—5 天, 以后各代 CPE 出现变快, D₇、D₁₉ 株 24 小时以内可以完成 CPE, 而 D₂ 株 48 小时才能完成(图 1—3)。

2. 通过 Vero 细胞未分离出病毒的鸭肛拭子标本再经乳鼠盲传两代, 结果仍未分离出病毒。

3. 鸭脏器组织悬液通过 Vero 细胞盲传 3 代, 未分离出病毒。

(二) 肠道病毒 D₂、D₇、D₁₉ 的鉴定

1. 生物学特性:

(1) 对酸和乙醚耐受性: ①对酸: 三株病毒的第 3 代组织培养液各取 1ml, 用 5N 醋酸

调 pH 至 3.0, 放 4℃ 24 小时, 然后用 4N NaOH 调 pH 至 7.2, 在 Vero 细胞上滴定 TCID₅₀; ②对乙醚: 3 株病毒各取 0.8ml, 加乙醚 0.2ml, 放 4℃ 18 小时, 然后减压抽去乙醚, 在 Vero 细胞上滴定 TCID₅₀。同时滴定未经处理的病毒的 TCID₅₀ 作为对照。以滴度是否下降判定病毒对酸和乙醚的敏感性。结果证明病毒 D₂、D₇ 和 D₁₉ 对酸和乙醚都有耐受性。

(2) 对乳鼠致病性: 3 株病毒按肠道病毒

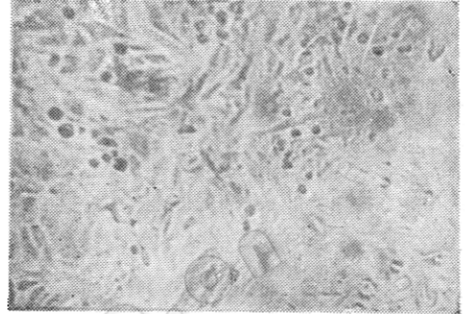


图 1 正常 Vero 细胞(125×4)

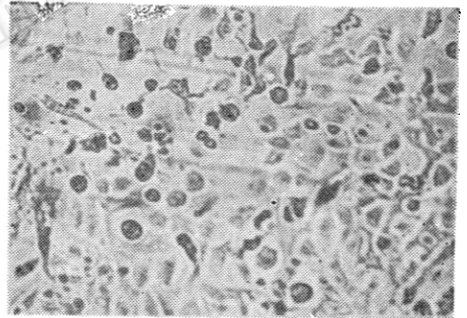


图 2 D₂ 在 Vero 细胞上第 16 小时 CPE (125×4)

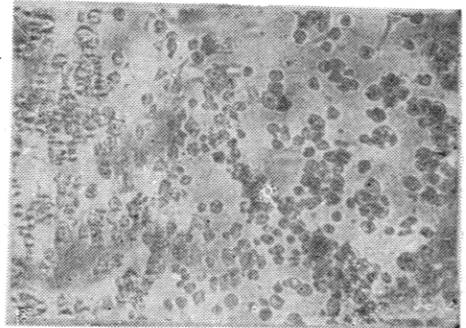


图 3 D₇ 在 Vero 细胞上第 24 小时 CPE (125×4)

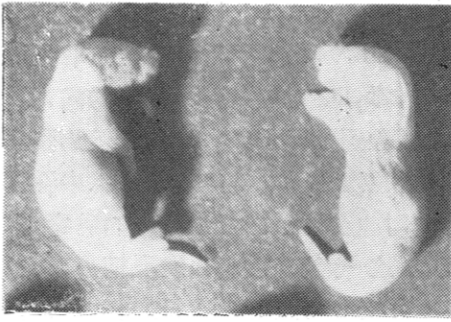


图4 D₂第3天小鼠致死(135底片,放大4寸)

分离办法,分别接种一窝乳鼠(5—7只),观察14天。结果证明: D₂株对乳鼠无致病性;而D₇和D₁₉株则有较强的致死性感染,潜伏期3天。发病乳鼠毛色无光,反应迟钝,爬行时出现震颤和翻滚,继之出现一后肢麻痹,后发展为双后肢,乳鼠濒死前头不能抬起,呼吸困难,最后呼吸衰竭而死(图4)。

(3) LD₅₀ 和 TCID₅₀ 测定: 选10窝乳鼠,每窝5只,测定D₇、D₁₉两株病毒的LD₅₀。病毒作10倍连续稀释,取10⁻⁴—10⁻⁸五个稀释度,每一稀释度接种一窝乳鼠,按肠道病毒分离法接种,逐日记录乳鼠存活情况,观察14天,最后计算LD₅₀。结果D₇株LD₅₀为5.1, D₁₉株为5.4。

D₂、D₇、D₁₉三株病毒的TCID₅₀ 滴定是在Vero和Hep-2细胞上做的,按常规进行,第7天判定结果: 在Vero细胞上D₂株TCID₅₀为7.25, D₇和D₁₉株为6.5; 在Hep-2细胞上D₂株TCID₅₀为5.25, D₇株为8.0, D₁₉株为6.5。

(4) 家鸭带毒时间的测定: 11只雏鸭分成3个实验组: 第一组4只,接种D₂; 第二组4只,接种D₇; 第三组3只,接种D₁₉。接种前采集的鸭便在Vero细胞上进行病毒分离盲传3代,未发现致细胞病变因子。接种后采集的各次鸭便,在Vero细胞上滴定病毒含量,结果证明,3株病毒从鸭体中排出各有一定的特点: D₂株从鸭体中排出,第3天开始,第5天达到高峰,然后呈直线下降,排毒曲线上升快下降也快。D₇和D₁₉株从鸭体中排出有相同和不同点。相同的是排毒曲线上升和下降比较平稳,高峰期基本相同。不同点是① D₇株第3天开始排毒,而D₁₉株接种后4小时即开始排出; ② D₇株排毒延续时间比D₁₉短。

3个毒株接种后的第15天,雏鸭结束排毒。由于第9天以后采样间隔时间太长,所以排毒结束的具体时间未测到。但从排毒曲线判断, D₂株结束最早, D₇次之,再次是D₁₉。

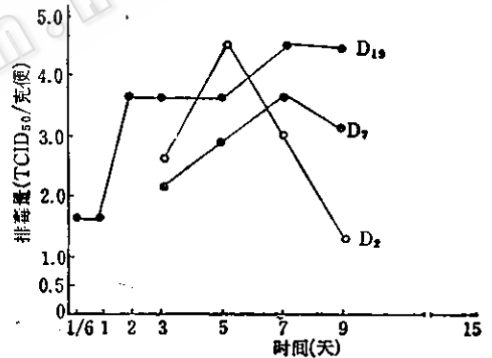


图5 三株病毒从鸭消化道中排出情况

表1 三株病毒的生物学特性和血清学特性

分离地点	毒株	生物学特性						血清学特性										型别			
		对初生乳小白鼠			在传代细胞上		对酸和乙醚的抗性		脊灰病毒免疫血清				肠道病毒组合血清								
		致病性	潜伏期	LD ₅₀	Vero TCID ₅₀	Hep-2 TCID ₅₀	酸	乙醚	I	II	III	I+II+III	A	B	C	D	E		F	G	H
唐河县	D ₂	-	-	-	7.25	5.25	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Polio III
	D ₇	+	3天	5.1	6.5	8.0	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	Cox. B ₁
桐柏县	D ₁₉	+	3天	5.4	6.5	6.5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	Cox. B ₁

注: 1. “+”表示有致病性和有细胞病变; “-”表示无致病性和无细胞病变。

2. 对酸和乙醚耐受性试验第7天结果。

(三) 血清学特性

1. D_2 、 D_7 和 D_{19} 经血清学鉴定,证明 D_2 株属脊髓灰质炎病毒 III 型; D_7 和 D_{19} 株属柯萨奇病毒 B_1 型。

2. 鸭血中和抗体测定: 毒株 D_2 和 D_{19} 于接种后第 20 天, D_7 株于接种后的第 28 天, 分别采血, 用相对应的毒株做抗原按常规测定血中的中和抗体, 结果均未测出(表 1, 图 5)。

讨 论

鸭中分离的三株病毒 (D_2 、 D_7 、 D_{19}), 其生物学和血清学均证明它们是人肠道病毒。在未鉴定之前曾怀疑它们是鸭子的病毒, 为弄清这个问题特地从病毒分离地点采回鸭血 66 份, 用分离的 4 株病毒作抗原, 测定中和抗体, 结果三株人肠道病毒的中和抗体均未测出。而另一株

病毒 (D_{36}) 在其中 2 份鸭血中显示高滴度的中和抗体 ($>1:640$)。说明 D_2 、 D_7 、 D_{19} 三株不是鸭子的病毒, D_{36} 可能是鸭子本身的病毒。

本试验用的鸭子系县城和集镇周围居民散养的, 经常出入于城镇排放的污水中吞食水中食物, 同时也会吞入肠道排出的病毒, 本实验就证明了这一点。曾有人发现柯萨奇 A₁ 型在蟑螂中可维持感染状态 15 日之久, 在其胃肠道和唾液腺中维持传染性更长 (20 天)。我们用雏鸭所做的实验证明了脊灰病毒 III 型和柯萨奇病毒 B_1 型在鸭消化道中可维持感染性一周。

参 考 文 献

- [1] Melnick, J. L. et al.: *Interuirology*, 4: 306, 1974.
- [2] 同上: 同上, 4: 306, 309, 1974.
- [3] 保坂康弘等: *ウイルス図鑑*, 302—303, 1972.