

鼠痘病毒灭鼠研究的一些方法

邓合黎 张明丽 何新桥

(青海省生物研究所)

我国的灭鼠研究过去多侧重于化学防治,在灭鼠中化防的确起了很大作用,但是它费人力、费物力、费时间,尤其是化费很多的粮食和难于找到一种比较理想的高效低毒灭鼠药。我们从摸索灭鼠新途径出发,开展了微生物灭鼠的探讨。有害啮齿类的微生物防治,国外已有近百年的研究史。它利用对人、畜、禽安全,对有害啮齿类致病的病原体,造成流行病达到防治目的。这项研究到目前为止已有苏联使用5170菌防治多种鼠类¹⁾和澳大利亚利用粘液瘤病毒防治欧洲野兔均获得良好效果²⁾。自1970年以来,我们利用鼠痘病毒(Ectromelia virus)作了防治小家鼠(*Mus musculus*)的试验,初步证明它对小家鼠致病力很强,死亡率很高,在野外条件下能造成鼠间流行病,并作了大田防治初试。又根据文献资料及我们的初步试验,认为它对人、畜、禽尚属安全。

一、病原体的制备

微生物灭鼠是一种将病原体人工感染鼠类后,导致鼠间疾病流行,达到灭鼠目的的一种方法。因此,进行微生物灭鼠的室内试验,第一步就是病原体的制备。

1. 冻干毒种: 按毒种剂量,用灭菌滴管或注射器,将一定比例的生理盐水(常用量为2毫升)注入安培瓶,反复吹打,使之溶化成为病毒悬液,吸入注射器内备用。

2. 组织悬液的制备: 鼠痘病毒感染鼠体后引起全身性的浸染,但取作制备病毒悬液的组织必须考虑三个条件: 体积较大;有大量的病毒积累;便于研磨以释放病毒。为了获得尽可能多的病毒作为病原体,我们选用肝组织作制

备组织悬液的材料。因为它是鼠痘病毒攻击、复制的所谓“靶器官”,而且鼠痘病毒比其他病毒更容易感染肝巨噬细胞。感染一旦在肝实质细胞确立,病毒复制将非常迅速,被感染的肝组织经过五次细胞有丝分裂后,不被感染的肝细胞是很少的,鼠也就死亡³⁾。所以,最好是取被感染的濒死鼠的肝。在使用前应选择发病典型个体的肝脏。

保存于50%中性甘油中的肝脏,吸去甘油后,以生理盐水反复吹打洗涤三次(每次5毫升)洗去甘油。然后移入玻璃组织研磨器内,先加入2毫升生理盐水研磨,基本磨匀后,再加4毫升生理盐水,再磨匀。吸取一滴悬液滴入营养琼脂斜面作细菌检验;另取一滴滴入沙保弱氏琼脂斜面作真菌检验。悬液内加入2毫升“双抗”溶液摇匀,3,500转/分15分钟离心,取其上清,即为病毒悬液。如系新鲜感染肝组织,则按无菌操作从鼠体内摘下直接研磨。

由于病毒不耐高温,整个操作过程应尽量保持低温。盛悬液的离心管应常埋插于冰块中。

病毒数量的计算,在有条件时可用鸡胚痘疱计数法测算,数量单位则用痘疱形成单位(PFU)⁴⁾。计算公式如下:

- 1) Прохоров, В. А., 1966 Микробиологический метод борьбы с вредными грызунами. Изд. Колос, Ленинград.
- 2) Thomas, M. Y. 1970 Myxomatosis and fibromatosis of rabbits, hares and squirrels. In: Infectious disease of wild mammals (J. W. Davis, et al.). The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.
- 3) Fenner, F. 1949 Mouse-pox (infectious ectromelia of mice): A review. J. Immunology, 36: 341—373.
- 4) 国立预防卫生研究所学友会编 1973 ウィルス实验学总论(修订二版)。丸善株式会社。

原液 1 毫升中的病毒数

$$= 10^a \times b \times \frac{1}{0.05} \text{ (PFU)}$$

10^a 是原液 10 的倍比稀释度, 即接种鸡胚时的浓度。 b 为每个浓度接种 4 个鸡胚而数得的绒毛尿囊膜上的平均痘疱数。

但是在野外工作时, 往往不具备鸡胚接种的条件, 这时可参考生物制品的数据, 将一个成年小家鼠的肝脏, 加 8 毫升生理盐水稀释, 获得 10^{-1} 悬液。 10^{-1} 悬液攻击小家鼠也比较合适。

二、动物的接种和浸染

动物的病原体接种有各种途径。虽然鼠痘是具丘疹的全身性感染的标准实验模式¹⁾, 但不同途径的接种, 病毒在动物体内的浸染途径是不同的。所以接种途径应根据实验目的和病毒在动物体内的浸染途径来选择。

网状内皮系统的巨噬细胞, 特别是肝脏里的, 有清除静脉注射的粒子的能力。其中, 肝的巨噬细胞是清除静脉注射的病毒粒子的最重要的细胞, 将病毒静脉注进鼠体后, 被肝巨噬细胞捕捉并破坏, 但如果大剂量静脉注射病毒, 会造成总胆管感染, 从而使病毒进入周围的肝实质细胞, 而感染的肝实质细胞或巨噬细胞引起邻近实质细胞的进一步感染。

病毒必须进入表皮才使皮肤感染。首先被感染的是真皮细胞或表皮的马尔丕基氏层细胞。病毒在皮肤内增殖后, 随淋巴细胞进入淋巴结再进一步增殖, 从而引起初期病毒血症。肝、脾的感染和继发性病毒血症使感染鼠呈全身性感染。

实验呼吸道感染中, 首先被感染的是呼吸道粘膜细胞和肺泡巨噬细胞。然后病毒一方面随感染巨噬细胞经淋巴结扩散至其它内脏, 另一方面随淋巴液流扩散。同时病毒还从被感染的鼠嗅觉粘膜经过嗅觉神经扩散至脑的嗅球。肺损伤的显著特征是病毒在淋巴上皮的复制。

脑内接种后, 病毒迅速进入体循环, 因而致死病例的肝、脾脏病毒效价总是很高。有人对小白鼠曾进行过 20 次脑接种传代, 结果没有发

现增加鼠痘病毒嗜神经的证据。

从上面的分析可以看出, 接种的途径和剂量应根据实验目的来选择。毒力测定应选用腹腔大剂量接种, 以便更直接观察病毒对动物的致命力, 免受动物体内其它因素的干扰。鼠痘病毒传代和感受性试验选用皮内小剂量接种。据我们观察, 在各种接种途径中, 后足掌皮内接种最能出现典型鼠痘病症, 肝脏也能积累大量病毒。因此, 在鼠痘病毒的动物实验中, 用得最多的是后足掌皮内接种。

腹腔接种: 皮肤消毒后, 将动物后部抬高, 头部向下, 使腹腔内肠管偏向胸部, 一定程度上可防止损伤肠管。针头于腹正中左侧下段刺入皮下, 在皮下滑行 1 厘米后刺入腹腔, 产生刺空感时表明针头已进入腹腔, 推注 0.5 毫升病毒悬液。若注射时皮下产生一鼓疱, 表示针头未刺入腹腔, 注入的病毒液在皮下, 应取消该动物, 另行接种。注射完毕, 以酒精棉球轻轻按捺针孔处。

后足掌接种: 以微量注射器 (总量为 0.25 毫升) 进行。接种部位是后足掌跗蹠部掌面几个疣突处, 针尖刺入皮内后约推进 3—4 毫米, 即可注入 0.03 毫升病毒悬液。通常接种的是左后足, 便于比较观察。

三、感染动物的观察

易感鼠接种鼠痘病毒的临床症状和病理变化与接种途径有密切关系。鼠痘病毒在小白鼠体内潜伏期为 7—9 天, 继发性皮肤病要到第八天才明显。也有人认为潜伏期为一星期, 临床病症从第 8 天开始出现。我们所用毒株对小家鼠毒力很强, LD_{50} 的 \log 值为 8.75, 足掌 0.03 毫升接种后, 常常在第 3 天即有病症出现, 临死前 1 天左右症状尤为明显。一般说第 5 天即有个体死亡, 同批实验鼠于 8 天左右全部死亡。

腹腔接种后, 感染鼠通常呈急性感染症状, 这是内脏性或全身性浸染所致, 常常在死亡前

1) Fenner, F. 1974 The biology of animal viruses (2nd edition). Academic Press. New York and London, 346—349.

一天或数小时外表仍似健康,活动正常,皮毛光滑。尸检可见肝、脾肿大呈弥散性坏死病变。腹腔内大量积液,胸腔也积有胸膜液。腹腔内脏器间发生显著粘连,肠壁增厚并充血,肠道充气。

后足掌接种一般引起慢性浸染。感染鼠毛乱无光泽,头面浮肿,运动迟钝,眼结膜发炎甚至瞎眼。四肢皮肤损害的症状最为典型,病程可分三期。第一期:脚的蹠面水肿。水肿从蹠面开始而后波及整个跗蹠,最后使脚呈梨状肿。由于水肿,皮肤绷得很紧似半透明,如作穿刺则渗出透明液体。第二期:皮肤溃烂为其特点。溃烂区始呈斑状,以后渐渐融合成斑片状。脚的患部与健康部在跗关节处形成截然分界。第三期:患脚坏死、变干,并在分界处脱落。当然,在整个脱脚过程中也包括肌肉、骨骼等方面的病损。同时,耳朵、尾巴、嘴的皮肤也受到损害。

试验过程中对老鼠的病症变化应逐日定时观察和详细记载,尸检也应详细记录,以备查看。

四、感染组织的收获与保存

感染组织的收获宜在鼠濒死时进行,因为死亡鼠体极易败坏导致污染,如取不到濒死鼠,则在鼠死亡后应尽可能及时收获。

1. 肝脏的收获:将濒死鼠置1:2,000浓度的新洁尔灭液中浸泡5—8分钟,移往无菌室,以无菌操作收获肝脏。将鼠尸腹面朝上钉于木板上,用碘酒、酒精棉球消毒,再用眼科无菌镊、剪,沿腹正中线剪开皮肤,分离皮肤和肌肉,充分暴露胸腹部肌肉。在肌肉面再消毒一次,另换一付无菌剪、镊沿腹正中线剪开腹、胸肌,充分暴露肝脏。再换一次无菌剪、镊,摘取整个肝脏,置50%中性甘油中保存,塞上瓶盖,以橡皮膏封固瓶口,注明编号。

2. 足皮肤的收获:一些研究者,在本世纪四十年代以前就证明了痘类病毒能在皮肤细胞中复制增殖,鼠痘病毒也具这一特征,所以收获肿胀期的足皮肤,它也含有丰富的病毒,是一种

良好的试验材料。

取足皮时选择脚未化脓和溃烂的个体进行,一旦溃烂则污染更甚。将鼠杀死,洗去脚上污垢,消毒后沿分界线环割皮肤,切口呈圆形(注意勿将肌肉或整肢切下),再用两把镊子像脱手套那样把皮肤翻剥下来,最后切去脚趾骨。考虑到皮肤上常有很多细菌,可用双抗溶液洗涤两次后,再放入中性甘油中保存。

由于病毒在甘油中比较稳定,在50%甘油生理盐水中装入感染的脏器低温保存的方法,很早以前就被采用。用这种方法保存时,选择特别优质的甘油是非常重要的。

50%中性甘油保存的肝,贮存温度有的要求5°C,有的要求0°C左右,病毒实验学总论认为:虽然在4°C冷库中可以保存相当长时间,但应尽量在低温下保存。同时还认为0°C—-20°C附近温度的冻结,与-25°C以下冻结时冰的状态不同,前者容易引起蛋白变性,病毒不活化并凝集等,因此应当杜绝0°C—-20°C保存。我们感到,如果有条件则应用尽可能低的温度保存,并且尽可能缩短冻结时间,使保存材料迅速进入预定的保存温度。如无条件则在4°C保存。如要长期保存,则应低温冷冻干燥保存。

五、溶液配制

1. 50%中性甘油配制:先配制磷酸氢二钠和磷酸二氢钾溶液,而后根据使用甘油的酸硷度不同,用不同量的磷酸氢二钠和磷酸二氢钾溶液,配成pH 7.4的50%甘油液。配方如下:

磷酸氢二钠溶液:358.24克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于1,000毫升蒸馏水中;磷酸二氢钾溶液:136.16克 KH_2PO_4 溶于1,000毫升蒸馏水中。

甘油 pH5.5 以上 甘油 pH5.5 以下

磷酸氢二钠:	17.5 毫升	40.0 毫升
磷酸二氢钾:	7.5 毫升	10.0 毫升
蒸馏水:	475 毫升	450 毫升
甘油:	500 毫升	500 毫升

溶液分装于洁净青霉素小瓶内,每瓶5毫升,15磅30分钟灭菌,普通冰箱保存备用。

2. 双抗溶液配制:取100万单位青霉素,

以灭菌注射用水溶解后，倾入灭菌的 100 毫升容量瓶内，再取 1 克链霉素倾入上述容量瓶，加灭菌注射用水至刻度处，分装灭菌小瓶，橡皮膏封口，保存于 -20°C 或普通冰箱最低温度处备用。

3. 沙保弱氏琼脂配制：真菌培养基 28°C
2—3 天温箱培养。

将琼脂 18 克、蛋白胨 10 克混于 1,000 毫升蒸馏水中加热溶解。加入葡萄糖 40 克，待其溶解后分装于 20×150 毫米试管内，每管 6—8 毫升。10 磅 20 分钟灭菌，取出后置成斜面，凝固后冰箱保存备用。此培养基 pH 为 5.5—6.0，除真菌外一般细菌不生长。