

· 研究原著 ·

文章编号: 1000-2790( 2000) 06-0719-03

# 犬副流感流行毒株的分离与鉴定

金昌德, 李六金, 施新猷, 师长宏, 赵世君 (第四军医大学实验动物研究中心, 陕西 西安 710033)

关键词: 犬副流感病毒; 流行毒株; 分离; 鉴定  
中图分类号: S 852. 653 文献标识码: A

**摘要:** 目的 分离和鉴定犬副流感病毒. 方法 无菌抽取病犬脑脊液, 接种到 Vero 细胞, 72 h 后收集培养液进行回归动物试验, 并采用形态学观察、血凝特性、血球吸附试验以及细胞敏感性、中和试验和交叉中和试验等方法进行系统鉴定. 结果 从病犬脑脊液中分离出一株 CPIV 流行毒株(CPIV-XN<sub>931</sub>). 接种 Vero 细胞后, 出现明显的细胞病变作用, 对 Vero 和 MDCK 敏感, 对 2. 5 mL · L<sup>-1</sup> 豚鼠红细胞具有显著的吸附作用; 其超微结构具有副粘病毒的基本特点, 中和抗体效价和交叉中和抗体效价都高达 1024. 结论 成功分离犬副流感病毒 CPIV-XN<sub>931</sub>.

## Isolation and identification of wild-type strain of canine parainfluenza virus

JIN Chang-De, LI Liu-Jin, SHI Xin-You, SHI Chang-Hong, ZHAO Shi-Jun  
Laboratory Animal Research Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**Keyword:** canine parainfluenza virus; wild-type strain; isolation; identification

**Abstract:** **AIM** To isolate and to identify canine parainfluenza virus (CPIV). **METHODS** The sick canine cerebrospinal fluid (CSF) was used to infect the Vero cell. After 72 hrs, culture medium was collected for the reversion animal test. Morphological studies, hemagglutination (HA) property, erythrocyte absorption, neutralizing and cross-neutralizing tests were performed to identify the virus. **RESULTS** A CPIV epidemic virus strain was isolated from the sick canine CSF, named CPIV-XN<sub>931</sub>. After infecting the Vero cell, the

cellular pathogenic effect (CPE) could be observed obviously. This virus could absorb guinea pig red cells (2. 5 mL · L<sup>-1</sup>) strongly, and had the basic character of parainfluenza virus in the ultrastructure. The titer of neutralized antibody and cross-neutralized antibody all fell to 1024. **CONCLUSION** The isolated is a strain of CPIV-XN<sub>931</sub>.

## 0 引言

犬副流感是由犬副流感病毒 (Canine parainfluenza virus, CPIV) 引起的一种犬的接触性传染病. 通过皮内接种 CPIV, 可导致犬发生咽炎、扁桃体炎和支气管炎等病症. 我们从一只患后肢麻痹的病犬脑脊液 (CSF) 中分离出一株 CPIV 流行毒株, 并对其形态结构特征和生物学特性进行了系统鉴定.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** CPIV-D008 标准毒株及其免疫血清购自美国 Fort Dodge 公司. CPIV-XN<sub>931</sub> 免疫血清由本实验室自制. Vero, MA-104, IBRS, F-81, MDCK 及 Hela 等传代细胞均从美国 ATCC 购进. 6 wk CPIV 抗体阴性犬 30 只购自非疫区.

### 1.2 病毒分离

**1.2.1 病料处理** 无菌手术抽取 CSF, 置含 10 mL · L<sup>-1</sup> 犊牛血清和适量双抗的 Hank's 液中, 4 ℃ 过夜. 将样品用微型台式离心机以 3000 r · min<sup>-1</sup> 离心 30 min, 除去杂质后用 0. 45 μm 的滤膜过滤除菌, 滤液置 -20 ℃ 冰箱.

**1.2.2 细胞敏感性试验** 处理好的样品用 Hank's 液按 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 和 1:9 稀释, 分别接种于 Vero, MA-104, IBRS, F-81, MDCK 和 Hela 细胞, 于 37 ℃ 培养, 进行动态观察. 分别收集 8~96 h 细胞培养液, 备用.

**1.2.3 回归动物试验** 将 24 只 CPIV 抗体阴性仔犬, 人工饲养至 2 mo 时分为 8 组, 每组 3 只. 试验组 a 和试验组 b 及对照组分别脑内接种 CSF 样品和 CPIV-XN<sub>931</sub> Vero 细胞培养液及 Hank's 液, 接种量为 0. 5 mL/只. 接种后第 7 日处死犬, 分别取 CSF、

收稿日期: 2000-01-01; 修回日期: 2000-02-01  
基金项目: 国家火炬计划[火炬发(1997)109号]  
作者简介: 金昌德(1968-), 男(朝鲜族), 吉林省延吉市人. 讲师, 硕士生(导师施新猷). Tel. (029) 5252978 Email. jcd6811@pub. xjtu. edu.cn  
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血浆白细胞黄层、心、肝、肾等样品, 分别测病毒 TCID<sub>50</sub>。

**1.3 红血球吸附试验** 选用大鼠、豚鼠、犬和鸡红细胞作为被感染细胞单层的吸附对象。于接毒后 8~96 h, 分别作红血球吸附试验<sup>[1]</sup>。

**1.4 血凝特性** 将鸡、猪、人“O”型、豚鼠、犬、绵羊和家兔等动物的红血球, 用 pH 7.5 的 PBS 液稀释, 以 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心、洗涤, 重复 3 次; 再用 pH 7.4 的 0.015 mol·L<sup>-1</sup> PBS 液制备 5 ml·L<sup>-1</sup> 红细胞悬液, 在 96 孔 U 型微量反应板上进行 HA 试验<sup>[1]</sup>。

**1.5 中和试验** 采取稀释血清-固定病毒的方法<sup>[1]</sup> 在 U 型微量反应板上进行。

## 1.6 电镜观察

**1.6.1 负染色** 收集 CPIV-XN<sub>931</sub> 感染的 Vero 细胞培养物 10 mL 按常规方法<sup>[2]</sup>, 用 20 g·L<sup>-1</sup> 磷钨酸 (PTA) 负染后电镜观察。

**1.6.2 免疫电镜** 收集 CPIV-XN<sub>931</sub> 感染的 Vero 细胞培养物 5 mL, 加入 0.1 mL 豚鼠抗 CPIV 高免血清, 振荡 1 min 后于 37℃ 感作 60 min, 以 6000 g 离心 15 min, 弃上清, 用 1 滴蒸馏水悬浮其沉淀, 按常规法负染色后电镜观察。

**1.7 交叉中和试验** 采用固定病毒-稀释血清的方法进行。将 3 种抗血清 2 倍连续稀释, 与 3 种病毒交叉混合, 37℃ 感作 60 min, 再接种 Vero 细胞单层, 培养 6~8 d, 观察 CPE。

## 2 结果

**2.1 CPIV 的分离** CSF 处理样品接种 Vero 细胞单层培养 7 d 时发现 1/5, 1/7 和 1/9 稀释度出现明显的 CPE。

**2.2 细胞敏感性** CPIV-XN<sub>931</sub> 毒株在 MDCK 和 Vero 细胞上引起较明显的 CPE, 而对 IBRS, MA-104, F-81 及 HeLa 细胞均不敏感。

**2.3 回归动物试验** CSF 和白细胞黄层的病毒效价最高, TCID<sub>50</sub> 分别为 10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-3</sup>, 在 Vero 细胞上 CPE 明显, 其余样品均未出现 CPE。

**2.4 红细胞吸附试验** 犬、鼠、鸡和豚鼠红细胞对 CPIV-XN<sub>931</sub> 均有吸附作用, 尤以豚鼠红细胞吸附能力最强, 在接毒后 18 h 即出现吸附现象, 24 h 后吸附作用逐渐稳定。

## 2.5 电镜观察

**2.5.1 负染样品观察** 在接种 CPIV 的 Vero 细胞培养物中, 观察到形态多样、大小不等的病毒粒子。当病毒粒子完整无损时, 病毒体呈白色外观, 并在其表面上附有密集的纤突结构; 有的病毒粒子已破裂, 可以见到粒子内部螺旋对称的核衣壳。丝状体比较多见, 有的丝状体长达 800 nm 以上 (Fig 1)。

**2.5.2 免疫电镜观察** CPIV 培养物与豚鼠抗 CPIV 高免血清 (50 倍稀释) 作用后, 电镜未见大块的抗原-抗体免疫复合物, 但能看到单个病毒粒子表面吸附有抗体分子, 其纤突加宽变厚, 呈现不规则的外观, 个别病毒粒子已破裂, 核衣壳呈螺旋对称结构 (Fig 2); 游离出来的病毒粒子核衣壳周围也附着有抗体分子 (Fig 3)。

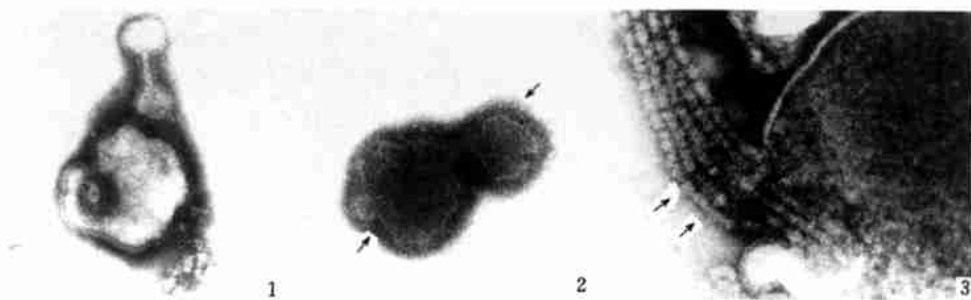


图 1 犬副流感病毒丝状形态

Fig 1 Filariform figure of canine parainfluenza virus

图 2 破裂后的犬副流感病毒粒子内部可见螺旋对称的核衣壳结构

Fig 2 Helix nuclear capsid inside the canine parainfluenza virus was observed after the disruptive canine parainfluenza virus particles

图 3 犬副流感病毒粒子破裂后游离出来的核衣壳结构

Fig 3 Structure of nuclear capsid inside the canine parainfluenza virus was freed after the canine parainfluenza virus particles broking

**2.6 血凝特性** CPIV-XN<sub>931</sub> 对鸡、猪、兔等动物的红细胞均具有凝集作用, 而随着该病毒传代次数的增

多, 其血凝性逐渐减弱, 甚至无规律。

**2.7 中和试验** 中和抗体效价 (SN) 高达 2048。

## 2.8 交叉中和试验 CPIV-XN<sub>931</sub> 毒株与 CPIV-D008 株起交叉中和反应(Tab 1)。

表 1 CPIV-XN<sub>931</sub>株与国际标准毒株交叉中和效价(SN)  
Tab 1 The SN of cross-neutralization titer between CPIV-XN<sub>931</sub> strain and international standard virus strain

Virus type	Immune serum	
	CPIV-XN <sub>931</sub>	CPIV-D008
CPIV-XN <sub>931</sub>	2048	1024
CPIV-D008	1024	1024

## 3 讨论

作者采用 Baumgartner<sup>[3]</sup>和 Wagener 等<sup>[4]</sup>的方法,从发病 7 d 的犬副流感病犬 CSF 中分离出一株 CPIV 流行毒株,复归动物后试验犬出现后肢麻痹、抽搐等神经症状,证明样品中确实有 CPIV 病毒存在。该毒株接种 Vero 细胞单层出现明显的细胞病变

作用;免疫电镜观察仅发现游离出来的核衣壳周围附着有抗体分子,没有见到典型的抗原抗体桥连支架,这可能与样品稀释倍数有关。对 2.5 mL · L<sup>-1</sup>豚鼠红细胞有较强的吸附能力。负染样品观察证实该病毒具有副粘病毒的基本结构特征;交叉中和试验结果显示, CPIV-XN<sub>931</sub>毒株与国外标准毒株 D-008 具有抗原同一性。由此可知这次分离病毒是成功的。

### 参考文献:

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版,北京:科学出版社,1997:354,336-340.  
[2] 洪涛. 生物医学超微结构与电子显微镜技术[M]. 北京:科学出版社,1984:174-182.  
[3] Baumgartner W, Krakowka S, Blakeslee J. Evolution of *in vitro* persistence of two strains of canine parainfluenza virus[J]. *Arch Virol*, 1987; 93(1-2): 147-154.  
[4] Wagener JS, Sobonya R, Minnich L *et al.* Role of canine parainfluenza virus and Bordetella bronchiseptica in kennel cough[J]. *Am J Vet Res*, 1984; 45(9): 1862-1866.

编辑 李之源

· 个案报道 · 文章编号: 1000-2790(2000) 06-0721-01

## 复方中药外敷治疗应力性骨膜炎的疗效观察

陈耀明<sup>1</sup>, 杨锦彪<sup>2</sup>, 齐宗利<sup>1</sup>, 吴端宗<sup>1</sup>, 董兆申<sup>1</sup> (<sup>1</sup>第四军医大学预防医学系劳动与环境卫生学教研室, 陕西 西安 710033, <sup>2</sup> 陕西省体育运动技术学院, 陕西 西安 710061)

关键词: 中药;应力性骨膜炎/治疗  
中图分类号: R243 文献标识码: E

**0 引言** 应力性骨膜炎是部队军事训练中的常见病、多发病,及时休息配合药物治疗是有效的治疗方法。但在一般情况下,休息治疗势必影响部队日常训练,为此,探索有效治疗药物、以减轻疼痛、促进愈合并使多数人能坚持军训,是训练伤防治研究的一个方向。我们运用 10 余种中草药配制的药膏外敷治疗 63 例患腿,有效率达 79.5%,显效率 42.2%,有较好的止痛、消肿效果。

**1 病例选择 and 治疗方法** 1998-12 选驻陕某部新兵营战士在进入体能训练 1, 2 mo 时的应力性骨膜炎、应力性骨折高发期进行筛检治疗。对全体新兵采取自报有下肢疼痛、行走障碍等自觉症状的战士,按应力性骨膜炎诊断标准确诊后,外敷中药,1 帖/d,逐日换药、记录疼痛症状,5 d 为 1 疗程。双侧痛者左侧用自制复方中药治疗,右侧用安慰剂作对照,单侧痛者

按就诊号,单号用中药,双号用安慰剂。以压痛指数(用手指按压疼痛部位,从略有疼痛到难以忍受分为 10 个等级,由患者自己确定疼痛等级)和自发痛指数(患者休息时主观感觉疼痛的程度,确定方法同压痛指数)作为评价指标。

所用中药复方的主要成分为牛膝、黄柏、川芎、生南星、地骨皮、木通等 10 余味中草药磨成粉末过筛,按一定比例混合,用白酒、凡士林调成糊状,贴于患处,1 帖/d,5 帖为 1 疗程。安慰剂用无药性的淀粉和呈色物质调成糊状,作对照治疗。

**2 结果** 压痛指数 1~4 级为轻度压痛占 13.3%,5~8 级为中度压痛占 84.5%,9~10 级为重度压痛占 2.2%。治疗 5 d 后症状减轻为有效,中药治疗组为 79.5%,安慰剂对照组为 58.1%,为避免主观心理因素干扰,以压痛指数和自发痛指数下降 4 以上为明显有效,4 以下为无明显效果,中药治疗组 42.2% *vs* 安慰剂对照组 22.3%,经  $\chi^2$  检验差别显著( $P < 0.05$ )。

**3 讨论** 用我们配制的中药外敷可迅速减轻军事训练所致应力性骨膜炎,局部压痛和自发痛,尤其是次晨疼痛明显减轻,经 3~5 d 治疗后有明显的改善。自发痛指数下降 1~3 者,其压痛指数多数未下降,可能是心理因素所致,压痛指数下降 4 以上者,自发痛指数都相应下降,故以压痛指数下降 4 以上作为评价指标,中药治疗组显著有效率明显高于安慰剂对照组。该复方的药理作用可能与药物的活血化瘀、止痛功能有关。安慰剂对照组有较高的有效率可能与患者应力性骨膜炎症状不重,在减小训练强度时也能好转。同时可能也有心理作用所致。患者如能及时休息结合中药外敷,效果更显著。该药价廉(0.1 元/帖,一疗程成本约 0.5 元)、制作简便、营卫生所即可自制。

收稿日期: 1999-09-13; 修回日期: 1999-12-01  
作者简介: 陈耀明(1957),男(汉族),上海嘉定市人。高级实验师。  
Tel: (029) 3374866

编辑 何扬举