

# 一株风疹病毒的分离和鉴定

韩雅儒 赵 锐 王长太 宫荫蓂 孙进文

(卫生部生物制品研究所, 北京)

自1962年 Weller 及 Neva<sup>[1]</sup>和 Parkman<sup>[2]</sup>分别用原代人羊膜细胞和原代绿猴肾细胞分离风疹病毒获得成功后, 于1963年 McCarthy<sup>[3]</sup>首次在兔肾传代细胞(RK 13细胞)上观察到风疹病毒的规律性病变, 并用于风疹病毒的鉴定。

为开展风疹病毒的检测及风疹疫苗的研究工作, 我们于1979年春, 用乳地鼠肾传代细胞(BHK21细胞), 从风疹患者分离到一株病毒, 经初步鉴定为风疹病毒, 定名为 BR-1 株。现将 BR-1 株病毒的分离及鉴定结果报告如下。

## 材料与方 法

### 一、BR-1 株标本的来源

取风疹患儿发病当天的咽拭子, 立即放入 Earle 氏液中, 当日接种于 BHK21 细胞。

### 二、传代细胞

1. BHK21 细胞 (乳地鼠肾传代细胞): 取自卫生部药品生物制品检定所, 自 156 代开始在我实验室传代。细胞营养液为 E70 液 (Eagle 氏液 + 70 液 = V/V = 7/3)。Eagle 氏液按常规

配制; 70 液是 Earle 基础液中含胰化牛肉水(10% 毫克氨基酸)、人红细胞水解液(100% 毫克蛋白氮)及 L-半胱氨酸(6% 毫克); 此外含 10% 灭活小牛血清及适量  $\text{NaHCO}_3$  和青、链霉素。接种病毒后改用维持液, 配方为: 含 0.5% 水解乳蛋白的 Earle 氏液, 加 2% 灭活小牛血清、0.01% 胱氨酸及适量  $\text{NaHCO}_3$  和青、链霉素。用于病毒的分离、培养与传代。

2. RK13 细胞(兔肾传代细胞): 来自英国生物标准及检定研究所(NIBSC), 自 43 代开始在我实验室传代, 营养液及维持液与 BHK21 细胞同。用于接种病毒后观察病变、病毒滴定及中和试验。

3. LLC-MK2 细胞(猴肾传代细胞): 来源和培养同 RK13 细胞, 自 303 代开始在我实验室传代。用于干扰试验及中和试验。

### 三、试验对照病毒

1. HPV-77 株风疹疫苗病毒: 取荷兰 Rijks 公共卫生研究所出品的疫苗。接种在 BHK21 细胞上传 6 代, 用于检定阳性病毒的对照。

2. Judith 株风疹病毒: 来自英国中央公共卫生实验室。接种于 BHK21 细胞上传 2 代, 用于中和试验和家兔免疫试验。

3. 新城鸡瘟弱毒 II 系疫苗(简称 NDV): 取北京畜牧兽医站新城鸡瘟弱毒 II 系疫苗, 经鸡胚尿囊腔传代后收获尿液进行滴定, 以接种后 48 小时产生血球吸附“+++”的稀释度做为试验病毒稀释度, 用于干扰试验。

4. ECHO-11 病毒: 来自浙江医科大学传染病研究室, 于 LLC-MK2 细胞上传代和滴定, 试验用病毒量约为 500 TCID<sub>50</sub>。用于干扰试验。

### 四、抗风疹病毒标准血清

取丹麦国立血清研究所的抗风疹血清国际参考制品。每安瓿含 1000 国际单位。用于中和试验及血凝抑制试验。

### 五、风疹病毒的分离与培养

用培养瓶培养 BHK21 细胞, 待生成单层后用 Earle 氏液洗一次, 接种咽拭子标本液 1 毫升, 置 37℃ 吸附 1 小时, 中间摇匀一次。然后将标本液移出加入维持液 7 毫升, 置 34℃ 培

养, 每隔 3—4 天换液一次。接种后 7—10 天回收维持液做为继续传代的接种材料。换液后的细胞继续培养至 14 天, 将培养瓶冻化吸取维持液及脱落细胞供鉴定用。

### 六、干扰试验

在 LLC-MK2 细胞生成单层后, 接种待检病毒液, 置 37℃ 吸附 1 小时, 吸掉病毒液加入维持液, 置 34℃ 培养 5—7 天后接种试验病毒。如用 NDV 做为试验病毒(简称 NDV 血球吸附法), 则于接种后 24—48 小时加入 1% 成鸡血球悬液, 置 4℃ 20 分钟后镜检判定结果。NDV 对照组(正常细胞接种 NDV) 出现血球吸附阳性“+++”, 试验组(接种待检病毒液后 5—6 天再接种 NDV) 血球吸附阴性, 说明风疹病毒已在细胞内繁殖, NDV 的感染受到干扰。如用 ECHO-11 病毒做为试验病毒(简称 ECHO-11 病毒病变法), 于接种后 2—3 天观察病变。对照组出现 ECHO-11 病毒的明显病变(“+++”或“+++”), 试验组 ECHO-11 病毒病变阴性, 说明 ECHO-11 病毒已受到风疹病毒的干扰。

### 七、中和试验

参照 Parkman 等<sup>[4]</sup> 和 Plotkin<sup>[5]</sup> 方法进行。待检病毒液和抗风疹病毒标准血清等量混合(含 4—8 个国际单位), 置 37℃ 水浴 1 小时, 然后接种于 RK13 细胞观察病变, 或接种于 LLC-MK2 细胞进行干扰试验。

### 八、血凝抑制试验

按常规方法进行。血凝素用吐温-80 乙醚方法处理; 血球为 1—2 日龄来亨鸡血球; 试验用的血清用肝素-氯化锰方法处理。

## 实 验 结 果

### 一、病变观察

1. BR-1 株病毒在 BHK21 细胞上的病变: BR-1 株病毒在 BHK21 细胞上连续传代, 待传至 2 代时, 接种病毒液后第 8 天观察到细胞圆缩, 折光性增强, 继之细胞从瓶壁脱落, 细胞单层形成网状, 上述病变于接种后 10—11 天达高峰, 与对照组有明显区别(见图 1、2)。当传至

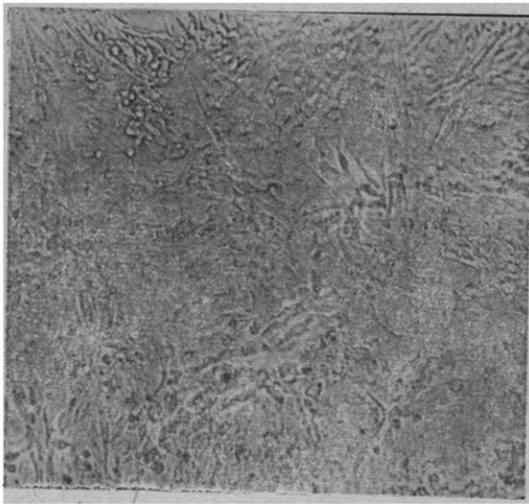


图1 正常的BHK21细胞(×300)

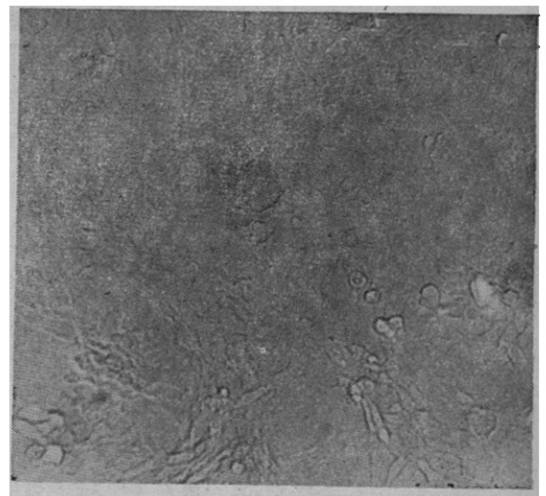


图3 正常的RK13细胞(×300)

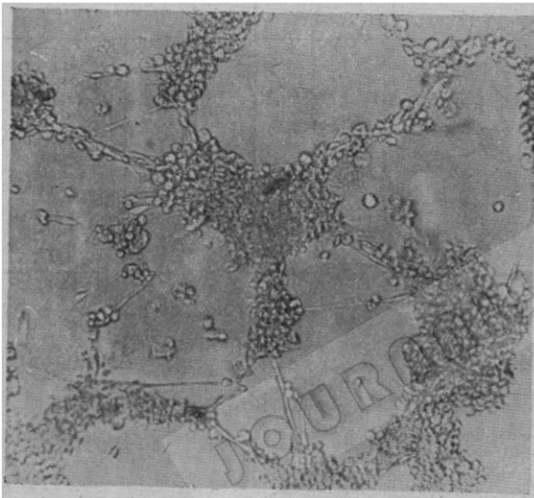


图2 BR-1株病毒在BHK21细胞上的病变(×300)



图4 BR-1株在RK13细胞上的病变(×300)

4代时,接种后7天开始出现上述病变,9—10天达高峰,传以后各代在接种后6—9天出现上述病变。

2. BR-1株病毒在RK13细胞上的病变:BR-1株病毒在BHK21细胞上传至3代时,收取的病毒液接种于RK13细胞上,于接种后第8天开始出现病变(见图3、4)。细胞变形,聚集,胞浆突起拉成细丝状,继之细胞部分从瓶壁脱落,细胞单层形成网状,病变进展比较缓慢。以后各代病毒液接种于RK13细胞后5—8天出现上述病变。

## 二、干扰试验

1. NDV血球吸附法:BR-1株病毒在BHK

21细胞上传至2、3代时用NDV血球吸附法进行干扰试验获可疑结果:NDV对照组出现血球吸附“+++”,试验组仅见极少数血球吸附。传至4、5代均获阳性结果。

2. ECHO-11病毒病变法:BR-1株病毒在BHK21细胞上传3代和5代的病毒液,用ECHO-11病毒病变法进行干扰试验均获阳性结果,所传各代鉴定结果见表1。

## 三、中和试验

将BR-1株病毒与抗风疹标准血清中和作用后的病毒、血清混合液接种于RK13细胞(试验组),同时将未经抗风疹标准血清中和作用的BR-1株病毒液接种于RK13细胞(对照组)进

表 1 BR-1 株病毒各代干扰试验结果

试验用病毒	BR-1 株病毒(代次)				阳性病毒对照	阴性标本	细胞对照	试验用病毒对照
	2	3	4	5				
NDV*	±	±	—	—	—	+++	—	+++
ECHO-11**		—		—	—	+++	—	+++

\* “±”见极少数红血球吸附;“+++”血球吸附明显;“—”未见血球吸附。

\*\* “—”未见病变;“+++”病变明显。

行病变观察。接种后第 7 天,对照组开始出现病变,第 9 天病变达高峰,试验组观察至 10 天仍未出现病变,证明 BR-1 株病毒已被抗风疹

标准血清中和。本试验中以 Judith 株风疹病毒做为阳性病毒对照。对照组于接种后第 5 天开始出现病变,第 7 天病变达高峰,试验组观察至

表 2 BR-1 株病毒与抗风疹标准血清中和试验结果

病毒株	病毒稀释度	试验组别	细胞病变观察(天)				
			5	7	8	9	10
BR-1	原倍	对照	—	±	++	+++	+++
		试验	—	—	—	—	—
BR-1	10 <sup>-1</sup>	对照	—	±	++	+++	+++
		试验	—	—	—	—	—
Judith	10 <sup>-1</sup>	对照	+	+++	+++		
		试验	—	—	—		
细胞对照			—	—	—	—	—

8 天仍未出现病变。中和试验结果见表 2。

将 BR-1 株病毒与抗风疹标准血清中和作用后的混合液接种于 LLC-MK2 细胞进行干扰试验。病毒采用 3 个稀释度,即原倍、10<sup>-1</sup> 及 10<sup>-2</sup>。对照组在接种后 7 天用 ECHO-11 病毒感染,均不产生病变,证明 ECHO-11 病毒受到干扰;但上述 3 个试验组均不能干扰 ECHO-11 病毒的感染,于接种后 4 天出现明显病变,说明 BR-1 株病毒已被抗风疹标准血清中和。

#### 四、血凝及血凝抑制试验

1. 血凝试验: 将 BR-1 株病毒 7 代病毒液接种于 BHK21 细胞后 7 天、12 天收取维持液,14 天收取维持液和细胞,用吐温-80 乙醚处理制备血凝素进行血凝试验,3 批血凝素滴度均在 1:32—1:64;用同样方法制备的 Judith 株病毒血凝素滴度为 1:128。此血凝现象可被抗风疹标准血清完全抑制。

2. 血凝抑制试验: 用 BR-1 株病毒免疫两只家兔。先肌肉注射 2 毫升,耳静脉注射 1 毫

升后,再每周一次耳静脉注射(1 毫升),共注射 4 次,最后一次注射后 2 周心脏采血,分离血清进行抗体测定。同时用 Judith 株病毒以同样方法免疫家兔做为对照。两株病毒的血清交叉血凝抑制试验结果见表 3。

表 3 BR-1 株和 Judith 株免疫血清交叉血凝抑制试验结果

免疫血清	BR-1 株血凝素		Judith 株血凝素	
	免疫前血清	免疫后血清	免疫前血清	免疫后血清
抗 BR-1 血清	<1:10	1:1814*	<1:10	1:905
抗 Judith 血清	<1:10	1:1814	<1:10	1:1280
抗风疹标准血清	—	>1:320	—	>1:320

\* 两只家兔免疫血清的几何平均滴度。

从表 3 可见, BR-1 株病毒免疫血清用两株病毒的血凝素测定,其血凝抑制抗体滴度分别为 1:1814 和 1:905,与 Judith 株病毒产生的抗体滴度 1:1814 和 1:1280 相近。用 Judith 株病毒的血凝素测定的抗体滴度稍低于 BR-1 株

病毒(免疫前的健康兔血清抗体滴度均小于1:10)。

## 小 结

1. 在鉴定风疹病毒的常规干扰试验中,一般用 ECHO-11 病毒做为试验病毒,但也有报道<sup>[6,7]</sup>用新城鸡瘟病毒做为试验病毒,以血球吸附法判定结果。在 BR-1 株病毒的分离和鉴定中,我们采用新城鸡瘟 II 系弱毒疫苗做为试验病毒,以血球吸附法判定结果。所鉴定的 7 批样品经用 ECHO-11 病毒做为试验病毒的干扰试验复核,获得一致结果,证明新城鸡瘟 II 系弱毒疫苗病毒血球吸附法可用于风疹病毒的鉴定。

2. BR-1 株病毒在 RK-13 细胞上发生的病变特征是,首先细胞拉长呈不规则形状,细胞界

限不清,继之细胞收缩、聚集和脱落,细胞单层形成网状,此病变特征与 McCarthy<sup>[3]</sup> 描述相一致。

在 BHK21 细胞上, BR-1 株病毒的病变类型为细胞折光性增强、收缩、聚集和迅速大量脱落,与 Vaheri 等<sup>[8]</sup>所描述的病变类型相一致。

## 参 考 文 献

- [1] Weller, P. D. and Neva, F. A.: P.S.E.B.M. 111: 215—224, 1962.
- [2] Parkman, P. D. et al.: P.S.E.B.M. 111: 225—230, 1962.
- [3] McCarthy, K.: *Lancet*, 2:593, 1963.
- [4] Parkman, P. D. et al.: *J. Immun.*, 93: 608, 1964.
- [5] Plotkin, S. A.: *Brit. Med. J.* 2: 1296, 1963.
- [6] Marcus, P. I. and Carver, D. H.: *Science*, 149: 983, 1965.
- [7] Rawls, W. E. et al.: P.S.E.B.M., 124: 167, 1967.
- [8] Vaheri, A. et al.: *Virology*, 27: 239, 1965.