

冠状病毒及鼻病毒混合标本的分纯

中国人民解放军后字 236 部队感冒防治小组

1972年3月中国人民解放军昆字 323 部队送检两份从感冒病人标本中分出的鼻病毒, 经用电子显微镜(以下简称电镜)检查, 发现其中一份有大量冠状病毒(也称日冕病毒)颗粒及鼻病毒颗粒^[1], 用光学显微镜检查(以下简称镜检)感染的细胞培养物, 也能同时看到冠状病毒及鼻病毒引起的两种细胞病变(图 1、2)。

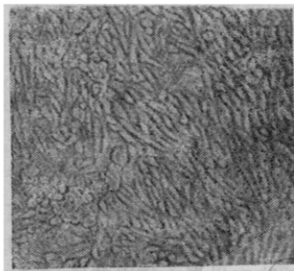


图1 正常人胚肾细胞
($\times 100$)

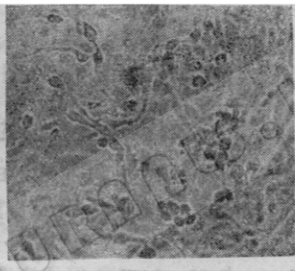


图2 昆徐株混合感染人胚肾细胞($\times 100$)

图上侧为鼻病毒引起的细胞病变,
图下侧为冠状病毒引起的细胞病变

目前一般认为冠状病毒不易分离, 国外已见报道的仅分出38株, 而血清学调查结果说明该病毒感染并不少见; 由于当时我们还没有冠状病毒毒株, 需要该病毒制作抗原以进行血清学调查, 决定将这份混合标本予以分纯。病毒分纯后, 我们取病人病后半年的血清作中和试验, 结果对鼻病毒的中和滴度为 $1:2560/100 \text{ TCD}_{50}$ 。

对冠状病毒的中和滴度未测出 ($< 1:10/100 \text{ TCD}_{50}$) 虽无双份血清比较, 因鼻病毒抗体滴度较高, 可以说明与病原有关, 对冠状病毒未测出抗体, 但这不能肯定与疾病无关, 因对该病毒感染后抗体演变情况还不很清楚。本文简要报道这份混合标本的分纯、鉴定过程及结果。

一、消除冠状病毒, 分出鼻病毒

(一) 原理

鼻病毒耐乙醚, 冠状病毒不耐乙醚, 通过乙醚反复处理混合的病毒液及终末稀释法传代, 将冠状病毒消除, 分出鼻病毒。

(二) 方法及结果

取第6代混合感染人胚肾细胞培养液(感染细胞单层上同时有鼻病毒及冠状病毒引起的细胞病变, 图2)0.8毫升, 加化学纯乙醚0.2毫升, 充分振摇, 置4℃过夜, 移至室温待乙醚挥发后将病毒液作10倍递增稀释, 接种人胚肾细胞, 33℃旋转培养7天(第7代), $\text{Log TCD}_{50} = 6.0$ 。电镜检查结果: 在接种 10^{-4} 处理培养液的细胞管中仅见鼻病毒病变, 没有冠状病毒; 作为对照, 在接种 10^{-3} 未经乙醚处理培养液的细胞培养管呈现冠状病毒及鼻病毒混合感

染,接种 10^{-4} 培养液的细胞管中,鼻病毒引起明显细胞病变,同时见到少量冠状病毒颗粒。

上述接种 10^{-4} 及 10^{-6} 乙醚处理混合感染培养液的第7代细胞培养液再经乙醚处理,仍作10倍递增稀释接种人胚肾细胞(第8代), $\text{Log TCD}_{50} > 8.5$ 。 10^{-4} 第8代感染培养液,再经乙醚处理后作10倍递增稀释接种人胚肾细胞,培养后(第9代)的 $\text{Log TCD}_{50} = 5$ 。

第9代 10^{-4} 感染培养液稀释成 10^{-1} 进行传代(第10代,乙醚处理3次后第1代),镜检细胞单层只有鼻病毒引起的细胞病变(图3)。随后以1:10连续传代至第12代,作电镜检查:只见鼻病毒病变,没有冠状病毒。传至第17代作理化试验,从细胞病变特点及理化试验结果(乙醚试验组 $\text{Log TCD}_{50} = 5.5$,耐酸试验组 $\text{Log TCD}_{50} < 1$,对照组 $\text{Log TCD}_{50} = 6$)证明与鼻病毒性质相符合。为判别所分纯的鼻病毒

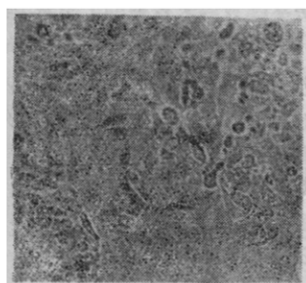


图3 鼻病毒昆徐株感染人胚肾细胞($\times 100$)
细胞病变主要表现为多形态

徐株与我们实验室1971年分得的5个型的鼻病毒是否同型,进行了定性中和试验:20单位鼻病毒141,155,202,226,233株混合免疫血清加等量20 TCD_{50} 鼻病毒昆徐株,置37℃中和1.5小时,结果完全抑制病毒生长(细胞病变阴性,仙石

病毒干扰试验阴性)。随后将上述5个型鼻病毒免疫血清分别与这株分纯的鼻病毒作定性中和试验,确定鼻病毒昆徐株与我们分出的鼻病毒141株是同型的。

二、消除鼻病毒,分出冠状病毒

(一) 原理

利用同型鼻病毒免疫血清反复处理混合感染病毒液及终末稀释法传代,除去鼻病毒,而将冠状病毒分出。

(二) 方法及结果

混合感染人胚肾细胞培养液(第9代)20 TCD_{50} 加等量20单位鼻病毒141株免疫血清,置37℃中和1.5小时,接种人胚肾细胞,33℃旋转培养后获得第10代培养物。将此第10代培养液传至第11代(中和处理后第1代),观察到冠状病毒引起的明显细胞病变(图4);经电镜检查发现很多冠状病毒颗粒,未查见鼻病毒颗粒及其引起的细胞病变。传至第13代仍表现为冠状病毒引起的细胞病变,电镜检查仍仅见冠状病毒

颗粒。传至第14代作理化试验,细胞病变及理化试验结果(乙醚试验组 $\text{Log TCD}_{50} < 1$,耐酸试验组 $\text{Log TCD}_{50} < 1$,对照组 $\text{Log TCD}_{50} = 4.5$)仍表现为冠状病毒;但在电镜检查中,除查出冠状病毒颗粒外,还发现有可疑鼻病毒引起的病变——液泡^[1]。

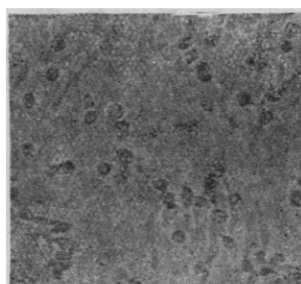


图4 冠状病毒昆徐株感染人胚肾细胞($\times 100$)
细胞病变主要表现为小堆小圆细胞

上述第14代感染培养液用作抗原,心脏免疫豚鼠制作免疫血清,用这免疫血清(8个单位)分别与100 TCD_{50} 第14代培养液或800 TCD_{50} 鼻病毒昆徐株作定性中和试验,结果只能抑制前者使不引起细胞病变,而对后者无抑制作用。又用鼻病毒

141株免疫血清(20个单位)分别与第14代培养液或鼻病毒昆徐株作定性中和试验,结果只能抑制后者,而对前者无作用。因之从定性交叉中和试验结果,也说明通过一次鼻病毒免疫血清中和处理,已将混合感染中鼻病毒抑制。由于抗体中和病毒的原理至今仍未完全清楚,一般认为抗体对细胞内病毒不起作用,抗体也不能直接消灭细胞外病毒^[2],因之电镜检查上述第14代培养物发现可疑鼻病毒引起的细胞病变,可能是经免疫血清处理后的培养物通过连续传代,又有少量鼻病毒复现。

为确实将冠状病毒分纯,我们又继续进行二次免疫血清处理,同时作终末稀释法传代:将上述第11代培养液加等量末稀释鼻病毒141株免疫血清(中和滴度1:2048),置37℃中和1.5小时,作10倍递增稀释分别接种人胚肾细胞,33℃旋转培养5天(第12代,2次中和培养物), $\text{Log TCD}_{50} = 3$ 。将第2次中和后稀释 10^{-1} 接种细胞的培养液作10倍稀释再接种人胚肾细胞(第13代,2次中和后第1代)。将2次中和后第1代培养液再用鼻病毒141株免疫血清中和处理一次,进行传代。用这份第3次免疫血清中和后的培养物作电镜检查,仅见冠状病毒颗粒,未见鼻病毒引起的病变。随后以1:10连续传5代,再作电镜检查,仍只见冠状病毒颗粒,未见其它病毒颗粒或可疑病变,至此我们认为冠状病毒已完全分纯。

参 考 资 料

- [1] 陈德惠:几种呼吸道病毒的电镜显微镜检查,中华医学杂志,54: 211—215, 1974。
- [2] Kjellen, L.: Arch. ges. Virusforsch., 39: 1—12, 1972。