

## 呼吸道合胞病毒的分离及其生物性状的研究

中国人民解放军昆字三二三部队感冒气管炎病毒组

(昆明)

我们使用 33℃ 旋转培养法,用 HeLa 细胞与原代人胚肾细胞,对 34 份急性呼吸道感染的婴儿进行了病毒分离,分出呼吸道合胞病毒 6 株。同时,对呼吸道合胞病毒生长性状与保存条件做了研究,发现其在 HeLa 细胞中用旋转法培养较静置法敏感,且融合性病变亦较明显。

呼吸道合胞病毒不仅是婴幼儿呼吸道感染的重要病原<sup>[1]</sup>,而且可能是慢性气管炎急性加重的病毒病因之一<sup>[2,3]</sup>。在毛主席的革命路线指引下,我国近三年来,在感冒、气管炎的病毒性病原的研究上,取得一定进展。目前,除呼吸道合胞病毒外,其他常见的呼吸道病毒均已分出<sup>[4,5]</sup>,为此,我们于 1973 年 9 月至 11 月选择了 34 例急性呼吸道感染的婴儿,进行了病毒分离,分出呼吸道合胞病毒六株。本文报告病毒分离经过与生长性状。

### 材料与方 法

#### (一) 标本的采集

标本采集对象为急性呼吸道感染的婴儿有典型症状者。采集标本方法系以棉拭子涂取鼻咽分泌物,混悬于 3 毫升肉汤内。肉汤内每毫升含有青霉素、链霉素各 1000 单位,卡那霉素 500 单位,立即于床旁接种于细胞管内。部份标本系用鼻饲管,连以 5—10 毫升注射器,由鼻腔或咽部抽取分泌物,混悬于上述肉汤内,离心沉淀后,一般均于 3 小时内,接种上清液于细胞管;接种量每管为 0.2—0.3 毫升,次日更换维持液。

#### (二) 病毒分离

接种之细胞管为 HeLa 与原代人胚肾细胞。HeLa 细胞营养液为含有 20% 大牛血清和 0.5% 乳白蛋白水解物之 Earle 氏液;人胚肾细胞为含

有 15% 大牛血清和 0.5% 乳白蛋白水解物之 Earle 氏液。维持液用含 2% 胎牛血清之 Eagle 氏液与含 0.5% 乳白蛋白水解物之 Earle 氏液等量混合, pH 为 7.4 左右。每份标本接种 HeLa 与人胚肾细胞各两支,置 33℃ 旋转培养 (6.8 转/小时)。隔日观察细胞变化,每 4—5 天更换维持液一次,连续观察 10 天,一般连传两代。

#### (三) 观察方法

接种标本后的 HeLa 细胞如出现明显病变,则进行鉴定。人胚肾细胞若第一代观察无明显病变,则传至第二代,以病变与血球吸附试验为判断标准,对部份人胚肾细胞标本管有可疑者,做干扰试验<sup>[3]</sup>,如仍为阴性,则弃去。

#### (四) 病毒的理化性质与生物学性质

1. 病毒之核酸型测定:对乙醚稳定性和对酸稳定性,均以细胞管之病变为判断标准。

2. 血球吸附试验:对接种人胚肾细胞管标本,于 7—10 天培养后,用洗涤之 0.5% 豚鼠血球,进行血球吸附试验。于室温中放置 30 分钟后镜检。有的标本还用了磷酸缓冲盐水配成之 0.2% 猴血球,进行血球吸附试验<sup>[6]</sup>。

#### (五) 免疫血清制备

1. 呼吸道合胞病毒:标准株为捷克 1965 年冻干之美国 Long 株<sup>[7]</sup>在婴儿患者病毒分离过程全部结束后,于 1974 年 6 月始开启此毒种,以 HeLa 与双倍体细胞传代。

本文 1975 年 2 月 24 日收到。

**2. 免疫方法:** 将呼吸道合胞病毒 Long 株与分出之疑似呼吸道合胞病毒 6 株, 用新鲜收获且有充分融合病变之细胞管的病毒液, 鼻腔接种于经异戊基巴比士钠静脉麻醉之家兔, 每周一次; 如此连续 4—6 次, 末次感染 1 周后, 取血测定对病毒中和效价, 如达 1:40 以上则放血, 分出血清保存。血清用前均以 56°C 灭活半小时。

### (六) 血清学鉴定

**1. 交叉中和反应:** 将待测定之病毒, 稀释约为 200TCID<sub>50</sub>/0.2 毫升左右, 分别加入上述毒株之不同稀释度免疫血清内, 等量混合, 在室温作用一小时, 每组不同稀释度血清管, 分别取 0.2 毫升混合液加入两支 HeLa 细胞管中, 实验中并设有病毒对照, 正常细胞对照, 置 33°C 旋转培养, 观察 7—10 天。

**2. 补体结合反应:** 补体结合反应抗原系用上述毒株, 接种人胚肺双倍体细胞 KMB<sub>17</sub> (昆明医学生物研究所赠), 维持液为含 2% 小牛血清的 Eagle 氏液, 置 33°C 旋转培养, 待产生+++—++++ 病变时收获, 反复冻融 3 次, 离心除去细胞沉渣, 上清液即为补体结合抗原。正常细胞抗原对照, 系未接种病毒者, 同上法培养与冻融处理。免疫血清为 1973 年 9 月自行分出, 经交叉中和反应鉴定为呼吸道合胞病毒之宾株, 感染豚鼠鼻腔 4—6 次而得。补体结合反应采用半微量法, 实用 2 个补体单位。

**3. 病毒中和反应<sup>[1]</sup>:** 将呼吸道合胞病毒宾株之免疫兔血清, 稀释为 20 个抗体单位, 与 1:1 稀释之病毒液等量混合, 室温中和一小时后, 接种 2 支 HeLa 细胞管, 每管 0.2 毫升。实验时并有同株病毒对照, 正常细胞对照, 置 33°C 旋转培养观察。

### (七) 生长性状

选用自行分得之宾株进行试验。①细胞: 除上述 HeLa 与人胚肾细胞外, 还采用双倍体细胞 KMB<sub>17</sub> 进行比较。细胞营养液为含 15% 牛血清之 Eagle 氏液与含 0.5% 乳白蛋白水解物之 Earle 氏液等量混合溶液, 维持液用含 2% 胎牛血清之 Eagle 氏液。②感染滴度测定: 病毒悬液以 Hanks 液或磷酸缓冲盐水 10 倍稀释, 每组滴度用 4 支细胞管, 置 33°C 旋转培养, 共观察 12—15 天, 按 Reed-Muench 法计算其 TCID<sub>50</sub>。

### (八) 电镜检查

以分得之病毒接种 HeLa 细胞产生充分病变者, 用刀片刮下, 离心沉淀, 固定后进行超薄切片电镜观察。

### (九) 保存方法

**1. 液氮冻存:** 将新鲜收获之病毒液, 封入安瓶内, 即迅速投入液氮 (-195°C) 中冻存, 用时置 37°C 水浴中速融。

**2. 50%甘油保存<sup>[11]</sup>:** 将新鲜收获之病毒液, 加等量灭菌之中性甘油, 置 -20°C 至 -30°C 冻存。

**3. 冷冻干燥:** 仿常规方法进行, 唯保护剂分别为脱脂新鲜牛奶、10% 胰液、50% 蔗糖磷酸缓冲盐水液 (pH 7.5), 以作比较。

## 结 果

### (一) 病毒分离结果

由 34 例急性呼吸道感染婴儿之鼻咽分泌物标本中, 共分出呼吸道合胞病毒 6 株, 阳性率为 17.6%, 用棉拭子采取之 18 份标本中分得 3 株, 用鼻咽吸管吸出之 16 份标本中亦分得 3 株病毒。

婴儿的月龄与病毒分离阳性的关系: 1 个月以下者 9 份标本, 未能分出; 2 至 4 个月者 6 份标本分出 3 株; 5 至 7 个月者 10 份标本分得 2 株; 8 至 12 个月者 9 份标本仅分得 1 株。

病程与分离阳性率的关系: 发病 1—3 天内采集标本 12 份, 分出 1 株病毒。发病 4—6 天之 11 份标本分出 5 株, 7 天以后采集者则未能分出。

表 1 急性呼吸道感染婴儿病毒分离结果

临床诊断	检查人数	阳性人数
上 感	6	0
支 气 管 炎	5	1
新生儿肺炎	8	0
支气管肺炎	15	5
小 计	34	6

由表 1 结果可知, 临床诊断为支气管

炎与支气管肺炎者均分离得到病毒, 其中以支气管肺炎分离阳性率较高。

## (二) 组织培养之分离比较与病变特征

此 34 份标本, 以 HeLa 细胞分得病毒者 6 株, 而以人胚肾细胞分出者只有 3 株。

在 HeLa 细胞上接种第一代即出现病变者, 6 株病毒中有 3 株, 于接种后第 6—7 天查出。经盲传一代始查出者为 3 株。

在人胚肾细胞上, 第一代病变往往不明显, 传代后则渐可辨明, 若再传至 HeLa 细胞上则较易判断。

在 HeLa 细胞上, 于 33°C 旋转培养时, 病变以形成融合细胞为主, 甚易辨明。早期之典型融合病变, 常见于管底单层细胞反折处。此融合性细胞依其形态有两种, 一种折光性较强, 部份脱离管壁, 胞浆有丝状突起或伪足状, 整个形态如不规则之地图(图 2、图 3)。另一种多出现于细胞致密之单层, 则在此单层上形成大而圆的融合性多核巨细胞(图 5), 核多位于胞浆边缘, 依稀可见。在同一细胞管内, 上述两种形态之融合细胞均可见到。在此融合细胞周

围往往有圆缩细胞堆集(图 3、5)。自此 1 到 2 天后, 融合细胞则更增多, 细胞圆缩, 脱落亦更增多(图 4)。最后整个细胞单层逐渐破坏脱落, 或仅残余少量融合性细胞(图 6)。在 37°C 静置培养时, HeLa 细胞以圆缩脱落为主, 融合性病变则较为稀少, 细胞单层往往不全部破坏。此点与国外叙述之呼吸道合胞病毒在 HeLa 细胞上的病变相似<sup>[8,12]</sup>。

在人胚肾细胞上病变以融合为主, 常象败叶状, 有时象成片之毛玻璃状, 并有拉丝现象, 胞浆内细胞核亦隐约可见。此种融合性病变若不细心镜检, 易被忽略。但熟悉此特征, 或固定后再以姬姆萨染色, 此种融合性细胞则不难识别(图 7)。

分离之病毒接种 HeLa 细胞, 产生病变后, 刮下, 固定染色, 可查到胞浆内有嗜酸性包涵体, 其外周有一透明区。

## (三) 病毒之理化性质与生物学性质

分离之 6 株病毒均为 RNA 核酸型, 不耐酸, 不耐乙醚, 用豚鼠血球与猴血球反复试验, 均未发现血球吸附现象, 结果见表 2。

表 2 六株病毒的生物学性质与理化性质

病毒株	核酸型试验			酸稳定试验		乙醚稳定性		血球吸附	
	加 IUDR	不加 IUDR	核酸型	pH 3.0	pH 7.2	乙醚处理	未处理	豚鼠	猴
宾株	1.5	1.5	RNA	<1.0	1.5	<1.0	1.5	—	—
许株	1.67	2.0	RNA	<1.0	2.0	<1.0	2.0	—	—
奕株	3.0	2.5	RNA	<1.0	2.5	<1.0	2.5	—	—
林株	3.0	3.0	RNA	<1.0	3.0	<1.0	3.0	—	—
斯株	2.5	2.5	RNA	<1.0	2.5	<1.0	2.5	—	—
郭株	2.0	2.0	RNA	<1.0	2.0	<1.0	2.0	—	—

## (四) 血清学鉴定结果

Long 株与此组病毒经鼻腔感染家兔与豚鼠, 一般在 4—6 次后, 血清中和抗体

效价始可达 1:40 到 1:160, 若次数较少, 则抗体未能测出。

### 1. 交叉中和反应

取 Long 株与自行分得之两株病毒, 分

别以兔免疫血清进行交叉中和试验,结果如下:

表 3 Long 株与自行分出的两株病毒交叉中和反应结果

免疫血清	中和病毒滴度 (TCID <sub>50</sub> )	中和反应滴度		
		Long 株	宾 株	奕 株
Long 株	100	1:64	1:256	1:128
宾 株	10	1:8	1:128	1:64
奕 株	32	1:8	1:256	1:256

以上结果可看出,呼吸道合胞病毒 Long 株与自行分出之两株病毒有密切抗原关系,但 3 株比较而言,两株自行分出之毒株抗原基本一致,而与 Long 株则稍有差异。

2. 补体结合反应

以上述经交叉中和反应鉴定为呼吸道合胞病毒之宾株,鼻腔感染豚鼠所得之免疫血清,与上述毒株接种双倍体细胞制备之补体结合抗原,进行测定。结果如下:

表 4 宾株豚鼠免疫血清与各株病毒之补体结合反应

免疫血清	抗原	补体结合反应滴度						
		Long 株	宾株	奕株	林株	许株	靳株	郭株
宾 株		1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64

由上结果可知补体结合反应均为一致。

3. 病毒中和反应

以宾株免疫血清稀释为 20 个中和抗体单位,与上述各株产生充分病变之病毒

表 5 宾株免疫血清对各株病毒中和作用

分 组	病 毒	细 胞 病 变						
		Long 株	宾株	奕株	林株	许株	靳株	郭株
宾株血清中和		—	—	—	—	—	—	—
病毒对照		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

中和反应可鉴定林、许、靳、郭四株亦属于呼吸道合胞病毒。

液进行中和反应,接种两管 HeLa 细胞于 33℃ 旋转培养 4—8 天进行观察。

(五) 电镜检查

病毒颗粒有囊膜,外观若细齿轮状,有穗状突起,感染之 HeLa 细胞膜边缘有病毒芽生现象,病毒颗粒直径约为 90—120 毫微米左右(图 8)。

(六) 生长性状

1. 影响呼吸道合胞病毒在 HeLa 细胞上形成融合性病变之因素: 选用宾株进行了以下观察。

(1) 旋转与静置: 旋转培养可明显促使融合病变成形,静置培养则甚少。

(2) 培养基成份: 在含有谷胺酰胺之 Eagle 氏维持液中,融合病变明显。用单纯的 0.5% 水解乳白蛋白 Earle 氏维持液,细胞病变出现较晚,以圆缩为主。

(3) 接种量: 病毒接种量较大时,则易产生广泛性融合性病变。病毒接种量小时,则往往为局限性病变。

(4) 细胞单层: 以生长幼稚者较好,细胞过老过密,则形成广泛性融合病较为困难,HeLa 细胞一般于分管 48 小时后,即可使用。

2. 呼吸道合胞病毒在不同细胞上之敏感性

表 6 呼吸道合胞病毒宾株在不同细胞上之生长情况(旋转培养)

细胞种类	出现病变时间(天)	Lg TCID <sub>50</sub> /0.2 毫升
双 倍 体	4	3.67
HeLa 细胞	4	2.50
人 胚 肾	6	1.0

由上述结果可知: 以双倍体细胞最为敏感, HeLa 细胞次之,原代人胚肾细胞最差。双倍体细胞上融合性病变不够显著,不如 HeLa 细胞上病变具有特征,易于识别。

### 3. 合胞病毒旋转与静置培养之比较

表 7 呼吸道合胞病毒菌株旋转与静置培养生长之比较\*

实验次数	培养方法	LgTCLD <sub>50</sub> /0.2 毫升
第一次	旋 转	3.50
	静 置	1.67
第二次	旋 转	3.77
	静 置	1.33

\* 以 HeLa 细胞做实验, 以细胞病变为判断标准。

试验结果表明, 旋转法较静置法敏感 1.83—2.44 个对数(表 7)。且融合性病变亦较显著, 维持 HeLa 细胞正常形态亦较好。

#### (七) 保存条件之观察

呼吸道合胞病毒很不稳定, 在保存中容易丢失。为此, 我们在保存时, 进行了以下观察:

**1. 液氮低温保存:** 新分出上述 6 株病毒可在液氮中保存。我们观察至少可保存 4—5 个月以上。

**2. 50% 甘油低温保存:** 将上述 6 株病毒加甘油于  $-20^{\circ}\text{C}$  到  $-30^{\circ}\text{C}$  冻存至少可保存 4—5 个月以上。在此低温内, 病毒甘油悬液并不真正冻结。

**3. 冷冻干燥保存:** 选择分出之菌株病毒新鲜收获液, 加不同保护剂, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥保存, 结果以牛奶、10% 胰酪为保护剂时, 病毒冻干后迅速灭活, 而以 50% 蔗糖磷酸缓冲盐水为保护剂时, 冻干后感染滴度虽有所下降, 但启开毒种, 接种 HeLa 细胞仍可传出。目前观察至少可保存 2 个月以上。

## 讨 论

呼吸道合胞病毒自 1956 年由患感冒的猩猩分出<sup>[45]</sup>, 不久即查明这是引起婴幼儿急性下呼吸道感染最重要的一种病毒。绝大多数初次感染发生于婴幼儿时期, 在

一次流行中, 由呼吸道合胞病毒引起之婴幼儿细支气管炎与支气管肺炎可达到这些疾病全年总数 35—80%<sup>[1]</sup>。我们分离之结果亦证明, 此病毒在引起婴幼儿支气管肺炎与支气管炎中的重要性。值得我国临床工作者密切注意。

由于上述患者均系一岁以下婴儿, 采取双份血清有一定困难, 未能查明抗体升高情况。但文献介绍凡分出呼吸道合胞病毒之患儿, 几乎均有症状<sup>[1]</sup>, 从我们分离的结果可以证明, 合胞病毒与临床感染有关。

此病毒在较大儿童与成年人中均可发生再感染。近年来研究表明, 此病毒在慢性气管炎急性症状发作时具有一定重要性<sup>[5]</sup>。我们打算在分出此病毒基础上, 用以进行慢性气管炎急性症状发作时血清学调查。

呼吸道合胞病毒之血清型虽较单纯, 但以动物免疫血清按中和反应进行分类, 至少有两个以上不同血清型<sup>[9,10]</sup>。以交叉补体结合反应鉴定则无区别, 故考虑分离之病毒有属于呼吸道合胞病毒的可能性时, 可先以交叉补体结合反应鉴定较为合适<sup>[9,10]</sup>。近年来, 有使用荧光抗体法进行鉴定, 为快速诊断提供了方便<sup>[11]</sup>。我们分出之 6 株病毒, 由于其具有不耐酸、不耐醚, 属于 RNA 核酸型之特性, 可以将其与呼吸道感染中常见之腺病毒、鼻病毒、某些肠道病毒、Reo 病毒、疱疹病毒相区别, 又由于此组病毒之重要特征为在 HeLa 细胞和原代人胚肾细胞上形成融合性病变, 而与冠状病毒、巨细胞病毒等又有所不同。据文献介绍能在组织培养中引起融合性病变者, 常见有副流感病毒 2、3 型、腮腺炎病毒、麻疹病毒, 但这些病毒在组织培养中均可产生血球吸附现象<sup>[6]</sup>。我们用豚鼠血球与猴血球在产生明显病变之肾细胞上进行血球吸附试验, 均为阴性, 故不得不考虑最大

可能属于合胞病毒。经用交叉中和反应与补体结合反应证明,此组病毒可以确定属于呼吸道合胞病毒。

呼吸道合胞病毒由于其不稳定,抵抗力低,在没有较为敏感的细胞如 HEP-2 等和及时接种时,分离较为困难。HeLa 细胞在国外亦用以分离合胞病毒<sup>[1]</sup>,且有较高的阳性率。但其敏感性各实验室保存之 HeLa 细胞株又有所不同<sup>[12]</sup>。呼吸道合胞病毒接种 HeLa 细胞<sup>[11]</sup>,在 37°C 静置培养时,形成之合胞病变甚为稀少。因此其病变不如在 HEP-2 细胞上形成明显之融合,易于识别。我国曾有人使用 HeLa 细胞、猴肾细胞等分离婴幼儿呼吸道感染的病毒材料,但未能分出呼吸道合胞病毒,究系何种原因,值得进一步探索。

我们在进行病毒分离时,仅使用旋转培养法,未与静置法作平行的比较,但将已分出之呼吸道合胞病毒进行研究表明,旋转法比静置法好。国外用猴肾细胞滴定呼吸道合胞病毒<sup>[13]</sup>,亦发现旋转法优于静置法。故实际分离时,采用旋转法可提高分离阳性率。

人胚肾细胞对呼吸道合胞病毒敏感性较差<sup>[14]</sup>,我们的结果也是这样。但鉴于人胚肾细胞对其他常见呼吸道病毒有较广泛

的敏感性,为常用的手段,若能仔细掌握呼吸道合胞病毒在原代人胚肾细胞上病变的特点,可能有助于呼吸道合胞病毒之分离。

### 参 考 资 料

- [1] E. H. Lennette et al. (editors): *Diagnostic Procedures for viral and Rickettsial Infections* Ed. 4, New York, 1969.
- [2] R. G. Somerville: *Lancet*, 2: 1247—1248, 1963.
- [3] M. J. McNamara, et al.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 100: 19—24, 1972.
- [4] 卫生部直属等单位细菌病毒协作组: *中华医学杂志*, 1: 1—3 1972.
- [5] 陈德惠: *中华医学杂志*, 4: 211—215 1974.
- [6] 萧俊等: *微生物学报*, 10: 39—44 1964.
- [7] R. W. Chanock, et al.: *Amer. J. Hyg.*, 66: 281—290, 1957.
- [8] W. S. Jordan: *J. Immunol.*, 88: 581—590, 1962.
- [9] A. V. Coates et al.: *P.S.E.B.M.*, 112: 958—964, 1963.
- [10] H. Wulff, et al.: *P.S.E.B.M.*, 115: 240—243, 1964.
- [11] J. H. Shible, et al.: *P.S.E.B.M.*, 120: 203—208, 1965.
- [12] D. A. J. Tyrrell: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 82: 72—84, 1963.
- [13] H. Wulff et al.: *P.S.E.B.M.*, 115: 458—462, 1964.
- [14] C. R. Bennet: *J. Infect. Dis.*, 110: 8—16, 1962.
- [15] J. A. Morris, et al.: *P.S.E.B.M.*, 92: 544—549, 1956.

## STUDIES ON THE ISOLATION AND GROWTH CHARACTERISTICS OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

KUN NUMBER 323 UNIT, THE CHINESE PEOPLE'S LIBERATION ARMY

(Kunming)

Using the HeLa Cell and human embryo kidney roller tube monolayer tissue cultures at 33°C, six strains of respiratory syncytial virus were recovered from 34 infants with acute respiratory tract disease. In the present report, we have also compared the growth characteristics

of the respiratory syncytial virus on different culture conditions. It was found that the sensitivity and the syncytium formations of the infected HeLa cells in the roller tube culture were more superior than the stationary culture method.

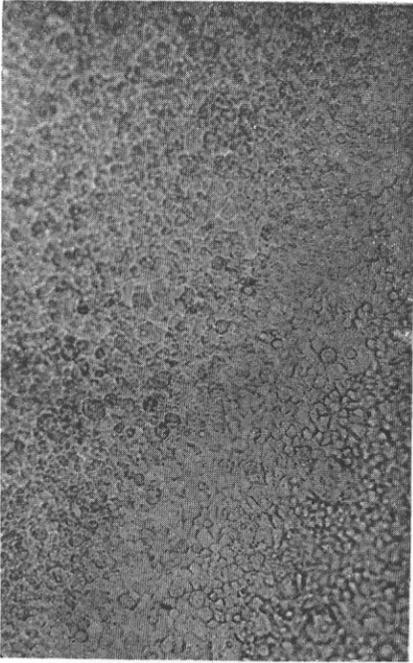


图1 正常 HeLa 细胞(60×)

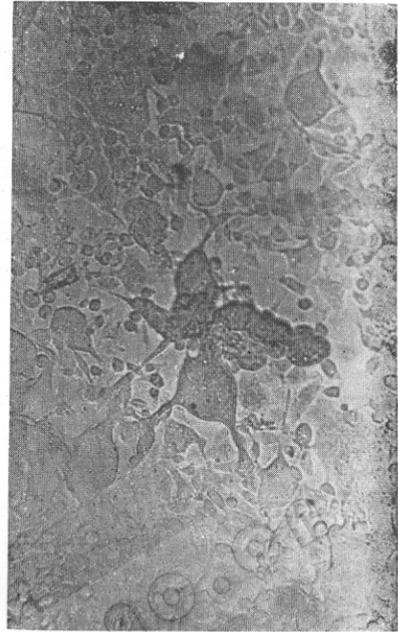


图2 突株感染 HeLa 细胞早期融合性病变(60×)



图3 突株感染 HeLa 细胞之融合性病变胞浆离壁,周围有圆缩细胞堆积(60×)

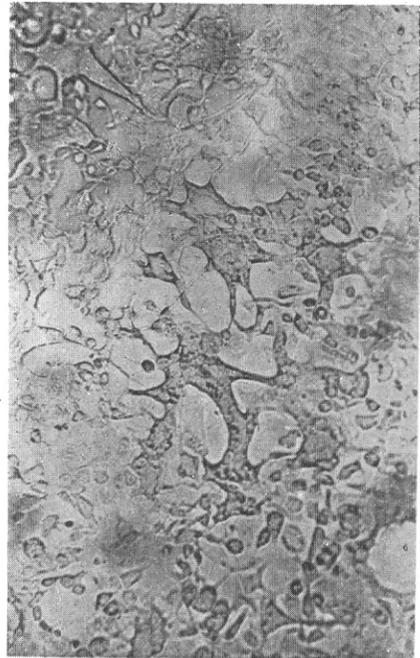


图4 突株感染 HeLa 细胞产生广泛融合性病变(60×)

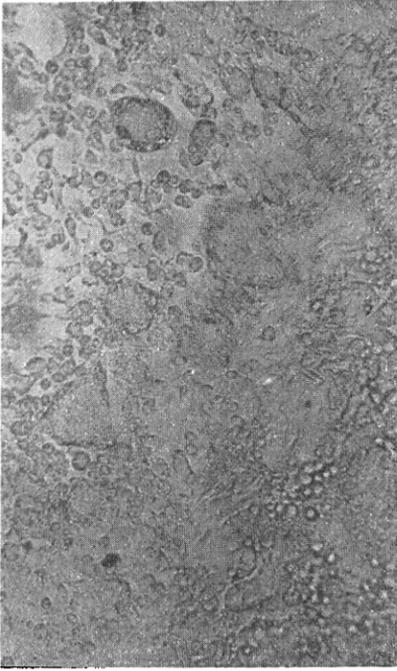


图5 宾株感染之致密 HeLa 细胞单层, 形成大而圆的多核巨细胞, 胞浆边缘有融合之细胞核可见(60 $\times$ )

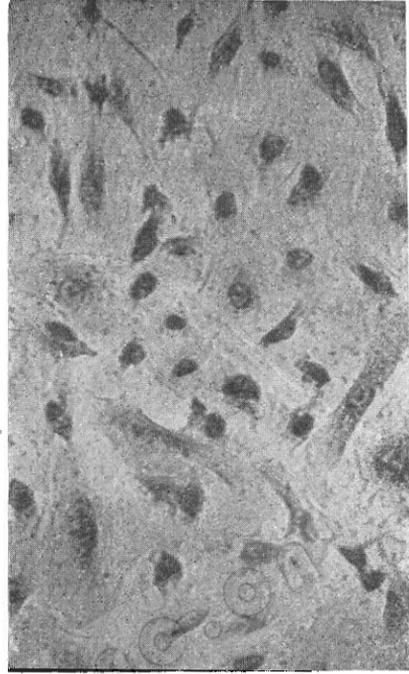


图6 正常原代人胚肾细胞 (120 $\times$ ) 姬姆萨染色



图7 奕株感染之人胚肾细胞, 其融合细胞内细胞核清晰可见并有拉丝, 圆缩等病变, 姬姆萨染色(60 $\times$ )

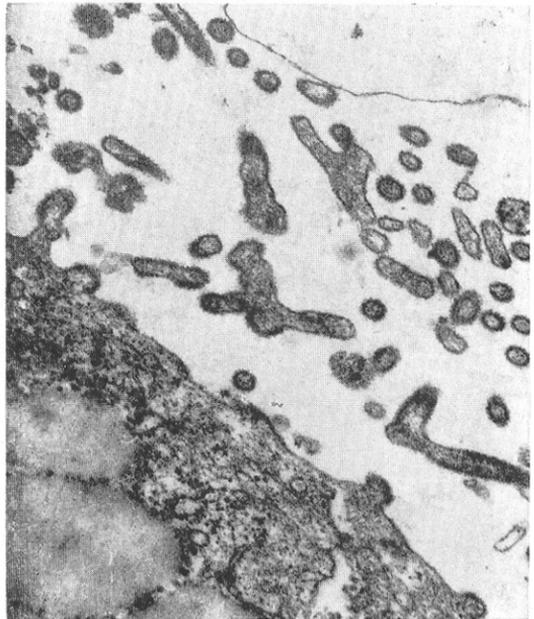


图8 宾株等感染 HeLa 细胞电镜照片 (32000 $\times$ )