

# 日冕病毒的分离鉴定与血清学调查

中国人民解放军昆字三二部队病毒组\*

(昆明)

本文介绍 1971 年 12 月由昆明地区感冒患者分出一株日冕病毒。经交叉中和反应发现, 该毒株与国外报导的 229 E 株有密切抗原关系, 但又有一定区别。对昆明与贵阳两个地区人群血清中和试验调查结果指出, 血清中和抗体 1:2 以上阳性率者达 29%, 并且成人比儿童感染广泛。

日冕病毒是人类近年来发现的一种重要的呼吸道病毒, 在用电镜观察时, 发现其形态较为特殊, 病毒颗粒四周具有花瓣状突起, 犹如日冕, 1968 年 Almeida 等建议定名为日冕病毒<sup>[1]</sup>。

近年来, 我国对感冒、气管炎病毒病因进行了大量调查研究工作。1971 年 12 月份, 我们于昆明地区一名普通感冒患者鼻咽分泌物中得到日冕病毒与鼻病毒混合感染标本, 由中国人民解放军 236 部队予以发现<sup>[2]</sup>, 经分纯后进行了鉴定, 并对昆明、贵阳地区不同年龄组人群血清进行了中和试验调查。

## 一、日冕病毒昆徐株的分离

此病毒于 1971 年 12 月分离自昆明地区感冒患者。其病症是流清鼻涕, 轻度鼻塞, 全身稍感不适, 但不发热, 病程历时 3 天。发病次日即取患者鼻分泌物种入人胚肾细胞管, 33°C 旋转培养, 维持液为 2% 胎牛血清之 0.25% 乳白蛋白水解物之 Hanks 氏液, 于第一代即可见肾细胞单层之边缘有轻度病变, 细胞呈伪足状突起与变圆, 当时重复鉴定两次均耐乙醚, 不耐酸, RNA 核酸型, 血球吸附试验阴性, 鉴定为鼻病毒, 经选送 236 部队电镜切片检

查, 除发现有鼻病毒颗粒外, 并见有典型之日冕病毒颗粒存在。因我们与 236 部队实验室从未保存过日冕病毒毒种, 故可排除实验室内毒株之污染可能性, 但对此患者未做双份血清抗体检查。

按 236 部队介绍的方法<sup>[3]</sup>, 首先将此混合感染标本中的鼻病毒除去。即先以乙醚使混合感染中日冕病毒灭活, 分出鼻病毒, 传代培养, 以其病毒液免疫豚鼠, 制备鼻病毒免疫血清, 再用以中和原混合感染培养中之鼻病毒, 而使日冕病毒得以分出。为使毒株进一步纯化, 又进行终末稀释两次。纯化后之日冕病毒反复进行传代, 并

表 1 日冕病毒昆徐株纯化前后的比较

性质 样品	核酸型试验		酸稳定性试验		乙醚稳定性试验		病毒
	加 IUDR	不加 IUDR	pH 3.0	pH 7.2	乙醚处理	未处理	
分纯前	3.50	3.17	<1.0	3.17	2.77	3.17	鼻病毒 日冕病毒
分纯后	3.0	3.0	<1.0	3.0	<1.0	3.0	鼻病毒 日冕病毒

注: 分纯后系以双倍体细胞进行鉴定, 分纯前用肾细胞测定。

本文于 1975 年 4 月 2 日收到。

\* 承中国人民解放军 236 部队, 中国医学科学院流行病学防治研究所指导与协助, 特致谢意。

测定其对乙醚和酸的稳定性,与核酸型试验,证实确已分纯(图版 I-1,表 1)。

## 二、日冕病毒昆徐株的生物学性质

### 1. 原代人胚肾细胞培养

原代人胚肾细胞的生长液,为 15% 牛血清之 0.5% 乳白蛋白水解物之 Earle 氏液。维持液:用于病毒分离时,为 2% 胎牛血清之 0.25% 乳白蛋白水解物 Hanks 氏液;用于病毒传代或测定时为 2% 小牛血清 1:1 Eagle 氏液与 0.5% 乳白蛋白水解物之 Earle 氏液。

未纯化前此鼻病毒与日冕病毒混合感染接种于原代人胚肾细胞上,均出现典型的鼻病毒细胞病变,先是细胞单层边缘细胞出现蜘蛛样与圆缩细胞,折光性增强,渐渐细胞病变蔓延至整个细胞单层,最后细胞全部退化并由管壁脱落。分纯后之日冕病毒接种人胚肾细胞单层,则仅出现散在的圆缩细胞,少数成堆,折光性增强,但细胞单层并不全部破坏,故细胞质量不佳时,对此病变不易判定。

### 2. 双倍体细胞 KMB<sub>17</sub> 培养

双倍体细胞 KMB<sub>17</sub> 由昆明医学生物研究所分子,生长液为 10% 小牛血清之 2:1 Eagle 氏与 0.5% 乳白蛋白水解物之 Earle 氏液,维持液为 2% 小牛血清之 1:1 Eagle 氏与 0.5% 乳白蛋白水解物 Earle 氏液。

将日冕病毒昆徐株接种于双倍体细胞上,亦用 33℃ 旋转培养,病变则远较肾细胞上清楚,一般于接种日冕病毒 3—4 天后细胞若绳索状变性,细胞单层疏开,广泛出现一些颗粒与为数不多的小圆细胞,最后可演变为细胞单层全部破坏(图版 I-2,3),病变较易判断。

我们还接种了两株传代的人胚肺细胞,亦获得同样结果。

### 3. 双倍体与人胚肾细胞对日冕病毒的敏感性

为比较双倍体与人胚肾细胞对日冕病毒的敏感性,我们进行了不同稀释度接种培养试验。结果(表 2)指出,日冕病毒昆徐株在组织培养上传代之病毒, KMB<sub>17</sub> 双倍体细胞较人胚肾细胞为敏感。

表 2 昆徐株在双倍体与人胚肾细胞上细胞病变出现之比较

	观察 天数	不同稀释度病毒接种后之细胞病变												细胞对照	
		10 <sup>-1</sup>				10 <sup>-2</sup>				10 <sup>-3</sup>					
双倍体	10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-
人胚肾细胞	20	++	++	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: (+) 系指在肾细胞虽未查到可见之病变,但于第 9 天转种于双倍体细胞后又可查出有病毒者。

## 三、交叉中和反应

交叉中和利用的已知日冕病毒 229 E 株系,中国医学科学院流行病防治研究所赠,以双倍体细胞传代。

### 1. 免疫血清制备

以健康豚鼠进行免疫,将上述毒株接种人胚肾细胞,33℃ 旋转培养,产生典型病变后,反复冻融 3 次,离心取上清,是为

免疫抗原, 免疫手续为每只豚鼠, 每次脚掌注射病毒抗原 0.2 毫升, 心脏或腹腔注射抗原 1 毫升, 每隔 4 天, 重复免疫一次, 共 8 次, 末次注射 7 天后进行放血, 分出血清, 以双倍体细胞测定中和抗体效价, 若中和抗体效价达 1:32 以上, 即冻存储备用。血清用前以 56°C 30 分钟灭活。

## 2. 病毒交叉中和反应

将病毒液滴定后, 用时约稀释为 200 TCID<sub>50</sub>/0.2 毫升, 分别与等量不同稀释度之免疫血清混合, 在 37°C 水浴中作用 1 小时, 然后由每个混合液管中各取 0.2 毫升, 接种双倍体细胞两支, 33°C 旋转培养观察, 以 25% 以上细胞产生病变者, 为阳性标准, 实验中并作病毒对照、血清对照与正常细胞对照。

结果(表 3)指出, 昆徐株和日冕病毒 229 E 株有明显的抗原关系, 但不尽相同, 我国的日冕病毒昆徐株免疫血清, 对 229 E 病毒之中和滴度, 仅及其本身 1/32, 经重复 3 次, 结果亦类同。设若昆徐株仍有鼻病毒之混合感染, 则 229 E 免疫血清当不能中和昆徐株, 而我们实验之结果, 为 229 E 免疫血清可中和昆徐株病毒, 其滴度相等, 而昆徐株免疫血清中和 229 E 病毒之滴度甚低, 故可排除分纯后昆徐株混合感染之可能性。

表 3 日冕病毒昆徐株与 229 E 株交叉中和反应结果

免疫血清	中和反应滴度	
	昆徐株 (500TCID <sub>50</sub> /0.2 毫升)	229 E (500TCID <sub>50</sub> /0.2 毫升)
昆徐株	1:256	1:8
229 E	1:64	1:64

## 四、人群血清学调查

鉴于日冕病毒昆徐株免疫血清对 229 E 病毒株中和反应滴度甚低, 在对本地区人群血清学调查时, 我们采用了国内分纯的昆徐株作为中和试验之病毒株进行测定。

### 1. 方法

各年龄组之人群, 均为医院内或门诊之体检血清、肝功等生化检查均属正常者, 分别于昆明与贵阳两地区收集, 血清收集后分别加入等量抗菌素溶液(每毫升内加青霉素、链霉素各 1000 单位, 新霉素 100 单位, 双性链丝菌素 5 单位), 放 4°C 一夜, 以除去可能污染之杂菌, 放 -30°C 冰箱冻存储备用。

中和反应所用病毒为纯化后日冕病毒昆徐株。为保证此株确已分纯, 在人群血清试验前后, 均以乙醚稳定性试验, 229 E 免疫血清中和试验, 检查鼻病毒确已被除去。病毒实用单位为 32—1000 TCID<sub>50</sub>/0.2 毫升, 血清测定时先以 56°C 灭活 30 分钟, 由 1:2 开始 4 倍稀释进行测定, 病毒与血清在 37°C 水浴作用一小时, 分别取 0.2 毫升混合液, 种入 2 支双倍体细胞中。33°C 旋转培养观察, 判断标准与实验对照同上述。

### 2. 结果

由表 4 可知, 昆明与贵阳两个地区人群感染日冕病毒昆徐株之阳性率接近。依年龄组分析, 1—5 岁组阳性率最低, 以后随年龄增长而俱增, 在 16 岁以上的成人组中, 血清中和抗体 1:2 以上之阳性率, 昆明与贵阳地区分别为 41.5% 和 53.8%。可见日冕病毒在成人中感染甚为广泛。

表 4 昆明与贵阳地区人群血清之日冕病毒昆徐株中和反应调查结果

	检查人数	阳性数	阳性率* (%)	人群血清中和抗体滴度					
				1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
昆 明	98	27	27.5*	8	16	2	1		
1—5 岁	29	3	10.4	3					
6—10 岁	20	5	25.0		5				
11—15 岁	7	2	29.5	1	1				
16 岁以上	42	17	41.5	4	10	2	1		
贵 阳	95	29	30.5	8	13	4	1	1	2
1—5 岁	23	1	4.4		1				
6—10 岁	23	4	17.4	1	3				
11—15 岁	10	3	30.0		2	1			
16 岁以上	39	21	53.8	7	7	3	1	1	2

注：血清中和试验昆徐株在此血清测定前后，均用乙醚稳定性试验，229 E 免疫血清中和试验，证实确无鼻病毒存在。

\* 包括 1:2 可疑阳性。

## 五、讨 论

日冕病毒分离培养较常见的呼吸道病毒为难，有的需要器官培养始能分出<sup>[4]</sup>，有的用人胚肠细胞分离，可取得较好的效果<sup>[8]</sup>，有的虽然在人胚肾细胞分出，但初代时病变往往不明显，经传代后，其病变亦仅为散在或小堆的小圆细胞，若未仔细地观察，可被忽略。我们分离之此株病毒病变之特征亦同，若无电镜切片详细检查，可能被遗漏。

国外报告用传代人胚肺 WI-38 细胞分离日冕病毒，未见成功<sup>[5,6]</sup>。我们体会，由人胚肾分离之昆徐株较易生长于传代人胚肺或双倍体细胞上，一般转种数日后，即可见明显之细胞病变。由此受到启示，在用人胚肾细胞分离，疑有日冕病毒之情况下，转种于双倍体细胞，可有助于判断病毒之存在。

日冕病毒属包括之病毒为数不少<sup>[7]</sup>，人的日冕病毒在形态学上，与鼠肝炎病毒、禽支气管炎病毒十分相似。但在细胞生长范围，抗原结构上仍有一定区别<sup>[7,8]</sup>。据介

绍，用组织培养分出之各株日冕病毒中和试验证明都是同型，由我们交叉中和反应结果看来，国内之日冕病毒昆徐株与国外组织培养分出之代表株 229 E，有密切的抗原关系，但又有一定的区别。

日冕病毒昆徐株经用人群血清中和反应调查，证实其感染甚为广泛。据 Bradburne 报告<sup>[9]</sup>，他在英国不同地区，采集 215 份人血清作中和试验，发现 29% 的人对 229 E 株具有中和抗体，在成人组中血清阳性率高达 41%。由于此病毒感染之广泛存在，故在防治感冒气管炎病毒病因上，值得进一步加强研究。

## 参 考 资 料

- [1] Almeida, J. D. et al.: *Nature*, **220**:650, 1968.
- [2] 陈德蕙: 中华医学杂志, **4**: 211—216, 1974.
- [3] 中国人民解放军 236 部队感冒防治组: 微生物学通报, **2**(4): (正在印刷中) 1975.
- [4] Tyrrell, D. A. J. et al.: *Brit. Med. J.*, **1**:1467—1470, 1965.
- [5] Kapikian, A. Z. et al.: *J. Inf. Dis.*, **119**: 282—290, 1969.
- [6] Hamre, D. et al.: *P. S. E. B. M.*, **121**: 190—192, 1966.
- [7] Andrewes, C. et al.: *Viruses of Verte-*

- brates, Third Ed., p. 179—189, Bailliere  
Tindall Publ., 1972.
- [8] McIntosh, K. et al.: *J. Immunol.*, **102**:

- 1109—1118, 1969.
- [9] Bredburne, A. F. et al.: *Brit. Med. J.*,  
**3**:767—769, 1967.

## ISOLATION, IDENTIFICATION AND SEROLOGICAL STUDIES OF A CORONAVIRUS STRAIN

VIRUS RESEARCH GROUP OF KUN NUMBER 323 UNIT, THE CHINESE PEOPLE'S  
LIBERATION ARMY  
(*Kunming*)

A coronavirus strain mixed with rhinovirus was isolated from the nasal and pharyngeal secretions of a common cold patient by embryo kidney tissue culture in the city of Kunming in December, 1971. It was further purified by removal of rhinovirus by neutralization with specific antiserum. By means of cross neutralization tests, we found that the coronavirus KS strain isolated from China was antigenically closely

related to the coronavirus 229E strain, but there was also a definite difference between them. During 1973—1974, 193 samples of serum from person residents in the cities of Kunming and Guiyang were collected and tested for serum neutralization, the seropositive percentage was 29% in average, and the infectious rates for adult groups were higher than for children groups.