

## 甲型肝炎病毒分离及培养特性的研究

李成明 陈立礼 殷大常 陈丹林

刘丽华 王宏喜 胡 萍

(四川省卫生防疫站病毒性疾病控制科, 成都)

### 提 要

应用人胚肺二倍体细胞(2BS)直接从甲肝病人急性期粪便中分离培养出一株甲型肝炎病毒( $S_{84-1}$ )。该毒株无致细胞病变作用, 具有产量和毒力较高( $10^{-6.5} \sim -7$ ) 繁殖周期短(7天左右)的优点, 可作为生产甲型肝炎诊断试剂和研制甲型肝炎疫苗的候选毒株。

1979年, Provost、Frosner 分别用恒河猴胎肾细胞和人肝癌传代细胞培养甲肝病毒首获成功<sup>[1][2]</sup>。这一突破为甲型肝炎的特异诊断和防治开拓了良好的前景。近几年来, 国内也陆续开展了此项研究, 并有一些培养成功的报告<sup>[3][4]</sup>。但因病毒产量低, 仍未满足研制疫苗和大规模生产诊断试剂的需要。我们利用人胚肺二倍体细胞成功地分离培养出一株繁殖滴度较高的甲肝病毒( $S_{84-1}$ )。同条件下与HM-175等国外毒株相比较,  $S_{84-1}$ 毒株具有产量较高, 繁殖周期短的优点, 现报告如下:

### 材 料 与 方 法

#### 1. 标本来源与处理

(1)甲肝病毒粪便标本: 采自四川省合川县甲肝暴发流行中一典型病人的发病早期, 按文献<sup>[5]</sup>制备成5%悬液, 经ELISA法证实为甲肝病原阳性。将此粪便悬液经10000rpm离心沉淀, 上清用pH7.2, 0.01M磷酸缓冲液透析, 过滤除菌, 分装冻存于 $-30^{\circ}\text{C}$ , 供分离培养用。

(2)参考甲肝毒株(HM-175): 该毒株由WHO肝炎参比中心Gust教授赠给, 经预防中心病毒所肝炎室用2BS细胞传代适应后, 于83年全国甲肝病毒工作会议期间发给。

本课题得到中国预防医学中心病毒所肝炎室刘崇柏, 詹美云主任的大力支持; 重庆第二防疫站, 合川县防疫站参与现场标本的收集; 四川医学院电镜室李光荣, 王燕萍老师协助电镜观察, 再此一并致谢。

本稿1985年11月23日收到

## 2. 培养细胞

(1) 人胚肺二倍体细胞(2BS): 北京生物制品所供给。

(2) 人胚肾原代细胞(HK), 人胚肺原代和传代细胞(HL)均由本室自制。Vero细胞由病毒所流行病组赠给。

## 3. 甲肝恢复期血清

采自甲肝病人恢复期, 抗-HAV 滴度 1 : 2560(IAHA 法)

## 4. 甲肝 IgG 抗体提纯和酶结合物的制备

将高滴度甲肝抗体血清用聚乙二醇 G6000, DEAE 柱纯化后, 用改良过碘酸钠法<sup>[6]</sup>制备抗-HAV-HRP 酶结合物。

## 5. 甲肝 IgM 抗体阴性, 阳性血清

采自甲肝流行区人群, 用美国 Abbott 公司 RIA 放免诊断试剂标化。

## 6. 甲肝病毒的原代分离与传代培养

将 2BS 细胞培养于方瓶和带盖片试管中, 长成片后弃去培养液, 种入除菌的  $S_{84-1}$  粪便标本(每大方瓶种 1 ml, 每管 0.1 ml), 放 37°C 吸附 2 小时后, 补充无血清 Eagle's 培养液(9 ml/瓶, 0.9 ml/管), 放 32°C 维持培养, 48 小时后, 换以含 2% 牛血清的 Eagle's 维持液, 继续 32°C 培养, 4~6 天换液一次, 定期用 IF 法检测。待 50% 以上感染细胞荧光颗粒阳性 7~15 天后, 弃去瓶内维持液, 加入 5 ml 无血清 Eagle's 液, 反复冻融 5 次, 将悬液放 -30°C 保存, 供检测与传代用。病毒传代及 HM-175 甲肝毒株的培养亦按上述方法进行。

## 7. 病毒检测

(1) 间接免疫荧光法(IF): 定期取出感染的细胞盖片, 用冷丙酮固定 12~15 分钟, 洗涤, 加入 1 : 20 稀释甲肝恢复期血清, 37°C 作用 45 分钟, 洗涤, 加入马抗人 IgG-荧光素结合物, 37°C 作用 30 分钟后, 洗涤, 用荧光显微镜观察结果。

(2) 固相酶免疫法(ELISA): 操作同文献<sup>[6]</sup>, 即将冻融的感染细胞悬液加到抗 HAV 包被的板中, 作用后加入抗-HAV-HRP 酶结合物, 随后按常规加入底物。显色, 判读结果。

## 8. 病毒毒力测定

用无血清 Eagle's 液将冻融的  $S_{84-1}$  病毒悬液作 10 倍序列稀释, 分别接种感染 2BS 细胞盖片, 放 32°C 培养 45 天后用 IF 法检查, 以 50% 感染细胞荧光阳性的稀释度为该毒株的 TCID<sub>50</sub>。HM-175 毒株按同法测定。

## 9. 病毒的鉴定

(1) 免疫电镜检: 取培养第七代的  $S_{84-1}$  病毒悬液, 用氯仿抽提, 10000rpm 离心30分钟, 上清与 6 单位的甲肝恢复期血清混合, 37°C 作用 1 小时后, 4 °C 过夜, 25000rpm 离心 1 小时, 沉淀用 50 $\mu$ l 双蒸水悬浮后滴于铜网上, 凉干, 用 1.5% 磷钨酸负染后送电镜观察。

(2) 抗原特异性检测: 采用 ELISA 双夹心法。将标化的 IgM 甲肝抗体阴性和阳性血清 1 : 1000 稀释后, 分别加到抗  $\mu$  链抗体 (Sigma 产品) 包被孔中, 用培养第七代的  $S_{84-1}$  病毒为抗原检测这批血清。

## 结 果

1.  $S_{84-1}$  的原代分离与传代培养: 用  $S_{84-1}$  粪便悬液感染 2BS 细胞后, 维持培养至二个月时仍 IF 检查阴性。将感染细胞冻融后盲传第二代, 培养到四十天时, 部分感染细胞浆内出现砂粒样荧光颗粒, 继续培养至 60 天后收获冻融, 再传代。如表 I 所示, 随着连续传代, 病毒的繁殖周期缩短, 荧光颗粒出现的时间提前。第十二代时, 接种后第三天便出现荧光颗粒, 第六天荧光强度达到二十, 阳性细胞近 100%。图 1、为第十一代  $S_{84-1}$  病毒的典型荧光检测照片。在整个传代培养过程中无明显细胞病变, 培养上清中病毒检查阴性 (ELISA 法)。

表 1  $S_{84-1}$  病毒的传代培养结果  
Table 1 Result of serial propagation of  $S_{84-1}$  HAV in 2BS cells

传代次数	IF 阳性时间 (天)	$\geq 50\%$ 细胞 IF 阳性时间 (天)	收获病毒时间 (天)	病毒感染滴定 (TCID <sub>50</sub> )	病毒抗原滴定 (ELISA)
1	-	-	60	ND	-
2	40	ND	60	ND	1:1
5	23	35	42	ND	1:8
7	15	24	30	10 <sup>-7</sup>	1:8
11	ND	10	20	ND	1:16
12	ND	7	15	10 <sup>-6.5</sup>	1:8
13	3	6	15	ND	1:8

(-) — 阴性结果

ND — 未测定

IF — 免疫荧光测定



图1. 第11代  $S_{84-1}$  病毒感染 2BS 细胞 20 天时的 IF 检测照片, 可见胞浆内颗粒荧光, 在核周围的胞浆内, 荧光颗粒聚集成片状。

Fig 1. Fluorescence micrograph of the 20th days 2BS cells infected by  $S_{84-1}$  HAV (passage 11). It was shown granular fluorescence in cytoplasm and spot fluorescence in perinuclear cytoplasm.



图2. 第6代  $S_{84-1}$  病毒的免疫电镜照片, 可见典型的 27nm 大小的空心 and 实心甲肝病毒颗粒 (放大倍数13万倍)。

Fig 2. Immune electron micrograph of negatively stained  $S_{84-1}$  HAV (passage 6), which were shown typical empty and density HAV particles in a diameter of 27nm (130000 $\times$ ).

2.  $S_{84-1}$  病毒的鉴定结果: 免疫电镜检查见到 27nm 大小的典型甲肝病毒颗粒复合物, 空心 and 实心病毒颗粒同时存在 (图 2)。用培养第七代的  $S_{84-1}$  病毒作抗原, 检测 40 份标化甲肝 IgM 抗体阴性、阳性血清, 39 份测定结果相符 (符合率 97.5%), 表明该病毒确为甲型肝炎病毒 (表 II)。不符合的那一份血清采自一典型甲肝病人发病后 113 天, 因而认为其结果不符合可能是二种方法的敏感度差异造成。

表 2 应用培养的 $S_{84-1}$ 病毒检测抗-HAV IgM 标化血清(ELISA)  
Table 2 Detection of standardized sera of anti-HAV IgM  
using cultured  $S_{84-1}$  HAV (by ELISA)

	$S_{84-1}$ 病毒		合计(份)
	+	-	
标化抗-HAV IgM血清*	30	0	30
	1	9	10
	31	9	

\* 经Abbott RIA药盒标化。

3.  $S_{84-1}$  与 HM-175 的培养比较: 平行用 2BS 细胞培养这两个毒株, 并测定其感染和抗原滴度。结果表明  $S_{84-1}$  毒株在 2BS 细胞中繁殖周期较 HM-175 毒株短, 毒力也高于 HM-175 毒株。与所报道的一些国内外毒株比较,  $S_{84-1}$  毒株的毒力较高(表 3)。

表 3  $S_{84-1}$  与国内外其它甲肝病毒株的毒力比较  
Table 3 Comparison of HAV  $S_{84-1}$  with some domestic  
and abroad HAV strains

	毒株名称*							
	$S_{84-1}$ **	HM-175	龙甲-1	沈-2	CSM-1	PA-21	PA-33	FR-AL
感染测定(TCID <sub>50</sub> )	$10^{-7.0}$	$10^{-5.5}$	$10^{-7.6}$	$10^{-5.6}$	$10^{-6.6}$	$10^{-6.0}$	$10^{-6.5}$	$10^{-7}$
IF 检测阳性时间(天)	12	22						
病毒抗原测定(ELISA)	1:8	1:4						

\* 除  $S_{84-1}$  和 HM-175 为本研究外, 其余毒株的结果来自文献(3), (7)。

\*\*  $S_{84-1}$  与 HM-175 均为在 2BS 细胞适应 6 代后, 同条件下培养观察。

4.  $S_{84-1}$  病毒的产量研究: 将培养各代的细胞收获, 冻融后, 用 ELISA 法测定, 结果表明随着传代适应后, 抗原滴度有一定的增加(表 1)。将培养第十一代的  $S_{84-1}$  病毒定期收获, 冻融 5 次后测定, 可见培养二周后病毒产量便接近高峰, 延长培养时间, 病毒产量的增加并不明显。取其培养第三周的感染细胞反复冻融后检测, 以冻融 5 次病毒滴度最高。冻融 3 次和次数过多, 病毒滴度都低, 估计因前者病毒释放不充分, 后者抗原活性丢失所致(图 3)。

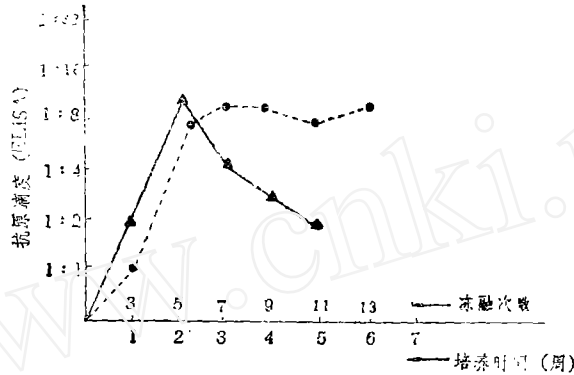


图 3 培养时间和冻融次数与病毒滴度的关系。▲—▲ 不同冻融次数的病毒滴度曲线。●—● 第十一代  $S_{84-1}$  HAV 的生长曲线。

Fig 3 Growth curves of  $S_{84-1}$  HAV (passage 11) in 2BS cells and relationship of freeze—thaw times to HAAg titer.

▲—▲ HAAg titer curves of different freeze—thaw times, which was done by using the 15th day's cells after  $S_{84-1}$  HAV (passage 11) infection.  
●—● Growth curves of  $S_{84-1}$  HAV (passage 11).

5.  $S_{84-1}$  对温度、细胞的敏感性：将第一代和第三代  $S_{84-1}$  病毒感染的细胞放  $35^{\circ}\text{C}$  和  $37^{\circ}\text{C}$  培养，直到二个月 IF 法检查病毒阴性。用 HK、HL 原代细胞和 Vero 传代细胞培养第六代  $S_{84-1}$  病毒 ( $32^{\circ}\text{C}$ )，结果均阴性，将它们收获冻融，再盲种于同种细胞中，结果仅 HL 细胞在感染后 45 天出现微弱荧光。

## 讨 论

本文报道应用 2BS 细胞从四川省合川县急性期甲肝病人粪便中分离培养出一株能稳定培养传代的病毒，经形态学和血清学鉴定证实为甲型肝炎病毒，定名为  $S_{84-1}$ 。该病毒在长期传代培养中，不引起细胞病变和培养上清病毒测定阴性。随着传代适应，其繁殖周期逐步缩短，这些特点与国外报告的一些毒株的特点完全一致<sup>[8][9]</sup>。

2BS 细胞是一种性状较好，已用于多种疫苗生产的细胞株。直接用它培养  $S_{84-1}$  甲肝病毒，为今后用该病毒研制疫苗提供了方便。不同细胞与温度培养的结果表明， $S_{84-1}$  甲肝病毒的生长条件比较严格，在 2BS 细胞上培养以  $32^{\circ}\text{C}$  为最佳温度。

与 HM-175 毒株和一些国内外报告的毒株比较， $S_{84-1}$  甲肝病毒是一株繁殖周期短，感染滴度和病毒产量较高的毒株。它的分离培养成功，不仅有助于甲肝病原学研究，甲肝防治工作的深入开展，而且也有益于甲肝疫苗和甲肝诊断试剂的研制。

## 参 考 文 献

- (1) Provost, P.J. et al., 1979 *Proc. soci. Exp. Bio. Med.* 169:231.  
 (2) Frosner G.G. et al., 1979, *Infection* 7:303.  
 (3) 胡孟冬等, 1984, 中华传染病学杂志, 2(2):109.  
 (4) 秦 贤等, 1984, 公共卫生与疾病控制杂志3(1):1。  
 (5) 李成明等, 1982, 中华微生物学与免疫学杂志2(6):390。  
 (6) Wilson M.B. et al., 1973, 《*Immunofluorescence and related staining technique*》P215.  
 (7) Bina L.N. et al., 1984, *J. Clin. Microbiol* 20(1):23.  
 (8) Gauss M.V. et al., 1981, *J. Med. Virol* 7:233.  
 (9) Danner R.J. et al., 1981, *Infect. Immunol* 32:288.

## ISOLATION AND PROPAGATION OF HEPATITIS

## A VIRUS IN VITRO

Li Cheng-ming	Chen Li-li	Ying Da-Chang
Chen Dan-lin	Lu Li-hua	Wang Hong-xi
	Fu Ping	

(Department of Viral Disease of Control, Health and Anti-epidemic Station of  
Sichuan Province, Chengdu)

A Strain of hepatitis A virus( $S_{84-1}$ ) was directly isolated from a fecal specimen of acute patient with hepatitis A and serially passaged in human diploid fibroblast (2BS). Some conditions of cultivation of this virus were also studied. Following serial propagation, the incubation time of  $S_{84-1}$  virus was reduced from one and half months (passage 2) to 3 days (passage 12).  $S_{84-1}$  virus, without cytopathic effect, can't be detected in supernatant fluid by ELISA and was harvested by freezing-throwing the cells 5 times. Comparing with HM-175 HAV strain under the same condition,  $S_{84-1}$  has a higher infective titre ( $TCID_{50}$ ,  $10^{-6.5-7}$ /ml) and HAAg titre (1:16, by ELISA). The typical HAV particles were shown in harvested cell suspension by immune electron microscopy,