

10株水痘带状疱疹病毒的分离鉴定与生物学特性

郑官增¹ 叶冬桂² 朱智勇³¹(浙江省台州市卫生防疫站, 浙江台州 317000)²(浙江省台州医院, 浙江台州 317000)³(浙江省卫生防疫站, 杭州 310009)R 373.12
K 372

摘要 用 Vero-E₆ 细胞从 12 例水痘及带状疱疹病人水疱液中分离到 10 株病毒, 分离阳性率为 83.3%。10 株病毒均具有使感染细胞圆缩、融合、脱落等典型的 VZV 局灶性细胞病变(CPE)特点, CPE 随着传代次数增加而加快。用带状疱疹恢复期病人血清作间接免疫荧光染色镜检, 可见典型的感染细胞核内荧光块。10 株病毒感染细胞制成的抗原片, 检测 5 例带状疱疹病人急性期及恢复期血清, 荧光抗体滴度均有 4 倍以上增高。VZV 对 Vero 细胞敏感; 对沙鼠肾, 胎兔肾, 胎豚鼠肾、肺、脾原代单层细胞不敏感; 对乳小白鼠不敏感。毒种在 -20℃ 保存一周内死亡; 但在 30% 脱脂牛奶、20% 小牛血清及 10% 山梨醇 Eagle's 液中, 液体或真空冷冻干燥 -100℃ 可保存二年以上。

关键词 水痘带状疱疹病毒, 分离, 鉴定, 生物学特性

水痘带状疱疹病毒(VZV)是引起人类水痘、带状疱疹的病原。为了寻找水痘带状疱疹疫苗病毒株及研制疫苗的基质细胞, 我们自 1994 年以来, 用 Vero-E₆ 细胞床边接种法, 从 2 例水痘和 10 例带状疱疹病人水疱液中分离到 10 株 VZV, 并对其生物学特性作了初步探索研究。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 标本 12 例标本均用无菌注射器吸取病人出疱后 2~10 d 的水疱液, 立即送病毒实验室接种。

1.2 细胞 Vero-E₆ 及 Vero 传代细胞由朱智勇教授提供; 2BS 和 HLF 二倍体细胞分别来自中国药品生物制品检定所和中科院上海细胞所, 本室传代保存; 沙鼠肾, 胎兔肾, 胎豚鼠肾、肺、脾原代细胞均本室自制。生长液为 10% 新生小牛血清 Eagle's 液。

1.3 病毒分离^[1] 生长成单层的 Vero-E₆ 细胞倒去生长液, 每 5 mL 小方瓶单层细胞接种标本 0.1~0.5 mL (视标本量而定), 36℃ 吸附 2 h 后, 倒去标本液, 用 Eagle's 液洗一次, 加 5 mL 维持液, 置 36℃ 温箱每日观察 CPE。每隔 2~3 d 换液一次, 7 d 后如无 CPE 出现则进行盲传, 盲传 3 次仍无 CPE 则视为分离阴性。

1.4 带状疱疹病人急性期及恢复期双份血清 急性期血清采自病人出疱第 1~2 天, 恢复期血清采自出疱后 10~14 d 皮损结痂大部分脱落的病人血清。

1.5 间接免疫荧光测定^[2] 出现 CPE 后的细胞, 用 0.02% EDTA+0.1% 胰酶消化液分散细胞, 取少量细胞悬液滴在玻片上干燥, 冷丙酮固定 10 min 后, 1:20 稀释带状疱疹恢复期病人血清 37℃ 结合 45 min, 洗涤, 吹干后加甘油封片, 用荧光显微镜观察细胞核内荧光染色情况。

1.6 CPE 观察 接种标本后, 每天观察对照细胞有无自然脱落等非特异性细胞死亡现象及 VZV 特异性

收稿日期: 1997-10-24, 修回日期: 1998-06-24

CPE。“+”示CPE在25%以下,“-”示CPE为25~50%，“卅”示CPE为50~75%。

1.7 VZV某些生物学特性的研究 VZV₁经Vero细胞连续3次带毒传代,CPE达“卅”。用超声波细胞粉碎器裂解感染细胞,500 r/min离心沉淀,上清液为毒种^[4]。

2 结果

2.1 病毒分离情况

用Vero-E₆细胞从12例水痘或带状疱疹病人疱液中分离到10株病毒,阳性率为83.3%。其中男6例,女4例,水痘病人1例,带状疱疹病人9例。病人年龄在5~72岁,平均31.2岁。标本采集时间在出疱后2~10 d,平均5.4 d。8份标本在接种细胞3~8 d(平均6 d)出现“+~卅”CPE。2份标本在细胞带毒传第二代后出现“+”CPE,结果见表1。

表1 标本来源及病毒分离情况
Table 1 Source of sample and isolation of virus

患者 Case	标本来源 Source of sample			临床诊断 Clinical diagnosis	CPE出现情况 Appearance of CPE		毒株编号 Strain No.
	性别 Sex	年龄(岁) Age(Years)	采样距出疱天数 Days from sampling to vesicle		原代细胞 Primary cells	次代细胞 Secondary cells	
洋·^	M	5	2	Varicella	卅		VZV ₁
胡·^	M	10	3	Herpes zoster	+		VZV ₂
何·^	F	22	10	Herpes zoster		+	VZV ₃
张·^	M	21	6	Herpes zoster	+		VZV ₄
张·^	F	23	4	Herpes zoster	卅		VZV ₅
尹·^	M	72	5	Herpes zoster		+	VZV ₆
孙·^	M	25	8	Herpes zoster	+		VZV ₇
陈·^	F	50	6	Herpes zoster	+		VZV ₈
陈·^	F	8	4	Herpes zoster	卅		VZV ₉
叶·^	M	66	6	Herpes zoster	+		VZV ₁₀

2.2 CPE特点

细胞开始表现为肿胀、圆缩、聚集,最后出现多个细胞融合、脱落,如图1、图2。

2.3 感染细胞间接免疫荧光染色特点

经间接免疫荧光染色镜检,可见感染细胞内典型的核内荧光块,充满整个细胞核,细胞浆内无任何荧光颗粒,如图3。

2.4 病人双份血清间接免疫荧光抗体滴度

将出现CPE“卅”的细胞制成抗原片,用5例带状疱疹病人恢复期及急性期双份血清作间接免疫荧光染色,结果恢复期病人抗体滴度均比急性期增高4倍以上,结果见表2。

2.5 VZV部分生物学特性的研究

2.5.1 VZV₁在传代细胞、二倍体细胞及原代细胞上适应情况 将VZV₁毒种接种于Vero-E₆,Vero传代细胞,2BS和HLF二倍体细胞,沙鼠肾原代细胞,胎兔肾原代细胞,胎豚鼠肾、肺、脾原代单层细胞。结果Vero及Vero-E₆传代细胞接种5~7 d后出现典型的VZV CPE;2BS、HLF及其它原代细胞经盲传三代未见CPE,括取细胞做荧光染色也未见阳性细胞。

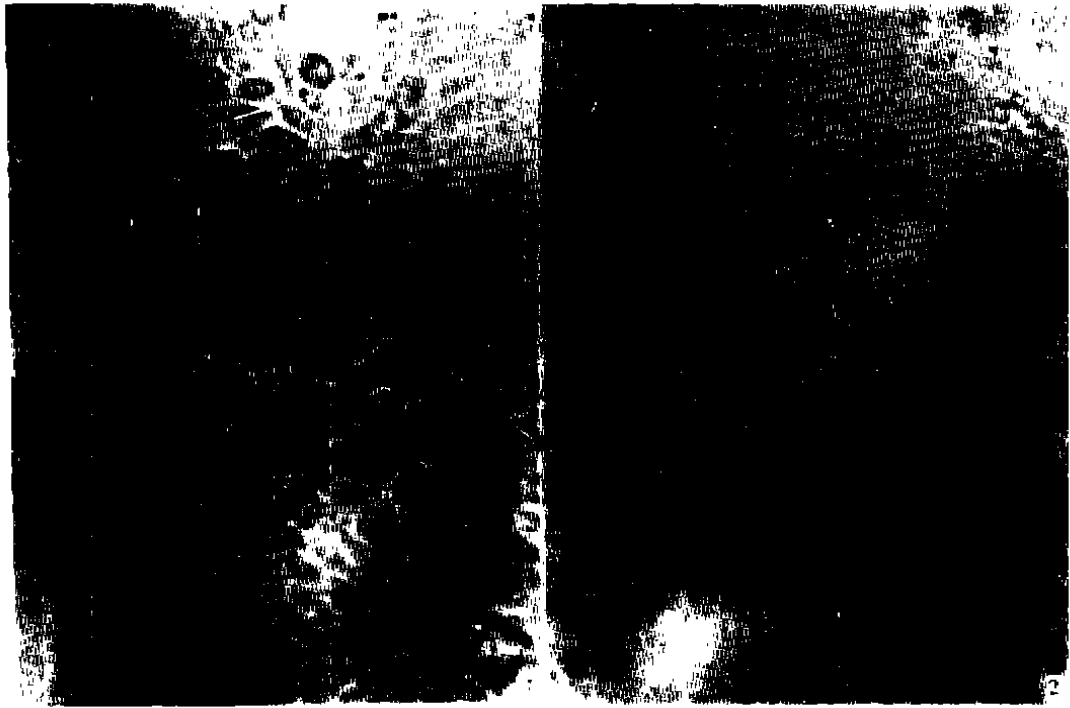


图 1 VZV 致 Vero-E₆ 细胞圆缩、融合、脱落病变(放大 400 倍)

Fig.1 VZV causes typical Vero-E₆ cell damages such as rounded and shrivelled, fusion and fallout ($\times 400$)

图 2 VZV 致 Vero-E₆ 细胞圆缩、融合病变(放大 100 倍)

Fig.2 VZV causes typical Vero-E₆ cell damages such as rounded and shrivelled as well as fusion ($\times 100$)

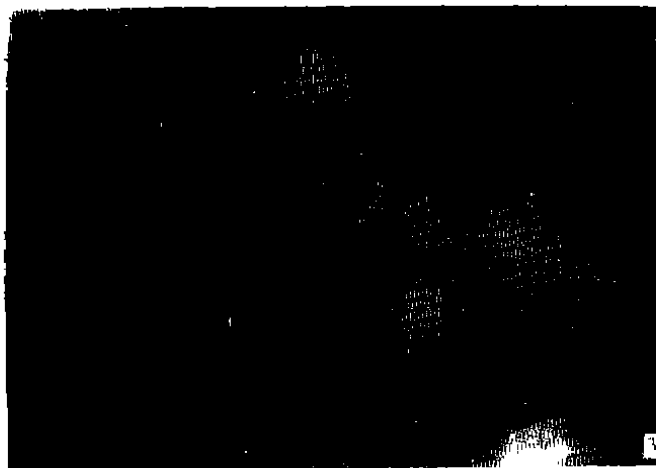


图 3 VZV 感染细胞核内荧光抗原

Fig.3 Antigen of fluorescence in VZV - infected cell nucleus

2.5.2 VZV₁ 在 Vero 细胞内生长后的 TCID₅₀ VZV₁ 在 Vero 细胞上传至 CPE 达“+”后,用 24 孔一次性使用塑料细胞培养板,每孔接种经不同处理后病毒液 0.1 mL,36℃ 烛缸法培养 14 d 观察 CPE 及荧光染色阳性细胞。结果感染细胞培养液或感染细胞与培养液经超声波击碎(8 min 后),经 8 000 r/min 离心 30 min,上清液 TCID₅₀ 均是 10⁻²;感染细胞与培养液经超声波击碎(8 min)但不离心,直接测 TCID₅₀ 是 10⁻³。

表 2 带状疱疹病人双份血清免疫荧光抗体滴度

Table 2 Titer of immunofluorescence antibody of sera of acute and recovering stage of patients with herpes zoster

毒株号 Strain No.	血清抗体滴度倒数 Reciprocal antibody titer of sera				
	1 号血清 Serum 1	2 号血清 Serum 2	3 号血清 Serum 3	4 号血清 Serum 4	5 号血清 Serum 5
	VZV ₁	<20 1280	80 1280	20 640	20 640
VZV ₂	<20 1280	20 320	20 320	80 1280	20 640
VZV ₃	<20 1280	80 1280	20 640	80 1280	<20 640
VZV ₄	<20 640	80 640	80 1280	20 640	20 1280
VZV ₅	<20 640	20 640	20 320	80 1280	<20 320
VZV ₆	<20 1280	20 1280	20 640	80 640	20 640
VZV ₇	<20 1280	80 640	20 1280	80 1280	20 640
VZV ₈	<20 1280	20 640	20 1280	80 640	<20 320
VZV ₉	<20 640	20 640	80 1280	20 640	20 1280
VZV ₁₀	<20 1280	80 1280	20 1280	20 640	20 640

*: 上排为急性期血清,下排为恢复期血清。

The above is acute stage sera, the underneath is recovering stage sera

2.5.3 VZV₁ 在 Vero 细胞上的生长特点

2.5.3.1 VZV₁ 毒种接种 Vero 单层细胞后,第 5 天开始出现 CPE“+”;带毒传代后,第 3 天为“++”,第 5 天为“+++”;CPE 随着传代次数增加而加快。

2.5.3.2 将盖玻片放入细胞瓶内,培养成单层细胞后,接种毒种,待出现典型的 CPE 后,取出盖玻片作荧光染色镜检,结果荧光阳性细胞仅出现在有 CPE 的细胞核内。

2.5.4 VZV₁ 在乳长爪沙鼠,乳小白鼠中适应情况 分别将 2 日龄乳长爪沙鼠(8 只),乳小白鼠(7 只),每只脑内接种毒种 0.02 mL,腹腔接种 0.5 mL,第 5 天开始逐日观察其发病情况,并每天取 1 只鼠脑、肺、脾、肾冰冻切片,间接免疫荧光法动态检查 VZV 抗原;结果试验组乳鼠均未发病,也未检测到阳性抗原。

2.5.5 VZV 细胞培养上清液病毒感染性测定 4 株 VZV 分别接种 Vero 细胞,待 CPE 达

“卅”后,取培养液 4 000 r/min 离心 10 min,吸上清液接种于 Vero-E₆ 单层细胞;逐日观察细胞病变持续 6 d,4 株病毒感染细胞均未出现 CPE,经带毒传代一次后,均出现“+~卅”CPE。

2.5.6 VZV 毒种保存 5 株毒种分别接种 Vero 细胞,CPE 达“卅”时倒去培养液,加入含 5% 蔗糖,10% 小牛血清,50% 甘油的 Eagle's 液,刮下细胞,-20℃ 保存一个月后 VZV 全部死亡。后改为 30% 脱脂牛奶,20% 小牛血清,10% 山梨醇 Eagle's 保存液,一部分作真空冷冻干燥-100℃ 保存;另一部分直接保存在-100℃ 低温冰箱内。上述两种保存方法,二年后 VZV 仍存活。

3 讨论

3.1 一些学者认为 VZV 最敏感的培养细胞是人胚肺纤维母细胞、羊膜细胞。本研究用 Vero-E₆ 细胞分离 VZV,病毒分离阳性率高达 83.3%。其原因可能与以下几个因素有关:一是 VZV 对 Vero-E₆ 细胞比其它细胞敏感;二是采用床边接种法,标本未经冷冻保存,病毒滴度高,感染力强。2 例标本未分离到病毒主要原因是所取水疱液量太少,且病人用过干扰素、病毒唑、阿昔洛韦等抗病毒药物。

3.2 本次分离到的 10 株病毒,8 株在标本接种后的第一代就出现典型的 VZV CPE,全部病毒株经 3 次细胞带毒传代后出现“卅”CPE。感染细胞制成抗原片,用 5 例带状疱疹病人双份血清检查,恢复期比急性期抗体滴度均有 4 倍以上增加。荧光染色可见感染细胞具典型的核内荧光抗原,细胞浆内无任何荧光颗粒。上述检测结果均符合 VZV 典型特征^[1-4]。结合临床诊断,我们认为本次分离到 10 株病毒确系水痘带状疱疹病毒。

3.3 VZV₁ 等毒株部分生物学特性研究结果有如下特点:

(1) VZV 对 Vero 及 Vero-E₆ 细胞高度敏感,是分离及研究 VZV 的首选细胞株。

(2) VZV 在 2BS 和 HLF 二倍体细胞上难以适应;VZV 对胎兔肾、乳长爪沙鼠肾,胎豚鼠肾、肺、脾原代细胞不敏感;VZV 对乳长爪沙鼠、乳小白鼠亦不敏感。

(3) 从 CPE 及盖玻片小培养荧光染色特点分析,VZV 产生明显的局灶性细胞病变;病毒在细胞核内增殖;细胞病变随着传代次数增加而加快。

(4) VZV 在 Vero 细胞内增殖后,病毒 TCID₅₀ 滴度是 10⁻²~10⁻³,明显低于流行性出血热、脊髓灰质炎等病毒^[6,7]。

(5) VZV 感染细胞上清液接种细胞,经盲传一代后,出现 CPE,说明病毒在细胞核内增殖的同时,有感染性病毒颗粒释放到液体中。

(6) VZV 病毒在含 30% 脱脂牛奶、20% 小牛血清、10% 山梨醇的 Eagle's 液体或经真空冷冻干燥后-100℃ 能保存二年以上。

参 考 文 献

- 1 黄桢祥主编 医学病毒学基础及实验技术 第 1 版 北京:科学技术出版社,1990.824~829
- 2 Williams V, Gershon A, Brunell P A *et al* Serologic response to varicella-zoster membrane antigens measured by indirect immunofluorescence. J Infect Dis, 1974, 130, 669~672

- 3 Asano Y, Itakura N, Hiroishi Y *et al*. Viral replication and immunologic responses in children naturally infected with varicella-zoster virus and in varicella vaccine recipients. *J Infect Dis*, 1985, 152(5): 863-868
- 4 Frey HM, Steinberg SP, Gershon AA *et al*. Rapid diagnosis of varicella-zoster virus infections by countercurrent immunoelectrophoresis. *J Infect Dis*, 1981, 143(2): 274-279
- 5 Asano Y, Albrecht P, Stagno S *et al*. Potentiation of neutralization of varicella-zoster virus by antibody to immunoglobulin. *J Infect Dis*, 1982, 146(4): 524-529
- 6 郑官增、何志胜、谢忠俭等. 家鼠型 EHFV 台₄₁株在沙鼠肾原代细胞上产生血凝素的研究. *中国卫生检验杂志*, 1993, 3(6): 350-352
- 7 郑官增、张宗祥. 麻疹及脊髓灰质炎疫苗质量纵向调查. *中国卫生检验杂志*, 1996, 6(5): 38-39

Isolation, Identification and Biological Properties of Ten-Strain Variella-Zoster Viruses

Zheng Guanzeng Ye Donggui Zhu Zhiyong

(Taizhou City Sanitary and Epidemic Prevention Station, Taizhou, Zhejiang Province 317000)

Abstract Ten strains of virus were isolated from vesicle fluid of skin lesions of 12 patients with varicella or herpes zoster by means of Vero-E₆ cells. The positive rate was 83.3%. These viruses all cause typical cell damages such as rounded and shrivelled, fusion and fallout. These damages got quick following increased future degenerations. The typical fluorescence lump of nucleus within the infected cells would be found by indirect immunofluorescence technique. The antigen samples prepared with virus-infected cells could be used to examine the sera of patients with herpes zoster and it could be found that the antibody titer in recovering stage was four times as much as that in acute stage. VZV was sensitive to Vero cells and not sensitive to the primary simple-lager cells from *Meriones unguiculatus* kidney, fetal rabbit kidney and fetal guinea pig kidney, lung and spleen. VZV was insensitive to newborn white mouse too. The viruses would die within one week at -20 °C, but they can be preserved in Eagle's solution containing de-fat milk, newborn bovine serum and sorbitol at -100 °C over two years.

Key words Variella-zoster viruses, Isolation, Identification, Biological property