

# 小鼠诱导转基因传代细胞对 AFP 粪便 标本中脊灰和其他肠道病毒的分离鉴别研究

## Sensitivity Comparison of L<sub>9</sub>, RD and Hep-2 Cells in Virus Isolation and Identification from Stool Specimens of AFP Cases

刘明团      王树声      朱田凤      谢振国  
Liu Mingtuan    Wang Shusheng    Zhu Tianfeng    Xie Zhenguo  
李秀芳      韦一知      杨春义      Akio Hagiwara\*  
Li Xiufang      Wei Yizhi      Yang Chunyi

(广西区卫生防疫站 南宁市桃园路 530021)

(Guangxi Health and Anti-epidemic Center, Taoyuanlu, Nanning, Guangxi, 530021)

**摘要** 报告 46 份 AFP 粪便标本用 L<sub>9</sub>, RD 和 Hep-2 三种细胞作病毒分离, 阳性率分别为 26.09%、60.87%、43.48%。同步分离出脊灰病毒 I 型 1 株, II 型 2 株, III 型 4 株, I + II 型 1 株, I + III 型 1 株, 混合 P2-E 1 株。脊灰病毒总分离阳性率为 28.93%。非脊灰肠道病毒分离阳性率分别为 0%、36.96%、23.91%。从 6 份第一次分离结果阴性的高危病例和高度临床病例粪便标本重新分离出 1 株 III 型脊灰病毒和 3 株非脊灰肠道病毒。应用 L<sub>9</sub> 细胞不仅能作型别鉴定, 而且能区别脊灰病毒和非脊灰肠道病毒混合感染。

**关键词** L<sub>9</sub> RD Hep-2 细胞 病毒分离鉴定

**Abstract** Viruses were isolated simultaneously from stool specimens of 46 AFP cases by L<sub>9</sub>, RD and Hep-2 Cells, with positive rate 26.09%, 60.87% and 43.48% respectively. A total of 3 strains of poliovirus I, 2 strains of poliovirus II, 4 strains of poliovirus III, 1 strain of poliovirus I + II, 1 strain of poliovirus I + III and 1 strain of poliovirus II + non-polio enterovirus were isolated from the specimens. The total isolation rate of poliovirus was 28.93% whereas the isolation rate of non-polio enterovirus was 0%, 36.96% and 23.91% respectively in the 3 kinds of cells. One strain of poliovirus III and 3 strains of non-polio enterovirus were re-isolated by 22nd generation RD and Hep-2 cells simultaneously from specimens of high risk cases or clinical cases which were negative in the first isolation by 212th generation Hep-2 or RD cells. The application of L<sub>9</sub> cell can not only identify the type of poliovirus, but also distinguish poliovirus infection from non-polio enterovirus infection.

**Key words** AFP, L<sub>9</sub> cell, RD cell, Hep-2 cell, enterovirus

中图法分类号 R373.2; R446.13

从事脊髓灰质炎 (简称脊灰) 病毒和肠道病毒研究人员都知道 RD 细胞 (来源于人横纹肌瘤细胞) 和 Hep-2 细胞 (来源于人表皮样癌细胞) 支持脊灰病毒和其他肠道病毒生长, 尤其 RD 细胞对肠道病毒更敏感。WHO 推荐 AFP 粪便标本病毒分离, 区分脊灰病

毒和非脊灰肠道病毒感染鉴定采用 RD 和 Hep-2 两种细胞。但我们实践工作中发现 ECHO 病毒组个别型病毒能在这两种细胞上产生明显的细胞病变 (CPE), 这给区别脊灰病毒和非脊灰肠道病毒带来一些困难。另一方面非脊灰肠道病毒占优势情况下, 混合物中低滴度的脊灰病毒有时被漏检。当前, 我国已进入消灭脊髓灰质炎最后阶段和消除脊灰野病毒在环境和人群中存在和传播, 加强脊灰监测工作, 特别

1997-01-15 收稿

\* 日本东京国立预防医学卫生研究院

是病原学监测极为重要。目前我们脊灰实验室工作不仅要提高急性弛缓性麻痹 (AFP) 粪便标本中病毒分离阳性率,而且更不能漏检一株脊灰病毒。1996年5月作者从日本 NIH引进一株 L<sub>8</sub> 细胞(来源于小鼠转基因传代细胞),该细胞仅限于脊灰病毒生长,对非脊灰肠道病毒不敏感和两株低代 RD Hep-2细胞系,有效地提高了 AFP粪便标本的病毒分离阳性率和满意地鉴别出脊灰病毒和非脊灰肠道病毒,现报告如下:

## 1 材料与方法

### 1.1 标本

AFP大便标本由广西各地市县卫生防疫站采集,在带冰条件下送省站实验室。

### 1.2 分离和鉴别细胞培养

RD细胞(2代)、Hep-2(23代)和 L<sub>8</sub>(22代)细胞,均从日本 NIH引进

### 1.3 方法

基本按照 WHO《脊髓灰质炎病毒检验手册》方法进行病毒分离(在2孔聚乙烯塑料板进行)和血清中和试验鉴定<sup>[1]</sup>。

### 1.4 脊灰病毒滴定

取细胞培养病毒液,用2%牛血清 MEM 维持液作递度稀释从 10<sup>-1</sup>~ 10<sup>-9</sup>,每一稀释度 4 孔,每孔 50 μL,观察细胞病变,按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>

### 1.5 细胞培养液

RD和 Hep-2细胞培养液用 MEM (日本产品), L<sub>8</sub> 细胞培养需特殊 DMEM 培养液,培养粉(日本产品)。使用液中按 1%加 HAT (Hypoxanthine, aminopterin, thymidine) 分别由 JICA (日本国际协

表 1 三种传代细胞的病毒分离鉴定结果

Table 1 Isolation and identification result of virus with three cells

细胞种类 Cell	检测标本数 Specimen number	阳性数 Positive number	阳性率 Positive rate (%)	非脊灰肠道病毒 Nonpoliovirus						
				I	II	III	I + II	I + III	P <sub>2+</sub> E	
L <sub>8</sub>	46	12	26.09	3	2	4	1	1	1	0
RD	46	28	60.87	3	2	4	1	1	1	17
Hep-2	46	20	43.48	3	2	4	1	1	1	11

表 2 三种传代细胞对脊灰病毒的敏感性滴定

Table 2 Sensitive titration of poliovirus in three cells

检测份数 Number of specimen	型别 Type of poliovirus	细胞出现完全病变天数 Days of cytopathic effect entirely (1 d~ 6 d)					
		L <sub>8</sub>		RD		Hep-2	
		CPE	TCID <sub>50</sub>	CPE	TCID <sub>50</sub>	CPE	TCID <sub>50</sub>
7	P1	++++	7.0	++++	7.0	++++	7.0
4	P2	++++	7.0	++++	7.25	++++	7.0
4	P3	++++	7.0	++++	8.0	++++	6.5

办事业团)和日本 NIH赠送,配制按常规方法。

## 2 结果

### 2.1 L<sub>8</sub>和 RD Hep-2三种细胞对 AFP病例粪便标本作病毒分离

46例 AFP粪便标本在 L<sub>8</sub> RD和 Hep-2三种细胞分离出肠道病毒阳性率分别为 23.91% (11/46)、60.87% (28/46)和 43.48% (20/46),三种细胞同步分离出脊灰病毒 I 型 1 株, II 型 2 株, III 型 4 株, I + II 型 1 株, I + III 型 1 株,混合型 P<sub>2+</sub> E 1 株。脊灰病毒总分离阳性率为 28.95% (11/38) (包括 1 株混合肠道病毒 P<sub>2+</sub> 非脊灰肠道病毒,简称 E),三种细胞对脊灰病毒分离阳性结果基本一致。非脊灰肠道病毒分离阳性率分别为 0% (0/46)、36.96% (17/46)、23.91% (11/46),结果表明,它们在分离非脊灰肠道病毒 (NPEN) 三者差异非常显著,见表 1

### 2.2 三种培养细胞对脊灰病毒敏感性测定

将 15 份脊灰病毒分离物同步分别接种到 L<sub>8</sub> RD 及 Hep-2 单层细胞,每天观察细胞病变发展及病毒繁殖滴定情况,结果见表 2

可见三种细胞 L<sub>8</sub> RD Hep-2 对 3 个型脊灰病毒均敏感,病毒滴度可达 (log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>) 6.5~ 8.0,且各型在三种细胞上均可产生明显的 CPE RD 和 Hep-2 病变出现最早,接种标本后 1 d~ 2 d 可产生 + ~ + + + +,而 L<sub>8</sub> 细胞病变出现较迟,接种后 1 d~ 3 d 才出现。有些分离物低含量脊灰病毒需要培养到第 5 d 才出现完全 CPE 结果揭示 L<sub>8</sub> 细胞虽也可用于病毒分离,但最好用作脊灰病毒和非脊灰肠道病毒的重复分离的鉴定。

表3 AFP临床病例及高危病例粪便液重复分离结果

Table 3 Re-isolated result from stool specimen cases of AFP and high risk

患者 Case	免疫次数 Inoculated number	最后一次 接种日期 Date of last OPV	麻痹日期 Date of onset paral	采便日期 Date of collection stool	结果 Results	
					第一次分离 First isolation	第二次分离 Second isolation
王×× Wang××	不详 Unknown	不详 Unknown	1996-01-09	1996-01-20	-	非脊灰肠道病毒 Nonpoliovirus
黄×× Wang××	0	0	1996-05-03	1996-05-07	-	非脊灰肠道病毒 Nonpoliovirus
杨×× Yang××	0	0	1996-04-05	1996-05-09	-	-
赵×× Zhao××	0	0	1996-05-31	1996-06-04	-	非脊灰肠道病毒 Nonpoliovirus
韦×× We××	1	1993-12-05	1996-04-24	1996-04-26	-	-
雷×× Le××	1	1996-01-05	1996-04-14	1996-04-25	-	脊灰III型病毒 Nonpoliovirus

### 2.3 AFP临床病例及高危病例粪便标本结果分析

对60d随访仍残麻的AFP临床病例和高危病例初次分离(初次分离用196代RD和256代Hep-2细胞)病毒阴性的粪便(份重新制成悬液,分别接种RD和Hep-2细胞。培养结果(份标本中重新分离出1株脊灰III型病毒和1株非脊灰肠道病毒。见表3)

结果表明对第一次分离阴性高危病例和临床病例粪便标本,重新制备粪便悬液,更换低代RD、HEP-2细胞再次作病毒分离,它将有效地提高病毒分离阳性率,是防止遗漏脊灰病毒分离的一种补救措施。

### 3 讨论

1996年5月底以前,广西AFP病毒分离平均阳性率为7%~10%。究其原因,用单一的高代数(196-256)的Hep-2或RD细胞,敏感性低;二是粪便标本的数量和质量及运送条件均不够规范,制备粪便悬液的便量不够,影响了病毒分离阳性率。1996年5月作者从日本NIH引进低代RD及Hep-2细胞,改用2孔板培养RD和Hep-2细胞进行病毒分离,病毒分离阳性率升至30%~60.86%之间,比以往高2~3倍。从本文研究比较,这三种细胞分离脊灰病毒的阳性率无明显差别,但是在分离非脊灰肠道病毒RD优于Hep-2细胞,前者阳性率为43.48%,后者为23.9%,L<sub>9</sub>细胞对非脊灰肠道病毒不敏感。柯萨奇病毒(COX病毒),ECHO病毒都是人源病毒,暂栖于人消化道<sup>[2]</sup>。Hep-2细胞对柯萨奇病毒B组尤其敏感,而RD细胞则对ECHO病毒较敏感,两种细胞同时进行分离,可以互补,提高脊灰病毒和非脊灰肠道病毒分离阳性率。目前多数脊灰病毒实验室人员,鉴别脊灰病毒和ECHO病毒,或COX病毒感染是根据这两种病毒在

RD或Hep-2细胞上生长繁殖程度来判断。这种方式区别肠道病毒似乎不太客观。作者在日本NIH肠道病毒室研修和广西区防疫站脊灰实验室进行肠道病毒分离观察到COXB组病毒不能在Hep-2细胞生长,但ECHO病毒组中某些型别如ECHO7,13不仅在RD细胞生长,而且在Hep-2细胞也同样产生完全CPE,这就难于加以区分。因此,建议鉴定分离物除了用RD和Hep-2细胞外,可采用L<sub>9</sub>细胞来鉴定。方法是将0.1mL阳性分离物接种于L<sub>9</sub>单层细胞,观察7d,无细胞病变者为非脊灰肠道病毒感染。产生CPE,收集细胞病变培养液,在L<sub>9</sub>细胞作型别鉴定,结果清晰。该法的主要优点有:(1)解决AFP分离物混合肠道病毒感染中低含量脊灰病毒,因高滴度非脊灰肠道病毒干扰和防止脊灰病毒漏检等问题。(2)减少分离物型别鉴定重复性和提高结果报告及时率。(3)三种细胞应用不仅提高病毒分离阳性率,而且能区别脊灰病毒和非脊灰肠道病毒混合感染。

对临床诊断为脊灰病例,小年龄组未全程服苗的高危病例,如第一次粪便标本分离阴性者,应采用RD、Hep-2低代细胞重复分离一次,以提高病毒分离阳性率,防止脊灰病毒的漏检。

据了解目前越南北方分离出I型脊灰野病毒。广西与越南北方有着1535公里边境线,因此,建立敏感的检测系统,提高病毒分离阳性率,是目前脊灰实验室当务之急,这对于搜索环境中脊灰病毒,阻断输入和境内脊灰野病毒传播,最终实现消灭脊髓灰质炎都具有重要作用。

### 参考文献

- 1 WHO扩大免疫规划和传染性疾病预防部等. 脊髓灰质炎病毒检验手册. 1992.
- 2 顾方舟主编. 脊髓灰质炎. 上海: 上海科技出版社, 1984.

(责任编辑: 蒋汉明)