

亚洲甲型流行性感冒病毒的生物学性状研究

IV. 动物感染实验

任貴方 王植嵩 朱旣明*

(中国医学科学院病毒学系, 北京)

已有的文献报告^[1,2]证明雪貂是一种对流感病毒敏感的动物,但此种动物大量繁殖饲养比较困难。多数流感病毒株在小白鼠中连续传代可获得适应^[2],到目前为止,它是唯一的能较广泛应用于流感病毒研究的动物,但适应毒株在小鼠中引起的疾病是病毒性肺炎,与人的流感在各方面都不相同。为此寻求新的对流感病毒敏感的实验动物是迫切需要的。故我们试验了8种实验室常用动物对新分离的亚洲甲型流感病毒的敏感性,除了观察这些动物在感染后的临床症状和抗体产生情况外,并用其鼻洗液或肺组织作病毒分离试验。本文即报告这些试验的结果。

一、材料与方 法

病毒 亚洲甲型 I 相长 57-4 株鸡胚 6 代尿液病毒(以下简称长 57-4 E₆);亚洲甲型 II 相长生 57-2 株鸡胚 6 代尿液病毒(以下简称长生 57-2 E₆)及 20 代尿液病毒(以下简称长生 57-2 E₂₀**)。上述各株病毒均用前一代病毒毒种在使用前通过鸡胚获得新鲜尿液病毒,并滴定其血凝滴度。

动物及感染方法 使用的动物有小狗、小猫、棉鼠、田鼠、乳大白鼠、乳小白鼠、乳豚鼠及乳兔。感染前先用乙醚轻度麻醉,然后经鼻滴入病毒材料:小狗感染量为 0.8—1 毫升;小猫为 0.4 毫升;棉鼠、田鼠、乳大白鼠、乳豚鼠及乳兔均用 0.3 毫升;乳小白鼠为 0.03 毫升。

观察指征 1. 测量体温:小狗及小猫于感染前 1 天测体温 2 次,感染前 30 分钟再测体温 1 次,在感染后 1—2 周内每日测体温 2—4 次。其他动物未测。

2. 观察症状:感染后 2 周内每日密切观察有无症状。

3. 分离病毒:感染后每日、间日或是在第 3 日采取鼻拭子或鼻洗液,小动物则杀死取鼻甲、气管或肺脏研磨,制成悬液接种 10 日龄鸡胚尿囊分离病毒。

4. 病理检查:定期杀死受染的部分动物,检查肺部病变。个别作病理切片镜检。

5. 血清学检查:狗、猫等动物于感染前及感染后 14 日从心脏取血分离血清作血凝抑制抗体检查。小动物则取多份血混合后分离血清作血凝抑制抗体检查。

6. 相变的测定:利用正常马血清抑制 I 相、不抑制 II 相病毒血凝的作用,检查通过动物后再分离的病毒的相别。

* 长春生物制品研究所。

** 本实验中所使用的长生 57-2 株系由长春生物制品研究所赠与。

本文 1962 年 11 月 13 日收到。

二、實驗結果

1. 實驗感染小狗 用亞洲甲型 I、II 相流感病毒共感染 3 批小狗。結果見表 1。由本

表 1 亞洲甲型流感病毒感染小狗的實驗結果

實驗批號	病毒材料	受 染 小 狗			鼻拭子雞胚病毒 分離*			臨床或病理解剖所見	恢復期 血清抗 體檢查
		編號	日齡	體 溫	1 日	2 日	3 日		
1	亞洲甲型, I 相, 張 57-4 E ₀ , 血凝滴度 1:160	1	57 日	未升高	0/5	0/5	—	17 日殺死, 兩肺未發現病損	<1:10
		2	”	”	0/5	0/5	—	17 日殺死, 一側肺有可疑病損	<1:10
		3	”	”	3/5	3/5	—	17 日殺死, 右側邊肺門部有大塊充血實化病變	1:10
		4	”	”	1/5	0/5	—	17 日殺死, 兩肺均有大塊充血實化病變	未測
2	同 上	57	85 日	未升高	0/5	0/5	0/5	7 日殺死, 兩肺各葉廣泛充血, 散在淤血點。鏡檢: 灶性間質性肺炎, 肺水腫。肺分離病毒陰性	未測
		59	”	”	1/5	0/5	0/5		<1:10
		60	”	”	0/5	0/5	0/5		未測
3	亞洲甲型, II 相, 長生 57-2 E ₀ , 血凝滴度 1:240	54	45 日	24 小時升高 1.2°C	6/6	5/6	1/6	感染後 24—48 小時, 小狗有倦怠懶動、爬伏休息、輕度鼻卡他症狀, 48 小時後即恢復常態	1:80
		55	”	升高 1°C	0/6	0/6	0/6		1:10
		56	”	升高 0.9°C	5/6	0/6	0/6		1:80

* 分子代表病毒分離陽性的雞胚數, 分母代表病毒分離接種的雞胚數; “—” 表示未作。

表 2 亞洲甲型流感病毒感染小猫的實驗結果

實驗批號	病毒材料	受染小猫		鼻洗液雞胚分離病毒						屍 體 解 剖		恢復期血清凝抑制 抗體檢查
		編號	年齡	2 日	3 日	4 日	6 日	8 日	9 日	病 理 所 見	病毒分離	
1	張 57-4 E ₀ , I 相, 血凝滴度 1:80	5	成年	4/5		0/5	0/5	0/5		于 8 日殺死, 兩肺近肺門部充血	鼻甲與肺分離病毒均陽性	1:40
		6	45 日	5/5		5/6	4/5	0/5	0/5			1:80
		7	45 日	死								
	長生 57-2 E ₀ , II 相, 血凝滴度 1:480	1	45 日	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	(第 12 日死亡)		1:40
		2	”	5/5	5/5	5/5	1/5	2/5				<1:10
		3	”	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5			
2	長生 57-2 E ₀ , 血凝滴度 1:320	8	40 日	3/5		3/5	4/5	1/7		14 日殺死, 右肺下葉有輕度出血病變		1:160
		9	”	3/5		4/5	6/7	1/7	1/6*			1:160
		10	”	5/5		5/5	6/8	3/7				1:160
	長生 57-2 E ₂₀ , 血凝滴度 1:1280	11	”	2/5		6/6	6/7	0/7		14 日殺死, 兩肺中下葉均有中等度出血病變		1:20
		12	60 日	5/5		5/5	5/5	0/5				1:80
		13	”	2/5		2/5	4/5	0/5				1:160
3	長生 57-2 F ₀ , 血凝滴度 1:32	14	”	5/5		4/5	5/5	0/5				1:80
		15	”	5/5		1/5	5/5	0/5				1:160
		16	”	5/5		1/4	0/5	0/5				1:20
	長生 57-2 E ₂₀ , 血凝滴度 1:32	17	”	5/5		2/5	4/5	0/5				1:10
		18	”	5/5		4/4	1/5	0/5				1:10
		19	”	5/5		4/4	1/5	0/5				1:20

* 第 10 天病毒仍為陽性。

表可見从小狗中病毒分离結果多数为阴性,其分离阳性者亦仅限于接种后 1—2 天。幼齡小狗似乎較为易感,其中 1 批 45 日齡的小狗在感染病毒后出現一时性的体温升高,短時間的輕度上呼吸道及全身症状,恢复期血清伴有血凝抑制抗体的升高。在年齡稍大的小狗則未見有症状。多数无抗体反应。一般上呼吸道带毒時間均短。7 只小狗于接种后 7—17 日杀死 5 只,其中 3 只肺部有充血实化病变,病理切片检查 57 号小狗发现有灶性間質性肺炎。

2. 实验感染小猫 用不同代数、不同浓度的亚洲甲型 I、II 相流感病毒,感染 3 批小猫,結果見表 2。实验結果指出, I、II 相鸡胚 6 代的病毒均可引起小猫无症状的感染,上呼吸道携带病毒长达 6—8 日,并引起抗体反应。在少数解剖的动物中发现实验感染可引起小猫肺脏的輕度充血及出血性病变,病毒可以从鼻甲、肺脏中分离出。

用不同代数的 II 相病毒感染小猫,发现用鸡胚 6 代病毒感染 2 只小猫中的一只携带病毒的时间竟长达 10 日,其余一只于第 12 日可能由于非特异性原因而死亡。用鸡胚 20 代病毒感染的 2 只小猫携带病毒的时间为 6—8 日。

在使用两种不同代数的、稀释后使其血凝滴度均为 1:32 的 II 相病毒感染小猫的实验中,接种后第 6 日 E_{20} 病毒在小猫上呼吸道繁殖的量較 E_6 病毒为低。从血清检查的結果可以看出,传 20 代的病毒感染后的抗体反应也显著低。

3. 实验感染棉鼠 用亚洲甲型 I、II 相病毒,均为鸡胚 6 代,分 3 批共感染 10 只成年棉鼠。病毒可以在棉鼠上呼吸道及肺脏存活至少 3 日,并引起多数动物肺脏充血病变。值得注意的是 II 相病毒通过棉鼠再經鸡胚分离后,6 次中有 2 次轉变为 I 相(見表 3)。

表 3 亚洲甲型流感病毒感染棉鼠的实验結果

实验批号	病毒材料	受染棉鼠 (编号)	鸡胚分离病毒*			病 理 解 剖
			鼻甲、气管	肺	相别	
1	长生 57-2 E_6 , II 相, 血凝滴度 1:480	1		5/5	II	48 小时死亡,肺呈槟榔样淤血
		2				32 小时死亡
		3		3/5	II	36 小时死亡,全肺充血
2	长生 57-2 E_6 , II 相, 血凝滴度 1:160	4	2/5		I	
		5	3/5		II	
		6	5/5		II	
		7	1/5		I	
3	张 57-4 E_6 , I 相, 血凝滴度 1:160	8		3/6		3 日杀死,两肺高度淤血
		9		0/6		5 日杀死,两肺近肺門部輕度充血
		10				观察 14 日,无症状,未死亡

* 分子代表病毒分离阳性的鸡胚数,分母代表病毒分离接种的鸡胚数。

4. 实验感染田鼠、乳大白鼠及乳小白鼠 用 II 相病毒分 2 批共感染田鼠 15 只,发现病毒可在田鼠上呼吸道繁殖,带毒時間至少可达 5 日,并可引起抗体反应。同样值得注意的是 II 相病毒通过田鼠再經鸡胚分离后 5 次中有 2 次变为 I 相(見表 4)。

II 相病毒感染乳大白鼠、乳小白鼠,第 3 日均可自呼吸道器官分离到病毒,未見引起相变,但可引起动物肺脏的充血、出血及实变。

表 4 亞洲甲型流感病毒感染 3 种啮齒動物的實驗結果

實驗 批號	病毒材料	受染動物			雞胚分離 病毒	分離 病毒的 相別	病 理 解 剖	血清中血凝抑制抗 體檢查
		種類	編號	年齡				
1	長生 57-2E ₆ , II 相, 血凝滴度 1:160	田鼠	1	成年	5/5	II		
			2	”	4/5	I		
			3	”	4/5	II		
			4	”	5/5	II		
			5	”	4/5	II		
			6—12	”				
2	長生 57-2E ₆ , II 相, 血凝滴度 1:160		1—3	”	(死亡)		14 日殺死, 兩肺均有輕 度出血性病變	于 14 日殺死, 取血混 合測定抗體為 1:160
			4	”	(死亡) 4/5*			
			5	”	3/5*			
			6	”	1/5*			
			7	”	4/5*			
			8	”				
			9	”				
			10	”				
	長生 57-2E ₆ , II 相, 血凝滴度 1:240	大白鼠	1	離乳	5/6	II	14 日殺死, 兩肺均有出 血性病變	
			2	”	6/6	II		
			3	”	5/6	II		
			4	”	4/6	II		
			5—10	”				
	長生 57-2E ₆ , II 相, 血凝滴度 1:240	小白鼠	1 窩	8 日	6/6	II	第 3 日死亡的小白鼠, 肺有充血及實變	
			2 窩	”	6/6	II		
			3 窩	”	6/6	II		
			4 窩	”	6/6	II		

* 田鼠 4 號為第 4 日分離結果, 5—7 號為第 5 日分離結果, 其餘均為第 3 日分離結果。

5. 實驗感染乳豚鼠及乳兔 用 II 相病毒滴鼻感染 200 克體重剛離乳的豚鼠, 兩批共 14 只。感染後第 3 日 6/14 可以用鼻洗液分離到病毒。感染後 14 日殺死 7 只, 均有肺脏充血或實變, 血清中亦出現 1:160 的血凝抑制抗體。

以同法感染 500—1000 克體重剛斷乳的家兔, 兩批共計 11 只。其中 4 只于第 3 日采取鼻洗液經雞胚分離病毒均陰性。另 7 只于第 14 日殺死, 均未見肺脏有明顯病變, 血清檢查發現血凝抑制抗體只有 1:10—1:20。

三、討 論

亞洲甲型流感病毒實驗感染 8 種動物, 其中年齡 45 日的小狗受染後出現發熱、輕度卡他及全身倦怠症狀, 但从鼻部分離病毒的陽性率很低, 分離時間也很短。如果使用不離乳的小狗進行試驗, 可能有更明顯的反應。Адо^[3] 的報告也認為小狗可以包括在對流感病毒敏感的动物範圍之內。

病毒感染小貓、棉鼠、田鼠、乳豚鼠、乳兔、乳大白鼠、乳小白鼠等動物後, 其中除去乳兔不敏感外, 其餘 6 種動物對流感病毒均可產生無症狀感染。病毒在上述 6 種實驗動物

的呼吸道器官可以繁殖,其中小猫最长可带毒 10 天,一般亦可带毒 6—8 天。如果应用病毒分离作为指标,则这几种动物均可作为流感感染的实验模型,用传代适应的方法估计有可能获得产生临床症状的适应株。有趣的是 II 相病毒通过棉鼠和田鼠后,部分毒株变为 I 相。这一变异是在个别机体中发生的,未表现出一定的规律,值得进一步研究。

在实验中并发现 II 相流感病毒在鸡胚中传 20 代后(对人已失去致病性,在上呼吸道不繁殖,也不引起抗体反应^[4]),其在小猫上呼吸道中繁殖存活的能力及其免疫力似有减弱的趋向,是否可以利用小猫来研究病毒对人体的毒力变异,是个值得进一步探讨的问题。

四、結 語

实验中发现幼年小狗感染亚洲甲型流感病毒后有轻微发热及上呼吸道炎症,小猫、棉鼠、田鼠、乳豚鼠、乳大白鼠与乳小白鼠均呈无症状感染,病毒在上呼吸道繁殖并出现抗体反应。病毒在小猫上呼吸道中繁殖可存在长达 6—8 天之久。对利用这一结果进行流感实验研究的可能性作了简短的讨论。

后记 在本文报告的工作以后,本组焦永真同志在进行动物感染的工作中,发现将亚洲甲型 I 相病毒京科 59-7 株鼻腔感染 1—2 月龄的小狗后,病毒能在小狗上呼吸道生存长达 5 天。

参 考 文 献

- [1] Smith, W., Andrews, C. H., Laidlaw, P. P.: *Lancet*, 11: 66, 1933.
- [2] Francis, T., *Science*, 80: 457, 1934.
- [3] Адо, А. Д., Титова, С. М.: *Вопросы Вирусол.*, (2): 165, 1959.
- [4] 郝成章、梁荣根、岩波、朱既明: 全国急性传染病学术会议资料选编, 中册, 第 311 页, 1959.

STUDIES ON THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE ASIAN A TYPE INFLUENZA VIRUS

IV. EXPERIMENTAL INFECTION IN ANIMALS

JEN KUEI-FANG, WANG CHIH-LUN AND CHU CHI-MING

(Laboratory of Influenza, Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

Results of intranasal instillation of the Asian A type influenza virus to various animals showed that young puppies developed mild fever and upper respiratory inflammatory signs, while young cats, cotton-rats, Chinese hamsters, suckling guinea pigs, suckling white rats and suckling mice manifested as inapparent infection which was demonstrated by survival of the virus in the upper respiratory tract of these animals for several days and the production of antibody. The possibility of application of these animals to experimental studies of influenza virus was briefly discussed.