

亚洲甲型流感病毒的相的研究

II. 敏感相与不敏感相病毒的某些生物学性状的比较

王植伦 薛凤举

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

前文已经报道^[1], 亚洲甲型流感病毒的敏感相与不敏感相病毒对非特异性抑制素的敏感性是不同的。毒株的此种特性, 在一定的条件下可以发生变化。为了有助于进一步了解亚洲甲型流感病毒的相的问题, 在研究相的变异的同时, 我们对敏感相与不敏感相病毒的抗原结构、吸附红血球后游离的能力及其对热的稳定性、血球凝集范围、乙醚处理的影响等性状进行了比较研究, 其中对某些性状还结合相的变异进行了比较, 现将结果报告如下:

一、材料与方 法

病毒 在实验中所使用的毒株是自 1957—1962 年间在我国各地分离的亚洲甲型病毒, 除文内另加注明者外, 均是按标准传代法接种鸡胚尿囊液后收获的尿囊液病毒。

免疫血清 (1) 鸡免疫血清: 用亚洲甲型流感病毒京防 61-6 株 (敏感相) 及通过马血清作用后所获得的变异株京防 61-6 HS (不敏感相)^[1] 免疫鸡而得, 对本株病毒的血球凝集抑制滴度分别为 1:5120 及 1:7680。(2) 大白鼠免疫血清: 以鼻腔滴入及腹腔注射病毒两种免疫方法制备。用鼻腔免疫动物时, 以乙醚轻度麻醉, 每次滴入病毒 0.5 毫升。腹腔免疫时注射量为 1.5 毫升。每组动物共免疫 3 次, 每次间隔一星期, 末次免疫后半个月从心脏抽取血液分离血清测定血凝抑制效价。

鸡血球、牛血球及小白鼠血球悬液 制备方法详见前文^[1]。

病毒的吸附与游离 先用生理盐水把比较试验的鸡胚尿囊液病毒调节至大致相等的血凝滴度, 然后分别加入密集鸡血球使其最终浓度为 2%, 置 4℃ 吸附 30 分钟, 离心沉淀后吸出上清液置 4℃ 保存, 以便与其它标本同时滴定血凝效价。病毒血球沉淀物以冷生理盐水洗 1 次后, 加入与原病毒液量相等的预先加温至 37℃ 的生理盐水, 摇匀后置 37℃, 按 10 分、30 分、1、2、4 小时的间隔时间分别取出标本离心沉淀, 吸取上清液滴定血凝效价以测知病毒量。以原血凝滴度减去吸附后遗留在上清液中的病毒血凝滴度, 作为已被吸附在红血球上的病毒量, 按不同间隔时间游离至上清液的病毒血凝滴度与被吸附病毒量之比所求得的百分数, 表示吸附后游离的病毒量。

乙醚处理病毒 以 1/2 体积量的乙醚与鸡胚尿囊液病毒混合, 用力摇匀 2 小时, 经离心沉淀 10 分钟吸去上清乙醚层后, 于室温下曝露约 1 小时, 以便蒸发残存的乙醚。

血球凝集及血球凝集抑制试验 同前文^[1]。

二、实验结果

1. 抗原结构的分析

将京科 58—24 株 (内含敏感相及不敏感相病毒颗粒, 表现为敏感相), 与用终末稀释

传代法由其中分离出来的純敏感相病毒，和用馬血清中和后分离的純不敏感相病毒及其相应大白鼠免疫血清进行交互血球凝集抑制試驗，結果見表1。敏感相病毒与其母株的抗原結構完全一致，而不敏感相病毒，看来与其母株的抗原結構有所差別。

表 1 敏感相、不敏感相病毒与其母株間的抗原关系

免 疫 血 清 [△] 病 毒*	京 科 58-24		京 科 58-24HS		京 科 58-24LD	
	鼻腔免疫	腹腔免疫	鼻腔免疫	腹腔免疫	鼻腔免疫	腹腔免疫
京 科 58-24	160 ⁺	200	80	80	160	320
京 科 58-24HS	<10	<10	15	50	<10	<10
京 科 58-24LD	320	320	80	120	240	560

* 京科 58-24 基本上表现为敏感相，但內含不敏感相病毒顆粒。京科 58-24 HS 为經馬血清中和后所获得的純不敏感相病毒。京科 58-24 LD 是采用終末稀释传代法从京科 58-24 分离出的純敏感相病毒。

“△” 大白鼠免疫血清。
“+” 血清稀释度的倒数。

为了进一步澄清亚洲甲型流感病毒的相的变异与抗原結構的改变有无直接联系，我們把京防 61-6 (敏感相株) 及其通过馬血清作用后所获得的变异株京防 61-6 HS E 10 (不敏感相株)，分别与其相应的鸡免疫血清进行交互血凝抑制試驗，結果見表 2。由表 2 看来，京防 61-6 与其变异株之間在抗原結構上无可察見的差別。

2. 吸附紅血球后的游离能力及其对热的稳定性

童葵塘等^[2]，James 和 Fiset^[3] 曾报告对抑制素不敏感的亚洲甲型毒株比敏感株較迅速地从紅血球游离，Takátsy 等^[4]和 Choppin 等^[5]亦报道亲和相亚洲甲型病毒在 37℃ 从紅血球游离的速度較非亲和相毒株为慢。我們以 3 株对抑制素敏感程度不一的亚洲甲型病毒进行吸附鸡血球后的游离試驗。桂防 62-11 E₁₂ 是高度敏感相病毒，桂防 62-11 E₉ HS₃ E₅ 是桂防 62-11 經過馬血清中和作用 3 次所获得的、对抑制素敏感性較差的、处于中間过渡状态的病毒^[1]，京防 61-6 E₉ HS₃ E₁ HS₁ E₆ 是从高度敏感相病毒京防 61-6 E₉ 經過馬血清中和后所获得的純不敏感相病毒^[1]。这 3 株病毒的游离能力如图 1 所示。由图 1 可見，不敏感相病毒的游离速度最高，敏感相病毒表現最差，中間状态的病毒則居其中。

在另一次試驗中，同样見到敏感相病毒从血球上游离能力弱，表現游离緩慢且不完全，不敏感相病毒的游离速度快，且游离得較完全。敏感相病毒的游离能力較不耐热，經 56℃ 加温 15 分鐘就有非常明显的破坏現象，不敏感相病毒的游离能力較稳定，虽然 56℃ 加温 30 分鐘仍相当稳定。(表 3)

表 2 亞洲甲型毒株相別改变前后的抗原关系

免 疫 血 清 [△] 病 毒*	京 防 61-6	京 防 61-6HS
京 防 61-6	5120 ⁺	320
京 防 61-6HS	7680	1280

* 京防 61-6，原株，敏感相。京防 61-6 HS 是經馬血清作用后所获得的变异株，不敏感相。

“△” 鸡免疫血清。
“+” 血清稀释度的倒数。

抗原比 = $\sqrt{\frac{7680}{5120} \times \frac{320}{1280}} = 1/1.63$

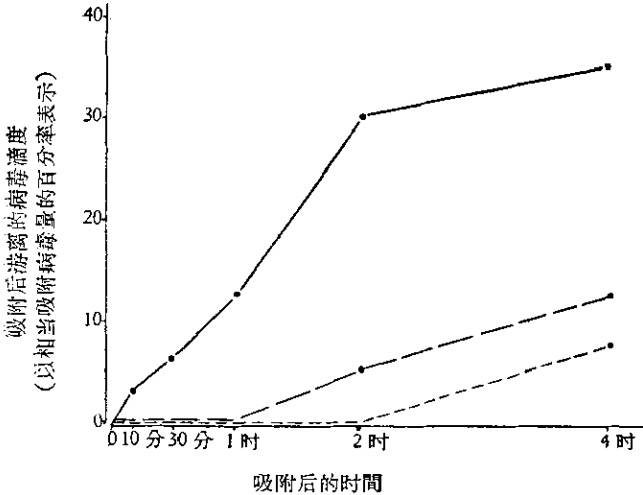


图 1. 三株对抑制素敏感程度不同的亚洲甲型病毒
吸附鸡红血球后游离能力的比较

- 对抑制素不敏感的京防 61-6E₉HS₃E₁HS₁E₆ 的游离曲线
- 对抑制素具有中等敏感性的桂防 62-11E₂HS₃F₅ 的游离曲线
- 对抑制素高度敏感的桂防 62-11E₁₂ 的游离曲线。

3. 血球凝集范围

敏感相及不敏感相亚洲甲型病毒的血球凝集范围有所不同，文献上已有报道^[2,6,7]。我们对 16 株病毒进行了试验，敏感相毒株不凝集小白鼠血球及牛血球，不敏感相毒株则能凝集。（表 4）

4. 乙醚处理的影响

Henle^[8] 曾报告经乙醚处理的 PR₃ 及 Lee 株流感病毒对鸡血球的血凝滴度下降，Menon^[9] 则报告有些亚洲甲型流感病毒经乙醚作用后对鸡血球的血凝滴度上升 4—16 倍，其它大多数亚洲甲型病毒及良好地适应于鸡胚的原甲型及亚洲甲型病毒株，在乙醚处理后对鸡血球的血球凝集滴度下降。Menon 的报告还提到对非特异性抑制素不敏感的亚洲甲型毒株经乙醚处理后变为

表 3 不加温及经 56℃ 加热后 4 株敏感相及不敏感相病毒吸附于鸡红血球后的游离过程

56℃ 加温时间	标 本	血 球 凝 集 滴 度			
		敏 感 相		不 敏 感 相	
		沪防 60-1E ₁₄	京防 61-6E ₁₂	兰生 60-2E ₁₃	贵 57-2F ₁₅
不 加 温	原尿囊液	480	480	280	480
	吸附后上清液	<5	<5	7.5	8.75
	洗 液	<5	<5	<5	<5
	37℃ 15 分	<5	<5	40	240
	37℃ 1 小时	15	10	120	240
	37℃ 4 小时	120	120	160	280
15 分	原尿囊液	280	480	240	560
	吸附后上清液	<5	<5	10	60
	洗 液	<5	<5	<5	<5
	37℃ 15 分	<5	<5	35	140
	37℃ 1 小时	<5	<5	120	240
	37℃ 4 小时	<5	<5	120	240
30 分	原尿囊液	240	480	280	560
	吸附后上清液	<5	<5	<5	7.5
	洗 液	<5	<5	<5	<5
	37℃ 15 分	<5	<5	70	160
	37℃ 1 小时	<5	<5	120	200
	37℃ 4 小时	<5	<5	140	240

表 4 敏感相及不敏感相亚洲甲型病毒对小白鼠血球及牛血球的凝集特性的比较

病 毒		血 球	
相 别	株 别	小 白 鼠	牛
敏 感 相	沪防 60-1	—	未 試
	沪軍 58-12-37-3	—	”
	豫防(魯)	—	”
	京防 61-6	未 試	—
	京防 61-7	”	—
	京防 61-8	”	—
	桂防 62-11	”	—
	兰生 62-1	”	—
不 敏 感 相	长生 57-2	+	未 試
	京 57-2	+	”
	京科 59-7	未 試	+
	蒙防 62-1	”	+
	京科 58-24HS ₁ E ₂	”	+
	京防 61-6 HS ₃ F ₄ HS ₁ E ₃	”	+
	京防 61-6HS ₄ E ₄	”	+
	桂防 62-11HS ₃ E ₄ HS ₄ E ₁	”	+

* “—” 不发生凝集； “+” 发生凝集。

敏感,对特异抗体也有较大的敏感性;原来对抑制素敏感的毒株经乙醚处理后变得更为敏感。Werner等^[20]也指出亚洲甲型病毒经乙醚处理后对抗体的敏感性增高。我们的试验结果表明,敏感相与不敏感相病毒对乙醚处理的反应是不同的:在对鸡血球的亲和性上,敏感相病毒在乙醚处理后略有下降或基本上无变化,不敏感相病毒在乙醚处理后,血凝滴度比原来提高 3—10 倍。(表 5)在对免疫血清中的抗体的亲和性上,敏感相病毒在经乙醚处理后,基本上无变化,但不敏感相病毒在经乙醚处理后,其对抗体的亲和性可以提高 3 倍。至于对非特异性抑制素的敏感性上,两者在处理前后均无改变,即敏感相病毒对抑制素仍然敏感,不敏感相病毒仍不敏感。

表 5 乙醚处理前后亚洲甲型病毒的血凝滴度及对抗体的亲和性比较

病 毒			血 凝 滴 度	血凝抑制效价*
相 别	株 别	乙 醚 处 理		
敏 感 相	沪防 60-1	前	60	320
		后	40	480
	京防 61-6	前	240	
		后	100	
不敏感相	贵 57-2	前	320	35
		后	3200	100
	兰生 60-2	前	1280	
		后	3840	

* 用京防 61-6 株的免疫鸡血清。

基于不敏感相病毒经乙醚处理后,并不改变其对抑制素的不敏感性,但对抗体的亲和

性却頗有提高。我們用 2 株經乙醚处理后的不敏感相病毒和其中一株不經乙醚处理以及一株敏感相病毒株作为抗原，检查了 4 例經常規血清学方法确定为亚洲甲型流感病毒患者的双份血清(血清不經除去抑制素的处理)，检查结果見表 6。京科 57-19 虽属不敏感相，但对抗体具有相当程度的亲和性，用以检查不經除去非特异性抑制素处理的患者血清，似可达到诊断的目的。此株病毒經乙醚处理后使其对抗体的亲和性大大提高，急性期血清中，較微量的抗体也能发现，这将有助于改进血清学的诊断方法。

表 6 以各种不同的亚洲甲型病毒抗原检查流感患者双份血清

抗 原	血 清*		A		B		C		D	
	急性期	恢复期	急性期	恢复期	急性期	恢复期	急性期	恢复期	急性期	恢复期
沪防 60-1	800	>1280	>1280	>1280	960	>1280	>1280	>1280	>1280	>1280
京科 57-19	<10	100	<10	80	<10	160	<10	240	<10	240
京科 57-19 (乙醚处理)	17.5	480	15	800	<10	800	15	>1280	<10	>1280
兰生 60-2 (乙醚处理)	15	280	<10	240	<10	320	17.5	>1280	<10	>1280

* 血清未經任何除去非特异性抑制素的处理。

三、討 論

众所周知,人及动物血清中含有不等量的对流感病毒的非特异性抑制素,这給血清学诊断带来不少困难。亚洲甲型病毒流行以后,新的抑制素被发现了^[12-15],这些抑制素在某些动物的血清中含量特別高,虽經霍乱弧菌滤液处理也不能完全破坏,这无疑給血清学工作增加了新的問題。目前,霍乱弧菌滤液还未能普遍供应,各基层单位单独制备又有客观条件上的困难,过碘酸鉀处理虽能彻底除去抑制素,但尚难保証对抗体毫无影响^[9]。因此,在亚洲甲型病毒作为主要的流感病原的现阶段,可以考虑用不敏感相-亲和相亚洲甲型病毒为抗原来检查患者双份血清,以初步确定是否为亚洲甲型流感。在測定亚洲甲型单价疫苗免疫后抗体的反应,以及調查人羣或动物血清中亚洲甲型流感抗体含量等工作中,也可以考虑采取这类病毒为血凝抑制抗原,以省却处理血清的麻煩。选取不敏感相-亲和相病毒再經乙醚处理可能提高其敏感性。当然这种改变方法的价值尚需經過实际应用的考驗。

从京科 58-24 株分离出純敏感相及純不敏感相两种病毒顆粒后,与母株病毒进行交互血凝抑制試驗的結果看来,純不敏感相病毒与敏感相病毒及母株之間似乎存在着抗原結構的差异。此种从一毒株中分离出抗原結構不同的变种的現象,Isaacs 及 Edney^[11] 用終末稀释法从甲型流感病毒 Melbourne 株中也曾发现过。但根据京防 61-6 株(敏感相)及其变异株京防 61-6 HSE₁₀ (不敏感相)之間的抗原結構沒有可以察見的差別,可見毒株的相的变异与抗原結構的变异并无直接联系。

本文报道了多株敏感相及不敏感相病毒对小白鼠血球及牛血球的凝集特性:敏感相毒株对这两种血球不凝集,不敏感相毒株則凝集。看来利用这个特性是可以把亚洲甲型毒株的相別区分出来的。亚洲甲型敏感相及不敏感相病毒的吸附紅血球后的游离速度不同,文献上已有报道^[2-3]。我們的工作除了証实此点以外,还发现在变异过程中形成的中間状态的病毒,不但在对抑制素的敏感性上居于

度上也介于敏感相及不敏感相病毒之間。由此看来,毒株对抑制素的敏感性、对小白鼠及牛血球的凝集能力和吸附于紅血球后游离能力之間有着密切的关系,它們都是相的变异的特征。

四、結 語

1. 亚洲甲型病毒株对抑制素的敏感性及对抗体的亲和性之間并无绝对一致的关系,因而有可能选择对抑制素呈不敏感相而对抗体呈亲和相的毒株作为血凝抑制試驗的抗原。乙醚处理病毒不影响其对抑制素的敏感性,但能提高对抗体的亲和能力,因此用乙醚处理不敏感相-亲和相病毒可能是一种良好的血凝抑制試驗抗原。

2. 同一病毒株中可能含有抗原結構不同的变种,但毒株的相的变异与抗原結構的变异并无直接联系。

3. 亚洲甲型病毒株可以利用其是否凝集小白鼠血球和牛血球来判定其为敏感相或不敏感相。

4. 亚洲甲型病毒的相的变异过程中形成的中間状态的病毒,在吸附紅血球后的游离速度上亦介于敏感相及不敏感相病毒之間。关于对抑制素的敏感性及游离能力的关系問題作了簡短的討論。

参 考 文 献

- [1] 王植全、薛凤举:微生物学报, **10**(3): 310, 1964.
- [2] 童葵塘、刘錦棠、朱既明:微生物学报, **7**: 273, 1959.
- [3] James, S. M., Fiser, P.: *Nature*, **184** (Suppl.): 1656, 1959.
- [4] Takátsy, Gy., Barb, K., Farkas, E.: *Acta, Virol.*, **3** (Suppl.): 79, 1959.
- [5] Choppin, P. W., Tamm, I.: *J. Exp. Med.*, **112**:895, 1960.
- [6] Zhdanov, V. M., Zakstelskaya, L. Y., Yefinova, V. E., Khait, S. I.: *J. A. M. A.*, **167**:1469, 1958.
- [7] Яхно, М. А., Закстельская, Л. Я.: *Вопросы мед. вирусол.*, **5**:58, 1958.
- [8] Henle, W.: *Advances in Virus Research*, Vol. 1, pp. 141, 1953.
- [9] Mcnon, I. G. K.: *Bull. W. H. O.*, **20**:199, 1959.
- [10] Werner, G. H., Sharma, R., Gogolski, L.: *Arch. f. g. Virusforsch.*, **10**:7, 1960.
- [11] Isaacs, A., Edney, M.: *Brit. J. Exp. Path.*, **31**:196, 1950.
- [12] 刘錦棠、童葵塘、朱既明:微生物学报, **7**:284, 1959.
- [13] Voláková, N., Jandasek, L.: *Acta. Virol.*, **3**:109, 1959.
- [14] Sugiura, A.: *J. Virol. (Japan)*, **9**:138, 1959.
- [15] Takátsy, Gy., Barb, K.: *Nature*, **183**:52, 1959.

STUDIES ON THE PHASE OF ASIAN INFLUENZA VIRUS

II. COMPARISON OF THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF INHIBITOR SENSITIVE AND NONSENSITIVE STRAINS

WANG CHIH-LUN HSÜEH FENG-CHÜ

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

Previous studies indicate that there is no constant association between sensitivity to γ -inhibitor and avidity to specific antibody of Asian influenza virus strains. Nonsensitive and avid strains may be selected as antigen for haemagglutination-inhibition test. In this experiment, it was shown that virus treated with ether showed no change in its sensitivity to inhibitor, but an increase in avidity to antibody was noted. It is proposed that nonsensitive, avid virus strain after ether treatment may be a desirable antigen for haemagglutination-inhibition test.

Evidence is presented to show that phase variation may sometimes be accompanied by slight difference in antigenic structure. However, there is no direct relationship between phase variation and the variation in antigenic structure of the virus.

Agglutination of mouse erythrocytes and cow erythrocytes was found to be constantly associated with nonsensitivity to inhibitor. After adsorption to fowl erythrocytes, the elution rate of the intermediate strain formed during phase variation of an Asian influenza virus was found to lie between the sensitive and nonsensitive strains.