

沙眼病原研究

VII. 沙眼病毒血清学性质的研究*

王克乾 黄元桐

(卫生部生物制品研究所,北京)

我们用鸡胚分离沙眼病毒成功以后,对病毒的理化及生物学性质进行了一系列研究,部分材料前已发表^[1]。本文报导采用补体结合、血凝抑制、病毒中和、毒性中和4种试验方法进行沙眼病毒血清学性质研究的結果。

材料和方法

(一) 病毒 共有沙眼病毒生研55,生研82,生研106三株及淋巴肉芽肿病毒JH株。沙眼病毒是本所于不同时期分离所得。为比较观察,个别试验加用了最先分离也是研究较多的生研8株沙眼病毒。毒种均为真空冷冻干燥材料或-50℃保存之感染卵黄膜组织。用前按常规方法在鸡胚卵黄囊内传代,俟鸡胚于5—8天有规则地死亡时,收取其卵黄膜制备实验材料。

(二) 病毒液及抗原之制备 取两个以上卵黄膜混合研磨,用肉浸液-盐水(1:1)制成20%悬液,低速离心后吸取上清液即为粗制病毒液,用于病毒中和试验。同上法用M/50 pH=7.2 麦氏(McIlvaine)缓冲液^[2]制成的病毒悬液,经高速(5,500转/分,1½小时)及低速(2,000转/分,15分钟)交替离心2—3次,按1个卵黄膜加入1毫升麦氏缓冲液重新混匀,即为纯化病毒液,保存于-50℃,定期注射动物制备免疫血清。于纯化病毒液中,加入硫柳汞使含量为1:20,000,普通冰箱保存,用作补体抗原,效价达1:64或更高。血凝素溶液为用麦氏生理盐溶液(pH=7.0的麦氏缓冲液1份加生理盐水4份,用前配制)制成20%病毒悬液,低速离心二次,吸取上清液,-50℃保存,用时稀释。毒素溶液为用含0.2%明胶的M/10磷酸盐缓冲液(pH=6.8—7.0)制成50%的病毒悬液,经低速离心二次去除粗块后即成。为保证毒素的效价,必须注意收取濒死或刚死的感染卵黄膜制备。

(三) 血清

1. 鸡免疫血清: 用两年左右的来亨公鸡,每隔3—4天肌肉内注射纯化病毒液1—2毫升,免疫15次或再静脉内免疫3—6针,末次免疫后5—7天取血分出血清。

2. 鸽免疫血清: 选用家鸽血清对淋巴肉芽肿病毒的补体结合抗体阴性者,每隔3—4天肌肉内免疫1毫升,共6—8次,末次免疫后5—7天取血分出血清。

3. 鸽鸟疫阳性血清: 选自天然情况下,血清含淋巴肉芽肿病毒之补体结合抗体者,取其血清作为鸟疫阳性血清。

鸡血清可做病毒及毒性中和试验以及血凝抑制试验,鸽血清可作补体结合试验及血凝抑制试验。所有血清均在-20℃保存,用前在56℃水浴内加温30分钟灭活。

(四) 试验方法

1. 补体结合试验: 采用试管微量法^[3],总量0.6毫升,其中血清、抗原、溶血素、羊血球各0.1毫升,

* 本工作在陽飞凡先生指导下进行,并蒙王用揖大夫指正,特此致谢。
本文1963年10月6日收到。

补体 0.2 毫升。試驗时抗原用 2—4 单位,溶血素 2 单位,羊血球浓度为 1%,补体用 2.5 单位。結合条件为普通冰箱內 18—24 小时,加入敏感化血球后 37°C 水浴內 30 分钟讀取結果,以 50% 血球未溶解(++)的血清最高稀釋度表示血清效价。

2. 血凝及血凝抑制試驗: 参考 Hillemann 氏^[4]方法。用麦氏生理盐溶液将血凝素自 1:10 倍比稀釋,每管 0.5 毫升,加入 1% 小白鼠紅血球 0.25 毫升搖勻,室溫或 30°C 水浴內培育 1 小时半讀取結果,以血球完全凝集的最高稀釋度計算血凝素效价。血凝抑制試驗先将血清倍比稀釋,每管分別加不同稀釋度血清 0.25 毫升,繼加 4 单位血凝素 0.25 毫升搖勻,室溫作用 20—30 分钟后再加入 1% 小白鼠紅血球 0.25 毫升,水浴(30°C)內 1 小时或室溫 1 小时半讀取結果,效价以血球凝集現象完全被抑制的血清最高稀釋度表示。

3. 病毒中和試驗: 采用血清定量病毒变量的方法。将病毒液 10 倍递增稀釋,試驗組每管加入等量未稀釋的免疫血清,对照組加入免疫前血清或生理盐水搖勻后,置室溫 1 小时,再放 4°C 1 小时,然后接种于 6—8 日齡的鸡胚卵黃囊內,每稀釋度注射 5—6 只,观察 12 天,兩組鸡胚半数致死終点(LD₅₀)的比数即为中和指数。

4. 毒性及毒性中和試驗: 将毒素液自 2 倍开始作倍比稀釋,每稀釋度尾靜脉內注射 8—12 克小白鼠 4—6 只,每只 0.5 毫升,观察 24 小时,以小白鼠死亡在半数以上的最高稀釋度作为毒素之效价(最小致死量)。毒性中和試驗即将血清稀釋与适量的毒素液(本实验用 3 个最小致死量)等量混和,12°C 90 分钟再放冰浴內 30 分钟后,如上法注射小白鼠,观察血清能否保护半数以上的小白鼠免于中毒死亡。

实 驗 結 果

(一) 补体結合試驗 沙眼患者血清对鸚鵡热-淋巴肉芽肿病毒組(以下簡称鸚-淋組)病毒抗原呈阳性补体結合反应是早已知道的^[5]。本实验用沙眼与淋巴肉芽肿两种病毒作抗原和沙眼免疫血清、淋巴肉芽肿免疫血清以及天然鳥疫阳性血清作交叉試驗,观察沙眼病毒毒株間以及与鸚-淋組病毒間的抗原关联性,同时用煮沸抗原作比較观察。表 1 結果表明,家鴿經免疫后血清抗体效价一般在 1:200 左右,最高可达 1:512(煮沸抗原測定者)。

表 1 沙眼病毒株間及与鸚-淋組病毒交叉补体結合試驗

血 清	抗				原	
	煮沸处理 ¹⁾	沙生研 55	沙生研 82	沙生研 106	淋 JH ²⁾	正常卵黃膜
抗生研 55	+	320 ³⁾	512	512	192	<16
	-	192	256	384	192	<16
抗生研 82	+	512	512	512	192	<16
	-	192	192	320	192	<16
抗生研 106	+	128	256	256	256	<8
	-	40	32	160	192	<16
抗淋 JH	+	160	320	512	320	<16
	-	192	320	384	384	<16
天然鳥疫 1 号	+	256	256	256	128	<8
	-	192	192	320	192	<16
天然鳥疫 2 号	+	48	12	32	48	<8
	-	160	160	192	160	<16

1) “+”为补結抗原經 8—16 倍稀釋煮沸 20 分钟处理,“-”为未經处理。

2) 表中数字代表血清的效价,为血清稀釋度的倒数。表 2 同。

3) 淋巴肉芽肿病毒 JH 株。

三株沙眼病毒之間及与淋巴肉芽肿病毒之間均有交叉反应，它們与天然烏疫阳性血清亦呈現阳性反应，且对本病毒与异病毒的效价沒有明显区别。这就說明沙眼病毒在株間有共同的抗原性并与鸚-淋組病毒有抗原的关联性。表中結果表明，用煮沸抗原測得的血清效价大多較高，唯对 2 号天然烏疫阳性血清反較未經煮沸者为低，原因尙待查明。

(二) **血凝及血凝抑制試驗** 我們发现沙眼病毒在 20—30°C 能凝集小白鼠紅血球，血凝效价一般为 1:160，間或可达 320 以上。已經凝集的血球不会自然离散，震蕩后仍能凝集且效价不減，用高速离心法可将病毒顆粒沉下而与血凝素分开，这些性質和鸚-淋組病毒及痘类病毒相似而与流感病毒不同^[6]，有关沙眼血凝性質的研究詳見另文^[7]。表 2 为分別用鸡及鵠免疫血清进行血凝抑制試驗的結果。

表 2a 沙眼病毒株間及与鸚-淋組病毒交叉血凝抑制試驗(鵠免疫血清)

血 清	沙 眼 抗 原			
	生 研 8	生 研 55	生 研 106	生 研 82
抗生研 8	40	40	20	80
抗生研 55	320	320	160	320
抗生研 106	160	160	160	未做
抗 淋 JH	40	80	40	80

如表 2a, 2b 所示，各株沙眼病毒之間呈現交叉抑制反应，与淋巴肉芽肿免疫血清及天然烏疫阳性血清亦呈現阳性反应，且它們之間的抑制效价沒有明显区别，显示沙眼病毒各毒株之間及与鸚-淋組間有共同的血凝抗原。牛痘病毒及亚洲甲型流感病毒的免疫血清以及正常兔、鸡血清都不能抑制沙眼病毒血凝反应(如表 3)。

表 2b 沙眼病毒株間及与鸚-淋組病毒交叉血凝抑制試驗(鵠血清)

血 清	沙 眼 抗 原	
	生 研 55	生 研 106
抗生研 55	40	20
抗生研 82	40	20
抗生研 106	20	10
抗 淋 JH	40	20
天然烏疫	40	20

表 3 沙眼病毒与牛痘、流感病毒免疫血清的交叉血凝抑制試驗

血清, 动物种类	沙 眼 抗 原	
	生 研 82	生 研 106
抗沙眼, 鸡	106	80
抗淋 JH, 鸡	40	20
抗牛痘 1 号, 兔	<10	<10
抗牛痘 2 号, 兔	<10	<10
抗亚洲流感, 鸡	<10	<10
正常兔血清	<10	<10
正常鸡血清	<10	<10

(三) **病毒中和試驗** Hillemann 氏等曾制备了具中和效能的鸚-淋組病毒鸡免疫血清并应用于組內各病毒的鉴别^[8]。我們試用于制备沙眼病毒及淋巴肉芽肿病毒免疫血清亦获成效。表 4 所列的是两次实验的結果。

从第一次中和試驗中可以看出，三株沙眼病毒对其相应的抗血清呈現相互交叉的中和反应，效价亦接近(唯生研 82 病毒抗血清对生研 106 病毒表現异常)；而沙眼病毒与淋巴肉芽肿病毒間的交叉反应在滴度上似有所区别。

为查明沙眼病毒与淋巴肉芽肿病毒間的抗原关系，做了第二次試驗。所用血清較第

表 4 沙眼病毒株間及与淋病病毒交叉病毒中和試驗

实验次数	免疫血清	病 毒			
		生研 55	生研 82	生研 106	淋 JH
I	抗生研 55	170	>692	4,169	145
	抗生研 82	151	389	*	5
	抗生研 106	107	219	7943	48
	抗淋 JH	36	42	295	100
II	抗生研 55	100,000	—	—	13
	抗生研 82	—	742	—	2
	抗生研 106	—	—	25,120	56
	抗淋 JH	36	562	19	269

一次所用的多三次靜脉免疫。实验結果表明,三株沙眼病毒抗血清对原病毒株具有高度的中和作用而对淋巴肉芽肿病毒的中和效价較低或不明显。

(四) 毒性及毒性中和試驗 小白鼠經尾靜脉內注射高浓度沙眼病毒悬液大多于 4—8 小时后死亡。死前有厌食、聳毛、战慄、呼吸急促等症象,最后衰竭而死。剖检見胸腹腔有少量积液,腸管胀气,小腸充血水肿,鏡下可見肝脾細胞有灶性坏死区。注射 2 小时以内死亡的多因栓塞或休克所致,殘存 24 小时以上的多能活存下去。表 5 为 4 株沙眼病毒的毒性試驗結果,表中看出它們的毒素效价都不超过 1:8。

表 5 沙眼病毒小白鼠致死毒素的浓度

病毒株	病 毒 稀 释 度							效价
	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	
生研 8	—*	4/4**	—	0/4	—	—	—	1:3
生研 55	5/5	—	4/5	—	0/5	0/5	—	1:4
生研 82	5/5	—	4/5	5/5	—	0/5	—	1:6
生研 106	6/6	—	6/6	6/6	6/6	—	0/6	1:8

* 未做。

** 死亡鼠数/注射鼠数。

这种毒素性質很不稳定,反复冻化三次,在 4°C 或 22°C 放置 3 小时均足使效价明显下降(見表 6)。这种小白鼠致死毒素和病毒感染性伴随存在。将病毒液經 5,000 轉/分离心 1 小时后只有含大量病毒的沉淀部分能致小白鼠中毒死亡,而其上清液則不能使小

表 6 沙眼病毒毒素的稳定性

处理方法	毒 素 稀 释 度				
	1:2	1:4	1:6	1:8	1:12
冻融 3 次	2/6	0/5	0/6	0/5	—
22°C, 3 小时	5/5	4/5	0/4	—	—
4°C, 3 小时	—	4/4	0/5	0/6	—
4°C, 24 小时	—	0/4	1/4	0/4	—
对照(不处理)	—	4/5	2/6	3/6	0/6

表 7 沙眼病毒毒素中和試驗

血 清	血清稀釋度	
	1:2	1:10
抗生研 55	0/5	0/5
抗生研 82	0/5	1/5
抗生研 106	0/5	0/5
天然烏疫 1 号	5/5	2/5
天然烏疫 2 号	5/5	5/5
鸡免疫前血清 1 号	3/5	未做
鸡免疫前血清 2 号	5/5	未做
1/6 毒素液对照(1.5 最小致死量)		4/4

白鼠致死,脏器亦无任何可見病变。

为查明病毒毒素的抗原性質,我們測驗了 3 株沙眼病毒鴿免疫血清及 2 份天然烏疫鴿血清对生研 106 沙眼病毒毒素的中和作用。如表 7 所示,三株沙眼病毒免疫血清虽 10 倍稀釋仍中和了 1.5 最小致死量的毒素使小白鼠免于死亡,而免疫前血清 2 倍稀釋并没有中和效能,說明毒素中和反应是特异的;而天然烏疫阳性血清中未能証明含有中和沙眼病毒毒素的抗体。

討 論

沙眼病毒有无型別之分或究竟有几型? 目前尚无定論。国外曾有报导,生研 55 病毒(鼠脑适应株)与在以色列及西非岡比亚所分离的沙眼病毒起交叉中和反应^[9,10]。就我們对 11 株沙眼病毒的了解,其性質在很多方面都是相同的,只是个別病毒株在理化或生物学性質的个别方面存在着某些差异。本文用补体結合、血凝抑制、病毒中和及毒性中和試驗等 4 种方法对三、四株沙眼病毒研究的結果表明,它們之間呈現极为显著的交叉反应,大体上显示了抗原的一致性。唯最近有报导用毒素保护試驗将沙眼病毒分型的^[11]。因此,关于沙眼病毒型別問題,尚有必要在今后工作中試用更多方法对更多的病毒株作仔細的比較分析。

根据沙眼患者血清对鸚-淋組病毒抗原呈阳性补体結合反应,以及根据沙眼包涵体的形态学及抗菌素对沙眼的疗效等方面,曾推断沙眼病毒和鸚-淋組有一定关系。我們曾报导沙眼病毒在鸡胚卵黄膜內能丰富繁殖^[12],其它生物学性質如病毒的形态大小、繁殖以及某些物理、化学因素对病毒的影响等方面,亦表明与鸚-淋組有諸多相似之点。本文查明沙眼病毒与淋巴肉芽肿病毒相互之間以及与天然烏疫阳性血清,在补体結合試驗和血凝抑制試驗方面,呈現相互交叉反应,証明沙眼病毒与鸚-淋組之間有共同的抗原成分。另一方面,交叉病毒中和試驗表明,沙眼病毒与淋巴肉芽肿病毒間有一定的差别,毒性中和試驗亦表明,烏疫阳性血清不表現有中和沙眼病毒毒素的能力。

本文实验表明,将沙眼病毒补体結合抗原煮沸处理并不影响抗原性,病毒却已灭活,在操作上較為安全方便。我們曾用此种煮沸抗原检查人羣血清中沙眼抗体水平,查明有 73.7% 的沙眼患者血清呈补体結合阳性反应。

如上所述,血凝抑制試驗可用于沙眼病毒学研究。初步試驗結果,沙眼病毒血凝抑制試驗亦可用于測定人羣血清抗体,效价与补体結合試驗相近。

摘 要

本文报导了用补体結合、血凝抑制、病毒中和及毒性中和試驗 4 种方法对沙眼病毒进行研究的結果。通过对我們分离的三株病毒的抗原检查,发现它們之間呈現密切的相互交叉反应,表明它們属于同一种抗原类型。据补体結合試驗及血凝抑制試驗結果,沙眼病毒与淋巴肉芽肿病毒免疫血清以及天然烏疫阳性血清亦呈現阳性反应,表明沙眼病毒与

鸚鵡熱-淋巴肉芽腫病毒組有共同的補體結合及血凝抗原。病毒及毒性中和試驗的結果表明，沙眼病毒與鸚鵡熱-淋巴肉芽腫組病毒在抗原性上有一定的差別，而沙眼病毒株之間則有明顯的一致性。

參 考 文 獻

- [1] 湯飛凡等：中華眼科雜誌，(1):7, 1958。
 [2] Hodgman, C. D. et al.: *Handbook of Chemistry and Physics*, 39th ed. p. 1615, 1957—1958。
 [3] 王濟淵著：實驗病毒學，人民衛生出版社，第 113—117 頁，1955 年。
 [4] Hillemann, M. R. et al.: *J. Immunol.*, **66**:115, 1951。
 [5] Rake, G. et al.: *PSEBM*, 49:545, 1942。
 [6] Hirst, G. K., in "*Rivers & Horsfall's Viral and Rickettsial Infections of Man*", Pitman, London, 3rd ed. p. 106。
 [7] 沙眼病毒血凝性質的研究，未發表。
 [8] Hillemann, M. R.: *J. Inf. Dis.*, **76**:96, 1945。
 [9] Bernkopf, H.: *Bull. Res. Council Israel*, sect. c. *Exp. Med.* 8E/1—2, 25—29, 1959, 引自 *Rev. Int. Trachoma.*, **37**(3):530, 1960。
 [10] Roger, A. & Roger, F.: *Ann. Inst. Pasteur*, **101**(4):522, 1961。
 [11] Bell, S. D. et al.: *Science*, **130**:622, 1959。
 [12] 湯飛凡等：中華醫學雜誌，(2):81, 1957。

STUDIES ON THE ETIOLOGY OF TRACHOMA

VII. SEROLOGICAL PROPERTIES OF TRACHOMA VIRUS AND RELATIONSHIPS TO PSITTACOSIS-LYMPHOGRANULOMA VENEREUM(P-L) GROUP OF VIRUSES

WANG K' O-CH' IEN, HUANG YUAN-T' UNG

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

Using four serological methods, namely complement fixation test (CFT), hemagglutination inhibition test (HIT), neutralization test (NT), and toxin neutralization test (TNT), serological studies were carried out with 3 strains of trachoma virus isolated at different times in China.

Data obtained with these methods showed that these strains of trachoma virus exhibited very marked cross reactions with each other, indicating that they belong to one single serotype.

Using these same methods in examining the serological relationship between trachoma and the P-L (psittacosis-lymphogranuloma) group of viruses, the following results were obtained:

In CFT and HIT, trachoma virus, lymphogranuloma venereum virus and their respective immune sera, and sera from pigeons naturally infected with ornithosis were used. They showed fairly marked cross reactions with each other. These results indicated that trachoma virus shares common antigen with P-L group of viruses, and it would be reasonable to state that trachoma virus behaves like a member of the P-L group.

The results of NT and TNT, on the other hand, showed that the antigenicity of trachoma virus differed from those of the other members of the P-L group, having little, if any, heterologous neutralizing effect.