

新甲₁型流行性感冒病毒的蚀斑

张育琴 张海莲 李光利 章以浩

(卫生部北京生物制品研究所)

1977年5月,我国出现了新甲₁型流行性感冒(简称流感)病毒^[1]。我们共选用了9株新甲₁型流感病毒及5株减毒活疫苗毒种在鸡胚肌皮、鸡胚肾混合细胞单层进行蚀斑试验,结果如下。

材料与方法

一、病毒株

京生 77-12E₃、京生 77-15E₃、京生 77-20E₃ 三株系 1977 年卫生部北京生物制品研究所分离;京防 77-120E₃、京防 77-128E₃、京防 77-184E₃ 和京防 77-185E₃ 四株系 1977 年北京市卫生防疫站分离;辽丹 77-5E₅ 及津防 77-78E₅ 株系 1977 年分别由丹东市及天津市卫生防疫

站分离。另外还选用了 1947 年国外分离的 FM₁-3E₁₇ 及 1953 年卫生部北京生物制品研究所分离的京生 53-7E₃ 两株甲₁型流感病毒作为对照。

上述 11 株病毒均通过鸡胚尿囊腔传代,蚀斑试验前用 0.25% 乳蛋白水解物 EarLa 氏液将病毒液稀释成 10^{-2} 或 10^{-3} 。

二、疫苗株*

京生 77-12E₈(28℃)、京生 77-12E₈(31℃)、京生 77-12E₁₂(31℃)、辽丹 77-5E₈(34℃) 及辽丹 77-5E₅ 株₃E₁(较疫苗代数在鸡胚中少传一代)。5 个疫苗株的减毒方法见文献^[2]。蚀斑

*“E”代表鸡胚,“株”代表核酸处理,符号后面的数字代表传代次数,括弧内数字系减毒传代时所用的温度。

试验前将疫苗株及其早代株京生 77-12E₃、辽丹 77-5E₅ 分别作鸡胚滴定 (EID₅₀)，-40℃ 保存备用。

三、细胞

鸡胚肌皮及鸡胚肾混合细胞单层^[3]。

四、细胞营养液及蚀斑覆盖培养基

细胞营养液为 0.25% 乳蛋白水解物 EarLe 氏液加入 5% 牛血清。蚀斑覆盖培养基中加入 100μg/ml 胰酶^[4]，组成见文献^[5]。

五、蚀斑试验

方法见文献^[5]。培育温度为 33℃、36℃ 及 39℃。

结 果

一、9 株新甲₁型及 2 株甲₁型流感病毒在鸡胚肌皮、鸡胚肾混合细胞单层的蚀斑形成结果 (见表 1)

由表 1 结果可见我国分离的 9 株新甲₁型

表 1 新甲₁及甲₁型流感病毒在不同温度下蚀斑形成情况*

| 病毒株 | 33℃ | | | | | 36℃ | | | | | 39℃ | | | | |
|-----------------------------------|--------|-----------|-----------|------|-----|--------|-----------|-----------|------|-----|--------|-----------|-----------|------|-----|
| | 开始出斑天数 | 最大直径 (mm) | 平均直径 (mm) | 培育天数 | 斑形 | 开始出斑天数 | 最大直径 (mm) | 平均直径 (mm) | 培育天数 | 斑形 | 开始出斑天数 | 最大直径 (mm) | 平均直径 (mm) | 培育天数 | 斑形 |
| 京生 77-12E ₃ | 2 | 2 | 1.2 | 5 | 较清楚 | 2 | 2×2.5 | 1.2 | 4 | 清楚 | 2 | 2 | 0.6 | 4 | 较清楚 |
| 京生 77-15E ₃ | 3 | 2×1.1 | 1 | 4 | 较清楚 | 3 | 1.5 | 1.2 | 4 | 较清楚 | 3 | 1.2 | 0.5 | 5 | 模糊 |
| 京生 77-20E ₃ | 3 | 2.5×3 | 1.5 | 4 | 清楚 | 3 | 3.0 | 2.5 | 4 | 较清楚 | 2 | 3 | 1.5 | 5 | 清楚 |
| 辽丹 77-5E ₅ | 2 | 2.5 | 1.5 | 5 | 清楚 | 3 | 3×3.5 | 2.5 | 5 | 清楚 | 3 | 2.5 | 0.5 | 5 | 清楚 |
| 津防 77-78E ₃ | 3 | 2.5 | 1 | 6 | 不清楚 | 4 | 2 | 1.8 | 4 | 较清楚 | 4 | 1 | 0.3 | 5 | 不清楚 |
| 京防 77-120E ₃ | 3 | 1.8×1.5 | 0.8 | 5 | 不清楚 | 3 | 3 | 1.3 | 5 | 清楚 | 3 | 2 | 1.5 | 5 | 清楚 |
| 京防 77-128E ₃ | 4 | 0.2 | 0.2 | 5 | | 3 | 2 | 1.6 | 5 | 较清楚 | 3 | 0.1 | 0.1 | 5 | |
| 京防 77-184E ₃ | 4 | 1.5×1 | 0.3 | 5 | 较清楚 | 2 | 3 | 2.5 | 5 | 清楚 | 2 | 3.2 | 2.2 | 5 | 清楚 |
| 京防 77-185E ₃ | 3 | 3 | 1.5 | 6 | 清楚 | 2 | 3.5 | 2.5 | 5 | 清楚 | 3 | 2×2.2 | 1.4 | 4 | 清楚 |
| FM ₁ -3E ₁₇ | 2 | 1.5 | 0.3 | 5 | 不清楚 | 2 | 3×3.5 | 1.5 | 5 | 不清楚 | 3 | 2.5×2.8 | 1.4 | 4 | 不清楚 |
| 京生 53-7E ₃ | 3 | 3 | 1 | 6 | 清楚 | 3 | 2.5 | 1.5 | 4 | 清楚 | 3 | 2.5 | 1.9 | 4 | 清楚 |

* 表中 0.1—0.3mm 直径的蚀斑系显微镜下测量结果，0.1—0.2mm 直径的蚀斑形状肉眼不易观察。

流感病毒通过鸡胚传 2、3 代后，在 33℃、36℃ 及 39℃ 培育均能形成蚀斑 (见图 1)，但开始出现蚀斑的时间、蚀斑大小及斑形是否清晰则与毒株有关。一般看来，36℃ 培育，蚀斑的直径较大，斑形也较清晰。多数病毒在 39℃ 培育，蚀斑较小，有的毒株斑形模糊。同样，2 株甲₁型流感病毒 FM₁-3E₁₇ (见图 2) 及京生 53-7E₃ 在上述三种温度培育也能较好地形成蚀斑。

二、两种温度培育下覆盖层中加入胰酶与否对蚀斑形成的影响

培育温度为 36℃ 及 39℃，结果见表 2。

由表 2 可以看出，6 株新甲₁型病毒不论其覆盖层中加入胰酶与否，在 36℃ 及 39℃ 下均能形成蚀斑。但是加入胰酶后蚀斑形成的数量较多，斑形较清晰。36℃ 培育时所形成的蚀斑直径较大。另外，两株甲₁型流感病毒的蚀斑形

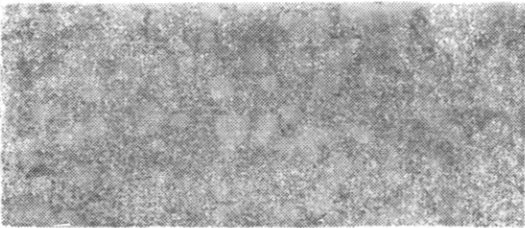


图 1 新甲₁型流感病毒 (辽丹 77-5E₅, 36℃) 蚀斑

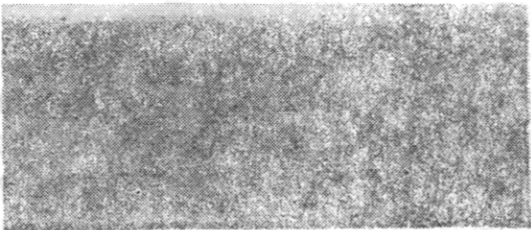


图 2 甲₁型流感病毒 (FM₁-3E₁₇, 36℃) 蚀斑

成和新甲₁型相似。

表2 胰酶对新甲、型及甲、型流感病毒蚀斑形成的影响

| 病 毒 株 | 36℃ | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------|------|--------------|------|-----|------------|-----|--------------|------|-----|
| | 加 胰 酶 | | | | | 不 加 胰 酶 | | | | |
| | 开始出斑 大数 | 斑数 | 最大直径 (mm) | 培育天数 | 斑形 | 开始出斑 大数 | 斑数 | 最大直径 (mm) | 培育天数 | 斑形 |
| 京生 77-12E ₃ | 2 | 1000 | 2×1.8 | 3—4 | 清楚 | 2 | 400 | 1.8×2.1 | 3—4 | 较清楚 |
| 辽丹 77-5E ₃ | 2 | 100 | 3.2 | 4 | 清楚 | 2 | 18 | 2 | 3—4 | 模糊 |
| 京生 77-15E ₃ | 2 | 336 | 2 | 3—4 | 清楚 | 2 | 240 | 2 | 3—4 | 不清楚 |
| 京生 77-20E ₃ | 2 | 432 | 3 | 3—4 | 清楚 | 2 | 200 | 2 | 4 | 较清楚 |
| 京生 77-120E ₃ | 2 | 32 | 3.8 | 4 | 清楚 | 3 | 13 | 2 | 3—4 | 较清楚 |
| 京生 77-185E ₃ | 2 | 90 | 2.5 | 3—4 | 清楚 | 2 | 20 | 1.5 | 4 | 不清楚 |
| FM ₁ -3E ₁₇ | 2 | 35 | 2.5×2.8 | 4 | 不清楚 | 2 | 5 | 2×2.5 | 4 | 模糊 |
| 京生 53-7E ₃ | 2 | 210 | 3 | 3—4 | 清楚 | 4 | 5 | 1.1 | 4 | 不清楚 |

| 病 毒 株 | 39℃ | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------|-----|--------------|------|-----|------------|-----|--------------|------|-----|
| | 加 胰 酶 | | | | | 不 加 胰 酶 | | | | |
| | 开始出斑 天数 | 斑数 | 最大直径 (mm) | 培育天数 | 斑形 | 开始出斑 天数 | 斑数 | 最大直径 (mm) | 培育天数 | 斑形 |
| 京生 77-12E ₃ | 2 | 600 | 1.5 | 4 | 较清楚 | 2 | 400 | 2 | 3 | 较清楚 |
| 辽丹 77-5E ₃ | 2 | 24 | 3.6×3 | 3 | 清楚 | 3 | 5 | 1 | 3 | 模糊 |
| 京生 77-15E ₃ | 2 | 271 | 2.8 | 3—4 | 清楚 | 2 | 40 | 3 | 2—3 | 不清楚 |
| 京生 77-20E ₃ | 2 | 285 | 3.2 | 3—4 | 清楚 | 2 | 115 | 2 | 3 | 不清楚 |
| 京生 77-120E ₃ | 2 | 6 | 3 | 4 | 清楚 | 3 | 3 | 3 | 3—4 | 不清楚 |
| 京生 77-185E ₃ | 2 | 35 | 2.8 | 4 | 清楚 | 2 | 5 | 3 | 4 | 不清楚 |
| FM ₁ -3E ₁₇ | 3 | 15 | 2.5×2.8 | 4 | 不清楚 | 3 | 5 | 1.5 | 3 | 模糊 |
| 京生 53-7E ₃ | 2 | 117 | 3×2.5 | 3—4 | 清楚 | 3 | 3 | 1.5 | 3 | 模糊 |

表3 新甲、型早代株与其疫苗株的蚀斑形成比较*

| 组别 | 病 毒 株 | 33℃ | | | | | 36℃ | | | | | 39℃ | | | | |
|----|---|----------------|-----|--------------|----------|-----|----------------|-----|--------------|----------|-----|----------------|-----|--------------|----------|-----|
| | | 开始 出斑 天数 | 斑数 | 最大直径 (mm) | 培育 天数 | 斑形 | 开始 出斑 天数 | 斑数 | 最大直径 (mm) | 培育 天数 | 斑形 | 开始 出斑 天数 | 斑数 | 最大直径 (mm) | 培育 天数 | 斑形 |
| I | 京生 77-12E ₃ | 2 | 250 | 1.2 | 5 | 较清楚 | 2 | 300 | 1.5 | 5 | 清楚 | 2 | 180 | 1.8 | 5 | 较清楚 |
| | 京生 77-12E ₈ (28℃) | 2 | 224 | 1.2 | 5 | 不清楚 | 3 | 60 | 1 | 5 | 不清楚 | 2 | 8 | 0.2 | 5 | |
| | 京生 77-12E ₈ (31℃) | 2 | 42 | 1 | 5 | 不清楚 | 3 | 20 | 2 | 5 | 较清楚 | 3 | 5 | 0.2 | 5 | |
| | 京生 77-12E ₁₂ (31℃) | 2 | 6 | 1 | 5 | 不清楚 | 3 | 7 | 0.2 | 5 | | 2 | 9 | 0.2 | 5 | |
| II | 辽丹 77-5E ₃ | 3 | 6 | 2.2×1.5 | 5 | 清楚 | 3 | 90 | 3×3.5 | 5 | 清楚 | 2 | 13 | 3 | 4—5 | 清楚 |
| | 辽丹 77-5E ₈ (34℃) | 4 | 4 | 1.5×1.2 | 5 | 较清楚 | 4 | 49 | 2.8 | 5 | 清楚 | 3 | 6 | 1 | 4—5 | 模糊 |
| | 辽丹 77-5E ₃ 鞣 ₃ E ₁ | 4 | 4 | 0.1 | 5 | | 4 | 3 | 1.4 | 5 | 较清楚 | 3 | 4 | 0.1 | 3 | |

* 表中 0.1—0.2mm 直径的蚀斑系显微镜下测量结果,肉眼不易观察,II 组中 36℃ 的数据系另一次实验结果

三、5 个减毒活疫苗株及其早代株蚀斑形成的区别

将疫苗株及其早代株分成两组,京生 77-12E₃、京生 77-12E₈(28℃)、京生 77-12E₈(31℃)及京生 77-12E₁₂(31℃)为 I 组,辽丹 77-5E₃、辽丹 77-5E₈(34℃)及辽丹 77-5E₃ 鞣₃ E₁ 为 II 组。

蚀斑试验前,每组均用 EarLe 氏液稀释,使种子液中含有等量 EID₅₀ 的病毒,结果见表 3。

由表 3 可见两组病毒的早代株及其疫苗株在 33℃ 及 36℃ 培育已可看出一定的区别,即早代株所形成的蚀斑数较多、直径较大、斑形也比较清晰。39℃ 培育疫苗株与早代株相比蚀斑

数量大减,如 I 组早代株京生 77-12E₃ 蚀斑数为 180 个,3 个疫苗株却分别为 8、5 及 9 个;早代株蚀斑最大直径为 1.8mm,斑形也较清晰,而 3 个疫苗株所形成的蚀斑却很小仅为 0.2mm。II 组 2 个疫苗株与其早代株相比在 39℃ 的蚀斑形成有一定程度的差别,但不如 I 组显著。原因可能由于辽丹 77-5 早代株通过鸡胚传了 5 代,使该株已初步减毒。根据新甲₁型疫苗株的选育经验来看,该类型的病毒,经鸡胚传 8 代左右即可达减毒的目的^[2]。

小结与讨论

本文结果说明新甲₁型流感病毒的鸡胚早代株,未经任何组织培养适应,即可在鸡胚成纤维、鸡胚肾混合细胞单层中形成蚀斑,培育温度以 36℃ 为佳。即使在蚀斑覆盖层中不加入胰酶,或培育温度达 39℃ 时也能形成蚀斑。由于该型病毒较容易形成蚀斑,从而为病毒分离纯化选种工作提供了方便。

在蚀斑覆盖层中加入胰酶后,新甲₁型流感病毒蚀斑形成的数量较多、斑形清晰,36℃ 培育蚀斑直径大。本文结果再次证实了胰酶对蚀斑形成有促进作用^{[4][6]}。这种促进作用的机理为何? 胰酶是作用于宿主细胞还是作用于病毒? 一些研究结果指出,感染宿主细胞中由于内源性蛋白酶引起的。病毒血凝素裂解乃是病

毒产生最适感染力所必需的^{[7][8]}。用胰酶处理流感病毒时完整的血凝素(HA)多肽被裂解成 HA₁ 及 HA₂,从而提高了病毒的感染力。而只有在一定的宿主系统中形成高感染力的病毒时高效率的蚀斑形成才有可能^{[9][10]}。现在已知,胰酶对于蚀斑形成的促进作用是由于它作用于出芽病毒血凝素的结果,而不是作用于细胞本身^[11]。

试验中 5 个减毒活疫苗毒种的蚀斑形成与其早代株相比,可以看出一定程度的差别,特别是 39℃ 培育差别较明显。我们初步考虑蚀斑试验可作为活疫苗选种时的实验室初筛方法,详细讨论见文献^[2]。

参考文献

- [1] Kung H. C. et al.: *Bull. WHO*, **56**: 913, 1978
- [2] 章以浩等: 微生物学通报, **6**(4): 22, 1979.
- [3] 张汉荆等: 微生物学报, **12**(2): 158, 1966.
- [4] Appleyard G. et al.: *J. Gen. Virol.* **25**: 351, 1974.
- [5] 张育琴等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1983.
- [6] Came P. E. et al.: *Arch ges Virusforsch* **23**: 246, 1968.
- [7] Lazarowitz S. G. et al.: *Virology* **52**: 193, 1973
- [8] Skehel J. J., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 93, 1975.
- [9] Lazarowitz S. G. et al.: *Virology*, **68**: 440, 1975.
- [10] Klenk H. O. et al.: *Virology*, **68**: 426, 1975.
- [11] Kilbourn E. D.: *Yale J. Biol. and Medicine*, **53** (1): 41, 1980.