

# 猪与人甲<sub>3</sub>型流感病毒的研究

## II. 生物学特性比较

\* 田慕贞 罗群明 陈顺兰 冯玲玲

(湖北省医学科学院病毒研究所, 武汉)

### 提 要

本文比较从猪中分离的甲<sub>3</sub>型流感毒株与人甲<sub>3</sub>型流感病毒生物学特性的异同, 并试图了解猪甲<sub>3</sub>型毒株中有无温度敏感株。结果发现1979年至1982年从猪中分离的甲<sub>3</sub>毒株不仅其抗原性与当代人甲<sub>3</sub>毒株相同, 某些生物学特性也基本相同。如这些毒株血凝素对不同动物血球凝集范围和温度敏感性, pH耐受性等也基本相同。

在14株猪甲<sub>3</sub>毒株中未找到温度敏感株, 大多毒株在33℃和在34℃一样繁殖得很好, 推测猪体温较人体高, 只有强毒株才能由人传给猪, 猪可能是人甲<sub>3</sub>强毒株的储存者与传播者, 这在流感流行病学方面将有意义。

甲<sub>3</sub>型流感病毒极易由人传给猪, 几乎每年在人流感流行季节, 在猪群中也可分离到与当代人群流行的甲<sub>3</sub>型病毒抗原性相同的毒株<sup>[1]</sup>。这些病毒进入猪群后, 尽管其抗原性未发现明显改变<sup>[2]</sup>, 但由于宿主改变了, 病毒的生物学特性是否也随之发生改变, 这些资料可能为流感变异及流行规律提供一些线索, 现将分析比较结果报告如下:

## 材料与方 法

### 一、病毒株

进行实验所用病毒皆为接种鸡胚后, 收取新鲜尿液, 猪甲<sub>3</sub>型毒株是在鸡胚中传6—8代时使用, 人甲<sub>3</sub>毒株都由其它实验室引进, 传代历史不清楚, 见表1。

二、血球凝集(HA)及血凝抑制试验(HI)按常规<sup>[3]</sup>方法进行。

### 三、温度对病毒血凝素的影响。

将各病毒株的鸡胚尿液分为7份, 分别于37℃, 45℃, 50℃, 56℃, 60℃, 65℃,

• 本稿1986年2月18日收到

现工作单位: 同济医科大学附属协和医院病毒研究室。

表 1. 用于实验的甲<sub>3</sub>型流感病毒  
Table 1. The strains used for test

病毒株 strains(pig)	分离日期 isolated date	分离地点 isolated place	病毒株(对照) strain(human)
A/猪/鄂/163/79(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1979.8.10	湖北恩施县	A/京/1/68(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
A/猪/鄂/54/81(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1981.1.15	湖北建始县	A/粤/243/72(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
A/猪/鄂/56/81(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.9.15	湖北建始县	A/鄂/8/75(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
A/猪/鄂/123/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.11.10	湖北武汉市	A/粤/38/77(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
A/猪/鄂/199/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.11.25	同上	A/京/2/79(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
A/猪/鄂/230/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.11.25	同上	A/汉/135/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
A/猪/鄂/231/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.2	同上	A/沙/15/83(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
A/猪/鄂/247/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.2	同上	
A/猪/鄂/251/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.2	同上	
A/猪/鄂/252/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.2	同上	
A/猪/鄂/262/82(H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.2	同上	
A/猪/鄂/264/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.2	同上	
A/猪/鄂/265/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.2	同上	
A/猪/鄂/321/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.12	同上	
A/猪/鄂/335/82(H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )	1982.12.20	同上	

70℃水浴中保温30分钟后, 连同置于4℃的病毒尿液按常规法测定剩余的 HA 滴度。

#### 四、pH 对病毒血凝素的影响。

用 pH 为 5、6、7、8 的磷酸缓冲液代替盐水稀释病毒, 然后进行 HA 滴度测定, 以生理盐水稀释病毒作为血凝滴度对照。

#### 五、血凝素的血球凝集范围

采集鸡、鸭、鹅、鸽、人、猴、猪、马、牛、羊、狗、豚鼠、大白鼠、小白鼠14种动物, 至少3只以上同种动物的血球混合后, 配成1%的血球然后用分光光度计测定血球浓度, 在室温下进行血球凝集试验。

#### 六、对非特异性抑制素的敏感性

采集猪、兔、牛、豚鼠、马、鸡、大白鼠6种动物的血清, 每种动物至少3只以上的血清混合后使用, 另取了鸡且清用玻璃珠打散后使用。将血清1:4稀释后56℃30分钟加热后使用, 血清经用盐水稀释后加入4个血凝单位的病毒尿液测血抑滴度。

#### 七、温度敏感株的检测:

在33℃及39℃检测病毒株在鸡胚中的 EID<sub>50</sub>。方法见任贵方等报通<sup>[4]</sup>。

## 结 果

一、不同温度对猪与人甲<sub>3</sub>流感病毒血凝素的影响：结果见表2。

表2. 温度对各株病毒血凝素影响  
Table 2. Comparison of sensitivity of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> viruses from pigs  
and humans to temperature

病毒名称 virus	温 度 temperature							
	4 °C	37 °C	45 °C	50 °C	56 °C	60 °C	65 °C	70 °C
京科68-1	100	133	100	83	50	6.2	6.2	0
粤防72-243	100	100	100	69	38	25	12	0
鄂防75-8	100	150	200	125	50	50	25	0
粤防77-38	100	100	100	50	66	24	7	0
京科79-2	100	150	150	75	58	33	25	0
汉防82-135	100	100	75	62	46	6	6	0
猪79-163	100	200	150	100	50	54	25	0
猪81-56	100	125	100	62	50	50	25	0
猪82-123	100	150	75	69	46	20	0	0
猪82-189	100	150	75	69	34	17	0	0
猪82-230	100	200	200	25	25	0	0	0
猪82-247	100	150	75	50	42	23	0	0
猪82-251	100	100	50	25	25	15	0	0
猪82-252	100	100	150	69	37	3	0	0
猪82-262	100	266	133	66	66	16	4.2	0
猪82-265	100	100	100	40	37	0	0	0
猪82-335	100	116	150	50	57	53	0	0

注：以4 °C所测得血凝滴度为100%。

\*100% = the haemagglutinin titer at 4 °C

从表2可见：

1. 不同年代的人甲<sub>3</sub>病毒有一半毒株(3/6)在37°C作用30分钟后所测得的HA滴度比在4°C高，温度在45°C，大部份毒株(5/6)HA滴度仍和4°C一样或更高些，50°C条件HA滴度普遍下降，在65°C仍可测出低的HA滴度，70°C已完全测不出。其中以鄂防75-8特别耐热，HA滴度在各温度条件下，下降较慢，但切断温度仍为70°C。

2. 猪甲<sub>3</sub>毒株大部分(8/11)在37°C测得的HA滴度比4°C高，45°C仍然大部分毒株(7/11)HA滴度和4°C相同或更高，在65°C绝大部分毒株(8/11)已测不出HA滴度。

3. 在65°C的条件下1979年与1981年分离的猪甲<sub>3</sub>，与1979年人甲<sub>3</sub>相同，1982年分离的猪甲<sub>3</sub>，与1982年的人甲<sub>3</sub>相同，对65°C温度比1979年的毒株更敏感些。

分析以上所得结果表明，猪与人甲<sub>3</sub>毒株对温度的敏感性是一致的，其HA滴度普遍在37°C作用30分钟后比4°C高，在45°C仍维持较高，这是值得重视的问题。而人甲<sub>3</sub>毒

株相隔十几年, 抗原性已有明显改变, 但 HA 对温度的敏感性并无明显变化。它的这种生物学特性还是相对稳定。

二、不同pH对猪与人甲<sub>3</sub>流感病毒血凝素的影响:

表 3. pH 对各株病毒血凝素影响  
Table 3. Comparison of sensitivity of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> viruses from pigs and humans to pH

病 毒 株 virus	pH				盐 水 0.85% salt solution
	5	6	7	8	
京科68-1	50	60	100	100	*100
粤防72-243	70	100	100	100	100
鄂防75-8	25	50	100	100	100
粤防77-38	25	100	100	100	100
京科79-2	25	50	100	100	100
汉防82-135	25	50	100	100	100
猪79-105	12	50	100	100	100
猪81-56	25	50	100	100	100
猪82-123	40	40	88	100	100
猪82-109	16	33	66	100	100
猪82-230	50	100	100	100	100
猪82-231	31	50	75	100	100
猪82-247	16	66	66	71	100
猪82-251	25	100	100	100	100
猪82-252	25	50	100	100	100
猪82-262	50	50	100	100	100
猪82-264	12	25	100	100	100
猪82-265	25	50	100	100	100
猪82-321	8	50	50	66	100
猪82-325	16	33	80	80	100

注: 盐水对照滴度作为100%  
\*100% = the haemagglutinin titer in 0.85% salt solution

从表 3 可看出所有毒株 HA 滴度与 pH 的关系都是一致的, pH5 条件下 HA 滴度最低, 但在 pH 8 硷性条件下, 并不影响 HA 活性。

三、不同毒株 HA 的血球凝集范围:

所有毒株都可与表中的 14 种血球发生凝集, 但人毒株京科 68-1 对猴, 猪, 马, 牛血球凝集能力极差, 粤防 72-243, 鄂防 75-8, 粤防 77-38 对 14 种血球都能较好凝集, 而京科 79-2, 汉防 82-135 凝集这些血球能力居于其间。所有猪甲<sub>3</sub>与京科 79-2, 汉防 82-135 类似。此外我们注意到不论是猪甲<sub>3</sub>或人甲<sub>3</sub>毒株对人的血球能很好凝集, 却都对猪血球凝集差, 并没有因由猪中分离出的甲<sub>3</sub>而能更好地凝集猪血球。79 年以前的毒株都对鸽血球能较好凝集, 但人的汉防 82-135 毒株与所有猪甲<sub>3</sub>毒株对鸽血球凝集很差。见表 4, 因此不同年代毒株的各种血球凝集能力不完全相同。

表 4. 不同毒株血球凝集范围  
Table 4. Comparison of agglutinating ability to red blood cells between pig and human H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> viruses

毒株 virus	血 球 种 类 RBC ( GMT of agglutination )													
	鸡 chicken	鸭 duck	鹅 goose	鸽 pigeon	人 human	猴 monkey	猪 pig	马 horse	牛 cattle	羊 goat	狗 dog	豚 鼠 guinea	大白 鼠	小白 鼠 mice
京科68-1	*100	100	100	100	100	12.5	12.5	12.5	12.5	25	50	100	50	50
粤防72-243	100	50	50	50	50	50	25	50	50	25	25	50	50	50
鄂防75-8	100	50	100	50	100	100	50	50	50	50	50	100	50	50
粤防77-38	100	100	100	50	100	50	25	50	50	50	50	100	100	50
京科79-2	100	100	50	50	100	50	3.1	12.5	12.5	12.5	25	50	50	25
汉防82-135	100	31.2	25	12.5	100	25	12.5	25	50	25	12.5	25	25	25
猪79-163	100	25	25	12.5	100	50	25	25	50	25	25	25	100	50
猪81-56	100	50	50	25	100	50	25	25	50	25	50	50	50	25
猪82-123	100	25	25	12.5	50	25	6.2	25	50	25	12.5	50	200	12.5
猪82-199	100	25	50	12.5	100	50	12.5	25	50	25	25	25	100	25
猪82-230	100	50	50	25	100	100	25	25	50	50	50	50	300	25
猪82-231	100	100	100	6.25	100	50	12.5	50	50	50	6.25	50	100	50
猪82-247	100	40	40	10	40	20	20	40	40	40	20	40	80	40
猪82-251	100	25	50	12.5	50	25	25	50	50	25	25	25	50	50
猪82-252	100	50	50	12.5	100	25	25	50	50	50	25	50	50	25
猪82-262	100	25	31.2	12.5	50	25	25	50	25	25	25	25	25	25
猪82-264	100	40	40	10	80	20	10	80	80	80	20	20	40	20
猪82-265	100	40	40	10	80	40	10	40	40	40	40	40	40	20
猪82-321	100	50	25	25	100	25	25	25	50	25	25	50	25	25
猪82-335	100	50	25	25	100	25	25	50	50	25	25	25	25	25

\*以鸡血球凝集效价为100%

100% = agglutinating titer of chick red blood

#### 四、对非特异性抑制素的敏感性:

由表 5 可见人甲<sub>3</sub>京科68-1仅对鸡血清( $\alpha$ 抑制素), 及马血清( $\gamma$ 抑制素)较敏感, 而对其它猪, 兔, 牛, 豚鼠, 鸡等血清中非特异性抑制素不敏感, 75年以后的人甲<sub>3</sub>毒株及所有猪甲<sub>3</sub>毒株对所测的 7 种动物血清中的非特异抑制素都非常敏感, 人粤防72-243敏感性居于其中。

为了排除这些血清中是否含有特异性甲<sub>3</sub>抗体, 我们将这些正常动物血清用霍乱滤液按常规法处理后, 再测定。结果见表 6。由表 6 可见有些动物血清的血抑滴度消失, 或显著下降至很低滴度。唯猪血清经用霍乱滤液处理后, 仍保存较高血抑滴度, 特别是对人汉防82-135毒株以及其他由猪中分离的大多数毒株血抑滴度仍很高, 可能是这些猪血清中含有特异的甲<sub>3</sub>抗体, 对于马血清, 豚鼠血清及兔血清中血抑滴度也未完全处理掉, 则不能肯定是霍乱滤液对这些血清中的抑制素作用不大, 或也存在甲<sub>3</sub>抗体。

表 5. 猪甲<sub>3</sub>型与人甲<sub>3</sub>型病毒对不同动物血清的非特异性抑制素  
Table 5. Comparison of sensitivity of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> viruses from pigs and humans to non-specific inhibitors

血清抑制素 sera inhibitor	病 毒 virus													
	京科 68-1	粤 防 72-243	鄂防 75-8	粤 防 77-38	京科 79-2	汉 防 82-135	猪 79-163	猪 81-56	猪 81-123	猪 82-199	猪 82-231	猪 82-247	猪 82-335	
猪 pig	1 2	< 10 < 10	40 40	160 40	< 10 < 10	< 10 < 10	640 80	< 10 20	320 40	160 80	160 80	160 80	160 80	80 10
兔 rabbit	1 2	20 < 10	80 20	320 80	80 < 10	40 < 10	80 20	20 10	80 20	80 20	80 20	80 40	160 20	20 < 10
牛 cattle	1 2	10 < 10	< 10 < 10	< 10 < 10	40 10	20 < 10	10 < 10	20 10	< 10 10	< 10 10	< 10 10	20 < 10	20 < 10	< 10 < 10
豚 鼠 guinea	1 2	10 < 10	20 20	1280 160	320 80	80 10	40 < 10	80 10	40 20	320 < 10	320 < 10	30 < 10	320 10	40 40
马 horse	1 2	40 < 10	40 80	1280 160	160 160	40 < 10	40 < 10	10 10	30 160	1280 160	1280 160	1280 160	1280 160	320 160
鸡 chicken	1 2	< 10 < 10	< 10 < 10	20 20	20 < 10	80 10	40 < 10	40 < 10	40 10	20 20	40 20	20 20	10 20	10 < 10
蛋 清 chicken egg protein	1 2	40 < 10	< 10 < 10	< 10 < 10	160 < 10	< 10 < 10	80 10	80 10	80 < 10	< 10 < 10	80 < 10	640 < 10	640 < 10	< 10 < 10
大 鼠 rat	1 2	< 10 < 10	40 < 10	40 < 10	< 10 < 10	< 10 < 10	80 10	< 10 10	40 < 10	40 < 10	40 < 10	40 < 10	80 < 10	20 < 10

1 = 未处理

2 = 血清经RDE处理

1 = no treated

2 = serum was treated by RDE

### 五、温度敏感株的检测:

对14株猪甲<sub>3</sub>毒株进行了测定, 未发现温度敏感株。除有5株在39°C比在34°C繁殖EID<sub>50</sub>低2个对数组外, 其它毒株在39°C与在34°C一样, 都能很好繁殖。

## 讨 论

实验结果表明, 不仅逐年从猪中分离出的甲<sub>3</sub>毒株, 其抗原性与当代人的甲<sub>3</sub>毒株相同, 而且其生物学特性如血凝素对热的稳定性, 对pH的敏感性以及血球凝聚范围, 对各种动物血清中非特异性抑制素的敏感性都与人79—82年的甲<sub>3</sub>毒株相似。因我们实验

表 6. 猪甲3流感病毒 t<sub>1</sub> 性状检测  
Table 6. Detection of nature occurring t<sub>1</sub> strains of H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>  
influenza virus from pig

病毒株 virus	在不同温度的感染滴度 EID <sub>50</sub> EID <sub>50</sub> at different temperature			病毒株 virus	在不同温度的感染滴度 EID <sub>50</sub> EID <sub>50</sub> at different temperature		
	34°C	39°C	差值 log <sub>10</sub> reduction		34°C	39°C	差值 log <sub>10</sub> reduction
猪81-54	*6.25	6.00	0.25	猪82-251	7.50	7.25	0.25
猪81-56	6.75	5.75	1.00	猪82-252	6.37	6.00	0.37
猪82-123	7.33	5.33	2.00	猪82-262	4.00	2.00	1.40
猪82-199	4.50	2.37	2.13	猪82-264	6.50	4.25	2.25
猪82-230	4.00	3.00	1.00	猪82-265	7.33	7.00	0.33
猪82-231	7.00	4.75	2.25	猪82-321	6.75	5.20	1.40
猪82-247	5.20	3.00	2.20	猪82-335	6.50	5.37	1.13

\*EID<sub>50</sub>以 log<sub>10</sub>/ml 的负数表示  
EID<sub>50</sub> expressed in negative log<sub>10</sub>/ml

室在进行动物分离期间,从未进行人流感工作,故也不可能是实验室内交叉污染。

在实验室将流感病毒繁殖在不同种属的宿主细胞,其某些生物学特性可能发生改变<sup>[5]</sup>,由此推测人甲<sub>3</sub>毒株进入猪群,其某些生物学特性也可能会发生改变。而我们所检测的几项生物学特性并未发生改变,有可能是所分离到的这些毒株,还刚从人传给猪,尚未影响到其生物学特性的改变。但这些毒株并不是偶然从猪中分离到,很可能是正在猪群中传播流行,因在1982年冬11—12月连续3次在武汉肉联厂分离到甲<sub>3</sub>病毒,并且分离率较高,可达10%。

朱既明等<sup>[6, 7, 8]</sup>认为流感病毒在自然界是以自然温度敏感株与强毒株混合群体方式存在。特别是1979—1982年人甲<sub>3</sub>病毒株中82.4%为温度敏感株。当甲<sub>3</sub>传到猪群,是否仍有温度敏感株存在?根据我们检测1979—1982年14株由猪中分离到的甲<sub>3</sub>病毒,没有一株为温度敏感株。分析其原因,可能是猪的正常体温为39—40°C较人体的温度为高,其鼻腔温度必然比人的高。因此在人群中弱毒的温度敏感株不能在猪的呼吸道繁殖生存。只有人群中毒力强的非温度敏感株才有可能在猪体生存。这样猪可能成为人甲<sub>3</sub>强毒株的储存者与散播者。由于在我国农村,大量人群与猪群有密切的接触,故这些储存在猪中的人甲<sub>3</sub>型强毒流感病毒株在流行病学中的作用是特别值得重视的问题。

分析不同年代人甲<sub>3</sub>病毒的生物学特性,我们所得结果与陶三菊等相似<sup>[9]</sup>。如京科68-1,不能很好凝集猴、猪、马和牛的血球,而我们测知不仅粤防77-38毒株血球凝集范围明显,比京科68-1广,而自1972年起,粤防72-243,鄂防75-8都已能较好凝集这些血球。但京科79-2、汉防82-135这些毒株对这些种类的血球凝集较差,因此可能是因毒株不同也有关。但是京科68-1的有些生物学特性确实是和72年以后的毒株明显不

同, 又如对非特异性抑制素的敏感性, 它仅对鸡血清与马血清略敏感, 而自72年以后的毒株全都对各种动物血清中的非特异抑制素很敏感, 为什么京科68-1与其他各年代毒株有明显不同, 原因还不清楚, 大多数猪甲<sub>3</sub>型与人甲<sub>3</sub>型毒株在37℃作用30分钟后其HA滴度都比4℃高, 45℃仍维持较高, 其原因不明。但我们认为尽管1968—1982年甲<sub>3</sub>流感抗原性已有明显变异, 但甲<sub>3</sub>型毒株几项生物学特性基本上是稳定而变化不大。

### 参 考 文 献

- (1) 田慕贞等, 待发表。
- (2) 田慕贞等; 1987《病毒学杂志》1:9。
- (3) 全国流行性感中心研究室, 1958 流感手册 人民卫生出版社。
- (4) 任贵方等, 1980 中华医学杂志 60:526。
- (5) Simanovsraya V.K., 1983, Acta Virol, 21:385。
- (6) Chu C.M. et al., 1982, J. of Virol 41(2):353。
- (7) 吴恩平等, 1984, 中国医学科学院学报4(3):157。
- (8) Oxford J.S. et al., 1980, J. Gen. Virol, 48:383。
- (9) 陶三菊等, 1980, 流行病学杂志 1(1):1。

## COMPARATIVE STUDIES OF INFLUENZA A (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) ISOLATED FROM PIG AND HUMAN II CHARACTERIZATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES

Tian Mu-zhen Lao Qun-ming Chen Shun-lan Feng Lin-lin

(Virology Institute, Hupei Academy of Medical Sciences, Wuhan)

The influenza A viruses (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) isolated from pigs each year were antigenically indistinguishable from contemporary human isolates in 1979-1982, the characteristics of biological properties were also similar.

The results showed that haemagglutinins of pig strains were similar to human strains by being heat sensitive, agglutinating to the range of animals red blood cells, sensitive of pH etc. There were some differences between the strains in various years by agglutinating various animals red blood cells. The dove red blood cells could be agglutinated better by all the human strains before 1979 than the pig strains in 1979-1982 and human strains in 1982.

We tried to select the naturally occurring temperature-sensitive strains among pig isolates but none of the 14 strains was a ts strains. It was possible that the body temperature of pig is higher than human body so that only virulent strains from human might multiply in pig hosts.