

医学科学译丛

肠道病毒专辑

1963

上海市医学科学技术情报研究站 編
上海市科委医药专业委员会传染病专题小组

上海科学技术出版社

医学科学译丛

腸道病毒專輯

1963

上海市医学科学技术情报研究站 編
上海市科委医药专业委员会传染病专题小组

上海科学技术出版社

內 容 提 要

本專輯選譯了近兩年來國外有關腸道病毒疾病和脊髓灰質炎活疫苗的科研論文和報導共 56 篇，分編為三大類：一、病原學，20 篇。對於脊髓灰質炎病毒研究的進展、各種診斷方法及其比較，有較詳細的報導。二、流行病學，19 篇。介紹口服脊髓灰質炎活疫苗後預防效果的觀察，以及本病毒的自然免疫力及其預防和消滅的方法。三、臨床部分，17 篇。說明柯薩奇及 ECHO 病毒在人類疾病中的作用，發生脊髓灰質炎時心血管系統改變、循環和呼吸功能障礙、物質代謝紊亂等一系列的變動情況。

本書可供國內從事腸道病毒研究的科研工作者及流行病學工作者參考。

醫學科學譯叢

腸 道 病 毒 專 輯

上海市醫學科學技術情報研究站 編
上海市科委醫藥專業委員會傳染病專題小組

*

上海科學技術出版社出版

(上海瑞金二路 450 號)

上海市書刊出版業營業許可證出 093 號

新華書店上海發行所發行 各地新華書店經售

上海新華印刷廠印刷

*

開本 787×1092 1/16 印張 19 插頁 1 字數 568,000

1963 年 12 月第 1 版 1963 年 12 月第 1 次印刷

印數 1—4,500

統一書號：14119·693

定 價：(十四) 2.70 元

編者的話

肠道病毒一般是指包括脊髓灰质炎、柯薩奇、ECHO 病毒的一大类病毒。除脊髓灰质炎已为人所熟知外,柯薩奇病毒及 ECHO 病毒經血清学和病毒学調查,証明在人群中亦有广泛的传播,并能引起疱疹性咽峡炎、无菌性脑膜炎、流行性肋肌痛、婴儿心肌炎以及类似脊髓灰质炎的瘫痪性疾患等一系列的疾病。还有若干型别的柯薩奇病毒与 ECHO 病毒,其致病性至今还不十分了解。由于肠道病毒与人类健康的关系非常密切,因而无论在科学研究方面或防治工作方面都值得加以注意。

我国自 1960 年起已开始大规模应用脊髓灰质炎活疫苗,事实証明它是安全有效的制品;但要消灭脊髓灰质炎的流行,还要在不同流行病学条件下对使用疫苗的方法、疫苗病毒与脊髓灰质炎野病毒同其他肠道病毒之間的干扰作用,以及接种疫苗后出现的中枢神經系統疾病的病原学和流行病学等問題,进行更深入的研究。

为了配合当前研究肠道病毒疾病和脊髓灰质炎活疫苗的需要,特从近两年来国外杂志发表的有关文献中选譯了 56 篇有关肠道病毒的病原学、流行病学、临床学以及某些国家在不同流行病学条件下应用脊髓灰质炎活疫苗的研究資料。这些資料对我国医学科学研究工作者有一定的参考价值。例如,在病原研究方面:日本学者中川洋、新宮正久的“脊髓灰质炎病毒研究的进展”,对脊髓灰质炎病毒的特性、特别是变异問題,有較全面的綜述;德国学者 R. Wigand 的“进行肠道病毒中和試驗时存在的困难”一文,对观察中和試驗結果时所遇到的困难作了精辟的分析;美国 Wilson Smith 在“脊髓灰质炎病毒的免疫反应”一文中,对絮状沉淀及絮状沉淀抗体及其与中和抗体的关系,有比較深刻的研究;K. A. Lim 及 M. B. Melnick 的“以混合抗血清組鉴定病毒型別”的一篇报导簡化了过去的过篩試驗,設計了組合混合血清的方法,并已应用于病毒的定型。

在肠道病毒的流行病学和脊髓灰质炎活疫苗的研究方面:苏联 M. П. Чумаков 院士报导了苏联 1959~1960 年大规模应用 Sabin 株活疫苗的流行病学效果,和疫苗病毒在人群中散布、干扰作用等問題;美国 A. B. Sabin 及 H. Koprowski 分別报导了在有肠道病毒广泛传播地区和在新生儿中应用活疫苗的研究,对实际工作和研究工作都有参考价值;日本窪田英夫和苏联 Л. А. Шекоян 在不同条件下研究了健康儿童感染肠道病毒的情况;匈牙利 И. Демек 等报导了 1958 年肋肌痛流行和新生儿心肌炎暴发的調查研究。在临床诊断和治疗方面:主要選擇了国外有关柯薩奇、ECHO 病毒引起各类疾病的临床特点,以及有关脊髓灰质炎病理、诊断、治疗的研究資料。例如苏联 A. Г. Думнова 报导的“儿童患急性脊髓灰质炎的心血管系統的改变”,Г. А. Коршунова 的“脊髓灰质炎患者尿內肌酸-肌酐指数”,美国 W. A. Spencel 的“致命性脊髓灰质炎的循环障碍”,日本中村恒男等报导的“Galantamine 对脊髓灰质炎后遗症的使用經驗”等,都值得我們参考。

本专輯对于选题和核稿工作,虽經进行了多次篩选和反复校正,但由于時間比較匆促,查閱的杂志种类不多,編譯人員的水平有限,因此,在内容和文字上尚存在很多缺点,

我們懇切希望病毒工作者和讀者們多提寶貴意見,幫助我們改進。

有關本專輯的出版工作,由上海科學技術出版社給予極大的支持,特此致謝。

編 者

1963年12月

目 录

一、病 原 学

1. 脊髓灰质炎病毒研究的进展.....李祖蔚譯 (1)
2. 进行肠道病毒中和試驗时存在的困难.....张孝秩譯 (7)
3. 用一种干扰素抑制脊髓灰质炎病毒核糖核酸的传染力.....高驥千譯 (15)
4. 脊髓灰质炎病毒的各种标志.....陈希声譯 (20)
5. 脊髓灰质炎病毒試管内标志的試驗方法.....陈希声譯 (25)
6. 肠道病毒对人胚和人羊膜細胞所致病变的比較.....曾瑞云譯 (27)
7. 哺乳类細胞对原型肠道病毒培养中的易感性比較.....杨嗣坤譯 (32)
8. ECHO-26、ECHO-27、柯薩奇 B-6 病毒的分离和特性.....王长安譯 (36)
9. 用两株成年羊腎传代細胞培养 ECHO、柯薩奇及腺病毒.....言穆琳譯 (40)
10. 脊髓灰质炎病毒的免疫反应 病毒絮状沉淀与絮状沉淀阻滯抗体的产生.....聞玉梅譯 (43)
11. 各种測定脊髓灰质炎組織培养中和抗体方法的比較.....徐桂林譯 (48)
12. 适于大批測定脊髓灰质炎抗体的一种微量方法.....刘翥廷譯 (52)
13. 以混合抗血清組鉴定病毒的型別: 在肠道病毒(柯薩奇和 ECHO 病毒群)定型中的应用.....葛治华譯 (57)
14. 中枢神經系統疾病患者中 B 組柯薩奇病毒中和抗体反应的观察.....王长安譯 (65)
15. ECHO-4 型病毒的鉴定和血清学診斷的改良方法以及毒株的选择.....李子华譯 (71)
16. 脊髓灰质炎實驗室診斷方法綜述.....楼性方譯 (76)
17. 从小儿麻痺症病人血液分离脊髓灰质炎病毒的新途径.....朱宝忠譯 (78)
18. 粪便中脊髓灰质炎病毒的快速血清鉴定法 I. 实验部分.....齐家仪譯 (79)
19. 粪便中脊髓灰质炎病毒的快速血清鉴定法 II. 理論部分.....应大明譯 (85)
20. 實驗室快速診斷脊髓灰质炎的一种改良方法.....周紹曾譯 (92)

二、流 行 病 学

21. 脊髓灰质炎口服疫苗的現况.....张柄瑞譯 (96)
22. 苏联居民口服 Sabin 株脊髓灰质炎活疫苗大规模免疫法研究的某些总结.....都康平譯 (102)
23. 波兰应用 Koprowski 減毒株脊髓灰质炎活疫苗的现场观察报告.....林尔昕譯 (111)
24. 1958年尼加拉瓜馬那瓜市脊髓灰质炎流行地区服用減毒活疫苗的效果观察.....夏立人譯 (118)
25. 其他肠道病毒大量存在的条件下, 大规模服用脊髓灰质炎活疫苗的效果观察.....蔣君遐譯 (125)
26. 婴儿服用脊髓灰质炎減毒活疫苗后不同免疫反应的观察.....徐君佩譯 (131)
27. 脊髓灰质炎疫苗株病毒在接触接种者的人群中散播的实际意义.....徐君佩譯 (140)
28. 脊髓灰质炎灭活、活毒及联合疫苗免疫效果的比較.....徐君佩譯 (144)
29. 消灭脊髓灰质炎的問題及其解决途径.....王惠芳譯 (148)
30. 脊髓灰质炎病毒隱性感染的調查 第一报: 关于隱性感染状况的长期观察.....陈方之譯 (152)
31. 健康儿童肠道病毒带毒状况調查.....都康平譯 (164)
32. 路易斯安那州脊髓灰质炎自然免疫力的研究.....邵 鈞譯 (167)
33. 肠道病毒及其在人类传染病病理学中的作用——无菌浆液性脑膜炎.....陆树范譯 (175)

34. 1958年匈牙利肋間肌痛流行和新生儿心肌炎暴发的病毒学研究.....都康平譯 (180)
35. Coxsackie B-2 病毒引起夏季热性病的流行.....齐家仪譯 (183)
36. 中枢神经系统的病毒性疾病 脊髓灰质炎疫苗接种对病因学的影响顾友梅、顾振声譯 (187)
37. 某住宅区 ECHO₉ 病毒感染流行中肠道病毒感染的临床及流行病学观察.....顾友梅、顾振声譯 (195)
38. 水中的氯对肠道病毒的影响.....欧阳佩英譯 (203)
39. 某托儿所使用两种球蛋白預防脊髓灰质炎的效果观察.....夏立人譯 (208)

三、临床部分

40. 柯薩奇及 ECHO 病毒在人类疾病中的作用刘湘云譯 (211)
41. 罗马尼亚 1958 年及 1959 年的柯薩奇病.....张孝秩譯 (218)
42. 小儿柯薩奇病毒感染的研究 第二篇 1955 年东京流行疱疹性咽峡炎的
临床观察.....錢 潮譯 (222)
43. 柯薩奇病毒感染引起的心肌炎与心包炎.....沈时霖譯 (226)
44. 中枢神经系统病毒性疾病的鉴别诊断和治疗.....沈时霖譯 (228)
45. 脊髓灰质炎的临床情况和实验结果 双重感染的意义和 Salk 疫苗对小儿
麻痹症的影响.....沈时霖譯 (236)
46. 儿童患急性脊髓灰质炎时心血管系统的改变.....陈鸿达譯 (244)
47. 致命性脊髓灰质炎的循环障碍.....戴瑞鴻譯 (247)
48. 急性脊髓灰质炎的物质代谢紊乱问题.....刘湘云譯 (252)
49. 脊髓灰质炎患者尿内肌酐-肌酐指数瞿治平譯 (253)
50. 脊髓灰质炎患者呼吸功能的动力障碍.....瞿治平譯 (257)
51. 急性脊髓灰质炎呼吸障碍的临床类型、分类方法及发病机制陆树范譯 (261)
52. Galantamine 对脊髓灰质炎后遗症的使用经验錢 潮譯 (267)
53. 脊髓灰质炎的治疗和康复治疗以及随访工作的经验和收获.....沈时霖譯 (272)
54. 脊髓灰质炎瘫痪前期的临床表现及疾病最初几天中的误诊分析.....刘湘云譯 (282)
55. 脊髓性小儿麻痹的整形外科治疗.....李 伟譯 (285)
56. 非脊髓灰质炎病毒与瘫痪病.....张孝秩譯 (293)

一、病原学

1. 脊髓灰质炎病毒研究的进展

作者 中川 洋, 新宮正久

譯自日本“臨床研究”1961, 38(6):4~9

一、緒 言

脊髓灰质炎的病原体, 早在1909年就由 Landsteiner 氏及 Popper 氏确定其为病毒。他們將患脊髓灰质炎死亡的小儿的脊髓乳剂灭菌后, 接种在恒河猴的脑内, 从而引起与人类相同的典型脊髓灰质炎的弛緩性麻痹。其后进一步用感染的病猴脊髓, 按同样的方法接种健康猴子, 使继续传代获得成功。可是, 在以后的一段长时间内, 除猴以外, 未能找到别的实验动物可用于脊髓灰质炎的研究。因此, 对脊髓灰质炎及其病毒的实验研究, 就受到了不少的限制。直到1939年, Armstrong 氏, 用脊髓灰质炎病毒的 Lansing 株(II型), 接种在棉鼠的脑内, 确定其能使它感染后, 才对脊髓灰质炎II型病毒的研究起了一定的促进作用。一直至最近几年以前, 人們还以为脊髓灰质炎病毒是严格的嗜神经性病毒, 但自从 Enders 氏等发现用人胎的非神经性组织培养, 能够使本病毒在试管内繁殖后, 现在更知道用其他种类哺乳动物的非神经性细胞, 特别是猴^①的肾细胞, 或用由人体组织而来的传代细胞, 譬如 HeLa 细胞, 也是比较容易于繁殖的方法。应用这些组织培养, 不但给脊髓灰质炎病毒的物理化学和生物学的性状-抗原性和病原学的研究, 以及变异或疫苗等研究, 带来了很大的发展, 而且使得从人体分离病毒和其型别的辨认, 得到了许多方便, 这对于诊断和流行病学的研究方面, 做出了巨大的贡献。因此, 在近几年来, 关于脊髓灰质炎的研究, 出现了许多惊人的成绩。有名的研究者 Enders 氏, Weller 氏及 Robbins 氏等在1954年曾获得了 Nobel 氏医学奖金。兹将脊髓灰质炎病毒研究的发展情况, 扼要述之如下。

二、脊髓灰质炎与肠道病毒

脊髓灰质炎病毒能在非神经性细胞内良好繁殖, 已如前述。实际上, 人类经口感染本病毒后, 病毒能从粪便中排出, 还有一部分可从咽粘膜中证明, 至于侵入神经系统而引起病变的例子, 倒还是比较少数。从健康人的粪便中所分离的病毒, 其中大部分是在肠道细胞内繁殖, 但对神经的亲合力很低。这样看来, 脊髓灰质炎病毒虽称为嗜神经性病毒, 但它的物理化学和生物学性状与柯萨奇 Coxsackie 病毒及人类肠道细胞致病性病毒 ECHO 很相类似, 而后两者同样对肠道细胞都具有亲合力, 所以这三者被总称为肠道病毒。

三、物理化学性状

脊髓灰质炎病毒的实际大小问题, Elford 氏等在1935年报告, 用超滤法测定其大小为8~12毫微米, 说是属于极小型的病毒。嗣后, 由于应用组织培养容易获得大量的病毒材料; 另一方面由于病毒

① 据金泉氏报告在制造病毒疫苗时, 认为可采用恒河猴及爪哇猴, 此外还有 *Macacus fuscatus*, *Macacus Cyclops* 也是好用的。——譯者注

提純方法的不断进步,能够获得极高度的提純病毒,所以对病毒的正确大小及其形态,可借电子显微镜来清楚地观察。如 Sabin 氏等用超离心机的分級离心法提純出来的脊髓灰质炎病毒,用电子显微镜观察,报告这病毒为球状,其直径为 27~30 毫微米。这个数值也已由其他研究者証实,认为是 28 毫微米。从别的測定法来看,例如超滤法为 24 毫微米,用超离心沉淀的沉降系数測定法为 25~30 毫微米,用电离輻射法为 20 毫微米,大致与上述的数值相一致。从以上測定的数值来看,可以知道它虽是比 Elford 氏等所报告的大得多,但它仍是属于小型的病毒。

在另一方面 Schaeffer 氏及 Schwerdt 氏,把猴腎細胞組織培养液作为培养脊髓灰质炎病毒的材料来源,用甲醇沉淀法、丁醇浸出法、分級离心法、添加核酸分解酶法、电泳法及浓度傾斜离心法等,可以得到高度提純的病毒材料,对此再加低温处理,终于成功地取出結晶。这个成就是动物病毒結晶化的开端,可說这是继 Stanley 氏将烟草花斑病毒結晶化后的又一新成就。在这个結晶形成的过程中观察病毒的形态时,还不象病毒在单独时那么圆整而是呈六角体形的,所看到的是有規則而密集的排列。对結晶的材料用紫外綫吸收光谱来看,在 265~280 毫微米之間有尖峰,显然这与核蛋白有关。进一步作化学的研究,发现这是由核糖核酸与蛋白质所构成,并明确了核糖核酸因被蛋白质所包裹着,所以很难受到核糖核酸分解酶的作用。尤其是最近,由于 Colter 氏等及 Alexander 氏等对脊髓灰质炎病毒用石炭酸处理,把核糖核酸从蛋白粒子分离成功,闡明了单用分离的核糖核酸,能使宿主細胞得到感染。

四、抵抗力

脊髓灰质炎病毒是一种最稳定的病毒。粪便中的脊髓灰质炎病毒,虽在夏季的温度,仍能保持活力几小时,如被带有粪便的蒼蝇或其他昆虫所污染的食物,亦能成为危险的传染来源。但經加热后(62°C 加热 30 分钟),就可以使食品中的脊髓灰质炎病毒完全灭活。据园田氏报告,在脱脂奶中的脊髓灰质炎病毒,用 37°C 温度处理 1 星期后,仍保持或多或少的感染力,但在 55°C 加热 15 分钟后,則几乎完全失去活力。他又指出在酱油及鮮牡蠣中所包含的脊髓灰质炎病毒,約在 1 星期以內,仍保持有感染力。一般认为脊髓灰质炎病毒,在相当宽的氢离子浓度范围(pH 3.8~8.5)內是稳定的。园田氏說,脊髓灰质炎病毒在食醋中相当稳定。对低温特別稳定,在 4°C 中可保持活力几个月,尤其是与 50% 的甘油水或有保护性质的蛋白同放在低温中,它的活力能保持 1 年以上。在干冰中經過几年后,感染力还是存在。虽經暴露于二氧化碳中或反复冰冻,但其活力几乎不受影响。在低温下,对乙醚很稳定这一点,是与脑炎病毒等有所不同的。而且脊髓灰质炎病毒对酒精、石炭酸、福尔馬林有一定的抵抗力,如要完全使它灭活,还需相当的时间。例如:福尔馬林的浓度为 0.3%,4°C 时需 3~5 天;在 4000 倍的稀释度,37°C 时約需 3 天可以使病毒灭活。用福尔馬林灭活对病毒的抗原性沒有破坏,所以, Salk 氏用它来制造疫苗,但为了使病毒完全灭活,还須保存于 30°C 經 3~5 天之后,方可使用。

此外,脊髓灰质炎病毒,对氧化剂、紫外綫照射却不稳定,它会較快地被灭活。經紫外綫照射灭活病毒的抗原性会降低,因而一般认为这不适用于制造疫苗。

脊髓灰质炎病毒与别的病毒一样,不論是在机体内或試管内均不能受抗菌素的影响。根据这种性质,才能讓我們在分离脊髓灰质炎病毒时,把抗菌素添加在标本內,以抑制污染細菌的发育,有利于分离质量的提高。

就一般病毒的抵抗力來說,含有細胞的与經過提純而不含細胞的病毒是不同的,后者比前者弱得多,脊髓灰质炎病毒亦不例外。例如:經過部分提純的脊髓灰质炎病毒 Lansing 株,在含有游离氯 0.05 p. p. m. (百万分之 0.05 的游离氯)的条件下, pH 为 6.85~7.40, 經過 10 分钟,一般认为可以灭活,但如有不断地被新鮮的咽粘液和粪便污染的机会,特別对游泳池中的游离氯,必須經常注意它有显著削弱效果的情况。

五、抗原性

脊髓灰质炎病毒由于抗原性的差异,起初被分为 Brunhilde 株、Lansing 株及 Leon 株这三个名

称。嗣后,对很多脊髓灰质炎病毒株,经过血清学试验后,证明这些病毒株,都可归入在上列三型之内,即是现称的I型、II型及III型。兹将属于各型的主要病毒株的名称介绍如下:

I 型: Mohoney 株(强毒株), LSc 株, Sabin 1 株, Lederle 1 株(后三者均是弱毒株)

II 型: MEF-1 株(强毒株), Y-SK 株, Sabin 2 株, Lederle 2 株(后三者均是弱毒株)

III 型: Saukett 株(强毒株), Sabin 3 株, Lederle 3 株(后两者均是弱毒株)

在各型病毒中,除能使机体产生特异性中和抗体的抗原以外,已经知道的还有补体结合性抗原。将病毒的組織培养液加热、福尔马林处理或紫外线照射,以使病毒灭活时,可将可溶性补体结合性抗原游离出来。这种抗原,对异型的脊髓灰质炎抗体存在着交叉反应。这种游离抗原的大小,据 Benyesh 氏等用电离辐射法所测得的是7~13毫微米。又据上述 Schaeffer 氏及 Schwerdt 氏所提纯的脊髓灰质炎病毒,用作为补体结合性抗原时,虽在高浓度下,也没有出现抗补体作用,而仍旧保持着型的特异反应。

六、动物实验与新宿主

脊髓灰质炎病毒除能使人类发生自然感染外,只有黑猩猩易感,但认为麻痹的发生率是低的。又如上所述 Landsteiner 氏等把病毒材料接种于猴子的脑内,证实能使其发生麻痹,以后用于对感染材料的病毒分离和辨认,在过去就只有把猴子作为唯一的实验动物。在1939年 Armstrong 氏开始采用棉鼠和小白鼠,他把II型 Lansing 株接种棉鼠和小白鼠的脑内,使它感染和适应。嗣后, Habel 氏^①等采用小白鼠的脊髓腔接种法,发现它能引起强度的感染。应用这个方法,不仅II型,就是I型及III型的脊髓灰质炎病毒,也证实了可以通过同样方法来适应于小白鼠。此外,II型 MEF-1 株,倘接种于乳幼田鼠的脑内,也能使其感染。经适应于乳幼田鼠的II型 MEF-1 株接种在鸡胚尿囊腔或卵黄囊内也能增殖。

关于脊髓灰质炎病毒的最重要的新宿主,或许应是试管内培养的非神经性细胞。

七、培 养

我们虽早就知道猴子是脊髓灰质炎病毒的实验感染的宿主,但由于成本高,来源不易,显著地阻碍了脊髓灰质炎病毒研究的进展。自从1949年 Enders 氏等应用非神经組織培养脊髓灰质炎病毒成功后,这不仅使病毒的研究,而且也使脊髓灰质炎的流行病学、感染途径、诊断等方面都获得了飞跃的进步,已如上述。又从 Enders 氏领先以后,加上许多专家的努力,对脊髓灰质炎病毒,不但可以用人胎皮肤、人胎肾、人胎肺、人子宫、人羊膜细胞、小儿包皮、增殖腺及扁桃腺、猴肾细胞及猴睾丸来作培养传代,并确定用 HeLa、FL、KB 细胞(请参考 Eagle, H. et al. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 91, 361, 1959)及由猴肾细胞传代的 MS 细胞(请参考 Kanda, Y. and Melnick, J. L.: Exper. Med., 109, 9, 1959)等的固定细胞株,也能使病毒增殖,而且发现在增殖中,有引起细胞破坏的作用,即细胞病变作用(Cytopathogenic effect 简称 CPE),我们可简单地经过这种 CPE 的观察来了解在組織培养中的病毒增殖情况。同时, CPE 可因同种免疫血清的特异作用而受到阻止,所以在试管内进行病毒的中和试验也就成为可能。由此可见一支试管中的組織培养,实际上相当于一只猴子的价值。兹将在脊髓灰质炎病毒培养中所常用的第一代猴肾细胞的培养方法介绍如下:

- (1) 将健康的猴子,用放血法杀死,在无菌操作下,取出它的肾脏。
- (2) 将肾脏放入磷酸盐缓冲液中,仔细洗涤后,除去肾的外被膜,用小刀切开使成两半。
- (3) 用镊子和剪刀摘除髓质部分,将皮质部分剪成细小的碎块。
- (4) 将皮质小块放进加温达37°C的0.25%胰蛋白酶液中,在电磁搅拌器中,不断旋转,以使细胞游离出来。
- (5) 每30分钟取出上层液,立即浸入冰浴中,以停止胰蛋白酶的作用。
- (6) 对所收集的上层液进行离心沉淀,除去上清液,将已沉淀的细胞,悬浮在生长液中。

^① 采用脊髓腔接种法,是我国李振翩氏首倡的, Habel 是其共同工作者。——审者注

(7) 計算細胞數,測定濃度,分裝小管。

(8) 保持在 37°C 內約一星期,可看到完全單層細胞層的形成。

按上列方法,用一只猴子的兩個腎臟皮質細胞,約能制成組織培養管 1000 個以上。這可以廣泛應用於疫苗的製造,病毒的分離和辨認等方面。

將脊髓灰質炎病毒接種於組織培養管中,保持 35~37°C 約 7 天,細胞發生完全病變,從試管壁脫落。倘取病人的糞便為材料,用新鮮糞便或用保存在低溫中的糞便約 0.5~1.0 克,在 Hanks 液或培養液中,制成 10~20% 乳劑,低溫離心沉澱,取其上層液加入青霉素(500 單位/毫升)及鏈霉素(0.5 毫克/毫升),接種在培養試管中,就可照上法培養之。為辨認增殖病毒,可用已知各型免疫血清與病毒混合後進行組織培養,從而檢查有無細胞病變作用出現(即觀察有無特异性中和反應的出現)。

初代猴腎細胞雖可能帶有潛在病毒,如: B 病毒、泡沫病毒(foamy agent),但猴腎細胞對脊髓灰質炎病毒有較高的敏感性,對外來影響的抵抗力強,方法簡單,宜於作大量培養,能產生高濃度的病毒等。因此,仍被人們所樂用。

除這種單層細胞培養外,曾有人採用組織塊血漿包埋法,但最近幾乎不為人所使用。

現知細胞病變作用強的動物病毒,就象嗜菌體在細菌菌苔上形成蝕斑(plaque)那樣,在單層細胞層上形成透明的空斑,脊髓灰質炎病毒亦能形成之。為了達到這個目的,可以用猴腎或睪丸細胞、人的 HeLa 細胞或羊膜細胞等。至於培養法可以用培養皿亦可以用培養瓶。1 個空斑是由 1 個病毒所形成。因此進行病毒的定量時,這是切實易行的方法,而且用這種方法就可能選出純粹原種的病毒克隆^①(virus clone),從而使對於增殖和變異的研究有了顯著的進展。為了更深入地觀察增殖,用猴腎細胞懸浮液,對單層細胞和單一細胞來進行研究,在感染後經過 4~5 小時的潛伏期,已能看出病毒的增殖,在 7~8 小時達最高點,據說從 1 個細胞所產生的病毒為 100~2000 個。

八、變 異

早就有人致力於動物病毒的變異研究,特別是關於用弱毒病毒製備活病毒疫苗的問題。脊髓灰質炎病毒變異的研究,在病毒遺傳學上,同時感到有很大的興趣。此外,關於弱毒脊髓灰質炎病毒的毒力測定和在逆轉變異的問題上,也是很重要的。

(一) 變異在病毒遺傳學上的應用

1. **i (inhibitor 抑制因子) 變異** 竹森氏等報告在正常牛血清中存在有對脊髓灰質炎病毒的抑制因子。在單層培養細胞上接種病毒,進行形成空斑的實驗時,將所用瓊脂分為兩組,第一組含有抑制因子,第二組不含有抑制因子。在含有抑制因子的瓊脂上能看出有小的空斑,但在不含有抑制因子的瓊脂上,形成大的空斑。再對用純化過的親代病毒,加上帶有抑制因子的培養液,做了好幾次的傳代以後,發現所增殖出來的是不易為已往用過的抑制因子所滅活的變異病毒。對這種變異病毒,在加有抑制因子的瓊脂里,它所产生的空斑是與親代病毒不同的大空斑。對這種空斑加以純化後,就可以得到變異株,對親代病毒可以 i^+ 表示之。這個 i 變異比較穩定,雖在不含有抑制因子的條件下傳代亦不改變,又被被抑制因子滅活的 i^+ 與 i 變異病毒進行比較時,則見前者顯著滅活,而後者較難於滅活。據說從免疫血清的中和曲線來看,在 i^+ 病毒與 i 變異病毒之間並無差別。

竹森氏等報告亦發現馬血清有抑制因子,加用這種抑制因子,進行病毒的傳代培養時,能得到對抑制因子不易滅活的變異病毒。

2. **cr (cystine-response 胱氨酸反應) 變異** Dubes 氏等認為脊髓灰質炎病毒所以在猴腎細胞能發生顯著的細胞病變作用,必須在培養基內含有胱氨酸,但已發現在不含有胱氨酸的反复培養以後,所得到的變異株並不需要胱氨酸。這種 cr 變異病毒中的一部分,因胱氨酸的濃度過高,就會妨礙它的繁殖,特稱為 cr^i 變異病毒。

3. **m (minute plaque 小空斑) 變異** 竹森氏等用 1.0% 馬血清傳代後,能看到它形成比親代病

^① “克隆”是“clone”的音譯。在醫學英和大辭典里譯為“分枝系”。——譯者注

毒的空斑小的变异病毒的 m 变异株。关于选择 m 变异的因子问题还不明了,但这种 m 变异,认为在一般传代中是稳定的。

4. 耐热性变异 森岡氏报告用 II 型病毒經 50°C 加热,对残存的病毒进行反复增殖后,可以得到抵抗 50°C 加热的变异。

(二) 脊髓灰质炎与神經病原性有关的变异

1. d (delayed 延迟) 变异 Vogt 氏等使脊髓灰质炎病毒在含有 0.4% 碳酸氢鈉的琼脂和 0.1% 碳酸氢鈉的琼脂培养基中形成空斑时,发现强病毒在上列两培养基中所产生的空斑的数量相同,而弱病毒在 0.1% 碳酸氢鈉琼脂中所产生的空斑数量显著减少,称为 d 变异。虽然这与病原性有一定的联系,但一般认为还不是完全平行的。

2. MS (monkey stable cell 猴腎稳定細胞) 变异 Kanda 氏等用猴腎細胞 (MS 細胞) 传代的病毒株,使它产生空斑,发现强毒株产生大的空斑,弱毒株产生极小的空斑。因此,认为对 III 型的强毒株与弱毒株的区别特别有效,可是 MS 細胞的这种性质,是否能在传代中永久不变,还待研究。

3. t (titrate 滴定) 变异 Lwoff 氏等对一批混合病毒,在 37°C 与 40°C 中培养后进行滴定时,发现强毒株在 37°C 与 40°C 中培养时的效价,大致相同,以 (t^+) 表示之,而弱毒株,在 40°C 比在 37°C 中培养时的效价显著减低,以 (t^-) 表示之。虽然这可能与病原性有相当的关系,但当然还有例外。

4. 低温适应变异 据 Dudes 氏等报告,通常在 37°C 中培养的病毒,改在 30°C 中培养后,也能在 30°C 中逐渐增殖得很好。但这种病毒株比亲代病毒的病原性为弱。而且对这种病毒再改用 23°C 进行传代培养后,认为可能得到病原性更弱的病毒。

5. CFt (Complement fixation titer 补体結合效价) 变异 新宮氏对补体結合反应的抗原,用不加热和 56°C、65°C、75°C、85°C 加热 30 分钟,与同种血清之間,进行塑胶板滴定法 (box titration),发现在弱毒病株对不加热的抗原所表现的反应最高,但在强毒株对加温至一定温度的抗原所表现的反应更高 (CFt 变异)。經詳細探討結果,认为病原性与 CFt 之間有相当的关系。据报告在 I 型脊髓灰质炎,到 CFt+75 为止的所有阶段的病毒,都存在有 CFt 变异,在 II 型則到 CFt+65 以上就不存在,III 型及 ECHO 病毒則到 CFt+56 以上就不存在。Coxsackie 病毒的 CFt 变异全是阴性 (CFt⁻)。

6. H (human) 变异 据 Gard 氏說过,通过肠道的病毒,其所形成的空斑,在人类的組織上比在猴腎細胞上所得的空斑数为低,这个称为 H 变异。曾考虑过拟利用这点性质,作为病毒株的标志,但还未发表詳細的报告。

7. A (amnion 羊膜) 变异 据新宮氏报称,用初代人羊膜細胞及初代猴腎細胞对同批混合的病毒进行滴定时,发现强毒株所表现的效价,几乎没有变化,但在弱毒株,用人羊膜細胞所表现的效价較低。这种性质称为 A 变异,强毒株在分类上以 A⁺ 来表示,弱毒株在分类上用 A⁻ 来表示。

8. E (elution 洗脫) 变异 Hodes 氏认为用二乙氨基乙醇水杨酸盐 (Diethylaminoethanol salicylate-DEAE) 纖維素对脊髓灰质炎病毒进行吸附洗脫时,发现强毒的 Mahoney 株在 0.02 M 的磷酸盐緩冲液中的洗脫是好的,但弱毒的 LSc 株的洗脫是不好的。这种性质仅限于 I 型,认为与神經毒力的强弱成比例,对这种性质称为洗脫标志 (E. marker)。

9. 与动物传代有关的神經致病性变异 发现对神經致病性最强的病毒,用 1~10 个 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dosis, 50% 的組織培养感染量) 接种于猴子脑內,能使猴子发生麻痹,但对最弱病毒虽用 100 万个 TCID₅₀ 亦不发生麻痹。在这两者之間,必然还存在各个阶段的致病性病毒。通常认为在猴子以外的动物进行传代,其結果就会对猴子失去致病性。Theiler 氏采用小白鼠传代, Koprowski 氏采用棉鼠传代,早告成功; Roca-Garcia 氏及 Cox 氏采用鸡胚传代,也告成功;还有 Enders 氏等报告了他們的成功实验,就是用人类組織細胞传代,証实能减弱病毒对猴子的致病性。

这許多成功經驗,在制造 Koprowski 氏, Cox-Lederle 氏及 Sabin 氏弱毒脊髓灰质炎疫苗的病株时,发挥了很大的作用。

关于神經致病性的遗传,特别是稳定性,是一重要問題,但无论过去或现在,都还未能完全了解清

楚。因此，我們要慎重地對待這個問題，也就是說要考慮到兩種可能性：其一是对猴子有神經致病性，不應肯定說，它对小儿也一定有神經致病性；其二是对猴子沒有神經致病性，不應否定地說，它对人类就一定沒有神經致病性。

經過猴子以外的動物傳代所得到的弱病毒，将它通过人的腸道，往往能发现逆轉變異 (back mutation)。在給小儿服用 Sabin 氏弱毒活疫苗后，其所排出病毒的一部分，应用与猴子的致病性有关的試管内标志，如 d, t, MS, CFt 等，均能从阴性变为阳性。Melnick 氏等的报告，将排泄的这种病毒的一部分，接种于猴子的脑內及脊髓內，其致病性确实有所增强。这种弱毒的病毒株由于通过人的腸道而发生逆轉變異，有变为强毒株的傾向，认为这是由于腸內的某些因子所引起的。关于这些因子問題，目前还不明白。這個問題的提出，特別是在采用弱毒脊髓灰質炎疫苗时，更显出了它的重要性。

九、毒力測定法

脊髓灰質炎病毒的毒力測定法，首先是对弱病毒疫苗的毒力測定，其次是从服用疫苗者分离出来的病毒毒力測定等問題上，值得加以重視。

(一) 应用动物測定脊髓灰質炎病毒的毒力

脊髓灰質炎病毒的毒力測定，可列举：猴的脑內接种法，猴的脊髓內接种法，猴的經口服用法及小白鼠的脊髓內接种法。过去常用猴的脑內接种法，但现已知脊髓內接种法比脑內接种法更敏感，約为 $10^3 \sim 10^4$ 倍。同时知道嗜神經毒力的强弱，除与病毒本身的性质有关以外，还和病毒所接触的神經細胞的种类有关。就是，脑細胞的抵抗力比脊髓細胞为强，即使同属脊髓細胞，黑猩猩的比猴子要强些，而人类的則比黑猩猩更强。

应用口服法的毒力測定，采取自然的感染途径应当是最好的方法，但在实际上由于它較脑內接种法的敏感性差，所以除了为特別的目的以外，是不能使用的。从腸道的敏感性來說，人的腸道的敏感性是最强的，其次的順序为黑猩猩、蟹猴 (Macacus crebrenus)，这是与神經細胞的敏感性成正比的。小白鼠脊髓內接种法，过去只用于 II 型脊髓灰質炎，现在 I 及 III 型，亦已有适应脊髓腔的可能。

(二) 用組織培养来作脊髓灰質炎病毒的毒力測定

用猴来測定脊髓灰質炎病毒的毒力，需要較大的費用和熟练的技术，所以存在有一定的困难。因此，期望能有試管内測定法，在目前已經知道有 d, MS, t, H, A 变异等标志。这些标志虽非所有的性质和傾向都一致，但是考虑脊髓灰質炎病毒，从侵入机体到达神經細胞为止的过程中，毒力也不可能以单一的标志而表现出来。毒力有种种作用，例如向腸道的吸附能力，在腸道內的增殖能力，向血內的移行能力，对神經的亲合力，在神經細胞的增殖力等，按上列許多的变异标志加以整理就能知道有一定的标志，或者是由許多标志相結合而有所表现。因此，采用試管內的标志对毒力的測定就成为可能。

(三) 用血清反应来作脊髓灰質炎病毒的毒力測定

补体結合效价变异标志 (CFt marker) 与本測定法虽属同一范畴，但前者的标志本质，其感染粒子的直径約为 28 毫微米，而补体結合性抗原的感染粒子約为 8 毫微米，认为是由于补体結合性抗原与病毒粒子的离解有难易的緣故。从这个事实暗示病毒的物理化学性状与致病性的关系。

(四) 根据物理化学性状来測定脊髓灰質炎病毒的毒力

II 变异标志就属于这个范围。用二乙基胺-乙醇水杨酸 (diethylamino-ethanol salicylate) 的纖維素，从它的洗脫狀況，发现在强毒的 Mahoney 株与弱毒的 LSc 株之間的差別，可能因所用的脊髓灰質炎病毒株較少，必須在今后作进一步的探討。

十、結語

常常提到过，关于闡明脊髓灰質炎病毒性状的各种研究，是在应用了 Enders 氏等的組織培养法后才得到发展。由于本病毒具有較好的稳定性，所以用它作动物病毒結晶的研究才开始获得成功。利用了高度提純的病毒材料，从而能逐漸地对它的形态、化学組成等有所明确。但是，象小型病毒的內部构造

的詳細情况,則仍未获得解决。在另一方面,由于应用了組織培养才能进行病毒的分离、辨认、特别是制造疫苗等,这样就在诊断、預防及流行病学的研究范围内,发挥出巨大的力量。最近关于活疫苗投入实际应用阶段的問題上,还是以毒力测定法和毒力的回复,作为研究的重点。輝煌的成績虽已出现,但还存在着不少問題有待于今后的研究。

(李祖蔚譯 陈希声校 沈鼎鴻、高驥千审)

2. 进行肠道病毒中和試驗时存在的困难

作者 R. Wigand^①

譯自西德 "Zbl. f. Bakt., I Orig." 1960, 177(4):504~517

利用免疫血清对肠道病毒进行中和試驗具有显著的型別特殊性,因此这个試驗便被采用为鉴定病毒型的良好方法。此外,在由某种病毒型造成的流行中,要对其所致疾病作出诊断、以及对于某一范围居民的受染程度进行测定,应用这种中和試驗来証明人体內的抗体也有重大的意义。在組織培养小瓶內进行的中和試驗,往往能够直接定出病毒的型別。除了脊髓灰质炎病毒以外,在 Cocksackie B 組病毒及 ECHO 病毒方面常会遇到困难。这些困难在于:当早期查看結果的时候,血清的中和滴度往往会比預期的为低;而在晚期查看結果的时候,中和现象却可以完全消失;或者在极端的情况下,在早期查看結果时甚至就看不出有肯定的中和现象。以下将选择一些例子來說明发生这类困难的原因,以及克服这类困难的途径。

材料与方法

組織培养 按照一般方式(Ramos-Alvarez 及 Sabin 两氏,见 J. A. M. A. 167: 147, 1958)制备好經胰蛋白酶处理过的爪哇猴(Cynomolgus)的原始猴肾培养。生长培养液是由 Hanks 氏液加入 2% 小牛血清及 0.5% 乳白蛋白水解物所組成,而每小瓶內的維持培养液則由 2 毫升 pH 7.5 的 Earle 氏液加入 0.5% 乳白蛋白水解物所組成(但不加入血清)。制成的組織培养于 6~12 天后接种病毒。为了获得病毒蚀斑(Plaques),作者等在瓶內按照 Hsiung 及 Melnick 两氏的方法(Virology 1:533, 1955)进行操作。

病毒 經过猴肾組織培养的病毒株在制成悬液后保存于 -18°C 的温度,只有 Cocksackie B 2 型病毒株則保存于干冰內。为了进行病毒的滴定:按每 10 倍稀释的病毒悬液于每小瓶內各接种 0.2 毫升,每个稀释度接种 4 小瓶,而以 7~10 天內的最后有 50% 示細胞致病作用(der cytopathogene Effekt)的稀释度作为病毒滴度。

抗血清 标准的抗 ECHO 猴血清得自美国小儿麻痹症国家基金会的肠道病毒委员会(见 Amer. J. Publ. Health 47:1558, 1957),另外一分得自 New Haven 的 Melnick 博士。部分家兔抗血清是用高度免疫方法在自己实验室內制备的;此外,所用的柯薩奇 B 組家兔抗血清是微生物学联合公司(Microbiological Associates Inc.)的出品。全部血清都保存在 -18°C ,应用前并不加温。

中和試驗 抗血清按每 5 倍的方式稀释;病毒則用含 0.5% 乳白蛋白水解物的 Earle 氏液稀释,使 0.1 毫升具有約 100 ID_{50} 的剂量(ID_{50} 是能在 50% 組織培养中引起細胞致病效应的病毒感染量——譯者)。将相等量的抗血清稀释液及病毒稀释液混合后放置于約 25°C 的保温箱內一小时。然后将混合液

^① 著者是在美国俄亥俄州辛辛那提大学医学院 A. B. Sabin 教授领导的儿童医院研究所內进行本文实验的。——譯者注

接种于 4 个培养小瓶内,各 0.2 毫升。在每次混合过程中,都同时作一次病毒滴定。在接种有 100ID₅₀ 的病毒对照小瓶内的细胞破坏约达到预期程度一半的一天,即开始查看中和试验的结果(“早期查看”),此后每 2 天查看结果一次,直至接种后的第 8 及第 10 天(“晚期查看”)。血清的中和滴度及病毒滴度都按照 Reed 及 Muench 两氏的方法进行计算。作小白鼠中和试验时,则将血清及病毒的混合物 0.05 毫升皮下注射于生后 24 小时的小白鼠体内,然后在 14 天内观察其发病率及死亡率。

結 果

突破倾向^① 前面提到过的“突破(Durchbruch)”,即血清滴度由早期查看结果到晚期查看结果显著降低的现象,是很常见的。这种突破倾向与血清的种类及性质并无关系,主要是随着有关病毒株而发生。在 Cocksackie B 组的各种病毒株中间,我们发现了具有轻微、中度以及强烈突破倾向的病毒株。在所有试验中,这些病毒株对各种血清几乎表现了相同的情况。除了病毒株的独特性之外,突破倾向也与所用病毒的剂量大小有关(应用大量病毒时较易发生突破,同时其突破现象也比较强烈),而且在一定程度上也与小瓶内的组织培养性质有关(良好的组织培养能增加突破的机会)。以后还将说明,病毒株的本身状况对于其突破倾向也可能有一定关系。

为了举例说明两个病毒株的不同突破倾向,我们在表 1 中表明了用 ECHO 9 型病毒的原型株(Hill 株)及 1957 年从 Milwaukee 市一名病人身上分离所得的“流行株”之间所作定量的交叉中和试验的结果。在表中的每一格内,上下分列了早期查看及晚期查看的滴度,从这里可以看出原型株的中和滴度的早期查看与晚期查看的结果是相同的,然而流行株对两种血清都有晚期查看滴度下降到早期查看滴度 1/10 的现象。至于其他例子的突破倾向的差异情况则见表 2 及表 3。

表 1 ECHO 9 型病毒的原型株与流行株的血清学试验结果比较

病 毒	对 下 列 病 毒 株 的 猴 抗 血 清 的 中 和 滴 度	
	原 型 株	流 行 株
原 型 株	32,000 *	1000
	32,000	1000
流 行 株	1000	1000
	100	100

* 用 0.1 毫升血清与 100 ID₅₀ 病毒作用后的 50% 效应。每格内的上一行表示早期查看的结果,下一行为晚期查看的结果(以后各表均如此)。

“Prime”^② 关系 从表 1 还能看出一种情况,即如果我们单注意早期查看的结果,用 ECHO 9 型原型株抗血清对流行株的中和滴度要比原型株约低 32 倍。相反的,由流行株制成的抗血清对流行株及原型株的中和滴度则是相等的,这种类型的抗原关系,就称为“Prime”关系。流行株则称为“Prime”株。推测起来,“Prime”株的抗原结构可能要比原型株复杂些,因此原型株的抗血清不能完全中和 Prime 株。值得注意的是从流行中分离得到的所有 ECHO 9 型病毒株之间,在血清学方面都是相似或相同的(Tyrrell 氏等, 1958);但是这些病毒株与原型株倒并不相同。关于这一点我们(Sabin 氏等, 1958)和 Wesslén 氏等(1958)都曾有过报导。

“Prime”关系在肠道病毒方面很常见。譬如 ECHO 病毒的 5, 6, 7, 9, 11 及 13 (肠道病毒委员会, 1957)以及 22 型(作者与 Sabin 氏未曾发表的资料)方面就已经发现有这种“Prime”关系存在,可能在其他的型中也有存在。当然,同时也应该注意到在经过多次传代以后,个别病毒株的可中和性(Neu-

① 系指突破早期的血清中和界限之意。

② 从文内对“Prime”的说明来看,可以知道,这字倘用一般的几种译词,不能确切说明问题。为了避免误译,暂用原文。——译者注

tralisierbarkeit)也可能会有所改变,从而使这些已经发现的抗原性方面的差别在以后的试验中有所变动(詳后)。在11株曾经作过交叉中和试验的柯萨奇 B₂, B₃ 及 B₄ 型病毒中,我们发现15对交叉试验中存在有11次“Prime”关系[作者与 Sabin 氏已发表(1958)及尚未发表的资料]。表2上半部柯萨奇 B₂ 型病毒的 B. V. A. 96 株就是一个“Prime”株的例子,这个病毒株还显示了与原型株 Ohio 1 不同的、对同株血清及异株血清的显著的突破倾向。

表2 柯萨奇 B 組同型病毒的不同株之间的抗原性与其他性质的差别情况

病 型	毒 株	用家兔抗血清的中和滴度		說 明
		Ohio I*	B. V. A. 96	
B ₂	Ohio I	1100	2000	抗原方面的相应关系及突破与可中和性的差别
		1000	750	
		50	1200	
		6	100	
B ₄	Powers	Powers*	Texas 13	相互的抗原差别
		400	60	
		300	35	
		200	1280	
		30	960	

* 原型株。

相互的抗原差别 与“Prime”关系中存在的差别相反,在柯萨奇 B 組病毒株的15对交叉中和试验中,仅一对、即柯萨奇 B₄ 型病毒的两个株出现相互的抗原差别(表2下半部)。两株病毒各对其同株血清具有较异株血清为高的中和滴度。同样, Philipson 及 Rosen 两氏(1959)最近发现 ECHO 11 型病毒的原型株与由 Philipson 及 Wesslén 两氏(1958)所分离得的、原来称为 U 病毒的 ECHO 11 型病毒株之间,存在着更为显著的相互抗原差别。

可中和性的差别 一种免疫血清对其同株病毒 A 的中和滴度,甚至在早期查看结果时,也可能较其同型的异株病毒 B 为低。由于某种原因,病毒 A 较病毒 B 难于中和。表2中的病毒 B. V. A. 96 株就较病毒 Ohio 1 株难于中和。表3更列出了一个特别明显的例子。用 ECHO 24 型病毒的89株所制备的家兔抗血清,与其本身病毒株的中和滴度,要比对于原型病毒株93低10倍。病毒株93的抗血清对89株的中和滴度也较93株为弱。这两株病毒并无抗原性方面的差别,而是89株的可中和性原来就比较差;此外,与93株不同,89株还具有显著的突破倾向。

表3 ECHO 24 型病毒的两个株之间的可中和性及突破倾向的差别

病 毒 株	对下列病毒株的家兔免疫血清的中和滴度	
	93	89
93 (原 型 株)	160	1600
	160	1600
89	50	160
	16	10

表4还列出了另外一个例子。1957年在 Milwaukee 市所分离得的3个 ECHO 病毒株,起初无法鉴定其类型。但是后来应用了在高浓度下的高效价抗 ECHO 16 型病毒的猴血清始鉴定这3株病毒为 ECHO 16 型病毒。起初应用的、由 Melnick 氏制备的 ECHO 16 型猴血清,原来对于同株病毒具有1:500以上的滴度,可是对这3株新分离的病毒以1:10的稀释度进行试验,即使是早期查看的结果也并

不出現中和作用、或者仅有很微弱的迟緩的細胞致病效应。这个现象可說并不奇怪,因为国家基金会制备的、作用更强的猴血清,对新分离的病毒株的中和滴度,也要比对同株的原型株(Harrington株)的滴度在早期查看时低 200~600 倍(根据表 4 中的数字計算,应改为 120~600 倍。——譯者)、晚期查看时低 50~150 倍。全部病毒株都有明显的突破傾向, Neva 氏在 ECHO 16 型病毒方面也发现了这一现象(1957)。至于这些新分离的 ECHO 16 型病毒株,对于原型株來說是一种相互关系或“Prime”关系、或者仅是这些病毒株难于中和的問題,由于不曾对这些病毒株制备抗血清并进行交叉試驗,因此还不能加以确定。

表 4 ECHO 16 型病毒的两种“原型”抗血清对 ECHO 16 型原型株及其他三株 ECHO 16 型病毒(Milwaukee 市, 1957)的中和作用

病 毒 株	ID ₅₀	查看結果的日期	对下列猴体血清的中和滴度	
			国家基金会	Melnick 氏
Harrington (原型株)	32	5	56,000	560 ⁺
		9	3,800	160
P. L.	64	5	320	<10(V)*
		9	26	<10
S. C.	20	5	450	<10(V±)
		9	72	<10
B. N.	20	5	90	<10
		9	26	<10

* (V)表示早期查看結果时迟緩的細胞致病作用。同时用 200~640 ID₅₀ 进行了重复的中和試驗作为对比。

多数病毒株的交叉中和試驗 对 2 个以上病毒株利用其“Prime”的免疫血清进行交叉中和試驗,将产生很复杂而且难以解释的結果。作者与 Sabin 氏在 Coxsackie 病毒方面曾經发现过这样的情况,如病毒株 B 对另一株病毒 A 处于“Prime”关系,同时病毒株 C 却又对病毒株 B 也处于“Prime”关系,即病毒株 B 本身可以以“象原型株样的”反应与病毒株 C 发生关系。这时候,“Prime”株一般具有較强的突破傾向,而且时常比原型株表现出較差的可中和性。

根据以上这些研究,可以知道 Ohio 1 株(B 2 型)、Nancy 株(B 3 型)及 Powers 株(B 4 型)等一般熟知的柯薩奇 B 組病毒的原型株,都很适宜于用来証明人体血清中的中和抗体,因为这些病毒株也可以很好地为同型病毒的异株血清所中和而且很少有突破傾向。ECHO 9 型病毒的原型株(Hill 株)也具有同样的性质。但是在另一方面,这些病毒株都不适于用来制备診斷用的抗血清,因为这些血清是要用来鉴定其他病毒株的。为了这个目的,抗原性质比較广泛的“Prime”株就适宜得多了。曾經作者与 Sabin 氏研究过的 Coxsackie B 組血清中,用 B. V. A. 96 株(B 2 型)、Stevens 株(B 3 型)及 Burrier 或 J. V. B. 株(B 4 型)等病毒株制备的血清,特別适用于鉴定同一型的异株病毒(作者与 Sabin 氏, 1958)。

Wenner 氏等曾經在脊髓灰质炎 II 型的一系列病毒株中发现过相互及“Prime”关系方面的抗原差异(1956), Karzon 氏在 ECHO 6 型的一些病毒株中也发现过这种差异(1957), McBride 用精細的方法(蝕斑系統中的反应动力学)也在脊髓灰质炎 I 型的許多病毒株中发现了这种差异(1959)。所以抗原方面的这种异株性(Heterogenität)可能在肠道病毒中很广泛地存在(包括脊髓灰质炎病毒在內),型与型之間也許只是在程度及頻率方面有些不同而已。

一次小白鼠传代的影响 如果把柯薩奇 B 組的一株病毒通过小白鼠,然后将小白鼠标本在組織培养中进行中和試驗,此时这个病毒,对于同一种血清,就可能出现較弱的中和滴度,并且出現强烈的突破傾向。譬如在柯薩奇 B 1 型病毒的 Conn. 5 株(表 5)用一种同株血清及 2 种异株血清(表 5 中未列入)