

亚洲甲型流感病毒发源的研究

I. 1957年洛阳市两次流感流行的病毒类型及其相互关系*

梁荣根 張育琴

(卫生部生物制品研究所, 北京)

馬美松

(洛阳市卫生防疫站, 洛阳)

楊 敏

(卫生部生物制品研究所, 北京)

流感病毒的特点之一是其抗原性结构的易变性。朱既明^[1]总结了40余年来甲型流感病毒的演变过程: 从1918年到現在甲型流感病毒最少经历过4次抗原性大转变, 即猪型 (Swine, 1918—1919), 原甲型 (A, 1934—1943), 亚甲型 (A₁, 1946—1956) 及亚洲甲型 (A₂, 1957—), 每次出现一个新的亚型后, 它代替了旧的亚型而成为流行的主要病原。由于人羣缺乏对新亚型的免疫力, 随着新亚型的出现就会发生世界规模的流行。因此研究新的亚型的发源及其形成过程, 对了解病毒变异规律与流感的防治, 都有重大意义。

关于A₂病毒的发源问题许多学者曾提出了假设: Mulder及Masarel^[2]发现1957年荷兰A₂流行前, 70岁以上的老人的血清中有10.4%含有A₂抗体, 由此推测A₂病毒可能与1889—1890大流行的病原有共同抗原成分。Andrewes^[3]结合Mulder等的发现, 认为A₂病毒可能是1889—1890年的病原在某种未知的动物宿主中保留下来而再度引起流行的。Горбунова^[4]根据A₂与原甲型病毒株的交互血凝抑制试验结果, 认为A₂发源于原甲型。Соколов等^[5]则认为A₂与猪型有一定的关系。这些假设还有待更多的科学资料证实。

1957年初洛阳市曾经发生了两次流感的流行。第一次为局限性流行, 自1956年12月中旬开始, 于1957年1月上旬达到高峰, 持续时间约达20余天, 从患者咽洗液中分离出A₁型病毒。后来, 在3月中旬正当全国流感大流行的时候^[6,7], 又暴发了第二次流行, 流行地区极为广泛, 发病率高达60%左右, 在这次流行中分离出A₂型病毒。我们对这两次流行中分离的病毒进行了研究, 并对某学校在两次流行中的发病率进行了调查。由于这些调查研究的結果对A₂型的发源问题有所启示, 故将其扼要报告如下。

一、材料与方 法

(一) 咽洗液标本的采取与运送 用生理盐水洗漱患者咽部, 每管约十余毫升, 用广口冰壶将标本

* 本文蒙朱既明所长审阅, 特此致谢。
本文1962年9月27日收到。

運送至北京。

- (二) 病毒分離方法 用雞胚羊膜腔接種法分離。
- (三) 補體結合試驗 可溶性抗原之製備：用感染雞胚的尿囊膜凍化三次製成。

豚鼠免疫血清製備：先以病毒尿液滴鼻感染小白鼠，3、4 天后取其病變肺組織製成懸液，以鼻腔法免疫豚鼠製成。

試驗方法：將抗原自 1:2.5 起連續稀釋，血清固定為 4 個單位。

- (四) 血凝抑制試驗 本實驗用的雞免疫血清均用霍亂濾液處理除去非特異抑制素。

以上詳細方法均見流感手冊^[8]。

二、結 果

(一) 病毒分離

在 1957 年 1 月的局限性流行中，洛陽市防疫站於 1 月 7 日採取了 9 例患者咽洗液標本送至北京作病毒分離。共進行了 7 份標本的病毒檢查（其中 2 份各由 2 例標本混合而成），分離出流感病毒 5 株。3 月中旬該市發生流感大流行，市防疫站在 4 月 5 日、6 日又採取了患者標本多份運送至北京。我們對其中 9 例標本單獨作病毒分離，其餘的標本分別合併為 2 份混合標本進行，結果分離出病毒 7 株。兩次病毒分離的結果見表 1。值得注意的是 × 學校在兩次流行中均分離出流感病毒。

表 1 1957 年初洛陽市兩次流感的病毒分離結果

单位	患者姓名	采取标本日期	病毒分离			分离结果	病毒株名称
			鸡胚代数				
			第1代	第2代	第3代		
×学校	朱广×	1月7日	0/5	4/9	8/8	+	洛57-1
	梁德×	”	1/5	1/7	8/8	+	洛57-2
	邵泽×	”	0/6	0/6	0/6	-	
	赵云×	”	0/6	0/5	0/5	-	
	朱德×	”	2/7	5/5	6/6	+	洛57-3
	馬兆×及張玉×	”	1/6	3/6	5/5	+	洛57-4
	楊士×及佟健×	”	1/6	2/4	5/7	+	洛57-5
×学校	王志×	4月5日	1/4	4/4	3/3	+	洛57-6
	楊思×	”	1/5	3/3	3/3	+	洛57-7
	李业×	”	3/3	5/6	3/3	+	洛57-8
	安大×	”	2/4	4/5	4/4	+	洛57-9
	刘×	”	0/5	0/6		-	
	刘迪×	”	0/5	0/5		-	
	××所	雷結×	4月6日	0/2	1/6	3/5	+
赵榕×		”	1/2	3/6	4/4	+	洛57-11
宋桂×		”	0/4	0/5		-	
×学校及 ××所	混合 ₁	4月5日及6日	0/4	0/6		-	
	混合 ₂	”	1/4	4/4	3/3	+	洛57-12

注：分子代表陽性雞胚數目，分母代表收獲雞胚數目。分離結果陽性者以“+”表示，陰性者以“-”表示。

(二) 病毒鉴定

1. 补体结合试验: 用流感甲、乙两型豚鼠血清与洛 57-1、洛 57-3、洛 57-4、洛 57-8、洛 57-9 及洛 57-10 等 6 株病毒之可溶性抗原作补体结合试验, 其中洛 57-1、洛 57-3、洛 57-4 是于 1 月流行中分离的, 其他 3 株则在 3—4 月份大流行中分离的。试验中加入正常鸡胚尿囊膜抗原作为对照。结果见表 2。

表 2 流感甲型和乙型血清对 6 株洛阳新分离病毒的补体结合试验结果*

抗 原	血 清	
	甲型(PR ₈)	乙型(Lec)
洛 57-1	1:15	○
洛 57-3	1:10	○
洛 57-4	1:7.5	○
洛 57-8	1:5	○
洛 57-9	1:7.5	○
洛 57-10	1:30	○
PR ₈	1:50	○
Lec	○	1:17.5
正常尿囊膜	○	○

* 表中数字表示抗原滴度; “○”表示<1:2.5。

由表 2 结果看出甲型血清对 6 株新分离病毒的可溶性抗原均呈明显的阳性反应, 而乙型血清则呈阴性反应, 证明洛阳市两次流行所分离的病毒均属于甲型。

2. 血凝抑制试验: 为了进一步了解两次流行中所分离病毒的类别, 又用血凝抑制试验进行鉴定。自两次流行中各任选 4 株病毒, 即洛 57-1、洛 57-3、洛 57-4、洛 57-5、洛 57-6、洛 57-7、洛 57-8 和洛 57-9 等 8 株病毒, 在鸡胚传递 3—5 代后作成抗原, 与 PR₈ (A 型)、FM₁ (A₁ 型)、京 56-1 (A₁ 型)、Lee (B 型)、京科 54-6 (B 型)、1233 (C 型)、仙台 (D 型)、张 57-4 (A₂ 型)、A/sing/57 (A₂ 型) 之鸡免疫血清作血凝抑制试验。为了解亚洲甲型病毒的相别, 在试验中也包括了正常马血清^[9], 试验结果见表 3。

表 3 各类型流感标准血清对新分离病毒的血凝抑制效价

病 毒	血 清										判定
	PR ₈	FM ₁	56-1	Lee	54-6	1233	仙台	张57-4	A/sing/57	正常马	
洛 57-1	○	100	80	○	○	○	○	160	○	○	A ₁
洛 57-3	○	120	80	○	○	○	○	160	○	○	A ₁
洛 57-4	○	70	50	○	○	○	○	100	○	○	A ₁
洛 57-5	○	60	50	○	○	○	○	140	○	○	A ₁
洛 57-6	○	○	○	○	○	○	○	2240	1600	1600	A ₂
洛 57-7	○	○	○	○	○	○	○	1280	1600	480	A ₂
洛 57-8	○	○	○	○	○	○	○	2560	2240	480	A ₂
洛 57-9	○	○	○	○	○	○	○	40	80	○	A ₂
血清效价*	3200	1920	2240	400	320	1920	70	6400	560	—	

“○”表示<20;

* 表示该血清对本株病毒的效价。

从表 3 的结果可将此 8 株病毒的抗原性清楚地分为 2 组: 一组是洛 57-1、洛 57-3、洛 57-4 及洛 57-5 等 4 株病毒, 它们能够被 A₁ 型 (FM₁、京 56-1) 及 A₂ 型 (张 57-4) 的鸡免疫血清所抑制, 而不被 PR₈、Lee、京科 54-6、1233、仙台的鸡免疫血清及正常马血清所抑制。说明 A₁ 型和 A₂ 型血清对 1957 年 1 月所分离的病毒都有明显的抑制效价。考虑到当时在我国以及全世界各地 A₂ 型尚未出现, 故洛阳 1957 年 1 月的流行可以判断是

由 A₁ 型病毒引起的¹⁾。

另一組洛 57-6、洛 57-7、洛 57-8 及洛 57-9 等四株病毒與 1957 年 1 月分離的 4 株不同，除了不被 PR₈、Lee、京科 54-6、1233、仙台的雞免疫血清所抑制外，亦不被 A₁ 型 (FM₁、京 56-1) 的雞免疫血清所抑制，而 A₂ 型 (張 57-4 及 A/sing/57) 血清卻對這 4 株病毒呈很高的抑制效價 (其中洛 57-9 株為 II 相，故效價低)。從這些結果可以明顯看出 4 月份流行的病原是 A₂ 型流感病毒²⁾。

(三) 流行病學觀察

值得注意的是這兩次流行的病毒雖然屬於不同亞型，卻有一定的抗原關係。

為了查明曾感染過 A₁ 型病毒者在 A₂ 型的流行中是否有免疫力，我們曾對 X 學校 985 人作了流行病學調查。現將 1 月份 A₁ 流行時發病者與未發病者於 4 月份 A₂ 型流行時的發病率統計列作表 4。

表 4 洛陽市 X 學校在 1957 年 4 月份 A₂ 型流感流行時發病率統計

組 別	人 數	發病人數	發病率(%)
1957 年 1 月 A ₁ 型病毒流行時曾發病者	221	34	15.4
1957 年 1 月 A ₁ 型病毒流行時未發病者	764	436	57.1
合 計	985	470	47.7

由表 4 可以看出，在 1957 年 1 月曾罹患 A₁ 型流感的人於 4 月份 A₂ 型流行時發病者甚少，與未罹患 A₁ 型者比較，其發病率低 3.7 倍。

三、討 論

根據現有資料，A₂ 型病毒最早出現於貴州一帶^[10] (1957 年 2 月)，接着全國各地在 3、4 月份發生了大流行。本報告的材料證明 1957 年 4 月洛陽市分離的病毒為 A₂ 型流感病毒，表明 4 月的流行是 A₂ 型大流行的一部分。至於在 1957 年 2 月以前的流感的病原學據國內各地研究的資料，認為仍系 A₁ 型^[1]。其與後來全國大流行的病原——A₂ 型病毒的關係，尚無更多的資料。我們的結果說明 1957 年 1 月在洛陽市所分離的 A₁ 型病毒具有特殊的抗原性：一方面老的 A₁ 病毒如 FM₁、京 56-1 的血清對這些病毒的抑制效價較低——根據交互血凝抑制試驗的結果，洛 57-4 與 FM₁ 的抗原比為 1/30，與最近分離的京 56-1 為 1/16——說明 1 月分離的 A₁ 型病毒與過去分離的 A₁ 型病毒的抗原性有頗大的差異。另一方面 A₂ 型病毒血清對 1 月分離的病毒亦有一定的抑制作用，以後的研究並證明後者的血清對 A₂ 型病毒亦有一定的抑制作用。以上的結果初步說明 1957 年 1 月份流行的病毒，既與過去的 A₁ 型有共同的抗原成分，又與以後出現並引起全國大流行的 A₂ 型

1) 我們分離出洛 57-1、洛 57-2、洛 57-3、洛 57-4 及洛 57-5 等 5 株病毒後，在 1957 年 2 月即已進行了一次病毒型別的鑑定，此時尚未有 A₂ 型病毒之出現，故只以 PR₈ (A 型)、Lee (B 型)、1233 (C 型)、FM₁ (A₁ 型)、京 53-7 (A₁ 型)、京 56-1 (A₁ 型)、京 56-8 (A₁ 型) 的雞免疫血清對新分離的 5 株病毒作血凝抑制試驗，結果 5 株病毒僅能被 A₁ 型血清 (FM₁、京 53-7、京 56-1、京 56-8) 所抑制，當時即已肯定新分離病毒為 A₁ 型。本文所報告的乃是與第二次分離的病毒一起進行試驗的結果。

2) 另一次病毒鑑定證明洛 57-10 與洛 57-12 亦為 A₂ 型病毒。

有共同的抗原成分。对这些毒株的深入分析研究的结果,将在另文中报告^[11]。

流行病学调查的资料说明,在 1 月份经 A₁ 型病毒感染过的人们,对于 A₂ 型病毒产生了显著的免疫力。苏联学者 Slepushman 氏也曾获得类似的结果^[12]。该作者对某工厂进行了流感的流行病学观察,发现该厂在 1957 年 3、4 月份曾有过一次 A₁ 型病毒所引起的流行波,至 5、6 月份又发生了一次 A₂ 型病毒的流行,据观察统计发现曾罹患过 A₁ 型流感的人在 A₂ 型流行时与未患 A₁ 型者比较其发病率低 2.4 倍。全国流感中心研究室^[13]进一步的研究发现洛 57-3 这一类 A₁ 型病毒的抗原性是属于 D/56 组,同样的苏联在 1957 年 3、4 月份所分离的病毒也属于 D/56 组。

综合实验室研究与流行病学调查的结果,我们认为在老的 A₁ 型与 A₂ 型之间可能有中间的抗原类型存在,而洛阳市 1 月份流行的病原可能就是这种中间类型的代表。这种亚型之间的关系对研究亚洲甲型流感病毒的抗原性变异及其发源问题,提供了极为宝贵的资料,同时也表明如果用前一个亚型的最新病毒株来制备疫苗,对以后出现的新亚型的流行,可能会有相当多的预防效果。

四、总 结

1. 1957 年 1 月自洛阳市采取的 7 份患者咽洗液中分离出流感病毒 5 株,鉴定均属 A₁ 型。但是其抗原性与老的 A₁ 型 FM₁、京 56-1 已有相当大的差别。

2. 1957 年 4 月自洛阳市采取的 11 份患者咽洗液中分离出流感病毒 7 株,经鉴定均为 A₂ 型。

3. 观察到 1957 年 1 月份分离的 A₁ 型病毒与老的 A₁ 型和后来出现的 A₂ 型病毒均有交互抑制现象,初步说明这种亚甲型病毒即与原来的 A₁ 型以及 A₂ 型病毒有共同的抗原成分。

4. 流行病学观察的结果表明 1 月份曾经患过 A₁ 型流感的人在 A₂ 型流行时其发病率比未患过的人低 3.7 倍,说明前者的感染对后者产生了有效的免疫作用。

参 考 文 献

- [1] 朱既明: 中华医学杂志, 44: 117, 1958.
- [2] Mulder, J. & Masurel, N.: *Lancet* 1:810, 1958.
- [3] Andrewes, C. H.: in *Perspectives in Virology*, p. 184; Andrewes, C. H.: *International Conference on Asian Influenza, Amer. Rev. Resp. Dis.*, 83(2) Part 2:112, 1961.
- [4] Горбунова, А. С.: *Вопросы Вирусол.*, (4): 401, 1959.
- [5] Соколов, М. И., Гоу, Шу-де и Е Тянь-син: *Вопросы Вирусол.*, (5): 580, 1959.
- [6] 朱既明、肖俊、郝成章: 科学通报, (12): 373, 1957.
- [7] 梁荣根、满慧英、张育琴、汤飞凡: 科学通报, (13): 407, 1957.
- [8] 全国流感中心研究室编: 流行性感冒手册, 1958.
- [9] 刘锦棠、董葵塘、朱既明: 微生物学报, 7: 284, 1959.
- [10] 黄粹珠、周礼祺: 微生物学报, 6: 433, 1958.
- [11] 梁荣根: 微生物学报, 9(3): 226—234, 1963.
- [12] Slepushman, A. N., *Bull. W. H. O.*, 20:292, 1959.
- [13] 薛风举、王植念、李翰唐、朱既明: 人民保健, 1: 947, 1959.

STUDIES ON THE ORIGIN OF A₂ INFLUENZA VIRUS

I. RELATIONSHIP BETWEEN VIRUS TYPES RECOVERED FROM TWO OUTBREAKS OF INFLUENZA IN LO-YANG IN 1957

LIANG YUNG-KEN, CHANG YU-CHIN

(*National Vaccine and Serum Institute, Peking*)

MA MEI-SUNG

(*Lo-Yang Sanitation and Epidemiology Station Lo-Yang*)

YANG MIN

(*National Vaccine and Serum Institute, Peking*)

1. During an outbreak of influenza in Lo-Yang in January 1957, 5 strains of influenza virus were isolated from 11 throat washings. All these 5 strains were found to be A₁ serologically. However, their antigenic character differed from that of the earlier A₁ strains (FM₁, Peking 56-1).

2. In April of the same year, another influenza epidemic occurred in Lo-Yang and 7 strains of influenza virus isolated from 11 throat washings were examined. All these strains were found to be A₂.

3. The result of haemagglutination-inhibition test showed that the Lo-Yang A₁ cross reacted not only with the earlier A₁ strains, but with the A₂ virus as well.

4. The results of an epidemiological study of the incidence of A₂ influenza in a certain school in Lo-Yang in April 1957 showed that the morbidity rate in those who had been affected with A₁ influenza in January is 3.7 times lower than in those who had not. It is suggested that persons recovered from A₁ influenza had developed immunity against A₂.