

# 新分離流行性感冒病毒株的鑑定 與一些血清學的觀察

黃 絳 珠

(貴陽醫學院微生物學教研組)

流行性感冒(以下簡稱流感)病毒的傳染在歷史上早有記載,自 1933 年 Smith 氏自喉頭洗液中首次培養出甲型流感病毒以後,世界各地關於分離流感病毒的報道極多。我國各地雖常見類似流感疾病的發生,但是病原體的分離及有關問題的報道尙屬不多<sup>[1]</sup>。

我校於 1956 年 7 月間曾發生一次流感小流行。爲了確證該次流行的病原,進行了流感病毒的分離及血清學檢查的工作。由於校方及時採取了措施,流行的期間極短,僅取得喉頭洗液 12 份及 15 名患者的二次血清標本。9 月初旬新生陸續來校報到,此次新生係來自西南區各縣市,乃利用體檢剩餘血清 162 份進行了 PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub>, K 及 Lee 株的血凝抑制抗體的檢查。茲將結果作一報道,冀能作爲流感傳染在西南區的一點資料。

## 方 法 與 材 料

### 分離方法

1954 年及 1955 年均曾取得疑似流感患者的喉頭洗液進行病毒分離工作,都沒有成功。此次乃改用 Ритова 氏<sup>[2]</sup>的方法,將標本用鷄血球濃縮後再行接種。不過在操作過程中沒有盡依 Ритова 氏的方法,而是用 1/150M 磷酸鹽緩衝鹽水(pH 7.0)作爲喉頭洗液,每一病人用 20 毫升,然後用每一標本的 10 毫升喉頭洗液洗滌青霉素及鏈霉素空瓶各一只。因曾初步估計過臨床方面所遺的每只青霉素空瓶中約剩青霉素 10,000 單位;而每只鏈霉素空瓶中約剩鏈霉素 100 毫克,在利用抗生素上,這一辦法足供所需之量,而在實際應用過程中,亦證明接種了這種喉頭洗液的鷄胚亦是沒有細菌的生長的。然後在每份洗滌過青霉素及鏈霉素空瓶的喉頭洗液中,加入無菌 1% 鷄血球懸液 0.1 毫升,在 4—8°C 冰箱中經 2—3 小時後,見全部喉頭洗液中的鷄血球都已凝集於管底,傾去上部喉頭洗液。由於鷄胚不敷用及此種凝集作用有非特異性的情況<sup>[3]</sup>,乃將所有凝集血球,合併成爲兩份標本(每 6 份合併成 1 份),各接種 6 只 10 日來亨鷄胚。按照 Barnes 氏等<sup>[4]</sup>的技術,3 只接種羊膜腔,3 只接種尿囊腔。35°C 溫箱中孵育 64—68 小時後,在分別採取每只鷄胚的羊水及尿囊液進行血球凝集試驗時,觀察到所有鷄胚均尚生活,在一份中,於第一代即有兩只鷄胚(一只只是接種羊膜腔的;一只只是接種尿囊腔的)的尿囊液及羊水中均檢出病毒——標以 K。其餘未出現陽性結果的鷄胚,均未繼續接種。

## 病毒種

PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub> 及 Lee 株均先後由北京中央生物製品檢定所贈給。試驗中所用的 PR<sub>8</sub> 株已在我組雞胚尿囊腔中繁殖多代; FM<sub>1</sub> 株在雞胚尿囊腔中繁殖 2—5 代; Lee 株在雞胚尿囊腔中繁殖 7—10 代; K 株自分離後在雞胚尿囊腔中繁殖 7—9 代。傳代時用 Douglas 胰消化液<sup>[5]</sup> 作 10<sup>-2</sup> 或 10<sup>-3</sup> 稀釋。接種後之雞胚均孵育於 35°C 溫箱中, PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub> 及 K 株約經 40—44 小時後; Lee 株約經 64—68 小時後取出置冰箱中 2—3 小時或過夜, 再採取尿囊液。傳種及中和試驗用病毒保存於 -20°C 冰箱中, 血球凝集試驗及補體結合試驗用病毒保存於 4—8°C 冰箱中。

免疫血清: 用兩種方法製備。

1. 聞仲權和朱既明氏<sup>[6]</sup> 第二系統的方法, 製備天竺鼠免疫血清。

2. 重慶軍醫大學微生物學教研組<sup>[9]</sup> 介紹的方法, 注射病毒尿囊液於雞腹腔中, 接連 3 日, 每日 10 毫升, 於末次注射後之第 6 日採血。

由於我們沒有霍亂弧菌, 未能製備霍亂濾液以除去非特異抑制素, 所以在製備免疫血清以前, 先行測知預備使用的試驗動物正常血清對 4 株流感病毒的血凝抑制效價, 以便選取正常血清中無血凝抑制作用的動物來進行免疫, 則在抗原分析中發生的偏差可以較小。檢查的結果, 發現各種動物的正常血清中多數都有或高或低的血凝抑制效價, 有的甚至可以高達 1/128。但在製備雞免疫血清時, 所選取的雞, 其正常血清僅對個別病毒株有 10 倍的血凝抑制效價。

血凝抑制試驗: 按照 Salk 氏<sup>[7]</sup> 的方法。唯血清每個稀釋度的用量為 0.1 毫升, 且僅作 2 倍或 10 倍開始的一列等倍數稀釋; 抗原用量為 2 單位 0.1 毫升; 1% 雞血球懸液用量為 0.2 毫升(雞血球均採自同一只雞<sup>[6]</sup>)。45 分鐘後讀取結果。

在本工作將近結束時, 得到中央生物製品檢定所贈給的霍亂弧菌稻葉型 95/54 株。考慮到血清中非特異抑制素的影響, 故又按照黃元桐及朱既明氏<sup>[10]</sup> 的方法製備了霍亂濾液, 並按照所介紹的方法觀察了免疫血清在經處理前後特異性反應變化的情況。至於患者二次血清標本及新生入學體檢剩餘血清中血凝抑制抗體效價的測定, 由於標本已消耗, 未能進行處理與比較。

## 補體結合試驗

按照 Friedewald 氏<sup>[11]</sup> 的方法, 用生理食鹽水 10 倍稀釋的病毒尿囊液作為抗原, 用量為 0.2 毫升。補體用 1 個單位 0.2 毫升。所用豚鼠免疫血清是在試驗前 7 天採取的, 血清分離後保存於 -20°C 冰箱中, 用前 56°C 加溫 30 分鐘, 自 10 倍開始稀釋, 每個稀釋度用 0.2 毫升。敏感綿羊血球用 0.4 毫升。以 ++ 強度為終點。

## 中和試驗

按照 Barnes 氏等<sup>[14]</sup> 的方法, 以 600 ID<sub>50</sub>/0.1 毫升的病毒, 與各種稀釋度的抗血清等量混合, 置 37°C 溫箱中經 30 分鐘, 每個稀釋度接種 3 只雞胚的尿囊腔內, 接種量每只雞胚 0.1 毫升。並以 100% 不生長為終點。

# 結 果

## (一) K 株病毒的鑑定

K 株病毒的鑑定工作,分兩方面進行,一方面作了凝集各種動物血球能力及致病力的觀察;另一方面製備了免疫血清作抗原分析,茲將獲得的結果分述於下:

1. K 株凝集各種動物血球能力的觀察: 結果見表 1。

表 1 流行性感冒病毒各株凝集各種動物血球的能力

		動 物 血 球												
		人	猴	狗	貓	猪	黃牛	山羊	綿羊	豚鼠	兔	小白鼠	鷄	蟾蜍
流 感 病 毒	K	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
	PR <sub>8</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
	FM <sub>1</sub>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
	Lee	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

K 株能凝集多種動物的血球,這個性格與流感病毒相同。能凝集豚鼠血球,故與丙型流感病毒不同<sup>[12]</sup>;能凝集猴血球,是與 PR<sub>8</sub> 及 FM<sub>1</sub> 株不同處;不凝集貓、猪、黃牛、山羊及綿羊的紅血球是與 Lee 株不同處。故知 K 株在凝集各種動物血球的能力上,是與 PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub>, Lee 及丙型流感病毒不完全相同的。

2. 對小白鼠的致病力: 用乙醚麻醉 4 只小白鼠,滴入未稀釋的 K 株病毒尿囊液 0.05 毫升於鼻內,觀察 14 日,均活躍無異常,未再繼續觀察。

3. PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub>, Lee 及 K 各株與其相當抗血清的交互血清學試驗,結果見表 2。並根

表 2 PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub>, K 及 Lee 株間交互血清反應的抗體效價†

		PR <sub>8</sub>		FM <sub>1</sub>		K			Lee		正常 尿囊液 補結
		血 抑*	補結	血 抑*	補結	血 抑*	補結	中和	血 抑*	補結	
PR <sub>8</sub>	鷄免疫血清	640/640		10/<10		10/<10		<4	<10/<10		
	豚鼠免疫血清		320		80		80			40	40
FM <sub>1</sub>	鷄免疫血清	10/10		160/320		10/10		4	<10/<10		
	豚鼠免疫血清		80		320		40			10	10
K	鷄免疫血清	10/10		10/10		320/320		512	<10/<10		
	豚鼠免疫血清		40		20		640			10	10
Lee	鷄免疫血清	<10/<10		<10/<10		<10/<10		<4	320/320		
	豚鼠免疫血清		10		10		10			1280	10

† 所列均為效價的倒數。

\* 分子為未經霍亂濾液處理的血凝抑制抗體效價;

分母為經霍亂濾液處理的血凝抑制抗體效價。

據血凝抑制試驗計算其抗原比<sup>[13]</sup>,結果見表 3。

由於抗原分析,證明 K 對於 PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub> 及 Lee 株來說,是具有特異性抗原的病毒株。但 PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub> 及 K 株之間有低效價的交互血凝抑制作用及補體結合作用,似可佐證 K 是

表 3 根據表 2 中血凝抑制抗體效價作出的抗原比\*

	病 毒			
	PR <sub>8</sub>	FM <sub>1</sub>	K	Lee
PR <sub>8</sub> 雞 免 疫 血 清	1/1			
FM <sub>1</sub> 雞 免 疫 血 清	45/<45	1/1		
K 雞 免 疫 血 清	45/<45	32/32	1/1	
Lee 雞 免 疫 血 清	<45/<45	<32/<32	<32/<32	1/1

\* 分子為未經霍亂濾液處理時抗原比的倒數；  
分母為經霍亂濾液處理後抗原比的倒數。

屬於甲型的一個新變株。又由於 FM<sub>1</sub> 株雞抗血清對 K 株有低效價的中和作用，而 PR<sub>8</sub> 株雞抗血清對 K 株無中和作用，加以 K 株和 FM<sub>1</sub> 株之間的抗原比略高於和 PR<sub>8</sub> 之間者，似可進一步證明 K 株是屬於亞甲型的一個新變株。而且，就本試驗來看，無論血清用霍亂濾液處理與否，其血凝抑制試驗結果所得的抗原比都極相近似，似乎是由於所選擇的正常動物血清中沒有或僅有低效價非特異抑制作用，故所製備的免疫血清仍表現了高的特異性。

## (二) K 株與這次小流行的關係

為了從血清學方面證明患者的傳染原，曾取得 15 名患者的兩次血清標本，進行了血凝抑制抗體的檢查，結果見表 4。

表 4 15 名患者二次血清標本血凝抑制抗體效價測定結果(血清未經霍亂濾液處理)

患 者	血 凝 抑 制 抗 體 效 價 †				兩 次 標 本 間 隔 時 間 (天)	培 養 結 果 *
	PR <sub>8</sub>	FM <sub>1</sub>	K	Lee		
1. 孫	16/8	16/16	64/64	2/8	12	未做
2. 朱	64/64	8/16	<2/2	<2/4	24	+
3. 魚	8/8	8/8	8/8	<2/32	12	-
4. 劉	8/8	2/8	16/64	16/8	12	+
5. 袁	8/8	16/32	16/64	<2/<2	11	-
6. 劉	8/16	4/32	<2/8	<2/<2	11	+
7. 林	16/32	16/128	2/32	4/4	11	-
8—15	無顯著的抗體增高，從略。				11	十或一

† 分子是第一次標本的血凝抑制抗體效價的倒數；分母是第二次標本的血凝抑制抗體效價的倒數。

\* 凡是該患者的喉頭洗液是混合在陽性結果的一份中的，都記以“+”號；

凡是該患者的喉頭洗液是混合在陰性結果的一份中的，都記以“-”號。

其中 3 份血清對 Lee 株的血凝抑制抗體有 4 倍以上的增高；4 份血清對 K 株的血凝抑制抗體有 4 倍以上的增高。其餘 8 份血清對所試的 4 株病毒無顯著的抗體增高。雖然如此，尚不能認為這 8 名患者不是由這幾株病毒中之一所引起的，因為 Morgan 氏等<sup>[14]</sup>

曾證明有些患者血清中對自體分離出來的流感病毒沒有抗體增高的現象。不過, 二次標本採取的間隔僅為 11 天, 是否由於反應較慢此時尚不能檢出亦是可能的。就二次血清標本中抗體增高的情況來說, K 株是我校此次小流行的病原是可以置信的。而乙型亦可能為病原之一, 不過沒有分離出與 Lee 抗原性相近似的病毒株。

凡是對 K 株的血凝抑制抗體有 4 倍以上增高者, 均對 FM<sub>1</sub> 株的血凝抑制抗體有 2 倍以上的增高, 似乎亦可佐證 K 是與 FM<sub>1</sub> 株較為接近的一個新變株, 因而可以誘致對 FM<sub>1</sub> 株的回憶性抗體增高<sup>[12]</sup>。

### (三) 四株流感病毒在西南區存在的情況

在這次流行後一月餘, 適逢我校新生入學, 有剩餘的體檢血清標本, 乃作了血清中對 PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub>, K 及 Lee 株的血凝抑制抗體的檢查, 企圖從中得出這些流感病毒株的傳染在西南區存在情況的資料, 結果見表 5。

表 5 162 份血清標本對 4 株流感病毒血凝抑制抗體效價測定結果  
(血清未經震盪濾液處理)

		PR <sub>8</sub>	FM <sub>1</sub>	K	Lee
		標 本 份 數			
血 凝 抑 制 抗 體 效 價	<1/2	0	0	25	97
	1/2	0	0	34	15
	1/4	3	4	39	11
	1/8	23	20	39	16
	1/16	41	48	15	8
	1/32	31	47	4	10
	1/64	39	33	3	4
	1/128	21	8	3	1
	1/256	2	2	0	0
	1/512	2	0	0	0

共檢查 162 份血清標本其中 6 份採自雲南, 45 份採自貴州, 111 份採自四川來的新生。若以血凝抑制抗體效價在 1/50 以上為有價值, 則血清標本中對 PR<sub>8</sub>, FM<sub>1</sub>, K 及 Lee 株具有血凝抑制抗體的陽性率分別為 39.5%, 26.5%, 3.7% 及 3%。可以證明甲型、亞甲型、乙型及 K 株的傳染在西南區是存在的。

## 討 論

從實驗結果中, 似可證明 K 株是一株具有特殊抗原性的流感病毒。由於 K 株可以凝集豚鼠紅血球以及在雞胚尿囊腔中能夠生長, 可以斷定 K 株是與丙型流感病毒不同的<sup>[12]</sup>。在分離接種時, K 株在雞胚尿囊腔中即能生長繁殖, 此點亦與乙型流感病毒的情況不合<sup>[4]</sup>。抗原分析的結果, 在血球凝集抑制試驗及補體結合試驗中它均與 PR<sub>8</sub> 及 FM<sub>1</sub> 株有低效價的交互反應; 在中和試驗中, FM<sub>1</sub> 株雞抗血清對它有低效價的中和抗體; 在血球凝

集抑制試驗中它和 FM<sub>1</sub> 株的抗原比又略高於和 PR<sub>6</sub> 株的抗原比;在患者二次血清標本檢查中,對 FM<sub>1</sub> 株有回憶性抗體增高;加以 K 株不能使小白鼠發病,使我們初步認為 K 株是屬於亞甲型的一個新變株。

從各病毒株在西南區的普遍性來看,可推論甲型及亞甲型的傳染曾有過廣泛的流行,至於甲型及亞甲型的傳染現在是否存在,似應在小兒中進行普遍的血清學檢查才能推論。具有對 Lee 株血凝抑制抗體的標本僅佔 3%,可能是由於乙型只限於散在性流行之故。

由於具有對 K 株血凝抑制抗體的人數不多 (3.7%), 而且係此次流行中分離得的新株,似可證明 K 株是晚近形成的一個新變株。在貴陽,這是第一次分離得流感病毒,在這一期間以及其他的時候,全國許多地區都有流感的流行,因此 K 株是否在血清學上與其他地區新分離的病毒株相同,或是完全是一個西南區的新變株,是值得追究的。

在免疫血清的製備中,如能選取血清裏沒有或僅有低效價血凝抑制作用的動物進行免疫,則所得的免疫血清雖未經霍亂濾液處理,仍可顯相當高的特殊性。當然,這不是否定霍亂濾液處理的重要性,而是在這樣的物質有缺乏時可資應用的另一辦法。

## 結 語

1. 本文報告了在貴陽分離一株流感病毒——K 株,並初步認為這株病毒是亞甲型的變株。

2. 根據患者二次血清標本抗體出現情況,認為這一病毒是這次貴陽醫學院流感小流行的病原體。

3. 利用入學新生剩餘體檢血清的檢查,觀察到甲型及亞甲型流感病毒,過去在西南區曾引起過廣泛的流行;而 K 株的傳染也是存在的。乙型的傳染亦可能是散在性存在的。

本文承于本崇副教授指正,而某些工作並得張若樑同志的協助,均此致謝。

## 參 考 文 獻

- [1] 朱既明等:中華醫學雜誌, 42: 1097, 1956.
- [2] Ритова, В. В.: 微生物學譯報, 1 (2): 179, 1954.
- [3] Ноклюбова, Л. И.: 微生物學譯報, 3 (2): 65—66, 1956.
- [4] Barnes, M. W., Morgan, H. R. & Finland, M.: *J. Lab. & Cli. Med.*, 33: 309, 1948.
- [5] Kolmer, J. A. & Boerner, F.: *Approved Lab. Tech.* 4th. ed., U. S. A., 343, 1945.
- [6] Miller, G. L. & Stanley, W. M.: *J. Exp. Med.*, 78: 185, 1944.
- [7] Salk, J. E.: *J. Infectious Disease*, 48: 87—97, 1944.
- [8] 關仲權、朱既明: 微生物學報, 4 (1): 167—174, 1956.
- [9] 個人通訊.
- [10] 黃元桐、朱既明: 微生物學報, 4 (1): 175—184, 1956.
- [11] Friedewald, W. F.: *J. Exp. Med.*, 78: 347, 1943.
- [12] 朱既明: 微生物學譯報, 3 (4): 7—13, 1956.
- [13] 朱既明: 微生物學報, 1 (1): 17—35, 1953.
- [14] Morgan, H. R., Barnes, M. W. & Finland, M.: *J. Lab. & Cli. Med.*, 33: 1212—1219, 1948.

# A REPORT ON A NEWLY ISOLATED STRAIN OF INFLUENZA VIRUS IN KWEI-YANG, WITH SOME EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF INFLUENZA IN THE SOUTH-WEST

HWANG CHIANG-CHU

*Department of Microbiology, Kwei-Yang Medical College, Kwei-Yang*

The author reported the isolation of a strain of influenza virus from throat washings of patients, during an epidemic in The Kwei-Yang Medical College in July, 1956. On account of the following evidences, the virus isolated was designated as strain K, which may be a new variant of the A-prime group of the influenza viruses.

1. It possessed the ability of agglutinating the red blood cells of the guinea pigs.

2. It multiplied easily in the chorio-allantoic cavity of the chicken embryos on first isolation.

3. In low dilutions of the specific antisera, there existed cross hemagglutination-inhibition and complement fixation reactions between the strains K and FM<sub>1</sub>, but in the neutralization test, strain K reacted quite specifically.

4. A rise in the titers of the hemagglutination-inhibition antibody against FM<sub>1</sub> in the convalescent sera of the patients suggested an anamnestic reaction which pointed to a close relationship between K and FM<sub>1</sub>.

5. Within a period of 14 days after intranasal inoculation with strain K, the white mice under experimentation showed no apparent infection.

The fact that there appeared higher titers of the hemagglutination-inhibition antibodies against the strain K in the sera of the convalescents was taken by the author as a strong confirmation that K was the very viral agent which was responsible for this small epidemic in the College.

About one month after the subsidence of the epidemic, and during our routine physical examination of our new students, the author had the opportunity of collecting the sera of 162 healthy students, from the cities in Sze-Chuan, Yun-Nan and Kwei-Chow. It was concluded that the antibodies existed in these sera against the different known strains of the influenza viruses might represent the presence of the different viral infections in these districts.