

1956 年上海流行性感胃流行的病毒學檢驗

陳希聲 錢朝木 沈方正 印桂金

(上海市衛生防疫站)

解放前國內很少有人作過流行性感胃的病原學研究，近年來由於黨和政府對於科學研究的重視，本病病毒學的研究工作才開始逐漸發展起來。1950 年在北京流感流行中，張學德、蔣豫園二氏曾分離出 2 株甲型流感病毒^[1]。1952—1955 年朱既明、梁榮根、聞仲權、黃元桐等氏在北京幾次流感流行中分離出亞甲型及乙型流感病毒^[2]。薛鳳舉、王植崙兩氏亦在 1954—1955 年北京流感流行中分離出亞甲型及乙型流感病毒^[3]。1954 年成都流感流行中有沈鼎鴻氏等分離出 1 株甲型流感病毒^[4]。上海關於這方面的研究也是從近兩年才開始，1955 年以前在上海未有人分離出流感病毒。

1956 年夏季我國有不少地區先後有流感的流行，上海也曾發生。我們在這次流行中，主要選擇幾個發病人數較多的單位，如學校、工廠，就症狀比較典型（發熱在 38—38.5°C 以上，併有頭痛、咳嗽、流涕或四肢酸痛的）病人的洗喉液和部分病人的雙份血清來作病毒學檢驗；以推定這次上海流行主要屬於那種型別。茲就檢驗材料、試驗方法和檢驗結果敘述如後。

材 料 與 方 法

(一) 檢驗材料

1. 洗喉液來源：1956 年 6—7 月共採得疑似流感病人洗喉液標本 178 例，內計學校 5 所，共 101 例；工廠 7 所，共 75 例；本站 2 例共計 13 個單位，178 例。
2. 病人血清：1956 年 6—8 月共採得病人血清 81 例，但採得雙份血清者僅 14 例。
3. 病毒抗原：供病人血清血球凝集抑制試驗用的病毒抗原，其毒株是由中央生物製品檢定所（有甲型 PR 8 株、亞甲型 FM 1 株、乙型 Lee 株）及中央生物製品研究所（有亞甲型京 53-7 株及京 56-1 株，乙型京 54-6 株、丙型 1233 株）撥給的。
4. 免疫血清：與新分離流感病毒作血球凝集抑制試驗用的免疫血清是由中央生物製品研究所分給的抗各型流感病毒的雞血清。

(二) 檢驗方法

1. 採樣法：(1) 洗喉液：選擇典型病例在發病 1—3 日以內，用不含蛋白脲（為免引起惡心）的 10% 肉湯鹽水使病人嗽喉。採樣前令其先輕咳數聲，然後將上液倒入口內，仰頭反覆洗嗽 1—2 分鐘。先吐入乾淨杯內，然後傾入原盛上項肉湯鹽水的試管中，保存於低溫冰箱（-25°C）內以迄病毒分離開始進行。(2) 病人血清：採取發病期及恢復期（距發病在 2—3 週以上）的病人血液約 5—10 毫升。析出血清後保存在 -25°C 低溫冰箱內。

1957 年 7 月 15 日收到。

2. 病毒分離法:

每毫升洗喉液先加青黴素 1000 單位及鏈黴素 500 微克, 放置 4°C 冰箱內 4 小時以上。如標本比較混濁, 則先用離心沉澱法(每分鐘 2500—3000 轉 10—15 分鐘)處理後, 方採取上層液, 加入抗生素。

分離病毒係採用雞胚接種法。每個標本接種 4—8 個雞胚, 第二代以後每代各接種 3—6 個雞胚, 每次同時接種肉湯作無菌試驗。最初接種 12—13 日雞胚羊膜腔, 接種量每一雞胚為 0.15—0.2 毫升, 隨後放置 35—36°C 培育器內孵育 2—4 天。收穫時先將雞蛋放置 4°C 冰箱內一夜, 次晨取出剖蛋採集羊水及尿液試作血球凝集試驗。選擇其中血凝試驗陽性而效價較高者繼續傳代, 仍接種羊膜腔併同時接種尿囊腔內 1—3 滴, 以便下次收穫時可能獲得血凝陽性的尿液。如尿囊液血凝試驗已出現陽性的, 傳代時即改接種尿囊腔, 每一雞胚接種量為 0.1—0.2 毫升。

3. 血球凝集試驗:

由每個雞胚收穫的羊水或尿囊液用生理鹽水以倍數稀釋法由 1:2 稀釋至 1:256, 每一稀釋管各加 0.25 毫升, 各管各加 0.5% 鷄血球(有時用豚鼠血球或 O 型人血球作對照)0.25 毫升, 混勻後放置室溫內 30—45 分鐘後判讀結果。如血凝效價達 1:16 以上的, 則下次傳代收獲時羊水或尿液可由 1:5 或 1:10 開始作倍數稀釋至 1:5120。

4. 血球凝集抑制試驗:

將免疫鷄血清(甲型用抗 PR 8, 亞甲型用抗 FM 1, 抗京 53-7, 抗京 56-1, 乙型用抗 Lee, 抗京 54—6, 丙型用抗 1233) 或病人血清用生理鹽水由 1:10 作倍數稀釋至 1:5120, 每管血清量為 0.25 毫升, 各加病毒量 0.25 毫升。(病毒採用 50% 血凝效價的 4 個單位), 再加 0.5% 鷄血球 0.25 毫升, 合計每管總量為 0.75 毫升。混勻後放置室溫內 30—45 分鐘後觀察結果。血凝抑制效價以能抑制血球凝集的血清最高稀釋倍數計算。

檢 驗 結 果

(一) 洗喉液病毒分離

就上述採驗洗喉液 178 例中, 選擇 57 例進行了病毒分離。其中接種第 1 代雞胚羊水毫無血凝效價者多未再接再種第 2 代; 凡稍有或已有相當明顯的血凝效價者, 均連續傳代。計傳代至第 2—3 代以上的有 22 例, 最後共分離出 7 株流感病毒。

根據以上幾個陽性例, 採樣均在病程的第二天。洗喉液的直接血凝試驗陽性的並不一定第一代雞胚羊水就出現陽性血凝現象; 相反地, 直接血凝試驗陰性的, 其第一代雞胚羊水即有出現血凝陽性的。

陽性例中有兩例, 其第 1, 2 代雞胚羊水血凝效價極低, 直至第 3 代個別雞胚羊水或尿液方出現稍高血凝效價的, 但仍有部分雞胚為陰性。這說明了在分離病毒時如雞胚供應上或人力上無不足時應連續接種雞胚三代, 以提高陽性檢出率。

爲了進一步鑑定以上新分離的 7 株病毒屬於那種流感類型, 先將各株病毒繼續傳代使其接種雞胚尿囊液血凝效價逐漸提高至 1:160—1:320 以上, 以便與各型抗血清作血球凝集抑制試驗, 檢驗結果如表 1。

根據表 1 結果可以初步鑑定此新分離 7 株全部屬於亞甲型流感病毒, 因其他型抗血

清對此 7 株病毒全無抑制血凝的效價（僅丙型抗血清因用罄只作 2 例），而獨有亞甲型各抗血清與各病毒株有或多或少的抑制血凝效價，尤其抗京 53-7 及抗京 56-1 兩種抗血清較之抗 FM 1 血清的抑制效價一般更高。這說明了此新分離病毒與北京近年所分離的亞甲型毒株關係較近。尤其 212 株幾完全不能被抗 FM 1 血清所抑制，這說明了欲鑑定新流行病毒株最好用近年新分離病毒的抗血清來作血凝抑制試驗，否則往往會不易定型。

表 1 新病毒株與各型抗血清血球凝集抑制試驗結果

免疫血清		新 分 離 病 毒 株							對 照	
型 別	株 別	89 號	99 號	206 號	209 號	212 號	215 號	216 號	同株病毒	同株血清效價
甲 型	抗 PR 8	—	—	—	—	—	—	—	PR 8	1:2560
	抗 FM 1	1:80	1:80	1:40	1:40	<1:10	1:80	1:40	FM 1	1:2560
亞甲型	抗京 53—7	1:160	1:160	1:80	1:160	1:20	1:80	1:40	京 53—7	1:640
	抗京 56—1	1:160	1:160	1:80	1:80	1:80	1:160	1:320	京 56—1	1:320
乙 型	抗 Lee	—	—	—	—	—	—	—	Lee	1:320
	抗京 54—6	—	—	—	—	—	—	—	京 54—6	1:10240
丙 型	抗 1233	—	—	—	—	—	—	—	1233	1:320

(二) 病人血清血球凝集抑制試驗

1956 年流感流行中在各流行單位採集病人洗喉液的同時也採了部分病人的血清計 81 例，而其後能採得恢復後第 2 次血清的僅有 14 例。以下只就此 14 例雙份血清與各型抗原（用甲型 PR 8、亞甲型 FM 1、京 53—7、京 56—1、乙型 Lee 等株）作血球凝集抑制試驗，檢驗結果如表 2。

討 論 與 總 結

1. 綜合以上疑似流感病人洗喉液病毒分離和雙份血清檢驗結果，我們可以推論 1956 年上海流行流感主要是亞甲型。但以檢驗例數還是太少，很可能在流行期中還夾雜有他型的病例。據張箐、陳玉雲、許健音等^[5]的報告，在 1956 年 6 月流行以前（2—4 月）曾分離出 5 株亞甲型病毒，並分離出一株丙型流感病毒；又在 6、7 月上海流行期中亦分離出亞甲型病毒，而在流行後期（8 月）分離出 1 株甲型流感病毒。據此上海這次流行主要是亞甲型之外，或許還包括有部分甲型與丙型。

2. 關於洗喉液標本保存時期，據谷口氏^[7]謂在 -70°C 低溫冰箱中至少可保存 43 日，在 -4°C 普通冰箱中至少可保存 9 日，而我們所獲得的 7 株流感病毒，有 5 株是用保存在 -25°C 低溫冰箱中 26 天以上的材料分離成功的，而且有 2 個標本是在 -25°C 中保存了 47 天之久。可見低溫保存法在大量標本一時無法全部進行檢驗的時候應用，仍有分離出病毒的可能性。

表 2 病人雙份血清與各型流感病毒血球凝集抑制試驗

病 人 (編號)	血清次數	病 毒					結果解釋
		甲 型 PR 8	亞甲 型			乙 型 Lee	
			FM 1	京 53—7	京 56—1		
(1)	1	1:80	1:40	1:80	1:20	1:160	+(亞甲型)
	2	1:160	>1:1280	1:320	1:160	1:160	
(2)	1	1:10	1:40	<1:10	<1:10	1:40	+(亞甲型)
	2	1:40	1:320	1:10	1:20	1:40	
(3)	1	1:10	1:20	1:40	1:10	1:40	-
	2	1:10	1:20	1:20	1:10	1:40	
(4)	1	1:20	1:40	1:80	1:20	1:80	-
	2	1:20	1:40	1:80	1:20	1:80	
(5)	1	1:40	1:20	1:10	1:10	1:40	-
	2	1:80	1:40	1:10	1:20	1:40	
(6)	1	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:40	-
	2	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	1:40	
(7)	1	1:80	1:80	1:40	1:40	1:80	+(亞甲型)
	2	1:160	1:320	1:160	1:80	1:80	
(8)	1	1:40	1:80	1:40	1:40	1:80	+(亞甲型)
	2	1:40	1:640	1:80	1:320	1:160	
(9)	1	1:40	1:40	1:20	1:80	1:80	+(亞甲型)
	2	1:80	1:80	1:40	1:320	1:80	
(10)	1	1:80	1:20	1:320	1:80	1:320	+(亞甲型)
	2	1:160	1:160	1:1280	1:640	1:640	
(11)	1	1:40	1:20	1:40	1:40	1:320	±
	2	1:40	1:40	1:80	1:80	1:160	
(12)	1	1:40	1:40	1:40	1:40	1:80	-
	2	1:80	1:80	1:80	1:40	1:80	
(13)	1	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80	-
	2	1:80	1:160	1:80	1:80	1:80	
(14)	1	1:160	1:640	1:640	1:320	1:80	-
	2	1:160	1:640	1:320	1:640	1:80	

參 考 文 獻

- [1] 張學德、蔣豫圖：C. M. J., 1: 68, 1950.
[2] 朱既明、梁榮根、聞仲權、黃元桐：中華醫學雜誌, 42: 1097, 1956.
[3] 薛鳳舉、黃元桐：中華醫學雜誌, 42: 1103, 1956.
[4] 沈鼎鴻、陳志潛、黃安華、吳慧君：中華衛生雜誌, 3: 366, 1955.
[5] 張 箐、陳玉雲、許健音：生物製品通訊, 2: 80, 1957.
[6] 谷口勝二：研究報告集錄, 醫學篇, 昭和 29 年 4 月(1954).

ETIOLOGICAL STUDIES ON THE EPIDEMIC OF INFLUENZA IN SHANGHAI, 1956

CHEN HEE-SHUN, CHIEN CHOU-MO, SHEN FAN-DJUN AND ING GUA-DJIN

(Laboratory of Hygienic and Anti-epidemic Station)

During the epidemic of influenza in the summer of 1956 in Shanghai, seven strains of influenza virus were isolated from the throat washings of patients by inoculation into the amniotic sacs of chick embryo. All these strains were identified as type A-prime; but they seemed to be more closely related to the 2 strains of type A-prime isolated in Peking in 1953 and 1956, than to the typestrain FM1 isolated in 1947.

Acute and convalescent patients sera have been examined by the hemagglutination inhibition tests with known influenza virus strains out of 14 cases, 6 showed an 4-fold (or more) increase of titre against the A'strains.