

# 从普通感冒患者分离的病毒及其鉴定

李怀恩 袁文洪 成淑珍 申厚凤

(中国人民解放军济字 249 部队, 济南)

普通感冒(下称感冒)是常见病, 一年四季常有发生, 而且往往由于感冒而诱发气管炎或慢性气管炎急性发作。遵照伟大领袖毛主席关于“预防为主”的教导, 认真贯彻全国防治慢性气管炎工作会议的精神, 我们于 1973 年先后作了感冒患者的病毒分离和鉴定工作。

## 一、标本的采集和处理

从济南感冒病人中取发病 3—5 日的咽漱液和鼻拭子共 40 份。病人临床呈典型感冒症状, 鼻塞、流鼻涕、全身不适、体温不超过 38℃ 等。

标本取回后加抗菌素, 最后浓度为青霉素 1000 单位/毫升和链霉素 1000 微克/毫升, 以碳酸氢钠调 pH 至 7.2—7.4, 于 4℃ 放置 3—4 小时。如不能立即接种细胞管, 则放低温冰箱保存。

## 二、标本的分离及结果

### 1. 分离材料

细胞: 人胚肾(或人胚肺)原代单层细胞(大多数是 3—6 个月的人胚), 按常法制备。

营养液: 10% 小牛血清, 0.5% 乳白蛋白水解物的 Hanks 氏液。

维持液: 2% 小牛血清, 0.5% 乳白蛋白水解物的 Hanks 氏液。

采样液: 0.5% 乳白蛋白水解物的 Hanks 氏液 3—8 毫升。pH 7.2—7.4。

### 2. 分离培养

取已处理好标本 0.5 或 1 毫升, 接种于单层细胞管内, 经 33℃ 静置 4 小时, 倾去标本液, 加入维持液 1 毫升。33℃ 旋转培养(13 转/小时), 逐日观察 7—15 天左右, 如细胞呈 ++—++++ 病变者立即收获, 放入低温冰箱保存。如没有病变则盲传 3 代, 有的传到第 7 代, 作血球吸附试验或干扰试验(用 100 TCD<sub>50</sub> 仙台病毒), 这些试验都是阴性

时, 则弃之。结果从 40 份标本中分离出 22 株病毒\*, 阳性检出率 55%, 其中粘液病毒和腺病毒占多数(表 1)。

从标本分离病毒时, 其中有一半在第一代就出现病变或血球吸附阳性。有少数盲目传代到第 5 代才出现血球吸附阳性(图 1)。

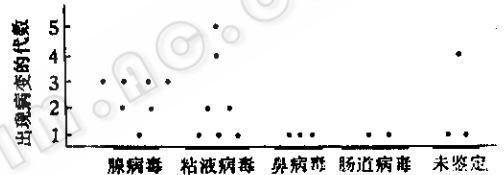


图 1 盲目传代出现阳性结果的情况

## 三、毒株的鉴定

### 1. 方法

每株病毒在鉴定时, 需再传代 1 次, 观察其是否有变化, 再根据每株病毒所致的细胞病变情况, 从形态初步判断病毒种类, 进而作理化试验和特殊观察。

①半数组织培养感染量测定(TCD<sub>50</sub>): 病毒经培养, 细胞出现典型病变时收获, 放冰箱冷冻保存。用前取出融化, 以 0.5% 乳白蛋白水解物(含 10% 小牛血清)或 Hanks 氏液作对数稀释。一般稀释到 10<sup>-7</sup>—10<sup>-9</sup>。取 0.1 毫升接种于细胞管内, 再加 0.9 毫升维持液, 每个稀释度接种 4—6 管, 逐日观察细胞病变 7 天左右。最后按 Reed-Muench 公式<sup>[1]</sup>计算 TCD<sub>50</sub>。

②耐酸试验: 将受试病毒液以 0.1N 盐酸调 pH 至 3.0, 37℃ 水浴箱中放置 1 小时, 再以碳酸

本文于 1974 年 12 月 9 日收到。

\* 电镜观察时, 发现其中一株(M<sub>11</sub>-72)是鼻病毒和粘液病毒混合感染, 故实际毒株应为 23 株。

表 1 分离出病毒的感冒患者的情况

标本号	姓名	性别	年龄 (岁)	症				状				标本种类	分离出的病毒
				咳嗽	头痛	流鼻涕	全身 不适	发热	鼻粘膜 充血	咽部 充血			
M <sub>2</sub> -72	王××	男	23	+	+	+	+	+	+	+	+	鼻咽拭子	鼻病毒
M <sub>11</sub> -72	郭××	男	23	+	+	+	+	+	-	-	-	鼻咽拭子	鼻病毒和粘液病毒
C <sub>8</sub> -73	张××	男	3	-	-	+	-	+	-	-	+	咽拭子	鼻病毒
C <sub>1</sub> -73	李××	女	成	-	+	+	-	-	-	-	-	鼻咽拭子	肠道病毒
C <sub>10</sub> -73	韩××	男	4	-	-	-	+	+	-	-	+	咽拭子	肠道病毒
C <sub>3</sub> -73	戚××	男	15	-	-	+	-	-	+	-	+	鼻咽拭子	腺病毒
C <sub>2</sub> -73	王××	女	10个月	+	+	+	-	-	+	-	-	鼻咽拭子	腺病毒
C <sub>4</sub> -73	许××	男	成	+	-	-	-	+	-	-	+	咽拭子	腺病毒
C <sub>9</sub> -73	杨××	男	成	-	+	+	+	-	+	-	-	鼻咽拭子	腺病毒
C <sub>6</sub> -73	袁××	男	成	+	+	+	+	-	-	-	+	鼻咽拭子	腺病毒
C <sub>7</sub> -73	冯××	男	2	-	-	+	-	+	-	-	+	咽拭子	腺病毒
C <sub>11</sub> -73	徐××	男	1	-	+	-	-	+	-	-	+	咽拭子	腺病毒
36-N	燕××	男	成	+	-	+	-	-	+	-	-	鼻咽拭子	粘液病毒
37-N	何××	女	成	+	-	-	+	-	-	-	+	鼻咽拭子	粘液病毒
38-N	袁××	男	成	-	-	+	+	-	-	-	+	鼻咽拭子	粘液病毒
40-N	王××	女	46	+	-	+	+	-	-	-	-	鼻咽拭子	粘液病毒
42-N	高××	女	61	-	+	+	+	-	-	-	-	鼻咽拭子	粘液病毒
43-N	黄××	女	4	-	-	+	+	+	-	-	-	鼻咽拭子	粘液病毒
49-N	丁××	女	5	-	-	+	-	+	-	-	-	鼻咽拭子	粘液病毒
41-N	王××	男	10个月	+	-	+	-	-	-	-	-	鼻拭子	未鉴定
44-N	徐××	女	成	+	+	+	+	-	-	-	+	鼻咽拭子	未鉴定
M <sub>7</sub> -7	宋××	男	22	+	+	+	+	-	-	-	+	鼻咽拭子	未鉴定

氢钠调 pH 到 7.0, 并按对数稀释, 每个稀释度接种 4—6 管进行培养, 观察病变 7 天左右。对照组: 病毒液 pH 为 7.0, 其他作法与试验组相同。

⑧耐乙醚试验: 取 0.8 毫升病毒液, 加入 0.2 毫升乙醚, 加塞封住管口, 充分振摇后, 置 4℃ 过夜, 次日取出, 使乙醚挥发干净, 将病毒液按对数稀释, 每个稀释度接种 4—6 管细胞管, 进行培养。观察细胞病变 7 天左右。对照组不加乙醚, 其余操作方法与试验组相同。

⑨血球吸附试验: 接种标本的细胞管, 逐日观察细胞 7 天左右, 仍没出现病变者, 将其维持液取出加入 0.5% 豚鼠和鸡红血球悬液, 于 4℃ 静置 30 分钟后倾去, 再加以生理盐水洗 2—3 次。显微镜下观察血球吸附现象。

⑩补体结合试验: 受试病毒接种于无血清、无抗菌素的细胞管内, 经孵育后, 细胞呈++至+++者立即收获。经冻融 3 次后, 以 3000 转/分离心 30 分钟。取上清液并以 56℃ 30 分钟灭活后作为抗原。补体结合试验操作方法按常规全量法进行。

⑪中和试验: 将受试病毒和稀释血清按对数稀释, 于 37℃ 水浴箱中放置 1 小时, 继而接种于细胞管内, 每个稀释度接种 4—6 管, 逐日观察细胞病变。

## 2. 结果

部分毒株鉴定试验结果列入表 2。

表 2 部分毒株鉴定试验结果

标本号	理化试验(TCD <sub>50</sub> )			腺病毒 补体结 合试验	病毒种类
	耐乙醚	耐酸	对照		
M <sub>2</sub> -72	5.38	<1.0	>6	0	鼻病毒
M <sub>11</sub> -72	5.6	<1.0	5.7	0	鼻病毒, 粘液病毒
C <sub>8</sub> -73	5.4	2.5	>6	—	鼻病毒
C <sub>10</sub> -73	>6	>6	>6	—	肠道病毒
C <sub>1</sub> -73	>6	>6	>6	—	肠道病毒
C <sub>2</sub> -73	>6	>6	>6	1:32	腺病毒
C <sub>4</sub> -73	5.25	>6	5.4	1:8	腺病毒
C <sub>6</sub> -73	4.75	5.4	5.25	1:16	腺病毒

注: 0 为未作试验; — 为阴性结果。

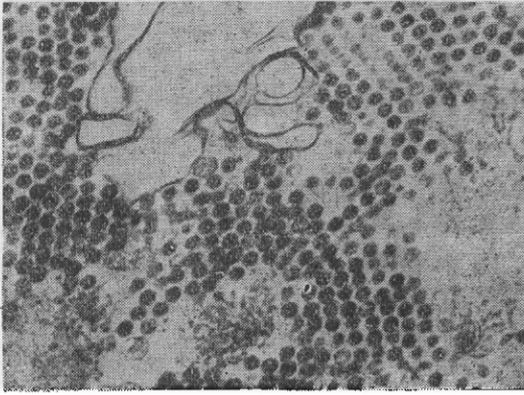


图2 济05株腺病毒颗粒 27800×

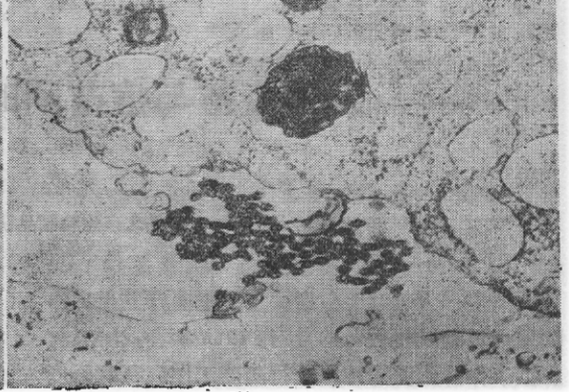
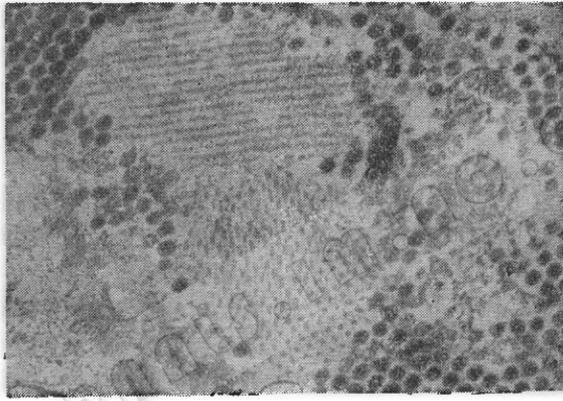
图3 细胞外的粘液病毒(M<sub>11</sub>)颗粒 34000×

图4 济05株于人胚肾细胞核内呈现的腺病毒颗粒及其副结晶包涵体 70000×

特别要说明的是，接种原代人胚肾细胞的病变：

①腺病毒：开始细胞变圆，有的膨大，继而成葡萄状堆集，最后脱落；补体结合效价均在1:8以上。病毒形态及其副结晶包涵体见图2,3。

②鼻病毒：细胞形态不整齐，呈多形态，3—7日出现病变。

③粘液病毒：病变细胞呈长条状，使单层细胞呈蜘蛛网状，血球吸附试验阳性。病毒形态见图4。

④肠道病毒：病变细胞小圆形、散在，出现时间较早。

(电子显微镜照片为陈德蕙等同志拍摄，特此致谢。)

### 参 考 资 料

- [1] Cohen, A.: *Textbook of Medical Virology*, 35—38, London, 1969.
- [2] Tyrrell, D. A. et al.: *Brit. Med. J.*, 1:606, 1968.
- [3] Kavvana, R. et al.: *Naika*, 26:430, 1970.
- [4] Kapikian, A. Z. et al.: *J. Infect. Dis.*, 119: 282, 1969.
- [5] Frothingham, T. E. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133: 1184, 1970.
- [6] Tsunoda, A.: *Naika*, 26: 435, 1970.
- [7] Hjordis, M. F. et al.: *Amer. J. Epidem.*, 97: 93, 1973.
- [8] 陈德蕙, 中华医学杂志, 4: 211, 1974.