

1975 年上海市郊流行性肌痛(胸痛)的病原学调查

施耕笙 丁晓光 应蓓蓓

(上海市卫生防疫站, 上海)

1975 年 7—9 月上海嘉定县和宝山县部分地区发生流行性肌痛(胸痛)暴发流行。从 34 例患者的肛拭、咽喉洗液和粪便标本中分离到 26 株柯萨奇 (Cox) B₁ 病毒。9 例患者的双份血清和 3 例患者的恢复期血清与新分离病毒的代表株 (沪肌痛 75-9) 作了中和试验, 结果表明, 9 例患者的恢复期血清中和抗体滴度较急性期有四倍或四倍以上的增长, 恢复期血清中和抗体几何均值比急性期高 42 倍, 从而肯定造成本次流行的病原体是 Cox B₁ 病毒。

1975 年 7 月上海市嘉定县和宝山县的部分地区发生了一种以高热、剧烈胸痛为主要特征, 但无明显上呼吸道和消化道感染等症状的疾病流行, 前后历时三个月, 据不完全统计, 共发病约 1760 余例。为明确临床诊断, 采取有效的防治措施, 迅速控制本病的流行, 我们及时地进行了病原学调查, 查明引起这次疾病流行的病原是柯萨奇 B₁ 型 (Cox B₁) 病毒。

材 料 和 方 法

(一) 病毒分离标本

1. 直肠拭子: 采取发病一周以内患者的直肠拭子, 放入装有 2—3 毫升 0.5% 水解乳蛋白汉克斯溶液 (0.5% LH) 和青、链霉素的小试管中, 取回实验室后, 用镊子夹出棉拭, 在试管壁挤压出液体后弃去, 离心沉淀吸取上清液, 作牛肉汤培养证实无菌后, 保存于低温冰箱, 备用。如上清液培养有细菌生长则再用庆大霉素处理。

2. 咽喉洗液: 以 0.5% LH 给患者含嗽, 含嗽液经离心沉淀后, 吸取上清液 2—3 毫升, 每毫升加青、链霉素各 1000 单位, 在 4℃ 普通冰箱作用 4 小时后, 作牛肉汤培养, 如无菌则存放低温冰箱备用。如有菌再加庆大霉素处理。

3. 粪便标本: 用 Hanks 溶液制成 20% 悬液后, 用活性炭吸附去毒性, 再用青、链霉素除菌。

具体方法从略。

(二) 血清标本

采取发病一周以内和发病一月以上 (急性期和恢复期) 患者的双份血液, 待血液凝固后分离血清, 经牛肉汤培养证明为无菌后, 放在 -20℃ 低温冰箱保存, 用前置 56℃ 水浴灭活 30 分钟。

(三) 病毒的分离和鉴定

1. 每份标本均接种于 HeLa 细胞和人胚肾细胞 (HK), 在两种细胞上均传二代以上再判定病毒分离是阳性或阴性。如接种两种细胞均有明显细胞病变, 则鉴定时用致 HK 细胞病变毒株。如接种 HeLa 细胞, 细胞病变为阳性而 HK 细胞为阴性, 则将在 HeLa 细胞上分离到的毒株转种到 HK 细胞, 产生病变后, 再以此毒株进行鉴定。病毒鉴定均用 HK 细胞进行, 根据病变出现的早晚确定鉴定时所用病毒的稀释度, 即第 1—4 天出现病变的毒株分别作 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-2} 和 10^{-1} 稀释, 将稀释好的病毒液分到 7 支带棉花塞的小试管中, 每管 0.25 毫升, 第一管不加免疫血清作病毒对照用, 余下 6 管, 分别加入 0.25 毫升 Cox B₁—Cox B₁ 单价免疫血清, 振荡试管架使病毒和免疫血清充分混合, 再置 37℃ 水浴作用 1 小时后, 接种 HK 细胞, 每份病毒血清混合液接种 2 支细胞管, 每管接种 0.2 毫升病毒血清混合液, 加维持液 (含 3% 牛血清的 0.5% LH 液) 0.8 毫升, 2 管

本文于 1977 年 12 月 13 日收到。

病毒对照各接种病毒 0.1 毫升加维持液 0.9 毫升,接种好后置 37℃ 恒温箱培养,隔日观察细胞病变,第 7 天判定结果。抑制细胞病变出现的免疫血清的型别即为被鉴定病毒的型别。

2. 任选二份标本即沪肌痛 75-9 和沪肌痛 74-24 接种 1 日龄乳鼠,各一窝,每鼠皮下接种标本 0.02—0.03 毫升,如有发病或死亡,则解剖取肌骨,制成 20% 悬液,离心沉淀,取上清液,再加青、链霉素除菌,以此悬液接种一窝乳鼠传代发病后,立即解剖,取出病鼠的肌肉、肝脏、脑组织浸入 10% 福尔马林溶液中作病理切片用。

(四) 血清中和试验

以沪肌痛 75-9 为代表株与患者急性期和恢复期血清作中和试验。先测定沪肌痛 75-9 毒株在人胚肾细胞上的 TCD₅₀。在血清中和试验中采用病毒定量(100TCD₅₀/0.1 毫升)血清作 1:5、1:20、1:80、1:320 和 1:1280 稀释的方法。0.25 毫升各稀释度血清中分别加入 0.25 毫升沪肌痛 75-9 毒株,在 37℃ 水浴作用 1 小时后,每份血清病毒混合液接种 2 支细胞管,每管接种 0.2 毫升,加 0.8 毫升维持液,置 37℃ 恒温箱培养,于第 4 和第 7 天镜检细胞病变,以抑制细胞病变出现的血清最高稀释度作为血清中和抗体效价。

(五) 沪肌痛 75-9 毒株免疫血清制备

以沪肌痛 75-9 毒株的 HK 细胞培养感染液(离心沉淀除去细胞碎片)作为抗原,免疫家兔三次,每次各 10 毫升。第一次耳静脉注射抗原后,间隔 7 天和 14 天,再作第二、三次免疫,末次免疫后 7 天,心脏抽血,分离血清,放置 56℃ 水浴中 30 分钟灭活,存放低温冰箱,备用。

(六) Cox B₆ Schmitt 株与沪肌痛

75-9 株交叉中和试验

将 Cox B₆ Schmitt 株与沪肌痛 75-9 株免疫血清作 1:5—1:1280 连续四倍递增稀释,每种免疫血清各分两行稀释排,其中一行加入 100 TCD₅₀/0.1 毫升的 Cox B₆ Schmitt 株病毒,另一行加入 100 TCD₅₀/0.1 毫升的沪肌痛 75-9 株病毒,病毒与血清量均为 0.25 毫升,在 37℃ 水浴作用 1 小时后,接种 HK 细胞管,然后置 37℃ 恒温培养,第 4 和第 7 天镜检细胞病变,以抑制细胞病变出现的血清最高稀释度作为抗体效价。以了解两株病毒之间的抗原关系。

结 果

(一) 流行性肌痛(胸痛)患者标本病毒分离和鉴定结果(表 1)。

表 1 流行性肌痛(胸痛)患者标本病毒分离结果

调查例数	细胞种类	病毒分离阳性	
		例数	%
34	HeLa	26	76.5
	HK	19	55.9

用 HeLa 细胞和 HK 细胞对 34 例患者的直肠拭子、粪便标本和咽喉洗液进行了病毒分离。用 HeLa 细胞分离到 26 株病毒,用 HK 细胞分离到 19 株病毒,病毒分离阳性率分别为 76.5% 和 55.9%。可见新分离的 Cox B₆ 病毒对 HeLa 细胞的敏感性较对 HK 细胞为高。新分离病毒经鉴定均为 Cox B₆ 病毒。新分离毒株可引起 HeLa 细胞全部圆变、退化、脱落,但对 HK 细胞并不全部侵犯,圆变细胞逐批脱落,最后残留少部分纤维形细胞。三种标本中以粪便标本的病毒阳性率最高(4/4—100.0%),直肠拭子次之 20/26—76.92%,咽喉洗液最低(2/4—50.0%)。

26 株新分离病毒所致的细胞病变只能为 Cox B₆ 免疫血清抑制而不能为 Cox B₁—Cox B₅ 单价免疫血清抑制,故新分离病毒全为 Cox B₆ 病毒。

(二) 流行性肌痛(胸痛)患者标本病毒分离与病程和年龄的关系

病程越短病毒分离阳性率越高。如发病 1—2 天内采到的标本病毒分离阳性率最高(100.0%),发病 3—4 天为 81.8%,发病 5—6 天为 66.7%,发病 7—8 天的标本病毒分离阳性率最低为 50.0%。

患者年龄和病毒分离阳性率的高低有一定关系,9 岁以下为 100.0%,10—14 岁

为 87.5%, 15 岁以上为 72.2%。

(三) 新分离毒株对新 生乳鼠的致病性

沪肌痛 75-9 和 75-24 两毒株, 接种 1 日龄乳鼠后 3—4 天发病, 症状为生长迟缓、震颤, 爬行困难, 后肢脚爪朝上, 瘫痪, 最后导致死亡。病死乳鼠的肌肉、脑、肝组织切片检查: 可见到肌肉组织有炎性细胞浸润及变性; 肝脏组织也有炎性细胞浸润, 部分肝细胞混浊、肿胀、核萎缩; 脑组织中有少数软化灶。

(四) 流行性肌痛(胸痛)患者急性期和恢复期血清与新分离的沪肌痛 75-9 毒株的中和试验(结果见表 2、3、4)。

表 2 流行性肌痛(胸痛)患者双份血清
与新分离毒株的中和试验

恢复期 急性期	1:5	1:20	1:80	1:320	合计	抗体四 倍以上 增长人 数
<1:5			2	2	4	4
1:5			1	1	2	2
1:20				1	1	1
1:80				2	2	2
合计			3	6	9	9

表 3 流行性肌痛(胸痛)患者急性
期和恢复期血清中和抗体效价

病期	调查 人数	血清中和抗体效价					抗体几 何均值	比值
		<1:5	1:5	1:20	1:80	1:320		
急性期	9	4	2	1	2	0	5.27	1
恢复期	12	0	0	0	3	9	223.9	42.3

由表 2、3 可见患者急性期血清中有 4 份抗体为阴性(<1:5), 另 5 份已有不同水平的中和抗体, 但不论急性期中和抗体水平如何, 恢复期血清中和抗体均有四倍或四倍以上的增长, 急性期抗体水平越低, 恢复期抗体增长倍数越高。表 3 表明中和抗体几何平均值, 恢复期为急性期的 42.3 倍, 抗体水平的增长十分明显。可以肯定

沪肌痛 75-9 病毒是引起本次流行性肌痛(胸痛)暴发流行的病原体。

(五) 流行性肌痛(胸痛)患者双份血清与 Cox B₁ 病毒原型株(Schmitt)的中和试验(结果见表 4)。

表 4 流行性肌痛(胸痛)患者双份血清
对 Cox B₁ 病毒的中和抗体效价

血清编号	病期	中和抗体效价	
		对 Cox B ₁ 原型株病毒	对沪肌痛 75-9 株病毒
1	急性期	<1:5	<1:5
14	恢复期	1:80	1:80
2	急性期	<1:5	<1:5
15	恢复期	1:80	1:80
3	急性期	<1:5	<1:5
16	恢复期	1:320	1:320
4	急性期	1:20	1:20
17	恢复期	1:320	1:320
5	急性期	1:5	1:5
18	恢复期	1:20	1:80
7	急性期	1:80	1:80
20	恢复期	1:80	1:320

根据六例患者的双份血清同时与 Cox B₁ 病毒 Schmitt 株和沪肌痛 75-9 毒株进行中和试验的结果, 其中四例患者血清对两株病毒的中和抗体效价完全一致, 恢复期比急性期增长 16 倍以上。一例患者血清对两株病毒的中和抗体效价均为 1:5, 而恢复期血清效价, 对 Schmitt 株上升 4 倍对沪肌痛 75-9 毒株上升 16 倍, 另一例患者的急性期血清对两株病毒的中和抗体效价均为 1:80, 而恢复期血清对 Schmitt 毒株的中和抗体效价未变, 对沪肌痛 75-9 毒株的中和抗体效价上升 4 倍。

讨 论

本病曾在世界各地流行^[1,2]。此病的病原体主要是 Cox B 组病毒, 此外某些型的 Cox A 组病毒和 ECHO 病毒亦可引起本病。由 Cox B₁—Cox B₃ 病毒引起的流行

性肌痛(胸痛)国外均已有过报道^[3-8]。国内以往虽有胸痛散发病例,但未查明病原,亦未见过有关本病流行的报告。这次我们在本病流行期采得患者早期的直肠拭子、咽喉洗液和粪便标本的病毒分离阳性率高达 76.5%,经鉴定全为 Cox B₂ 病毒,患者双份血清对新分离的 Cox B₂ 病毒的中和抗体都有四倍以上的增长,从而可以肯定本次流行的病原体系 Cox B₂ 病毒。从 Cox B₂ 病毒原型株(Schmitt)和这次新分离到的 Cox B₂ 病毒的交叉中和试验结果看来,两者抗原性基本相同。从 9 例患者中有 4 例在急性期抗体效价 <1:5, 3 例仅有低水平(1:5—1:20)抗体来看,表明以往人群对 Cox B₂ 病毒缺乏免疫力,因而造成本次流行。

一般认为 Cox B 组病毒对猴肾(MK)细胞和 HK 细胞的敏感性较 HeLa 细胞为高,而本次实验结果正相反,这可能与不同实验室传代保存的 HeLa 细胞的敏感性不同有一定关系,但主要取决于毒株本身。新分离的 Cox B₂ 病毒对我室的 HeLa 细

胞敏感性较对 HK 细胞为高,但脊髓灰质炎病毒对其的敏感性反较对 HK 细胞为差,1971 年新加坡和日本从急性出血性结膜炎患者分离到的肠道病毒虽同属肠道病毒 70 型,但前者对 HeLa 细胞敏感,而在 MK 细胞上不生长,反之后者对 HK 细胞敏感而对 HeLa 细胞不敏感,因此为了提高病毒分离阳性率,应尽可能采用各种细胞是非常必要的。

参 考 文 献

- [1] Rivers, T. M. and Horsfall, F. L. Jr.: *Viral and rickettsial infections of man* 3rd ed. 519. Pitman. London. 1959.
- [2] Editorials: *J.A.M.A.*, 102:460, 1934.
- [3] Соловьев, В. Д. и др.: *Вопр. Вирусол.*, 3: 301, 1959.
- [4] Демек, И. и др.: *Вопр. Вирусол.*, 3: 321. 1960.
- [5] Mclean, D. M. et al.: *Canad. Med. A. J.*, 79:789, 1958.
- [6] Gordon, P. B. et al.: *Arch. Int. Med.*, 103:63, 1959.
- [7] *Brit. Med. J.*, (News and Notes), 4 (5782):310, 1971.
- [8] Cotterill, J. A.: *Am. Heart. J.*, 87:538, 1974.

AN INVESTIGATION ON THE ETIOLOGY OF EPIDEMIC MYALGIA (PLEURODYNIA) IN THE RURAL DISTRICTS OF SHANGHAI

Shi Ou-sheng, Ding Xiao-guang, Ying Bei-bei

(Sanitary and Anti-epidemic Station of Shanghai)

From July to September in 1975, an epidemic myalgia (pleurodynia) broke out in certain districts in the counties of Baoshan and Jiading. 26 strains of coxsackie B₁ virus were isolated from rectal swabs, throat washings and stool specimens taken from 34 patients. The results of neutralization test using paired sera from 9 patients, and convalescent serum from 3 cases against the recently isolated virus antigen (SM75-9) showed

that the titre of the convalescent sera of 9 cases showed a four-fold rise or was higher than those of the acute stage and the G. M. T. of the convalescent sera was 42 times higher than that of the acute stage. This virologic and serologic results demonstrated that coxsackie B₁ virus was the etiologic agent of the epidemic myalgia (pleurodynia) in 1975 in Shanghai.