DOI:10.16016/j.1000-5404.1979.01.004

Med. 50: 723, 1971
14、Миррахимов, М.М. и др.: Кли. Мед. (12) 14, 1972
15、Susmono, A. et al: Amer. Heart J. 84: 203, 1973
16、Лазарис, Я. Л. и др.: Легочное Кровообращение Москва 1963 P. 95～144
17、Bergofsky, E.H.: Amer. J. Med. 57: 378, 1974
18、Fishaman, A.P. Cir. Res. 38: 221, 1976
19、J.F. Nunn: Applied respiratary physiology znd Edition, Butter Worths 1977 P414—421
20、Messer, J. V. et al: Amer. J. Cordiol. 9: 384, 1961
21、Neill, W. A. et al.: Am. J. Cardiol. 24: 166, 1969
22、Ward, W.: Mountion Medicine Crosby lockwood 1975 P.108—190
23、Taylor, S. H. et al.: Brit. Heart J. 72: 627, 1965
24、Gould, L. et al.: J. Clin. Pharmacol. 12: 153, 1972
25、Majid, P. A. et al.: Lancet (2) 719, 1971
26、Perret, C. et al.: Brit. Heart J. 37: 640, 1975
27、Gould, L. et al.: Am. Heart J. 92:397, 1976

感冒病人病毒的分离和鉴定

训练部　朱德钟、王守良、王华东、李光平、刘启富

感冒是引起慢性支气管炎复发的重要原因[1]。感冒病原的种类颇多，但主要是病毒[2]。因此，找出引起感冒的主要病毒种类，对感冒、慢性支气管炎的防治有着重大意义。

1972.3～1973.2，我们曾对92例成年感冒病人进行病毒分离，并作了初步鉴定。现将病毒分离和鉴定情况汇报于后。

材料和方法

1.标本的采取及处理：感冒病人均为本校学员、工作人员及部分上海机床厂的工人。选择发病后第1～4天的病人采取标本。鼻分泌物以灭菌棉拭子采取，洗于含3毫升0.25%LHEagle氏液(PH7.2)的试管中，咽洗液用5毫升Hanks液含漱，然后两者混合，以3000转离心沉淀15分钟，取其上清。每毫升标本液加双抗(青霉素+链霉素)各1000单位，卡那霉素500单位，放4℃冰箱2小时或过夜后，接种至原代人胚肾单层细胞管中（如当时无细胞管，则冻存于－20℃低温冰箱）。

2.人胚肾细胞的制备：将自妇产科人工引产的3～7个月胚胎，及时取肾，于冷Hanks液平皿中去包膜，将肾皮质剪成米

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

粒大小，用Hanks液洗三次，加PH 7.2的0.125～0.25%胰蛋白酶（Difco）Hanks液20～40毫升（视胚龄大小而定），置4℃过夜，次日倾去胰蛋白酶液，并用Hanks液洗肾组织3次，然后加少量Hanks或LH溶液，用大口吸管吹吸，使肾组织块充分分散成肾细胞悬液，补充生长液（含10%灭活小牛血清的0.25%LH及1/2Eagle氏液、双抗500单位、卡那250单位、PH7.2）30～50毫升，混匀后，取细胞悬液1毫升，用生长液稀释成1:2、1:4及1:8，接种于试管中，置36℃孵育，次日，观察细胞贴管情况，以确定合适的细胞浓度，分装于100×12 mm的试管，置36℃孵育48小时后，换生长液一次，约5～7天可成单层肾上皮细胞。

3.标本接种及培养观察：取上述原代人胚肾单层细胞4管，倒去其中生长液，每管加入维持液（含2%灭活小牛血清的0.25% LH及1/2Eagle氏液、双抗500单位、卡那250单位、30mM $MgCl_2$、PH7.2）0.5毫升，然后每管加入标本0.5毫升，置33℃转管（每小时8～10转）培养，次日倒去标本液，每管重加入维持液1毫升，待2～3日后，用高PH的维持液娇正PH一次，第七天换维持液一次。每日或隔日观察细胞病变一次，于第7天或第12天作血吸附试验（每管加入1%洗涤豚鼠红血球0.1毫升，于4℃斜置15分钟后观察结果）。如出现细胞病变或血吸附现象的细胞管，则取其液相连续转代3～4次后，进行生物学鉴定。如观察2周尚无细胞病变及血吸附现象的标本，则任取其一管盲目传代一次，仍无细胞病变及血吸附现象者，则作干扰试验，（以仙台病毒10个$TCID_{50}$的血吸附单位攻击，培养48小时后，观察血吸附结果来判定）。干扰试验仍阴性者，则作阴性结果。

4.病毒鉴定方法：

（1）耐酸试验：取待鉴定病毒培养液0.6毫升，分装于两支小试管内，每管0.3毫升，其中一管加$N/_{10}HCl$液0.1毫升为试验管（PH3.0±），另一管加PH7.0的磷酸盐缓冲生理盐水0.1毫升为对照管。将两支试管同时置37℃水浴箱中，作用60分钟后，试验管以$N/_{10}NaOH$液0.1毫升娇正PH达7.0，对照管则补充同量的PH7.0磷酸盐缓冲生理盐水。最后试验管和对照管分别以维持液作10倍递增稀释，每个稀释度接种原代人胚肾细胞3支，于33℃转管培养，每1～2天观察细胞病变，7—10天计算$TCID_{50}$结果。

（2）耐乙醚试验：取待鉴定病毒培养液0.8毫升，以每管0.4毫升分装于两支试管中，其中一管加麻醉用乙醚0.1毫升，混匀，另一管不加作为对照。两管同时置4℃冰箱过夜，次日将乙醚处理的试管内病毒液倒入灭菌平皿中，于室温中待乙醚完全蒸发后，两管分别以维持液作10倍递增稀释，同上接种细胞管、培养和观察计算。

（3）核型试验：将待鉴定病毒培养液用每毫升含50微克疱疹净眼药水（或每毫升含100微克的胞苷）的维持液作10倍递增稀释，同时以不含药物的维持液作同样稀释为对照，同上分别接种细胞管、培养和观察该药对病毒的影响。在试验同时，用DNA病毒（疱疹病毒）和RNA病毒（$ECHO_{11}$）作对照。

（4）血吸附抑制试验：将待鉴定粘病毒（10^{-1}）接种于原代人胚肾细胞（维持液同上）15～20管，于36℃孵育72小时，倒去感染的维持液，并以Hanks氏液洗一次，然后加入已经蔡氏滤液（上海生物制品研究所赠给）处理的流感病毒和副流感病毒各型血清（用Hank氏液稀释至1:10）每管1毫升，每型血清2～3管，另有2～3管不加血清作为病毒对照。置36℃孵育30分钟后，每管加入

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1%洗涤豚鼠血球0.1毫升，斜置4℃冰箱20分钟后，镜检血吸附现象及血吸附抑制现象。

（5）中和试验：将待鉴定的鼻病毒先行滴定，测出其$TCID_{50}$，试验时用维持液稀释成50～100$TCID_{50}$/毫升，免疫血清⑩先以LH作1:40稀释，经56℃30分钟灭活后，再以维持液作4倍递增稀释，然后各稀释度血清与上述病毒等量混合，置室温1小时后，每稀释度血清接种细胞管3支，每管1毫升。并设血清、病毒和细胞对照组。置33℃转管培养。隔日观察细胞病变，待病毒对照细胞病变呈“卅”后，判定结果。

结果与讨论

1.病毒分离结果：92例成年感冒病人鼻咽洗液标本中，有20份标本在原代人胚肾细胞上出现细胞病变或血吸附现象，经传代及初步鉴定确定，其中6份是粘病毒、9份是鼻病毒、2份是肠道病毒、1份是疱疹病毒、尚有2份致细胞病变的病毒待定(表1)。

2.病毒分离阳性感冒病人的主要症状：在20例病毒分离阳性的感冒病人中，有17例作了临床症状的记录，其主要症状见表2。

表1　92例成年感冒病人鼻咽洗液标本的病毒分离结果

病人标本总数	分离阴性标本数	分离阳性标本数						分离阳性率(%)
		粘病毒	鼻病毒	肠道病毒	疱疹病毒	待定病毒	合计	
92	72	6	9	2	1	2	20	21.6

表2　17例分离到病毒的感冒病人的主要症状

标本号	发病日期			采标本日期			主要症状							分离到病毒的种类
	年	月	日	年	月	日	喷嚏	流涕	畏寒	头痛	咽痒	咳嗽	全身不适	
601	72	5	15	72	5	15	+	+	+					粘病毒
606		5	13		5	16	+	+	+	+	+	+	+	
613					5	17		+				+	+	
618		5	22		5	23	+	+			+	+	+	
645		9	23		9	26	+	+	+	+		+	+	
646		9	26		9	26		+	+	+	+	+	+	
609		5	14		5	17		+		+	+		+	鼻病毒
626		6	18		6	19	+	+			+		+	
631		7	9		7	10	+	+		+	+			
640		7	10		7	12	+	+						
642		7	10		7	12	+	+	+	+	+	+		
662	73	1	6	73	1	9	+	+	+	+	+	+	+	
666		1	15		1	17	+	+		+	+	+		
667		1	16		1	18	+	+		+	+			
668		1	16		1	19		+	+	+	+	+	+	
616		5	21		2	23	+	+		+	+	+	+	肠道病毒
629		6	19		2	20				+	+	+		疱疹病毒

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

从表2看来，分离出不同种类病毒的感冒病人都有共同的打喷嚏、流清鼻涕、咽部发痒或发干等症状。因此根据临床症状是无法作出病原诊断的。

3.病毒生长及传代的情况：20份阳性标本病毒的生长和传代情况见表3。

9份分离出鼻病毒的标本均在接种标本后第7～12天才逐渐自单层细胞边缘出现局灶性细胞病变，病变细胞呈玻璃样折光性，细胞外缘不整齐，呈阿米巴状，并有长枝突起，细胞表面呈节结状；这种病变细胞可留存1～3天，随后变圆、破碎。这种病灶可缓慢地向细胞层中心发展，但在初代分离时很难发展到全层。在连续传代过程中，可加快和增强这种细胞病变作用。这种典型细胞病变只在33℃转管培养时才易见到，在36℃

表3　20份阳性标本病毒的生长和传代情况

标本号	第一代		第二代		第三代		病毒种别
	细胞病变出现之天数及程度	血吸附出现之天数及程度	细胞病变出现之天数及程度	血吸附出现之天数及程度	细胞病变出现之天数及程度	血吸附出现之天数及程度	
601	10(±)	10(+)	5(±)	5(++)	8(±)	8(+++)	粘病毒
606	10(±)	10(+)	5(±)	5(++)	6(±)	6(++++)	
613	11(+)	8(−)	7(±)	7(±)	8(+)	8(+++)	
618	9(±)	8(±)	13(±)	13(+)	7(+)	7(++)	
645	11(+)	9(±)	6(++)	6(++)	7(++)	7(++)	
646	9(+)	9(+)	6(+)	6(++)	7(++)	7(++)	
609	10(++)		4(++)		6(++)		鼻病毒
626	9(++)		6(++)		6(++)		
631	9(++)		7(++)		5(+++)		
640	12(++)		7(++)		4(+++)		
642	7(+)		6(++)		4(++)		
662	10(±)		9(+)		5(++)		
666	10(+)		6(+)		5(++)		
667	10(+)		5(++)		5(++)		
668	10(±)		5(++)		5(++)		
585	2(++)		2(+++)		2(++++)		肠道病毒
616	3(++)		2(++)		2(++++)		
629	9(++)		2(++)		2(+++)		疱疹病毒
583	2(++)		2(++)		2(+++)		待定病毒
672	8(+)		5(+)		5(+)		

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

静止培养时则不出现。

6份粘液病毒的标本在初代分离时直到9～11天才于细胞层边缘逐渐出现轻微的颗粒性圆细胞病变或轻度的血吸附现象，连续传至第三代，细胞病变或血吸附现象才逐渐增强。

两株肠道病毒在初代分离时于第2～3天即出现典型的油滴状小圆细胞的病变，但一株疱疹病毒初代分离时在第9天才出现成团的大圆细胞的病变，一经传代则迅速加快和增强细胞病变，另一株能迅速引起大圆散在颗粒细胞病变的病毒和一株呈类似鼻病毒细胞病变病毒尚待鉴定。

根据上列情况，我们认为病人标本分离工作中，盲传2代对提高病毒的检出率是有利的。

4.病毒的鉴定情况

20株新分离的病毒中18株做了一些相应的生物学鉴定。其结果见表4、5、6、7。另2株病毒尚待鉴定。

表4　9株鼻病毒的理化特性

病毒编号	耐酸试验		耐乙醚试验		核型测定		
	pH 3.0	pH 7.0	乙醚处理	对照	试验组	对照组	核型
609	<1.0	4.2	4.5	4.0	3.7	4.0	RNA
631	<1.0	3.5	3.2	3.5	3.8	3.8	RNA
640	<1.0	3.2	2.7	3.2	3.5	3.8	RNA
626	<1.0	4.0	3.7	4.0	3.8	3.3	RNA
642	<1.0	3.5	2.4	3.1	3.5	3.1	RNA
662	<1.0	3.0	2.0	2.5	—*	—	
666	<1.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	RNA
667	<1.0	3.5	3.0	3.5	3.0	3.5	RNA
668	<1.0	2.5	3.5	3.5	—	—	

*未做

表4为9株具有典型鼻病毒细胞病变的病毒，均能耐受20%乙醚18小时以上的处理，但不能耐受在PH3.0的条件下，37℃作用1小时；除662，668未作核型测定外，其余7株经核型测定试验证明均为RNA病毒。这些基本理化特性是符合鼻病毒的特性的。

表5　六株粘病毒的一些生物学性状

病毒编号	血凝效价（感染细胞培养液）	鸡胚羊水囊接种生长情况	血吸附抑制试验 流感病毒免疫血清 甲型a	乙型b	丙型c
601	1:2	未生长*	—	—	—
606	1:8	〃	—	—	—
613	1:16	〃	—	—	—
618	1:8	〃	—	—	—
645	1:16	〃	—	—	—
646	1:16	〃	—	—	—

“*” 经鸡胚羊水囊传一代仍未见豚鼠血球的血凝现象。
“a” 系A_2京生71～1株的鸡免疫血清。
“b” 系B湘防株的鸡免疫血清。
“c” 系C_{123}株的鸡免疫血清

表5为6株血吸附试验阳性的粘病毒，它们在原代人胚肾上能很好生长，出现血球吸附现象，但血凝滴度均很低（1:2～1:16）；对鸡胚羊水囊均不易适应；经血吸附抑制试验证明均不被流感病毒三个免疫血清所抑制，似非流感病毒。我们认为这6株粘病毒是副流感病毒。至于分属于那几个副流感病毒的型别，有待进一步鉴定。

表6为2株快速出现典型肠道病毒细胞病变的病毒，经耐酸、耐乙醚试验证明为耐酸、耐乙醚，符合肠道病毒特点。但不被脊髓灰质炎病毒三个型的抗血清所中和，对乳小白鼠（生后1天龄）脑内及腹腔接种也不感染。因此这两株肠道病毒很可能是ECHO病毒。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表6　两株肠道病毒的生物学特性

病毒编号	耐酸试验		耐乙醚试验		乳小白鼠感染试验	脊髓灰质炎病毒免疫血清中和试验※		
	PH3.0	PH7.0	乙醚处理	对照		Ⅰ型	Ⅱ型	Ⅲ型
585	3.2	3.5	4.5	4.5	0/6 △	——	——	——
616	6.5	6.5	6.7	6.5	0/6	——	——	——

"※"脊髓灰质炎病毒免疫血清系昆明医学生物研究所赠给，以1:10血清与等量病毒（不稀释）于室温作用1小时后，接种细胞管，待病毒对照照管呈"卅"以上的细胞病变时，判定结果。

"△"每只乳小白鼠接种浓病毒液脑内0.01毫升，腹腔0.05毫升观察2周，表中分母为接种鼠数，分子为发病或死亡鼠数。

表7　一株疱疹病毒的生物学性状

病毒编号	乳小白鼠（死亡数/接种数）	2至3周小白鼠（死亡数/接种数）	病毒核型测定			疱疹病毒免疫血清中和试验※
			试验组	对照组	核型	
629	7/7	4/6	<1.0	3.2	DNA	+

"※"疱疹病毒免疫血清系北京卫生部药品、生物制品鉴定所供给。以1:10稀释与不稀释的病毒液在人胎肾细胞管中作中和试验。

表7中是一株从典型感冒急性期病人的鼻咽分泌物中分离到的病毒，从细胞病变特点、核型测定、小白鼠感染试验及中和试验的结果看来是符合疱疹病毒的。

5.几株鼻病毒的双向中和试验

为了了解我们分离到的鼻病毒究竟有几个型，曾将72年先分离出的5株鼻病毒和北京解放军302医院等兄弟单位赠给的某些鼻病毒株制备豚鼠免疫血清，各取我们分离的4株（609、626、631及642）和302医院的1株（059）做了双向中和试验，其结果见表8。

从表8中看出059同我们分离的4株鼻病毒均无抗原交叉，不是同一个血清型；本地区4株鼻病毒中609和642株亦无抗原交叉，也为不同血清型；而626和631株有明显抗原交叉，是否为同一血清型，尚待确定。

6.病人鼻咽洗液标本中的鼻病毒在低温保存过程中的稳定性：

在实际工作中常有必要将病人标本暂置低温冻存。为了了解标本冻存后对鼻病毒分离结果的影响，我们曾对1972年6～7月间采取的4份鼻病毒感染鼻咽洗液标本（即626，631，610及642），于1973年2月26日重新用原代人胚肾细胞进行分离（已于

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

－20℃冻存7～9个月），其结果列于表9。

表8　几株鼻病毒的双向中和试验结果

抗病毒血清编号 \ 病毒	626	609	631	642	059
626	2560	－※	640	－	－
609	－	640	－	－	－
631	160	－	2560	－	－
642	－	－	－	640	－
059	－	－	－	－	640

※“－”为兔疫血清稀释1:40无中和作用。

表9可看出4份鼻病毒感染的鼻咽洗液标本，于－20℃冻存7～9个月后，重新分离时全部获得阳性结果。但与原来分离情况相比较，则在重分离时其典型细胞病变出现的时间和病变程度均比原分离时延缓和减弱。由此可见，在－20℃低温长期冻存过程中，标本中鼻病毒虽有一部分已失去细胞感染的活性，但仍会有不少活存，使重分离获得成功。因此在实际工作中需要暂时冻存标本，对鼻病毒的分离结果是无多大影响的。

7.人胚组织细胞对鼻病毒的不同敏感性

关于人胚的不同组织细胞对鼻病毒的敏感性不同，即使同一种人胚组织来自不同人胚对鼻病毒的敏感性也有很大差异，已有不少的报导（5—8）。我们为了提高分离阳性率，曾试用了原代人胚肾细胞、人胚肠半传代细胞及人胚肺双倍体细胞，（由昆明医学生物研究所赠给），维持液中不加 $MgCl_2$ 并以灭活鸡血清代替小牛血清，平行分离感冒病人标本22份。结果初代出现特异性细胞病变者：肠细胞有5份标本（即662，666，667，668及672），肺细胞有3份（即667，668及672），而肾细胞没有一份，但干扰试验阳性有2份（即662及666）。由于这5株病毒已有4株确定为鼻病毒（另一株CPE也颇似鼻病毒），故初步看来，人胚肠半传代细胞在上述维持液的条件下对某些鼻病毒的分离似比原代肾和肺双倍体细胞更为敏感。

为了了解同一种双倍体细胞对不同鼻病毒株的敏感性。我们曾以上述人胚肺双倍体细胞对5株用原代肾细胞分离到的鼻病毒作了感染滴度的测定，（维持液中加 $MgCl_2$ 及小牛血清）结果列于表10。

由表10可看出5株鼻病毒中有2株（626，631）在人胚肺双倍体细胞中繁殖不如原代肾细胞，另外3株在两种细胞中的繁殖情况差别不大。从中和试验证明626、631属同一个系明显抗原交义而另3株则为不同的三个血清型。由此可见同一种人胚肺双倍体细胞对不同血清型的鼻病毒感染的敏感性是不同的。据此，在实际工作中尽可能寻找比较广泛病毒敏感性的人胚双倍体细胞或增加1～2种细胞同时用于分离标本，对提高分离阳性率是有好处的。

小　结

1.对92例成年人感冒病人进行了病毒病原的分离和鉴定，共分出病毒20株，分离阳性率为21.6%；20株病毒中9株为鼻病毒（占45%），6株为粘病毒（占30%），2株为肠道病毒（占10%），1株为疱疹病毒（占0.5%），还有2株（占10%）待鉴定。

2.从我们72年5～7月间分离到的5株鼻病毒中抽取4株，经双向中和试验证明至少分属于3个血清型。

3.某些鼻病毒在病人标本中，于－20℃冻存7～9个月仍能分离成功，故在低温暂时冻存标本，对鼻病毒的分离不会有多大影响。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表9　4份鼻病毒感染的病人标本于－20℃保存7—9个月后重分离结果

病毒编号	第一代 典型细胞病变出现的天数和程度		第二代 典型细胞病变出现的天数和程度		第三代 典型细胞病变出现的天数和程度	
	原分离	重分离	原分离	重分离	原分离	重分离
626	9（++）	13（±）	6（++）	9（+）	6（++）	9（++）
631	9（++）	11（±）	7（++）	9（±）	5（+++）	12（+）
640	19（++）	13（±）	7（++）	9（++）	4（+++）	9（+）
642	7（+）	10（+）	6（++）	9（+）	4（++）	9（++）

表10　5株鼻病毒在人胚肺双倍体细胞和原代肾细胞中的滴度

病毒编号	人胚肺双倍体细胞	原代人胚肾细胞
609	>4.9	4.0～4.5
626	1.0	3.8～4.0
631	2.3	3.5～3.8
640	3.3	3.2～3.5
059※	3.3	4.0～4.5

※059鼻病毒系解放军302医院赠给

4.某些呼吸道病毒（如鼻病毒、付流感病毒等）初代分离时细胞病变或血吸附现象常不明显，经传代1～2次后则显著加强。故盲传2代有利于提高检出率。

5.不同人胚组织细胞对鼻病毒的敏感性有差别，继续寻找更广泛敏感性的人胚双倍体细胞或增加1～2种细胞用于分离病毒，有利于提高分离阳性率。

参考文献

1.全军防治慢性支气管炎办公室：情况简报，1972，17期

2.Tyrrell, D.A.G. et al.: Lancet 1:239, 1960

3.Mufson, M.A.et al: J.A.M.A. 195(1): 91, 1966

4.Connelly, A.P.et al.: J. Lab. &.Clin.Med.63:31, 1964

5.Phillips, C.A.et al.: Proc Soc. Exp. Biol. Med. 119:843, 1956

6.Stott, E.G.et al.: Bris. J. Exp. Path. 48:544, 1967

7.Johnson, K.M.et al.: Am.J. Pub. Helth. 52:933, 1962

8.Hoorn, B.L.; Tyrrell, D.A. G.: Arch. Ges. Virusforschung 18:210, 1966

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net