

1971 年流行性结膜炎病毒的分离和鉴定*

施 耜 笙⁽¹⁾ 马 子 行⁽²⁾ 于 如 逊⁽³⁾
陆 显 新⁽¹⁾ 李 子 华⁽⁴⁾ 王 悦 治⁽⁵⁾
贺 适 民⁽⁶⁾ 潘 玉 芝⁽⁷⁾ 沈 美 瑀⁽⁸⁾

(上海红眼病病原协作组, 上海)

1971 年上海市急性结膜炎 (俗称“红眼病”) 流行时, 分离到一株细胞致病性病毒 (暂定名为“沪红 17”或“SEC 17”)。经与 25 名患者的双份血清作中和试验, 结果表明急性期血清的中和抗体滴度均 $\leq 1:5$, 恢复期血清的中和抗体滴度: 21 名有 4 倍或 4 倍以上增长, 2 名阳转 (另 2 名无急性期血清, 双份恢复期血清均为阳性)。说明沪红 17 株病毒是这次“红眼病”的病原。另外 8 名患者的单份急性期血清及 7 名正常人血清的中和抗体滴度亦均 $\leq 1:5$ 。说明感染前人群 (共 38 名) 对该病毒的抗体水平甚低。

18 名患者双份血清的腺病毒补体结合试验, 和腺病毒 8 型中和试验, 无一例有抗体增长, 说明这次流行与腺病毒无关。

沪红 17 株病毒不能被 5-IDUR 所抑制, 对乙醚稳定, 能耐酸 (pH 3.0, 37℃ 1 小时), 能被 50℃ 半小时灭活, 在含有 1 M 钙或镁离子时 50℃ 加热 1 小时仍稳定。感染细胞的超薄切片电镜观察, 胞浆中有许多空胞及液泡, 并在胞浆中查见典型的晶格样排列的病毒颗粒, 有的成堆地释放于细胞外, 其大小为 25—26 毫微米, 核内未查见病毒颗粒。根据上述生物学特征, 沪红 17 株病毒可归入微小 RNA 病毒 (Picorna virus), 且与肠道病毒近似。

但沪红 17 株病毒不被脊髓灰质炎病毒第 1-3 型, 柯萨奇病毒 A9、B1-6 型, 肠道孤儿病毒第 1-13, 15, 17-19 型的免疫血清所中和。对乳鼠不致病; 对人胚肾、恒河猴肾及地鼠肾等原代细胞的敏感性差, 对 Hela、人羊膜、人胚肺等传代细胞极敏感。根据这些实验结果和已知三种肠道病毒作了比较和探讨。我们认为沪红 17 株病毒很可能是一种新的微小 RNA 病毒。

最后, 作者将近年来新加坡、日本、澳大利亚等地有关流行性结膜炎病毒分离和鉴定的报告, 和本文作了对比和讨论。

1970 年以前的报告^[1-4], 世界各地发生的流行性角结膜炎, 其病原大都是腺病毒, 尤以腺病毒第 8 型为多见。查特吉 (Chatterjee, S. 1970) 等^[5]报道 1969 年一种不平常型流行性结膜炎席卷加纳全国, 流行情况及临床表现与常见的流行性角结膜炎不同。利姆及墨菲 (Lim, K. H. & Murphy, M. Y. 1971) 等^[6]报道 1970 年新加坡发生规模空前的流行性结膜炎, 并否

* 本文的电镜工作, 承北京吴慎同志协助在人胚肺传代细胞及人胚肾原代细胞中培养, 并承北京陈德慈同志大力协助, 完成本文的电镜检查部分, 并提供电镜照片和讨论意见。实验过程中, 承第七军医大学及南京市卫生防疫站赠与部分患者血清, 谨此一并致谢。

(1) 上海市卫生防疫站; (2) 上海市传染病总院; (3) 上海铁道医学院; (4) 上海第一医学院; (5) 上海第二医学院; (6) 上海生物制品研究所; (7) 上海实验生物研究所; (8) 上海眼病皮肤病防治所。

本文 1973 年 10 月 8 日收到。

定了腺病毒是病原。1971年上海市发生的流行性结膜炎(俗称“红眼病”)有传播快,发病率高,潜伏期短等特点,临床表现除有明显的结膜充血、水肿外,多数患者伴有球结膜出血及角膜上皮点状脱落,部分伴有耳前淋巴腺肿大、咽痛、发热等症状。流行初期,各单位共作了1297份标本的细菌培养及416份标本的直接涂片检查,均未获得有意义的结果。为了找寻这次流行的病原以进一步贯彻“预防为主”的方针。在市革命委员会和卫生局革命委员会的领导下,发扬社会主义大协作精神,各单位抽调科研人员,组成“红眼病”病原研究协作组,对“红眼病”病原作了一系列研究。

患者眼拭材料的病毒分离

一、分离方法

以棉拭涂抹患者眼睑结合膜,然后将其洗于2毫升的维持液中。多数为3—5人混合为一份,少数为单独或两人混合,经青、链霉素500单位/毫升处理后,置零下20—30℃保存。应用的组织细胞分别有:原代人胚肾、原代地鼠肾、D-6、L₁₆、传代人羊膜等五种;每份标本接种3—4管细胞,每管0.2毫升,维持液为5%小牛血清水解乳蛋白汉克斯液,观察时间自1—3周不等,观察一周以上者3—5天换液一次,收获后冻融1—3次继续传代,每份标本在同一种细胞上至少传三代以上。

二、分离结果

90份眼拭标本分别在五种组织细胞上的分离结果(表1),共有41份经三代以上仍有不同程度的细胞病变,其中大部只产生不完全的细胞病变,病变进展缓慢,三代以后病变时有时无,多数未能稳定传代,其中只有用D-6细胞分离的沪红17和用人胚肾细胞分离的沪红14能稳定传代,并有特异性的完全病变。经鉴定,沪红14株病毒能被腺病毒第3型免疫血清所中和,但不能被沪红17株的免疫血清所中和,已鉴定为腺病毒3型。沪红17株病毒的鉴定另行叙述。

表1 眼拭标本的病毒分离结果

细胞种类	标本数	可疑阳性 (三代以上仍有不同程度的细胞病变)
原代人胚肾	24	9
原代地鼠肾	12	5
D-6 细胞	39	19
L ₁₆ 细胞	10	5
传代人羊膜	5	3
总计	90	41

腺病毒血清学试验

一、材料和方法

(一)采取18名患者的急性期和恢复期双份血液,然后分离血清,置零下20℃保存。另外还采了9名未曾感染“红眼病”的正常人血清。血清在试验前经56℃灭能30分钟。

(二)腺病毒第8型中和试验在人胚肾细胞进行,第8型标准毒株的TCD₅₀=4.5/0.1毫升,试验时采用100 TCD₅₀与稀释血清等量混合,置37℃水浴1小时,接种细胞管每管0.2毫升,6—7天看结果。

(三)腺病毒补体结合试验采用卡萨尔斯(Casals)小量法,抗原为腺病毒第7型标准株的人肾细胞培养物作1:8稀释,补体用量为2个恰实单位,于4℃结合18小时,每管试验总量为0.6毫升。

二、实验结果

(一)18名患者的双份或三份血清与腺病毒第8型的中和试验结果:5份为<1:10,3份为1:10,1份为1:20,8份为1:40,1份为1:80。急性期与恢复期血清的中和抗体完全一致,无一例增高(表2)。

(二)9名采自未曾感染“红眼病”的正常人血清对腺病毒第8型的中和试验结果:4份为<1:10,2份为1:10,3份为1:20。

(三) 18 名患者双份血清的腺病毒补体结合试验结果: 除 3 名双份血清均为抗补外, 其余 15 名的补结抗体 3 份为 1:4,

5 份为 1:8, 2 份为 1:8—1:16, 2 份为 1:16, 1 份为 1:32, 2 份为 1:64。恢复期抗体未见有 4 倍或 4 倍以上增高(表 2)。

表 2 患者双份血清的腺病毒血清学试验

患者姓名	标本号	采血时距 发病天数	试 验 结 果	
			腺病毒第 8 型 中和试验	腺病毒 补体结合试验
曾 ×	86	1	1:10	1:8
	87	15	1:10	1:8
潘 ×	88	1	1:10	抗补
	89	15	1:10	抗补
曹 × ×	84	1	<1:10	1:8
	85	13	<1:10	1:8
王 × ×	35	1	1:40	1:8
	77	24	1:40	1:8
闻 × ×	83	1	1:40	1:64
	79	24	1:40	1:64
王 × ×	55	2	1:80	1:8
	75	19	1:80	1:8
	82	67	1:80	1:8
沈 ×	54	2	<1:10	1:8
	74	19	<1:10	1:8
	81	66	<1:10	1:8
章 × ×	43	4	1:40	1:16
	44	60	1:40	1:8
姚 × ×	45	4	1:20	1:64
	46	60	1:20	1:64
伍 × ×	49	4	<1:10	抗补
	50	60	<1:10	1:4
汪 × ×	51	4	1:40	抗补
	52	60	1:40	抗补
谢 × ×	25	2	1:40	1:8
	30	34	1:40	1:16
黄 × ×	22	15	<1:10	1:4
	80	58	<1:10	1:4
黄 × ×	23	15	1:10	1:4
	78	51	1:10	1:4
赵 × ×	39	3	1:40	1:16
	40	23	1:40	1:16
张 × ×	37	4	<1:10	抗补
	38	60	<1:10	抗补
钮 × ×	47	4	1:40	抗补
	48	60	1:40	1:16
蒋 × ×	53	4	1:40	抗补
	76	60	1:40	1:32

新分离病毒株的中和试验

一、材料和方法

(一) 25 名双份(或三份)血清标本采自不同时间和地区的“红眼病”患者。除 2 名(*11 及 *12)外, 其余 23 名的第一份血清均采于急性期, 第二份采于发病后 3—9 周, 6 名患者的第三份血清采于发病后半。另外 10 名患者的单份血清中, 8 名采于发病第一天, 2 名采于发病后 8 个月。7 名正常人血清采于距流行结束后半年。

(二) 病毒材料包括由本市分离的沪红 17 株、沪红 14 株(为腺病毒 3 型)及北京分离的京红 25 株(为腺病毒 4 型, 承中国医学科学院病毒研究所赠与)。

(三) 沪红 17 株病毒的中和试验在 D-6 细胞进行。试验时病毒液(D-6 细胞培养物)稀释成 1:4 (≈ 25 TCD₅₀/0.1 毫升)。血清作 1:5—1:80 两倍递增稀释, 各稀释度血清与病毒等量混合, 置 37℃ 水浴 1 小时, 接种细胞管每管 0.2 毫升, 6—7 天后看结果。沪红 14 株及京红 25 株病毒的中和试验在人胚肾细胞进行, 试验时病毒液(人胚肾细胞培养物)稀释成 1:30 (≈ 25 TCD₅₀/0.1 毫升)。其余方法同上。

二、试验结果

(一) 25 名患者的双份或三份血清对沪红 17 株病毒的中和试验结果: 急性期血清的中和抗体滴度均 $\leq 1:5$, 恢复期血清均有中和抗体存在, 无一例阴性, 除了 2 名患者(*11, *12)第一份血清采血时已为恢复期(15 天)而难于比较外, 其余 23 名中的 21 名(占 91.3%)恢复期血清的中和抗体滴度较急性期有 4 倍或 4 倍以上增高。另 2 名(*10, *25)恢复期血清中和抗体

表 3 急性结膜炎患者双份血清与新分离毒株的中和试验

患 者	发病日期	标本号	病 程 (天)	中和抗体效价			患 者	发病日期	标本号	病 程 (天)	中和抗体效价		
				沪红17 株	沪红14 株*	京红25 株**					沪红17 株	沪红14 株*	京红25 株**
#1,王	1971年 8月25日	35 77 107	1 24 126	<1:10 1:10 1:20	1:10 1:10 1:10	<1:10 <1:10 <1:10	#13,曹	1971年 8月9日	149-1 149-2	7 22	<1:5 1:40		
#2,闻	1971年 8月25日	83 79 108	1 24 131	1:5 1:10 1:20	1:20 1:20 1:20	<1:10 <1:10 <1:10	#14,沈	1971年 8月10日	158-1 158-2	6 21	<1:5 1:40		
#3,王	1971年 8月26日	55 82 110	2 67 131	<1:10 1:40 1:40	1:10 1:10 1:10	<1:10 <1:10 <1:10	#15,杨	1971年 8月11日	153-1 153-2	5 20	<1:5 1:80		
#4,沈	1971年 8月26日	54 81 109	2 66 130	<1:5 1:10 1:10	<1:10 <1:10 <1:10	<1:10 <1:10 <1:10	#16,秦	1971年 12月8日	105 111 115	2 5 110	<1:5 1:80 1:40		
#5,章	1971年 7月28日	43 44	4 64	<1:5 1:10	<1:10 <1:10	<1:10 <1:10	#17,孙	1971年 8月10日	南1A 南1B	4 25	<1:5 1:40		<1:10 <1:10
#6,姚	1971年 7月28日	45 46	4 64	<1:5 1:40	1:10 1:10	<1:10 <1:10	#18,薛	1971年 8月11日	南2A 南2B	3 24	<1:5 1:80		1:10 1:10
#7,伍	1971年 7月28日	49 50	4 64	<1:5 1:40			#19,金	1971年 8月10日	南3A 南3B	4 25	<1:5 1:20		<1:10 <1:10
#8,汪	1971年 7月28日	51 52	4 64	<1:5 ≥1:80	1:20 1:20	<1:10 <1:10	#20,薛	1971年 8月7日	南4A 南4B	7 28	<1:5 1:20		1:10 1:10
#9,谢	1971年 7月30日	25 30 114	2 34 230	<1:5 ≥1:80 1:20			#21,单	1971年 8月10日	南5A 南5B	4 25	<1:5 1:40		
#10,王	1971年 7月31日	41 42	4 24	<1:5 1:5			#22,张	1971年 8月10日	南6A 南6B	4 25	<1:5 1:80		
#11,黄	1971年 8月2日	22 80	15 58	1:5 1:5	1:10 <1:10	<1:10 <1:10	#23,王	1971年 8月13日	南7A 南7B	1 22	<1:5 1:40		
#12,黄	1971年 8月5日	23 78	15 51	1:40 1:40			#24,赵	1971年 8月11日	南8A 南8B	3 24	<1:5 ≥1:80		
							#25,仇	1971年 8月10日	南9A 南9B	4 25	<1:5 1:5		

* 沪红 14 株病毒已鉴定为腺病毒 3 型。 ** 京红 25 株病毒已鉴定为腺病毒 4 型。

阳转(表 3)。

(二)上述患者中的 8 名同时作了沪红 17 株及京红 25 株的中和试验,南京市患者 4 名(*17—*20) 同时做了京红 25 株的中和试验,两者结果无一例有抗体增高现象(表 3)。

(三)10 名患者单份血清及 7 名正常人对沪红 17 株病毒的中和试验结果:10 名中的 2 名(*26*,27) 采血时距发病已有八个月,血清中的中和抗体滴度仍有 1:40,

另 8 名采血时为发病第一天,中和抗体滴度均 ≤1:5。距流行结束后 6 个半月的 7 名正常人,中和抗体滴度亦 ≤1:5(表 4)。

沪红 17 株病毒的实验结果

一、标本来源及分离经过

眼棉拭标本于 1971 年 7 月 27 日采自某医院发病第二天的 2 名门诊患者(吴、徐)。其临床表现主要为异物感,两眼结合膜急性充血,水肿,其中 1 人并有轻度喉

表 4 患者单份血清及正常人对沪红 17 株病毒的中和试验

	姓 名	采血时间	标本号	病 程 (天)	沪红 17 株 中和抗体
急性 结膜 炎患 者	*26, 黄	1972年 3月16日*	112	230	1:40
	*27, 陶	同 上	113	237	1:40
	*28, 丁	急性期	南10 A	1	<1:5
	*29, 王	”	南11 A	1	<1:5
	*30, 周	”	南12 A	1	1:5
	*31, 李	”	南15 A	1	<1:5
	*32, 秦	”	南16 A	1	1:5
	*33, 周	”	南17 A	1	<1:5
	*34, 张	”	南18 A	1	1:5
	*35, 马	”	南20 A	1	<1:5
正 常 人	*36, 朱	1972年 3月16日*	正 1		<1:5
	*37, 于	”	正 2		<1:5
	*38, 马	”	正 3		1:5
	*39, 马	”	正 4		<1:5
	*40, 孙	”	正 5		1:5
	*41, 王	”	正 6		<1:5
	*42, 李	”	正 7		<1:5

* 距流行结束后 6 个半月。

痛。采后立即投入含有 2 毫升维持液的试管中洗涤, 弃棉拭, 加入青、链霉素处理, 置零下 30℃ 保存。标本接种 D-6 细胞进行分离和传代。初期按常法分离及传代, 第一、二代仅出现可疑病变, 第三代经冻融后取上清液接种, 3 天后换液, 于第 6 天出现++的病变, 第四代接种后 12 天(中间换液二次)出现++++的完全病变, 第五代起接种后 3—4 天即出现完全病变。目前已传至第 11 代, 病变强度基本稳定。

二、细胞敏感范围及病变特点

1. 对多种传代细胞如 HeLa、D-6、L₁₆、传代人羊膜、传代人胚肺及传代人胚肾等均敏感。其中以 HeLa 及传代人羊膜细胞最为敏感, 次之为传代人胚肺细胞, 再次之为 D-6 细胞, L₁₆ 细胞敏感性最差。各种传代细胞上的病毒滴度见表 5。对原代人胚肾、原代恒河猴肾及原代地鼠肾细胞敏感性差, 只产生轻度病变, 适应后可产生++的细胞病变, 但稳定性较差。

表 5 沪红 17 株病毒在传代细胞上的滴度

细胞种类	D-6	L ₁₆	HeLa	传代人 羊膜	传代人 胚肺
病毒滴度*	1.75—2.33	1.5	5.0	5.5	4.5

* TCD₅₀/0.1 毫升(其数值为使半数组织培养管出现病变的病毒稀释度倒数的对数)

2. 细胞病变的特点与腺病毒及疱疹病毒等完全不同。病变初期于细胞层较薄处先出现成堆的小圆或卵圆形细胞, 逐渐扩展成灶性分布, 产生折光度增强、胞浆肿胀的圆形、卵圆形等不规则的病变细胞, 晚期迅速蔓延全细胞层, 其时病变细胞的胞浆萎缩、变暗并自管壁脱落。在 HeLa 细胞上, 病变细胞的多形态性及折光度更为明显(见图 1, 2)。在传代人羊膜细胞上, 病变细胞退变呈圆形, 病变的发展较快, 能迅速自管壁脱落。

三、血清学鉴定

1. 沪红 17 株病毒不能被下列免疫血清所中和: 脊髓灰质炎病毒 1、2、3 型, 柯萨奇(Coxsackie)病毒 A 组第 9 型, B 组: 第 1—6 型, 肠道孤儿病毒(ECHO)第 1—13, 15, 17—19 型, 腺病毒第 3、第 7 型及疱疹病毒的免疫血清。

2. 沪红 17 株病毒的 D-6 细胞培养液(TCD₅₀ = 2.5/0.1 毫升)免疫家兔后获得的兔免疫血清, 对本病毒(25 TCD₅₀/0.1 毫升)的中和抗体滴度为 1:160。

四、动物接种

1. 沪红 17 株病毒滴入家兔眼结合膜, 观察 5 天, 未发生结膜炎。

2. 沪红 17 株病毒培养液接种一天龄的乳鼠一窝(共 7 只), 第一代于第 5 天有 2 只死亡, 将死鼠去头、爪和内脏, 留下肌骨组织制成 20% 悬液, 经 3000 转/分离心沉淀 30 分钟, 取上清加青、链霉素处理 4 小时后作细菌培养为阴性, 继续传代接种一天龄及二天龄的乳鼠各一窝(每窝 7 只)。

观察二周,未见发病。第二次又以沪红 17 株病毒接种一窝(6只)一日龄乳鼠,观察二周,未见发病,故可否定其对乳鼠的致病性,从而可排除柯萨奇病毒。

五、生物学特性试验

1. 核酸型试验

材料及方法:抗 DNA 代谢药物 5-碘脱氧尿嘧啶核苷(5-IUDR)由上海第十二制药厂生产赠予。病毒按十倍连续稀释,接种两组 D-6 细胞管作 TCD₅₀ 滴定,一组维持液中按 100 微克/毫升浓度加入 5-IUDR,一组不加药物作为对照,同时用已知 DNA 病毒(疱疹病毒)及已知 RNA 病毒(脊髓灰质炎病毒)用同法平行滴定,观察 7 天,中间分别换含药或不含药的维持液一次。

实验结果:沪红 17 株不能被 5-IUDR 所抑制,可判定为 RNA 病毒(表 6)。

表 6 抗代谢药物抑制试验

	沪红 17 株病毒	疱疹病毒 (DNA 病毒 对照)	脊髓灰质炎 病毒(RNA 病毒对照)
含 5-IUDR 100 微克/毫升	2.33*	2.0	4.5
无药对照	2.33	≥5.5	4.0
结果判断	RNA 病毒	DNA 病毒	RNA 病毒

* TCD₅₀/0.1 毫升

2. 耐乙醚试验

实验方法:沪红 17 株病毒培养液中加入 20% 乙醚(分析纯)充分混合后置 4℃ 18 小时。用真空泵将乙醚抽去,并与未经乙醚处理的病毒液分别作 TCD₅₀ 滴定,用已知耐乙醚的脊髓灰质炎病毒及对乙醚敏感的疱疹病毒作同样处理和滴定,观察 7 天,中间换液一次。

实验结果:沪红 17 株病毒对乙醚稳定(表 7)。

表 7 对乙醚的敏感性试验

	沪红 17 株病毒		脊髓灰质 炎病毒	疱疹病毒
	D-6 细胞	人羊膜传 代细胞	D-6 细胞	D-6 细胞
20% 乙醚 4℃ 处理 18 小时	1.75*	5.5	4.5	<1.0
未经乙醚处理	1.75	5.5	4.0	4.5
结果判断	耐乙醚		耐乙醚	对乙醚敏感

* TCD₅₀/0.1 毫升

3. 耐酸试验

实验方法:将沪红 17 株病毒分别用 pH 3.0 及 pH 7.4 的汉克斯液作 10 倍连续稀释,置 37℃ 水浴 1 小时,然后接种细胞管作 TCD₅₀ 滴定,观察 7 天,中间换液一次。

实验结果:沪红 17 株病毒能耐酸(pH 3.0, 37℃ 1 小时)(表 8)。

表 8 耐酸(pH 3.0)试验

	沪红 17 株病毒	
	D-6 细胞	HeLa 细胞
pH 3.0, 37℃ 1 小时	1.75*	5.0
pH 7.4, 37℃ 1 小时	1.75	5.0
结果判断	耐酸	耐酸

* TCD₅₀/0.1 毫升

4. 耐热性试验及双价阳离子对热的保护作用

实验方法:沪红 17 株病毒悬液分别用:(1) 2M 氯化钙溶液、(2) 2M 氯化镁溶液、(3) 水解乳蛋白汉克斯液作等量稀释,置 50℃ 水浴加热 1 小时,然后在 D-6 细胞上作 TCD₅₀ 滴定。同时用疱疹病毒作同样处理进行对照,观察 7 天,中间换液一次。

实验结果:沪红 17 株病毒加热 50℃ 30 分钟即被灭活,在含有 1M 钙或镁离子存在时,经 50℃ 1 小时仍不能被灭活,但疱疹病毒不能被钙或镁离子所保护(表 9)。

表 9 耐热性试验及双价阳离子对热的保护作用

	沪红 17 株病毒	疱疹病毒
加热 50℃, 半小时	<1*	未做
加热 50℃, 1 小时	<1	<1
含 1M MgCl ₂ , 50℃ 1 小时	1.5	<1
含 1M CaCl ₂ , 50℃ 1 小时	1.5	<1

* TCD₅₀/0.1 毫升

5. 干燥毒种的保存

按常法将病毒悬液进行冰冻干燥保存, 一个半月后开启按原量稀释后接种细胞管, 第一代病变推迟 3—4 天出现, 继续传代后即恢复原有病变强度。

6. 培养温度比较

沪红 17 株病毒同时作两组 TCD₅₀ 滴定, 分别于 33℃ 及 37℃ 静置培养, 两者滴度基本相同, 在 33℃ 培养比 37℃ 培养产生病变推迟 1—2 天。

六、感染细胞的电镜形态观察

送电镜检查鉴定的标本系沪红 17 株病毒感染传代人胚肺和初代人胚肾细胞后, 呈现明显细胞病变的培养物。电镜超薄切片的制作按几种呼吸道病毒的电镜鉴定一文中所介绍的方法进行^[7]。

结果, 在上述两种细胞的病毒培养物中, 均可查见较多显示特殊超微结构改变的感染细胞和一些细胞外及胞浆内的致密病毒颗粒。核内则未查见类似颗粒。

感染细胞超微结构改变的特征是细胞圆缩, 其电子致密度显著增强, 细胞核常偏一端呈分叶状, 核染色质中央稀疏边缘致密并堆集成团块, 部分核膜间隙增宽, 核旁胞浆内有许多聚集成群的液泡和空泡 (图 3-1)。液泡具有单层或 2—3 层嗜钨酸性较强的界膜, 内含颗粒样基质, 偶可查见基质中有致密颗粒。这种特殊的细胞超微结构改变, 在有关其他微小核糖核酸科病毒的电镜研究中已有报告^[8,9], 并被认为是可以

作为该科病毒初步鉴定的指征^[7]。

胞浆内和细胞外成熟病毒颗粒的形态特点是: 基本呈球形, 大小直径在 25—26 nm 左右; 衣壳裸露, 无囊膜, 在胞浆内组合并倾向于排列呈结晶状或串珠状 (图 3-2, 3-3)。细胞外的胞膜旁常排列呈类结晶状 (图 3-4)。

上述病毒颗粒的形态特点和感染细胞超微结构的改变均与 Picorna 科的其它病毒相同, 因而可以确定所分离获得的沪红 17 (SEC 17) 株病毒属该科病毒无疑。

讨 论

一、急性结膜炎是一种常见病, 其病原种类很多, 本文在否定了细菌是病原的基础上, 用各种传代和原代细胞分离病毒, 结果在 Detroit-b 细胞上分离到一株 (沪红 17 株) 与这次流行有密切关系的病毒。查特吉等报告^[5] 加纳的一次流行未分离出病毒。利姆等^[6] 报告新加坡的一次流行自 55 份标本中分离出 30 份细胞致病性病原体, 并否定了腺病毒, 但当时尚未证明分离物和流行的关系。我们分离的 90 份标本中, 有 39 份产生不同程度的细胞病变, 但只有 2 份能稳定传代, 其中 1 份鉴定为腺病毒 3 型, 且和流行无关, 只有 1 份可确认是“红眼病”病原。说明我们对“红眼病”病毒分离的规律性, 目前还未很好掌握。

二、病毒中能引起“红眼病”的种类甚多, 其中以各型腺病毒为常见, 1970 年前造成流行的以第 8 型腺病毒为主^[1-4]。在这次流行中, 国内各地曾分离到腺病毒 3、4、8 等各型。本文对 18 名患者的双份血清作了腺病毒补体结合试验及腺病毒第 8 型的中和试验 (表 2)。其中 8 名及 12 名又分别作了新分离的腺病毒 3 型 (沪红 14 株) 及腺病毒 4 型 (京红 25 株) 的中和试验 (表 3)。结果无一例有抗体增长现象。说

明这次“红眼病”与腺病毒无关。

三、新分离的沪红 17 株病毒与 25 名患者双份血清的中和试验结果(表 3), 除 2 名(*11 及 *12) 第一份血清已为恢复期而不能比较外, 其余 21/23 (占 91.3%) 的恢复期血清抗体滴度均有 4 倍或 4 倍以上的增高。另 2 名(*10 及 *25) 恢复期血清的抗体阳转。已可说明沪红 17 株病毒是这次“红眼病”的病原。

四、31 名患者的急性期血清(表 3 中 21 名, 表 4 中 8 名)及 7 名正常人血清(共

38 名)对沪红 17 株病毒的中和抗体滴度, 30 名为 < 1:5, 8 名为 1:5。感染后 4—8 个月的 8 名患者(*1—4, *9, *16, *26, 及 *27) 血清中仍保持有一定的抗体水平(4 名为 1:40, 3 名为 1:20, 1 名为 1:10)。说明这次感染前人群中对该病毒的抗体水平甚低。

五、根据近年病毒分类的方法^[10,11], 沪红 17 株病毒与有关各类病毒生物学性状的鉴别(表 10): 1. 根据核酸型试验, 沪红 17 株是 RNA 病毒, 可以排除属于 DNA

表 10 有关各类病毒的理化性状*与沪红 17 株病毒的比较

病毒种类	核酸型	构型及套膜	粒子大小 (毫微米)	繁殖部位	对乙醚 稳定性	对 酸 (pH 3.0) 稳定性	对 50℃ (1 小时) 稳定性	含 1M 双价 阳离子时对 50℃稳定性
痘类病毒 Pox virus	DNA	不 明 有套膜	230~300	胞浆内	稳定	敏感	稳定	敏感
疱疹病毒 Herpes virus	”	立方形 有套膜	110	核内	敏感	”	敏感	”
腺 病 毒 Adeno virus	”	立方形 无套膜	70~80	”	稳定	稳定	”	”
粘液病毒 Myxo virus	RNA	螺旋形 有套膜	80~200	胞浆内	敏感	敏感	”	”
副粘液病毒 Para-myxo virus	”	”	100~300	”	”	”	”	”
节足动物媒介病毒 Arbos virus	”	立方形 有套膜	40~50	”	”	”	”	”
呼吸道肠道病毒 Reo virus	”	立方形 无套膜	70~75	”	稳定	稳定	稳定	稳定
微小RNA病毒 Picorna virus	鼻 病 毒 Rhino virus	”	18~30	”	”	敏感	敏感	更敏感
	肠道病毒 Enteri virus	”	”	”	”	稳定	”	稳定
沪红 17 株病毒	”	无套膜	25~26	”	”	”	”	”

* 参阅: 1. Melnick, J. L., McComb, M., *Prog. Med. Virol.* 8: 400—409, 1966.
2. Wallis, C., Melnick, J. L. *Virology*, 16: 504—506, 1962.

病毒的腺病毒、疱疹病毒及痘类病毒。2. 沪红 17 株对乙醚及酸(pH 3.0)稳定, 可以排除对两者均敏感的粘液病毒(流感病毒), 副粘液病毒(副流感病毒)和节足动物媒介

病毒, 亦可排除对乙醚稳定而对酸敏感的鼻病毒。3. 沪红 17 株病毒能被 50℃ 半小时灭活, 而当有 1M 的二价阳离子 (Mg^{++} 或 Ca^{++}) 存在时, 则可保护其不被灭活这

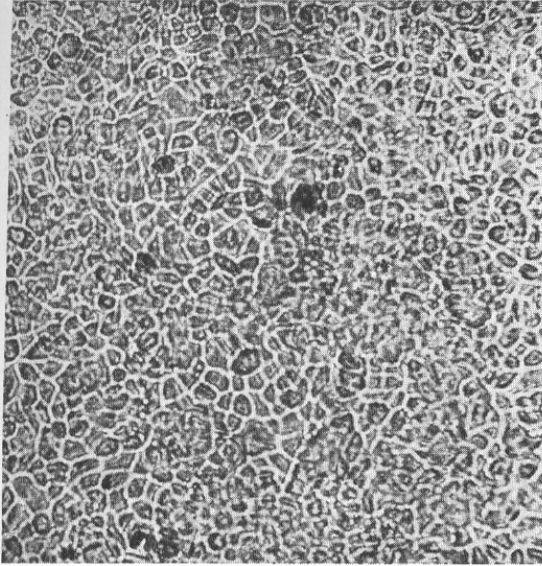


图 1 对照 HeLa 细胞

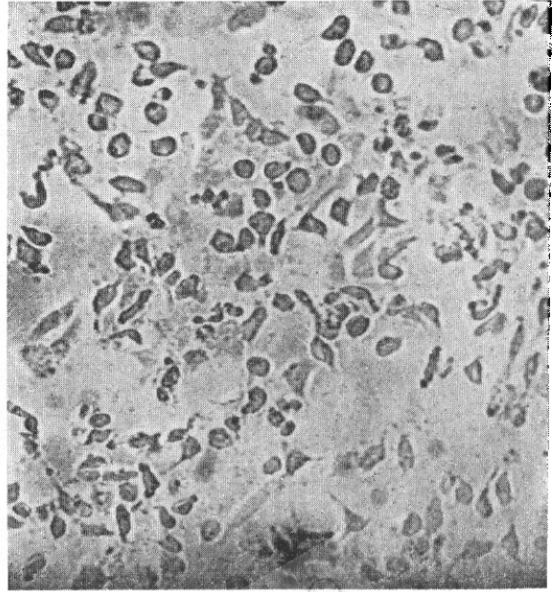
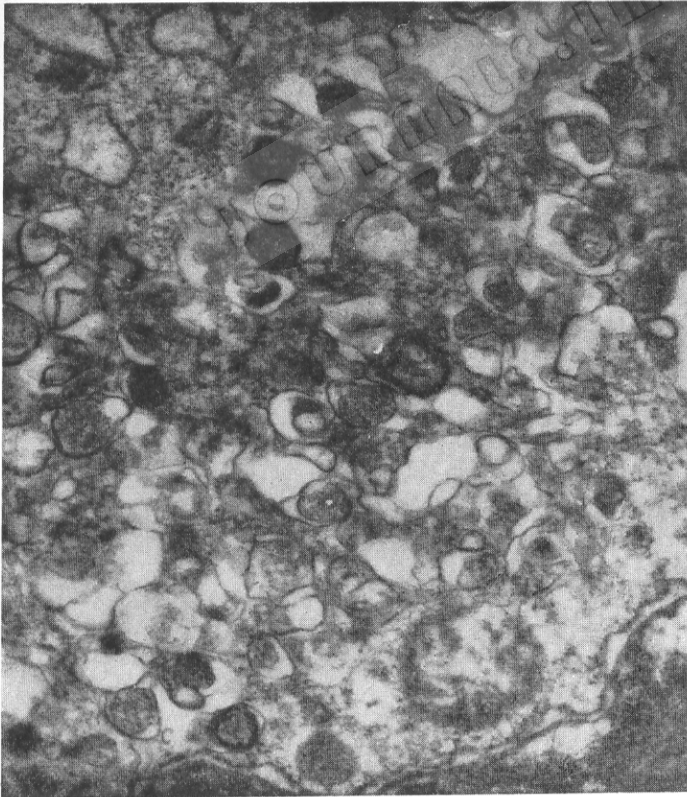


图 2 沪红 17 病毒在 HeLa 细胞上的晚期病变，晚期的病变细胞蔓延至全细胞层，其时胞浆萎缩、变暗，逐渐自管壁脱落。



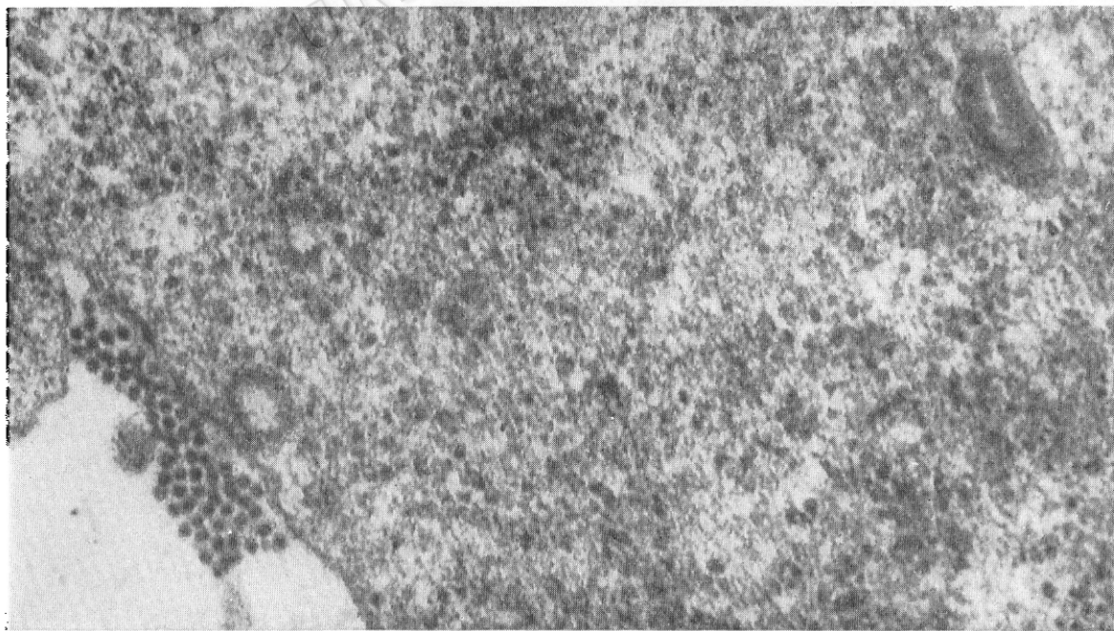
(3-1) 感染细胞(传代人胚肺)的超微结构变化：核旁胞浆内有许多聚集成群的液泡和空泡，液泡有单层或 2—3 层嗜锇酸性较强的界膜。×28,000 倍



(3-2) 感染细胞(初代人胚肾)的胞浆内，出现结晶状排列的病毒颗粒，其大小为 25—26nm。×70,000 倍



(3-3) 胞浆内串珠状排列的微小 RNA 病毒
感染细胞(初代人胚肾)的胞浆内,有串珠状排列的病毒颗粒,大小同前。 $\times 70,000$ 倍



(3-4) 细胞外微小 RNA 病毒
感染细胞(初代人胚肾)的胞膜旁,有类结晶状排列的病毒颗粒,大小同前。 $\times 70,000$ 倍

图 3 SEC 17 株病毒感染细胞的电镜形态观察

一特性，则可排除呼吸道肠道病毒和上述各类病毒。4. 根据电镜的形态观察，感染细胞超微结构的病变特征，以及病毒颗粒在胞浆中呈典型的晶格样排列，其大小为 25—26 毫微米，核内未查见等形态特点（图 3），结合上述理化性状，可以确认沪红 17 株病毒属于微小 RNA 病毒（Picorna virus），且和肠道病毒近似。

六、沪红 17 株病毒和已知三种肠道病毒的比较（表 11）：1. 沪红 17 株不能被脊髓灰质炎病毒第 1—3 型的免疫血清所中和，可排除脊髓灰质炎病毒。2. 沪红 17 株病毒接种乳鼠后，第一代有 2/7 只死亡，继续传代两窝（共 14 只）乳鼠，均未见发病，又以沪红 17 病毒株接种一窝（6 只）1 日龄乳鼠，观察 2 周末见发病，故可否定对乳鼠的致病性；据此即可排除柯萨奇病毒。3. 肠道病毒中，凡引起细胞病变而已排除脊髓灰质炎及柯萨奇病毒时，应归入肠道孤儿（ECHO）病毒。沪红 17 株病毒只用 ECHO 1—13、15、17、19 型免疫血清作了中和试验，因此尚不能排除其他型别的

ECHO 病毒。值得指出的是已知 34 个型的 ECHO 病毒对原代人胚肾细胞均敏感而对 HeLa 细胞较不敏感。沪红 17 株病毒则对人胚肾等原代细胞敏感性差而对 HeLa 等传代细胞甚敏感。且迄今为止，肠道病毒能引起急性结膜炎者尚未见报道。这次“红眼病”的流行病学及临床情况和以往的急性结膜炎亦有所不同。因此认为沪红 17 株病毒很可能是一种新的微小 RNA 病毒。

七、作者等对上述研究得到初步结果后，已陆续见到河野等^[12]及墨菲等^[13-15]的报告：河野等于 1971 年对自日本分离出类似的病毒并作了鉴定，墨菲等^[13,14]将 1970 年自新加坡分离的及 1971 年自澳大利亚分离的类似病毒加以鉴定，并将三处的毒株作了抗原性比较。现将上述报告与本文研究结果略作探讨：

1. 4 个地区所分离的病毒，其生物学特性基本相同，均认为系微小 RNA 病毒。但河野等^[12]及墨菲等^[13]报告中的电镜检查及照片，认为病毒颗粒同时散在分布于胞

表 11 沪红 17 株病毒与已知三种肠道病毒的比较

病 毒 型 别	对组织细胞的敏感性	对乳鼠的致病性	各型免疫血清的中和试验
脊髓灰质炎病毒 第 1—3 型	对猴肾及人胚肾敏感， 对传代细胞敏感性差	通常认为不致病	第 1—3 型免疫血清不能中和沪红 17 株病毒
柯萨奇病毒 Coxsackie virus A 组：1—24 型，B 组：1—6 型	通常认为 A9、B1—6 型 对猴肾及人胚肾敏感	各型均有致病性	A9 及 B1—6 型免疫血清不能中和沪红 17 株病毒
肠道孤儿病毒 Echo virus 1—34 型	各型对人胚肾均敏感 对 HeLa 细胞一般不敏感	通常认为不致病	1—13、15、17—19 型免疫血清不能中和沪红 17 株病毒
沪红 17 株病毒	对人胚肾敏感性差 对 HeLa 细胞甚敏感	不致病	能被本病毒的免疫血清所中和

浆及胞核内。按微小 RNA 病毒的繁殖部位是胞浆，核内不应出现病毒颗粒，且病毒颗粒的形态特征，以呈结晶状及串珠状的典型排列更有鉴定价值。因此上述电镜检

查结果，不能作为微小 RNA 病毒的依据。本文的电镜检查结果：胞核内未查见病毒颗粒，胞浆内可查见典型的结晶状及串珠状排列的病毒颗粒（图 3-2，3-3）。在胞浆

内的液泡及空泡中，胞膜旁或胞外，均有成堆类结晶排列的病毒颗粒(图 3-4)。且感染细胞的超微结构呈现微小 RNA 病毒的典型病变(图 3-1)，这些检查结果，是微小 RNA 病毒的有力证据。

2. 日本的毒株自人胚肾细胞分离，HeLa 细胞分离未获成功。河野等认为应归入肠道孤儿病毒(ECHO)。新加坡及澳大利亚的毒株均自 HeLa 细胞分离，人胚肾细胞未获成功，墨菲等只提出可归入肠道病毒。作者分离的病毒如根据其含二价阳离子时可耐热的特性能进一步证明与肠道病毒相似，但根据其对不同组织细胞的毒力不同及致病性的差异，仍认为和已知三种肠道病毒有所差别(见表 11)。

3. 墨菲等报告^[14,15]新加坡 70 年株与日本及澳大利亚的 71 年株在抗原上有差异。此外上述三地的作者在病毒分离率上远比本文为高。这些结果差异，有待进一步研究。

八、最近，据北京 301 医院病毒实验室吴慎同志报告，他们实验室曾将沪红 17 株病毒与北京生物制品检定所 1971 年从流行性结膜炎患者眼分泌物中分离的京检 5 株病毒(该株病毒的电镜照片，呈现与沪红 17 株病毒相同的胞浆内典型结晶状排

似。他们还用沪红 17 株病毒的免疫血清、71 年北京流行性结膜炎患者的一份恢复期血清和一份正常人血清，分别与沪红 17 株及京检 5 株病毒作了中和试验，结果见表 12。尽管两株病毒均分离自 71 年患者及对传代人胚肺细胞的敏感性相同，但其抗原性仍有很大差异。值得提出的是北京 71 年患者对该地 71 年患者分离的京检 5 株病毒的中和抗体甚低(1:4)，而对上海 71 年患者分离的沪红 17 株病毒的中和抗体较高(1:64)。似可说明当地同年份的病毒，其抗原性亦有差异。但目前数据还非常不足，这些差异只能作初步参考。

小 结

本文报道自“红眼病”患者眼拭标本中，分离出一株能稳定传代并有特异性细胞病变的病毒(暂名沪红 17 或 SEC₁₇)。通过患者双份血清中和试验，证明该病毒是这次“红眼病”的病原。根据各种生物学特性试验及电镜形态学观察，沪红 17(SEC₁₇)株病毒可鉴定为微小 RNA 病毒(Picornavirus)，且和肠道病毒近似。对该病毒和已知三种肠道病毒作了比较和探讨。认为沪红 17(SEC₁₇)株病毒很可能是一种新的微小 RNA 病毒。本文对近年自新加坡、日本、澳大利亚及北京等地分离和鉴定的流行性结膜炎病毒的报告，作了初步比较和探讨。

表 12 沪红 17 株及京检 5 株病毒的比较

	沪红 17 株病毒 (10 ⁻⁴ 稀释)	京检 5 株病毒 (10 ⁻⁴ 稀释)
沪红 17 株病毒免疫血清	>1:128	1:8
71 年北京流行性结膜炎患者赵××恢复期血清	1:64	1:4
正常人血清(吴×)	1:4	<1:4

列的病毒颗粒)，作了感染滴度的比较。结果，在同批传代人胚肺细胞中，两者的 TCD₅₀ 均为 6.0，病变出现时间和特点亦相

参 考 资 料

[1] Dawson, C. R.: *Amer. J. Opth.*, 69:473, 1970.
[2] Laibson, P. R. et al.: *Arch. of Opth.*, 84—86, 1970.
[3] Andzhelov, B. O. et al.: *Opth. In.*, 23(3):187—190, 1968.
[4] Conggrave, T. Y. & Loh, R. C. K.:

- Amer. J. Opth.*, **61**:521—555, 1966.
- [5] Chatterjee, S. et al.: *Brit. J. of Opth.*, **54**(9):628—630, 1970.
- [6] Lim, K. H. & Yin-Murphy, M.: *Singapore Med. J.*, **12**(5):247—249, 1971.
- [7] 陈德慧: 几种呼吸道病毒的电子显微镜鉴定, *中华医学杂志*, **54**(4): 211, 1974.
- [8] Dales, S., Eggers, H. J., Tamm, I. and Palade, C. E.: *Virology*, **26**:379—389, 1965.
- [9] 川名林治: ライノウイルス感染症に関する研究, *感染症杂志*, **44**: 425—430, 1970.
- [10] Melnick, J. L., McComb, M.: *Prog. Med. Virol.*, **8**:400—409, 1966.
- [11] Wildy, P.: Classification and Nomenclature of viruses Monographs in Virology, Vol. 5, (Karger Basel), 1971.
- [12] 河野等: *Lancet*, **1**:1191, 1972.
- [13] Y-Murphy, M. et al.: *South Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, **3**:3, 303, 1972.
- [14] Y-Murphy, M. et al.: *Lancet*, **2**:857, 1972.
- [15] Y-Murphy, M. et al.: *South Asian J. Trop. Med. Pub. Health*, **4**:1, 11, 1973.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE VIRUS OF THE EPIDEMIC CONJUNCTIVITIS IN 1971

SHI OU-SHENG¹, MA TSE-SHUNG², YU RU-SUN³, LU XIAN-XIN⁴,
LI TSE-HUA⁴, WANG YUE-ZHI⁵, HO SHIH-MING⁶, PIN YU-CHIH⁷
AND SHEN MEI-CHÜN⁸

(Shanghai "Red eye" Cooperative Research Group, Shanghai)

One strain of cytopathogenic virus (temporarily called "Shanghai epidemic conjunctivitis" SEC 17) was isolated during epidemic conjunctivitis (so called "red eye"). Spreaded in Shanghai, 1971. Neutralization tests were done with paired sera from 25 patients, the results showed that the sera neutralization titer of acute cases were $\leq 1:5$, and that among the convalescence cases, 21 cases increased 4-fold or more, 2 cases turned positive and 2 other cases, in which only convalescent sera were taken, also showed positive result. This indicated that the SEC17 virus was the etiological agent of this epidemic conjunctivitis. Serum neutralization tests were also performed with sera from 8 acute cases and 7 healthy people, all of which showed a neutralization titer of $\leq 1:5$. These results showed that the sera neutralization antibody titer of the general population, prior to the infection (altogether 38 per-

sons) against SEC 17 virus was quite low.

Adeno virus complement fixation test and type 8 adeno-virus neutralization test were performed, with paired sera from 18 patients, but none showed any serological response, which indicated that the epidemic of "red-eye" in question was not of adeno-virus origin.

SEC 17 virus was not inhibited by 5-IDUR, stable in ether and resistant to acid

1. Epidemiological and Sanitary Station of Shanghai.
2. Shanghai Municipal Infectious Disease Hospital.
3. Shanghai Railway Medical College.
4. Shanghai First Medical College.
5. Shanghai Second Medical College.
6. Shanghai Vaccine and Serum Institution.
7. Shanghai Institute of Experimental Biology.
8. Shanghai Municipal Ophthalmic and Dermatological Station.

(pH 3.0, 37°C, 1 hr.); it lost its vitality by heating at 50°C for half an hour, but was stable in the presence of 1 *M* calcium or magnesium ions, at 5°C for 1 hr.

Ultra-micro sections was made from the infected tissue cells were examined under electron microscope, and many vacuoles and fluid vesicles within the cytoplasm were found, SEC 17 virus particles, in typical crystallized arrangement were also seen within the cytoplasm, some clusters of the virus particles were found outside the cells but none was seen within the nuclei. The size of the virion measured 25—26 nm. With these biological specifications, the SEC17 virus may be classified as picorna virus similar to enteroviruses.

However, the SEC 17 virus failed to be neutralized by the immunune sera of

type 1—3 polioviruses, type A9, B1—6 coxsackie viruses and type 1—13, 15 or 17—19 ECHO viruses. Suckling mice were not susceptible to SEC 17 virus. It was less virulent to the primary human foetal kidney cells, rhesus monkey kidney cells, and hamster kidney cells, but was virulent to the continuous cells of HeLa, human amnion, and of human foetal lung. From these serological and virological studies and in comparison with the three known enteroviruses, it is assumed that the SEC 17 virus may be of a new type of picorna virus.

Finally the authors had compared the reports of the viruses isolated and identified from the epidemic conjunctivitis that happened in Singapore, Japan and Australia in the recent years, with discussion.