

1973—1975年北京地区婴幼儿病毒性肺炎的病原学研究

丘福禧 李桂英 索玉琴 王秀云 张浩燕 邵 兰

(北京友谊医院病毒研究室,北京)

1973—1975年连续三个冬、春我们在北京地区对85例临床诊断为病毒性肺炎的婴幼儿病例进行了病原学研究。从59例的咽拭子分离出腺病毒,主要是7型,其次是3型。还从合并有胸膜炎的14例中10例的胸腔积液分离出型别相同的腺病毒。同型腺病毒也从5例死亡病儿的肺组织分离出来。从1例的咽拭子分离出1型副流感病毒。从60例得到急性期和恢复期双份血清进行了血清学诊断。在测定中和抗体的47例,7型或3型腺病毒中和抗体都显著升高。在测定补体结合抗体的60例中,40例的补体结合抗体也有明显的增长。从咽拭子、胸腔积液和肺组织分离出来的腺病毒代表株与同型腺病毒原型株的电子显微镜观察和比较表明,其形态一致。

病毒性肺炎是冬、春季节婴幼儿中常见的急性传染病,发病率高,常发生流行,病死率也高,严重地威胁儿童的健康。其病原涉及到许多种型的病毒^[1]。为了解近年来我国流行的婴幼儿病毒性肺炎的病原,并同国内以前的^[2,3]以及国外的^[1]情况相比较,我们在1973—1975年连续三个冬、春进行了这方面的研究。期望通过这项工作,能确定这些病例的诊断,为分析治疗效果提供依据,并作为今后开展预防工作的参考。

材料和方法

(一) 标本

从发病后10天以内的病儿取咽拭子,放入0.25%乳白蛋白水解物 Hanks 氏溶液,充分洗涮,加青霉素和链霉素,最终浓度各为200单位;有胸膜炎的取胸腔积液;死亡的取肺组织研磨,用0.5%乳白蛋白水解物 Hanks 氏溶液制成10%悬液,加青霉素和链霉素,最终浓度各为400单位。置4℃冰箱内2—4小时,然后放于低温冰冻保存。同时收集发病1周以内和第3—4周以后的血清,放于低温冰冻保存。

(二) 组织培养

所用细胞主要是原代人胎肾单层上皮细胞,

在一小部分病例加用原代人胎肺单层成纤维细胞。维持液是含有2%小牛血清的0.25%乳白蛋白水解物 Hanks 氏溶液。将咽拭子、胸腔积液或肺组织悬液标本接种组织培养分离病毒,结果取阳性的进行鉴定,阴性的盲目传代2次。

(三) 免疫血清

将3型腺病毒原型株 GB 株 (Huebner 等, 1954年)、7型 Gomen 株 (Berge 等, 1955年)、14型 Dewit 株 (van der Veen 和 Kok, 1957年) 和21型 AV-1645 株 (Bell 等, 1960年) 分别培养于人胎肾细胞,制备免疫原。所用维持液是“199”综合培养基。将免疫原分别静脉内注射于体重约2,000克的家兔,共注射6次,每次1.5毫升,间隔3天。末次注射后2周取血,测定中和抗体滴度(3型的中和抗体滴度为1:1,024, 7型为1:2,048, 14型为1:512, 21型为1:512)。鉴定病毒株时所用的免疫血清稀释度采用20个中和抗体单位(即免疫血清中和抗体滴度的20倍)。副流感I型(HA-2)、II型(CA)和III型(HA-1)病毒原型株的免疫血清由北京药品生物制品检定所提供。用前均在56℃灭活30分钟。

(四) 补体结合试验

1. 病毒鉴定: 将分离出的病毒株在人胎肾细

本文于1976年10月21日收到。

胞中传代,用“199”综合培养基作为维持液,待细胞病变达“++++”时收获,经快速冰冻融解3次,制备成补体结合抗原。免疫血清由北京药品生物制品检定所供给,是用 HeLa 细胞培养的腺病毒(4型, R167 株, Hilleman 和 Werner, 1954 年)注射豚鼠制备的免疫血清(补体结合抗体滴度为 1:256,用前在 56℃ 灭活 30 分钟)。将免疫血清同抗原原液用小量法进行补体结合试验。免疫血清采用 1:8 和 1:32 两个稀释度。每次实验都包括分离株抗原的抗补体对照、对照抗原的抗补体对照、腺病毒原型株抗原的抗补体对照、血清对照、溶血素对照和红血细胞对照。

2. 补体结合抗体测定:将病儿的双份血清各以 Hanks 氏溶液作一系列四倍稀释,同腺病毒原型株(3型)抗原和对照抗原用小量法进行补体结合试验。每次实验都包括腺病毒原型株(3型)抗原的抗补体对照、对照抗原的抗补体对照、血清对照、溶血素对照和红血细胞对照。

(五) 中和试验

1. 病毒鉴定:将分离出的细胞病变形态特点似腺病毒所致的病毒株(稀释度为 10^{-1} 或 10^{-2} ,相当于 100 个组织培养 50% 感染剂量,以下简称 TCID₅₀),先分别同 3 型和 7 型腺病毒原型株的家兔免疫血清在人胎肾细胞中做中和试验。如果病毒株的致细胞病变作用不被中和,再分别同 14 型和 21 型腺病毒原型株的家兔免疫血清做中和试验。每次实验包括病毒对照和细胞对照。

2. 中和抗体测定:将病儿的双份血清各以 Hanks 氏溶液作一系列四倍稀释,先分别同 3 型和 7 型腺病毒原型株(100—1,000 个 TCID₅₀)做中和试验。如果测不出抗体升高,再分别同 14 型和 21 型腺病毒原型株做中和试验。

(六) 红血细胞吸附和抑制试验 按 Chanock 等^[12]和 Hsiung^[13]的方法进行。将接种原代人胎肾单层上皮细胞培养经传 3 次未出现细胞病变的原标本,再接种原代人胎肾单层上皮细胞。在接种后第 5 天和第 7 天,各取一瓶,吸出培养液,放入无菌小瓶中。将豚鼠红血细胞用 Hanks 氏溶液洗涤 3 次,配成 0.5% 悬液,加 0.2 毫升到每瓶细胞中,水平放置在冰箱内 20 分钟。然后用冷 Hanks 氏溶液将细胞瓶内未吸附的红血细胞洗去。用显微镜观察结果。按吸附在单层细胞上的

红血细胞浓度记录,以 +、++、+++、++++ 表示。

如果红血细胞吸附现象在 ++ 以上时,将收集在无菌小瓶中含有病毒的组织培养液传代。做红血细胞吸附抑制试验进行鉴定。将分离株 0.2 毫升分别同 I、II 和 III 型副流感病毒原型株的免疫血清(含 20 个红血细胞吸附抑制抗体单位) 0.2 毫升混合。放室温 1 小时后,接种细胞培养。同时做病毒对照和细胞对照。接种后 3—5 天测定红血细胞吸附。当分离株的红血细胞吸附被某个型别的免疫血清抑制时,表明该分离株就是那个型别。

(七) 电子显微镜观察

由本院超微结构研究室将原代人胎肾细胞培养的 3 型和 7 型腺病毒原型株,以及从咽拭子、胸腔积液和死亡病儿的肺组织用同样细胞培养分离出的 3 型和 7 型腺病毒分离株,分别制片,进行电子显微镜观察和摄影。

结 果

(一) 病毒分离和鉴定(表 1)

在 1973—1975 年连续三个冬、春共收集 85 例年龄为 6 个月—4 岁临床诊断为病毒性肺炎的病儿在病程早期(病期第 10 天以内)的咽拭子标本,用原代人胎肾单层上皮细胞(图版 I-1)培养法进行了病毒分离。结果有 59 例的培养产生细胞病变(图版 I-2),阳性率为 69.4%。从 85 例中 14 例合并有胸膜炎的病儿取其胸腔积液(病期第 5—10 天)用同样方法进行了病毒分离。结果有 10 例的培养产生细胞病变,阳性率为 71.4%。在 85 例中有 5 例死亡的病儿进行了尸体剖检,取其肺组织(病期第 12—18 天)用同样方法也进行了病毒分离。结果 5 例的培养都产生细胞病变。所有这些标本培养的病变特征是初期在细胞片的边缘部分出现散在的细胞变圆和肿胀现象,以后在细胞片的中间部分也出现同样的病变,然后病变细胞逐渐增多,聚积成一堆一堆的葡萄状,最后从瓶壁脱落。这种病变

表 1 85 例婴幼儿病毒性肺炎的病毒分离和鉴定

标 本	结 果		细 胞 病 变			鉴 定			红血细胞吸附**	
	阳 性 数 分 离 例 数	阳 性 率 (%)	腺 病 毒			3 型	7 型	未确定*	阳 性 数 分 离 例 数	副流感病毒 I 型
咽 拭 子	59/85	69.4	16	40	3				1/26	1
胸腔积液	10/14	71.4	2	8						
肺 组 织	5/5	100.0	1	4						

* 在 3、7、14 和 21 型以外。 ** 未出现细胞病变的病例。

的特征同腺病毒培养的病变特征一致。

所有产生这种特征性细胞病变的病毒分离株都用补体结合试验进行了分类鉴定。鉴定的结果都属于腺病毒。

经过用补体结合试验初步鉴定为腺病毒的分离株再用中和试验进行了分型鉴定。结果在 59 株从咽拭子分离出来的腺病毒中有 40 株是 7 型, 16 株是 3 型, 3 株未确定(在 3、7、14 和 21 型以外)。在 10 株从胸腔积液分离出来的腺病毒中有 8 株是 7 型, 2 株是 3 型。在 5 株从肺组织分离出来的腺病毒中有 4 株是 7 型, 1 株是 3 型。

有 26 例的咽拭子标本先接种原代人胎肾单层上皮细胞培养经传 3 次未出现细胞病变, 以后将其原标本再接种原代人胎肾单层上皮细胞, 在第 5 天和第 7 天观察红血细胞吸附现象。结果有 1 例的标本在接种后第 5 天观察到有红血细胞吸附现象(图版 I-3)。经用红血细胞吸附抑制试验进行鉴定, 结果属于 I 型副流感病毒(图版 I-4)。

在 85 例中只得到一种标本的有 70 例, 其中只有咽拭子的为 68 例, 分离出病毒的有 46 例(45 例为腺病毒, 1 例为 I 型副流感病毒); 只有胸腔积液的和只有肺组织的各 1 例, 都分离出腺病毒。在 85 例中得到两种标本的有 13 例, 其中有咽拭子和胸腔积液的为 11 例, 从这两种标本分离出同型

腺病毒的有 7 例, 从咽拭子分离出腺病毒而从胸腔积液未分离出病毒的有 4 例; 有咽拭子和肺组织的为 2 例, 在这 2 例都从两种标本分离出同型腺病毒。在 85 例中得到咽拭子、胸腔积液和肺组织 3 种标本的有 2 例, 在这 2 例都从 3 种标本分离出同型腺病毒。

将接种原代人胎肾单层上皮细胞分离出腺病毒的 36 份原标本, 再接种原代人胎肺单层成纤维细胞进行分离比较, 也都得到阳性结果。又将接种原代人胎肾细胞未分离出病毒的 6 例标本, 再接种原代人胎肺细胞进行分离比较, 结果也都未分离出病毒。

在进行上述病毒分离工作的同时, 还从相同年龄范围的 33 例临床诊断为其他肺炎的病儿收集了咽拭子标本, 用同样方法进行了病毒分离。结果只从 2 例(6.1%)分离出腺病毒, 3 型和 7 型各 1 例。

(二) 双份血清内腺病毒抗体的测定(表 2)

从 85 例临床诊断为病毒性肺炎的婴幼儿中的 60 例得到急性期和恢复期双份血清。在这 60 例中有 24 例分离出腺病毒(7 型或 3 型), 其中 16 例在病程中腺病毒补体结合抗体升高 4 倍以上, 8 例未显著升高。这 8 例中有 3 例的第一份血清采取时间过迟(超过病期第 10 天), 有 4 例的

表 2 60 例婴幼儿病毒性肺炎的双份血清内腺病毒抗体的测定

腺病毒抗体	病毒分离阳性者		病毒分离阴性者	
	抗体升高 4 倍以上例数 测定例数	抗体未显著升高例数 测定例数	抗体升高 4 倍以上例数 测定例数	抗体未显著升高例数 测定例数
中和	19/19	0/19	28/28	0/28
补体结合	16/24	8/24	24/36	12/36

第二份血清采取时间过早（不到病期第 3 周）。在分离出腺病毒的 24 例中,有 19 例进行了腺病毒中和抗体测定,结果与分离出的病毒型别相同的中和抗体都升高 4 倍以上。其余 36 例未分离出病毒,其中 24 例在病程中腺病毒补体结合抗体升高 4 倍以上,12 例未显著升高。这 12 例中有 6 例的第一份血清采取时间过迟,有 4 例的第二份血清采取时间过早。在未分离出病毒的 36 例中,有 28 例进行了腺病毒中和抗体测定,结果都升高 4 倍以上(7 型和 3 型各 14 例)。从 6 例临床诊断为其他肺炎的婴幼儿得到双份血清进行了腺病毒补体结合抗体和中和抗体的测定;其中 1 例临床诊断为喘型肺炎的患儿有腺病毒补体结合抗体和 7 型腺病毒中和抗体的增长,其余 5 例没有腺病毒抗体的增长。

(三) 腺病毒原型株和分离株的电子显微镜观察

应用电子显微镜技术,对从咽拭子、胸腔积液和死亡患儿肺组织分离出来的 7 型和 3 型腺病毒代表株同 7 型和 3 型腺病毒原型株进行了对比观察,结果其形态与腺病毒原型株的形态一致(图版 II-1—4)。

讨 论

本研究通过对 85 例临床诊断为病毒性肺炎的婴幼儿病例进行病毒分离和对其中 60 例的双份血清进行血清学诊断以及对分离出的病毒代表株进行电子显微镜观察的结果表明,近年来在北京地区引起婴

幼儿病毒性肺炎流行的病原主要是腺病毒,以 7 型较多,3 型次之。这种情况与 1958 年以来在北京^[2]和长春^[3]等地区的情况相同,表明 7 型和 3 型腺病毒可能是十多年来在我国北方每年冬、春期间引起婴幼儿病毒性肺炎流行的最主要的病毒种型。其它病毒在本病病原中所占的比例较小。然而,这种情况与国外的情况^[1]不大相同。在别的国家,引起婴幼儿肺炎的腺病毒虽然主要也是 3 型和 7 型^[6],但是多病原的研究表明,婴幼儿下呼吸道感染的主要病原是呼吸道融合细胞病毒,其次是副流感病毒、流行性感胃病毒、腺病毒和支原体^[7-16]。有的作者^[17]报告冠状病毒在婴幼儿下呼吸道感染的病原中也占较重要的地位,其所占百分率低于呼吸道融合细胞病毒和 III 型副流感病毒,而高于腺病毒、流行性感胃病毒、I 型和 II 型副流感病毒及鼻病毒。有的作者^[18,19]认为在婴儿中腺病毒肺炎只是偶然才观察到。还有的^[20]认为在幼儿中腺病毒肺炎只是偶然才引起死亡。在不同国家引起本病流行的主要病原有所不同,可能与地理、气候和环境等条件的差异有关。根据国内的研究结果,我们认为在我国防治婴幼儿病毒性肺炎的重点应该针对 7 型和 3 型腺病毒。

参 考 资 料

- [1] 丘福禧: 医学参考资料, (9): 386—392, (10): 459—467, 1975.
- [2] 任贵方等: 中华医学杂志, 48: 71—76, 1962.
- [3] 朱既明等: 微生物学报, 9: 20—29, 1963.
- [4] Chanock, R. M. et al.: *New England J.*

- Med.*, **258**: 207—213, 1958.
- [5] Hsiung, G. D.: *Diagnostic Virology*, p. 52—56, New Haven and London, Yale University Press, 1964.
- [6] Jackson, G. G. and Muldoon, R. L.: *J. Infect. Dis.*, **128**: 811—866, 1973.
- [7] Hilleman, M. R. et al.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **87**: 165—180, 1963.
- [8] Ogunbi, O.: *J. Trop. Med. and Hyg.*, **73**: 138—140, 1970.
- [9] Profeta M. L. and De Vitali, M. P.: *Boll. Ist. Sieroter. Milan*, **50**: 57, 1971.
- [10] Glezen, W. P. et al.: *J. Pediat.*, **78**: 397—406, 1971.
- [11] Hall, C. E. et al.: *J. Epidemiol.* **94**: 367—385, 1971.
- [12] Maletzky, A. J. et al.: *J. Pediat.*, **78**: 407—414, 1971.
- [13] Jacobs, J. W. et al.: *Lancet* **1**: 871—876, 1971.
- [14] Rocchi, G. et al.: *Zentbl. Bakt. I Orig. Ser. A.*, **219**: 7—13, 1972.
- [15] Loda, F. A. et al.: *Pediatrics*, **49**: 428—437, 1972.
- [16] Morrell, R. E. et al.: *Amer. J. Epidemiol.*, **101**: 231—237, 1975.
- [17] McIntosh, K. et al.: *J. Infect. Dis.*, **130**: 502—507, 1974.
- [18] Rose, H. M.: Adenoviruses. In "Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections" (EH Lennette and NJ Schmidt, eds.) 4th Ed., p. 207, American Public Health Association, New York, 1969.
- [19] 飯田広夫: ウイルス学, p. 178—180, 金原出版株式会社, 东京, 1975.
- [20] Fenner, F. and White, D. O.: Adenoviruses. In "Medical Virology," p. 223, Academic Press, New York and London, 1970.

ETIOLOGY OF VIRUS PNEUMONIA AMONG CHILDREN IN BEIJING, 1973—1975

Qiu Fuxi, Li Guiying, Suo Yuqin, Wang Xiuyun,
Zhang Haoyan and Shao Lan

(Virus Research Laboratory, Beijing Friendship Hospital, Beijing)

Etiologic studies on 85 patients between the age of 6 months and 4 years with the clinical diagnosis of virus pneumonia were carried out in the winter and spring months for three successive years from 1973 to 1975 in Peking. Adenoviruses, predominantly Type 7, and less frequently, Type 3, were isolated from throat swab specimens in 59 cases. Homotypic adenoviruses were also recovered from pleural fluid specimens in 10 out of 14 cases complicated by pleural effusion, as well as from lung tissue specimens in 5 fatal cases. Type 1 parainfluenza virus was isolated from throat swab specimen in 1 case. Paired

sera were obtained from 60 cases during acute and convalescent stages of the disease and subjected to serologic study. Marked increases were demonstrated in neutralizing antibody against Type 7 or Type 3 adenovirus in all the 47 cases determined and in complement-fixing antibody against adenovirus in 40 of the 60 cases. A comparative observation made by electron microscopy on homotypic prototype strains of adenovirus and representative strains of adenovirus isolated from throat swabs, pleural fluids and lung tissues revealed that they were morphologically identical.