

婴幼儿毛细支气管炎的病毒病原学研究

中国医学科学院儿科研究所

(北京)

1. 从 1974 年冬—1976 年春对北京地区婴幼儿毛细支气管炎 80 例患儿的咽拭子标本进行了病毒分离工作,结果共分离出合胞病毒 12 株,阳性率占 15%。
2. 以 65 例患儿的双份血清中和试验结果证明:其恢复期对合胞病毒 4 倍中和抗体升高的有 39 例,阳性率占 56.5%。首次确证了北京地区婴幼儿毛细支气管炎和合胞病毒的病原关系。
3. 北京地区农村于 1976 年春首次分离出合胞病毒,其双份血清恢复期中中和抗体 4 倍升高的阳性率为 75%。初步证明合胞病毒也是北京地区农村婴幼儿毛细支气管炎的重要病原。
4. 对北京地区合胞病毒新分离株进行了一些培养特性和分离特性的研究,为今后中西医结合防治本病提供了一定的依据。

婴幼儿毛细支气管炎是一种常见病多发病,每年冬春两季在北京地区有不同规模的散发,也偶有小的流行,对婴幼儿健康危害很大,多数病例发生在 1—6 月的婴儿,严重者可发生呼吸循环衰竭,甚至于死亡。本文通过对婴幼儿毛细支气管炎患儿的咽拭子病毒分离鉴定和双份血清检查的研究,试图说明呼吸道合胞病毒(以下简称合胞病毒)在北京地区的分布,流行情况和病毒分离特性,为中西医结合防治合胞病毒的感染提供必要的科学依据。

材料和方法

(一)病毒来源

自 1974 年冬—1976 年春从北京市儿童医院和怀柔县医院采取两周岁以内具有典型毛细支气管炎症状患儿 89 例,对 80 例取了咽拭子,并在其中 56 份取了双份血清,另有 9 例仅取双份血清。采标本患儿的年龄分布见表 1。

(二)标本的采集

用棉拭子从患儿的咽后壁涂取咽分泌物,混悬于 2 毫升 0.5% 水解乳白蛋白的 Hanks 液中(内含 2% 小牛血清或鸡血清,青霉素 200 单位/

表 1 采标本患儿年龄分布

年 龄	病例数	百分率(%)
< 3 月	15	16.6
3 月—< 6 月	34	38.2
6 月—< 1 岁	32	35.8
1 岁—< 2 岁	8	9.4
总 数	89	100

毫升,链霉素 200 微克/毫升,卡那霉素 400 单位/毫升)。1975 年冬—1976 年春标本液改用 0.2% 明胶 Hank's 液,标本送往实验室后再用上述抗菌素处理一次,经 3000 转/分离心 15 分钟,不经冻化于 2—4 小时内把上清液接种于 1—2 种细胞管内各 2 支,接种量每管为 0.2 毫升,维持液为 0.8 毫升,置 33—35°C 平面孵育 24 小时,次日更换维持液,33—35°C 旋转培养(10 转/小时)。

(三)病毒分离

采用 HeLa (Bristol) 株,原代人胚肾细胞(HEK),传 2—5 代的人胚肺细胞。细胞生长液成份如下:(1) HeLa (Bristol) 株为 10% 小牛血清的 Eagles 液。(2) 原代人胚肾细胞为 10% 小

本文于 1977 年 3 月 2 日收到。

牛血清加 0.5% 水解乳白蛋白的 Hanks 液。(3) 传代人胚肺细胞为 10% 小牛血清加 Eagles 液和 0.5% 水解乳白蛋白的 Hanks 液各半。抗菌素加常规量。细胞维持液成份：(1) HeLa (Bristol) 株和传代人胚肺细胞为 2% 小牛血清的 Eagles 液。(2) 原代人胚肾细胞为 2% 小牛血清的 70 液 (血红蛋白水解液的 Hank's 液) 或 2% 小牛血清的 Eagles 液。维持液中除加常规抗菌素量外, 另加入 0.0003% 的谷胱酰胺。逐日观察病变, 以出现典型的细胞融合病变为病毒存在的指标, 如无病变, 则于接种标本后的第 7 天、第 14 天各做 0.5% 豚鼠血球吸附试验一次, 第一代连续观察三周, 每隔 3—4 天更换维持液一次, pH 均为 7.6 左右, 一般盲传一代, 如仍无病变或血球吸附试验阴性则弃去。

(四) 免疫血清制备

1. 病毒: 呼吸道合胞病毒 Long 株系医学科学院流行病防治研究所供给。北京地区新分离的合胞病毒地方株为 R_6 、 R_{32} 、 R_{17} 。当细胞出现完全病变后不经冻化和滴定用作免疫抗原。

2. 动物的选择: 家兔和豚鼠均可。

3. 麻醉方法和途径: 家兔采用戊基巴比妥钠静脉注射, 用量为 17 毫克/公斤。豚鼠采用乙醚鼻腔吸入麻醉。

4. 免疫途径: 均采用鼻腔滴入法。

5. 免疫次数: 每周一次连续四次, 末次免疫后隔一周试血一次, 分离血清后作合胞病毒 Long 株和新分离的地方株交叉中和试验, 以研究其相互抗原关系。

(五) 新分离病毒的鉴定(中和试验)

将中国医学科学院流行病防治研究所气管炎组供给的联合国世界卫生组织的合胞病毒 Long 株豚鼠免疫血清稀释成 20 个中和单位 (56°C 30 分钟灭活), 与 1:2 稀释的疑似合胞病毒株等量混合, 置室温中和 1 小时, 然后接种两支原代人胚肾细胞, 每管 0.1 毫升, 维持液为 0.9 毫升, 整个实验设病毒对照管, 免疫血清对照管和正常细胞对照管, 置 33—35°C 旋转培养 (10 转/小时), 当病毒对照出现 +++ 病变, 而试验管不出现病变, 则判定中和试验为阳性, 共观察 7—10 天。

(六) R_6 、 R_{32} 、 R_{17} 毒株的理化性状和生物学性状试验方法^[1]。

(七) 患儿双份血清检查(中和试验)

1. 病毒: 合胞病毒 Long 株和 R_{32} 毒株, 试验中 Long 株用 100 TCID₅₀/0.1 毫升, R_{32} 毒株用 32 TCID₅₀/0.1 毫升。

2. 细胞使用 HeLa (Bristol) 株和原代人胚肾细胞。

3. 患者血清由 1974 年冬—1976 年春采自毛细支气管炎病例, 患病急性期与恢复期的 65 例血清。

4. 实验操作: 将患儿的双份血清分别倍比稀释成 1:2—1:8, 1:4—1:16, 1:5—1:20 (56°C 30 分钟灭活) 与 Long 株或 R_{32} 等量混合, 置室温和一小时内, 急性期和恢复期各接种两支 HeLa (Bristol) 株或原代人胚肾细胞, 每管接种 0.2 毫升, 整个实验设病毒对照、双份血清对照、正常细胞对照, 判定标准为当病毒对照出现 +++ 病变, 而急性期血清试验管出现 +++ 以上病变, 而恢复期血清不出现病变时, 作为有 4 倍中和抗体升高, 视为有近期感染, 并具有病原学诊断的价值。

(八) 合胞病毒的细胞病理形态研究

将新分离的 R_6 、 R_{32} 毒株 0.2 毫升接种于盖玻片已长成单层的 HeLa 细胞原代人胚肾细胞传代人胚肺细胞上, 分别于接种后 24 小时、48 小时、72 小时……取出盖玻片用甲醇固定 30 分钟, 然后用 Giemsa 稀释液染 3—4 小时, 用酒精、丙酮、二甲苯脱水和鉴别, 封固待查。) 一般接种合胞病毒 72 小时后, 在上述三种细胞上均能产生不同程度的细胞病理形态改变。

实验结果

(一) 病毒分离

1. 从 1974 年冬—1975 年春 31 例毛细支气管炎患儿的咽拭子中分离到两株疑似合胞病毒。

2. 从 1975 年冬—1976 年春 49 例患儿的咽拭子标本中分离到疑似合胞病毒 10 株。以上 12 株病毒均经中和试验鉴定, 证明和合胞病毒 Long 株具有共同的抗原结构, 其分离情况见表 2。

(二) 不同细胞培养的病毒分离特点

表 2 80 例毛细支气管炎呼吸道合胞病毒分离结果

病毒分离结果	病例数	1974 冬—1975 春 WHO RSV Long 株中和		1975 冬—1976 春 WHO RSV Long 株中和	
		阳性	阴性	阳性	阴性
		阳性数	12	2	0
阴性数	68	0	29	0	39
分离总例数	80	2	29	10	39

80 例咽拭子标本从 HeLa 细胞分离出合胞病毒共 8 株(表3、4),原代人胚肾细胞分离出 3 株病毒,原代人胚肾细胞和传代

人胚肺细胞同时分离出 1 株合胞病毒。在 HeLa 细胞上第一代显现典型融合病变者有 5 株,盲传第二代才出现病变者有 3 株,原代人胚肾细胞和传代人胚肺细胞第一代同时出现病变者有 1 株,我们发现在传代人胚肺细胞上分离合胞病毒时所产生的病变往往不具融合的特征性且不易辨认,当再次传入 HeLa 细胞或原代人胚肾细胞时才能显示出典型的融合细胞病变,一般在 HeLa 细胞或原代人胚肾细胞上产生的融合病变分布均匀和广泛颇具特征性。

表 3 接种咽拭标本第一代出现融合病变的例数

标本编号	细胞种类	初次出现融合细胞病变的天数															总数	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
R ₆	HeLa						-	+										1
R ₃₂	HEK, 传代人胚肺											+						1
R ₉₄	HeLa												+					1
R ₁₀₉	HEK													+				1
R ₁₁₀	HEK									+								1
R ₁₁₅	HeLa										+							1
R ₁₁₇	HeLa											+						1
怀 ₁	HeLa																+	1
怀 ₁₃	HEK												+					1
分离阳性数																	9	
平均分离天数	HeLa	9.4 天																
	HEK	9 天																

表 4 咽拭标本传第二代产生融合病变的例数

标本编号	细胞种类	出现融合细胞病变的天数																	总数
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
R ₈₇	HeLa						+											1	
R ₉₂	HeLa											+						1	
R ₁₁₈	HeLa								+									1	
分离阳性数																			3
平均分离天数		8.3 天																	

(三) 患儿双份血清检查:

1. 从1974年冬—1975年春 26例双份血清对 R₃₂ 毒株恢复期中抗体有 ≥4 倍升

表 5 1974 冬—1975 春 10 例双份血清 R₃₂ 毒株中和抗体检查结果

标本编号	年龄(月)	性别	临床诊断	病程		中和抗体滴度		升高倍数
				急	恢	急	恢	
R ₁	5	男	毛细支气管炎	5	27	<2	8	>4倍
R ₅	4	女	”	4	23	<4	16	”
R ₆	5	男	”	5	23	<4	16	”
R ₈	5	男	”	4	27	<4	16	”
R ₁₀	7	女	”	5	30	<2	8	”
R ₁₁	3	男	”	7	23	5	20	4倍
R ₂₁	4	女	”	3	22	2	8	4倍
R ₂₂	8	男	”	5	22	<4	16	>4倍
R ₃₂	15	女	”	9	38	5	40	8倍
R ₃₃	5	女	毛细支气管炎	5	29	<2	8	>4倍

注: “急”为急性期; “恢”为恢复期。

高的有10例, 阳性率占38.5%, 结果见表5。

2. 从1975年冬—1976年春 39例患儿的双份血清对合胞病毒 Long 株恢复期中抗体 ≥ 4 倍升高的有 29 例, 阳性率占 74.4%, 其中有 8 例对本人新分离的合胞病毒地方株也具有恢复期中抗体 4 倍升高见表 6。因而首次确证了北京地区婴幼儿毛细支气管炎与合胞病毒的病原关系, 对此病毒的传播情况值得重视, 两年检查的双份血清中和抗体升高 4 倍的阳性率占 56.5%。

(四) 新分离毒株的生物学和理化性状

由表 7 所示核酸型为 RNA, 不耐酸, 不耐乙醚, 对 0.5% 豚鼠血球不产生血球吸附现象。

(五) R₃₂ 毒株在原代人胚肾细胞上不同维持液中繁殖的特性

由表 8 可见在原代人胚肾细胞上应用两种维持液培养 R₃₂ 毒株的滴度大致相仿, 但产生融合病变以 70 液更为明显, 已初

表 6 1975 冬—1976 春 29 例双份血清 中和抗体检查结果

编号	年龄(月)	性别	临床诊断	病程(天)	中和抗体滴度								
					呼吸道合胞病毒 Long 株	R ₈₇	R ₉₂	R ₁₁₀	R ₁₁₅	R ₁₁₇	R ₂₁₈	怀 ₁	怀 ₁₃
R ₇₅	11	女	毛细支气管炎	6	5								
				26	20								
R ₇₉	3	男	”	4	<5								
				22	20								
R ₈₇	2	女	”	2	5	5							
				20	20	20							
R ₉₂	12	男	”	5	<5								
				30	20		5						
R ₉₄	9	男	”	5	<5								
				21	20								
R ₉₅	2	男	”	4	5								
				47	20								
R ₉₆	6	男	”	3	<5								
				17	20								
R ₉₉	8	男	”	6	5								
				24	20								
R ₁₀₁	2	男	”	3	5								
				23	20								
R ₁₀₃	2	男	”	4	5								
				23	20								
R ₁₀₄	3	女	”	7	5								
				24	20								
R ₁₀₇	11	女	”	5	<5								
				26	20								
R ₁₀₉	8	男	”	4	<5								
				25	20								

续表 6

编号	年龄(月)	性别	临床诊断	病程(天)	中和抗体滴度								
					呼吸道合胞病毒 Long 株	R ₈₇	R ₉₂	R ₁₁₀	R ₁₁₅	R ₁₁₇	R ₁₁₉	怀 ₁	怀 ₁₃
R ₁₁₀	5	男	毛细支气管炎	2	5				5				
				25	20			20					
R ₁₁₁	9	女	"	5	5								
				25	20								
R ₁₁₅	6	男	"	2	5				5				
				24	20			20					
R ₁₁₇	2	男	"	4	5					5			
				14	20				20				
R ₁₁₈	4	男	"	5	5						5		
				27	20					20			
R ₁₂₀	4	男	"	3	5								
				13	20								
R ₁₂₃	4	女	"	6	5								
				30	20								
R ₁₂₄	7	女	"	5	<5								
				46	20								
R ₁₂₇	4	男	"	3	5								
				28	20								
R ₁₆	7	女	"	4	<5								
				20	20								
怀 ₁	7	男	"	4	<5						<5		
				21	>20							>20	
怀 ₄	10	男	"	4	<5								
				21	>20								
怀 ₁₃	4	男	"	3	<5							<5	
				16	>20								>20
怀 ₁₉	6	男	"	4	<5								
				14	>20								
怀 ₂₀	10	男	"	3	<5								
				28	>20								
怀 ₂₁	7	男	"	5	<5								
				24	>20								

表 7 R₆、R₃₂、R₈₇ 毒株生物学性状和理化性状

病毒名称	核酸型试验			酸稳定性试验		乙醚耐性		血球吸附 0.5% 豚鼠
	加 IUDR	不加 IUDR	核酸型	pH 3.0	pH 7.6 左右	乙醚处理	不经乙醚处理	
R ₆	3.50*	3.50	RNA	<1.0	3.50	<1.0	3.50	—
R ₃₂	3.50	3.0	RNA	<1.0	3.0	<1.0	3.0	—
R ₈₇	>4.0	4.0	RNA	<1.0	2.50	<1.0	1.5	—

* lg TCID₅₀/毫升, IUDR 为 60 微克/毫升, 乙醚为 20%。

表 8 Eagles 液和 70 液培养 R₃₂ 毒株比较试验

病毒	维持液	感染滴度	融合病变
R ₃₂	70 液+2% 小牛血清	3.0*	明显
	Eagle's 液+2% 小牛血清	2.5	稍差

* lg TCID₅₀/0.2 毫升。

步应用全部国产原料配制的 70 液作为培养合胞病毒的细胞维持液进行了初步摸索, 值得进一步研究。

(六) 新分离毒株的抗原性比较

R₃₂ 免疫血清对 R₆、R₃₂、R₈₇、R₉₂、R₉₄、合胞病毒 Long 株的中和反应结果见表 9, 合胞病毒 Long 株与 R₆、R₈₇ 两株新分离病毒的交叉中和试验结果见表 10, 由此可见以上各株病毒的抗原性无明显差异, 均属呼吸道合胞病毒。

(七) 合胞病毒的保存条件试验

我们对北京地区新分离的合胞病毒进行了保存条件试验, 温度为 -30℃ 左右, 一组病毒液中加入 50% 甘油冻存六个月尚

表 9 R₃₂ 免疫血清对各株病毒中和反应

分 组	细 胞 病 变					呼吸道合胞病毒 Long 株
	R ₆	R ₃₂	R ₃₇	R ₃₂	R ₆₄	
R ₃₂ 血清中和	—	—	—	—	—	—
抗原对照	++++	++++	++++	++++	++++	++++

表 10 呼吸道合胞病毒 Long 株与 R₆、R₃₇ 株交叉中和试验结果

免疫血清	病毒滴度	中 和 试 验 滴 度		
		呼吸道合胞病毒 Long 株	R ₆	R ₃₇
呼吸道合胞病毒 Long 株	10 TCID ₅₀ /0.2 毫升	1:80	≤1:80	1:80
R ₆	10 TCID ₅₀ /0.2 毫升	>1:80	1:80	1:80
R ₃₇	10 TCID ₅₀ /0.2 毫升	1:80	<1:80	1:160

能传出,而另一组不加甘油冻存仅 16 天就传失。由此可见若无超低温条件时,如果在病毒液中加入 50% 甘油然后冻存于 -20℃ 至 -30℃ 低温冰箱保存合胞病毒,这是一种切实可行的方法。

(八) R₆ 毒株引起的细胞病变特点

在非旋转培养条件下形成融合病灶较少,但细胞浆内嗜酸性包涵体清晰可见,形似桑椹,包涵体周围有一亮晕和胞浆隔离,一般 HeLa 细胞和传代人胚肺细胞较易着色,而原代人胚肾细胞的染色时间宜稍长,脱水时间要短些。

呼吸道合胞病毒 R₆ 株的细胞病变见图版 I 1—3。

讨 论

1974 年冬—1976 年春我们从病毒分离和双份血清检查结果,首次确证了北京地区婴幼儿毛细支气管炎和合胞病毒的病原关系。我们的结果和出生后数月婴儿发生的半数毛细支气管炎是由合胞病毒引起的报道相仿^[2],但低于 Gardner 报告 78% 的婴幼儿毛细支气管炎由合胞病毒感染所引起的报告^[3]。两年中,除分离出合胞病毒外,曾分离到两株 III 型副流感病毒,此外

未发现腺病毒,流感病毒和其他型别的副流感病毒存在。1976 年春我们对北京地区农村一次婴幼儿毛细支气管炎的散发流行进行了病毒病原学的调查,结果除分离出合胞病毒以外,还发现患儿的双份血清恢复期中抗体对合胞病毒有 4 倍以上升高的阳性率占 75%,因此也证明了合胞病毒是北京地区农村婴幼儿毛细支气管炎的重要病原,有关在大城市中分离合胞病毒和调查该病毒的流行规律的情况国内外已有报道^[4-7],但尚未见到有关合胞病毒在农村发生流行的报道,我们这一实践为今后安排防治合胞病毒感染提供了一定的参考价值。1975 年冬—1976 年春无论在病毒分离或双份血清的检查方面,所得结果的阳性率均较上年约高一倍。其原因除标本液的改换、敏感细胞 HeLa Bristol 株的采用以外,还可能与自然界甲₂型流感病毒的散发流行有关。有报道^[8]采用补体结合试验检查流感流行期和流感流行间隙期合胞病毒在人群中感染的比重,在流感流行期共检查正常人群的 290 人份的合胞病毒的补体结合抗体,阳性率占 25.5%,而在流行间隙期测 334 份人的补体结合抗体的阳性率只有 9%。这一事实和我们的实验结果有

相似之处。1975年冬北京地区曾发生了一次甲₃型流感病毒的散发流行,在此期间我们也从婴幼儿肺炎中分离出甲₃型流感病毒,患儿双份血清恢复期特异性抗体也有4倍以上升高,而就在这年冬季和1976年春季我们分离合胞病毒和检查双份血清的阳性率都比上年为高,由此使我们推测到流感病毒和合胞病毒在引起人群感染方面是否可能彼此存在某种协同作用?这方面的机理尚待进一步研究阐明。有关分离病毒的条件和培养病毒的条件试验:我们曾把合胞病毒株接种到不同个体的原代人胚肾细胞上,结果发现某一批细胞不出现病变,而另一批原代人胚肾细胞则产生明显的融合细胞病变。这一现象提示了人胚肾细胞可能对合胞病毒存在个体敏感差异性,这也给采用人胚肾细胞分离合胞病毒带来一定困难。分离病毒维持液的pH对合胞病毒的增殖也有影响,如果维持液的pH在7.6左右,对促进细胞融合病变的广泛程度和病变出现的迟早都有关系,这和有的报道^[9]相吻合。孵育温度和旋转培养对合胞病毒也有影响,如果把孵育温度稍高于33℃低于35℃可使融合病变提早出现。一般33℃旋转培养合胞病毒需要72小时出现病变,而把同样滴度的病毒置33—35℃之间培养,则48小时就出现病变,由此可见孵育温度可适当提高。我们曾把R₈₇毒株做了培养条件的试验:采用旋转培养的感染滴度的结果为4.0 lg TCID₅₀/

0.2毫升。而平面培养所得感染滴度<1.0 lg TCID₅₀/0.2毫升,所以旋转培养也很必要。合胞病毒对外界温度较敏感,培养条件要求严格,一般采用常规咽拭子分离方法的阳性率不超过30%。而在另一报道^[10]中作者在一次婴幼儿急性下呼吸道感染的流行期间采用鼻洗液床边接种分离法,结果分离合胞病毒的阳性率可达87—89%之间,并且测得鼻洗液的病毒量比咽拭中所含的病毒量大500倍,因此我们的分离方法有待改进。

参 考 资 料

- [1] 卫生部防治慢性气管炎办公室: 慢性气管炎实验方法汇编(一), 人民卫生出版社, 第182—183页, 1973年。
- [2] Fenner, F. J. and White, D. O.: *Medical Virology*, Academic Press, New York, p. 329, 1970.
- [3] Gardner, P. S. et al.: *Arch. Dis. Child.*, 43: 629, 1968.
- [4] Foy, H. M. et al.: *Am. J. Epidemiol.*, 97: 80—90, 1973.
- [5] 中国人民解放军昆字三二三部队 感冒气管炎病毒组: 微生物学报, 15: 125—132, 1975。
- [6] Simpson, H. et al.: *Brit. Med. J.*, 22: 629—632, 1974.
- [7] Kim, H. N. et al.: *Am. J. Epidemiol.*, 98: 216—225, 1973.
- [8] Каплан, А. С. и Др.: *Вопр. Вирусол.*, 5: 607, 1969.
- [9] Jordan, W. S. et al.: *J. Immunol.*, 88: 581—590, 1962.
- [10] Caroline, B. H. et al.: *J. Infect. Dis.*, 131: 1—5, 1975.

A STUDY OF VIRUS ETIOLOGY OF INFANTILE BRONCHIOLITIS

Institute of Pediatrics of the Chinese Academy of Medical Sciences
(*Beijing*)

1. From the winter of 1974 to the spring of 1976, isolation for respiratory syncytial virus has been carried out from throat washing of 80 pediatric patients with infantile bronchiolitis in Beijing with a total of 12 isolations, a positive rate of 15%.

2. Neutralization test of 65 pair sera from patients with infantile bronchiolitis showed that, against R. S. V. (Long strain), 39 sera of convalescents showed an increase in neutralizing antibody titre of four folds, i. e., a positive rate of 56.5%. It is the first time that a correlation between R. S. V. and etiology of infantile bronchiolitis in Beijing has been made.

3. In the spring of 1976, R. S. V. was isolated for the first time in the rural areas of Beijing. Seventy five percent of pair sera from patients with infantile bronchiolitis were found to show a four-fold increase of neutralization titre. Preliminary test also indicated that R. S. V. has thus been an important pathogen of infantile bronchiolitis in rural areas of this city.

4. The culture characteristics and methods of isolation of the local strains of R. S. V. have been investigated. This finding might provide a basis for future study in the prevention and treatment of this disease by combined traditional Chinese and western medicine.