

婴幼儿肺炎的病毒病原学

中国医学科学院儿科研究所

(北 京)

1. 1976年冬—1978年春对北京地区临床诊断疑似病毒性肺炎 221 例患儿的咽拭标本进行了病毒分离, 结果分离到合胞病毒 29 株, 阳性率占 13.1%。腺病毒 42 株, 阳性率占 19%。单纯疱疹病毒 8 株, 阳性率占 3.6%。血球吸附病毒 2 株, 阳性率占 0.9%。

2. 对 155 例同上患儿的双份血清检查结果表明, 其恢复期对合胞病毒 Long 株 ≥ 4 倍中和抗体升高的有 68 例, 阳性率占 43.9%。首次证明了北京地区婴幼儿病毒性肺炎和合胞病毒的病原关系。从 155 例同上患儿的双份血清血凝抑制试验结果证明, 恢复期对腺病毒 ≥ 4 倍血凝抑制抗体升高的有 20 例, 阳性率占 12.9%。145 例婴幼儿病毒性肺炎患儿的双份血清检查结果表明, 恢复期对流感病毒 4 倍血凝抑制抗体升高的阳性率占 16.5%。恢复期血清对副流感病毒 4 倍血凝抑制抗体升高的阳性率占 13.1%。

婴幼儿病毒性肺炎是北京地区常见的疾病, 发病率高, 近年来病死率虽有所下降, 但仍严重地威胁婴幼儿的健康。为了更有效地应用中西医结合方法进行防治工作, 首先必须确切探明其主要病毒病因, 然后才能制订有针对性的防治措施。过去我国曾对婴幼儿腺病毒肺炎和流感、副流感病毒肺炎进行过研究^[1-3], 但是呼吸道合胞病毒(以下简称合胞病毒)与婴幼儿病毒性肺炎的病原关系尚不清楚。本文报道: 通过对婴幼儿支气管肺炎患儿的咽拭子病毒分离鉴定和血清学诊断, 初步了解该病的病毒病因, 特别是合胞病毒的分布情况以及新分离合胞病毒株在多种细胞培养基上产生的细胞病理形态特性。

材 料 和 方 法

(一) 病例选择

自 1976 年冬—1978 年春从我所病房, 北京儿童医院门诊, 昌平县医院儿科采集三岁以下经 X 线诊断为病毒性肺炎患儿的咽拭子共 221 份;

患儿双份血清共 155 例。本组均为散发病例。

(二) 病毒分离鉴定

从病毒性肺炎患儿咽后壁抹取咽分泌物, 混悬于 2 毫升 0.4% 明胶 Hank's 液, 采用 HeLa 细胞 (Bristol) 株、Hep-2 细胞、原代人胚肾细胞, 传代人胚肺细胞 (3—5 代)、Vero 细胞、FL 细胞分离病毒, 接种 0.2 毫升标本液于上述两种或两种以上细胞各两管, 逐日观察病变。原代人胚肾细胞如不呈现病变, 则分别于接种后第 7 天和第 14 天各做血球吸附试验一次, 传代细胞置 33—35℃ 旋转培养 (10 转/小时)。维持液为 2% 小牛血清的 Eagle's 液, 原代人胚肾细胞的维持液用不加牛血清的 Eagle's 液, 33—35℃ 静置培养, 共观察三周。如无病变或血球吸附阴性者则盲传一代, 仍无变化者, 作为阴性弃去。

病毒鉴定: 合胞病毒采用中和试验法^[4]进行。

腺病毒中和试验: 将新分离的腺病毒株 100 TCID₅₀/0.1 毫升分别加等量的 3, 7, 11 型腺病毒的免疫血清 20 个中和单位, 操作方法按常规进行。

血球吸附抑制试验参照 Chanock 法^[5]。

本文于 1978 年 7 月 24 日收到。

(三) 免疫血清制备

合胞病毒 Long 株和新分离合胞病毒 P 35 株, 昌 22 株兔免疫血清的中和效价均为 1:80, 制备方法见[4]。副流感病毒 HA-2(I 型), CA(II 型), HA-1(III 型), HA-2 和 CA 的豚鼠免疫血清血凝抑制抗体效价均为 1:80—1:160, HA-1 的血凝抑制抗体效价为 1:80, 以上制备方法参照[4]。腺病毒家兔免疫血清包括 3, 7, 11 型的血凝抑制抗体效价均 > 1:320, 制备方法见[2]。甲、型和甲、型流感病毒鸡免疫血清由流研所流感组赠给。单纯疱疹病毒家兔免疫血清由卫生部药品生物制品检定所供给。

(四) 患儿双份血清检查

采用以下 10 种抗原: 合胞病毒 Long 株 (FL₄₋₁)、腺病毒 3, 7, 11 型 (HK₁₋₃)、甲、型流感病毒津防 77-78 (E₁)、甲、型流感病毒粤防 77-38 (E₁)、HA-2(HK₁₋₄)、CA(HK₁₋₆)、HA-1(HK₁₋₆)、单纯疱疹病毒昌 39 株 (HK₁)。

合胞病毒中和试验按[6]方法。

腺病毒 3, 7, 11 型微量猴血球凝集抑制试验按 Rosen 氏法^[1], 抗原用 4—6 个单位, 猴血球浓度为 1%。

流感病毒与副流感病毒微量血球凝集抑制试验: 患儿血清加霍乱弧菌滤液处理过夜, 然后置 56℃ 30 分钟灭活, 抗原用 4 个单位, 豚鼠血球为 0.75%, 总量为 0.075 毫升。

单纯疱疹病毒中和试验: 抗原量为 100 TCID₅₀/0.1 毫升, 将急性期血清稀释成 1:10, 恢复期血清为 1:40, 以完全中和为终点。

(五) 合胞病毒理化性状、生物学性状

1. 合胞病毒 P 35 株和昌 22 株的生物学和理化性状试验方法见文献[9]。

2. 合胞病毒 P 86 株和昌 22 株在 HeLa 细胞 (Bristol) 株和 Vero 细胞, FL 细胞上敏感性测定试验, 采用 10 倍稀释平行滴定法。

3. 合胞病毒 P 86 株与昌 22 株在 Vero 细胞, FL 细胞, HeLa 细胞 (Bristol) 株, 原代人胚肾细胞, 传代人胚肺细胞 (26 代) 上引起的细胞病理形态的研究, 操作方法见文献[6]。

实验结果

一、病毒分离

从 221 份患儿咽拭标本中分离到合胞病毒 29 株, 阳性率占 13.1%。腺病毒 42 株, 占 19%, 其中 3 型 14 株, 7 型 24 株, 非 3、7、11 型 4 株。单纯疱疹病毒 8 株, 占 3.6%。未能定型的血球吸附病毒 2 株, 占 0.9%。

二、合胞病毒在各种细胞上的分离特性

221 份咽拭标本在 Hep-2 细胞上分离得 2 株合胞病毒, 出现融合病变的天数分别为接种标本后的第 5 天与第 8 天, Hep-2 细胞和 HEK 细胞同时分离到 1 株合胞病毒, 分离时间均为接种标本后的第 5 天, 其余 23 株都是在 Hela 细胞和 FL 细胞上分离而得, 出现病变天数最短为第 5 天, 最长为第 23 天, 平均分离天数为 11.8 天, 其中有 4 株病毒是盲传第二代才出现融合病变。

三、新分离合胞病毒株鉴定结果

采用合胞病毒 Long 株家兔免疫血清对 29 株疑似合胞病毒进行了中和反应, 鉴定结果表明 29 株病毒与 Long 株具有相同抗原特性, 均确证为合胞病毒。

四、患儿双份血清检查

1. 从 155 例双份血清对合胞病毒 Long 株恢复期血清中和抗体 ≥ 4 倍升高的有 68 例, 阳性率占 43.9%, 其中有 23 例还对本人新分离合胞病毒株进行了中和试验, 结果表明有 22 例恢复期血清均有 ≥ 4 倍中和抗体升高, 从而初步阐明了北京地区

婴幼儿病毒性肺炎和合胞病毒的病原关系，在 23 例双份血清中，有 1 例对合胞病毒 Long 株和本人的病毒株均无中和抗体升高，另 1 例对本人病毒株有 4 倍中和抗体升高，但对 Long 株无抗体升高，其原因有待研究。恢复期血清对腺病毒血凝抑制抗体 ≥ 4 倍升高的有 20 例，阳性率占 12.9%，其中 3 型占 7.1%，7 型占 5.17%，11 型占 0.7%。从 145 例患儿双份血清检查流感病毒与副流感病毒的血凝抑制抗体的结果：恢复期血清有流感病毒血凝抑制抗体 ≥ 4 倍升高的有 24 例，阳性率占 16.5%，其中甲₁型占 5.5%，甲₂型占 11.0%。副流感病毒血凝抑制抗体升高的有 20 例，阳性率占 13.1%，其中 HA-2 占 4.6%，CA 占 4.6%，HA-1 占 3.4%。

2. 145 例患儿双份血清中具有两种或两种以上病毒抗体的情形：同一例双份血清中存在合胞病毒与流感病毒两种抗体升高的共 10 例，阳性率占 6.9%。同时存在合胞病毒与副流感病毒抗体的有 1 例，占 0.7%。存在合胞病毒，腺病毒，副流感病毒三种抗体的有 2 例，占 1.38%。有合胞病毒与腺病毒两种抗体的 1 例，占 0.7%。流感病毒与腺病毒同时存在抗体的有 3

例，占 2.1%。副流感病毒与腺病毒同时存在抗体的有 2 例，占 1.38%。上述结果表明，合胞病毒与其它呼吸道病毒同时存在抗体升高的例数占多数。

五、合胞病毒 P 35 株，昌 22 株的生物学与理化性状

由表 1 可见，核酸型为 RNA，不耐酸，不耐乙醚，0.5% 豚鼠血球吸附阴性。

六、不同细胞对新分离合胞病毒株的敏感试验

表 2 所示 P 86 株在 HeLa 细胞与 Vero 细胞上的感染滴度相仿，但是 Vero 细胞上的融合病变更具广泛性和立体感。昌 22 株在 HeLa 细胞和 FL 细胞上的感染滴度差异显著，以上实验结果，为今后采用 FL 细胞作为分离合胞病毒的敏感细胞系，提供了依据。

七、Vero 细胞与原代人胚肾细胞对副流感病毒敏感性的比较试验

由表 3 所示，Vero 细胞对副流感病毒

表 1 P 35 株，昌 22 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
	加 IUDR	不加 IUDR	核酸型	pH 3.0	pH 7.6	乙醚处理	不经乙醚处理	0.5% 豚鼠
P 35	4.0*	4.0	RNA	<1.0	3.0	<1.0	2.0	—
昌 22	2.0	2.0	RNA	<1.0	2.5	<1.0	2.0	—

* $1g_{10}$ TCID₅₀/毫升，IUDR 为 50 微克/毫升，乙醚为 20%

表 2 FL, Vero, HeLa 细胞培养 P 86 株，昌 22 株比较试验

毒株名称	细胞种类	感染滴度	病变情况
P 86 株	Vero	3.0*	++++
	HeLa	2.5	+++
昌 22 株	FL	4.5	++++
	HeLa	2.5	++

* $1g_{10}$ TCID₅₀/毫升

III 型,无论在感染滴度和病变程度方面,均显示比原代人胚肾更为敏感,在原代猴肾细胞来源缺乏的情况下,可用作分离副流感病毒的细胞系。

表 3 不同细胞对副流感病毒敏感性的比较试验

病毒名称	细胞种类	感染滴度	病变情况
副流感病毒 第 I 型	Vero	1.5	—
	HEK	2.0	—
副流感病毒 第 II 型	Vero	2.0	++++
	HEK	3.0	+++
副流感病毒 第 III 型	Vero	>5.0	++++
	HEK	5.0	+

* $\lg_{10}TCID_{50}/\text{毫升}$

八、不同细胞对合胞病毒新分离株的细胞病理形态研究

我们曾采用 Vero, HeLa, HEK, FL, HEL, CEF (鸡胚成纤维)细胞进行了细胞病理形态的研究,初步认为 Vero 细胞和 FL 细胞所产生的病变较显著,细胞浆内包涵体多而清晰,其次是 HeLa, HEL, HEK 细胞,CEF 细胞不产生任何病变。

讨 论

本文研究说明了几种常见的呼吸道病毒在北京地区婴幼儿病毒性肺炎中的重要作用。1976 年冬—1978 年春对 221 例患儿的咽拭标本病毒分离鉴定和 155 例双份血清检查证实 88.2% 是由一种或二种以上病毒感染所致,首次证明了北京地区婴幼儿病毒性肺炎与合胞病毒的病原关系,并发现该病毒在上述期间散发的婴幼儿病毒性肺炎的病原中占首位,阳性率为 43.9%。其次是流感病毒,占 16.5%。副流感病毒,占 13.1%。腺病毒只占 12.9%。合胞病毒在北京地区散发的婴幼儿病毒性肺炎病原中所占比重较国外报道的 25% 为高^[10]。昌

平县农村患儿 37 例双份血清,有 18 例对合胞病毒 4 倍以上抗体升高,阳性率高达 48.6%,因此对合胞病毒在北京农村的传播情况值得引起重视。流感病毒肺炎在我们研究的病例中占有一定的比重,我们发现 1977 年 11 月上旬—1977 年 12 月下旬,主要是甲₁型流感病毒,而从 1977 年 12 月下旬—1978 年 3 月上旬,主要为甲₂型流感病毒,婴幼儿对外界呼吸道疾患的流行较敏感,我们的结果反映了当时北京地区流感病毒散发流行的主要型别。另外我们检查了 145 例患儿的双份血清,同一例的血清中,具有合胞病毒与流感病毒两种抗体的阳性率高达 6.9%。过去我们的工作^[6]曾对合胞病毒与流感病毒在人群的感染方面可能存在某种协同作用引起了注意,本实验结果为在该两种病毒之间存在协同作用的可能性,又进一步提供了资料。

关于腺病毒的分离鉴定,以 7 型为主,从 12 例临床诊断为腺病毒肺炎而分离到 7 型腺病毒患儿的双份血清检查结果,发现其中有 7 例恢复期血清的血凝抑制和中和抗体都不升高。

有关影响分离合胞病毒的因素较多,国外报道^[11]分离合胞病毒的阳性率仅 1%,而血清学诊断的阳性率相当高,作者认为主要采用了敏感性差的传代细胞。我们曾把已知合胞病毒株分别接种在 HeLa 细胞上和 FL 细胞上进行了比较试验,结果 FL 细胞的感染滴度比 HeLa 细胞高 2 个对数,FL 细胞可用作分离合胞病毒。

我们分离流感病毒与副流感病毒阳性率低的原因,可能未采用鸡胚和猴肾细胞分离病毒所致。在 5 种细胞培养基上进行了合胞病毒的细胞病理形态特性的研究,从融合病变程度和细胞浆内包涵体数量的多寡,我们认为 FL 细胞和 Vero 细胞对合胞病毒较敏感。

参 考 文 献

- [1] 朱既明等：微生物学报，9:20, 1963。
- [2] 任贵方等：中华医学杂志，48:71, 1962。
- [3] 中国医学科学院儿科研究所：中华医学杂志，10: 613, 1974。
- [4] Lennette, E. H. et al.: Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections, 4th ed., New York, Am. Public Health Association, 1969.
- [5] Jokson, K. M. et al.: *Amer. J. Hyg.*, 71: 81—92, 1960.
- [6] 中国医学科学院儿科研究所：微生物学报，17(4):323—329, 1977。
- [7] Chanock, R. M. et al.: *New Engl. J. Med.*, 258: 207, 1958.
- [8] Rosen, L.: *Amer. J. Hyg.*, 71: 120, 1960.
- [9] 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。
- [10] Kim, H. W. et al.: *Amer. J. Epidemiol.*, 98: 216—225, 1973.
- [11] O. Sabeslavsky, et al.: *Bull. of W. H. O.*, 55(5): 625—631, 1977.

THE VIRAL ETIOLOGY OF INFANTILE PNEUMONIA

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

1. From the winter of 1976 to the spring of 1978, isolation for respiratory Syncytial virus, Adenoviruses, Herpes simplex virus, and Haemadsorption viruses has been carried out from throat washing of 221 patients with a tentative diagnosis of viral pneumonia in Beijing with a total of 29, 42, 8 and 2 strains, a positive rate of 13.1%, 19%, 3.6% and 0.9%.

2. Neutralization test of 155 pair sera from patients with infantile pneumonia showed that, against RSV (Long strain), 68 sera of Convalescents showed an increase in neutralizing antibody titer

of four fold, i.e., a positive of 43.9%. It is the first time that a correlation between RSV and etiology of infantile pneumonia in Beijing has been made.

H. I. test of 155 pair sera pediatric patients with infantile pneumonia showed that, against Adenoviruses 20 sera of Convalescents showed an increase in HAI titer of four times, a positive rate of 12.9%. A test of 145 pair sera from patients with infantile pneumonia showed that, against influenza viruses, parainfluenza viruses sera of Convalescents showed a rise in HIA titer of four folds, a positive rate of 16.5%, 13.1%.