

广州地区小儿呼吸道合胞病毒肺炎病原学研究

沈皆平 常汝虚 曾丽霞 张绿野
梁毅 何翠娟 关启鸿 关克涛

(广州市儿童医院病毒室, 广州)

本文报告了广州地区小儿病毒性肺炎 275 例中经病毒分离和/或血清学检查证实病原为呼吸道合胞病毒 (RSV) 的 82 例, 阳性率为 29.8%。首次在广州地区证实了 RSV 与小儿肺炎的病原关系。RSV 是本地区一岁以内婴儿最重要的下呼吸道感染病原, 流行高峰为夏秋季, 但病例终年不断, 与我国北方流行情况正好相反, 具有亚热带地区的流行特点。本文并对实验室诊断方法作了探讨。

呼吸道合胞病毒 (以下简写 RSV) 在小儿呼吸道感染中占重要地位。一岁以下婴儿的病毒性呼吸道感染几乎有 40% 与 RSV 有关^[1]。1973—1976 年我们从血清学上首次认识到 RSV 是广州地区小儿病毒性肺炎较重要的病原^[2]。在这个基础上我们继续研究小儿 RSV 肺炎的病原学。现将通过病毒分离和/或血清学证实的 82 例 RSV 肺炎病原学研究结果报告如下:

材料和方法

(一) 材料

为 1978 年 4 月至 1979 年 10 月在本院诊断为病毒性肺炎的婴幼儿。共采集鼻咽拭子 236 份, 急性期及恢复期血清 204 例。

(二) 方法

1. 病毒分离: 采用原代人胚肾细胞及 HeLa 细胞培养 (HeLa 细胞株由湖北医学科学院赠予), 以采集到的鼻咽拭子在床边接种, 接种后置 36°C 温箱 4 小时后换维持液 (内含 2% 鸡血清 Eagle 液), 静置 36°C 温箱培养。每天检查细胞病变, 若有典型 RSV 细胞病变时, 先做豚鼠血球吸附试验, 阴性后再与 RSV 免疫血清作中和试验鉴定。若无病变出现, 在种标本后第 7 天盲传代一次, 每代观察 2—3 周, 每周换维持液二次。

2. 血清学检查: 急性期血清在病孩入院后自

静脉取血, 分离血清保存于 -20°C。恢复期血清在病后 4—6 周采集。双份血清同时作补体结合试验 (以下简写补结试验) 及中和试验, 部分病例血清量不足则仅做其中一项。若病毒分离阳性者亦同时做自身病毒中和试验 (以下简称自身中和)。中和试验所用之抗原 RSV Long 株由中国医学科学院儿科研究所赠送, 在 HeLa 细胞中传代。补结试验之抗原制备参照 Ross 氏法^[3], 抗原效价滴定 1:32 为 1 单位, 每次试验用 4—8 单位。

3. 免疫血清制备: 选取 2.5kg 体重家兔两只, 自耳静脉注射 RSV 抗原, 每周一次, 每次 2ml, 第四次注射后一周采血滴定中和抗体效价, 若达 1:40—80, 即放血致死, 分离血清分装小瓶, 存放低温冰箱备用。注射用抗原制备: RSV 接种于 HeLa 细胞管, 3—4 天后病变应有“++++”, 收取经 3,000rpm 沉淀 20 分钟, 上清即为抗原, 每次新鲜收获制备。抗原滴度为 $3.5 \log_{10} \text{TICD}_{50}/\text{ml}$ 。

临床病毒肺炎诊断标准同前^[4]。上述实验室操作方法按本室常规略有改进^[5]。

实验结果

(一) 病毒分离

与人胚肾细胞相比, RSV 在 HeLa 细

本文于 1980 年 9 月 2 日收到。

胞的病变出现较早及较典型。典型的细胞病变是出现大量的融合细胞(图版 I-2、3、6)，也可同时或单独出现细胞变圆及变性而不发生细胞融合。在人胚肾细胞亦出现融合细胞病变，但有时融合病变不多，不易辨认，若加入中性红，使最后浓度为 1:

80,000，置 37℃ 1 小时，则融合细胞胞浆染成红色，甚为清晰(图版 I-8)。将有病变出现之细胞用苏木素伊红染色，可见大量胞浆内嗜酸性包涵体(图版 I-5)。本组病例典型的细胞病变最早出现在接种标本后第 4 天，大多数在 7—14 天。在 236 份鼻咽拭子标本中，共分离到 RSV 26 株，分离阳性率为 11.0%，其中 13 株是在 1979 年 3 月中旬至 4 月底的一个半月时间内分离到的。当时 6 月龄以下婴儿肺炎病例急剧增加，在这段时间内，共采集到鼻咽拭子 56 例，分离阳性率为 23.2%，这段时间可能是 RSV 散发流行。

(二) 血清学试验

204 例双份血清用中和试验和/或补结试验，其恢复期血清 ≥ 4 倍抗体升高者有 48 例，仅有 2 倍升高者 8 例，共 56 例。血清学检查阳性率为 27.4%。204 例双份血清中有 39 例未做病毒分离(包括少数标本污染被剔除者)。若将全部受检病例 275 例(236+39)通过病毒分离和/或血清学检查证实为 RSV 感染者共 82 例，总阳性率为 29.8%，居病毒性肺炎病原的第一位，首次确证了 RSV 与广州地区小儿肺炎的病原关系。

(三) RSV 肺炎病例的性别及年龄分布

82 例中男性 56 例。女性 26 例。男:女=2.1:1。

82 例中大于 1 岁者 18 例(21.9%)，小于 1 岁者 64 例(78%)，其中小于 6 月龄者 41 例(50%)。年龄最大为 4 岁，最小为 40 天。从年龄分布可见 RSV 肺炎主要侵犯 1 岁以内婴儿，特别是半岁以内婴

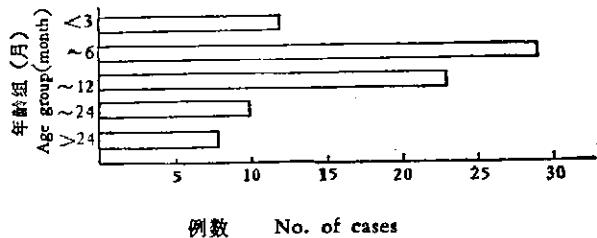


图 1 广州地区小儿呼吸道合胞病毒肺炎年龄分布
Fig. 1 Age distribution of children with RSV pneumonia in Guangzhou

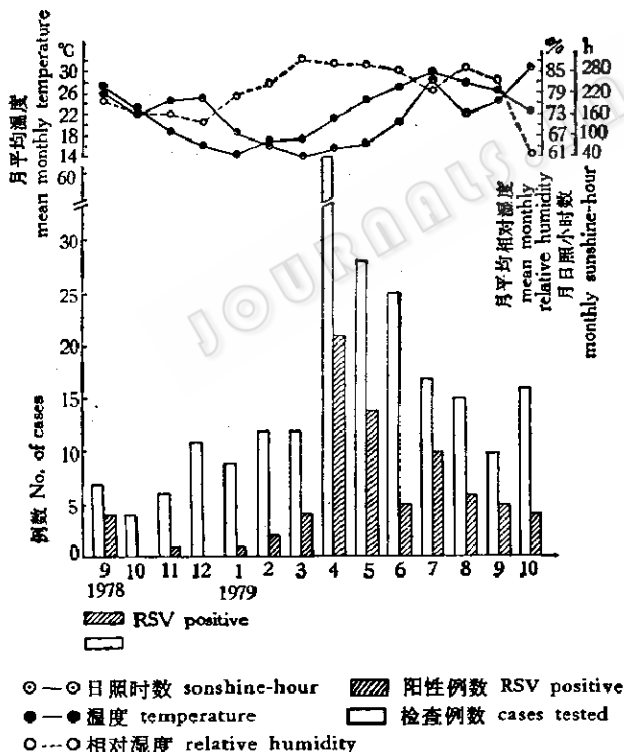


图 2 1978.9—1979.10 广州地区小儿呼吸道合胞病毒肺炎季节分布与每月平均相对湿度、温度及月日照小时数
Fig. 2 Seasonal distribution of RSV pneumonia in children in relation to the mean monthly relative humidity, temperature and monthly sunshine-hour in Guangzhou, Sept. 1978—Oct. 1979

儿(图1)。

(四) RSV 肺炎的流行季节

从1978年9月至1979年10月,连续14个月收取标本分离病毒及双份血清,发现广州地区小儿 RSV 肺炎主要在夏秋季流行,而以4—9月为高峰,但病例基本上终年不断。在这段时间广州地区的月平均相对湿度、温度及月日照时数与 RSV 肺炎流行情况对比见图2。(气象资料由广东省气象台供给)。

(五) RSV 感染后抗体产生情况

82例中有66例双份血清量足够做补结及中和试验者,其中和抗体及补结抗体测定结果比较见表1。

在病毒分离阳性的26例中,有24例

取回双份血清,其中8例的恢复期血清均无补结及中和抗体产生;他们发病时的年龄分别为:40天及3月各2例,58天、2月、4月、6月各1例。有两例(分别为3月及6月龄)在起病后12周追踪取回第3份血清,仍测不到中和抗体和/或补结抗体。

病毒分离阳性的26例血清学实验结果见表2。从表2看,本组试验结果、补结试验诊断 RSV 感染似较中和试验为敏感($p < 0.01$)。

(六) 混合病毒感染

本组有2例病毒分离为腺病毒(3型及7型各1例),自身中和及腺病毒补结试验均有 ≥ 4 倍抗体升高,同时对 RSV 补结

表1 66例合胞病毒肺炎双份血清检查结果

Table 1 Results of Paired Serologic Test of 66 Cases with RSV pneumonia

例数 Cases	VI 阳性 NT 及 CF 阴性 VI positive NT and CF Negative	CF 及 NT 二者均阳性 CF and NT both positive	CF 阳性 NT 阴性 CF Positive NT Negative	CF 阴性 NT 阳性 CF negative NT positive	合计 Total
	8	17	36*	5**	66

VI = 病毒分离 Virus isolation NT = 中和试验 Neutralization test

CF = 补结试验 Complement fixation test

* 其中6例病毒分离阳性。Including 6 cases of positive virus isolation.

** 其中2例病毒分离阳性,另一例 CF 滴度双份血清均为 1:640。Including 2 cases of positive by virus isolation and another case with paired sera showed the same titer of 1:640 by CF test.

表2 病毒分离阳性 26例血清学试验结果

Table 2 Results of Serologic Test of 26 Cases with Positive Virus Isolation

	例数 No. of cases	阳性 positive	阴性 Negative	%	
				阳性 Positive	阴性 Negative
自身中和试验 NT with virus isolated from patients themself	14	6*	8	42.9	57.1
Long 株中和试验 NT with Long strain	23	6	17**	26.1	73.9
Long 株补结试验 CF with Long strain	21	10***	11****	47.6	52.4

NT = 中和试验 Neutralization test CF = 补结试验 Complement fixation test

* 其中2例 Long 株中和试验阴性。Including 2 cases of negative NT with Long strain.

** 其中6例 Long 株补结试验阴性。Including 6 cases of negative CF with Long strain.

*** 其中2例抗体呈2倍升高。Including 2 cases of twofold increased antibody titer.

**** 其中1例 Long 株中和试验阳性。Including 1 case of positive NT with Long strain.

试验, 1 例有 2 倍, 另一例有 ≥ 4 倍抗体升高。

讨 论

RSV 肺炎的病原诊断, 本组病例是采用病毒分离及血清学检查两种方法。82 例中由病毒分离获得诊断者 26 例, 由血清学诊断者 56 例。但由于小于 7 月龄婴儿感染 RSV 后抗体产生能力较年长儿及成人低^[5], 在本组病毒分离阳性的 26 例中, 8 例血清学检查全为阴性, 其中除一例为 6 月龄外, 余均小于 4 月龄, 故在幼婴诊断 RSV 感染, 只靠血清学检查是不够的。影响 RSV 分离的因素较多, 国外报道分离阳性率相差颇大, 肺炎病儿 RSV 分离阳性率可高至 24%^[6] 及低至 1%^[7]。中国医学科学院儿科研究所在北京分离阳性率为 13.1%^[8], 本组为 11.0%, 比北京稍低。除了技术性的原因外, 亦可能与采取标本的季节有关。北京均为冬春季流行季节的病例, 而我们是连续 14 个月的取材。

至于中和试验与补结试验用于诊断 RSV 感染何者为敏感? 文献上有相反的意见。有人认为 4 月龄以下的婴儿补结抗体产生不良^[6], 亦有人认为甚至在幼婴, 若采取适当的方法, 补结与中和试验结果一样可靠。我们同意 Ross 氏的意见^[3], 如能使用适当的抗原, 补结试验似乎比中和试验敏感。我们最近对广州地区的 400 多例各年龄组人群作 RSV 抗体水平调查。使用补结试验, 在新生儿组 (脐带血) 及成人组分别测得补结阳性率为 97.8% 及 93.3%^[9], 也证明补结试验有敏感性高、操作容易、节省材料的优点, 值得今后在各地开展防治 RSV 感染工作中推广应用。

RSV 的流行季节, 国内外报告多认为在冬春季^{[1][5][10]}, 但我们在以前^[2]及本文的病例表明, 广州地区的 RSV 流行季节是

夏秋季, 冬春季反而病例稀少。这种流行季节与我国北方地区正好相反, 而与其他热带或亚热带地区相似^[11]。国外文献指出, 在温带地区 RSV 流行与气温成负相关, 当气温一旦上升, 感染数即下降^[12]。在热带地区, RSV 的流行与相对湿度成正相关^[13], 在终年相对湿度均高的乌干达, RSV 感染率就没有季节上的差别^[7]。广州地区的 RSV 流行高峰与当地的相对湿度关系较之与气温的关系更为密切, 相对湿度大时病例多, 反之则稀少 (见图 2)。在广州地区 RSV 流行期间, 不但婴幼儿肺炎及其他急性呼吸道感染病例增多, 且病毒分离比较易得阳性结果。我们曾在流行期间对门诊上呼吸道感染 (包括支气管炎) 婴儿 45 例作病毒分离, 也分离到 RSV 15 株, 说明 RSV 确是广州地区小儿呼吸道感染的重要病原, 是我们今后防治工作的一个重点。广州地区夏秋季呼吸道感染发病率高于冬春季^[14], 看来是与 RSV 流行有一定关系。另外, 我国南方数省市在 1971—1975 年夏季, 有流行性喘憋性肺炎较大流行, 多侵犯婴幼儿, 主要病原尚不明确, 疑为 RSV^[15], 本文报告的 RSV 流行季节, 在我国南方有一定的代表性, 对 RSV 可能是小儿流喘肺炎的病原, 提供了一个间接的证据。

参 考 文 献

- [1] 张方振: 国外医学流行病学 传染病学分册, 7 (3): 117, 1980。
- [2] 常汝虚等: 中华儿科杂志, 16(2): 70, 1978。
- [3] Ross, C. A. C. et al.: Arch. Ges. Virol., 14: 553, 1964。
- [4] 罗玉桃等: 中华儿科杂志, 17(4): 220, 1979。
- [5] Chanock, R. M.: Clinical Virology. R. Debré and J. Celers (editors), W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1970, pp 607—611。
- [6] Chanock, R. M. et al.: JAMA 176: 647, 1961。
- [7] Soběslavsky, O. et al.: Bull. of WHO, 55(5): 625, 1977。

- [8] 中国医学科学院儿科研究所: 微生物学报, 19(3): 327, 1979。
- [9] 沈皆平等: 新医学, 12(6): 281, 1981。
- [10] 张粹荆等: 中华儿科杂志, 16(2): 76, 1978。
- [11] Chanock, R. M. et al.: Bull of WHO, 37: 363, 1967。
- [12] Matin, A. J. and P. S. Gardner: *Lancet*, 2(8098): 1035, 1978。
- [13] Monto, A. and K. M. Johnson: *Am. J. Epidemiol.*, 86(1): 78, 1967。
- [14] 小儿呼吸道感染调查协作组: 中华儿科杂志, 16(2): 66, 1978。
- [15] 张粹荆等: 中华儿科杂志, 17(4): 197, 1979。

A STUDY OF ETIOLOGY OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS PNEUMONIA INFANTILE IN GUANGZHOU

Shen Jieping Chang Ruxu Zeng Lixia Zhang Luye Liang Yi
He Cuijuan Guan Qihong Guan Ketao

(*The Virus Laboratory of Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou*)

The studies of the etiology of respiratory syncytial virus (RSV) pneumonia of children in Guangzhou are reported. All cases have been confirmed by virus isolation and/or serological methods, RSV is the causal agent in 82 out of 275 cases (29.8%), and is the most important pathogen in lower respiratory tract infections among infants under one year old. This is the first report on the correlation

between RSV and etiology of children pneumonia in Guangzhou. This virus is most prevalent in summer and autumn but seems to be present all the year around. The epidemiologic pattern is opposite to that in the northern part of this country and has subtropic characteristics. The diagnosis method for RSV is also discussed.