

# 天津市儿童流行性感冒病原学检测分析

郭小华 段卫平 王世荣 张华 李颖 陈锦英

**【摘要】** 目的 对天津市 2001 ~ 2002 年流行性感冒(流感)患儿进行病原学分析。方法 用狗肾传代(MDCK)细胞和鸡胚双腔法进行流感病毒分离。用鸡红细胞和人 O 型红细胞凝集试验证实病毒的存在,用红细胞凝集抑制试验进行型和亚型的鉴定。结果 2001 年 10 月至 2002 年 3 月共采集 14 岁以下流感样患儿咽拭子标本 238 份,分离出 64 株流感病毒,检出率为 26.9% (其中 A(H3N2) 亚型 42 株,占检出数的 65.6%; A(H1N1) 亚型 13 株,占 20.3%; B 型 9 株,占 14.1%。所分离的 64 株流感病毒都具有适应于 MDCK 细胞株生长及与人 O 型红细胞凝集良好的生物学特性。转种鸡胚后,绝大多数(62/64 株)能适应鸡胚生长,但 64 份阳性咽拭子标本液直接接种鸡胚,仅有 3 份血凝阳性。此外,96.4%(53/55 株) A 型流感病毒均可由 O 相转为 D 相,有 2 株 A(H3N2) 为 O 相特征。B 型流感病毒均为 D 相特征。结论 天津地区流感病毒存在 A(H3N2)、A(H1A1) 和 B 三个型,以 A(H3N2) 为优势流行型。

**【关键词】** 流感病毒;血凝试验;血凝抑制试验

**Analysis on the aetiology of influenza in children in Tianjin** GUO Xiao-hua<sup>\*</sup>, DUAN Wei-ping, WANG Shi-rong, ZHANG Hua, LI Ying, CHEN Jin-ying. <sup>\*</sup>Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China

**【Abstract】 Objective** To analyse the pathogen of child patients with influenza in Tianjin aera. **Methods** The influenza virus isolation was performed by MDCK cells and embryonated eggs. The identification of the isolates was carried out with hemagglutination (HA) and hemagglutination inhibition (HI) tests. **Results** Two hundred and thirty-eight throat swab specimens from children with influenz-like illness were collected in Tianjin aera from Oct. 2001 to Mar. 2002 and 64 strains (26.9%) of influenza viruse were isolated. Data showed that there were 42 strains (65.6%) of A(H3N2) subtype, 13 strains (20.3%) of A(H1N1) subtype and 9 strains (14.1%) of B type in these positive isolates. All the isolated viruses grew very well in MDCK cells and hemagglutinated with human "O" red blood cells, and most (62/64 strains) of them were able to multiply in embryonated chick eggs. However, there were only 3 isolates with HA positive in inoculating embryonated eggs with the specimens. Meanwhile it was revealed that out of 55 strains of A type viruses, 53 strains (96.4%) were from O to D phase 2 strain of A(H3N2) were D phase characters and all B type isolated viruses being D phase properties. **Conclusion** There were three endemic types of influenza viruses-A(H3N2), A(H1N1) and B type in Tianjin aera, with A the main type.

**【Key words】** Influenza virus; Hemagglutination test; Hemagglutination inhibition test

流行性感冒(流感)是第一个实行全球性监测的疾病,2001 年天津市被接纳为国家流感监测单位,为及时监测流感病毒变异株,探索其变异依据,自 2001 年 10 月至 2002 年 3 月从天津市儿童医院和第三中心医院儿科采集流感样患儿标本 238 份,用细胞和鸡胚两种接种方法分离病毒,现将结果报告如下。

## 材料与方法

1. 标本来源:采集天津市儿童医院、天津市第三中心医院就诊的流感样患儿咽拭子标本,共 238 份,均为发病 3 天以内未用抗菌药物的首诊病人,年龄 0 ~ 14 岁,其中男 143 例,女 95 例。采集标本置入采样管(4 ml Hank's 液,0.5 ml 抗生素,调 pH 至 7.4 ~ 7.6)备用。

2. 鸡胚:9 ~ 11 日龄海兰褐或罗曼褐胚(由天津市兴华养殖场和金纳生物技术天津有限公司提供)。

作者单位:300011 天津市卫生防病中心微生物部(郭小华、段卫平);天津市第三中心医院(王世荣);天津儿童医院(张华);天津医科大学(李颖、陈锦英)

3. 细胞株和标准血清 狗肾传代(MDCK)细胞由国家流感中心提供第20代,本实验室传至22~42代用作病毒分离。鸡免疫血清 A/沪防/7/99(H1N1)、A/闽防/151/2000(H3N2)、B/沪防/20/2001均由国家流感中心提供。

4. 病毒分离与鉴定<sup>[1]</sup>:采用细胞和鸡胚两种方法相结合分离病毒。采集标本在24~48 h内,按常规法首先接种 MDCK 细胞,置 34℃ 孵育培养,每日观察细胞病理变化(CPE),当 CPE 达卅~卅卅或培养 72~96 h,按常规常量法分别用 1% 鸡红细胞和 1% 人 O 型红细胞同时测定血凝试验(HA)活性,有 HA 活性确定为阳性标本。然后将有 HA 活性的 MDCK 细胞培养液和全部待检标本液分别按常规鸡胚双腔法接种鸡胚,置 34℃ 孵育 72 h,分别收获鸡胚尿囊液和羊水,同时分别用上述鸡和人 O 型两种红细胞检测 HA 活性,有 HA 活性确定为阳性标本。流感病毒鉴定采用红细胞血凝抑制试验(HI),即阳性标本血凝滴度达 1:20 以上者用常量法进行型和亚型鉴定。

### 结 果

1. 病毒分离结果:自 2001 年 10 月至 2002 年 3 月采集 14 岁以下流感样患儿标本 238 份,分离出 64 株流感病毒,总检出率为 26.9%。检测结果见表 1。

表1 2001 年 10 月至 2002 年 3 月天津市流感病毒监测结果

病毒分离时间	标本数	阳性数	构成比 (%)	HI 试验结果		
				A <sub>1</sub> 型	A <sub>3</sub> 型	B 型
2001 年 10 月	15	0	0.0	0	0	0
2001 年 11 月	31	0	0.0	0	0	0
2001 年 12 月	107	35	54.7	5	30	0
2002 年 1 月	44	19	29.7	8	11	0
2002 年 2 月	21	6	9.4	0	1	5
2002 年 3 月	20	4	6.3	0	0	4
合 计	238	64	100.0	13	42	9

2. 不同年龄组患儿流感病毒检测结果:将患儿分为 4 个年龄组,新生儿组指出生 28 天之内,婴儿组指出生后 29 天至 1 岁,幼儿组 1~5 岁,学龄儿童组 6~14 岁。检测结果见表 2。

3. 流感病毒分离株的特点:64 株流感病毒首次接种细胞均对 MDCK 细胞敏感,接种后 48~72 h 阳性标本 CPE 卅~卅卅,测定细胞培养液 HA 活性均呈阳性。继而,将 64 株 HA 阳性的 MDCK 细胞培养液及其相对应的患儿标本液分别转种和接种鸡胚。细胞培养液转种鸡胚后,有 62 株经转种后便能适应鸡

胚生长,收获的尿液和羊水 HA 阳性,其中有 2 株(H3N2)虽经鸡胚反复转种 5~6 次,其尿液和羊水 HA 结果仍呈阴性。64 份患儿标本液接种鸡胚的结果,仅有 3 株 HA 阳性,HI 鉴定结果均为 A(H1N1)亚型。

表2 2001 年 10 月至 2002 年 3 月天津市不同年龄组儿童流感病毒监测结果

分 组	标本数	阳性数	阳性率 (%)	HI 试验结果		
				A <sub>1</sub> 型	A <sub>3</sub> 型	B 型
新生儿	12	3	25.0	0	3	0
婴儿	36	2	5.6	0	2	0
幼儿	65	25	38.5	2	21	2
学龄儿童	125	34	27.2	11	16	7
合 计	238	64	26.9	13	42	9

红细胞凝集试验结果为 96.4%(53/55 株)的 A 型流感病毒初次分离的第一代细胞培养液对人 O 型红细胞敏感,对鸡红细胞不敏感,经传代后均可由 O 相转为 D 相,表现出对鸡红细胞敏感性的恢复。仅上述 2 株病毒(H3N2)经反复传代仍不凝集鸡红细胞,始终只与人 O 型红细胞发生凝集反应,表现为 O 相毒株特征。此外,B 型流感病毒均显示 D 相特性,初分离的 B 型流感病毒株与鸡红细胞和人 O 型红细胞都发生凝集反应。

### 讨 论

目前,在人群中同时流行着 A(H3N2)、A(H1N1)亚型和 B 型流感病毒株,自 2001 年 11 月底,我国北方,包括北京和天津地区流感样病人明显增多,并从流感样患者分离出 A(H3N2)和 A(H1N1)亚型流感病毒,与 2000 年同期相比 A(H3N2)亚型活动明显加强。冬季是我国北方流感流行季节,我市与北京地区大体相同,进入 12 月份,我市流感样患儿增多,采集患儿标本 107 份,分离出 35 株流感病毒,占阳性构成比 54.7%,其中 A(H3N2)亚型 30 株,占 A(H3N2)亚型株总数的 71.4%,可以认为 2001 年 12 月为本年度天津市流感流行高峰,A(H3N2)亚型为流感流行优势型,临床症状也较重。2002 年 1 月初流感流行趋势开始下降,患病人数及检出率明显降低。进入 2 月,A 型流感病毒基本消失,从散发的患儿中发现 B 型流感病毒在活动,直至 3 月底,一直未形成流行峰,以散发出现。

自 1977 年我市开展流感病原学监测以来,本年度的标本分离阳性率最高,居历年之首。排除选择

典型病例,采样方法得当,接种及时等基本因素外,主要原因可能是 A(H3N2)亚型毒株在我市人群中已平静 2 年,人群对其免疫力下降。更重要的是国家流感中心已发现新分离出的 H3N2 亚型毒株的抗原性与 A/福建/151/2000 及 A/深圳/1/99 毒株间存在差异,其抗原性已发生了漂移。此外,我市人群中虽已进行过流感疫苗接种,但接种人数比 2001 年同期下降,据调查,阳性标本的患儿大多数未接种过流感疫苗,有可能与疫苗接种范围小、对流感没有形成免疫屏障有关。

我们所分离 A(H3N2)亚型毒株中有 3 株分别来自出生后 12、16、19 天的新生儿。可见,儿童是流感的重点保护人群,做好防护极为重要。

2002 年所分离的流感病毒优势流行株 A(H3N2)亚型生物学特性突出表现在对 MDCK 细胞敏感,毒株凝集人 O 型红细胞良好,该类毒株经反复传代、转种,大多数毒株都发生转变能适应鸡胚培养,由 O 相转为 D 相。值得注意的是,有 2 株经反复传代、转种仍只适应 MDCK 细胞培养,只凝集人 O 型红细胞。自 1996 年发现 O 相变异株以来,O 相毒株一直都很活跃,2001 年初我市也分离到 2 株类似毒株,这种现象国内其他地区也有报道<sup>[1-3]</sup>。目前认

为此类毒株系 HA 基因受体结合部位(RBS)的变异导致流感毒株凝集红细胞的种类及对鸡胚与 MDCK 细胞的敏感性不同<sup>[4-7]</sup>,天津地区出现这类毒株的变异基础及流行病学意义有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术. 北京:中国三峡出版社,1997.11.
- 2 黄平,沈桂章,倪汉忠,等. 广东地区 1996 年流感爆发的分子变异基础. 中国病毒学,2001,16:1-5.
- 3 周惠琼,江立敏,张巧云,等. 不同抗原性甲 3(H3N2)亚型流感病毒的鉴定及分子生物学研究. 中华微生物学和免疫学杂志,2001,21:552-555.
- 4 郭元吉,董婕,王敏,等. 甲 3(H3N2)亚型流感病毒相变异分子生物学基础的研究. 中华实验和临床病毒学杂志,1998,12:18-22.
- 5 Medeiros R, Escriou N, Naffakh N, et al. Hemagglutinin residues of recent human A(H3N2)influenza viruses that contribute to the inability to agglutinate chicken erythrocytes. Virology,2001,289:74-85.
- 6 Nobusawa E, Ishihara H, Morishita T, et al. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2):a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. Virology,2000,278:587-596.
- 7 Ciappi S, Azzi A, Stein CA, et al. Isolation of influenza A(H3N2) virus with "O"→"D" phase variation. Res Virol,1997,148:427-431.

(收稿日期 2002-08-27)

(本文编辑 张林东)

· 网络信息 ·

世界卫生组织流行病学数据系统(WHOSIS)

WHOSIS(<http://www.who.int/whosis/>)是 WHO 在网上建立的统计信息系统,提供其统计学和流行病学数据信息。通过 WHOSIS 系统可利用关键词途径检索 WHO 网站上的数据信息,也可以通过该网页链接到 WHO 各专门数据库。

Mortality Data(死亡率数据)

死亡率数据是《World Health Statistics Annual》(世界卫生组织统计年鉴)的网络版。包含有 WHO 死亡率数据库中的死亡原因、婴幼儿死亡原因、平均寿命、年龄标准化死亡率等最新数据信息。

Weekly Epidemiological Record(流行病学每周记录)

《流行病学每周记录》(<http://www.who.int/wer>)是 WHO 出版的快速准确地报道世界各国流行病学信息包括疾病爆发、出现的重要传染病等情况以及全球监测与控制疾病的有效措施等信息的杂志。1925 年创刊,每年出版 52 期,每周五用英、法文出版。其电子版以 PDF 格式通过互联网免费向用

户开放。1996 年第 71 卷开始上网,研究人员可免费进入网站阅读、下载该杂志的全部文献,获取世界范围的流行病学最新资料。该刊通过电子邮件向用户免费提供其最新目次服务,同时也提供一些流行病学快报。

HIV/AIDS 信息与数据

HIV/AIDS 信息与数据(<http://www.unaids.org/hivaidinfo/>)是建立在 UNAIDS(联合国艾滋病协作项目)网站上的有关 HIV/AIDS 信息的网页。通过该网页,可以通过主题方式免费浏览阅读 1996 年以来 UNAIDS 和 WHO 各年发表的有关全球 HIV/AIDS 流行病学文件和报告的全文;也可以免费浏览阅读 UNAIDS/WHO Epidemiological Fact Sheets。该简报包含了特定国家的 HIV/AIDS 和性传播疾病感染流行和发病率方面的最新数据信息。这些信息对于及时了解特定国家、特定地区以至全球的 HIV/AIDS 流行现状与趋势非常重要,对于决策与计划也是重要的数据信息。

(黄亚明 刘树春 郭继军 整理)