

1976~1990年北京地区腺病毒肺炎的流行特点 及分子流行病学研究

郑企静¹ 李泉根² 龚明敏³ 刘玉华³ 李 佳¹
朱 虹³ 阎田玉³ 赵高潮¹ 庞淑兰³ 富长伶³

摘要 对1976~1990年度15个冬春2 757例住院肺炎患儿作了病毒学检查,并对80~90年代及部分50、60年代分离的3、7型腺病毒(Ad3、Ad7)99株用12种DNA限制性内切酶作了基因组型分析。研究结果阐明了北京地区腺病毒(Adv)肺炎的流行特点。1976年以来北京地区没有出现Adv肺炎的爆发流行,仅有小规模流行。Ad3、Ad7仍是Adv肺炎的主要病原,但在不同阶段以一个血清型为主。1982年以后Adv肺炎的发病率逐渐下降,病情减轻。DNA限制性内切酶分析揭示了北京地区引起肺炎Ad3、Ad7基因组型分布。Ad7中有6个基因组型,Ad3中有3个基因组型。1958、1965年曾出现7a₁、7a₄、7b及7g,以后未再检出;1962年出现3a₂。1980~1990年7d及3a₂是优势基因组型。Ad7中除1984年一株7d₁外均为7d。1984及1986年分别检出3a₄及3a₆。

关键词 肺炎, 腺病毒 基因组型 分子流行病学

腺病毒(Adv)肺炎是危害婴幼儿健康的重要疾病。1958年北京、长春发生大规模婴幼儿肺炎的流行,病死率高达16.6%~33.6%^[1]。朱既明、任贵芳^[2,3]等对其病原研究的结果证明当时流行的肺炎主要由腺病毒3型(Ad3)及7型(Ad7)所引起。60、70年代及80年代初期我国均有不同规模Adv肺炎的流行。近几年来其发病率呈下降趋势,病情减轻。流行规律有变化,但这种变化难以血清型的变化来阐明。70年代末及80年代Wadell、李泉根^[4~7]先后用DNA限制性内切酶分析的方法,对Ad7、Ad3的分子流行病学进行研究,提出基因组型(Genome type)的概念,从基因水平上阐述了Ad3及Ad7流行特点。世界不同地区、不同时期Adv主要的基因组型不同,并可发生变异。1976~1990年我们连续15个冬春对2 757例婴幼儿肺炎的主要病毒病原作了观察,重点探讨了腺病毒肺炎的流行特点,并将1980~1990年度及部分50、60年代由Ad3、Ad7肺炎97例分离出的99个毒株作了基因组型的分析,寻求北京地区Adv肺炎分子流行病学的特

点,为防治工作提供依据。

材料和方法

一、标本的采集与处理:1976~1980年采取临床诊断为腺病毒肺炎^[8]患儿的急性期与恢复期双份血清396份。1981~1990年采取临床诊断为婴幼儿肺炎及毛细支气管炎患儿的咽拭子或鼻咽分泌物及双份血清2 361份。以上共计2 757份。

二、病毒分离:用传代HeLa细胞及原代人胚肾细胞,按常规方法作病毒分离及毒株鉴定。前者在取样2小时内进行接种。

三、抗原检测:用间接免疫酶组化法检测鼻咽分泌物中的呼吸道合胞病毒(RSV)抗原。

四、双份血清抗体检测:微量血凝抑制试验检测抗Adv3、7、11型血凝抑制抗体;中和试验检测部分病例双份血清的抗Adv1、2、5

1 北京热带医学研究所病毒室 100050

2 解放军第三〇二医院病毒室

3 首都医学院北京友谊医院儿科

型的中和抗体；中和试验及间接ELISA检测抗RSV IgG抗体。

五、Ad3、Ad7基因组型的分析：对从54例患儿分离出的56株Ad7毒株及从43例患儿分离出的43株Ad3毒株进行基因组型分析。

1.腺病毒DNA的提取（参照Shinagwa法）〔9〕：将Ad3、Ad7毒株接种于传代A-549细胞，待病变达Ⅲ时收获（2~6天），收集、裂解感染细胞，去除细胞DNA，加蛋白酶K消化后，用酚抽提法提取Adv DNA，以异丙醇沉淀，将纯化的Adv DNA用80%乙醇洗二次，真空干燥后溶于100μl TE缓冲液中。

2.DNA限制性内切酶酶解：用12种限制性内切酶进行酶解。所用的酶为BamHI、

BclI、BglI、BglII、BstE I、EcoRI、Hind III、Hpa I、Sal I、Sma I、Xba I、Xho I，均购自Boehringer GmbH，按Maniatis〔10〕的方法酶解。

3.核酸内切酶片段琼脂糖凝胶电泳：方法见李泉根报告〔7〕。电泳毕，在紫外光源下照相，观察结果。按李泉根、Wadell〔6,7〕之分类标准确定基因组型。

结 果

一、腺病毒感染的型别：1976~1980年临床诊断为腺病毒肺炎的主要病原为Ad3和Ad7，占43.9%（表1）。Ad7多于Ad3。

二、RSV和Adv感染率：1981~1990年

表1 1976~1980年血凝抑制试验检测双份血清抗腺病毒血凝抑制抗体结果

年份	双份血清数	腺 病 毒				阳性率%
		Ad3	Ad7	Ad3+7	合计	
1976	41	10	16	—	26	63.4
1977	76	17	36	—	53	69.7
1978	85	16	11	3	30	35.3
1979	80	19	18	—	37	46.3
1980	114	6	22	—	28	24.6
合计	396	68	103	3	174	43.9

注：阳性指恢复期血凝抑制抗体呈4倍或4倍以上升高。

我们同时开展了RSV及部分多病原的工作。研究结果表明RSV、Adv在婴幼儿肺炎中分别占31.2%及10.2%。1982年Adv肺炎感染率高，多于RSV感染，分别为45.9%及19.6%。Adv感染仍以Ad3、Ad7为主，占68.9%；如加上Ad3、Ad7混合感染，则占79.7%；Ad3多于Ad7。后者呈逐渐下降之趋势，1987~1989年无一例Ad7感染，1990年感染又有上升。Ad1、2、5、11共51例占21.2%（表2和表3）。

三、1976~1990年不同阶段Adv感染率：1976~1980年中双份血清血凝抑制试验鉴定的Ad3、Ad7病毒肺炎高于1981~1990年（174：

103）。1982年后Adv肺炎感染率呈逐渐下降趋势，到1989年为2.7%。1986年后散在发病。

四、不同血清型腺病毒肺炎病死率之比较：1970~1990年Ad3肺炎171例，病死率4.09%；Ad7肺炎178例，病死率6.18%，两者统计学处理无显著性差异。但如分阶段分析：1976~1980年Ad7肺炎的病死率为6.1%（7/115），Ad3肺炎68例，无死亡，两者有显著差异；1981~1985年、1986~1990年两型间病死率无差异。1976~1990年Adv肺炎总病死率为4.22%，1986~1990年度74例无一例死亡。

表2 1981~1990年血凝抑制试验检测双份血清抗腺病毒血凝抑制抗体结果

年份	双份血清数	腺病毒					合计	阳性率%
		Ad3	Ad7	Ad11	Ad3+7	Ad7+11		
1981	81	4	3	1	1	0	9	11.1
1982	116	14	13	0	11	1	39	33.6
1983	168	13	9	0	1	0	23	13.7
1984	98	6	4	0	0	0	10	10.2
1985	175	4	3	0	1	0	8	4.6
1986	156	5	3	0	0	0	8	5.1
1987	129	1	0	0	0	0	1	1.5
1988	159	1	0	0	0	0	1	0.6
1989	211	1	0	0	0	0	1	0.5
1990	113	1	3	0	0	0	4	0.5
合计	1406	50	38	1	14	1	104	7.4

表3 1981~1990年婴幼儿肺炎患儿 Adv、RSV病毒分离及双份血清检查结果

年份	例数	Adv分离(+)和/或双份血清检测(+)								RSV分离(+)或/和双份血清检测(+)			
		Ad1	Ad2	Ad3	Ad5	Ad7	Ad11	其它*	未定	合计	阳性率%	阳性数	阳性率%
1981	81	0	0	4	0	3	1	1	0	9	11.1	37	45.6
1982	161	5	3	23	8	21	0	14	0	74	45.9	31	19.6
1983	223	2	1	18	0	15	0	2	0	38	16.1	42	18.8
1984	213	5	1	15	0	5	0	2	0	28	13.1	66	31.0
1985	248	0	1	9	0	4	0	2	2	18	6.4	90	36.3
1986	336	5	3	17	0	5	1	0	0	31	9.2	75	22.3
1987	173	1	1	6	0	0	0	0	0	8	4.6	91	46.7
1988	280	0	6	2	2	0	0	0	1	11	3.9	124	39.9
1989	325	3	0	6	0	0	0	0	0	9	2.7	124	38.0
1990	205	1	0	3	1	10	0	0	0	15	7.3	58	27.0
合计	2361	22	16	103	11	63	2	21	3	241	10.2	738	31.2

* 指Adv不同型的混合感染。

五、腺病毒3、7型基因组型分布：由表4可以看出，在北京地区Ad7于1953、1965、1980~1990年共有6个基因组型，其中1953年有4个基因组型。但自1980年以来，除1株7d₁外，均为7d。在Ad3中有3个基因组型，其中3a₂占优势，于1984年出现3a₄，该年度3a₄多于3a₂。

六、腺病毒7d、3a₂、3a₄基因组型肺炎的

主要临床特征之比较：共统计完整病例80例，其中7d肺炎43例，3a₂肺炎28例，3a₄肺炎9例。三者之病死率（7d肺炎13.95%、3a₂肺炎7.14%、3a₄肺炎11.1%）及重症率（分别为60.47%、64.29%及66.67%）之间无统计学差异。临床主要特征如体温、中毒症状、肺部体征、X线病变、合并症等方面7d与3a₂及7d与3a₄之间无明显差异；但3a₂与3a₄相比，在中毒症状、

表4 Ad3、Ad7 基因组型分布情况

年度	Ad7					合计	Ad3			合计	
	a1	a4	b	g	d		d1	a2	a4		a6
1958	1(1)	1(1)	1(1)	1(1)		4					
1962							1			1	
1965			1			1					
1980					14(2)	14					
1981					1	1					
1982					6(1)	6	2	7(1)		9	
1983					11(3)	11	3(1)			3	
1984					3	4	9		1	10	
1985					3	3	4(1)		2	6	
1986					2	2	10	2		12	
1987							1			1	
1988							1			1	
1990					8	8					
合计	1(1)	1(1)	2(1)	1	48(6)	1	54(9)	31(2)	9(1)	3	43(3)

注：括号内数字为死亡人数

重度喘憋、重度发绀、呼吸衰竭及肺部X线病变方面有显著差异 ($P \leq 0.05$)，3a₄重于3a₂。

讨 论

我们总结了1976~1990年十五个冬春2757例Adv肺炎的流行特点，病人均为北京友谊医院和解放军第三〇二医院儿科住院患者，他们来自北京市各城、郊区、县，病例不加选择，研究结果可以反映北京地区的特点。

1976年以来北京地区未发生Adv肺炎的爆发流行，仅有小规模流行。据1981年后统计其发病率除个别年份外，均低于RSV肺炎。Ad3、Ad7仍然是Adv肺炎的主要病原，但在不同阶段往往以一个血清型为主。1982年后Adv肺炎的发病率逐渐下降，病情减轻。1976~1990年Adv肺炎总病死率为4.22%，明显低于50、60年代腺病毒肺炎的病死率。近五年来无一例死亡。这固然与我们采取有效的中西医结合治疗措施有关^[11]，但也反映病情转轻的流行趋势。

对引起Adv肺炎Ad3、Ad7基因组型的分析结果表明，1980~1990年北京地区Adv中除1984年出现1株7d₁外均为7d，这与傅文永报告^[12]长春地区7b为优势基因组型的结果不同，说明了地区的差异性。根据基因片段同源性的分析，李泉根^[6]提出7d可能由7b演化而来。傅氏报告中的7d出现于1982年，1987~1988年均均为7d，可以看到这种演化的趋势。北京地区这种变异可能早于长春。在Ad3中3a₂一直为北京地区优势基因组型，傅氏报告长春地区3a₁为优势基因组型。后者是用BamH I及 Bgl I 两种限制性内切酶分析定名的。由于所用的酶数量及分类方法不同，不能进行比较。但3a₁属我们分类方法中的3a、3a₁-8的范围内。

50年代末我们开始认识腺病毒肺炎，对我们仅保留的少数Ad7毒株的分析，有7a₁、7a₄、7b及7g基因组型，多种基因组型的存在标志着病毒变异剧烈，是当年爆发流行的重要因素。80年代后期，Adv肺炎发病率下降，病情减轻，与7d与3a₂遗传稳定性相关。我们研究结果表明1976~1980年Ad7肺炎病死率高于Ad3

肺炎病死率, 而1981~1990年两者病死率无差异。首都儿科研究所及北京儿童医院均曾报告Ad7肺炎的重症率、病死率高于Ad3肺炎。这可能由于80年代后Ad7基因组型的变异所致。我们不同基因组型与临床特征关系的分析表明1981~1990年7d与3a₂、7d与3a₄肺炎间无明显差异。傅氏报告^[13]中曾提到7b肺炎重于7d肺炎, 而后者与3a I肺炎病情相仿。关于不同基因组型肺炎致病力的差异, 尚待进一步探讨。

Epidemiology of Adenovirus Pneumonia in Beijing, 1976~1990 Zheng Qijing, Li Quangen, Gong Mingmin, et al., Department of Virology, Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing 100050

From 1976 to 1990 for 15 consecutive epidemic years, virological examinations were carried out on 2757 hospitalized infants and children infected with pneumonia. Ninety-nine strains of types 3 and 7 adenovirus (Ad3, Ad7) isolated from 50s to 90s were analyzed with 12 DNA restriction endonucleases. Results showed the epidemiologic characteristics of adenovirus (Adv) pneumonia in Beijing. Epidemic occurred yearly, but there was no severe outbreak of Adv pneumonia as in 1958. Ad3 and Ad7 were the main etiologic agents of Adv pneumonia. Ad7 was dominant in 1976~1980; while Ad3 was more prevalent in 1981~1990. DNA restriction endonuclease analysis revealed six genome types of Ad7 and three genotypes of Ad3. 7a₁, 7a₄, 7b and 7g occurred in 1958, 1965, but disappeared between 1980~1990; 3a₂ was first detected in 1962. From 1980 to 1990, 7d and 3a₂ were the dominant genome types. Among the Ad7 strains only one strain of 7d₁ was identified; all others were 7d. 3a₄ and 3a₆ first appeared in 1984 and 1986, respectively. The changes of epidemic patterns seemed correlated with the variations of genome types.

Key words Adenovirus pneumonia
Genome type Molecular epidemiology

参 考 文 献

- 1 邓金鏊. 1958年冬在北京流行的婴幼儿肺炎. 中华儿科杂志, 1959, 10(6): 449.
- 2 戴莹, 任贵芳, 林毓纯, 等. 北京地区1958年冬流行的婴幼儿肺炎及1960年春散发的同类疾患的病原学究研. 中华医学杂志, 1962, 48(2): 77.
- 3 朱既明, 黄永成, 孙丹枫, 等. 婴幼儿中毒性肺炎病原学的研究. 微生物学报, 1963, 9(1): 20.
- 4 Wadell, G & Vansanyi, TM. Demonstration of three different subtypes of adenovirus type 7 by DNA restriction site mapping. Infect Immun, 1978, 21: 738.
- 5 Wadell G, MK Cooney, A da Costa Linhars, et al. Molecular epidemiology of adenoviruses. global distribution of adenovirus 7 genome types. J Clin Microbiol, 1985, 21(3): 403.
- 6 Quan-Gen Li & Goran Wadell. Analysis of 15 different genome types of adenovirus type 7 isolated on five continents. J Virol, 1986, 60(1): 331.
- 7 Quan-Gen Li & Goran Wadell. Comparison of 17 Genome types of adenovirus type 3 identified among strains recovered from six continents. J Clin Microbiol, 1988, 26: 1009.
- 8 中华人民共和国卫生部. 小儿肺炎防治方案. 中华儿科杂志, 1987, 25: 49.
- 9 Shinagwa M, A Matzuda, T Ishiyama T. A rapid and simple method of preparation of adenovirus DNA from infected cells. Microbiol Immunol, 1983, 27(9): 817.
- 10 Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J. Restriction enzymes. In: Molecular Cloning Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982, 98.
- 11 阎田王, 龚明敏, 林胡春, 等. 活血化瘀治疗小儿腺病毒肺炎的机理探讨及电镜观察. 中西医结合杂志, 1984, (3): 139.
- 12 傅文永, 梁东, 郑永晨, 等. 长春和北京地区引起婴幼儿肺炎的3、7型腺病毒分子流行病学的研究. 微生物学报, 1960, 6(2): 127.
- 13 傅文永, 梁志学, 刘为民, 等. 引起婴幼儿肺炎的3、7型腺病毒基因组型与临床的关系. 中华儿科杂志, 1991, 29(1): 39.

(收稿: 1993-03-13 修回: 1993-10-10)