

·论著·

呼吸道感染儿童人细小病毒 B19
检测及临床意义

聂国明¹,方红²,余健¹,丁进亚³

(广州军区武汉总医院 1. 儿科; 3. 检验科,湖北 武汉 430070; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科,湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 了解呼吸道感染患儿是否存在人细小病毒 B19 (HPVB19) 感染。方法 采用巢式 PCR 方法,对 2000 年 9 月至 2001 年 8 月 256 例临床诊断为呼吸感染的儿童进行血清及咽分泌物 HPVB19-DNA 检测,并选择同期且检查前 2~4 月无呼吸感染的 104 例正常儿童为对照组。结果 ①血清标本显示,观察组 HPVB19-DNA 阳性率 18.8 % (48/256),对照组 HPVB19-DNA 阳性率 5.8 % (6/104),二组相比差异有显著性 ($P < 0.01$);观察组 48 例阳性血清样本中,第 1 季度阳性者为 15 例,第 2 季度 18 例,第 3 季度 7 例,第 4 季度 8 例,第 1,2 季度阳性率高于第 3,4 季度阳性率 ($P < 0.01$)。②咽分泌物标本显示,观察组阳性率 20.1 % (54/256),对照组阳性率 3.8 % (4/104),二组相比差异具有显著性 ($P < 0.01$),观察组第 1,2,3,4 季度咽分泌物阳性例数分别为 17,20,8,9 例,第 1,2 季度阳性率高于第 3,4 季度 ($P < 0.01$)。结论 人类细小病毒 B19 可导致儿童呼吸道感染,说明 HPVB19 为儿童呼吸道感染的致病因素之一,对呼吸道感染儿童有必要进行 HPVB19 的检测;HPVB19 所致的儿童呼吸道感染在第 1,2 季度高于第 3,4 季度。
[中国当代儿科杂志,2003,5(3):226-228]

[关键词] 人细小病毒 B19;聚合酶链反应;呼吸道感染;儿童

[中图分类号] R373;R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)03-0226-03

Detection of Human Parvovirus B19 in Children with Respiratory Infection

GuoMing NIE, Hong FANG, Jian YU, Jin-Ya Ding. Department of Pediatrics, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China

Abstract: **Objective** To understand if human parvovirus B19 (HPV B19) is one of causes of respiratory infection in children. **Methods** HPV B19-DNA was detected by the nested PCR technique in serum and pharyngeal secretions of 256 children with respiratory infection between September, 2000 and August, 2001. One hundred and four normal children without respiratory infection within 2 - 4 months were served as the control group. **Results** The total positive rate of HPV B19-DNA in serum and pharyngeal secretions in the observed group was significantly higher than that of the control group (18.8 % vs 5.8 % and 20.1 % vs 3.9 %, respectively; both $P < 0.01$). Of the 256 cases, there were 15, 18, 7 and 8 cases of positive HPV B19-DNA in serum, and there were 17, 20, 8 and 9 cases in pharyngeal secretions in the first, second, third and fourth quarters respectively. The positive rate of HPV B19-DNA was significantly higher both in serum and pharyngeal secretions in the first and second quarters than that of the third and fourth quarters ($P < 0.01$). **Conclusions** HPVB19 is one of the causative agents for respiratory infection in children. The incidence of respiratory infection with HPVB19 in the first and second quarters is higher than that of the third and fourth quarters.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(3):226-228]

Key words: Human parvovirus B19; Polymerase chain reaction; Respiratory infection; Child

长期以来,在儿科门诊及住院患儿中,呼吸道感染一直占首位。呼吸道感染的病原仍以病毒居多,临床上常常关注的病毒有呼吸道合胞病毒、腺病毒、流感病毒、副流感病毒、柯萨奇病毒、疱疹病毒等等,

[收稿日期] 2002-09-02; [修回日期] 2002-11-14
[作者简介] 聂国明(1965-),男,硕士,主治医师。主攻方向:儿科感染性疾病。
[通讯作者] 聂国明,湖北武汉市广州军区武汉总医院 11-3-303,邮编:430070。

而对人细小病毒(Human Parvovirus B19, HPVB19)了解不多。人细小病毒是动物病毒中体积最小、结构最简单的线状DNA病毒,目前世界各地都有HPVB19感染存在^[1],其感染可导致血小板减少性紫癜、再生障碍性贫血、白血病、溶血性贫血、结缔组织病和粒细胞减少^[2]等,并与感染性红斑、非免疫性胎儿水肿、流产、死胎^[3]及关节病^[4]等有关。呼吸道感染儿童是否也存在HPVB19感染,特别是通过咽分泌物来检测HPVB19感染的方法,国内外未见报道。因此深入研究HPVB19在呼吸道感染患儿中的发病情况及其危害性,对保护儿童健康具有十分重要意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

观察组256例,为2000年9月至2001年8月我院儿科门诊及住院的呼吸道感染患儿,年龄(5.2±1.5)岁,男性132例,女性124例。其中上呼吸道感染96例,支气管炎84例,肺炎76例,其诊断符合《实用儿科学》第6版相应疾病的诊断标准,患儿病程均≥5d。所有病例均根据随机原则,逐月收集,各季度患儿例数、年龄、性别及病种差异均无显著性。对照组104例,为同期幼儿园及小学健康体检儿童,既往身体健康,且近2~4个月无呼吸道感染发生,其性别、年龄及生活地区与观察组差异无显著性。

1.2 标本采集

上述儿童均采集静脉血各2ml,3000r/min离心10min后保留血清,-20℃冰箱保存待检。咽分泌物:清晨小儿未漱口前,用生理盐水浸泡过的咽拭子刮取咽部分泌物,立即置入装有约1.5ml生理盐水的试管中,振荡后3000r/min离心10min,取上清液,-20℃冰箱保存待检。观察组标本采集均在治疗前进行。

1.3 实验方法

1.3.1 主要试剂 TaqDNA聚合酶、4×dNTPs,10×PCR buffer、琼脂糖等购自上海博亚生物技术有限公司。巢式PCR所用引物按文献^[5]提供的序列,亦由上海博亚生物技术有限公司合成,HPVB19巢式PCR两对引物序列如下:第1对引物(外引物)1S:5'-CTTTAGGTATAGCCAACTGG-3',2A:5'-CACTGAGTTTACTAGTGCC-3';第2对引物(内引物)3S:5'-CAAAA GCATGTGGA GTGAGG-3',4A:5'-CCTTA TAATGGTGCTCTGGG-3'。

HPVB19质粒由第四军医大学分子生物学实验室赠送(含量为70μg/ml)。DNA提取液由中山医科大学生物技术研究所提供。DNA Markers购自华美生物工程公司,该DNA Markers由13条长度为11~587bp的片段所组成。

1.3.2 实验步骤 血液或咽分泌物3000r/min离心10min,取上清50μl加DNA提取液50μl振荡混匀,100℃水浴10min,立即放置4℃至少6h(最长不超过16h)之后,再15000r/min离心15min,取上清液进行巢式PCR反应。第1次PCR循环50μl反应体系中包括:双蒸水36μl,10×PCR Buffer 5μl,10mmol/L 4×dNTPs 1μl,Taq酶1μl,引物1S 300ng(1μl)、2A 300ng(1μl),模板5μl,充分混匀、离心,石蜡油30~50μl覆盖,反应条件为:95℃变性5min后,循环35周(95℃1min,55℃1min 30s,72℃1min),循环结束后,72℃充分延伸10min。第2次循环:取第1次PCR循环产物5μl为模板,1S,2A被3S,4A各300ng代替,同上述条件进行第2次PCR循环。结果观察:分别取DNA Markers、HPVB19质粒的第1,2次PCR循环产物及标本的第1,2次PCR循环产物各10μl分别与2μl溴酚蓝混合,并分别加样于含EB(0.5μg/ml)的2%琼脂糖凝胶中电泳50min,电压50V,紫外线分析仪上观察:HPVB19质粒及标本的第1次循环产物若分别于1112bp处出现金黄色电泳带,而HPVB19质粒及标本的第2次循环产物分别于104bp处出现金黄色电泳带者,则该标本即为阳性标本。

1.4 统计学方法

采用 χ^2 检验;多组进一步两两比较则采用 χ^2 分割的方法进行检验。

2 结果

观察组中,咽分泌物及血清HPVB19-DNA同时阳性的患儿共36例,因而血清和/或咽分泌物HPVB19-DNA阳性患儿共计66例,观察组血清及咽分泌物标本HPVB19-DNA阳性率高于对照组,两组间差异有显著性($P < 0.01$)。见表1。

观察组各病种间血清及咽分泌物HPVB19-DNA阳性率差异无显著性($P > 0.05$)。见表2。

观察组第1,2季度血清及咽分泌物HPVB19-DNA阳性率高于第3,4季度(均 $P < 0.01$)。见表3。

表1 观察组与对照组血清及咽分泌物 HPV B19 - DNA 检测结果

Table 1 Positive rate of HPV B19-DNA in the observed and control groups 例(%)			
组别	例数	HPVB19 - DNA 阳性	
		血清	咽分泌物
对照组	104	6(5.8)	4(3.8)
观察组	256	48(18.8) ^a	54(20.1) ^a

注 :a 与对照组比较 $P < 0.01$

表2 观察组各病种血清及咽分泌物 HPV B19 - DNA 检测结果

Table 2 Positive rate of HPV B19-DNA in the observed group children with different respiratory diseases 例(%)			
组别	例数	HPVB19 - DNA 阳性	
		血清	咽分泌物
上呼吸道感染	96	21(21.9)	26(27.1)
急性支气管炎	84	15(17.9)	18(21.4)
肺炎	76	12(15.8)	10(13.2)

表3 观察组各季度血清及咽分泌物 HPV B19 - DNA 阳性检测结果

Table 3 Positive rate of HPV B19-DNA in the observed group in different quarters 例(%)			
季度	例数	HPVB19 - DNA 阳性	
		血清	咽分泌物
第1季度	65	15(23.1)	17(26.2)
第2季度	63	18(28.6)	20(31.8)
第3季度	62	7(11.3) ^a	8(12.9) ^a
第4季度	66	8(12.1) ^a	9(13.6) ^a

注 :a 与第1,2季度比较 $P < 0.01$

3 讨论

目前用于 HPV B19 感染的诊断措施主要有:①血清学检测:血清 HPV B19 - IgM 阳性可证明近期感染已持续 2~4 个月,血清 HPV B19 - IgG 阳性提示既往感染,IgG 阳性转为效价增高可作为急性感染指标,由于 HPV B19 抗原来源较困难,使得血清学检测方法难以普及,另外免疫缺陷患儿可出现假阴性结果,从而导致漏诊。②基因诊断:即核酸杂交和聚合酶链反应(PCR)技术,前者可为 B19 感染的发病机制研究提供直接依据,但因标记过程复杂,且容易产生放射污染,所以不易作为常规检查方法;而

PCR 技术具有灵敏度高、特异性强的特点,尤其在免疫力低下的患儿中,HPVB19 感染长期存在,而不产生特异的 IgM 和 IgG 抗体,采用 PCR 方法检测能够避免假阴性结果的出现^[5]。巢式 PCR 技术是提高检测灵敏性和特异性的一条很好的途径,它通过先对一段较长片段 DNA 扩增,特异性地对其中的一部分进行第 2 次扩增,不仅将敏感性提高了 10~100 倍(和一般 PCR 比较)^[6],而且使特异性也得到了很大的提高。这种检测技术扩增的 HPV B19-DNA 产物为 104 bp 片段,这种扩增产物不必经核酸探针检测,因为巢式 PCR 第 2 对引物本身就相当于一对探针,只有当第 1 次 PCR 循环产物中有 HPV B19 - DNA 的 1112 bp 片段时,第 2 次 PCR 循环才有可能阳性^[7],因此特异性也较一般 PCR 有很大的提高。本文即通过巢式 PCR 技术检测 HPV B19-DNA。

国外研究认为微小病毒 B19 主要通过呼吸道途径传播^[5]。本实验健康对照组 HPV B19-DNA 检测阳性率为 3.8%(咽分泌物)~5.8%(血清),表明本地区健康儿童中存在 HPV B19 的自然感染。国内报道 B19 病毒 DNA 阳性的患儿,虽然主要临床诊断不同,却同时伴有上呼吸道感染的症状^[5]。本实验观察组 HPV B19 - DNA 阳性率在 18.8%(血清)~20.1%(咽分泌物)之间,与对照组比较差异有显著性,证实本地区呼吸道感染患儿存在 HPV B19 感染,从发病时间来看,集中于第 1,2 季度,其发病率显著高于第 3,4 季度,此点与其它报道有所不同^[8]。血清和/或咽分泌物 HPV B19 - DNA 阳性的 66 例患儿中,以发热为主 22 例,占 33%;以头痛咽部不适为主 12 例,占 18%;以咳嗽、咳痰症状为主 16 例,占 24%;发热伴咳嗽 34 例,约占 52%;发热伴肌肉痛 6 例,约占 9%;发热伴皮疹 3 例,占 4.5%。66 例 HPV B19 - DNA 阳性患儿中有 26 例系反复呼吸道感染,占 39.4%,这部分患儿均存在不同程度的免疫球蛋白 IgG 或/和 IgA 降低,说明免疫功能低下的患儿容易导致 HPV B19 的入侵。另外,咽分泌物 HPV B19 - DNA 阳性说明患儿正处于病毒血症期间,且有传染性,对这部分患儿必需进行治疗并采取相应的隔离措施。

[参 考 文 献]

[1] Heegaard ED, Hornsleth A. Parvovirus: the expanding spectrum of disease [J]. Acta Paediatr, 1995, 84(2): 109-117.

(下转第 233 页)

疫复合物的沉积减少,从而使病情得到控制^[2,3,11]。本研究应用 MP 与 CTX 冲击治疗 LN 1 个疗程后,NO 和 LPO 明显下降,SOD,GSH - px 和 GSH 明显升高,同时其临床常规指标也明显改善,狼疮活动明显减轻,提示 MP 与 CTX 冲击同时抑制细胞因子及炎症介质的产生而从多方面抑制 NO 的生成和其它 ROS 的释放,减轻肾脏的氧化损伤,使机体抗氧化功能得以恢复^[12],故推测 MP 和 CTX 对 5 项实验指标的调节作用可能是其治疗 LN 的机制之一。当然,由于病例数较少,这一观点尚需深入研究加以证明。

[参 考 文 献]

[1] 姜红,罗钢,王淑兰,等. 儿童狼疮肾炎血清一氧化氮及脂质过氧化物的变化 [J]. 中华肾脏病杂志,2001,17(6):419.
[2] Austin HA, Balow JE. Natural history and treatment of lupus nephritis [J]. Semin Nephrol, 1999, 19(1):2-11.
[3] 余学清,陈楠. 狼疮肾炎治疗现状及应注意的几个问题 [J]. 中华肾脏病杂志,2002,18(1):7-8.
[4] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11):1271-1277.

[5] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SL EDAI:a disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE [J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(6):630-640.
[6] 姜红,王淑兰,罗钢,等. 谷胱甘肽转移酶 μ 基因缺失和氧化损伤与系统性红斑狼疮相关性研究 [J]. 中华风湿病学杂志,2001,5(3):156-159.
[7] Blount S, Griffiths HR, Lunec J. Reactive oxygen species damage to DNA and its role in systemic lupus erythematosus [J]. Molec Aspects Med, 1991, 12(2):93-105.
[8] 张肇,陈孝文,江黎明,等. 狼疮肾炎患者白细胞介素 13 的血浆水平和基因表达 [J]. 中华肾脏病杂志,2000,16(1):20-23.
[9] Gladman DD, Urowitz MB, Kagal A, et al. Accurately describing changes in disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. J Rheumatol, 2000, 27(2):377-379.
[10] Sasaki T, Muiyoi T, Ryama A, et al. Circulating anti - DNA immune complexes in active lupus nephritis [J]. Am J Med, 1991, 91(4):355-362.
[11] Cameron JS. Lupus nephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 1999, 10(2):413-424.
[12] Radomski MW, Palmer RMJ, Moucade S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(24):10043-10047.

(本文编辑:俞燕)

(上接第 228 页)

[2] China B, Ramirez Ronda CH. Infections caused by parvovirus B19 [J]. Bol Asoc Med P R, 1996, 88(1-3):20-26.
[3] Woernle CH, Anderson LJ, Tattersall P, et al. Human parvovirus B19 infection during pregnancy [J]. J Infect Dis, 1987, 156(8530):17-20.
[4] Carrington D, Gilmore DH, Whittle MJ, et al. Maternal serum alpha - fetoprotein - a marker of fetal aplastic crisis during intrauterine human parvovirus infection [J]. Lancet, 1987, 1(3):433-435.
[5] Young NS. Parvovirus infection and its treatment [J]. Clin Exp

Immunol, 1996, 104(9):26-30.
[6] Cassinotti P, Weitz M, Siegl G. Human parvovirus B19 infections: Routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay [J]. J Med Virol, 1993, 40(7):288.
[7] 曹玉红,张国成,许冬亮. ELISA 法与巢式 PCR 法诊断人细小病毒 B19 感染的对比研究 [J]. 中国实用儿科杂志,2000,15(11):689-690.
[8] Woolf A P. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults [J]. Arch Intern Med, 1989, 149(8):1153-1158.

(本文编辑:吉耕中)