

粤东地区住院小儿急性下呼吸道感染病毒病原学研究

欧少阳¹,林广裕²,吴扬²,陆学东³,林创兴²,周仁彬²

(1. 揭阳市人民医院儿三科,广东 揭阳 522000; 2. 汕头大学医学院第二附属医院儿科,广东 汕头 515041;
3. 深圳市福田区人民医院检验医学部,广东 深圳 518033)

[摘要] 目的 了解2007年粤东地区住院小儿下呼吸道感染患儿的病毒病原现状并比较各个年龄组、不同季节、不同病种的病毒检出情况。方法 选择因急性下呼吸道感染住院治疗的小儿345例,取其鼻咽抽吸物采用多重PCR方法以筛查呼吸道合胞病毒,腺病毒,流感病毒A型、B型,副流感病毒1型、3型,鼻病毒,博卡病毒及人类偏肺病毒。结果 ①病毒总检出率为51.6%(178/345),其中呼吸道合胞病毒占首位,病毒检出率为19.3%(66/345),而人类偏肺病毒为3.2%(11/345),博卡病毒为3.2%(11/345)。②1~3月份(阳性率为61.9%)、毛细支气管炎患儿(阳性率为72.6%)、1~6个月婴幼儿(阳性率为71.3%)病毒检出率较高,4~6月份(阳性率为40.2%)、3岁以上儿童(阳性率为19.0%)病毒检出率较低,呼吸道感染病毒病原的总阳性率与性别无关。结论 粤东地区小儿下呼吸道感染的主要病毒病原为呼吸道合胞病毒等常见病毒,此外博卡病毒及人类偏肺病毒等也是重要的病原体;年龄越小,阳性率越高,不同季节的呼吸道病毒检出率不同,毛细支气管炎患儿的病毒总检出率最高。

[中国当代儿科杂志,2009,11(3):203-206]

[关键词] 急性下呼吸道感染;呼吸道病毒;PCR;儿童
[中图分类号] R725.6 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)03-0203-04

Viral pathogens of acute lower respiratory tract infection in hospitalized children from East Guangdong of China

OU Shao-Yang, LIN Guang-Yu, WU Yang, LU Xue-Dong, LIN Chuang-Xing, ZHOU Ren-Bin. Department of Pediatrics, People's Hospital of Jieyang, Jieyang, Guangdong 522000, China (Lin G-Y, Email: du0077@21cn.com)

Abstract: Objective To investigate the viral pathogens of acute lower respiratory tract infection (ALRTI) in hospitalized children from East Guangdong Province of China and the relationship of the pathogens with age and seasons. **Methods** The nasopharyngeal aspirates samples obtained from 345 hospitalized children with ALRTI were investigated for respiratory syncytial virus (RSV), human bocavirus (HBoV), human metapneumovirus (hMPV), influenza virus types A and B, rhinovirus, parainfluenza virus types 1 and 3 and adenovirus by PCR. **Results** Viral pathogens were detected in 178 patients (51.6%). RSV was the most frequent (19.3%). Novel viruses hMPV (3.2%) and HBoV (3.2%) were found. A highest detection rate 61.9% of virus was found between January to March. The infants aged 1 to 6 months showed a higher detection rate 71.3% of virus than the other age groups. The detection rate of viral pathogens was 72.6% in children with bronchiolitis, followed by asthmatic bronchitis (70.0%) and bronchial pneumonia (44.6%). **Conclusions** RSV remained the leading viral pathogens in children with ALRTI in East Guangdong of China. Novel viruses HBoV and hMPV were also important pathogens. The detection rate of viral pathogens was associated with seasonal changes and age. Different respiratory infectious diseases had different viral detection rates, with highest detection rate in bronchiolitis cases.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (3):203-206]

Key words: Acute lower respiratory tract infection; Viral pathogen; Polymerase chain reaction; Child

在儿童急性下呼吸道感染(ALTRI)中病毒是主要的病原体之一。为了解粤东地区住院ALTRI患儿病毒病原分布状况,对汕头大学附属二院和揭阳市人民医院两所医院345例住院ALTRI患儿的鼻咽深部分泌物应用多重PCR方法进行了呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、腺病毒(adenovirus, ADV)、流感病毒(influenza virus, IFV) A、B型、副流感病毒(parainfluenza virus, PIV) 1、3

[收稿日期]2008-07-21;[修回日期]2008-11-05
[基金项目]汕头市重点科技计划项目2007027
[作者简介]欧少阳,男,大学,副主任医师。主攻方向:呼吸系统,神经系统疾病。
[通讯作者]林广裕,教授,主任医师,汕头大学医学院第二附属医院儿科,邮编:515041。

型和鼻病毒 (rhinovirus, RV), 人类偏肺病毒感染 (human metapneumovirus, hMPV)、人博卡病毒 (human bocavirus, HBoV), 7 种 (9 类型) 常见呼吸道病毒的检测, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

研究对象为 2007 年 1 ~ 12 月住院治疗的 ALTRI 患者, 共计 345 例, 纳入研究 ALTRI 患者为发病 3 d 内就诊、入院后当天或第 2 天、未应用抗病毒药物治疗者。病人分布情况: 男 190 例, 女 155 例; < 6 月 87 例, 6 月 ~ 90 例, 1 岁 ~ 72 例, 2 岁 ~ 54 例, 3 ~ 5 岁 42 例; 支气管肺炎 110 例, 毛细支气管炎 95 例, 喘息样支气管炎 60 例, 支气管哮喘 80 例; 汕头病人 260 例, 揭阳病人 85 例。同时以 83 例健康儿童作为对照组, 纳入研究的儿童为社区健康门诊的 5 岁以下健康体检儿童, 且 2 周内无发热、咳嗽、喘息等呼吸道症状。临床疾病诊断标准均依据诸福

棠《实用儿科学》第 7 版。

1.2 方法

患儿入院后当天或第 2 天用一次性吸痰管收从单侧鼻孔进管 5 ~ 8 cm 抽取鼻咽分泌物 (NPA) 2 ~ 3 mL。于采集 NPA 中加入 2.0 mL 病毒保护液置于 -20℃ 冰箱中待检。将 NPA 置涡旋振荡器上充分振摇 2 min 混匀, 然后置离心机 4 200 r/min 离心, 10 min, 取沉淀作病毒核酸提取。提取所得的 DNA/RNA 标本每份有 60 μL, 操作严格按说明书进行。试剂盒 AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit 购于 Axygen 公司。在每份标本中加入 RNA 酶抑制剂 5 μL (40 U/ μL), -80℃ 保存备用。多重 PCR 反应: RNA 病毒条件为反转录 50℃ 30 min; 变性 94℃ 5 min; 94℃, 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 次循环; 延伸 72℃ 3 min。DNA 病毒反应条件为变性 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 40 次循环; 延伸 72℃ 3 min。扩增产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。在紫外线透照灯下观察核酸电泳带。引物由上海生工生物公司合成, 见表 1。

表 1 呼吸道病原体核酸特异性序列 PCR 引物

病原体	上游引物 (F)	下游引物 (R)	目的片段长
ADV (3, 7)	5'-TCTTCCCAACTCTGGTAC-3'	5'-CCTGGGTTTATAAAGGGGTG-3'	209
HBoV	5'-GCAAACCCATCACTCTCAATGC -3	5'-GCTCTCTCCTCCCAGTGACAT-3'	404
IFV (A)	5'-AAGGGCTTTCACCGAAGAGG-3'	5'-CCCATTCTCATTTACTGCTTC-3'	171
IFV (B)	5'-GGGATATACGTAATGTGTTGT-3'	5'-GCACTGCCTGCTGTACACTT-3'	489
PIV1	5'-CAGACGGCATATCTCCTCTGG-3'	5'-GGTATGAGAAATTACCGGT-3'	307
PIV3	5'-CTGGGCTTCATCACTAGAGA-3'	5'-GATCTGTTGGTCACCACAAGA-3'	585
RSV	5'-TTTCCACAATATYTAAGTGTCAA-3'	5'-TCATCWCCATACTTTTCTGTTA-3'	155
hMPV	5'-AACCGTGTACTAAGTGATGCACTC-3'	5'-CATTGTTTGACCG (A) GCC (A) CCA (G) TAA-3'	191
RV	5'-CGGTAATTTTGTACGCCAGTTT-3'	5'-GAAACACGGACACCCAAAGTAG-3'	501

1.3 统计学方法

计数资料的比较采用 χ^2 检验, 取 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 病毒检出率

83 例健康儿童病毒检出阳性标本 5 例 (占 6.0%), 其中 RhV 4 例, RSV 1 例。347 例患儿送检标本中阳性 178 例 (占 51.6%)。男性患儿病毒检出率为 53.2% (101/190), 女性患儿病毒检出率为 49.7% (77/155), 性别分布差异无显著性。检出率以 RSV 占首位, 为 19.3% (66/345), A 型 IFV 检出率为 11.9% (41/345), PIV1 检出率为 5.8% (20/345), PIV3 检出率为 4.9% (17/345), RhV 检

出率为 10.1% (35/345), ADV 检出率为 9.9% (34/345), hMPV 检出率为 3.2% (11/345), HBoV 检出率为 3.2% (11/345), 未检测到 B 型 IFV。检出阳性者, 单一病毒感染 130 例 (占 73.0%), 其中 RSV 46 例 (占 25.8%), 其次递减为 A 型 IFV 22 例 (占 12.4%), Rhv 13 例 (占 7.3%), PIV1 12 例 (占 6.7%), ADV 11 例 (占 6.2%), PIV3 10 例 (占 5.6%), hMPV 9 例 (占 5.1%), HboV 7 例 (占 3.9%); 混合感染 48 例 (占 27.0%), 两种病毒混合感染 36 例, 三种病毒混合感染 12 例。

2.2 不同年龄组呼吸道病毒检出情况

不同年龄下呼吸道病毒检出阳性率不同, 年龄越小, 阳性率越高, 组间在统计学上差异有显著性 (表 2)。不同种类的病毒在不同的年龄具有不同的分布特点, RSV 阳性率最高在 < 6 月组, 为 19.5%;

IFV 阳性率最高在 1 ~ 3 岁组,为 10.3%;HBoV, hMPV, PIV1 及 PIV3 主要见于 1 岁以下小儿。1 岁以下小儿易混合病毒感染, <1 岁组的混合感染率 22.6% (40/177)。

表 2 不同年龄下呼吸道病毒检出情况及阳性率 (%)

	<6 月	6 月 ~	1 岁 ~	2 岁 ~	3 ~ 5 岁	合计
检测例数	87	90	72	54	42	345
阳性例数	62	56	32	20	8	178
阳性率	(71.3)	(62.2)	(44.4)	(37.0)	(19.0)	(51.6)

注:组间比较, $\chi^2=4.488$, $P<0.05$

2.3 季节分布

病毒检测阳性率高峰时间为 1 ~ 3 月份,阳性率为 61.9% (52/84), 4 ~ 6 月份病毒检出率最低,阳性率为 40.2% (33/82), 7 ~ 9 月份阳性率为 56.0% (51/91), 10 ~ 12 月份阳性率为 47.7% (42/88), 各组间统计学上差异有显著性。RSV 主要见于 1 ~ 3 月份;A 型 IFV 主要见于 4 ~ 6 月份, PIV1 和 PIV3 主要见于 1 ~ 3 月份、7 ~ 9 月份;hMPV, HBoV, ADV, RV 全年均有散发病例。1 ~ 3 月份混合病毒感染率高。

2.4 病种分布

急性喘息组(包括毛细支气管炎、喘息样支气管炎和哮喘急性发作)患儿病毒总检出率为 54.9% (129/235), RSV 单一病毒检出率为 12.3% (29/235), IFVA 单一病毒检出率为 8.5% (20/235)。不同疾病下呼吸道病毒检出情况不同,组间有统计学差异(表 3)。毛细支气管炎主要病毒为 RSV,单一病毒检出率为 21.1% (20/90)。hMPV, HBoV 主要见于毛细支气管炎,支气管肺炎。RV 主要见于哮喘急性发作,单一病毒检出率为 11.3%。IFV 主要见于喘息样支气管炎,检出率为 20.0%。喘息样支气管炎混合病毒感染检出率较高,为 25.0%。

表 3 不同疾病下呼吸道病毒检出情况及阳性率 (%)

	支气管肺炎	毛细支气管炎	喘息样支气管炎	哮喘急性发作	合计
检测例数	110	95	60	80	345
阳性例数	49	69	42	18	178
阳性率 (%)	(44.6)	(72.6)	(70.0)	(23)	(51.6)

注:组间比较, $\chi^2=7.81$, $P<0.05$

3 讨论

代表下呼吸道感染病原体最具有诊断意义的标

本为支气管肺泡灌洗液、支气管洗液和肺活检,然而这些标本在临床上常常难以获得。由于呼吸道病毒感染通常由上呼吸道向下蔓延,一般认为呼吸道病毒属快速杀细胞病毒,需在活细胞中才能生长繁殖,很少有无症状带毒情况,故上呼吸道阳性检出标本可以较为准确地反映下呼吸道病毒的急性感染情况^[1]。本组研究 345 例患儿中,病毒总检出率为 51.6%,病毒总检出率高于北京地区(间接免疫荧光、逆转录聚合酶链反应)的 43.3%^[2]、上海地区(直接免疫荧光法)的 40.5%^[3]、重庆地区(直接免疫荧光法)的 36.2%^[4],低于温州地区(直接免疫荧光法)的 58.2%^[5]报道。病毒检出率的不同提示呼吸道感染病毒病原体地区的流行性差异,同时也与检测的方法以及所检测的病毒种类有关。RSV 是世界各地婴幼儿急性下呼吸道感染最重要的病毒病原,其流行面广,发病率高,文献报道每年 45% ~ 50% 住院的婴幼儿毛细支气管炎及 25% 婴幼儿肺炎是由 RSV 直接感染所致^[6]。本组资料 RSV 病毒检出率为 19.3%。A 型 IFV 检出率 11.9%, A 型 IFV 抗原不稳定,其既往感染所诱导的抗体也不稳定,主要通过带有流感病毒的空气飞沫,易造成暴发流行,故应特别重视。hMPV 是由荷兰学者 Van den Hoogen 等^[7]于 2001 年发现的一种新的人类呼吸道病原体。有人报道^[8]血清学调查显示,所有被调查的荷兰 6 ~ 12 个月婴幼儿下呼吸道感染患者有 25% 的抗 hMPV 抗体阳性,几乎所有儿童 5 岁以前全都感染过 hMPV,且可发生再次或反复感染,感染 hMPV 病毒的儿童,与 RSV 的临床特征相似,临床表现为上呼吸道感染症状到急性支气管炎和肺炎,在婴幼儿上呼吸道感染中占有很高的比例。Esper 等^[9]报道 5 岁以下 hMPV 呼吸道感染患儿中 1 岁以下占 60.4%。本组住院的呼吸道感染儿童中 hMPV 检出率 3.2%。2005 年 10 月瑞典科学家 Allander 等^[10]从小儿下呼吸道感染分泌物中发现一种新的细小病毒,该病毒能引起儿童下呼吸道感染,被命名为人 HBoV。相继,澳大利亚、日本、加拿大、法国及美国也报道了儿童呼吸道 HBoV 的感染,在他们所检测的样本中 HBoV 的感染约为 3.1% ~ 5.7% 不等,本组中 HBoV 检测阳性标本 11 例,阳性率为 3.2%。

本组资料中不同年龄下呼吸道病毒检出阳性率不同,以 1 ~ 6 月最高,阳性率为 71.3%,随年龄增大,病毒检出阳性率下降,不同年龄下呼吸道不同病毒检出阳性率不同,RSV 及 HBoV, hMPV, PIV 的好发年龄在 1 岁以内,而 IFVA 多发生在 1 ~ 2 岁。婴

幼儿病毒检出率高可能与婴幼儿期细胞免疫功能尚未完善,且气道分泌物中缺少 SIgA 有关,1~6个月的婴儿虽然可获得母传抗体,但其呼吸道还未产生局部的分泌型抗体,故婴儿血清中的中和抗体还不能给予足够的保护作用,甚至有人认为在呼吸道缺乏局部抗体情况下,血清中循环抗体的存在反而能促进 RSV 感染。随着年龄增大,下呼吸道感染住院患儿人数逐渐减少,病毒的阳性率也相应地降低。因此婴幼儿期应是防治病毒感染的重点。

本组资料显示下呼吸道感染病毒病原有明显季节性,不同季节的不同呼吸道病毒检出率不同,虽然粤东地区一年四季都有散发,但发病主要在1~3月份,检出率高达61.9%,在7~9月份形成一个次高峰,该时期检出率为56.0%。这可能与粤东地区该时期气候变化和温差较大有关。

本组资料显示:急性喘息患儿病毒总检出率较高,达为54.9%(129/235)。呼吸道感染可增加喘息发作频率^[11],某些患儿仅间歇性地在病毒感染时发作喘息症状,并常随着年龄的增长症状逐渐缓解,这可能是早期病毒感染所致的一种免疫记忆现象,也可能是病毒感染对气道上皮及气道神经组织作用的结果^[12],同时还可能是机体特异性体质的一种表现或标记^[13]。毛细支气管炎病毒总检出率最高,达为72.6%,病原主要是RSV,在毛细支气管炎阳性病例中占29.0%(20/69),同时检测到hMPV 5例,HboV 3例,表明hMPV及HBoV也是毛细支气管炎病原之一。哮喘急性发作时RV单一病毒检出率达11.3%,同时也检测到RSV,IFV,hMPV,HBoV,表明RV,RSV,IFV,hMPV,HBoV与哮喘关系均十分密切。

本组资料病毒混合感染48例,混合感染率13.9%,在阳性标本中占27.0%。1岁以下小儿易发生混合病毒感染,<1岁组的混合感染率22.6%(40/177)。婴幼儿更易出现病毒混合感染的原因可能有:①免疫系统尚未发育完善;②既往对呼吸道病毒暴露较少而缺乏保护性抗体等。有文献资料报道病毒混合感染并未加重患儿病情^[14]。病毒混合感染可能为先一种病毒感染后继发另一种病毒感染,或者一种病毒是其他病毒感染的依赖性病毒,而各种病毒是否都引起病理变化或者只是由一种病毒引起病理变化而其他的病毒只是携带状态,尚须结合血清学检查和病理检查进一步研究。混合感染除病毒之间混合感染外,也可为病毒和细菌混合感染、衣原体等^[15~17],本组资料尚未对这些问题进行研究。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会儿科学呼吸学组. 儿科呼吸道感染病原学诊断研讨会纪要[J]. 中华儿科杂志, 1995, 33(6):374-376.
- [2] 袁艺, 宋国维, 杜军保, 曹玲, 崔小岱, 钱渊, 等. 北京地区住院急性呼吸道感染患儿的病毒病原检测分析[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 6(3): 348-350.
- [3] 陆敏, 曾玫, 陆权, 顾兰琴. 上海地区小儿急性病毒性下呼吸道感染临床流行病学特征[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2005, 5(3):152-155.
- [4] 罗晓菊. 741例儿童急性呼吸道感染病毒病原学研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(2):266-269.
- [5] 陈小芳, 董琳, 李孟荣, 张正霞, 李昌崇. 温州地区婴幼儿急性下呼吸道感染病毒病原学分析[J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(7): 454-456.
- [6] 谢健屏, 常汝虚, 何翠娟, 谢集明, 赖桂香, 万根平. 1978~1996年广州地区呼吸道合胞病毒感染分析[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35(8):402-405.
- [7] Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease[J]. Nat Med, 2001, 7(6):719-724.
- [8] Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, et al. Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants [J]. J Clin Virol, 2004, 30(3):267-270.
- [9] Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years[J]. Infect Dis, 2004, 189(8): 1388-1396.
- [10] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(36):12891-12896.
- [11] Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease[J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(1 Suppl):S6-10.
- [12] Folkerts G, Busse WW, Nijkamp FP, Sorkness R, Gern JE. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(6):1710-1720.
- [13] Piedimonte G. Contribution of neuroimmune mechanisms to airway inflammation and remodeling during and after respiratory syncytial virus infection[J]. Pediatr Infect Dis J, 2003, 22(2 Suppl): S66-75.
- [14] Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections[J]. Clin Infect Dis, 1997, 25(6):1421-1429.
- [15] 华春珍, 俞惠民, 陈志敏, 李建平, 尚世强. 小儿下呼吸道感染的细菌病原学分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(5):365-368.
- [16] 董琳, 周晓聪, 陈小芳, 杨锦红, 林剑, 张海邻, 等. 温州地区儿童急性下呼吸道感染病原学及细菌耐药性检测[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(5):369-372.
- [17] 黄成, 王晓蕾, 张勋, 沈伟. 2001~2006年成都市儿童医院常见下呼吸道病原菌分布及耐药性检测[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(1):17-20.

(本文编辑:吉耕中)