

北京地区 2004—2006 年婴幼儿急性呼吸道感染中人偏肺病毒感染的研究

朱汝南 钱渊 赵林清 邓洁 王芳 孙宇 廖斌

【摘要】 目的 了解北京地区急性呼吸道感染婴幼儿中人偏肺病毒(hMPV)的感染情况。方法 采集2004年7月至2006年6月首都儿科研究所附属儿童医院门诊和住院呼吸道感染患儿的咽拭子和鼻咽洗液临床标本3330份,进行细胞培养和间接免疫荧光检测病毒;同时提取标本中病毒RNA后经逆转录聚合酶链反应扩增位于hMPV M基因的片段,经琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段。结果 从3330份临床标本中检测到110份hMPV阳性标本,阳性率3.3%。hMPV感染的患儿男女比例为1.5:1,其中<1岁年龄组患儿占46.4%(51/110),1~岁年龄组患儿占11.8%(13/110),2~5岁年龄组患儿占33.6%(37/110),>5岁年龄组患儿占8.2%(9/110)。hMPV感染患儿的临床症状以肺炎占的比例最大,为44.5%(49/110);其次是诊断为上呼吸道感染(22.7%,25/110);诊断为毛细支气管炎的占10.9%(12/110),其中诊断支气管炎占7.3%(8/110)。2004年7月至2005年6月期间几乎每个月份(除2005年5月和6月)都检出hMPV感染的阳性标本,未出现明显的流行高峰。而2005年7月至2006年6月期间hMPV出现了较为明显的流行,于2006年4月为最高峰,阳性检出率为17.1%。110例hMPV感染的临床标本中有6份标本存在与其他呼吸道病毒的合并感染。hMPV和同期的人呼吸道合胞病毒的感染高峰没有重叠。**结论** hMPV是北京地区婴幼儿急性呼吸道感染(尤其是下呼吸道感染)的重要病毒病原之一,其感染对2岁以下婴幼儿威胁更大。

【关键词】 人偏肺病毒; 婴幼儿; 急性呼吸道感染

Surveillance on human metapneumovirus in infants and children with acute respiratory infections in Beijing, from 2004 to 2006 ZHU Ru-nan*, QIAN Yuan, ZHAO Lin-ting, DENG Jie, WANG Fang, SUN Yu, LIAO Bin. *Laboratory of Virology, Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China
Corresponding author: QIAN Yuan, Email: yqianbjc@263.net

【Abstract】 **Objective** To understand the prevalence of human metapneumovirus(hMPV) infection in infants and young children in Beijing, China. **Methods** Gene fragment from hMPV was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the primer pair located on the membrane (M) encoding gene. RNAs were extracted by Trizol from 3330 specimens collected from outpatients and inpatients with acute respiratory infections and visited the affiliated Children's Hospital from July 2004 to June 2006. These samples had been tested for conventional respiratory viruses including RSV, influenza A and B, parainfluenza I, II, III and adenovirus by indirect immunofluorescence assay as well as virus isolation before RT-PCR for hMPV. **Results** Out of the 3330 clinical samples, 110(3.3%) were found positive to hMPV. The ratio of male to female among those positive to hMPV was 1.5:1. Fifty-one out of 110 positive (46.4%, 51/110) specimens on hMPV were from children under one year olds, 13 (11.8%, 13/110) were from 1 to 2 year olds, 37 (33.6%, 37/110) were from 2 to 5 years of age, and 9 (8.2%, 9/110) among children over 5 years of age. hMPV was associated with: pneumonia in 44.5% (49/110) of the cases; upper respiratory infections in 22.7% (25/110); bronchiolitis in 10.9% (12/110); and bronchitis in 7.3% (8/110). hMPV was detected almost in every month from July 2004 to June 2005 in sporadic cases whereas a peak was noticed in April 2006 during the period from July 2005 to June 2006. Among 110 positive samples, 6(5.5%) were also positive for other viruses including 3 as Influenza B, 2 as RSV and 1 as

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570080);北京市自然科学基金资助项目(052020);北京市科委新星计划资助项目(2004B34)

作者单位:100020 首都儿科研究所病毒研究室北京市感染与免疫中心实验室(朱汝南、钱渊、赵林清、邓洁、王芳);首都儿科研究所附属儿童医院(孙宇、廖斌)

通讯作者:钱渊, Email: yqianbjc@263.net

Parainfluenza 3, suggesting that these children were co-infected with hMPV and other respiratory viruses. The peak of hMPV prevalence did not overlap with that of RSV during this period. **Conclusion** Our findings suggested that hMPV had been one of the important agents causing acute respiratory infections especially severe lower respiratory infections like pneumonia and bronchiolitis in pediatric patients in Beijing. Infants and young children under two years of age seemed to be more susceptible to hMPV.

【Key words】 Human metapneumovirus; Infants and young children; Acute respiratory infections

人偏肺病毒(human metapneumovirus, hMPV)是 2001 年首先由荷兰科学家报告发现的一种在人类至少已有 50 年感染历史的副黏液类呼吸道病毒。随后在全球许多国家相继报道了 hMPV 的感染^[1,2]。本研究组在 2003 年首次报道了在北京地区婴幼儿急性呼吸道感染的标本中检测到 hMPV^[3]。随着对 hMPV 基因研究的不断深入,我们试图设计和选用更为有效的引物,应用 RT-PCR 方法对北京地区急性呼吸道感染婴幼儿中 hMPV 的感染进行连续的监测,并与其他常见呼吸道病毒感染的关系进行分析和探讨。

材料与方 法

1. 标本来源:2004 年 7 月至 2006 年 6 月连续 2 年取自首都儿科研究所附属儿童医院因急性呼吸道感染到门诊就诊患儿的咽拭子和住院患儿的鼻咽洗液标本,共 3330 份。

2. 常见呼吸道病毒的检测:鼻咽洗液标本用间接免疫荧光法和/或细胞培养(Hep-2 和 MDCK 细胞)检测 7 种常见呼吸道病毒[呼吸道合胞病毒(RSV)、流感病毒(甲、乙型)、副流感病毒(1、2、3 型)和腺病毒];咽拭子标本用上述细胞培养进行病毒分离和鉴定。

3. 引物设计: M 基因是 hMPV 基质蛋白的编码基因,其基因序列相当保守。参考 GenBank 中已发表的和我们发现的不同基因簇北京 hMPV 的 M 蛋白基因序列(DQ843659 和 DQ843658)^[4],设计合成了在不同基因簇 hMPV 都非常保守的一对位于 M 基因的引物。P1:5'-CAA TGT CTG TAC TTC CCA AA-3';P2:5'-CTT ATT GCA GCT TCA ACA GT-3',预期的扩增片段大小为 307 bp。由北京英俊生物技术有限公司合成。

4. RNA 提取:使用 Trizol 提取标本中的病毒 RNA,按说明书操作。

5. RT-PCR 检测:用随机引物逆转录合成 cDNA。然后用上述引物进行 PCR 反应,反应条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,48.4℃ 30 s,72℃ 45 s,扩增 45 个循环;72℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1.2% 琼脂

糖凝胶电泳检测。Trizol 和反转录酶 M-MLV 为 Invitrogen 公司产品;随机引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;Taq 酶为天为时代科技有限公司产品。

结 果

1. hMPV 检测:进行 hMPV 检测的 3330 份临床标本中,2041 份标本为取自住院患儿的鼻咽洗液,1289 份为取自门诊患儿的咽拭子。从这些标本中共检测到 110 份 hMPV 阳性标本,阳性率为 3.3%(110/3330),其中 29 份(26.4%,29/110)标本为咽拭子,取自门诊患儿;81 份(73.6%,81/110)为鼻咽洗液,取自住院患儿。

2004 年 7 月至 2005 年 6 月共检测 1859 份标本,55 份阳性,阳性率为 3.0%,其中取自住院患儿的标本占 92.7%(51/55);2005 年 7 月至 2006 年 6 月共检测 1471 份标本,55 份阳性标本,阳性率为 3.7%,其中 45.5%(25/55)为门诊标本。

2. hMPV 感染的特点:在本次为期 2 年的研究中,hMPV 检测阳性患儿中男女比例为 1.5:1;男性患儿有 66 例,占阳性标本的 60.0%(66/110)。110 例 hMPV 感染患儿的年龄从出生 11 d 至 10 岁。其中 <1 岁的患儿有 51 例,占 46.4%(51/110),1~岁年龄组的患儿为 13 例,占 11.8%(13/110),2~5 岁的患儿 37 例,占 33.6%(37/110),>5 岁患儿 9 例,占 8.2%(9/110)。

hMPV 检测阳性的门诊患儿中 <1 岁的患儿占 6.9%,1~岁年龄组患儿占 10.3%,2~5 岁的患儿占 69.0%,>5 岁的患儿占 13.8%;而 hMPV 检测阳性的住院患儿中 <1 岁的患儿占 60.5%,1~岁年龄组的患儿占 12.3%,2~5 岁的患儿占 21.0%,>5 岁的患儿占 6.2%;hMPV 感染患儿的临床诊断以肺炎所占比例最大,为 44.5%(49/110);其次诊断为上呼吸道感染(22.7%,25/110);诊断为毛细支气管炎的占 10.9%(12/110);支气管炎占 7.3%(8/110);另外还有少数诊断为喘息性支气管炎、喉炎、哮喘及其他,可见阳性患儿中以严重下呼吸道感染(肺炎和毛细支气管炎)为主,占本研究组中阳性的 55.5%(61/

110)。

3. hMPV 感染的季节分布:从图 1 可以看出,2004 年 7 月至 2005 年 6 月期间几乎每个月份(除 2005 年 5 月和 6 月)都有 hMPV 感染的阳性标本被检出,检出阳性率最高的月份为 2004 年 10 月,阳性率达到 7.4%。而 2005 年 7 月至 2006 年 6 月期间 hMPV 出现了较前一年明显的流行。从 2006 年 1 月开始阳性检出率逐渐升高,于 2006 年 4 月为最高峰,阳性检出率达到 17.1%,随后逐渐下降,6 月份下降为 4.5%。

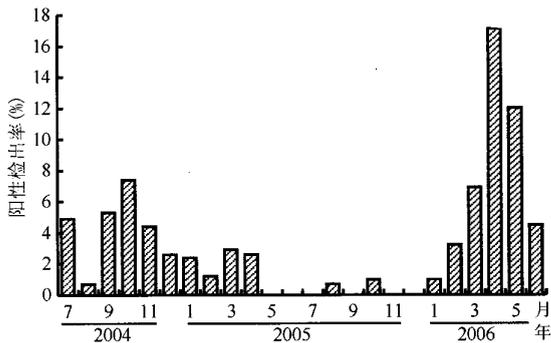


图1 2004 年 7 月至 2006 年 6 月北京地区婴幼儿 hMPV 月阳性检出率的分布

4. hMPV 与其他呼吸道病毒的合并感染:110 例 hMPV 阳性的临床标本中有 6 份标本同时检测到其他呼吸道病毒:其中 1 份标本中同时检测到副流感 3 型病毒;2 份标本中同时检测到 RSV;还有 3 份标本乙型流感病毒也是阳性,提示有 hMPV 与这些病毒的合并感染。

5. hMPV 感染与同期其他呼吸道病毒感染的比较:图 2 分别显示了 2004 年 7 月至 2006 年 6 月期间 hMPV、RSV 每月的阳性检出结果。从图 2 可以看出,RSV 的流行有明显的季节分布,冬春季是其感染高峰,夏季感染率相当低。2004 年 12 月至 2005 年 4 月 RSV 的感染率相当高,这期间 hMPV 的感染持续在较低水平,只在 2004 年 10 月出现了一个小高峰;而 2005 年 11 月至 2006 年 2 月 RSV 出现了更高的感染率,随着 RSV 感染率的下降,2006 年 4 月出现了较前一年明显的 hMPV 感染高峰。

讨 论

hMPV 作为新发现的呼吸道病毒病原在世界范围内迅速得到广泛的研究。各国学者通过不同的方

法都证实了 hMPV 感染的普遍性。荷兰学者用血清学证据显示 hMPV 至少已经在人类中传播了 50 年,荷兰儿童至 5 岁已经基本都感染过了 hMPV^[1]。儿童、老年人和免疫缺陷者都存在较高的 hMPV 感染率,2 岁以下儿童的感染风险最高^[5]。我们先前的研究也证明北京地区的人群中有相当一部分人也曾经感染过 hMPV,2~6 月龄组人群抗体水平最低,以后随着感染的发生抗体阳性率逐渐上升^[6]。

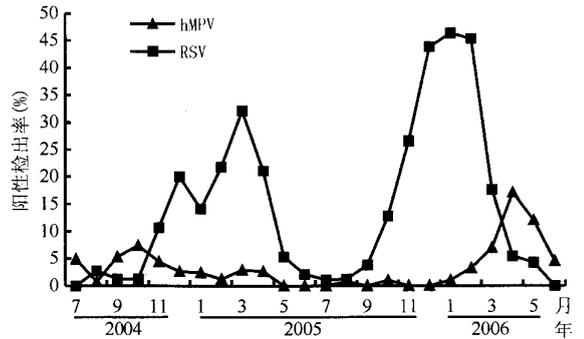


图2 2004 年 7 月至 2006 年 6 月北京地区婴幼儿 hMPV 和 RSV 感染的季节分布

本研究对北京地区婴幼儿中 hMPV 的感染进行了为期 2 年的连续监测。结果显示 hMPV 的流行规律在这两年中不尽相同。2004 年 7 月至 2005 年 6 月 hMPV 持续被检出,没有明显的高峰。但是监测的第二年(2005 年 7 月至 2006 年 6 月期间)却出现了明显的 hMPV 的流行高峰,最高峰出现于 2006 年 4 月(17.1%)。目前多数文献报道温带地区 hMPV 的流行高峰都在冬春季节^[7];本研究提示不同地区、不同年份 hMPV 的流行规律可能会有所不同。在监测期间有 3.3% 的急性呼吸道感染患儿与 hMPV 相关,这一结果与目前为期至少一年的研究报道中 hMPV 在儿童中的感染率(5%~12%)相比稍低^[8],提示 hMPV 的感染也有可能像 RSV 一样每个流行季节的感染强度有一定差异。

本研究中 hMPV 感染患儿的性别比例与文献报道相似;在所有 hMPV 感染患儿中 2 岁以下患儿占 58.2%,2~5 岁之间的患儿占 33.6%,因此 hMPV 在 5 岁以下儿童中的感染值得密切关注。在 hMPV 感染的门诊患儿中 2~5 岁患儿占 69.0%,而在 hMPV 感染的住院患儿中 <2 岁的患儿占 72.8%,提示 hMPV 感染对于 <2 岁的婴幼儿威胁更大。

目前报道的各年龄组人群 hMPV 感染的临床

症状包括轻度上呼吸道感染到严重需住院治疗。本研究中 hMPV 感染患儿中临床诊断为肺炎的占 50% 以上,这与我们先前的研究结果一致;其次是上呼吸道感染,可能是因为本研究的研究对象包括了因急性呼吸道感染就诊的门诊患儿。在连续 2 年监测中,2005 年 7 月至 2006 年 6 月期间有 45.5% 的 hMPV 阳性标本取自门诊患儿。有文献报道 hMPV 与 15% 上呼吸道感染相关^[9]。本文结果也提示 hMPV 是上呼吸道感染的重要病毒病原之一。尽管有研究报道存在高比例的 hMPV 与 RSV 的合并感染^[10,11],但是多数研究显示 hMPV 与其他呼吸道病毒的合并感染率很低^[12]。本研究只发现 6 例合并感染,提示 hMPV 合并其他病毒感染的现象并不常见。

参 考 文 献

[1] Van den Hoogen BG, de Jong JC, Grom J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, 2001, 7: 719-724.
 [2] Peret TG, Boivin G, Li Y, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis*, 2002, 185: 1660-1663.
 [3] 朱汝南, 钱渊, 邓洁, 等. 北京地区 6 岁以下儿童急性呼吸道偏

肺病毒感染. *中华儿科杂志*, 2003, 41: 441-444.
 [4] 朱汝南, 钱渊, 赵林清, 等. 北京地区 2 株人偏肺病毒的 P 和 M 蛋白基因序列分析. *中华微生物与免疫学杂志*, 2005, 25: 5-9.
 [5] Ordas J, Boga JA, Alvarez-Arguelles M, et al. Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(8): 2739-2742.
 [6] 赵林清, 曹守春, 朱汝南, 等. 北京地区人群中人偏肺病毒血清抗体水平的初步调查. *中华儿科杂志*, 2005, 43: 904-907.
 [7] Bovivin G, Abed Y, Pelletier G, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis*, 2002, 186: 1330-1334.
 [8] Esper F, Martinello RA, Boucher D, et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged < 5 years. *J Infect Dis*, 2004, 189(4): 1388-1396.
 [9] Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*, 2004, 350: 443-450.
 [10] Semple MG, Cowell A, Dove W, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. *J Infect Dis*, 2005, 191: 382-386.
 [11] Greensill J, McNamara PS, Dove W, et al. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9: 372-375.
 [12] van Woensel J, Bos AP, Lutter ER, et al. Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection. *Pedia Pulmonol*, 2006, 41: 872-874.

(收稿日期: 2007-03-26)
 (本文编辑: 张林东)

· 会 讯 ·

第九届全军流行病学及第八届全军防生物危害医学专业学术会议通知

根据 2007 年度全军医学科技学术活动计划的安排,由全军流行病学专业委员会和全军防生物危害医学专业委员会共同主办,军事医学科学院微生物流行病学研究所、病原微生物生物安全国家重点实验室承办的第九届全军流行病学及第八届全军防生物危害医学专业学术会议定于 2007 年 9 月 9-12 日在杭州召开。

1. 会议内容: 主题报告: 特邀全军流行病学及防生物危害医学领域专家作专题报告: ① 流行病学研究方面的新理论、新技术、新成果; ② 军队主要传染病流行研究进展; ③ 重要病原体快速检测方法; ④ 防生物危害医学研究的新成果、新进展; ⑤ 防生物危害医学研究的新导向、新技术、新标准。分组交流: 流行病学和防生物危害医学研究的发展近况、前景、对策以及新方法、新技术、新成果等。

2. 会议时间、地点: 会议定于 2007 年 9 月 9-12 日在杭州召开。9 月 9 日报到, 10-12 日开会, 会期 3 天。

3. 会议费用: 请参会人员于 8 月 10 日前交费, 会议注册费 500 元。请注明与会人员姓名, 发票在报到时交参会代表。会议差旅费及住宿费自理。开户名称: 中国人民解放军 62035 部队; 开户银行: 中国农业银行北京丰台支行; 帐号: 060101040008974。

4. 联系方式: 联系人: 韩晓娜 赵晓冬; 地址: 100071 北京市丰台区东大街 20 号五所科技处; 电话: 010-66948668(地), 0201-948668(军); 传真: 010-66948668, 63813974; Email: hanxn929@126.com。

全军流行病学专业委员会
 全军防生物危害医学专业委员会
 军事医学科学院微生物流行病学研究所
 病原微生物生物安全国家重点实验室