

· 实验室研究 ·

乌鲁木齐地区儿童人偏肺病毒感染状况初步研究

孙荷 芝敏 朱汝南 钱渊 赵桂臣 冯萍 杨学磊

【摘要】 目的 了解人偏肺病毒(hMPV)在乌鲁木齐地区儿童呼吸道感染患者中的致病情况。**方法** 选取 2006 年 11 月至 2007 年 4 月因呼吸道感染于新疆维吾尔自治区人民医院儿科住院患儿和部分门诊患儿的呼吸道分泌物及咽拭子标本共 209 份。通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 hMPV 的 M 基因片段。并对阳性标本进行测序,用 BLAST 及 DNASTar 软件进行分析。**结果** 共检出 2 例阳性标本,占总例数 1.0%。将 2 份阳性标本扩增的 hMPV M 基因片段进行对比,同源性为 83.8%。进一步选取 GenBank 中与本次扩增目的基因相同的 hMPV M 基因片段做基因进化树分析,结果提示 2 例标本可能属于不同的 2 种基因型。**结论** hMPV 是乌鲁木齐地区儿童呼吸道感染病原之一,在一个流行季节当地可同时有 2 种不同基因型的 hMPV 流行。

【关键词】 人偏肺病毒;呼吸道感染;儿童

Human metapneumovirus infection in children with acute respiratory tract inflammation in Urumuqi
SUN He*, ZHI Min, ZHU Ru-nan, QIAN Yuan, ZHAO Gui-chen, FENG Ping, YANG Xue-lei. *The Pediatric Research Institute of Xinjiang, Urumuqi 830001, China
Corresponding author: SUN He, Email: sunhe25@hotmail.com

【Abstract】 Objective To understand whether human metapneumovirus (hMPV) is one of the pathogens leading to the children's respiratory infections in Urumqi. **Methods** A total number of 209 samples were collected in the People's General Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region from November 2006 to April 2007 with some from the hospitalized children, while the others from outpatient clinic. Specimens included nasopharyngeal aspirates (NPA) and swabs were analyzed. Samples were all tested hMPV M gene by RT-PCR while the two positive PCR amplicons were sequenced and compared with other hMPV in GenBank by Blast and DNASTar. **Results** Of all the 209 samples, two positive ones were tested. The identities between them were 83.8%. Results from Phylogenetic analysis showed that they might belong to two different clusters. **Conclusion** hMPV was one of the pathogens leading to the children's respiratory tract infections in Urumqi, with two different hMPV groups existed in the same season.

【Key words】 Human metapneumovirus; Respiratory infections; Children

人偏肺病毒(hMPV)是 2001 年由荷兰学者 van den Hoogen 新发现的一种可致人呼吸道感染的副粘病毒。其后世界许多国家学者所进行的研究表明 hMPV 的确是导致人类呼吸道感染(尤其是儿童)的重要病原。我国经证实也存在 hMPV 的流行。为此我们对乌鲁木齐市 2006-2007 年冬春季部分呼吸道感染患儿进行了 hMPV 感染的初步研究。

对象与方法

1. 研究对象:选取 2006 年 11 月至 2007 年 4 月部分于新疆维吾尔自治区人民医院儿科门诊就诊及住院的呼吸道感染患儿共 209 例,其中门诊 49 例,住院 160 例。男 129 例,女 80 例。新生儿 6 例,1 月龄~岁 82 例,1~岁 67 例,3~岁 34 例,>7 岁 20 例。新生儿肺炎 6 例,支气管肺炎 109 例,支气管炎 18 例,喉气管支气管炎 10 例,喘息性支气管炎 14 例,毛细支气管炎 8 例,上呼吸道感染 42 例,发热待查 2 例。

2. 标本来源:门诊患儿均采集咽拭子标本,住院

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆儿科研究所(孙荷、芝敏、杨学磊);首都儿科研究所(朱汝南、钱渊);新疆维吾尔自治区人民医院儿科(赵桂臣、冯萍)

通讯作者:孙荷, Email: sunhe25@hotmail.com

患儿于住院后 48 h 内采集标本,采集咽拭子 138 份,呼吸道分泌物 71 份。全部标本保存于 2 ml 生理盐水中,冻存于 -70°C 冰箱待检测。

3. 直接免疫荧光法检测 7 种呼吸道病毒抗原: 呼吸道分泌物标本被分为 2 份,1 份用直接免疫荧光法检测呼吸道合胞病毒(RSV),腺病毒,副流感病毒 1、2、3 型和流感病毒 A、B 型 7 种常见呼吸道病毒抗原;另 1 份冻存,用于病毒核酸抽提。

4. 病毒核酸抽提: -70°C 冰箱取出标本冻融,吹打均匀后取 75 μl 样本加入 250 μl Triol(Gibco 产品)中,颠倒混匀,静置 5 min。然后加入氯仿 50 μl ,涡旋混匀后静置 5 min,12 000 r/min 离心 15 min。吸取上层水相,加入等体积异丙醇,静置 10 min。12 000 r/min 离心 15 min 后,弃上清,加入 75% 乙醇洗涤,7500 r/min 离心 5 min 后,再次弃上清,吸干后干燥, -20°C 保存。

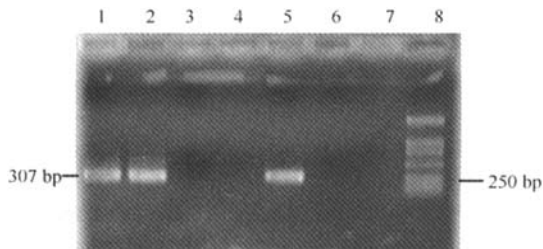
5. 反转录聚合酶链反应(RT-PCR): 实验方案由首都儿科研究所提供。反转录过程: DEPC H_2O_2 1.5 μl ,加随机六聚体引物(上海生工生物工程技术服务有限公司合成)4 μl ,dNTP 2 μl 溶解核酸后, 65°C 温育 5 min,再加入 $5\times$ RT buffer 8 μl ,0.1 mmol/L DTT(上海生工生物工程技术服务有限公司)4 μl ,MMLV(MBI 公司)0.4 μl ,RNA 酶抑制剂(BBI 公司)0.1 μl , 25°C 10 min, 37°C 1 h, 70°C 10 min。反转录合成 cDNA 后 -20°C 冻存。PCR 反应: $10\times$ buffer 2.5 μl ,dNTP 0.5 μl ,引物 h1 和 h2 各 0.5 μl ,模板 4 μl ,Taq 酶 0.3 μl ,加双蒸水至 25 μl 。 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 45 s, 48.4°C 退火 45 s, 72°C 延伸 45 s,共 45 个循环。最后 72°C 延伸 7 min。每次反应设阳性对照 M 基因质粒(由首都儿科研究所馈赠),阴性对照无菌水。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳确定,并经紫外光查看后照相。

6. 测序并分析: 阳性产物送上海生工生物工程技术服务有限公司用单向引物 h1 进行测序,结果用 BLAST 与 GenBank 中基因库已有序列进行比较,确定为 hMPV M 基因片段。并用 DNASTar 的 Megalign 中的 ClustalW 方法分析序列的同源性并绘制系统进化树。

结 果

1. hMPV 检出情况: 209 例患者标本中共检出 hMPV 感染 2 例,检出率约 1%,其中 1 例为维吾尔族患儿,21 月龄,临床诊断支气管肺炎,标本取自 2

月份;另 1 例为汉族患儿,3 岁,临床诊断支气管哮喘合并肺部感染,标本取自 3 月份。RT-PCR 检测 hMPV 电泳结果见图 1。



注: 1: Xinjiang227; 2: Xinjiang346; 3、4、6: 阴性标本; 5: Beijing946 阳性质粒对照; 7: 阴性对照; 8: Marker

图1 RT-PCR 检测 hMPV 结果

2. 其他病毒感染抗原检测情况: 71 例呼吸道分泌物标本中 RSV 阳性 21 例,腺病毒阳性 4 例,副流感 3 型 2 例,副流感 1 型 1 例,未见副流感 2 型与流感 A、B 型。其中混和感染 1 例,为腺病毒与副流感 I 型混合感染,未见与 hMPV 的混和感染。

3. 测序及基因进化树分析结果: 分析结果分别见表 1、图 2 及图 3。Xinjiang227 测序结果为 284 bp,Xinjiang346 为 285 bp。本研究选择他们共有的 264~265 bp 核苷酸和北京及其他国家的标准株及代表株之间进行同源性比对,由表 1 可以看出他们核苷酸之间同源性为 83.8%,而与北京及其他国家的代表株之间的同源性为 81.3%~95.8%。从而证实本研究所得到的确实是 hMPV 片段。系统进化树结果显示,2 株 hMPV 分属两个进化簇。

讨 论

hMPV 自从被发现以来,已被世界各国公认为一种易导致儿童呼吸道感染的病毒。而它的发现者 van den Hoogen 等^[1]认为它能解释约 10.0% 不明病原的呼吸道感染,在 100% 5 岁以下的儿童血清中都发现其抗体,更说明它感染的普遍性。朱汝南等^[2]报道在常见呼吸道病毒检测阴性的标本中 hMPV 的阳性率为 24.1%。上海报道 hMPV 感染率为 13.8%^[3]。都说明在我国也存在 hMPV 的流行。由于 hMPV 感染多发生于冬春季的特点,本研究收集了 2006 年 11 月至 2007 年 4 月的患者标本,结果 hMPV 感染率为 1.0%。乌鲁木齐地区的感染率明显低于国内相关报道^[2,4]。但是本研究结果表明,偏肺病毒也是新疆地区儿童呼吸道感染的病原之一。检出率低可能是由于不同地区,不同年

表1 乌鲁木齐地区 2 株 hMPV 与北京及其他国家 hMPV M 基因核苷酸序列同源性比较 (%)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		88.1	86.2	94.4	98.5	93.3	87.3	99.3	87.3	97.8	97.0	87.3
2			94.4	86.2	87.3	85.1	95.5	87.3	95.5	86.6	86.2	94.8
3				85.8	86.2	84.0	98.1	86.2	98.9	86.2	85.1	98.1
4					94.4	96.6	86.2	95.1	86.2	95.1	94.4	85.4
5						92.5	87.3	99.3	87.3	97.8	97.0	87.3
6							84.3	93.3	84.3	93.3	92.5	83.5
7								87.3	99.3	87.7	86.2	98.5
8									87.3	98.5	97.8	87.3
9										87.3	86.2	99.3
10											96.3	87.3
11												86.1
12												

注:1:NL00-1; 2:NL99-1; 3:Bj1816; 4:Bj1817; 5:CAN00-14; 6:CAN97-83; 7:CAN98-75; 8:CAN99-81; 9:CS038; 10:SO3587-02; 11:Xinjiang227; 12:Xinjiang346

1	GTAGCACTCG	ATGAATATAG	CAAACTGGAA	TTTGACAAAC	TCACAGTCTG	TGAAGTAAAA	ACAGTTTACT	TAACAACCAT	GAAACCATAC			
1	I.....	C.....	T.....	G.....	G.....	C.....	T.....	G.....	G.....			NL00-1
1	G.....	T.....	C.....	T.....	GT.....	A.....	G.....	T.....	C.....			NL99-1
1	T.....	C.....	T.....	A.....	G.....	T.....	G.....	T.....	T.....			Bj1816
1	T.....	C.....	T.....	A.....	G.....	T.....	G.....	T.....	T.....			Bj1817
1	T.....	C.....	T.....	A.....	G.....	T.....	G.....	T.....	T.....			CAN00-14
1	G.....	T.....	C.....	T.....	C.....	GT.....	A.....	G.....	T.....			CAN97-83
1	G.....	T.....	C.....	T.....	C.....	GT.....	A.....	G.....	T.....			CAN98-75
1	G.....	T.....	C.....	T.....	C.....	GT.....	A.....	G.....	T.....			CAN99-81
1	G.....	T.....	C.....	T.....	C.....	GT.....	A.....	G.....	T.....			CS038
1	G.....	T.....	C.....	T.....	C.....	GT.....	A.....	G.....	T.....			SO3587-02
1	G.....	T.....	C.....	T.....	C.....	GT.....	A.....	G.....	T.....			Xinjiang227
1	G.....	T.....	C.....	T.....	C.....	GT.....	A.....	G.....	T.....			Xinjiang346
91	GGGATGGTAT	CAAAATTTGT	GAGCTCAGCC	AAATCAGTTG	GCAAAAAAAC	ACATGATCTA	ATCGCACTAT	GTGATTTTAT	GGATCTAGAA			NL00-1
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			NL99-1
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			Bj1816
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			Bj1817
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			CAN00-14
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			CAN97-83
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			CAN98-75
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			CAN99-81
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			CS038
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			SO3587-02
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			Xinjiang227
91	G.....	A.....	T.....	G.....	G.....	T.....	G.....	C.....	G.....			Xinjiang346
181	AAGAACACAC	CTGTTACAAT	ACCAGCATTC	ATCAAAATCAG	TTTCAATCAA	AGAGAGTGAG	TCAGCTACTG	TTGAAGCTGC	TATAAGCA			NL00-1
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			NL99-1
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			Bj1816
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			Bj1817
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			CAN00-14
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			CAN97-83
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			CAN98-75
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			CAN99-81
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			CS038
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			SO3587-02
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			Xinjiang227
181	A.....	T.....	G.....	A.....	G.....	A.....	C.....	A.....	A.....			Xinjiang346

图2 乌鲁木齐地区 2 株 hMPV M 基因片段测序结果及与北京及其他国家同一基因片段对比

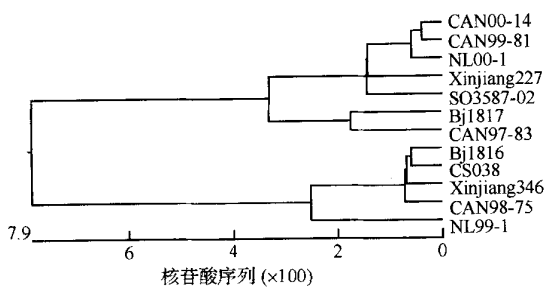
份 hMPV 感染的流行状况不同。在意大利连续 3 年的感染率就有着较大差别,2000-2002 年的感染率分别为 37.0%、7.0%、43.0%,其中 2001 年的感染率明显低于其他 2 年^[5]。而挪威 2002 年 11 月至 2003 年 4 月还出现过 hMPV 的暴发^[6]。此外,检出率的高低还与标本的收集与保存条件、标本的数量、标本是否反复冻融、选择的引物以及 PCR 过程都有着密切的关系。

hMPV 感染多导致婴幼儿的呼吸道感染;具推测 5 岁以下患下呼吸道感染的儿童中,hMPV 的感染率大约为 12.0%,而在上呼吸道感染中占

15.0%^[6]。而本文 2 例患儿年龄也与文献报道相符。所引起的呼吸道感染中以支气管肺炎最为常见,其次为毛细支气管炎。与 RSV 同为引起毛细支气管炎最重要病原,在国内都有相关报道^[7,8]。

现在已经明确存在 2 种基因型的 hMPV,2 种基因型又可被分成 2 种基因亚型,即 1a、1b 和 2a、2b,这从本文所绘制的基因进化树上也可以看出,所扩增出的 2 株阳性产物,可能分属于 2 种不同基因型,其中 Xinjiang227 与加拿大的 CAN99-81 有较高同源性,为 97.8%;而 Xinjiang346 与北京的 CS038 有较高同源性,为 99.3%。本文所选的同型 hMPV

M 基因片段之间的同源性为 92.5%~99.3%,不同型别之间的同源性为 83.5%~88.1%。本文中 2 例阳性标本均来自 2007 年冬春交界季节,说明一个流行季节中可以同时流行 2 种型别的 hMPV。hMPV 各种亚型之间由于不能产生完全而持久的交叉免疫,导致人一生中反复感染此种病毒。来自日本的报道显示^[9],一名 9 月龄的婴儿在 1 个月内先后感染了 2 种型别的 hMPV,也证实了不同型别 hMPV 感染之间所产生的免疫不完全性。



注:基因注册号:1:NL00-1:AF311365; 2:NL99-1:AY525843; 3: Bj1816: AY830146; 4: Bj1817: AY830147; 5: CAN00-14: AY145269; 6: CAN97-83: AY297749; 7: CAN98-75: AY297748; 8:CAN99-81: AY145264; 9: CS038: EF081358; 10: SO3587-02: DQ439511

图3 乌鲁木齐地区 2 株 hMPV 与北京及其他国家的部分 hMPV M 基因系统进化树分析

对于 hMPV 的混和感染,Konig 等^[10]发现有 60.0% hMPV 感染的儿童合并 RSV 感染,而且混合感染的发病年龄越小,病情越严重。国内对混合感染的研究鲜见报道,大都在其他常见呼吸道病毒阴性的标本中进行偏肺病毒的研究。本文病例中 RSV 感染率最高,但并没有发现 RSV 合并 hMPV

感染。hMPV 每年的流行状况可能都存在差别,因此监测 hMPV 的发生就有着极其重要的意义。

参 考 文 献

[1] van den Hoogen BG, De Jong JC, Grorn J, et al. A newly discovered humanpneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med,2001,7(2):219-241.

[2] 朱汝南,钱渊,邓洁,等.北京地区六岁以下儿童急性呼吸道偏肺病毒感染.中华儿科杂志,2003,41(6):441-444.

[3] 曾玫,陆权,钱渊,等.上海地区儿童下呼吸道人类偏肺病毒感染的初步研究.中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(6):544-548.

[4] 陈勇,丁韧,余加席,等.徐州市人偏肺病毒感染临床症状与流行病学研究.中华流行病学杂志,2006,27(9):827.

[5] Fabrizio M,Massimo P, Marialinda V, et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. J Clin Microbiol, 2003,41(7):2987-2991.

[6] Doller H, Risnes K, Radtke A, et al. Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. Pediatr Infect Dis J,2004,23:436-439.

[7] 刘恩梅,王利佳,邓兵,等.重庆地区人类偏肺病毒感染与小儿毛细支气管炎.临床儿科杂志,2004,22(9):607-609.

[8] 陈慧中,钱渊,王天有,等.偏肺病毒毛细支气管炎的临床研究.中华儿科杂志,2004,42(5):383-386.

[9] Takashi E, Rika E, Nobuhisa I, et al. Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. J Clin Microbiol, 2004, 42 (12): 5944-5946.

[10] Konig B, Konig W, Arnold R, et al. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. J Clin Microbiol, 2004, 42(10):4632-4635.

(收稿日期:2007-11-01)

(本文编辑:尹廉)