

· 实验研究 ·

巢式 PCR 诊断儿科患者鼻病毒感染的探讨

赵林清 钱渊 朱汝南 邓洁 王芳

【摘要】 目的 了解儿科急性呼吸道感染的病毒病原,建立快速、敏感、特异的检测鼻病毒(HRV)的方法。方法 根据已发表的 HRV 的核苷酸序列设计巢式 PCR 引物,并用多种呼吸道病毒的标准毒株确定方法的特异性。收集 2002 年 11 月至 2003 年 10 月的急性呼吸道感染患儿标本 771 例,应用巢式 PCR 方法检测标本中有无 HRV 基因片段。结果 特异性检测结果显示仅 HRV cDNA 有预期大小的片段扩增。771 例标本中 HRV 总检出例数为 148 例(148/771),占 19.2%;HRV 阳性检出率在咽炎患儿中达到 53.3% (8/15),喉炎患儿 43.8% (7/16),支气管炎患儿为 28.7% (29/101),其他如急性扁桃体炎、急性肺炎等患儿也有较高的 HRV 阳性检出率。在 2002 年 11 月以及 2003 年 8-10 月 HRV 检测阳性率较高(21.6%~32.6%),尤其在 2003 年 9 月份 HRV 检测阳性率最高,达到 32.6%;2003 年 3-7 月 HRV 阳性标本所占百分率较平稳,在 16.0%~19.1% 之间。结论 建立的巢式 RT-PCR 可以检测到儿科呼吸道感染患儿标本中的鼻病毒基因片段;HRV 是北京婴幼儿急性呼吸道感染的重要病毒病原之一。

【关键词】 鼻病毒;巢式逆转录聚合酶链反应

Human rhinovirus detection from infants and young children with acute respiratory infections by nested-polymerase chain reaction ZHAO Lin-qing, QIAN Yuan, ZHU Ru-nan, DENG Jie, WANG Fang. 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 develop a rapid, sensitive and specific method for detection human rhinovirus(HRV) from clinical specimens. **Methods** Primers derived from the highly conserved 5' noncoding region of human rhinovirus were used to develop a nested RT-PCR for detecting HRV. The sensitivity and specificity of the RT-PCR were determined using various RNA while DNA viruses were used as control. Seven hundred and seventy-one specimens collected from children with symptoms of acute respiratory infections from Nov. 2002 to Oct. 2003 were analyzed for HRV by RT-PCR as well as for other respiratory viruses through isolation of virus and indirect immunofluorescent assay. **Results** Only the cDNA from HRV was positive by RT-PCR, indicating the nested RT-PCR was specific. With RT-PCR, HRV were detected in 148 out of 771 specimens(19.2%). As for HRV positive rates, it was found 53.3% in pharyngitis patients; 43.8% in laryngitis patients and 28.7% in bronchitis patients. In Sep. 2002 and from Aug. 2003 to Oct. 2003, HRV positive rates were high(21.6%-32.6%), with Sep. 2003 in particular — 32.6%. From Mar. 2003 to Jul. 2003, HRV positive rates maintained from 16.0% to 19.1%. **Conclusion** HRV was one of the important agents for acute respiratory infections in infants and young children in Beijing.

【Key words】 Human rhinovirus; Nested reverse transcription polymerase chain reaction

鼻病毒(human rhinovirus, HRV)是成人和儿童呼吸道感染的最主要病原,并且是诱发哮喘的主要

病毒病原之一。目前在我国对儿童呼吸道感染的病毒病原学检测主要集中于呼吸道合胞病毒(RSV)、流感病毒(Inf)、副流感病毒(PIV)、腺病毒(ADV)等 4 种病毒,至今尚未见对 HRV 感染的研究报道,这势必会低估病毒在儿童呼吸道感染病原中作用,也可能成为我国儿科医师对呼吸道感染患儿治疗中抗生素过度应用的原因之一^[1]。为了解 HRV 在儿科急性呼吸道感染中的作用,我们设计了针对 HRV

基金项目:北京人类疾病基因诊断基础性研究实验室科研资助项目(JS96004);北京市优秀人才培养专项经费个人资助项目(20042D0300935);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

通讯作者:钱渊, Email: yqianbjc@263.net

基因序列保守区的巢式 PCR 引物,以期建立快速、敏感、特异的检测 HRV 的方法,并探讨该方法在病毒病原学诊断中的应用。

材料与方 法

1. 标准毒株来源:HRV14 型(HRV14)标准株 1059 株来自美国疾病预防控制中心,由首都儿科研究所张霆研究员赠送;肠道病毒(EV)柯萨奇 B3 Nancy 株、ADV 3 型 GB 株由崔小岱副研究员赠送;RSV A 亚型原型株 Long 株由中国疾病预防控制中心病毒病研究所赠送;B 亚型原型株 CH18537 株由美国国立卫生院(NIH)Collins 教授惠赠;A1 型及 A3 型流感病毒分离株由病毒室分离鉴定;肺炎支原体(MP)由细菌室孙红妹副研究员赠送。

2. 临床标本收集和处理:收集 2002 年 11 月至 2003 年 10 月来首都儿科研究所附属医院门诊就诊或住院的急性呼吸道感染患儿标本 771 例,其中咽拭子 282 例,取自门诊患儿;鼻咽分泌物标本 489 例,取自住院患儿。所有的标本均经常规处理后离心,上清用于 RNA 提取。

3. 引物设计:参照文献[2]在 HRV14 5' 端非编码区(5'-NCR)保守区基因序列设计巢式 PCR 引物,包括外侧引物 Rh1:5'-CCC CTG AAT G(CT)G GCT AAC-3',Rh2:5'-CGG ACA CCC AAA GTA GT(CT)GGT-3',预期扩增产物长度 106 bp;内侧引物 Rh3:5'-GAA TG(CT)GGC TAA CCT TAA (AC)CC-3',Rh4:5'-CAA AGT AGT (CT)GG TCC C(AG)T CC-3',预期扩增产物长度 93 bp。引物由赛百盛基因技术有限公司合成。

4. 病毒 RNA、DNA 提取:使用 Trizol (Invitrogen 公司产品)试剂盒提取标准毒株和标本中的 RNA、DNA,操作按照说明书进行。

5. cDNA 合成及巢式 PCR 扩增:以 RNA 为模板,应用随机引物进行逆转录反应合成 cDNA,然后进行巢式 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94℃ 20 s,60℃ 30 s,72℃ 9 s,扩增 50 个循环。预期扩增片段长度为 106 bp。取第一次 PCR 反应产物 5 μl 作为反应模板,进行第二次 PCR 扩增,引物为 Rh3、Rh4,反应条件为:94℃ 10 min,94℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 8 s,扩增 45 个循环,预期扩增片段长度为 93 bp。以 HRV14 标准毒株 cDNA 为阳性对照,无菌水为阴性对照。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳。

6. 巢式 PCR 方法特异性检测:以 ADV、MP 标准株 DNA 以及 RSV、Inf、EV 标准株或分离株的 cDNA 产物作为反应模板,应用 HRV 巢式 PCR 引物进行巢式 PCR 扩增,以检测方法的特异性。

结 果

1. 巢式 PCR 方法特异性检测:以 ADV、MP 标准株的 DNA 以及 RSV、EV 标准株、Inf 分离株的 cDNA 产物作为反应模板,应用 HRV 巢式 PCR 引物进行 PCR 扩增。结果显示仅 HRV14 cDNA 有特异性扩增片段,其他标准株 DNA 或 cDNA 均无预期的扩增产物。表明所用的检测 HRV 目的基因片段的巢式 PCR 方法与其他常见呼吸道病毒无交叉反应性。

2. 临床标本中的 HRV 检测结果:对 2002 年 11 月至 2003 年 10 月的 771 例临床标本进行了 HRV 检测,取自门诊患儿的 282 例标本中有 49 例检测到 HRV,检测阳性率 17.4% (49/282);取自住院患儿的 489 例标本中有 99 例检测到 HRV,检测阳性率 20.2% (99/489)。HRV 总检出例数为 148 例,总阳性率为 19.2% (148/771)。

3. HRV 感染与临床症状之间的关系:771 例临床标本中有 76 例标本取自发热患儿,9 例 HRV 检测阳性(11.9%,9/76);198 例急性上呼吸道感染患儿中 50 例 HRV 检测阳性(25.3%,50/198),其中明确诊断为咽炎的 15 例患儿中 8 例 HRV 检测阳性(53.3%,8/15),16 例明确诊断为喉炎的患儿中 7 例 HRV 检测阳性(43.8%,7/16),4 例明确诊断为扁桃腺炎的患儿中 1 例 HRV 阳性(25.0%,1/4);101 例支气管炎患儿中 29 例 HRV 检测阳性(28.7%,29/101);279 例肺炎患儿中 53 例 HRV 检测阳性(19.0%,53/279);35 例支气管哮喘患儿中 4 例 HRV 检测阳性(11.4%,4/35);71 例其他患儿中(临床诊断为喉梗阻或抽搐待查等)3 例 HRV 检测阳性(4.2%,3/71)。

4. HRV 感染的季节性分布:对所收集的 2002 年 11 月至 2003 年 10 月的临床标本以及 HRV 检出阳性率按月份进行统计。2002 年 11 月、2003 年 8、9、10 月份的 HRV 检测阳性标本所占比例较高,分别为 25.0%、29.9%、32.6%、21.6%,尤以 2003 年 9 月份为最高。2003 年 3-7 月 HRV 检测阳性标本所占百分率较平稳,维持在 16.0%~19.1% 之间(图 1)。

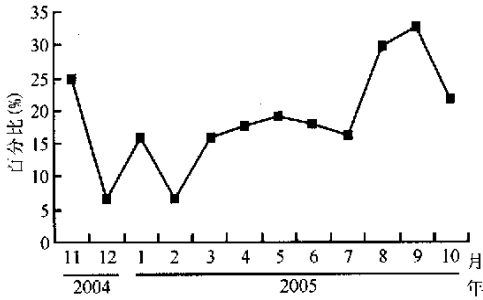


图1 北京地区 2002 - 2003 年 HRV 感染的季节性分布

讨 论

HRV 属小核糖核酸病毒。HRV 感染在世界各地都很普遍,尤其是儿童更易受到 HRV 感染。HRV 感染是普通感冒最常见的病因,可影响到整个的呼吸道,通过引起呼吸道黏膜的改变进而导致鼻窦炎、中耳炎或者是加重哮喘发作^[3]。病毒分离加上耐酸性试验是最经典的检测 HRV 的方法,但 HRV 不稳定,不易分离;由于 HRV 存在 100 多个血清型,免疫学实验的鉴定方法非常复杂而几乎不可行。因此近年来国外开展的通过一个反应检测到几乎所有型别的 HRV 的 RT-PCR 有可能在不久的将来取代病毒分离而成为一种常规的检测 HRV 的方法^[4]。

本研究中考虑到 HRV 血清型别多(100 多个),型别间变异大,型别间保守的区域 5' 端非编码区(5'-NCR)又与 EV 存在很高同源性等一系列特征,我们参考国外文献 HRV 5'-NCR 保守区基因序列设计巢式 PCR 引物,以多种病毒(包括 HRV)的 DNA 或 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,仅在以 HRV 的 cDNA 为模板的反应中得到预期大小的目的基因片段,证明方法特异性好,与其他病毒间无交叉反应。在此基础上,将 RT-PCR 方法应用到临床标本的检测中,保证了方法的可靠性。

所检测的 771 例标本,HRV 检测阳性率在咽炎患儿中达到 53.3%,喉炎患儿为 43.8%,支气管炎患儿中为 28.7%,其他如急性扁桃体炎、支气管炎等患儿中也有较高的 HRV 检测阳性率。HRV 总阳性率为 19.2% (148/771)。由以上结果可推断:①本研究中 HRV 的总检测阳性率并不像通常报道的那么高,分析其中原因可能我们的研究对象仅限于来医院就诊的患者,而社区医院的发展以及人们到就近的药房购药即可治愈通常由 HRV 感染引起的普通

感冒以及症状较轻的急性上呼吸道感染而减少了来医院就诊的几率,进而影响到本研究中 HRV 的阳性检出率。如果要开展 HRV 感染流行病学调查时需考虑到社区及医院两方面,才能使资料更客观的反映 HRV 感染状况。②本研究中不仅在上呼吸道感染中 HRV 有较高的阳性检出率,在下呼吸道感染(如支气管炎、支气管肺炎等)中 HRV 阳性检出率也较高。这与文献报道的 HRV 感染除了引起上呼吸道感染性疾病以外,也会感染下呼吸道而引起肺炎、儿童喘息、哮喘加重以及成人的慢性阻塞性肺炎等下呼吸道感染症状的结论相一致^[5,6]。

文献报道,在世界范围内 HRV 感染存在于各年龄组并全年均可发生,但在温带地区 HRV 感染流行高峰主要集中于早春及秋天,这种季节性分布的可能原因是一些诸如学校开学、室内人群密集等季节性的变化^[7]。本研究中我们对 HRV 感染进行了季节性分布的分析,发现在 2002 年 11 月以及 2003 年 8 - 10 月 HRV 检测阳性百分率较高(21.6% ~ 32.6%),尤其是 2003 年 9 月份 HRV 检测阳性百分率最高,达到 32.6%;在 2003 年 3 - 7 月 HRV 检测阳性标本所占百分率较平稳,维持在 16.0% ~ 19.1% 之间。本研究中 HRV 的季节性分布总体趋势与国外文献报道相似,但不同月份之间的变化略区别于国外文献报道。因目前仅有一个年度的资料,应继续积累资料以了解 HRV 感染的季节性分布。

参 考 文 献

- 董永绥,方峰. 在诊治小儿病毒性疾病中亟待解决的问题. 中华儿科杂志, 2002, 40: 387-390.
- Steininger C, Aberie SW, Popow-Kraupp T. Early detection of acute rhinovirus infection by a rapid reverse transcription-PCR assay. J Clin Microbol, 2001, 39: 129-133.
- Turner RB. Epidemiology, pathogenesis and treatment of the common cold. Ann Allergy Asthma Immunol, 1997, 78: 531-539.
- Hyypia T, Puhakka T, Ruuskanen O, et al. Molecular diagnosis of human rhinovirus infection; comparison with virus isolation. J Clin Microbol, 1998, 36: 2081-2083.
- Monto AS. The seasonality of rhinovirus infections and its implicaton for clinical recognition. Clinical Therapeutics, 2002, 24: 1987-1997.
- Savolainen C, Blomqvist S, Hovi T. Human rhinoviruses. Pediatric Respiratory Reviews, 2003, 4: 91-98.
- Monta AS. Occurrence of respiratory virus: time, place and person. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23: s58-s64.

(收稿日期: 2005-04-28)

(本文编辑: 孙强正)