

上海地区人偏肺病毒致儿童急性下呼吸道感染 的分子流行病学研究

沈军 朱启榕 曾玫 俞蕙 王晓红

【摘要】 目的 建立可靠的 TaqMan-MGB 实时荧光 RT-PCR 方法,检测临床样本中人偏肺病毒(hMPV)N 基因,以了解 2006 年 10 月至 2008 年 2 月期间上海地区 hMPV 致儿童急性下呼吸道感染(ALRTI)的临床与分子流行病学特点。方法 为了明确 hMPV 在儿童 ALRTI 中的地位,用直接免疫荧光方法检测呼吸道合胞病毒(RSV),腺病毒,A、B 型流感病毒,1、2 和 3 型副流感病毒 7 种儿童常见呼吸道病毒抗原,结合肺炎支原体、沙眼衣原体荧光定量 PCR 检测结果及细菌学培养结果进行分析。结果 2006 年 10 月至 2008 年 2 月上海地区 ALRTI 儿童鼻咽分泌物中 hMPV 的检出率为 3.86%(24/622),2006—2007 年冬季和 2007—2008 年冬季检出率分别为 6.60%(14/212)和 1.11%(2/180);hMPV 致儿童 ALRTI 以 <5 岁儿童多见。该期间上海地区 hMPV 仅见 A2 亚型株流行。呼吸道病毒是上海地区儿童 ALRTI 主要病原,在儿童 ALRTI 中 hMPV 感染可能仅次于 RSV,是常见的呼吸道病毒。结论 hMPV 是上海地区儿童 ALRTI 的重要病原体。

【关键词】 人偏肺病毒;急性下呼吸道感染;儿童;病原学

Molecular epidemiology of human metapneumovirus in children with acute lower respiratory tract infections in Shanghai SHEN Jun, ZHU Qi-rong, ZENG Mei, YU Hui, WANG Xiao-hong. Infectious Disease Department, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China
Corresponding author: SHEN Jun, Email: echoshen11@yahoo.com.cn
This work was supported by a grant from the Shanghai Key Discipline of Public Health Project (No. 08GWZX0102)

【Abstract】 Objective To understand the clinical and molecular epidemiologic features of human metapneumovirus (hMPV) in children with acute lower respiratory tract infection (ALRTI) from Oct. 2006 to Feb. 2008 in Shanghai. Methods We established a reliable and stable diagnostic method of TaqMan-MGB real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect hMPV in the clinically manifested respiratory samples. To understand the role of hMPV in children's ALRTI, we tested other seven common respiratory viruses, using direct immunofluorescence assays (DFA). Results Data was analysed on the rates of detection among patients with respiratory bacteria, mycoplasma pneumonia and chlamydia among the targeted samples and enrolled patients to display the spectrum of respiratory pathogens and the changing pattern of pathogens with time. Of 622 samples, hMPV was detected to be positive in 24 (3.86%) samples. However, the prevalence of hMPV in the winter season of 2006 to 2007 was higher than that in the winter season of 2007 to 2008. The majority of children infected with hMPV were younger than 5 years old. Data from phylogenetic tree analysis further demonstrated A2 genotype hMPV circulating during the study period. Conclusion Respiratory viruses were important respiratory pathogens among children with ALRTI and respiratory syncytial virus. They were the two most common virus which might be followed by hMPV that causing the diseases. We confirmed that hMPV as an important pathogen of ALRTI in the children from Shanghai.

【Key words】 Human metapneumovirus; Acute lower respiratory tract infection; Children; Etiology

人偏肺病毒(hMPV)感染在世界各地均有报道,并认为该病毒可能与 5%~10% 病因不明的儿童

急性下呼吸道感染(ALRTI)有关^[1-3]。国内 hMPV 在儿童中的流行病学资料尚不完整, hMPV 在儿童 ALRTI 病原谱中的地位及流行株的分子生物学特征鲜见报道。根据国外的资料, hMPV 可能有隔年流行的趋势,且似乎与呼吸道合胞病毒(RSV)的流行强度相互更替,在儿童 ALRTI 病毒谱中的比例不断

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.04.020

基金项目:上海市公共卫生重点学科建设项目(08GWZX0102)

作者单位:201102 上海,复旦大学儿科医院感染科

通信作者:沈军, Email: echoshen11@yahoo.com.cn

变化^[6-8],而国内是否有相同的现象尚未可知。在儿童 ALRTI 中,病毒与细菌混合性感染可能导致重症感染的发生,hMPV 是否易与其他病原体混合感染儿童,尚未有明确的答案^[2,7]。不同的年份和地区,可以有不同的基因型和亚基因型 hMPV 的流行株同时或主导流行,重庆地区报道仅有 A2 亚型的流行^[9];上海地区报道存在 2 种基因型的 hMPV 流行,但未有明确分型比较^[10]。本研究通过对上海地区 ALRTI 住院儿童深部鼻咽分泌物(NPS)中 hMPV 的检测与分析,探讨 hMPV 在儿童 ALRTI 中的临床与分子流行病学特点。

材料与方法

1. 研究对象:收集 2006 年 10 月至 2008 年 2 月复旦大学儿科医院确诊的 1347 例 ALRTI 患儿(男 854 例、女 493 例,年龄均 <15 周岁),其中临床诊断急性喉-支气管炎 7 例,喘息性支气管炎 55 例,急性支气管炎 122 例,毛细支气管炎 7 例和肺炎 1156 例(含重症肺炎 44 例)。患儿在住院 48 h 内采集 NPS 标本。随机挑选(每周二、四采集)622 例(男 385 例、女 237 例)患儿的 NPS 标本检测 hMPV 基因,其中诊断急性喉-支气管炎 3 例、喘息性支气管炎 25 例、急性支气管炎 56 例、毛细支气管炎 3 例和肺炎 535 例(含重症肺炎 22 例)。临床疾病诊断标准均依据诸福棠主编的《实用儿科学》第七版。

2. hMPV 检测:病毒 RNA 抽提与反转录操作按参考文献[10]方法。TaqMan-MGB 实时荧光 RT-PCR 上游引物为 5'-CAT CAG GTA ATA TCC CAC AAA ATC AG-3';下游引物为 5'-GTG AAT ATT AAG GCA CCT ACA CAT AAT AA-3';探针为 FAM-5'-TCA GCA CCA GAC ACA C-NFQMGB-3'。荧光 PCR 扩增条件:94 ℃ 加热 3 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 45 个循环;其目标片段长度为 163 bp。传统 RT-PCR 的上游引物为 5'-AAC CGT GTA CTA AGT GAT GCA CTC-3',下游引物为 5'-CAT TGT TTG ACC GGC CCC ATA A-3'。传统 RT-PCR 反应条件:94 ℃ 加热 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 45 个循环;最后 72 ℃ 7 min 结束反应;其目标片段长度为 213 bp。荧光 RT-PCR 与传统 RT-PCR 的引物与探针设计均按参考文献[11]方法。

3. hMPV N 基因序列分析:基因序列分析用 BLAST 和 DNAMAN 软件对 hMPV 核苷酸序列作比较,并绘制基因进化树。

4. 常见呼吸道病毒和其他病原体检测:用直接免疫荧光法检测 1347 份 NPS 中的呼吸道合胞病毒(RSV),腺病毒(ADV),A、B 型流感病毒(IFV),1、2 和 3 型副流感病毒(PIV)抗原;并调查同期标本中肺炎支原体、沙眼衣原体荧光 PCR 检测及细菌学培养结果。

结 果

1. hMPV 检出情况:622 份 NPS 标本中采用 TaqMan-MGB 实时荧光 RT-PCR 共检测出 hMPV 阳性标本 24 份,检出率为 3.86%;其中 3 月龄以下儿童检出率为 0.94%(2/213),3 月龄 ~ <6 月龄儿童检出率为 3.95%(3/76),6 月龄 ~ <1 岁儿童检出率为 2.73%(3/110),1 ~ <2 岁儿童检出率为 9.52%(6/63),2 ~ <5 岁儿童检出率为 6.98%(9/129),≥5 岁儿童检出率为 3.23%(1/31)。其中 <2 岁儿童占 58.33%(14/24),<5 岁儿童占 95.83%(23/24)。hMPV 致 ALRTI 绝大多数在 11 月到次年 1 月之间(21/24)。2006—2007 年冬季 hMPV 检出率为 6.60%(14/212),2007—2008 年冬季 hMPV 检出率为 1.11%(2/180)。323 例男性患儿中检出 hMPV 阳性 10 例(3.10%),237 例女性患儿中检出 hMPV 阳性 14 例(5.91%),两性儿童检出率差异无统计学意义($\chi^2=2.63, P>0.05$)。

2. hMPV N 基因进化树分析:24 份实时荧光 RT-PCR hMPV 阳性标本,传统 RT-PCR 方法检测到阳性标本 16 份(均为荧光信号较强、C_t值小的标本),随机选其中 7 份产物(SH07-1130, SH07-1207, SH07-1244, SH08-24, SH08-185, SH08-1435, SH08-1635)测序,与基因文库中已知 hMPV N 序列分析比对后证实为目标产物。图 1 为 hMPV 实时荧光 RT-PCR 结果;图 2 为 hMPV 传统 RT-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果。DNAMAN 软件绘制基因进化树提示,7 株均为 A2 亚型株(图 3)。

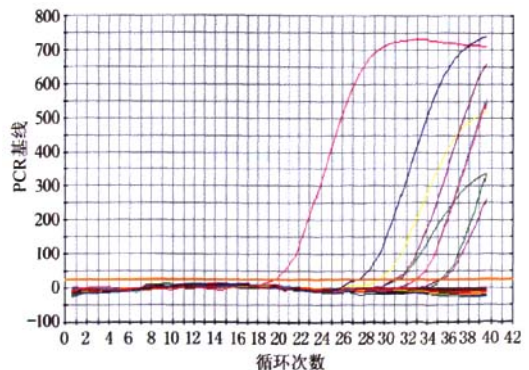
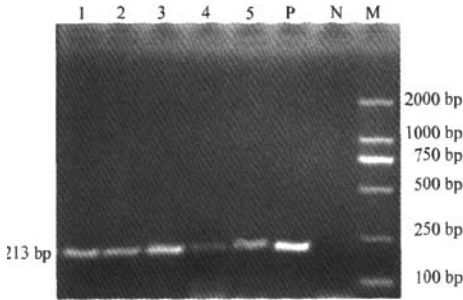
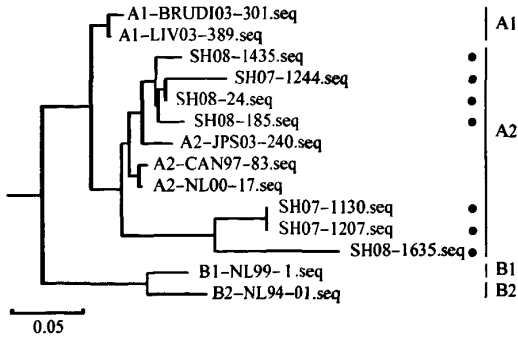


图 1 hMPV 实时荧光 RT-PCR



注: M: Marker; P: 阳性对照; N: 阴性对照, 1-5 为阳性结果

图2 传统 RT-PCR 产物电泳图



注: ● 为 7 株送检并测序及分析标本

图3 7 株 hMPV 基因进化树

3. 其他病原体检出情况: 1347 份标本中 7 种常见病毒检出率为 33.56% (452/1347); 其中 RSV 检出率为 28.36% (382/1347)。2006—2007 年冬季 RSV 检出率 31.16% (124/398), 2007—2008 年冬季 RSV 检出率 38.59% (120/311)。PIV、ADV 和 IFV 的检出率分别为 2.82%、1.86% 和 1.19%。细菌检出率为 24.64% (329/1335)。肺炎支原体和衣原体检出率分别为 7.85% (103/1312) 和 2.97% (39/1312)。1347 份标本总病原学检出率为 55.23% (744/1347), 其中混合感染率为 15.59% (210/1347), 2 份标本 hMPV 与 RSV 同时阳性, 9 份标本存在 3 种病原体同时感染; 有 44.77% 的临床标本病原未明。

讨论

ALRTI 是儿科的最主要疾病之一。hMPV 是近年来新发现的一种人呼吸道病毒, 已有的研究证实 hMPV 是一种常见且广泛流行的呼吸道病毒, 临床表现与 RSV 相似。国内报道在我国 6 岁儿童中几乎均已感染过 hMPV^[12]。因此, 明确上海地区 hMPV 在 ALRTI 中的临床与分子流行病学特点, 有重要意义。

本研究 hMPV 的检出率为 3.86%, 与国外大多

数资料中的检出率 (3%~5%) 一致。本研究发现, hMPV 是检出率仅次于 RSV 的呼吸道病毒, 由于两者的检测方法不同, 敏感度不同, 且检测总的样本基数不同, 虽然 hMPV 的检出率远低于 RSV, 又明显高于其他呼吸道病毒, 故结果提示, 在上海地区 hMPV 感染可能确实仅次于 RSV, 是致儿童 ALRTI 最常见的呼吸道病毒。本研究包含了两个连续流行季节, 在整个儿童 ALRTI 病原谱中, hMPV 并非一种突出的病原体, 在流行季节和流行年份中, 均有较高的检出率。

呼吸道病毒在人群中的循环和流行, 可能存在着一定的相互竞争。在本研究中, 2006—2007 年冬季 hMPV 检出率为 6.60% (14/212), 2007—2008 年冬季 hMPV 检出率为 1.11% (2/180); 同期 (2006—2007 年冬季和 2007—2008 年冬季) RSV 检出率分别为 31.16% (124/398) 和 38.59% (120/311)。hMPV 在本地区儿童中, 是否如 RSV 的流行强度呈现周期性波动^[13,14], 并表现出国外所报道的有隔年流行的趋势^[6-8,13], 还有待长期监测。

622 份标本中仅有 2 份标本 hMPV 与 RSV 同时阳性, 提示 hMPV 与 RSV 或其他病原体的混合感染并不多见。受本研究中的 hMPV 阳性标本量、特定目标人群及特定时段等因素的限制, hMPV 与其他呼吸道病原体的混合感染情况, 还需要更多的流行病学资料证实。

hMPV 共有 4 个亚基因型 (A1、A2、B1、B2)。根据文献, 针对保守的 N 基因设计引物的实时荧光 RT-PCR 敏感度最佳^[15]。本研究中, 7 株测序 hMPV 在基因进化树中均聚类为 A2 亚型, 与重庆地区的报道恰巧一致^[9], 似乎提示 2004 年 12 月至 2005 年 7 月重庆地区和 2006 年 10 月至 2008 年 2 月上海地区均仅有 A2 亚型株 hMPV 流行。但由于检测标本量少 (分别为 6 株与 7 株)、引物设计等使得 A2 亚型株更易检测到, 或 A2 亚型株感染人体后病毒载量最高而更易检测等因素, 均有可能导致错误的判断。2003 年 9 月至 2005 年 8 月期间, A2 亚型株在我国台湾为绝对优势流行株^[5]。推测重庆和上海地区也是以 A2 亚型株为优势流行株。

参考文献

[1] Bonroy C, Vankeerberghen A, Boel A, et al. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian paediatric hospital. Clin Microbiol Infect. 2007, 13:504-509.

[2] Hamano-Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, et al. Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother*, 2008, 14:424-432.

[3] Oliveira DB, Durigon EL, Carvalho AC, et al. Epidemiology and genetic variability of human metapneumovirus during a 4-year-long study in Southeastern Brazil. *J Med Virol*, 2009, 81: 915-921.

[4] Fabbiani M, Terrosi C, Martorelli B, et al. Epidemiological and clinical study of viral respiratory tract infections in children from Italy. *J Med Virol*, 2009, 81: 750-756.

[5] Wang HC, Huang SW, Wang SW, et al. Co-circulating genetically divergent A2 human metapneumovirus strains among children in southern Taiwan. *Arch Virol*, 2008, 53:2207-2213.

[6] Rafiefard F, Yun Z, Orvell C. Epidemiologic characteristics and seasonal distribution of human metapneumovirus infections in five epidemic seasons in Stockholm, Sweden, 2002-2006. *J Med Virol*, 2008, 80: 1631-1638.

[7] Cilla G, Onate E, Perez-Yarza EG, et al. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: high rate of viral co-infection. *J Med Virol*, 2008, 80: 1843-1849.

[8] Aberle SW, Aberle JH, Sandhofer MJ, et al. Biennial spring activity of human metapneumovirus in Austria. *Pediatr Infect Dis J*, 2008, 27: 1065-1068.

[9] Mao HW, Yang XQ, Zhao XD. Characterization of human metapneumoviruses isolated in Chongqing, China. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121: 2254-2257.

[10] Zeng M, Lu Q, Qian Y, et al. Human metapneumovirus infection in children with lower respiratory tract infections in Shanghai. *Chin J Microbiol Immunol*, 2006, 26: 544-548. (in Chinese)

曾玫, 陆权, 钱渊, 等. 上海地区儿童下呼吸道感染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: 544-548.

[11] Lu RJ, Zhang LL, Tan WJ, et al. Development and application of real-time RT-PCR assay for detection of human metapneumovirus in Beijing. *Letters Biotechnol*, 2008, 19: 207-209. (in Chinese) 陆柔剑, 张陵林, 谭文杰, 等. 人偏肺病毒 TaqMan-MGB 探针实时定量 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用. *生物技术通讯*, 2008, 19: 207-209.

[12] Zhang Q, Yang XQ, Zhao Y, et al. Survey of seroprevalence of human metapneumovirus infection in children of Chongqing area. *Chin J Pract Pediatr*, 2007, 22: 579-582. (in Chinese) 张琴, 杨锡强, 赵耀, 等. 重庆地区 0-6 岁儿童人类偏肺病毒感染状况调查. *中国实用儿科杂志*, 2007, 22: 579-582.

[13] Heininger U, Kruker AT, Bonhoeffer J, et al. Human metapneumovirus infections-biannual epidemics and clinical findings in children in the region of Basel, Switzerland. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(12): 1455-1460.

[14] Deng J, Qian Y, Zhu RN, et al. Surveillance for respiratory syncytial virus subtypes A and B in children with acute respiratory infections in Beijing during 2000 to 2006 seasons. *Chin J Pediatr*, 2006, 44: 924-927. (in Chinese) 邓洁, 钱渊, 朱汝南, 等. 2000 年冬-2006 年春北京地区急性呼吸道感染患儿中呼吸道合胞病毒的监测. *中华儿科杂志*, 2006, 44: 924-927.

[15] Cote S, Abed Y, Boivin G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 3631-3635.

(收稿日期: 2009-09-28)
(本文编辑: 张林东)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会成员名单

顾问 魏承毓 吴系科 施侶元 俞顺章
 名誉总编辑 郑锡文
 总编辑 李立明
 副总编辑 乌正赉 曲成毅 王滨有 姜庆五 何耀 詹思延
 编辑委员 按姓氏拼音排列

毕振强(山东)	曹广文(上海)	曹务春(北京)	陈坤(浙江)	陈维清(广东)	董柏青(广西)
段广才(河南)	龚向东(江苏)	顾东风(北京)	何耀(北京)	贺雄(北京)	胡永华(北京)
姜庆五(上海)	闾飙(北京)	李辉(北京)	李敬云(北京)	李立明(北京)	梁万年(北京)
刘殿武(河北)	刘民(北京)	刘天锡(宁夏)	陆林(云南)	栾荣生(四川)	吕繁(北京)
马文军(广东)	毛宗福(湖北)	孟蕾(甘肃)	米杰(北京)	潘凯枫(北京)	潘先海(海南)
乔友林(北京)	曲成毅(山西)	瞿世和(新疆)	沈洪兵(江苏)	时景璞(辽宁)	孙瑞华(北京)
谭红专(湖南)	唐耀武(北京)	汪华(江苏)	汪宁(北京)	王滨有(黑龙江)	王建华(天津)
王克安(北京)	王鸣(广东)	王声湧(广东)	王擢秀(天津)	吴凡(上海)	吴先萍(四川)
吴尊友(北京)	武阳丰(北京)	乌正赉(北京)	项永兵(上海)	肖东楼(北京)	徐飏(上海)
许汴利(河南)	闫永平(陕西)	严延生(福建)	杨维中(北京)	叶冬青(安徽)	于普林(北京)
于雅琴(吉林)	曾光(北京)	詹思延(北京)	张国刚(湖南)	张建中(北京)	张孔来(北京)
张顺祥(广东)	赵冬(北京)	赵仲堂(山东)	庄辉(北京)		

秘书 王岚(北京)