

# 杭州地区2011—2013年儿童呼吸道感染人偏肺病毒分子流行病学研究

寇宇 潘劲草 于新芬 李钧 杨旭辉 文艳苹 周银燕 濮小英 孙昼 谢立

**【摘要】** 目的 了解杭州地区儿童人偏肺病毒(hMPV)的分子流行病学特点。方法 收集2011年1月至2013年12月杭州市2所哨点医院儿科呼吸道门诊和住院病例2 593例,门诊病例采集咽拭子1 676份,住院病例采集气管吸取物917份。用实时荧光定量PCR方法检测hMPV核酸,阳性样本用RT-PCR方法对hMPV融合蛋白(F)部分基因片段扩增和序列测定。所测基因序列与GenBank代表株核苷酸同源性比较,并构建基因进化树。结果采用描述性统计和样本率的 $\chi^2$ 检验。**结果** 杭州地区呼吸道患儿hMPV检出率为6.51%(169/2 593)。门诊检出率为6.62%(111/1 676),住院检出率为6.32%(58/917),检出率差异无统计学意义( $\chi^2=0.086, P=0.769$ )。2岁和3岁组检出率最高,分别为14.14%(28/198)、14.01%(22/158),与其他组比较差异有统计学意义( $\chi^2=38.654, P=0.000$ )。冬春季检出高于夏秋季( $\chi^2=67.032, P=0.000$ )。测序的88株阳性基因序列与GenBank参考株核苷酸序列同源性为81.6%~100.0%,基因进化树分析显示分属于2个基因型的4个亚型。2011—2012年B1亚型占优势,2012年底至2013年A2型为流行。<1岁组A基因型(67.56%, 25/37)与 $\geq 1$ 岁组(43.13%, 22/51)检出率差异有统计学意义( $\chi^2=5.143, P=0.023$ )。**结论** 杭州地区儿童呼吸道感染hMPV存在4种基因型,<1岁组A基因型感染较多,2、3岁组hMPV检出率最高。

**【关键词】** 人偏肺病毒; 呼吸道感染; 流行病学特征

**Molecular epidemiology of human metapneumovirus in children with respiratory tract infection in Hangzhou** Kou Yu, Pan Jincan, Yu Xinfen, Li Jun, Yang Xuhui, Wen Yanping, Zhou Yinyan, Pu Xiaoying, Sun Zhou, Xie Li. Microbiology Laboratory, Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310021, China

Corresponding author: Kou Yu, Email: kouyu09@126.com

This work was supported by grants from the Scientific and Technological Development Program of Hangzhou (No. 20110833B36, No. 20120533Q24).

**【Abstract】 Objective** To understand the molecular epidemiologic features of human metapneumovirus (hMPV) in children with respiratory tract infection in Hangzhou. **Methods** 2 593 throat swabs were collected from patients with respiratory tract infections who visited the hospitals with sentinel surveillance programs from January 2011 to December 2013, including 1 676 outpatients and 917 inpatients. Total nucleic acid was extracted from the specimens and the fusion (F) protein gene of hMPV was amplified by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), with positive samples picked to compare with the sequence of hMPV in GenBank, after the sequence of amplification products were determined. Other two types of common respiratory virus were tested using RT-PCR. **Results** The overall positive rate in this study was 6.51% (169/2 593), with 6.62% (111/1 676) in outpatients and 6.32% (58/917) in inpatients, but no statistically significant difference was found ( $\chi^2=0.086, P=0.769$ ). The rates was 7.01% in males and 5.72% in females, with no statistically significant difference in different sex ( $\chi^2=1.676, P=0.195$ ). The positive rate was 14.14% (28/198) in the 2-year-olds, 14.01% (22/158) in 3-year olds. The rate in 2-year olds was higher than in other groups, with statistically significant differences between the groups ( $\chi^2=38.654, P=0.000$ ). Of the 169 positive cases, 153 (90.53%) in the younger than 5 years olds. The rates of infection with hMPV in winter and spring were statistically higher than in summer and autumn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.12.015

基金项目: 杭州市科技局资助项目(20110833B36, 20120533Q24)

作者单位: 310021 杭州市疾病预防控制中心微生物检验科

通信作者: 寇宇, Email: kouyu09@126.com

( $\chi^2=67.032, P=0.000$ ). The rate of co-infection was 19.52% (33/169). 88 amplified productions were selected for gene sequence analysis, and the F gene homology were 81.6%–100.0% with reference strains in GenBank. Data showed that all the 4 viral subtypes: A2 (52.27%, 46/88), B1 (37.51%, 33/88), B2 (9.09%, 8/88) and A1 (1.13%, 1/88) co-circulated during the study. However, different subtypes appeared predominant in different years: hMPV subtype B1 was in 2011 and 2012, subtype A2 in the end of 2012 and in 2013. Of the 88 specimens, gene sequences were determinate, with A genotype accounted for 67.56% (25/37), B genotype for 32.43% (12/37) in children younger than 1-year olds, and A genotype accounted for 43.13% (22/51), B genotype for 56.86% (29/51) in children above 1-year olds. Significant differences between the two groups ( $\chi^2=5.143, P=0.023$ ) were noticed. **Conclusion** It was confirmed that hMPV was one of the substantial pathogens causing the respiratory tract infections. Data from our study suggested that the peak time of hMPV infection predominated during winter and spring in Hangzhou. Both hMPV subtype B1 and subtype A2 were found popular in this study, with hMPV genotype A dominating in children younger than 1-year olds.

**【Key words】** Human metapneumovirus; Respiratory infection; Molecular epidemiology

人偏肺病毒(hMPV)引起的儿童急性呼吸道感染可致毛细支气管炎和肺炎等<sup>[1]</sup>。研究显示,hMPV是杭州地区儿童急性呼吸道感染的重要病原,已有研究主要检出B1基因亚型<sup>[2]</sup>,为进一步了解杭州地区儿童hMPV的流行状况及是否存在其他基因亚型,本研究对该地区儿童呼吸道门诊和住院患儿呼吸道样本进行检测。

## 对象与方法

1. 研究对象:哨点医院选择杭州地区就诊量大、具有代表性的医院,一家为省级儿童医院,另一家为设有儿科的综合性医院,均为国家流感哨点医院。选取2011年1月至2013年12月<14岁的呼吸道儿科门诊流感样病例(ILI)及住院的严重急性呼吸道感染病例(SARI)为研究对象<sup>[3,4]</sup>。收集门诊ILI患儿的咽拭子样本,住院病例收集当日白天新入院诊断为SARI的痰液抽取物(或气管抽取物),并于24 h内送至实验室。样本采集过程均告知患儿家属并征得同意。

### 2. 研究方法:

(1)hMPV及其他病毒检测:样本病毒RNA提取使用德国Qiagen公司的RNeasy Mini试剂盒,按试剂盒说明书操作。用宝生物工程(大连)有限公司的TaKaRa反转录试剂盒,以随机六聚体引物反转录合成cDNA,-40℃保存。采用实时荧光RT-PCR检测hMPV,检测方法、引物、探针参见文献<sup>[5]</sup>,PCR反应20 μl体系中加入1 μl cDNA为模板,使用TaKaRa Ex Taq酶进行扩增。扩增条件:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 45个循环。传统RT-PCR检测hMPV,参考文献<sup>[6]</sup>合成hMPV F蛋白基因片段的引物,引物序列:hMPV F-F: 5'-GAA AAT CCC AGA CAA TC-3', hMPV F-R: 5'-CCA TGT AAA TTA CGG AGC-3', 扩增条件: 94℃

5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 36个循环; 72℃ 7 min。目的片段526 bp(荧光定量RT-PCR检测荧光信号较强、Ct值较小的样本)。扩增产物测序结果与GenBank已知hMPV F蛋白进行比对。用实时荧光RT-PCR方法检测呼吸道合胞病毒(RSV)、流感病毒(INF,包括甲型和乙型),方法参见文献<sup>[7,8]</sup>。

(2)hMPV基因分型及序列分析:测序由上海生工生物工程有限公司完成。所测序列用NCBI-BLAST和DNASTar软件进行同源性比较。基因分型采用基因测序分型方法,使用Mega 5.0软件,采用邻接法(NJ)构建进化树,参照各亚型标准株序列,毒株亚型以其F基因片段序列在进化树分支中的位置确认。序列比较和进化树分析所用4种不同亚型参考序列均来源NCBI的GenBank注册hMPV病毒株,参考序列号:A1亚型为NL00-1(AF371337); A2a亚型包括CAN97-83(AY297749)、NL00-17(AY298021); A2b亚型包括BJ1887(DQ843659)、JPS03-240(AY530095); B1亚型为NL99-1(AY525842); B2亚型包括CAN98-75(AY297748)、BJ1887(DQ843659)。同时将杭州地区hMPV F蛋白核苷酸序列提交GenBank注册。

3. 统计学分析:用SPSS 16.0软件进行数据整理分析、描述性统计和样本率的 $\chi^2$ 检验,组间比较采用 $\chi^2$ 分割检验。

## 结 果

1. 一般情况:共纳入2 593例病例,其中儿科门诊1 676例、住院917例。hMPV检出率为6.51% (169/2 593),男性患儿检出率(7.01%, 112/1 597)与女性患儿检出率(5.72%, 57/996)差异无统计学意义( $\chi^2=1.046, P=0.306$ )。

2. hMPV检出率:

(1)不同年龄组比较:hMPV检出患儿年龄为1月龄至10岁。以2岁组和3岁组检出率最高,分别为14.14%(28/196)、14.01%(22/157)。卡方分割分析显示,2岁组与3岁组检出率差异无统计学意义( $\chi^2=0.001, P=0.972$ ),与其他各组检出率差异有统计学意义( $\chi^2=38.654, P=0.000$ )。

(2)不同时间比较:2011年hMPV检出率为6.50%(60/923)、2012年为6.11%(56/916)、2013年为7.02%(53/754),3年检出率差异无统计学意义( $\chi^2=0.570, P=0.752$ )。hMPV检出有明显的季节性,检出率最高的是2013年3月(21.12%,15/71),各年7—9月检出率较低或未被检出,见图1。按季节分布,冬季(11.56%)>春季(9.02%)>秋季(2.99%)>夏季(1.74%),见表1。卡方分割分析显示,夏季与秋季检出率差异无统计学意义( $\chi^2=2.111, P=0.146$ ),冬季与春季检出率差异无统计学意义( $\chi^2=2.378, P=0.123$ ),冬春季与夏秋季差异有统计学意义( $\chi^2=67.032, P=0.000$ )。

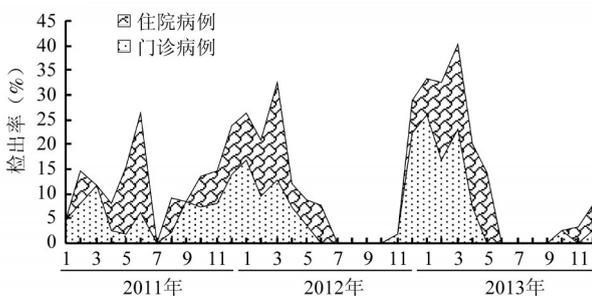


图1 2011—2013年杭州地区门诊和住院儿童病例hMPV检出率

表1 2011—2013年杭州地区各季节hMPV检出情况

季节	病例数	hMPV阳性数	阳性率(%)
冬(12月至次年2月)	683	79	11.56
春(3—5月)	676	61	9.02
夏(6—8月)	632	11	1.74
秋(9—11月)	601	18	2.99

(3)门诊与住院病例比较:门诊ILI样本hMPV检出率为6.62%(111/1676),住院SARI样本hMPV检出率为6.32%(58/917),差异无统计学意义( $\chi^2=0.085, P=0.769$ )。连续监测显示,住院病例hMPV流行高峰滞后面门诊病例1~2个月(图1)。门诊样本hMPV冬季检出率最高,为13.56%(59/453),其次是春季,为8.08%(35/433);住院样本春季检出率最高,为9.34%(20/248),其次是冬季,为8.06%(26/243)。门诊与住院冬季两样本检出率差异有统计学意义( $\chi^2=4.669, P=0.031$ );春季两样本检出率差异无统

计学意义( $\chi^2=1.298, P=0.255$ )。

3. hMPV基因进化树、序列分析:hMPV检测阳性样本核酸扩增产物测序率为52.07%(88/169)。利用杭州地区88株F基因526 bp基因核苷酸序列构建系统进化树,结果显示,杭州地区hMPV株的遗传谱系分为A、B两个簇,各簇又分为A1、A2和B1、B2亚簇,其中A1亚簇仅包含1个分支(图2)。进化树显示,2011—2012年杭州地区以B1基因为优势亚型,2012年底至2013年以A2为主要优势亚型,见图3。

同源性分析显示,测序的88株阳性基因序列与GenBank参考株序列同源性为81.60%~100.00%。各基因型与代表株核苷酸同源性较高,杭州地区A1基因型仅1例,与代表株NL00-1(AF371337)核苷酸同源性为99.95%;A2基因型与代表株CAN97-83(AI297749)核苷酸同源性为96.00%~100.00%。B1基因型与代表株NL99-1(AI525843)核苷酸同源性为97.70%~100.00%;B2基因型与代表株CAN98-75(AI297748)核苷酸同源性为94.50%~100.00%。杭州地区的88株hMPV测序结果中12份F蛋白部分基因序列已收录GenBank,登录号为KF729939~KF729950。

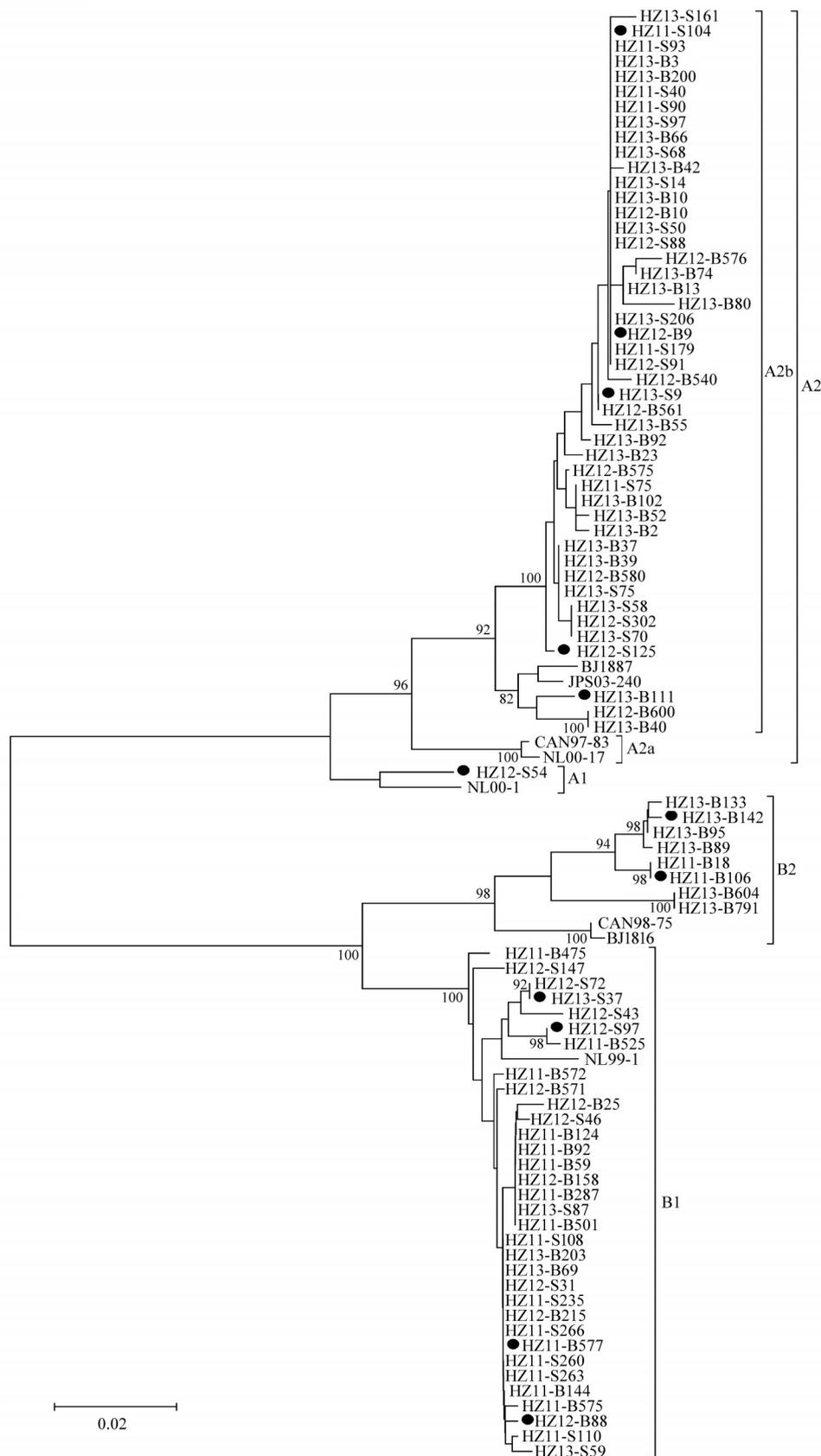
4. hMPV不同基因型的年龄分布:A基因<1岁组占优势(53.19%,25/47),其次是1~2岁组(27.65%,13/47);B基因型1~2岁组最多(46.34%,19/41),其次<1岁组(31.70%,13/41),见表2。<1岁和≥1岁A、B基因型检出率差异有统计学意义( $\chi^2=5.143, P=0.023$ )。

表2 hMPV不同基因型的年龄分布

基因型	参考序列	基因型阳性数(n=88)	年龄组(岁)				
			<1	1~2	3~4	5~6	7~14
hMPV A1	NL00-1	1	1				
hMPV A2	CAN97-83	48	24	13	6	2	1
hMPV B1	NL99-1	33	12	12	6	2	1
hMPV B2	CAN98-75	8	1	7			

注:GenBank登录号:A1:NL00-1(AF371337);A2:CAN97-83(AI297749);B1:NL99-1(AI525843);B2:CAN98-75(AI297748)

5. hMPV与RSV、INF混合感染情况:2593份样本的3种病毒混合感染检出率为1.50%(39/2593),hMPV与RSV或INF感染占23.07%(39/169)。39份混合感染样本中,hMPV与RSV阳性占48.71%(19/39),hMPV与INF阳性占30.76%(12/39),hMPV、RSV、INF同时阳性占5.12%(2/39),RSV与INF混合感染占15.38%(6/39)。



注：参考序列 A1: NL00-1 (AF371337); A2a: NL00-17 (AY298021); CAN97-83 (AY297749); A2b: BJ1887 (DQ843659)、JPS03-240 (AY530095); B1: NL99-1 (AY525843); B2: CAN98-75 (AY297748)、BJ1816 (DQ843658); ● GenBank 收录的本研究的序列

图 2 2011—2013 年杭州地区 hMPV 基因型系统进化树

### 讨 论

本研究显示,2011—2013 年杭州地区患儿呼吸道感染 hMPV 检出率为 6.51%, 其中住院 SARI 样本检出率为 6.32% (58/917), 门诊 ILI 样本检出率为 6.62% (111/1 676), 门诊 ILI 与住院 SARI 样本 hMPV 检出率差异无统计学意义。与该地区之前的门诊检出率(6.27%)一致<sup>[9]</sup>。

本研究还显示,杭州地区患儿 <1 岁组 hMPV 检出率最低, 1~3 岁组较高, 4~6 岁组检出率逐渐降低, 与 Daniel 等<sup>[10]</sup> 研究一致。

本研究也显示,杭州地区 hMPV 每年流行高峰不一致, 全年各季节均有 hMPV 检出, 但统计学结果显示, 冬春季与夏秋季 hMPV 检出率差异有统计学意义。杭州冬季检出率为 11.56%, 与本项目的前期研究(2009—2010、2010—2011 冬季)检测结果(11.23%)一致<sup>[2]</sup>。杭州住院患儿 hMPV 高峰在冬末初春, 与南京地区报道一致<sup>[11]</sup>, 可能与所处地域及环境气候有关。

有研究认为, A 型 hMPV 的致病性高于 B 型<sup>[12]</sup>, 另报道则认为 2 种型别的致病性没有差别<sup>[13]</sup>。本研究显示, 门诊、住院 hMPV A 基因型阳性样本差异无统计学意义。

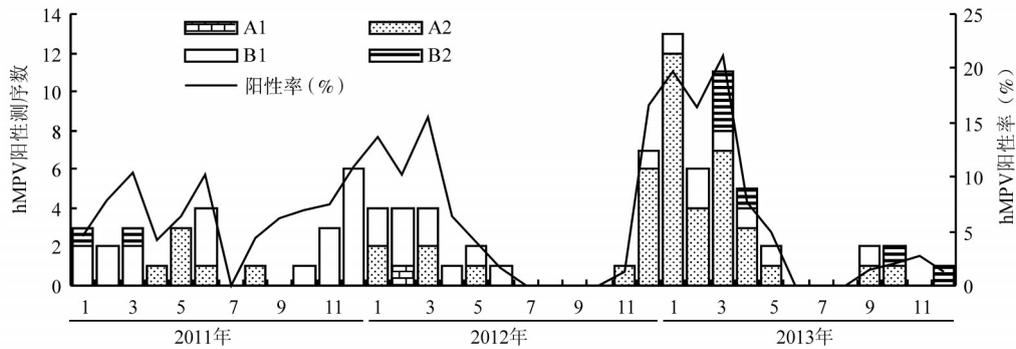


图3 2011—2013年杭州地区hMPV基因型分布

hMPV基因型随年代发生不同变化:北京地区2008年7月至2009年3月以hMPV A2最流行,2009年4月至2010年3月以B1为主,其次是B2亚型<sup>[14]</sup>。杭州地区在2009—2010年冬季为B1亚型流行<sup>[2]</sup>,与上述报道相同,2010—2011年冬季以B1为主。2011—2012年冬季以B1和A2为主,2012—2013年冬季以A2为主。基因进化分型分析,杭州地区hMPV毒株之间的亲缘关系较近,而与同型别内的参考株亲缘关系稍远,如A2b亚型杭州株与同亚型北京株(BJ1887)同属一个基因亚型,在不同的分支,提示杭州地区hMPV有地区特异性。

参 考 文 献

[1] Chan PK, Tam JS, Lam CW, et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(9): 1058-1063.

[2] Kou Y, Yu XF, Pan JC, et al. Analysis of infection status and pathogenic features of human metapneumovirus among children in Hangzhou between year 2009 and 2011 [J]. *Chin J Prev Med*, 2013, 47(1): 31-34. (in Chinese)  
寇宇, 于新芬, 潘劲草, 等. 2009—2011年杭州地区儿童人类偏肺病毒感染状况及病原特征分析 [J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(1): 31-34.

[3] The Ministry of Health of the People's Republic of China. National Programme of Influenza Surveillance (2010) [EB/OL]. [2010-09-03]. <http://www.moh.gov.cn/jkj/s3577/201009/3fa356d0f4834d408fde6c12891a6482.shtml>. (in Chinese)  
中华人民共和国卫生部. 全国流感监测方案(2010版) [EB/OL]. [2010-09-03]. <http://www.moh.gov.cn/jkj/s3577/201009/3fa356d0f4834d408fde6c12891a6482.shtml>.

[4] The Ministry of Health of the People's Republic of China. Sentinel Surveillance Programme on Inpatients with Severe Acute Respiratory Tract Infection (2011) [EB/OL]. [2011-01-28]. [http://www.gov.cn/zwgk/2011-02/11/content\\_1801649.html](http://www.gov.cn/zwgk/2011-02/11/content_1801649.html). (in Chinese)  
中华人民共和国卫生部. 住院严重急性呼吸道感染病例哨点监测方案(2011年版) [EB/OL]. [2011-01-28]. [http://www.gov.cn/zwgk/2011-02/11/content\\_1801649.html](http://www.gov.cn/zwgk/2011-02/11/content_1801649.html).

[5] Dare R, Sanghavi S, Bullotta A, et al. Diagnosis of human

metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(2): 548-552.

[6] Pabbaraju K, Wong S, McMillan T, et al. Diagnosis and epidemiological studies of human metapneumovirus using real-time PCR [J]. *J Clin Virol*, 2007, 40(3): 186-192.

[7] Yu XF, Pan JC, Ye R, et al. Preparation of armored RNA as a control for multiplex real-time reverse transcription-PCR detection of influenza and severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3): 837-841.

[8] van de Pol AC, van Loon AM, Wolfs TF, et al. Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(7): 2260-2262.

[9] Yang XH, Kou Y, Li J, et al. Human metapneumovirus infection in children with influenza-like illness Hangzhou [J]. *Chin J Clin Infect Dis*, 2014, 7(3): 222-225. (in Chinese)  
杨旭辉, 寇宇, 李钧, 等. 杭州地区儿童流感样病例人偏肺病毒流行情况分析 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2014, 7(3): 222-225.

[10] Daniel DE, Alpuche-Solis AG, Herrera-Díaz A, et al. Human meta-pneumovirus infections in Mexico: epidemiological and clinical characteristics [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(10): 969-974.

[11] Jin Y, Zhang J, Zhao DY, et al. Molecular epidemiological and clinical feature of human metapneumovirus in children with acute respiratory tract infection in Nanjing city [J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2011, 25(1): 11-13. (in Chinese)  
金玉, 张静, 赵德育, 等. 南京地区儿童人偏肺病毒感染的流行病学及临床特征分析 [J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2011, 25(1): 11-13.

[12] Vicente D, Mantes M, Cilia C, et al. Differences in clinical verity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(12): 111-113.

[13] Wei HY, Tsao KC, Huang CG, et al. Clinical features of different genotypes/genogroups of human metapneumovirus in hospitalized children [J]. *J Microbiol Immunol Infec*, 2013, 46(5): 352-357.

[14] Li J, Wang Z, Gonzalez R, et al. Prevalence of human metapneumovirus in adults with acute respiratory tract infection in Beijing, China [J]. *J Infection*, 2012, 64(1): 96-103.

(收稿日期: 2014-07-19)

(本文编辑: 万玉立)