

重庆地区急性呼吸道感染儿童人鼻病毒检测分析

张志勇, 陈 昕, 赵 耀, 杨锡强, 赵晓东

(重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所 生物安全二级实验室, 重庆 400014)

摘要: 目的 了解 2006—2007 年重庆地区急性呼吸道感染住院儿童人鼻病毒 (HRV) 的检出情况、感染特点及流行规律。方法 收集 2006 年 4 月—2007 年 3 月重庆医科大学附属儿童医院呼吸科住院的部分急性呼吸道感染患儿的鼻咽深部吸分泌物 390 份, 离心后当日提取呼吸道标本 RNA 应用针对 HRV 5' 端非编码区保守序列设计引物 采用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测标本中的 HRV 基因组 RNA 随机抽取 5 例 RT-PCR 鉴定 HRV 阳性的 PCR 产物进行序列测定 以验证 PCR 检测的特异性。对 HRV 阳性病例总结其感染特点及临床特征。结果 390 例标本中 HRV 阳性 61 例 阳性率为 15.6%。RT-PCR 检测 5 例 HRV 阳性的 PCR 产物行序列测定经 Genbank 比对均证实为 HRV。HRV 阳性患儿中 ≤ 2 岁 49 例 $> 2 \sim 5$ 岁 10 例, 5 岁以上 2 例。HRV 感染几乎全年散发, 2006 年 12 月 HRV 检测阳性率最高 达 29.5%。重庆地区 HRV 感染无明显高发季节。HRV 感染患儿的临床表现主要为咳嗽 (96.8%)、气促 (61.5%)、喘息 (56.5%)、发热 (35.5%)。临床诊断依次为支气管肺炎 20 例 (32.8%)、间质性肺炎 15 例 (24.6%)、毛细支气管炎 12 例 (19.7%)、重症肺炎 8 例 (13.1%)、支气管哮喘 4 例 (6.5%)、喘息性支气管炎 2 例 (3.3%)。8 例重症肺炎中先天性心脏病 2 例 中度营养不良 1 例, 且均在 2 岁以内。平均住院天数 7.5 d。61 例 HRV 阳性患儿中, 53 例进行痰培养, 40 例提示细菌感染 13 例正常。结论 HRV 是重庆地区婴幼儿急性下呼吸道感染较为常见的病毒病原, 其流行无明显季节特点。HRV 和喘息之间可能存在密切关系, HRV 感染在有心肺基础疾病的儿童中有重症倾向。

实用儿科临床杂志, 2008, 23(10): 736—738

关键词: 鼻病毒; 急性呼吸道感染; 流行病学; 重庆

中图分类号: R725.6 文献标志码: A 文章编号: 1003-515X(2008)10-0736-03

Detection of Human Rhinovirus in Children with Acute Respiratory Infection in Chongqing Area

ZHANG Zhi-yong, CHEN Xin, ZHAO Yao, YANG Xi-qiang, ZHAO Xiao-dong

(Laboratory Biosafety-2 Institute of Pediatrics, the Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence and clinical features of human rhinovirus (HRV) infection in hospitalized children with acute respiratory infection (ARI) in Chongqing area from 2006 to 2007. Methods Three hundred and ninety nasopharyngeal aspirates (NPA) were collected prospectively from children with ARI who were admitted to the division of pulmonology in children's hospital affiliated to Chongqing medical university between Apr 2006 and Mar 2007. Viral RNA in NPA was extracted using a QIAamp[®] RNA Mini kit in accordance with the manufacturer's instructions. Primers targeting the highly conserved 5'-noncoding region (5'-NCR) of HRV were used to develop a RT-PCR for detection of HRV. The specificity of the RT-PCR for HRV on clinical specimens was confirmed by sequencing 5 positive PCR products selected at random. The clinical characteristics of the patients with rhinovirus infection were analyzed. Results Three hundred and ninety infants with respiratory tract infection were admitted. 61 cases (15.6%) cases who were positive for HRV. Forty-nine cases for HRV were collected from children under 2 years old, 10 cases were collected from children between 2 to 5 years old and 2 cases were collected from children above 5 years old. As for the seasonal distribution, HRV infection occurred sporadically almost all over the year with the highest positive rate in Dec 2006 and did not show apparent seasonal distribution. Also, HRV was serially associated with clinical diagnosis: bronchopneumonia in 32.8%, interstitial pneumonia in 24.6%, bronchitis in 19.7%, severe pneumonia in 13.1%, bronchial asthma in 6.5%, and asthmaoid bronchitis in 3.3%. Symptoms possibly responsible for HRV infection were coughing (96.8%), panting (61.5%), wheezing (56.5%), fever (35.5%). Two cases were congenital heart disease and one case was malnutrition among eight children with severe pneumonia. The median hospital stay with rhinovirus infection was 7.5 days. Bacterial culture was performed for 53 cases of HRV positive specimens and bacterial infection were found in 40 cases. Conclusions HRV is a relatively common cause for acute respiratory infections and HRV infection occurred sporadically almost all over the year in children in Chongqing area. HRV might particularly be associated with wheezing. Children with chronic disease are more likely to have severe respiratory infection.

J APPLIC in Pediatric 2008, 23(10): 736—738

Key words: rhinovirus; acute respiratory infection; epidemiology; chongqing

人鼻病毒 (human rhinovirus, HRV) 是引起上呼吸道感染最常见的病原体, 至今已鉴定的 HRV 已超过 120 个血清型, 是人类病毒中血清型最多的病毒。越来越多的证据表明 HRV 不仅引起普通上呼吸道感染, 还可引起婴儿及儿童的下呼吸道感染^[1,2], 且已证明与支气管哮喘的

发作关系紧密^[3]。2006 年三峡大坝开始蓄水, 三峡库区的自然环境有可能发生巨大变化, 从而影响了 HRV 的流行规律。本研究对 2006 年 4 月—2007 年 3 月在重庆医科大学附属儿童医院呼吸科住院的 390 例急性呼吸道感染 (ARI) 患儿呼吸道标本进行 HRV 的检测, 旨在阐明三峡大坝蓄水后重庆地区儿童 HRV 的流行特点, 为公共卫生政策的制定提供理论依据, 并为今后多年度连续监测提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2006 年 4 月 1 日—2007 年 3 月 31 日每

收稿日期: 2008-03-02

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划项目资助 (教技函 20066-05-0774)

作者简介: 张志勇, 男, 博士生, 研究方向为临床免疫和病毒学。

通讯作者: 赵晓东, 男, 主任医师, 教授, 博士学位, 研究方向为临床免疫和病毒学, 电子信箱: zhaoxiaodong@yaho.com.cn

周一、三收集本院呼吸内科全部因 AR住院患儿的鼻咽深部吸取物,共 390份,占同期 AR住院患儿的 18.7%。男 248例,女 142例;年龄 20 d~10岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和处理 住院当天采集鼻咽分泌物标本,将装有 3 mL消毒 9 g/L盐水的注射器连接到塑料吸痰管上,将吸痰管小心置入患儿鼻咽部,轻轻推入 9 g/L盐水,尽可能多的吸出鼻咽分泌物。将吸出物转至另一含有 3 mL病毒转移液的无菌离心管中,立即置于冰上,0.5 h内转运至重庆医科大学儿科研究所生物安全二级实验室。鼻咽分泌物经吹打混匀,4℃ 1 000 r/min离心 10 min后,呼吸道标本上清用于 RNA提取。

1.2.2 引物设计 根据文献[4]在 HRV的 5端非编码区保守区内设计 PCR引物以扩增 HRV基因组 RNA。R_{H1} 5'-GAATGCTGGCTAACCTTAAACCC3'; R_{H2} 5'-CAAAGTAGTCIGGTCGCCAGTCC3'。预期扩增片段长度为 106 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.3 病毒 RNA提取 使用 QIAamp RNA Mini Kit (QIAGEN Inc USA)试剂盒提取患儿鼻咽吸取物标本上清中的总 RNA。试剂包括 Carrier RNA (poly A), Buffer AVL, Buffer AW1和 Buffer AW2。操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 cDNA合成及 PCR扩增 以 RNA为模板,应用随机引物进行反转录合成 cDNA,然后进行 PCR扩增。PCR体系为 25 μL,包含 1.25 U Taq Polymerase, 25 mmol/L dNTP, 10 mmol/L Tris-氯化氢, 50 mmol/L氯化钾, 1.5 mmol/L氯化镁, 0.2 μmol/L R_{H1}和 R_{H2}。PCR反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 1 min; 60℃ 1 min; 72℃ 1 min; 扩增 35个循环; 最后 72℃延伸 10 min。引物为 R_{H1}和 R_{H2}。预期扩增片段长度为 106 bp。PCR体系为 25 μL,引物终工作浓度均为 200 pmol/L。以测序确认的 HRV为阳性对照,无菌双蒸水为阴性对照。PCR产物经 20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 HRV的 PCR产物序列测定 随机抽取 5例琼脂糖凝胶电泳鉴定 HRV阳性的 PCR产物送重庆医科大学感染性疾病分子生物学实验室进行序列测定。以验证 PCR的特异性。

1.2.6 HRV感染临床资料分析 经反转录聚合酶链反应 (RT-PCR)证实的 HRV感染病例,收集其年龄、性别、症状、体征、辅助检查等临床资料以供分析。

2 结果

2.1 HRV检测结果 通过 RT-PCR检测,共检出 61例 HRV阳性标本,阳性率 15.6%。男 42例,女 19例。RT-PCR检测 5例 HRV阳性的 PCR产物行序列测定经 GenBank比对均证实为 HRV。

2.2 HRV感染年龄分布 390份标本中,20 d~6个月 174例,检出 HRV阳性 33例; >6~12个月 85例,检出

7例; >1~2岁 53例,检出 9例; >2~5岁 64例,检出 10例; >5~10岁检出 2例。≤2岁 49例,占阳性病例的 80.3%,其中 <1岁 40例,占 65.6%。

2.3 HRV感染季节性分布 2006年 4月—2007年 3月 HRV检出阳性率按月份进行统计。HRV阳性率为 0~29.5%,无明显的高发季节。见图 1。

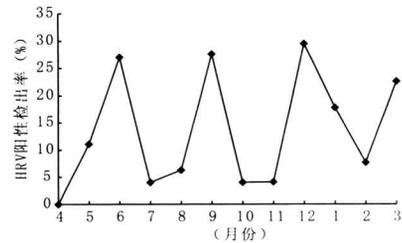


图 1 重庆地区 2006—2007年 HRV感染的季节分布

2.4 HRV感染患儿临床资料分析结果 61例 HRV阳性患儿中,诊断分别为支气管肺炎 20例 (32.8%),间质性肺炎 15例 (24.6%),毛细支气管炎 12例 (19.7%),重症肺炎 8例 (13.1%),支气管哮喘 4例 (6.5%),喘息性支气管炎 2例 (3.3%)。8例重症肺炎中先天性心脏病 2例,中度营养不良 1例,且均在 2岁以内。临床表现主要为咳嗽 (96.8%)、气促 (61.5%)、喘息 (56.5%)、发热 (35.5%)。61例中,53例进行痰培养,40例提示细菌感染,其中肺炎克雷伯菌 15例,肺炎链球菌 9例,流感嗜血杆菌 6例,副流感嗜血杆菌 3例,金黄色葡萄球菌 2例,卡他布兰汉菌、卡他莫拉菌、光滑假丝酵母菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌各 1例。其余 13例未见细菌生长。12例 HRV阳性患儿作肺功能检查,8例提示呼吸流速环呈轻度堵塞,2例提示呼吸流速环呈中度限制性障碍。舒张试验阳性 6例,余 2例正常。HRV阳性 54例患儿行胸部 X线检查,其中肺炎 32例 (59.3%),支气管炎 13例 (24.1%),余 9例未见异常。1例进行纤支镜检查,诊断为支气管内膜增生。45例病程在 1周内,15例 1周~1个月,1例 1个月以上。平均住院 7.5 d。61例 HRV阳性患儿中,3例并先天性心脏病,4例并缺铁性贫血,2例并中度营养不良,1例喉软骨发育不良。

3 讨论

HRV属于小 RNA病毒科中的一类,是引起人类病毒性呼吸道感染的最常见的病原体,且是诱发哮喘的主要病毒病原之一。研究发现 HRV不仅引起上呼吸道感染,还可致婴儿及儿童的下呼吸道感染,有先天性支气管发育异常等基础性疾病的婴幼儿有重症倾向^[5]。由于传统检测方法的限制,HRV在儿童急性呼吸道感染中的作用可能被低估。重庆地处西部的三峡库区,呼吸道感染性疾病潜在威胁巨大。王莉佳等^[6]对 2003年 4月—2005年 3月在本院呼吸内科住院的 1 052例急性呼吸道感染患儿进行 7种常见呼吸道病毒 [呼吸道合胞病毒 (RSV)、腺病毒,流感病毒 A及 B型,副流感病毒 I、II、III型] 检测,阳性标本 409例 (占 38.88%)。其中 RSV占阳性标

本的 88.02%。提示重庆地区以 RSV 流行为主。而目前尚无系统的关于重庆地区 AR 儿童中 HRV 的年度流行病学资料。本研究收集了 2006—2007 年本院呼吸科住院患儿鼻咽深部吸器物标本,收集的标本数占同期住院患儿总数的 18.7%,结果显示 2006 年 4 月—2007 年 3 月 390 份临床标本中,61 例 HRV 检测阳性,阳性率 15.6%。提示 HRV 是重庆地区儿童 AR 的重要病原。与北京报道的阳性率 (14.5%) 基本一致^[7],而比香港 (35.4%) 和西班牙 (25%) 报道的阳性率低^[8,9]。对于重庆地区与其它国家和地区的差异,可能的原因是本研究对象仅限于住院的患者,症状相对较重,而由 HRV 感染引起的普通上呼吸道感染可以在门诊和社区医院治愈,减少了住院的几率,从而影响了 HRV 的检出率。其次,不同地域和气候条件对 HRV 的流行可能也有影响。人群对 HRV 普遍易感,以儿童的感染率较高。Papadopoulos 等^[10]发现所有儿童 2 岁以前至少经历过 1 次 HRV 感染。本研究发现,HRV 感染患儿的年龄相对集中,61 例中 < 2 岁占 80.3%,仅 2 例 > 5 岁。提示 HRV 主要引起 5 岁以下,尤其是 2 岁以下小儿感染。HRV 导致的呼吸道感染常年发生,在温带地区,主要在早春和气温突然下降时节。在人群拥挤及空气不流通的地方较易发生相互传播。甚至可出现暴发流行^[11]。我国北京地区 HRV 流行高峰为春季和秋季^[6],而 2006—2007 年重庆地区 HRV 感染似无明显的高发季节,提示重庆地区的 HRV 感染季节特点可能与其他地区不同,是否与三峡大坝的蓄水有关尚待进行多年度的监测。

HRV 是引起普通上呼吸道感染的主要病原体,既往认为 HRV 不能在下呼吸道复制是基于下呼吸道的温度达 37℃,在此温度 HRV 不能生长及复制。近来,越来越多的证据表明 HRV 可引起婴儿及儿童的下呼吸道感染^[2]。本研究结果显示,HRV 阳性患儿中支气管肺炎、间质性肺炎和毛细支气管炎等下呼吸道感染 47 例,进一步说明 HRV 是重庆地区住院儿童下呼吸道感染的重要病原。

HRV 与婴幼儿毛细支气管炎关系也很密切,研究显示在毛细支气管炎的病原中 HRV 仅次于 RSV^[2]。本研究 19.7% 为毛细支气管炎。HRV 和 RSV 引起的毛细支气管炎的病情轻重目前尚无定论,但是婴幼儿时期的 HRV 感染会增加儿童时期发生哮喘的危险性,而且 HRV 是触发支气管哮喘恶化的重要原因。80%~85% 学龄儿童的哮喘加重与 HRV 有关^[13],而在成人,约 50% 的哮喘加重与 HRV 有关。支气管哮喘患儿也更容易发生 HRV 感染。本研究发现,HRV 感染的临床表现与 RSV 引起的下呼吸道感染类似,以咳嗽、气促、喘息为主,61 例中,56.5% 有喘息症状,提示 HRV 和喘息之间可能存在密切关系。HRV 导致呼吸道高反应性的确切机制尚不完全清

楚,有待进一步研究。

HRV 同样可引起严重的呼吸道感染,尤其是有基础疾病的患者。Guman 等^[14]曾报道 2 例干细胞移植后出现致死性呼吸道感染的病例。Daub 等^[15]对机械通气患者行呼吸道病原检测发现,HRV 占第 1 位 (42%)。本研究 3 例并先天性心脏病,4 例并缺铁性贫血,2 例并中度营养不良,1 例并喉软骨发育不良。虽然 HRV 感染患儿无 1 例需要进入重症监护室或者呼吸机治疗,但有 8 例 (13.1%) 诊断为重症肺炎,伴呼吸衰竭,其中 2 例伴先天性心脏病,1 例中度营养不良,均为 2 岁内,提示 HRV 感染在有心肺基础疾病的儿童中有重症倾向,尤其是 < 2 岁的患儿,需要引起重视。

本研究初步证实 HRV 是重庆地区住院儿童 AR 的重要病原,且可能与喘息具有一定相关性。但目前仅有 1 例的流行病学资料,门诊和社区医院还未纳入研究范围。HRV 在儿童呼吸道感染中的疾病负担和流行规律有待长期规范的监测。

参考文献

- [1] Herhenson MB, Johnson SL. Rhinovirus infections: More than a common cold. *J. Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174(12): 1284—1285.
- [2] Miller EK, Lu X, Erdman DD, et al. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *J. Infect Dis* 2007; 195(6): 773—781.
- [3] Hongze ST. Rhinoviruses in the pathogenesis of asthma: The bronchial epithelium as a major disease target. *J. Allergy Clin Immunol* 2006; 118(3): 587—590.
- [4] Stejneger C, Aberle SW, Popow-Kraupp T. Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay. *J. Clin Microbiol* 2001; 39(1): 129—133.
- [5] Vaakey JB, Vaakey B. Viral infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(2): 89—94.
- [6] 王莉佳,刘恩梅,赵晓东,等.重庆医科大学儿童医院急性呼吸道感染患儿病毒病原学分析[J].中国实用儿科杂志,2005;20(12):735—737.
- [7] 赵林清,钱渊,朱汝南,等.北京地区 2002—2006 年急性呼吸道感染儿童中鼻病毒感染的研究[J].中华流行病学杂志,2007;28(7):683—685.
- [8] Cheuk DK, Tang W, Chan KH, et al. Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: A prospective study. *J. Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(11): 995—1000.
- [9] Calvo C, Garcia-Garcia ML, Blanco C, et al. Role of rhinovirus in hospitalized infants with respiratory tract infections in Spain. *J. Pediatr Infect Dis J* 2007; 26(10): 904—908.
- [10] Papadopoulos NG, Bates PJ, Bardin PG, et al. Rhinoviruses infect the lower airways. *J. Infect Dis* 2000; 181(6): 1875—1884.
- [11] Hicks LA, Shepard CW, Britz PH, et al. Two outbreaks of severe respiratory disease in nursing homes associated with rhinovirus. *J. Am Geriatr Soc* 2006; 54(2): 284—289.
- [12] Jacques J, Bouscambert-Duchamp M, Moret H, et al. Association of respiratory picornaviruses with acute bronchitis in French infants. *J. Clin Virol* 2006; 35(4): 463—466.
- [13] Friedlander SL, Busse WW. The role of rhinovirus in asthma exacerbations. *J. Allergy Clin Immunol* 2005; 16(2): 267—273.
- [14] Guman JA, Peck AJ, Kuypers J, et al. Rhinovirus as a cause of fatal lower respiratory tract infection in adult stem cell transplantation patients: A report of two cases. *J. Bone Marrow Transplant* 2007; 40(8): 809—811.
- [15] Daub C, Parienti JJ, Vincent S, et al. Epidemiology and clinical outcome of virus-positive respiratory samples in ventilated patients: A prospective cohort study. *J. Crit Care* 2006; 10(5): R142.

(本文编辑:王家勤)