

· 论 著 ·

多重核酸检测系统同时检测 22 种呼吸道病原体的应用效果研究*

徐 亮, 邱灿林, 徐子强, 邓俊兴, 丰建国, 曾 鑫, 王衍芬
(韶关市疾病预防控制中心, 广东 韶关 512000)

[摘要] **目的** 采用多重核酸检测系统同时检测 22 种呼吸道病原体, 了解韶关市儿童急性呼吸道感染 (ARI) 常见病毒病原体的构成情况及流行特征。**方法** 选择粤北人民医院作为监测点, 按要求及时采集呼吸道患者标本 886 份送至韶关市疾病预防控制中心微生物检验室, 采用多重核酸检测系统定性检测 22 种呼吸道病原体, 包括新型冠状病毒、冠状病毒 HKU1、冠状病毒 NL63、冠状病毒 229E、冠状病毒 OC43、人类偏肺病毒、人鼻病毒/肠道病毒、甲型流感病毒、甲型流感病毒 H1、甲型流感病毒 H1-2009、甲型流感病毒 H3、乙型流感病毒、副流感病毒 1 型、副流感病毒 2 型、副流感病毒 3 型、副流感病毒 4 型、呼吸道合胞病毒、副百日咳杆菌、百日咳杆菌、肺炎衣原体、肺炎支原体。同时采用传统的荧光定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 对上述样品进行同样项目的检测, 对比检测结果准确性。**结果** 886 份标本中检出阳性 425 份, 核酸检出率为 47.97% (425/886), FluA 检出率最高, 为 15.46%, 其他病毒的检出率从高到低依次为鼻病毒 (HRV) 9.48%、人副流感病毒 (HPIV) 6.55%、乙型流感病毒 (FluB) 5.87%、RSV 4.29%、腺病毒 (ADV) 2.82%、MPV 2.03%、HCoV 1.02%、HBoV 0.45%。FluA、HRV、HPIV、FluB、RSV 和 MPV 的分布有一定季节特征, 而 ADV、HCoV 和 HBoV 季节特征均不明显。FluA、HPIV、RSV 在 1~<3 岁组检出率均较高; HRV、MPV、HCoV 在 1~<3 岁组检出率均较高; FluB 在 ≥6 岁组检出率较高。荧光定量 PCR 检测结果与上述检测结果一致。**结论** 韶关市儿童急性呼吸道感染 (ARI) 的病毒病原种类较多, 位于前 3 位依次是 FluA、HRV 和 HPIV。部分病原感染有季节流行特征, 与年龄也存在一定相关性。

[关键词] 急性呼吸道感染; 实时荧光 RT-PCR; 多病原检测; 病毒病原体

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.24.001 **中图法分类号:** R373

文章编号: 1009-5519(2023)24-4141-04 **文献标识码:** A

Application effect of multiple nucleic acid detection system for simultaneous detection of 22 respiratory pathogens*

XU Liang, QIU Canlin, XU Ziqiang, DENG Junxing, FENG Jianguo, ZENG Xin, WANG Yanfen
(Shaoguan Center for Disease Control and Prevention, Shaoguan, Guangdong 512000, China)

[Abstract] **Objective** To detect 22 kinds of respiratory pathogens by multiplex nucleic acid detection system, and to understand the composition and epidemic characteristics of common viral pathogens in children with acute respiratory infection (ARI) in Shaoguan city. **Methods** The People's Hospital of North Guangdong was selected as the monitoring point, and 886 samples of respiratory patients were collected in time as required and sent to the microbial laboratory of the Municipal Center for Disease Control and Prevention. The multiple nucleic acid detection system was used to detect 22 kinds of respiratory pathogens qualitatively. These include novel coronavirus, coronavirus HKU1, coronavirus NL63, coronavirus 229E, coronavirus OC43, human metapneumovirus, human rhinovirus/enterovirus, influenza A virus, influenza A virus H1, influenza A virus H1-2009, influenza A virus H3, influenza B virus, parainfluenza virus type 1, parainfluenza disease Virus type 2, Parainfluenza virus type 3, parainfluenza virus type 4, respiratory syncytial virus, Bacillus parapertussis, Bacillus pertussis, Chlamydia pneumoniae, mycoplasma pneumoniae. At the same time, the traditional fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the same items of the above samples, and the

* 基金项目: 韶关市 2020 年科技计划项目 (200812114531590)。

作者简介: 徐亮 (1979-), 主管技师, 主要从事微生物检验工作。

accuracy of the detection results was compared. **Results** Among the 886 samples, 425 samples were positive, and the detection rate of nucleic acid was 47.97% (425/886), and the detection rate of FluA was the highest (15.46%). The detection rates of other viruses from high to low were rhinovirus (HRV) 9.48%, human parainfluenza virus (HPIV) 6.55%, influenza B virus (FluB) 5.87%, RSV 4.29%, adenovirus (ADV) 2.82%, MPV 2.03%, HCoV 1.02%, HBoV 0.45%. The distribution of FluA, HRV, HPIV, FluB, RSV and MPV had certain seasonal characteristics, while ADV, HCoV and HBoV had no obvious seasonal characteristics. The detection rates of FluA, HPIV and RSV in 1-3 years old group were higher. The detection rates of HRV, MPV and HCoV in 1-3 years old group were higher. The FluB detection rate was higher in ≥ 6 years old group. The results of fluorescence quantitative PCR were consistent with the above results. **Conclusion** In Shaoguan city, there were many viral pathogens of acute respiratory infection (ARI) in children, and the top three were FluA, HRV, and HPIV in turn. Some pathogen infections have seasonal characteristics, and there is a certain correlation with age.

[Key words] Acute respiratory infection; Real-time fluorescent RT-PCR; Multi-pathogen detection; Viral pathogen

急性呼吸道感染是婴幼儿的常见和多发病,发病率高,给婴幼儿造成不同程度的健康威胁。国内外研究显示,病毒感染是急性呼吸道感染的主要致病源之一^[1-4]。因此,研究韶关市不同年龄儿童在不同季节常见呼吸道病毒病原及其流行病学特点,将有助于提高儿童急性呼吸道感染病毒病原监测能力,对诊断和预防起到关键作用。本研究选取 3 个监测点,对韶关市儿童急性呼吸道感染病毒感染情况进行分析,结果如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2020 年 8 月至 2021 年 7 月从粤北人民医院采集符合病例定义的 886 份患儿咽拭子,同时收集姓名、年龄、发病日期、采样日期及临床症状等信息。病例定义及标本采集详见参考文献[5]。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 于 2020 年 8 月至 2021 年 7 月对符合病例定义的 886 例患儿进行采样,采集发病时间在 1~3 d 内的咽拭子,放置于病毒保存液中,0~4 °C 低温保存,尽快送往实验室,提取核酸后置于 -80 °C 下备用。

1.2.2 仪器及试剂 ABI7500PCR 扩增仪, AutoPure32A 全自动核酸提取仪(杭州奥盛仪器有限公司),核酸提取试剂盒(磁珠法,中元汇吉),实时定量 PCR 检测试剂盒 AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit(美国 AB 公司),各型病毒的引物和探针由日本 TaKaRa 公司合成。多病原检测采用 HOPE ONE 检测仪进行检测。

1.2.3 核酸提取及荧光定量 PCR 根据试剂盒说明书,提取病毒总核酸,然后对提取的核酸在同一反应条件下同时进行 9 种病原体的扩增,每种病原体为

1 个反应孔。反应条件:50 °C 30 min;95 °C 15 min;95 °C 15 s,50 °C 30 s,72 °C 30 s,5 个循环;95 °C 15 s,55 °C 60 s,40 个循环;55 °C 收集荧光信号。实验中使用核糖核蛋白(RNP)为内对照。采用多重核酸检测系统同时定性检测 22 种呼吸道病原体,包括 16 种 RNA 病毒、2 种 DNA 病毒及 4 种细菌:甲型流感病毒、乙型流感病毒,甲型流感病毒 H1N1、呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型、副流感病毒-1/-2/-3/-4、冠状病毒 OC43/229E/HKU1/NL63、肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团杆菌、百日咳鲍特菌、鼻病毒、肠病毒、人偏肺病毒、腺病毒和博卡病毒。

1.3 统计学处理 应用 Excel2003 进行数据汇总处理,应用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 呼吸道病毒检出情况 一共检测 886 份标本,阳性 425 例,总检出率为 47.97% (425/886)。9 种呼吸道病毒均有检出,其中 FluA 检出率最高,为 15.46% (137/886),其后依次为 HRV、HPIV、FluB、RSV、ADV、MPV、HCoV、HBoV。见表 1。

2.2 呼吸道病毒的流行特征

2.2.1 不同季节病毒分布情况 FluA 在冬季的检出率最高;HRV 的检出高峰主要在秋季;HPIV 的高峰在春季。春季检出率最高为 FluA、其次为 HPIV、FluB 和 RSV;夏季依次为 FluA、HRV、HPIV 和 FluB;秋季为 HRV、HPIV、FluA;冬季以 FluA 最高,其后为 HRV 和 MPV。见表 2。

2.2.2 不同年龄病毒分布情况 在 886 例患儿中年龄最小者为 1.8 个月,最大者为 13 岁。各种病毒在

不同年龄段检出率分布见表 3。0~<1 岁组病毒检出以 FluA、HRV 为主;1~<3 岁组以 HRV、FluA 为主;3~<6 岁组和 ≥6 岁组都以 FluA 为主。除 ADV

和 HBoV 外及其他病毒在各年龄段检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 呼吸道病毒病原谱及检出情况

项目	FluA	HRV	HPIV	FluB	RSV	ADV	MPV	HCoV	HBoV	合计
阳性例数(<i>n</i>)	137	84	58	52	38	25	18	9	4	425
检出率(%)	15.46	9.48	6.55	5.87	4.29	2.82	2.03	1.02	0.45	47.97

表 2 呼吸道病毒在不同季节的分布情况[*n*(%)]

季节	<i>n</i>	FluA	HRV	HPIV	FluB	RSV	ADV	MPV	HCoV	HBoV	合计
春季	219	35(16.0)	20(9.1)	26(11.9)	21(9.6)	21(9.6)	6(2.7)	5(2.3)	3(1.4)	1(0.5)	138(63.0)
夏季	233	25(10.7)	21(9.0)	15(6.4)	15(6.4)	7(3.0)	4(1.7)	1(0.4)	1(0.4)	2(0.9)	91(39.1)
秋季	218	13(6.0)	31(14.2)	15(6.9)	7(3.2)	8(3.7)	11(5.0)	1(0.5)	2(0.9)	1(0.5)	89(38.2)
冬季	216	64(29.6)	12(5.6)	2(0.9)	9(4.2)	2(0.9)	4(1.9)	11(5.1)	3(1.4)	0	107(49.5)
χ^2	—	-52.25	9.67	21.35	9.54	22.08	5.72	15.95	1.39	2.03	31.95
<i>P</i>	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05

注:—表示无此项;春、夏、秋、冬季混合感染份数依次为 17、8、7、11 份。

表 3 呼吸道病毒在不同年龄的分布情况[*n*(%)]

年龄	<i>n</i>	FluA	HRV	HPIV	FluB	RSV	ADV	MPV	HCoV	HBoV	合计
0~<1 岁	284	19(6.7)	16(5.6)	11(3.9)	8(2.8)	6(2.1)	8(2.8)	3(1.1)	2(0.7)	2(0.7)	75(26.4)
1~<3 岁	251	31(12.4)	33(13.1)	13(5.2)	14(5.6)	10(4.0)	7(2.8)	11(4.4)	7(2.8)	2(0.8)	129(51.4)
3~<6 岁	187	54(28.9)	21(11.2)	18(9.6)	13(7.0)	15(8.0)	8(4.3)	2(1.1)	0	0	130(69.5)
≥6 岁	164	33(20.1)	14(8.5)	16(9.8)	17(10.4)	7(4.3)	2(1.2)	2(1.2)	0	0	91(55.5)
χ^2	—	47.05	9.67	10.52	11.23	9.68	2.98	9.74	11.72	2.66	92.58
<i>P</i>	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05

注:—表示无此项;4 个年龄组从小到大混合感染份数依次为 5、8、19、11 份。

2.3 呼吸道病毒混合感染 在 886 份标本中,同时检出 2 种以上呼吸道病毒混合感染 43 份,检出率为 4.85%(43/886)。9 种呼吸道病毒都存在混合感染的情况,以 HRV 和其他呼吸道病毒合并感染为主。

3 讨论

呼吸道感染的病毒病原学因地域、年份、季节和年龄等的不同而有差异^[6]。据报道,呼吸道病毒检出率均超过 20%(21.6%~58.2%),RSV、HPIV、ADV 和 Flu 是最常见的呼吸道感染病毒病原^[7-10]。通过对韶关市 886 例急性呼吸道感染患儿咽拭子的病毒病原学检测,共检出 9 种呼吸道病毒,阳性 425 例,总检出率为 47.97%,FluA 是 2019 年儿童急性呼吸道感染首位病毒病原,其后是 HRV 和 HPIV,3 种病毒病原占总检出数的 65.65%。本研究病例中呼吸道病毒检出率与何英等^[10]报道深圳市检出率(48.0%)的结果一致,略低于韶关市前几年的检出率(51.36%)^[11],而高于以往北京(32.0%)、上海(32.09%)等地区的

报道^[12-13]。

儿童急性呼吸道病毒感染全年均可发病,而且不同季节病毒主要感染类型也有所不同。本研究发现,2019 年不同季节 FluA、HRV、HPIV、FluB、RSV 和 MPV 的检出率均有差异,其中 FluA 和 MPV 的发病高峰在冬季;HRV 的高峰在秋季;而 HPIV、FluB 和 RSV 主要集中在春季,ADV、HCoV 和 HBoV 发病季节特征不明显。提示不同季节的就诊患儿应有针对性地关注不同呼吸道病毒病原体的感染^[14-16]。

本研究发现,不同年龄组患儿的呼吸道病毒病原体检出率存在差异,3~<6 岁组患儿 9 种病毒病原体检出率最高,0~<1 岁组患儿检出率最低。0~<1、3~<6 岁和 ≥6 岁组患儿的 FluA 检出率最高,1~<3 岁组的 HRV 检出率最高,与国内文献报道基本相符。3~<6 岁组儿童日常主要在托幼机构聚集活动,近距离飞沫传染的概率大,伴随着年龄增长,活动能力逐步增强,活动范围也不断扩大,从而接触呼吸道

病原体的概率也较高,但是其自身免疫功能还在逐步完善,抵抗力相对较弱,这与病毒感染有关。0~<1 岁组婴儿大部分以母乳喂养为主,母乳中的免疫球蛋白含量较高,所以自身对病原体有一定的抵抗力;且婴儿接触外界的概率较低,主要是家庭小范围活动,因而接触病原体的机会也相对较少。

本研究通过实时荧光 RT-PCR 检测呼吸道病毒病原体的方法得出儿童呼吸道病毒病原分布情况及其流行特点,这与韶关市长期流行特点是否一致需要进行进一步的研究,不同地区、时间、温湿度、气候条件、病原体的感染及其流行情况存在较大差异。韶关市急性呼吸道感染患儿病毒检出率相对于国内其他地区而言处在中上位置。究其原因可能是:首先,与儿童自身的生长发育特点有关;其次,与韶关市所处的地理位置、气候环境等相关,因此应继续对更多可能影响因素进行深入研究,这样才能制定符合韶关市有效的儿童急性呼吸道感染疾病诊断、治疗和防控措施。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治国家科技重大专项实施项目管理办公室. 发热呼吸道症候群监测实施方案[Z]. 2009:5-9.

[2] 王梅. 小儿急性呼吸道感染的病原学研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2003, 11(2): 117-118.

[3] SEO S, WAGHMARE A, SCOTT E M, et al. Human rhinovirus detection in the lower respiratory tract of hematopoietic cell transplant recipients: Association with mortality [J]. *Haematologica*, 2017, 102(6): 1120-1130.

[4] KLOEPFER K M, DESCHAMP A R, ROSS S E, et al. In children, the micro-biota of the nasopharynx and bronchoalveolar lavage fluid are both similar and different [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2018, 53(4): 475-482.

[5] 王亚娟, 姚德秀, 燕润菊, 等. 北京地区儿童急性下呼吸道感染的病原学研究[J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(3): 159-162.

[6] 朱汝南, 邓杰, 王芳, 等. 2000 年秋冬季至 2002 年夏北京地区急性呼吸道病毒病原学研究[J]. *临*

床儿科杂志, 2003, 21(1): 25-28.

- [7] 丁韵珍, 苏梨云, 孙家娥. 2000—2002 上海地区小儿呼吸道病毒感染病毒病原学研究[J]. *临床儿科杂志*, 2004, 22(4): 220-222.
- [8] 李军, 朱启镛, 俞蕙, 等. 上海地区儿童急性下呼吸道常见病毒及鼻病毒感染的临床研究[J]. *临床儿科杂志*, 2007, 25(6): 457-461.
- [9] 陈小芳, 董琳, 李孟荣, 等. 温州地区婴幼儿急性下呼吸道感染病毒病原学分析[J]. *临床儿科杂志*, 2005, 23(7): 454-456.
- [10] 何英, 陆学东. 深圳急性呼吸道感染住院儿童常见呼吸道病毒与新现病毒的流行情况调查[C]//中国微生物学会临床微生物学专业委员会, 医学参考报社, 宁波大学医学院附属医院. 第四届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛论文汇编. 中国微生物学会临床微生物学专业委员会, 医学参考报社, 宁波大学医学院附属医院: 中国微生物学会临床微生物学专业委员会, 2013: 199.
- [11] 邱灿林, 龚萍, 唐建红, 等. 韶关市儿童急性呼吸道感染病原学及流行病学特征[J]. *中国热带医学*, 2015, 15(6): 685-688.
- [12] 李洪军, 崔燕, 杨艳娜, 等. 2011—2018 年北京市通州区儿童急性呼吸道感染九种病毒性病原体监测研究[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(8): 713-718.
- [13] 何静, 龚燕, 张万菊, 等. 2009—2010 年上海地区急性呼吸道感染病毒病原谱分析[J]. *微生物与感染*, 2011, 6(2): 90-96.
- [14] 张炜炜, 陈良琼. 江苏海安地区老年急性呼吸道感染患者病原体谱感染的流行病学调查[J]. *公共卫生与预防医学*, 2021, 32(1): 129-132.
- [15] 许美芬, 梁玲芝, 吴晓宇, 等. 台州地区呼吸道感染患儿的肺炎支原体检测结果分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(22): 2722-2724.
- [16] 秦柯君, 曹献芹, 陈派强. 铜绿假单胞菌临床分布及耐药机制研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(2): 224-227.

(收稿日期: 2023-04-18 修回日期: 2023-09-12)