

DOI:10.13350/j.cjpb.240312

• 调查研究 •

儿童呼吸系统鼻病毒感染流行特征分析*

常颖, 黄光举**, 张慧玉, 李娟, 徐静

(唐山市妇幼保健院小儿呼吸科, 河北唐山 063000)

【摘要】 目的 分析唐山市儿童感染鼻病毒的流行特点。方法 收集2021年11月到2022年7月本院1500例就诊儿童资料,收集患儿痰液标本、咽拭子标本、肺泡灌洗液标本,并采用肺炎多重检验试剂盒进行病原鉴定,采用SPSS软件比较不同年龄和型别患儿鼻病毒阳性率差异。选取30份鼻病毒阳性标本,并进行VP4/VP2区扩增和测序。结果 共计检出309例(309/1500, 20.60%)患儿携带鼻病毒,其中男186例(186/826, 22.52%),女123例(123/674, 18.25%),两组患儿鼻病毒阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=4.1352, P<0.05$)。<1岁组、1~岁组、3~岁组和≥6岁组,各组患儿鼻病毒阳性率分别为:23.39%(102/436)、21.85%(137/627)、19.56%(23/271)和10.24%(17/166),≥6岁组患儿与其他组患儿鼻病毒阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=13.1154, 11.3038$ 和6.6416,均 $P<0.05$)。共有142例(142/309, 45.95%)患儿为混合感染,其中双重感染120例,三重感染22例。双重感染中RV+RSV A型检出最多,其次是RV+ADV型。三重感染中RV+RSV A+ADV型、RV+ADV+EV型和RV+PIV3+MP型检出较多。30株鼻病毒经分子分型鉴定结果显示21株RV A型,3株RV B型和6株RV C型。A型共检出9个基因型,B型共检出1个基因型,C型共检出2个基因型。结论 本次研究中<1岁组RV阳性率最高,随着年龄增长,RV检出率下降。鼻病毒与呼吸道合胞病毒、腺病毒和副流感病毒合并感染病例较多。鼻病毒A型是本次研究中优势株。

【关键词】 儿童;鼻病毒;流行特征**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)03-0312-04

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Mar.; 19(3): 312-315.]

Epidemic characteristics of respiratory rhinovirus infection in children

CHANG Ying, HUANG Guangju, ZHANG Huiyu, LI Juan, XU Jing (Pediatric Respiratory Department, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China)***

【Abstract】 **Objective** To analyze the epidemiological characteristics of children infected with rhinovirus in Tangshan city. **Methods** The data were collected on 1500 children who visited our hospital from November 2021 to July 2022. The sputum samples, pharyngeal swab samples, and alveolar lavage fluid samples were collected from children, and a pneumonia multiple test kit was used for pathogen identification. The differences in the positive rate of rhinovirus among children of different ages and types were compared by SPSS software. 30 positive specimens of rhinovirus were selected and VP4/VP2 region amplification and sequencing was performed. **Results** A total of 309 cases (309/1500, 20.60%) of children with rhinovirus were detected, including 186 males (186/826, 22.52%) and 123 females (123/674, 18.25%). The difference in rhinovirus positive detection data between the two groups of children was statistically significant ($\chi^2=4.1352, P<0.05$). The rhinovirus positive rates in the <1 year old group, 1-year old group, 3-year old group, and ≥6 year old group were 23.39% (102/436), 21.85% (137/627), 19.56% (23/271), and 10.24% (17/166), respectively. There was a statistically significant difference in the positive detection of rhinovirus between the 6-year old group and other groups of children ($\chi^2=13.1154, 11.3038, 6.6416$, all $P<0.05$). A total of 142 children (142/309, 45.95%) were diagnosed with mixed infections, including 120 cases of double infection and 22 cases of triple infection. RV+RSV type A was the most commonly detected in double infections, followed by RV+ADV type. Among the triple infections, RV+RSV A+ADV type, RV+ADV+EV type, and RV+PIV3+MP type were more detected. The molecular typing identification of 30 strains of rhinoviruses showed 21 strains of RV A type, 3 strains of RV B type, and 6 strains of RV C type. A total of 9 genotypes were detected for type A, 1 genotype for type B, and 2 genotypes for type C. **Conclusion** In this study, the RV positive rate was the highest in the group aged <1 year, and as age increased, the RV detection rate decreased. There were many cases of co-infection between rhinoviruses, respiratory syncytial viruses, adenoviruses, and parainfluenza viruses. Rhinoviruses type A was the dominant strain in this study.

【Key words】 children; rhinovirus; epidemic characteristics* **【基金项目】** 河北省2023年度医学科学研究课题计划(No. 20231768)。** **【通讯作者】** 黄光举, E-mail: Hyzhang6411@163.com* **【作者简介】** 常颖(1988-),女,河北唐山人,本科,主治医师。研究方向:小儿呼吸系统疾病。E-mail: hwssok74gj@163.com

鼻病毒(rhinovirus, RV)是一种小型非包膜病毒属于小RNA病毒科。人是RV病毒在自然界的宿主之一,可以通过飞沫等途径进行传播。RV是引起感冒、肺炎等呼吸道感染的常见病原体^[1]。RV于19世纪50年代由在普通感冒患者中分离得到,是儿童患者呼吸道感染的主要病原体,在儿童患者中除引起上呼吸道感染外,还能引起支气管炎、哮喘急性发作、慢性阻塞性肺疾病和支气管肺炎^[2]。感染RV后主要表现为:流涕、喷嚏、咽喉肿痛、头痛和肌肉疼痛等。RV引起的感染病程较短,一般7d左右,其中发病后1~3d病情最重,少数患者感染持续两周。RV与呼吸道感染疾病的发生、发展和病程等密切相关。RV基因组是7.2 kb单链RNA,带有一个开放阅读框(ORF)。它的多蛋白由4种衣壳蛋白和7种非结构蛋白组成^[3]。VP1位于病毒衣壳的外表面,参与病毒与受体结合的过程,是产生保护性抗体的主要抗原表位。RV的衣壳蛋白VP4/VP2具有较多血清型的抗体特异中和位点,这是病毒的抗原多样性的主要原因,也会在进化过程中可不断进化产生新的变异毒株。它人类血清型最多的病毒之一,其血清型已超过200种^[4]。依据目前国际病毒分类委员会(International committee on taxonomy of viruses, ICTV)的划分标准, RV可分为RV-A、RV-B和RV-C。世界各地报道显示RV-A和RV-C是感染的主要型别,它们通常与中度和重度感染有关,而RV-B主要在轻症患者中检出,而RV-C则与哮喘发作有关^[5-7]。

本次研究收集了唐山市妇幼保健院就诊儿童资料,对唐山地区RV的流行趋势进行监测,旨在为预防RV感染制定合理防控措施提供依据。

材料与方 法

1 材 料

1.1 研究对象 收集2021年11月到2022年7月唐山市妇幼保健院1500例就诊儿童资料。纳入标准:(1)依据《诸福棠实用儿科学》诊断为支气管炎和肺炎等呼吸道感染的患儿;(2)年龄14岁以下;(3)档案资料齐全。排除标准:(1)两周内接受过抗生素治疗、免疫类治疗;(2)患有非感染性肺间质性疾病。

1.2 主要仪器与试剂 ABI-7500型荧光定量PCR分析仪,美国应用生物系统公司;MRX-150型高速冷冻离心机,日本TOMY公司;低温冰箱,青岛海尔。肺炎多重检验试剂盒,美国路明克斯(Luminex)公司;QIAamp Viral RNA Mini Kit,德国QIAGEN公司;DNA回收试剂盒(Gel Extraction Kit),德国QIAGEN公司;反转录试剂盒SuperScript™ III First-strand Synthesis system for RT-PCR,美国Invitrogen

公司;SuperScript One-step RT-PCR System with Platinum TaqDNA Polymerase,美国Invitrogen公司;PCR反应试剂,宝日生物技术有限公司;其他试剂,生工生物工程(上海)股份有限公司。

2 方 法

2.1 标本采集 收集患儿痰液标本、咽拭子标本、肺泡灌洗液标本,并将标本置于-20℃保存。痰液标本采集:清水漱口3次清洁口腔后,取患者深咳的第二口痰液。咽拭子标本采集:用压舌板辅助,避免拭子不要碰到舌头。被采集者张口发“啊”音,充分暴露咽后壁,将拭子送入口腔快速擦拭两侧腭弓和扁桃体分泌物。肺泡灌洗液标本采集参照《肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017版)》中的方法。

2.2 病毒RNA提取 细胞解冻、复苏后,将标本悬液放入细胞培养瓶内,加入5 mL细胞生长液35.2℃孵育6~8 h并在显微镜下进行观察。采用QIAamp Viral RNA Mini Kit提取病毒RNA,过程如下:取140 μL样本液,放入1.5 mL离心管中,加入按照试剂盒说明书配置好的560 μL AVL液,混匀并静置10 min。加入500 μL无水乙醇,混匀,3 000 r/min(离心半径8.7 cm)离心15 s。将上清液转移至离心柱并放入1.5 mL EP管中,10 000 r/min离心45 s,弃去EP管中液体。加入AW1缓冲液500 μL,10 000 r/min离心45 s,弃去EP管中液体。加入AW2缓冲液500 μL,12 000 r/min离心45 s,弃去外管中液体。将离心柱放入新的1.5 mL EP管中,加入AVE缓冲液60 μL,静置3 min,得到总RNA。

2.3 病原检测 采用路明克斯肺炎多重检验试剂盒检测甲型流感病毒(IFA)、乙型流感病毒(IFB)、呼吸道合胞病毒(RSVA~B)、人偏肺病毒(HMPV)、鼻病毒(RV)、肠道病毒、腺病毒(ADV)、副流感病毒(PIV1~4)、肺炎衣原体、肺炎支原体、冠状病毒和嗜肺军团菌等。操作方法依据试剂盒说明书。

2.4 RV VP4/VP2区扩增和测序 选取30株RV病毒采用一步法实时反转录聚合酶链式反应对VP4/VP2进行PCR扩增。引物设计参照文献[8]中引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应体系依据反转录试剂盒使用说明书。反应条件:45℃ 10 min;95℃ 15 s,57℃ 10 s,68℃ 15 s,循环40次。观测Ct值,当Ct值≤35,阳性;当35<Ct值<38时,重做;当Ct值≥38时,阴性。采用DNA回收试剂盒回收DNA,将cDNA于-20℃保存,操作参照试剂盒使用说明。RV VP4/VP2区扩增引物设计参照[8],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应体系:正反引物和探针各2 μL, cDNA 4 μL, Taq Mix 酶

12.5 μL, 10×PCR buffer 4 μL, ddH₂O 补足 50 μL。45 °C 30 min, 94 °C 5 min; 95 °C 15 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环 40 次; 72 °C 8 min, 4∞。产物测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2.5 序列比对 测序结果利用软件 Bioedit 软件对序列进行拼接, 与美国国家生物技术信息中心(NCBL)检索鼻病毒参考株进行对比, 用于流行病学分析。其中选取参考株的 GenBank 号具体如下: RV A 型 DQ473501、DQ473503、EF173418、FJ445111、FJ445114、FJ445117 和 FJ445175, RV B 型 DQ473485, RV C 型 EU840952、GQ223227、KJ675506 和 KF958311。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 25 软件进行统计学分析, 计数资料以百分比或率表示, 组间比比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 病毒感染特征

2021 年 11 月到 2022 年 7 月唐山市妇幼保健院 1 500 例就诊儿童中, 男 826 例, 女 674 例, 男女比 1.23 : 1。其中肺炎 1 126 例、支气管炎 287 例、毛细支气管炎 56 例、其他疾病 31 例。1 500 例患儿 RV 阳性 309 例, 检出率 20.60%。其中男性患儿检出 186 例, 检出率 22.52%; 女性患儿检出 123 例, 检出率 18.25%, 两组患儿 RV 阳性检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.1352, P < 0.05$)。

2 不同年龄感染情况

按照年龄将患儿分为 <1 岁组、1~岁组、3~岁组和 ≥6 岁组, 各组患儿 RV 阳性率分别为: 23.39% (102/436)、21.85% (137/627)、19.56% (23/271) 和 10.24% (17/166), ≥6 组患儿与 <1 岁组、1~岁组和 3~岁组患儿 RV 阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.1154, 11.3038$ 和 6.6416 , 均 $P < 0.05$)。各组患儿 RV 与其他病原混合感染检出率依次为: 10.55% (46/436)、9.41% (59/627)、10.33% (28/271) 和 5.42% (9/166)。<1 岁组 RV 阳性率最高, 随着年龄增长, RV 检出率下降。见表 1。

表 1 不同年龄鼻病毒检出情况
Table 1 Detection of rhinovirus at different ages

年龄组 (岁) Age group	检测 例数 No.	RV 阳性		RV 与其他混合感染	
		例数 No.	阳性率(%) Positive rate	例数 No.	检出率(%) Detection rate
<1	436	102	23.39	46	10.55
1~	627	137	21.85	59	9.41
3~	271	53	19.56	28	10.33
≥6	166	17	10.24	9	5.42
合计 Total	1500	309	20.60	142	9.47

3 混合感染分析

309 例 RV 阳性患儿中共有 142 例患儿为混合感染, 混合感染检出率 45.95%。混合感染中双重感染 120 例, 三重感染 22 例。双重感染中 RV+RSV A 型检出最多, 其次是 RV+ADV 型。三重感染中 RV+RSV A+ADV 型、RV+ADV+EV 型和 RV+PIV3+MP 型检出较多。本次研究中混合感染中以双重感染为主, 未检出三重以上感, 见表 2。

表 2 RV 病毒与其他病原体混合感染情况
Table 2 Mixed infection of RV virus and other pathogens

混合感染病原体 Mixed infection pathogens	病例数 No.	构成比(%) Constituent ratio
RV+RSVA	25	17.61
RV+RSV B	7	4.93
RV+PIV1	13	9.15
RV+PIV2	3	2.11
RV+PIV3	8	5.63
RV+ADV	19	13.38
RV+EV	12	8.45
RV+HMPV	10	7.04
RV+IF A	3	2.11
RV+IF B	1	0.70
RV+MP	14	9.86
RV+HBOV	5	3.52
RV+RSV A+ADV	4	2.82
RV+RSV A+IF A	3	2.11
RV+RSV A+PIV3	2	1.41
RV+RSV A+MP	3	2.11
RV+ADV+EV	4	2.82
RV+ADV+IF A	2	1.41
RV+PIV3+MP	4	2.82
合计 Total	142	100.00

注: RV 鼻病毒, RSV 呼吸道合胞病毒, PIV 副流感病毒, ADV 腺病毒, EV 肠道病毒, HMPV 人偏肺病毒, IF 流感病毒, MP 肺炎支原体, HBOV 博卡病毒。

4 分型研究

30 株鼻病毒经分子分型鉴定, 21 株 RV A 型, 3 株 RV B 型和 6 株 RV C 型, 其中 RV A 型是本次研究中优势株。21 株 RV A 型共检出 9 个基因型, 其中 A1 型 5 株、A11 型 4 株、A12 型 3 株、A21 型 2 株、A29 型 3 株、A36 型 2 株、A49 型 1 株和 A61 型 1 株; 3 株 RV B 型均为 B3 型; 6 株 RV C 型共检出两个型别分别为: 2 株 C5 型和 4 株 C15 型。

讨 论

RV 是呼吸道感染的常见病原体, 它具有高度传染性, 是儿童呼吸道感染的常见病因。它首次在 1956 年从一名成年感冒患者中分离获得。在美国, 每年由 RV 感染导致的病例数超过 10 亿人次, 给经济带来很大负担。约有 10%~50% 的感冒由 RV 引起, 而成年人一年平均感染 RV 2~5 次, 儿童可达 10 多次。儿童由于免疫系统不成熟, RV 与受体连接位点隐匿, 因

而易发 RV 感染,其发病次数多于成人^[8-9]。唐山地区在我国年平均气温较适中的城市,人口密度又较大,有利于 RV 传播。本次研究对 1 500 患儿调查研究中 RV 阳性率 20.60%,其中 <1 岁组 RV 阳性率最高,随着年龄增长,RV 检出率下降。这与国内其他研究一致^[1,3]。RV 能够引起多种呼吸道疾病。本次就诊患者中 1 126 例诊断为肺炎、287 例支气管炎、56 例毛细支气管炎和 31 例诊断为其他疾病。它引起上呼吸道症状,通常较温和,且通过一段时间可自行消失。但是,当感染侵犯到下呼吸道时,可导致慢性呼吸道疾病和哮喘的发生,特别是对儿童、免疫抑制人群和老年人的危害更大,严重时甚至危及生命^[10]。

RV 常与其他病原体同时检出,混合模式也非常复杂。本次研究中 RV 与 RSV、ADV 和 PIV 合并感染病例较多。王焕焕研究显示 RV 与其他病毒合并感染和 RV 单独感染临床症状相似,这可能与 RV 具有较强的致病性有关,但 RV 与 RSV 合并感染比单独 RV 感染更加严重^[11]。有研究显示 RSV 感染引起毛细支气管炎的婴幼儿的年龄显著低于 RV 感染引起毛细支气管炎患儿年龄,而症状评分 RSV 更高^[12]。Ishizuka 等^[13]研究显示 RV 感染后血小板活化因子受体的水平升高,从而肺炎链球菌易于附着在气管上皮细胞。

RV 病毒有 4 个结构蛋白,其中 VP4 位于衣壳内部,其余三个结构蛋白暴露在病毒壳粒表面。VP4 相对保守,其基因序列关键位点的变化在 RV 的生物学特性中起着重要的作用。因此,国际上常以 VP4/VP2 基因序列作为 RV 分型的依据^[14]。RV 感染对患者的健康和生活质量造成了严重影响,也给家庭和社会造成了经济负担^[15-16]。随着全球化加剧和人口流动性增大,RV 各种血清型或基因型在全球范围内呈多样性分布。截至目前已发现的 RV 血清型超过 120 种,可将其分为三个基因组分别为 A、B 和 C 组。本次研究中共计检出 21 株 RV A 型,3 株 RV B 型和 6 株 RV C 型。本次研究中 A 型检出最多,其次是 C 型,这与杨康等研究一致^[17]。疫苗的研究重点是研发一种能对多种血清型都有保护作用的通用疫苗。由于 RV 的血清型较多,且不同血清型之间缺乏交叉免疫保护作用,这给疫苗的研发造成了困难。因而,目前还没有可以预防和治疗 RV 感染引起的呼吸道感染性疾病的有效疫苗或药物。本研究初步对 2021 年 11 月到 2022 年 7 月唐山地区 RV 流行特点进行了调查研究,但由于仅对部分样本 VP4/VP2 进行检测,所以仍存在一定局限性,对 RV 在此期间流行特点分析存在一定影响。

【参考文献】

- [1] 夏百成,马英伟,孙利伟,等. 2019-2021 年长春市儿童急性呼吸道感染病例中鼻病毒感染状况及其分子分型研究[J]. 疾病监测, 2022,37(4):469-474.
- [2] Kan OK, Washio Y, Fujimoto T, et al. Differences in the spectrum of respiratory viruses and detection of human rhinovirus C in exacerbations of adult asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respir Investig,2022,60(1):129-136.
- [3] 谭力,施婷婷,李明,等. 鼻病毒及所致人类疾病的研究进展[J]. 中国医药指南,2023,21(12):57-59.
- [4] 李岩,韩光跃,姜彩肖,等. 河北省石家庄地区某哨点医院 2018-2020 年住院儿童肺炎患者鼻病毒流行病学及基因特征分析[J]. 中国病毒病杂志,2021,11(04):303-307.
- [5] Da Costa Souza L, Bello EIM, Dos Santos EM, et al. Molecular and clinical characteristics related to rhinovirus infection in Brasilia, Brazil[J]. Braz Microbiol, 2021,52(1):289-298.
- [6] Lauinger IL, Bible IM, Halligan EP, et al. Patient characteristics and severity of human rhinovirus infections in children[J]. J Clin Virol, 2013,58(1):216-220.
- [7] Ko FW, Chan PK, Chan RWY, et al. Molecular detection of respiratory pathogens and typing of human rhinovirus of adults hospitalized for exacerbation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respir Res, 2019,20(1):210.
- [8] Tran DN, Trinh QD, Pham NT, et al. Human rhinovirus infections in hospitalized children: clinical, epidemiological and virological features[J]. Epidemiol Infect, 2016,144(2):346-354.
- [9] Thongpan I, Vichaiwattana P, Vongpunasawadpoovorawan Y. Upsurge of human rhinovirus infection followed by a delayed seasonal respiratory syncytial virus infection in Thai children during the corona virus pandemic[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2021(156):711-720.
- [10] To KKW, Yip CCY, Yuen KY. Rhinovirus From bench to bedside[J]. J Formos Med Assoc, 2017,116(7):496-504.
- [11] 王焕焕. 北京地区呼吸道感染住院儿童中人鼻病毒的流行状况和基因特征分析[D]. 泰山医学院, 2011.
- [12] Midulla F, Scagnolari C, Bonci E, et al. Respiratory syncytial virus, human bocavirus and rhinovirus bronchiolitis in infants [J]. Arch Dis Child, 2010,95:35-41.
- [13] Ishizuka S, Yamaya M, Suzuki T, et al. Effects of rhinovirus infection on the adherence of Streptococcus pneumoniae to cultured human airway epithelial cells[J]. J Infect Dis, 2003, 188(12):1928-1939.
- [14] 赵怀龙,吕燕,赵红,等. 济南市人鼻病毒 B83 型基因组特征及分子变异分析[J]. 山东大学学报(医学版), 2021,59(5):68-72, 81.
- [15] 高丽娟,金肖,赖灵巧,等. 1 652 例患儿下呼吸道感染病毒谱及流行病学特征调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2023,18(4):443-446.
- [16] 贾松伟,刘宇,张义堂. 儿童呼吸道病毒感染病原学特征分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022,17(9):1048-1052.
- [17] 杨康,谢家敏,黄鑫鑫,等. 2019-2021 年广东省严重急性呼吸道感染病例中鼻病毒流行情况及其分子分型研究[J]. 病毒学报, 2023,39(2):364-371.