

液相芯片 MASA 技术用于儿童呼吸道感染病原学研究*

夏 骏^{1,2}, 邓 菲¹, 金润铭³, 王 琳³, 王丽娜³, 胡志红¹, 刘 芳^{2**}, 王华林^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒所病毒学国家重点实验室、中国科学院分子病毒学重点实验室、无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 湖北武汉 430071; 2. 武汉大学病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430071; 3. 华中科技大学同济医学院协和医院儿科, 湖北武汉 430022)

Etiological Study of Respiratory Tract Infections in Children by Using

Multi-analyte Suspension Array Technology*

XIA Jun^{1,2}, DENG Fei¹, JIN Run-ming³, WANG Lin³, WANG Li-na³, HU Zhi-hong¹,
LIU Fang^{2**}, WANG Hua-lin^{1**}

(1. State Key Laboratory of Virology, Key Laboratory of Molecular Virology of CAS, Joint-lab of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Department of Pediatrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: The etiology of respiratory tract infection (RTI) pathogens, e. g. *Human respiratory syncytial virus A and B (RSVA, RSVB)*, *Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-Cov)*, *Influenza A virus and Influenza B virus (INFa, INFb)*, *Influenza A virus Parainfluenza virus 1 and 3 (PIV1, PIV3)*, *M. pneumoniae (MPN)* and *C. pneumoniae (CPN)*, were investigated using Multi-Analyte Suspension Array (MASA) technology. Samples were collected from throat swabs of 140 children symptomatic of typical respiratory tract infection. Ninety-five samples (67.85%) were positive for at least one of the above pathogens. The infection rate was 35.71% for RSVB, 4.29% for PIV3, 28.57% for INFa, 2.14% for INFb, 3.57% for MPN and 17.86% for CPN. The ratio of mixed infection was 17.14%. RSVA, PIV1, SARS were not detected. The infection rate of RSVB in children younger than 3 years was higher than that for children older than 3 years, while, INFa in children younger than 3 years was lower than that of children older than 3 years. The rate of INFa infection in the upper respiratory tract (URT) was higher than that in the lower respiratory tract (LRT). The opposite was found for infection with RSVB infection. We conclude that RSVB, INFa and CPN are the main pathogens that cause the RTI in children in Wuhan. Furthermore, RSVB appears to be the main pathogen that causes the RTI in younger children and LRTI in children.

Key words: MASA; Respiratory tract infection; Pathogen; Children

摘要: 利用多靶点液相芯片 (Multi-Analyte Suspension Array, MASA) 技术对引起儿童呼吸道感染 (respiratory tract infections, RTI) 的病原, 包括人类呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型 (*Human respiratory syncytial virus A and B, RSVA, RSVB*)、严重急性呼吸综合征冠状病毒 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV*)、流行性感冒病毒 A 型和 B 型 (*Influenza A virus and Influenza B virus, INFa, INFb*)、副流感病毒 1 型和 3 型 (*Parainfluenza virus 1 and 3, PIV1, PIV3*)、衣原体 (*C. pneumoniae, CPN*) 和支原体 (*M. pneumoniae, MPN*) 进行了病原学研究。我们采集并分析了 140 例患典型呼吸道感染症状儿童的咽拭子, 发现在这些标本中至少被前述的一种病

收稿日期: 2005-05-23, 修回日期: 2005-08-09

* 基金项目: 国家 863 项目 (2005AA219070); 科技部科研院所社会公益研究专项计划项目 (2000DIA40018)

作者简介: 夏 骏 (1980-), 男, 硕士研究生, 临床检验诊断学专业, 现从事呼吸道传染病的分子生物学研究。

** 通讯作者: 王华林 (1974-), 男, 博士, 副研究员。刘芳 (1969-), 女, 博士, 副教授。

Corresponding author. Tel: 027-87197327, E-mail: h. wang@wh. iov. cn

原感染的标本有 95 例,阳性率为 67.86%。结果显示这些标本中上述病原感染的情况分别为:RSVB 感染的患儿占 35.71%、PIV3 感染的占 4.29%、INFa 感染的占 28.57%、INFb 感染的占 2.14%、MPN 感染的占 3.57%、CPN 感染的占 17.86%,被两种以上病原混合感染的患儿有 17.14%。这些标本中都没有检测到 RSVA、PIV1 和 SARS-CoV 病原的感染。RSVB 病原的感染率在 3 岁以下的患儿中明显高于 3 岁以上的患儿,而 INFa 的感染情况则相反;在上呼吸道感染患儿中检测到 INFa 病原感染的比例明显高于下呼吸道感染,而 RSVB 病原感染的情况相反。此外,我们发现在 2005 年 3 月 - 5 月中造成武汉地区儿童呼吸道感染的主要病原是以 RSVB、INFa、CPN 为主,而 RSVB 感染则又是引起儿童下呼吸道感染和引起低龄儿童呼吸道感染的重要病原。

关键词:液相芯片;呼吸道感染;病原;儿童

中图分类号:R511

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)06-0586-04

呼吸道感染(Respiratory tract infection, RTI)是人类最常见的一种疾病,这种疾病的发生不分地域、性别或年龄。病毒等多种病原感染是引起 RTI 的一个非常重要的原因,更是引起儿童 RTI 的常见原因^[1]。在我国,儿童 RTI 是儿科最常见疾病,其中下呼吸道感染(Lower respiratory tract infection, LRTI)患儿在儿童住院病人中占有很大的比例。引起儿童呼吸道感染的病原学十分复杂,目前临床上尚缺少能够高特异性且快速检出多种 RTI 病原的诊断方法,因此这样一种方法的建立已是当前的研究热点^[2]。

液相芯片(Multi-analyte suspension array, MASA)作为一种新型的低密度基因芯片技术,具有高通量、灵敏度高、速度快的特点^[3]。本研究中我们应用基于液相芯片 MASA 技术的 LUMINEX 100™ MASA 平台对 RTI 患儿咽拭子中多病原的核酸进行了检测,证实了该方法是一种能够给临床提供及时准确诊断资料的有效方法,用此方法我们同时也对武汉地区儿童 RTI 病原学的分布进行了初步的流行病学分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用样本来源于武汉市协和医院儿科就诊和住院的有呼吸道感染症状(Respiratory tract infection, RTI)的患儿。并依照诊断标准^[4],记录患儿相关感染的症状和体征,分别归类记录为上呼吸道感染(Upper respiratory tract infection, URTI)、下呼吸道感染(Lower respiratory tract infection, LRTI)及其它感染三类。

用于样本采集的器材、采样液的准备参考文献^[5]介绍方法进行。采样器材均高压灭菌,所有用于 RNA 操作的试剂、器材均用 DEPC 处理或使用 RNA 专用器材。标本的采集用无菌棉签采集患儿咽分泌物,采集后标本放置在 $\leq 4^{\circ}\text{C}$ 条件下,并于 24h 内送至实验室,立即提取各种病原遗传物质,不

能立即处理的标本置于一 80°C 保存。

1.2 标本中病原核酸的提取

核酸(DNA/RNA)的提取参照 Invitrogen Trizol 试剂使用说明进行。提取出的核酸立即用于下一步操作,不能立即处理的置于一 80°C 保存。

1.3 标本中病原的检测

本研究中多病原的检测使用美国 Genaco 公司开发的 Molecular Differential Diagnostic (MDD) System for Respiratory Infections 试剂盒,使用方法根据说明书进行。该试剂盒基于 LUMINEX 100™ MASA 技术平台,能同时检测出 RTI 病人咽拭标本中多种病原核酸,包括人类呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型(*Human Respiratory syncytial virus A and B*, RSVA, RSVB)、严重急性呼吸综合征冠状病毒(*Severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS-Cov)、流行性感病毒 A 型和 B 型(*Influenza A virus and Influenza B virus*, INFa, INFb)、副流感病毒 1 型和 3 型(*Parainfluenza virus 1 and 3*, PIV1, PIV3)、衣原体(*C. pneumoniae*, CPN)和支原体(*M. pneumoniae*, MPN)。RT-PCR 使用美国 Qiagen 公司的一步法逆转录 PCR 试剂盒(Cat No. 210212)。

1.4 结果分析

依据试剂盒的使用说明对所检测到的荧光信号进行结果判断。实验结果用 SPSS 12.0 统计软件分析统计数据,样本率的比较采用 χ^2 检验(理论值小于 5 时使用校正公式)。

2 结果与讨论

2.1 不同年龄段呼吸道感染病原感染的阳性率

在这次对武汉地区 RTI 患儿病原学研究中,我们随机采集了 2005 年春(3 月~5 月)来武汉市协和医院儿科就诊和住院的有 RTI 症状的患儿的咽拭子标本 140 例,其中男性患儿 88 例,女性患儿 52 例,男女患儿比例为 1.7 : 1。由于不同年龄患儿活动范围及可能接触到的人群不同,例如小于 1 岁和

1岁~3岁患儿主要在家中抚养;3岁~6岁患儿已上幼儿园;6岁~14岁患儿已上小学等,我们根据年龄将患儿分成不同的年龄段进行分析。采样患儿的平均年龄为3.1岁,其中小于1岁的患儿标本32例,1岁~3岁43例,3周岁~6岁40例,6周岁~14岁25例。这些标本中具有上呼吸道感染(URTI)特征的有60例,下呼吸道感染特征(LRTI)的有76例,其他4例。

使用美国 Genaco 公司的 Molecular Differential Diagnostic (MDD) System for Respiratory Infections 试剂盒,我们对这 140 例诊断为各种呼吸道疾病患儿的咽拭标本进行了分析,共检出呼吸道病原感染阳性的标本 95 例,阳性率为 67.86%,高于王亚娟等的研究结果^[6],推测可能与地域、气候和所使用的方法有一定的关系。对标本的多呼吸道病原感染情况依据上述的年龄分组分析发现,在小于 1 岁、1~3 岁、3~6 岁、6~14 岁患儿中的总呼吸道病原感染阳性率比较相近,阳性率分别为 68.75%、67.44%、70% 和 64%,因此我们认为总呼吸道病原感染在活动范围不同的患儿中没有太大差异。

2.2 各种呼吸道病原分别在总标本中被检出的阳性率

如表 1,在所检测的 9 种病原中,SARS-Cov、RSVA、PIV1 三种病毒没有被检测出,RSVB 的阳性率在各种病毒的阳性率中是最高的,推测是引起本季节中儿童 RTI 的主要原因,这与 Hemming VG^[7]等的研究结果一致。

表 1 各种病原检测阳性率
Table 1 Positive rate of each pathogen

Pathogens	Number of positive	Number of total	Positive rate of each pathogen (%)
	samples (cases)	samples (cases)	
RSVB	50	140	35.71
PIV3	6	140	4.29
INFa	40	140	28.57
INFb	3	140	2.14
MPN	5	140	3.57
CPN	25	140	17.86
Mixed infection	24	140	17.14

RSVB: Human respiratory syncytial virus B; PIV3: Parainfluenza virus 1 and 3; INFa: Influenza A virus; INFb: Influenza B virus; MPN: *M. pneumoniae*; CPN: *C. pneumoniae*

在本次调查中,我们检测出的流感病毒感染以 A 型流感病毒为主,说明这段时间感染儿童的流感病毒主要是 A 型流感病毒。

我们同时检测到 24 例混合感染情况,在所有的 24 例混合感染中,发现被三种病原同时感染的标本有 9 例,被两种病原同时感染的有 15 例。其中在 18 份标本检测出 CPN 感染,15 份标本检测出 RSVB 感染,说明这两种病原在混合感染中占有很大的比例。

2.3 各种病原感染阳性率在不同年龄段中差异的比较

表 2 列出了各个年龄段中,各种病原检出的阳性情况。为了进一步研究各个年龄段病原感染情况,以 3 岁为界,将标本分为两组。对于 RSVB 感染,我们检测到 3 岁以下阳性标本为 34 例(45.33%),3 周岁以上的阳性标本为 16 例(24.62%),两组阳性率比较, $\chi^2=6.510$, $P=0.011$,在 $\alpha=0.05$ 水平差别有显著性的统计学意义,表明 RSVB 是低龄儿童 RTI 的主要病原,国外文献^[8]亦有报道。

表 2 各个年龄段病原感染阳性率[n(%)]
Table 2 Positive rate of pathogens in each age group[n(%)]

Pathogens	<1 years	1~3 years	3~6 years	6~14 years
RSVB	14(43.75)	20(46.51)	11(27.50)	5(20.00)
PIV3	2(6.25)	1(2.33)	2(5.00)	1(4.00)
INFa	7(21.88)	9(20.93)	14(35.00)	10(40.00)
INFb	0(0.00)	2(4.65)	1(2.50)	0(0.00)
MPN	1(3.13)	0(0.00)	3(7.50)	1(4.00)
CPN	5(15.63)	6(13.95)	7(17.50)	7(28.00)
Mixed infection	4(12.50)	5(11.63)	9(22.50)	6(24.00)

RSVB: Human Respiratory syncytial virus B; PIV3: Parainfluenza virus 1 and 3; INFa: Influenza A virus; INFb: Influenza B virus; MPN: *M. pneumoniae*; CPN: *C. pneumoniae*

对于 INFa, 3 岁以下阳性标本为 16 例(21.33%),3 周岁以上阳性标本为 24 例(36.92%),两组比较, $\chi^2=4.147$, $P=0.042$,在 $\alpha=0.05$ 水平差别有显著性统计学意义,我们分析其原因可能与 3 岁以上儿童暴露于病原中的机率更大有关。

2.4 症状和体征与病原感染间的关系

对于所收集的呼吸道感染患儿的标本,患儿的症状和体征都有详细的记录,其中咽部充血的患儿 117 例,咳痰患儿 76 例,喘息患儿 42 例。在 42 例喘息患儿中,我们检测出 RSVB 阳性标本 22 例,占 52.38%,表明 RSVB 感染与 UTI 患儿喘息症状有一定的相关性。

2.5 各种诊断分类统计差异的比较

依据患儿的病历资料和对应的检测结果,140

例患儿的感染可以归类为上呼吸道感染(URTI)、下呼吸道感染(LRTI)和其他感染。其中 URTI 有 60 例,被诊断为急性上呼吸道感染的最多,有 31 例,扁桃体炎 16 例,咽炎 6 例,鼻炎有 3 例。LRTI 有 76 例,其中喘息型支气管炎(asthmatic bronchitis)最多,共有 28 例,哮喘(asthma)有 24 例,肺炎(pneumonia)14 例,支气管炎(bronchitis)有 10 例。

在 URTI 患儿中我们用试剂盒共检测出的阳性标本 46 例,阳性率为 76.67%;在 LRTI 患儿中共检测出阳性标本 48 例,阳性率为 63.16%。在诊断为 LRTI 的患儿中,婴幼儿喘息型支气管炎和哮喘的患儿最多(28 例和 24 例),患儿的平均年龄分别是 1.47 岁和 2.86 岁。而在这两种疾病中,RSVB 的检出率是最高的,分别为 18 例(54.29%)和 8 例(33.33%)。提示 RSVB 可能是引起这两种疾病的重要原因。

表 3 中我们比较了三种主要病原在诊断为 URTI 和 LRTI 患儿中的阳性率。可以看出 RSVB 在 LRTI 组中阳性率明显高于 URTI 组,INFa 则相反,而 CPN 在两组中没有差别。

表 3 3 种主要病原在 URTI 和 LRTI 中阳性率的比较
Table 3 Comparison of positive rates of three major pathogens in URTI and LRTI

Pathogens	URTI n (%)	LRTI n (%)	X^2	<i>P</i>
RSVB	16(26.67)	34(44.74)	4.709	0.030
INFa	27(45.00)	12(15.79)	13.988	< 0.001
CPN	14(23.33)	11(14.47)	1.754	0.185

RSVB: Human Respiratory syncytial virus B; INFa: *Influenza A virus*; CPN: *C. pneumoniae*

通过本次的调查研究,我们分析了在 2005 年春武汉地区引起儿童呼吸道感染的各种病原情况和相

关的影响因素,这对于指导临床诊断和治疗具有明显的意义。在本实验中我们应用了美国 Genaco 公司提供的 Molecular Differential Diagnostic (MDD) System for Respiratory Infections 诊断试剂盒,在 LUMINEX 100™ MASA 平台上进行了 11 种呼吸道病原的同时检测,结果显示该方法方便快捷,与传统的病原培养方法相比具有明显的优势。另外,作为一种最新的检测技术,液相芯片技术不仅具有快速、经济的进行病原诊断的特点(整个过程只需要一天),同时也具有所需的样本量小的特点,因此容易被患者接受,值得在临床诊断中推广。

参考文献

- [1] Chew F T, Doraisingham S, Ling A E, *et al.* Seasonal trend of viral respiratory tract infections in the tropics[J]. *Epidemiol Infect*, 1998, 121: 121-128.
- [2] Xiang X Y, Qiu D W, Chan K P, *et al.* Comparison of three methods for respiratory virus detection between induced sputum and nasopharyngeal aspirate specimens in acute asthma [J]. *J Virol Methods*, 2002, 101: 127-133.
- [3] Dunbar S A, Vander Zee C A, Oliver K G, *et al.* Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP™ system[J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 53: 245-252.
- [4] 杨锡强,易著文. 儿科学[M]. 第六版,北京:人民卫生出版社,2004. 302-318.
- [5] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒及实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997. 186.
- [6] 王亚娟,姚德秀,燕润菊,等. 北京地区儿童下呼吸道感染的病原学研究[J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38: 159-162.
- [7] Hemming V G. Viral respiratory diseases in children: classification, etiology, epidemiology, and risk factors[J]. *J Pediatr*, 1994, 124:613-616.
- [8] Bakir T M, Halawani M, Ramia S, *et al.* Viral aetiology and epidemiology of acute respiratory infections in hospitalized Saudi children[J]. *J Trop Pediatr*, 1998, 44: 100.