

三水地区急性呼吸道感染儿童的常见病毒谱分析*

张巧玲¹, 钟斌才², 唐永梅¹ (广东省佛山市三水区人民医院: 1. 检验科; 2. 儿科 528100)

【摘要】 目的 分析三水地区急性呼吸道感染儿童的病毒病原学特点。**方法** 采用直接免疫荧光法对 2013 年 2 月至 2014 年 1 月因急性呼吸道感染就诊的 0~12 岁患儿鼻咽分泌物进行 7 种常见呼吸道病毒检测。**结果** 2 268 例患儿中, 749 例检出至少 1 种病毒, 总感染率为 33.0%; 12 例患儿同时检出两种病毒。共检出呼吸道合胞病毒(RSV) 252 例(33.1%), 流感病毒 A 型(IFV A) 139 例(18.3%), 副流感病毒 III 型(PIV III) 108 例(14.2%), 腺病毒(ADV) 101 例(13.3%), 副流感病毒 I 型(PIV I) 79 例(10.4%), 流感病毒 B 型(IFV B) 51 例(6.7%), 副流感病毒 II 型(PIV II) 31 例(4.1%)。5 岁以下患儿病毒感染率较高, RSV、PIV 2 岁前患儿多见, IFV 多见于 2 岁以上儿童, ADV 2~5 岁患儿多见。不同性别间病原谱差异无统计学意义($P>0.05$)。病毒感染的季节性比较明显, RSV 集中在春、秋季; IFVA 在 3、4、9 月高发; PIV III 和 PIV I 依次在夏、秋季高发。**结论** 病毒是三水地区儿童呼吸道感染的重要原因, 发病年龄主要在 5 岁以下, 其中 RSV、IFVA、PIV III 最常见。

【关键词】 急性呼吸道感染; 病毒; 儿童

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.14.034 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)14-1966-02

急性呼吸道病毒感染是儿科常见的疾病, 临床表现多以发热、头痛、鼻塞、流涕、咽痛、咳嗽为主, 单凭临床表现很难作出病因诊断。因其感染力强、传播速度快, 易造成局部流行, 对于住院患儿更易引起多重感染^[1-2], 反复儿童呼吸道感染对学生缺课和家庭经济压力都会造成很大的影响。因此早期特异性病原学诊断对于患儿的隔离保护和合理用药十分重要。一般实验室常用的病毒检测方法包括免疫学和核酸扩增技术两大类^[3]。核酸扩增检测可以同时检测多种病毒, 具有较好的应用前景, 但是实验条件要求较高, 要避免引起假阳性, 价钱也较高^[4]。免疫学检测方法有酶联免疫吸附试验(ELISA)、化学发光免疫分析法(CLIA)、免疫荧光法等。其中直接免疫荧光法(DFA)可以对多种呼吸道病毒进行检测, 特异性高, 操作简便, 易于在临床实验室推广, 因为取材方便, 尤其适合于儿童。本文采用 DFA 对最近 1 年来因急性呼吸道感染症状在本院就医的患儿进行了呼吸道合胞病毒(RSV)、流感病毒(IFV) A、B 型、副流感病毒(PIV) I、II、III 型及腺病毒(ADV) 检测, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入 2013 年 2 月至 2014 年 1 月因急性呼吸道感染入本院治疗的患儿共 2 268 例, 其中男 1 492 例, 女 776 例; 年龄 0~12 岁, 中位年龄 1.5 岁。临床诊断为急性上呼吸道感染、急性支气管炎、急性支气管肺炎、喘息性支气管炎, 诊断标准参照《诸福棠实用儿科学》第 7 版。患儿发病后没有进行抗病毒和激素治疗。此研究经医院伦理学委员会批准, 所有标本采集时均得到患儿家长同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有患儿均于入院当天或次日清晨采集标本。采用小儿微细型鼻咽植绒拭子, 插入鼻腔 6~8 cm, 旋转 2~3 圈, 放入装有生理盐水的塑胶试管, 1 h 内送检。

1.2.2 制片 漩涡混匀剧烈涡旋样本, 使细胞脱落; 弃掉植绒拭子。2 500 r/min 离心 10 min, 小心弃掉上清液。如果沉淀含

有较多黏液, 则需要用生理盐水重复洗涤离心以去除黏液。将试管内剩余细胞混匀, 每孔滴加约 25 μ L 细胞悬液, 此时可用显微镜观察细胞数量, 太少则需要重新采样。将玻片置于 35 $^{\circ}$ C 干燥箱干燥, 待玻片彻底干燥后, 冷丙酮固定 8~10 min。

1.2.3 DFA 检测 RSV、IFV A、IFV B、PIV I、PIV II、PIV III 及 ADV 的表达 采用 DHI 公司的呼吸道病毒检测试剂盒进行检测, 荧光试剂分别含有异硫氰酸荧光素标记的针对 7 种病毒的抗原的特异性小鼠单克隆抗体, 病毒抗原分别来源于 RSV Long 病毒株、IFV A Texas1/77 H3N2 病毒株、IFV B Hongkong5/72 病毒株、PIV I VP-1 病毒株、PIV II Greer 病毒株、PIV III C243 病毒株、ADV 3 型 GB 株/6 型株感染的细胞。固定好的玻片和阳性、阴性对照孔分别滴加针对 RSV、IFV A、IFV B、PIV I、PIV II、PIV III 及 ADV 的荧光试剂; 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 注意保湿; 用磷酸盐吐温缓冲液洗涤液进行洗涤。风干玻片, 滴加封固液, 用盖玻片覆其上。荧光试剂与患儿细胞中相应的病毒抗原结合后, 形成抗原抗体复合物, 采用德国 DM2000 荧光显微镜进行观察, 激发波长为 490 nm, 发射波长为 520 nm。阳性细胞内显示绿色荧光, 而未发生抗原抗体特异性反应的细胞被 Evans 蓝染成红色。每孔细胞涂片应不少于 200 个上皮细胞, 当放大倍数为 200 倍时, 在视野中找到大于或等于 2 个阳性细胞, 判断为标本阳性。阳性对照孔分别含有不同病毒感染的细胞, 阴性对照孔为未感染细胞。

1.3 统计学方法 应用 SPSS15.0 软件进行统计, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总体感染情况 2 268 例患儿中有 749 例至少检出一种病毒, 总阳性率 33.0% (749/2 268), 男患儿感染率 33.2% (497/1 492), 女患儿感染率 32.5% (252/776), 经 χ^2 检验, 性别之间差异无统计学意义($P>0.05$)。有 12 例标本同时检出两种病毒, 分别为 PIV I 合并 RSV 3 例、合并 IFV B 2 例; PIV III 合并 RSV 3 例、合并 IFV A 1 例、合并 ADV 2 例; IFB 合并

* 基金项目: 广东省佛山市卫生局医学科研立项(2014192)。

ADV 1 例。

2.2 不同病毒感染病原谱 阳性标本共检出 RSV252 例 (33.1%),IFV A 139 例 (18.3%),PIV Ⅲ 108 例 (14.2%),ADV 101 例 (13.3%),PIV I 79 例 (10.4%),IFV B 51 例 (6.7%),PIV Ⅱ 31 例 (4.1%)。优势病原为 RSV、IFV A 及 PIV Ⅲ,见表 1。

表 1 不同年龄段患儿 7 种病毒亚型检出结果

年龄 (个月)	n	RSV	ADV	IFV A	IFV B	PIV I	PIV Ⅱ	PIV Ⅲ	合计
≤6	424	82	4	10	2	4	4	28	134
>6~12	506	72	20	18	2	23	2	37	174
>12~24	425	55	19	27	4	22	8	28	163
>24~60	567	41	45	56	27	28	12	12	221
>60	346	2	13	28	16	2	5	3	69
合计	2 268	252	101	139	51	79	31	108	761

2.3 不同年龄段患儿各种病毒检出结果 0~12 岁患儿感染 7 种常见呼吸道病毒感染率存在差异(图 1),0~5 岁患儿总体感染率较高,可达 39.0%;5~12 岁患儿病毒感染率较低,为 19.9%。不同病毒的易感年龄在 2 岁(24 个月)前患儿 RSV 感染率较高,且随月龄增长 RSV 感染率下降;IFV A 型和 B 型 2 岁以上患儿多见;PIV 感染多见于 2 岁(24 个月)以下患儿,以 PIV Ⅲ和 PIV I 感染最常见;ADV 感染则以 2~5 岁患儿最常见。

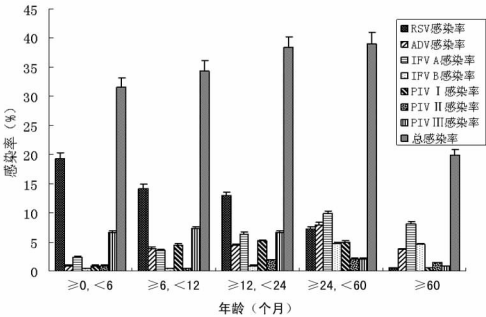


图 1 0~12 岁(60 个月)患儿常见呼吸道病毒感染率

2.4 不同月份各种病毒检出结果 从 2013 年 2 月到 2014 年 1 月不同月份 7 种病毒的感染率见图 2,由图 2 可见,1 年中除了 10、11 月份病毒感染率较低外,其余月份在儿童呼吸道疾病中病毒的感染率都是较高的。在春、夏季的 2~9 月份 RSV 处于持续高发;在春季的 3、4 月和 9 月 IFVA 形成了高发季节;ADV 在冬季较常见;副流感病毒则在夏秋季为高发季节。

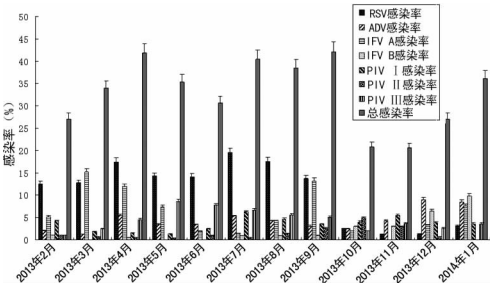


图 2 不同月份患儿常见呼吸道病毒检出率

3 讨论

RSV 属副黏病毒科,是肺病毒属成员,是婴儿和儿童下呼吸道感染疾病的重要病原之一,在急诊呼吸道感染婴幼儿中,RSV 是可检出的最常见的呼吸道病毒^[5-6];IFV A、B 型和 PIV I、Ⅱ、Ⅲ型是上呼吸道感染疾病的常见病原^[7],春季为 IFV A 多发季节,对于免疫力低下的患者容易引起重症肺炎;ADV 也是儿童急性呼吸道感染的常见病原,特别是儿童重症肺炎的重要病原之一。以上呼吸道病毒是社区获得性肺炎的病原,快速诊断可减少抗生素的滥用,对于指导 IFV A 引起的重症监护病房患者重症肺炎的早期诊断、尽快使用神经氨酸酶抑制剂以控制病情具有重要意义。

本研究 2 268 例标本中病毒感染总阳性率为 33.0%,优势病原谱为 RSV、IFVA 及 PIV Ⅲ,与北京及甘肃地区的研究一致^[8-9]。不同病毒易感年龄也不相同,如 RSV 易感患儿为 1 岁前,IFV 及 ADV 患儿多为 2 岁以上,而 PIV 感染者以 1~2 岁最多见。总体病毒感染水平在 5 岁前随年龄增长略有上升趋势,最高(2~5 岁)达到了 39.0%,而 5 岁以上患儿病毒感染率下降为 19.9%。国内各地区对于呼吸道病毒的报道也各不相同,田曼等^[10]报道南京地区儿童急性下呼吸道感染的病毒阳性率为 49.5%,其中 RSV 占 51.1%,以 1 岁以下儿童检出率最高;温州某医院报道 2006~2010 年急性呼吸道感染的住院儿童中病毒阳性率为 25.1%,阳性率由高到低依次为 RSV、PIV Ⅲ、ADV、IFV A、PIV I、PIV Ⅱ、IFV B^[11],由此可见不同地区的病原谱有所不同。在 749 例阳性标本中,共有 12 例标本同时检出了两种病毒,与检测抗体的间接免疫荧光法^[12]或 RT-PCR^[4]相比较,多重感染在本研究不多见,原因可能是本文所用方法(DFA)检测的是病毒抗原,检出的病例多为感染早期和急性期患儿,此时多重感染少见;而住院时间较长、免疫力低下的患儿多重感染较多见^[2]。

呼吸道病毒感染具有一定的季节性,南京报道当地儿童病毒感染的高发季节为 11 月至次年的 4 月^[10],韩国的一项研究报道当地流感病毒的高发季节为冬、春季,PIV I 高发季节为夏、秋季,PIV Ⅲ高发季节为秋季,RSV 在秋、冬季高发^[4]。由图 2 可见,在三水地区 4~6 月和 8~10 月形成了 2 个病毒高发的时段;春季到夏季为 RSV 高发季节;IFV A 在气候温暖的春季和秋季高发;PIV Ⅲ和 PIV I 依次在夏、秋季高发。这些数据为掌握三水地区呼吸道病毒感染的流行病学提供了第一手资料。

随着医学技术的进步,不断有新的致病病毒被发现,如人冠状病毒、人感染禽流感病毒等,面对呼吸道病毒疾病对我国儿童健康的挑战,一定要加深认识,积极防治。利用 DFA 对常见儿童呼吸道病毒抗原的快速检测,可作为临床诊断病原体的标准,为临床诊疗提供可靠的依据。通过对儿童急性下呼吸道感染患儿的病毒病原学检测,可准确快速掌握三水地区儿童呼吸道感染的病原学特征,为三水地区病毒性疾病的预防奠定基础。

参考文献

[1] Chorazy ML, Lebeck MG, McCarthy TA, et al. Polymicrobial acute respiratory infections in a hospital-based pediatric population[J]. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32(5): 460-466. (下转第 1970 页)

域的右侧出现大量散点(图 5)及幼稚细胞(IMI)杆状核细胞上方出现大量散点(图 6)时表示标本凝集,且随凝集程度加重而明显。镜下可见几个甚至几十个 PLT 聚集在一起,多见于新生儿、肥胖患者等抽血不当或组织液混入,此类标本经重新抽血复查后无警示提示。本研究中有 13 例标本镜下红细胞缟钱状凝集,均可见 $MCHC > 380 \text{ g/L}$, PLT 不同程度降低,经 37°C 水浴 10 min 后测定无警示提示,多见血液病患者或血液处于高凝状态的心肌梗死、脑血栓患者。抗凝剂 EDTA 依赖性假性 PLT 减少(EDTA-PTCP)发生率较低,常被忽视,造成误诊误治^[6]。本组出现 11 例 EDTA-PTCP,可见直方图与散点图明显改变,用枸橼酸抗凝剂重新采血或采集末梢血用预稀释方法手工计数后结果无显著性差异。本组 3 例因临床使用硫酸镁来预防控制妊娠高血压综合征子痫的发作及用于治疗先兆子痫造成 PLT 计数假性降低,高浓度镁离子有类似钙离子的生理作用,通过改变 PLT 内环磷酸腺苷水平而引起聚集造成 PLT 计数假性降低^[7],降低硫酸镁浓度后重新抽血检验后无警示提示。

3.4 未见明显异常 PLT 组 本研究中 291 例标本有警示提示,但 PLT 直方图未见明显变化且手工计数与血液分析仪计数未见明显差异,这种情况可能是上述 3 种情况不明显或标本存在潜在干扰因素(如黄疸、脂血、轻微溶血或药物治疗后影响等),有待进一步研究。镜检可见有些病例同时存在小红细胞和大 PLT,但大多未见明显异常。XE-2100 警示信息(Q-Flags)临界值设为 100,若测定的参数低于 100 则定为阴性,100~300 定为阳性^[8]。由表 2 可见,随着 Q-Flags 警示量级点增高阳性率逐渐增高,与李宝青等^[9]研究结果一致,可见实验室应制订适合的复检规则以保证结果准确的同时也保证了检验人员的工作强度。

综上所述,全自动血液分析仪虽然大大提高了实验室 PLT 检测的效率,但若 PLT 计数结果提示异常信息、警示符号及 PLT 直方图异常时,检验人员应根据不同情况,选择手工

计数、涂片镜检、重取标本或更换抗凝剂等方法进行复核,把质量的每一关,才能为临床提供可靠而有价值的诊断信息。

参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三.全国临床检验操作规程[M].2版.南京:东南大学出版社,1997:136-137.
- [2] Barnes PW, Mcfadden SL, Machin SJ, et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis[J]. Lab Hematol, 2005, 11(2): 83-90.
- [3] 林桢,张玉霞. Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪对血细胞形态异常警示功能的评价和分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(18): 2266-2268.
- [4] 叶长钦,罗辉,彭兰芬,等. 小红细胞对电阻法测定血小板数影响的分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(6): 539-540.
- [5] 张家明,韩日成,洪流. 血小板异常直方图在判断血小板计数结果中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(12): 713-714.
- [6] 熊祝嘉,岳志刚,吴秀茹,等. 乙二胺四乙酸依赖性假性血小板减少症误诊 1 例[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(7): 728.
- [7] 冯艳鹏,魏月霞. 血小板计数假性异常的影响因素探讨[J]. 河北联合大学学报:医学版, 2012, 14(5): 653-654.
- [8] 刘艳奎,朴美花. XE-2100 血液分析仪对影响血小板检测的参数警示信息分析[J]. 现代预防医学, 2008, 35(14): 2749-2750.
- [9] 李宝青,叶映月,林莉,等. Sysmex XE-2100 计数血小板时出现 Q-Flags 报警提示的可靠性评价[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(2): 158-159.

(收稿日期:2013-11-03 修回日期:2014-02-06)

(上接第 1967 页)

- [2] Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis[J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2012, 166(8): 700-706.
- [3] 宋利琼,李金明. 呼吸道病毒检测方法的研究进展[J]. 国际病毒学杂志, 2012, 19(1): 30-32.
- [4] Kim JK, Jeon JS, Kim JW, et al. Epidemiology of respiratory viral infection using multiplex RT-PCR in Cheonan, Korea (2006-2010) [J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(2): 267-273.
- [5] Utokaparch S, Marchant D, Gosselink JV, et al. The relationship between respiratory viral loads and diagnosis in children presenting to a pediatric hospital emergency department[J]. Pediatr Infect Dis J, 2011, 30(2): 18-23.
- [6] Debiaggi M, Canducci F, Ceresola ER, et al. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology [J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1): 74-98.

- [7] Weinberg GA, Hall CB, Iwane MK, et al. Parainfluenza virus infection of young children: estimates of the population-based burden of hospitalization[J]. J Pediatr, 2009, 154(5): 694-699.
- [8] 刘春艳,肖艳,谢正德,等. 2010 至 2012 年门诊和住院儿童急性呼吸道感染病毒病原比较分析[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(4): 255-259.
- [9] Huang G, Yu D, Mao N, et al. Viral etiology of acute respiratory infection in gansu province, China, 2011 [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64254.
- [10] 田曼,施圣云,秦茗,等. 儿童急性下呼吸道感染病毒病原学分析[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(2): 120-123.
- [11] 张冰,王晓,张微,等. 儿童急性下呼吸道感染病毒感染的临床流行特征[J]. 浙江医学, 2012, 34(4): 250-255.
- [12] 艾洪武,孙红,陈莎,等. 武汉地区冬春季儿童急性呼吸道感染病原学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(5): 1075-1077.

(收稿日期:2014-01-05 修回日期:2014-03-04)