

广州地区流感病毒和人博卡病毒感染的流行病学调查

何霞^{1,2}, 冯发深^{1,2}, 王铸^{1,2}, 徐霖^{2,3}, 张定梅^{1,4}, 关琳琳¹, 郑芸^{3,4}, 周荣⁵, 曹开源^{1,2,3,4*}
(1. 中山大学临床检验标准化研究中心, 广东 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院微生物教研室, 广东 广州 510080; 3. 广东省重大传染病预防和控制技术研究中心, 广东 广州 510080; 4. 中山大学热带病防治研究教育部重点实验室, 广东 广州 510080; 5. 广州呼吸疾病研究所国家呼吸疾病重点实验室, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】调查 2010–2011 年广州地区发热呼吸道感染病人的流感病毒(IFV)和人博卡病毒(HBoV)的流行状况和流行特点。【方法】采集 2010–2011 年广州市 5 家哨点医院共 3 460 例符合条件的有发热伴呼吸道感染症状患者的咽拭子标本, 同时进行相关临床信息的收集和分析, 采用普通和巢式 PCR 方法检测 IFV 和 HBoV 的核苷酸, 分析 IFV 和 HBoV 的流行情况和时间、人群分布特点, 对 IFV 和 HBoV 均为阳性的样本进一步进行副流感病毒等 5 种常见呼吸道感染病毒的检测, 以了解多重感染的状况。【结果】3 460 例病例中, IFV 和 HBoV 的阳性检出率分别为 21.13% 和 1.68%; 731 例 IFV 阳性标本中, 甲、乙、丙型流感病毒(FluA、B、C)的比例为 558:172:1, 其中 481 例(66.75%)诊断为上呼吸道感染。58 例 HBoV 阳性病例中 44 例诊断为下呼吸道感染(75.86%)。IFV 和 HBoV 病毒的检出均与年龄关联, 检出率最高的年龄组分别为 15~34 岁和 0.5~1 岁。IFV 和 HBoV 的发病高峰分别为 7~8 月和 5~6 月。5 例检出 HBoV 与 IFV 的混合感染, 混合感染率为 0.64%, 其中 1 例为 IFV、HBoV 和人冠状病毒(HCoV)的三重感染, HBoV 阳性的成人患者的混合感染率为 50%。【结论】2010–2011 年甲型流感病毒仍是广州地区发热呼吸道症候群的主要病原之一, 青壮年检测率较高, 夏季为流行高峰; 人博卡病毒为全年散发, 5–6 月发病率较高, 婴幼儿中发病率较高, 成人病例中人博卡病毒与流感病毒的混合感染率较高。

关键词: 呼吸道感染; 流感病毒; 人博卡病毒; 流行病学调查

中图分类号: R373 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)03-0417-05

Epidemiological Survey of Influenza and Human Bocavirus Infection in Guangzhou

HE Xia^{1,2}, FUNG Fat-sum^{1,2}, WANG Zhu^{1,2}, XU Lin^{2,3}, ZHANG Ding-mei^{1,4}, GUAN Lin-lin¹, ZHENG Yun^{3,4},
ZHOU Rong⁵, CAO Kai-yuan^{1,2,3,4*}

(1. Research Center for Clinical Laboratory Standard, Zhongshan Medical School of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Medical Microbiology, Zhongshan Medical School of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Guangdong Provincial Research Center for Severe Infectious Disease Prevention and Control Technology, Guangzhou 510080, China; 4. Key Laboratory of Tropical Disease Control, Ministry of Education, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 5. Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the prevalence status and characteristics of influenza virus(IFV) and human bocavirus(HBoV) in the patients with fever and respiratory tract infections in Guangzhou. 【Methods】A total of 3 460 throat swabs were obtained from patients with fever respiratory tract infection from 2010 to 2011 in Guangzhou, and relevant clinical information was collected and analyzed at the same time. Specimens were detected the nucleotide of IFV and HBoV by polymerase chain reaction and nested PCR, and the epidemic status, time and the population distribution characteristics of IFV and HBoV were analyzed, IFV and HBoV double positive specimens were further detected for other 5 common respiratory viruses including parainfluenza etc, to understand the status of multiple infection. 【Results】The positive rate of IFV and HBoV infection were 21.13% and 1.68% respectively in 3 460 cases. In 731 IFV positive specimens the ratio for influenza A, B, C subtypes was 558:172:1, and 481 patients were diagnosed with upper respiratory tract infection. In 55 HBoV positive cases, 44 were diagnosed with lower respiratory tract

收稿日期: 2011-12-02

基金项目: 国家重大传染病防治科技重大专项(2009ZX10004-213); 广东省重大传染病专项

作者简介: 何霞, 硕士研究生, 主要从事病毒和肿瘤学相关研究, E-mail: hexia6288687@163.com; * 通信作者: 曹开源, 副教授, E-mail: caoky@mail.sysu.edu.cn

infection with the proportion 75.86%. The patient age of IFV and HBoV with highest positive rate was between 15–34 years old and 0.5–1 years old respectively, and the onset peak time was in July to August for IFV and May to June for HBoV. Five specimens were detected as HBoV and IFV double infection, with co-infection rate of 0.64%, and 1 specimen was detected with IFV, HBoV, and HCoV co-infection. In HBoV positive adult patients, the co-infection rate was as high as 50%. 【Conclusion】 Influenza A virus was still one of the main pathogens of respiratory tract infection in Guangzhou from 2010 to 2011, and the incidence was higher in young people and prevalence in summer season. HBoV was distributed in the whole year, and the incidence was relatively higher during May to June, and in infants and young children. In adult patients, the coinfection rate of IFV and HBoV was higher.

Key words: respiratory tract infection; influenza virus; human bocavirus; epidemiological survey

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2012, 33(2): 417–420; COV3; 406]

呼吸道感染是引起人类发病和死亡的主要原因之一, 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、流感病毒(influenza virus, IFV)、副流感病毒(parainfluenza virus, PIV)、腺病毒(adenovirus, ADV)被认为是引起人类呼吸道感染最常见的病原体, 近年来由于分子生物学的发展, 新的呼吸道病毒不断被发现, 如人类偏肺病毒(human metapneumovirus, HMPV)^[1], 人冠状病毒(human coronavirus, HCoV) SARS、NL63、HKU1^[2-4]、人博卡病毒(human bocavirus, HBoV)^[5]等也被认为是呼吸道感染重要的病原体, 其中 HBoV 是最主要的共感染病原体之一。2009 年新甲型 H1N1 流感病毒在全球暴发流行, 广州地区也成为主要流行地域之一, 然而, 新甲型 H1N1 流感病毒暴发 1 年后, 流感病毒在广州地区流行情况如何, 流感病毒是否更容易与 HBoV 等其他呼吸道病毒合并感染, 流感病毒与 HBoV 的共感染是否增强病毒的致病性从而加重呼吸道感染的临床症状, 目前尚不清楚。为了解新甲型 H1N1 流感暴发后, 不同型别的流感病毒在广州地区的流行情况, 以及流感病毒与人博卡病毒及其他呼吸道病毒的合并感染情况, 本研究采集 2010 年 3 月至 2011 年 2 月广州地区发热呼吸道感染患者的咽拭子标本, 进行流感病毒和 HBoV 的检测, 分析广州地区流感病毒和人博卡病毒的流行状况, 以及流感病毒与 HBoV 两种病原体的流行特点和二者的共感染情况, 为广州地区甲型流感病毒和人博卡病毒的流行病学调查提供参考依据, 为流感病毒与 HBoV 共感染的致病性的相关研究打下基础。

1 材料与方 法

1.1 标本采集

收集广州市 2010 年 3 月至 2011 年 2 月中山

大学附属第二医院、中山大学附属第三医院、广州医学院附属第一医院、广东省中医院、暨南大学附属华侨医院 5 家哨点医院因呼吸道感染而就诊的 3 460 例患者的咽拭子标本。病例纳入标准: 发热 3 d 以内, 体温 ≥ 38 °C, 伴有咳嗽、咳痰或咽喉疼痛等呼吸道感染症状。用于检测病毒的标本置于病毒转运液 (VTM) 中, 低温送至中山大学生物安全二级实验室以及广州呼吸疾病研究所实验室 -80 °C 保存备用。

1.2 流感病毒的 RT-PCR 检测

使用 QIAmpMiniElute Virus Spin 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司) 提取病毒的 RNA 和 DNA, 操作步骤严格按照说明书进行, 提取的核酸 -80 °C 保存。使用随机引物及 Superscript III 逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司) 对病毒 RNA 进行逆转录, 操作步骤参考说明书进行, 反应条件为 25 °C 10 min, 50 °C 50 min, 85 °C 5 min。反转录产物 -20 °C 保存备用^[6]。

IFV 的检测采用巢式 PCR 扩增 IFV 的 NP 基因^[6], 引物序列见表 1, 目的片段大小 FluA 301 bp, FluB 226 bp, FluC 111 bp。PCR Taq 酶购自 Invitrogen 公司, 反应体系如下: 10×PCR Buffer 2 μ L, dNTP 0.2 mmol/L, MgSO₄ 1 mmol/L, 上下游引物各 0.3 mmol/L, cDNA 模板 2 μ L, DEPC 水补足至 20 μ L。巢式 PCR 反应条件: 第 1 轮 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 30 s (第二步开始 45 个循环), 72 °C 10 min。第 2 轮 95 °C 4 min, 94 °C 30 s, 55.3 °C 1 min, 72 °C 30 s (第二步开始 35 个循环), 72 °C 10 min。

1.3 HBoV 的 PCR 检测

标本的病毒 DNA 提取使用 QIAmpMiniElute Virus Spin 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司), 操作步骤按照说明书进行, 提取的核酸 -80 °C 保存。采用 PCR 扩增 HBoV 的 NP1 基因, 引物序列参照文献^[5], 上

表1 IFV的巢式PCR检测引物

Table 1 The primers for IFV detection by nested-PCR

assay		
Nested	Primer	Sequences(5'-3')
Outer	FluA-C-F1	GAACCTCRTYCYWWATSWCAAWGRRGAAAT
	FluB-F1	ACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA
	FluABC-R1	ATKGGCGWYRAYAMWCTYARRTCTTCAWAIGC
Inner	FluAB-F2	GATCAACTGAKMRRRAGYMGRAAYCCAGG
	FluC-F2	AAATTGGAAATTTGTTCTTTCAAGGACA
	FluA-C-R2	TCTTCATGATGCARSWSMAWKGCCATGCCATC
	FluB-R2	CTTAATATGGAAACAGGTGTTGCCATATT

游引物 5'-GACCTCTGTAAGTACTATTAC-3', 下游引物 5'-CTCTGTGTTGACTGAATACAG-3'。反应体系同上, 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 第二步开始 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 多重感染的检测

采用普通 RT-PCR 对 IFA 与 HBoV 双重感染的阳性样本进行呼吸道合胞病毒 (RSV), 腺病毒 (ADV), 副流感病毒 (PIV) 1-4 型, 偏肺病毒 (HMPV) 以及冠状病毒 (HCoV) (OC43, 229E, NL63) 的检测 (引物序列参考文献^[3,6-9]), 以检测是否存在三重及三重以上的多重感染。

1.5 统计分析

计量数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据分析通过 SPSS13.0 统计软件进行处理, 感染率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 病例的临床信息

3 460 份咽拭标本采自医院急诊、门诊及住院的呼吸道感染患者, 其中急诊病例数为 1 018 例, 门诊病例 782 例, 住院病例为 1 660 例, 年龄范围为 0 个月至 95 岁 (图 1), 儿童病例 (≤ 14 岁) 1 686 例, 平均年龄为 20.32 岁, 中位年龄为 16 岁, 男女比例为 1.38:1。所收集呼吸道感染病毒检测阳性患者临床症状主要包括发热 (82.14%)、咳嗽 (75%)、流涕 (32.60%), 部分有呼吸困难 (15.17%) 和喘息 (4.02%) 症状, 并有少部分 (4.16%) 出现腹泻、呕吐等胃肠道症状。

2.2 IFV 与 HBoV 的检出情况

3460 例标本中 731 例 (21.13%) 巢式 PCR 检

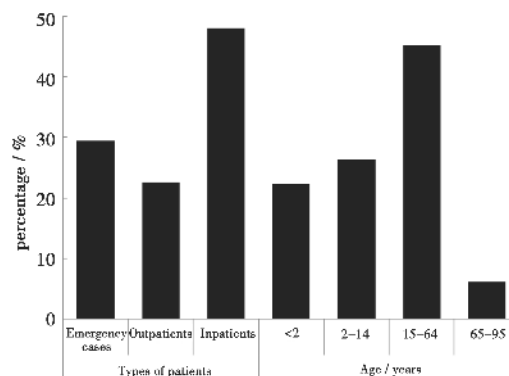


图1 3 460 份临床样本的统计信息

Fig.1 Statistical information of 3 640 clinical samples

测 IFV RNA 阳性, 58 例 (1.68%) HBoV DNA 检测阳性。731 例 IFV 阳性标本中, 甲、乙、丙型流感病毒 (FluA、B、C) 的比例为 558:172:1, 流感病毒检测阳性的病例中, 481 (66.75%) 例诊断为上呼吸道感染, 132 (25.07%) 诊断为下呼吸道感染, 包括支气管炎、支气管肺炎、肺炎, 部分病例伴有 COPD, 118 例为待确诊病例。HBoV 检测阳性的病例中, 44 例诊断为下呼吸道感染 (75.86%), 其中以支气管肺炎 (34 例) 为主, 9 例为上呼吸道感染, 3 例非呼吸道感染患者分别诊断为传染性单核细胞增多症、疱疹性咽峡炎及支气管哮喘, 2 例为待确诊病例。

2.3 IFV 与 HBoV 阳性病例的月分布

2010 年至 2011 年各月份病毒检出率分布不均 (图 2), 结果显示各月份均有流感病毒的检出, 流感病毒的总检出率在夏季 (7-8 月) 明显高于其他月份, 检出率最高峰出现在 2010 年 8 月, 为 48.04%, 其中 FluA 占 95.58%, 春季检出的 IFV 以 FluB 为主 (72.73%), 仅在 10 月份检出 1 例 FluC 阳性病例。HBoV 感染在 1 月份的检出率为 0, 1-3 月的总检出率仅为 0.05%, 而在 5-6 月相对较高, 为 4.26%。

2.4 IFV 与 HBoV 阳性病例的年龄分布

3 460 份标本的年龄分布见图 3, 统计结果显示各组病人的总检出率差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 246.77, P < 0.05$), 结果显示发热呼吸道症候群患者 IFV 和 HBoV 的总阳性率与 IFV 的阳性率呈正比关系, 15-34 岁组病毒检出率最高为 36.71%, 成人的检出高出儿童和老人。HBoV 在 6 个月至 1 岁的婴幼儿组的检出率最高, 其他各年龄组均有 HBoV 的检出病例 (图 3), 儿童的检出率 3.08% 明

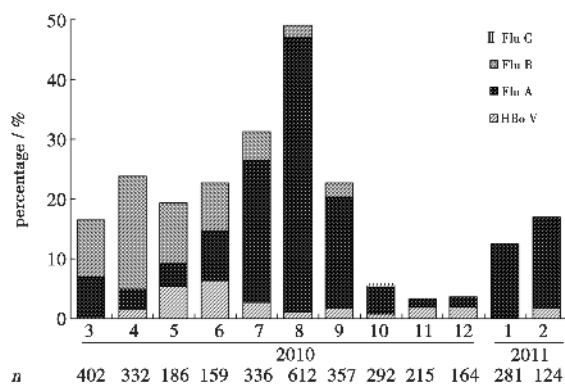


图 2 阳性病例的分月构成

Fig.2 Monthly of positive cases for Respiratory tract virus

显高出成人的 0.36% ($\chi^2 = 39.55, P < 0.05$)。

2.5 多重感染的检测

在 784 例病毒感染阳性标本中, 5 例患者为 IFV 与 HBoV 的双重感染(0.64%), 其中 1 例患者为 IFV、HBoV 和 HCoV 的三种病毒的混合感染(表 2)。HBoV 阳性的成人病例为 6 例, 其中 50% (3/6) 存在与 IFV 的混合感染。5 例混合感染病例均未出现重症、并发症或死亡, 三重感染患者症状

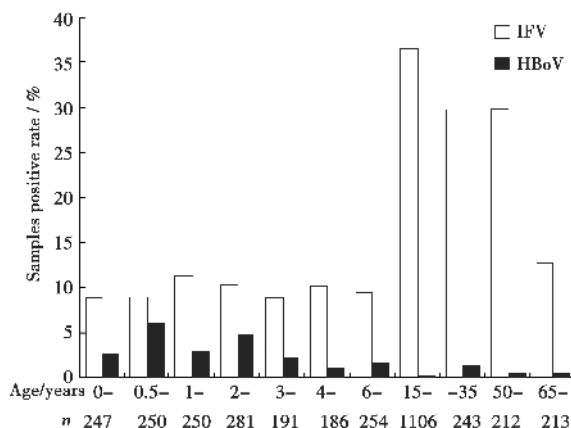


图 3 各年龄段 IFV 及 HBoV 的样本量与阳性率

Fig.3 Sample size and positive rate of IFV and HBoV at different age groups

与二重感染者无明显差异。

3 讨论

本研究调查了在 2009 年 H1N1 流感大流行

表 2 HBoV 和 IFV 共感染阳性患者临床表现

Table 2 Clinical presentation of the patients with HBoV and IFV coinfection

No.	Age/years	Sex	$t_{max}/^{\circ}\text{C}$	Copathogens	Diagnosis	Symptom
1	3	M		FluA	bronchial pneumonia	Fever, cough
2	10	F		FluA	Unkown	Fever, cough
3	19	M	37.9	FluB	URTI	Fever, cough, rhinorrhea, expectorate, debilitation
4	41	F	39.4	FluA	URTI	Fever, cough, sore throat, headache, debilitation
5	64	F	38.2	FluA+HCoV	URTI	Fever, cough, rhinorrhea

URTI: upper respiratory tract infection; M: male; F: female.

后广州地区的流感病毒的流行情况, 结果显示 IFV 的阳性率为 21.13%, 高于此前报道的广州地区 2009 年 H1N1 暴发时期所监测的 19.54%^[10], 这一变化表明 2009 年甲型 H1N1 暴发后流感病毒仍是广州地区呼吸道感染的主要病原体, 广州地区仍是流感病毒的流行的重要区域。731 例 IFV 阳性标本中, 甲、乙、丙型流感病毒(FluA、B、C)的比例为 558:172:1, 表明广州地区 2010-2011 年间甲型流感病毒仍是引起上呼吸道感染流行的主要病原之一, 而本室相关研究已发现其中新甲型 H1N1 所占比例已明显下降, 而以季节性流感的 H3N2 和 H1N1 为主^[11]。此外, 本研究结果显示, 发热呼吸道症候群中 FluB 也是重要致病病原体之

一, 而 FluC 则极少引起伴有发热的呼吸道感染, 这一结果与已知的不同型别的流感病毒的流行特点和致病性特点一致。

本研究检测的 HBoV 病毒的总阳性率为 1.68%, 儿童(≤ 14 岁)及小于 2 岁的婴幼儿患者 HBoV 的阳性率分别为 3.08% 和 3.75%, 与已报道的人博卡病毒的致病力、流行特征等相符^[12]。但本研究结果低于谢淑霞^[13]等在细支气管炎患儿中的检出率 12.9%。我们分析原因可能在于以下几方面: ①标本种类。本研究中采集主要为咽拭子标本, 与含有大量脱落细胞的下呼吸道标本如灌洗液和鼻咽抽吸物相比, 病毒载量较低。因而可能阳

(下转封 3 to inside back cover)

(上接第420页 from page 420)

性检出率偏低。然而灌洗液和鼻咽抽吸物为侵入性标本,费用高且病人痛苦较大,易导致病人不愿配合,采集困难,对于症状较轻的上呼吸道感染患者尤其难于采集;而咽拭子标本采集较易,无创无痛苦,对于一般上呼吸道感染的病原学监测研究来说,采集咽拭子标本更合适,而本研究主要是针对广州地区发热伴有呼吸道感染的患者进行IFV和HBoV的流行病学研究,目标人群中轻症患者占多数,因此选择了咽拭子标本。②标本来源。研究表明住院儿童的HBoV的感染率更高^[14],而本研究针对的是发热呼吸道症候群患者,其中包括了住院和门诊患者,而不仅仅只针对住院患者,因此阳性率会有所降低。

分析各月份IFV和HBoV阳性检出率可以发现,IFV的感染有很明显的季节性,流行高峰期在7-8月,与已报道的流行特征相符^[15]。本研究结果显示HBoV的主要流行趋势为全年散发,但在5-6月的发病率相对较高。对于不同年龄段人群的分析结果显示,IFV在15~34岁组的检出率为36.62%,高于其它年龄组,可能与此年龄段的人群在学校、交通、工作单位等公共场所活动多,接触人群范围广,因而受感染机率大等原因有关。本研究显示HBoV在0.5~1岁的婴幼儿组中感染率最高,3岁以后儿童的感染率下降至接近成人水平,临床诊断以下呼吸道感染为主(75.86%),表明HBoV在婴幼儿呼吸道感染中占有重要地位,但其与婴幼儿呼吸感染的关系和相关致病机制目前仍不明确,有待进一步的研究。

各类病毒性病原体的高发季节和易感染人群有一定的差异,其引起的呼吸道感染分为上呼吸道感染和下呼吸道感染。本研究结果显示IFV患者主要以上呼吸道感染多见(66.75%),这与不同时期IFV株的毒力相关;HBoV与儿童的下呼吸道感染密切相关(75.86%),阳性患者症状主要为发热、咳嗽,部分患者出现喘息,或同时伴有胃肠道症状,这一结果与已报道的博卡病毒的致病特点和流行特点相符^[16]。

研究表明,呼吸道病毒中HBoV是最常与其他病毒发生混合感染的病原体,混合感染率可高达69.2%,主要混合感染病原体为IFV、ADV等^[17],而在本研究中,HBoV与IFV混合感染率较低,其中成人患者的混合感染比例高于儿童,而且混合

感染与单一病毒感染患者临床症状并无明显差异,未显示症状加重的趋势,显示HBoV致病性较低,与IFV共感染不会加重呼吸道感染的症状,而成人中HBoV的无症状带毒者比例可能较高。

综上所述,对2010-2011年广州地区发热呼吸道感染患者的IFV和HBoV感染的调查研究结果表明,2009年甲型H1N1流感暴发流行后,流感病毒仍是发热呼吸道症候群的主要病原之一,以甲型为主,青壮年发病率较高,夏季为流行高峰;人博卡病毒则为全年散发,在5-6月发病率有所上升,在婴幼儿中发病率较高,但在成人病例中人博卡病毒与流感病毒的混合感染率较高。

参考文献:

- [1] van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease [J]. *Nat Med*, 2001, 7(6): 719-724.
- [2] van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus [J]. *Nat Med*, 2004, 10(4): 368-373.
- [3] Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia [J]. *J Virol*, 2005, 79(2): 884-895.
- [4] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1953-1966.
- [5] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [6] Coiras MT, Perez-Brena P, Garcia ML, et al. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay [J]. *J Med Virol*, 2003, 69(1): 132-144.
- [7] Allard A, Albinsson B, Wadell G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction [J]. *J Med Virol*, 1992, 37(2): 149-157.
- [8] Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, et al. Simultaneous

(下转第406页 to page 406)

不同方法检测 NMO-IgG/抗 AQP4 抗体滴度的比较 (正文见第 407)

Comparative Analysis of Methods for Titrating Anti-aquaporin-4 Antibodies in Neuromyelitis Optica Spectrum (page in 407)

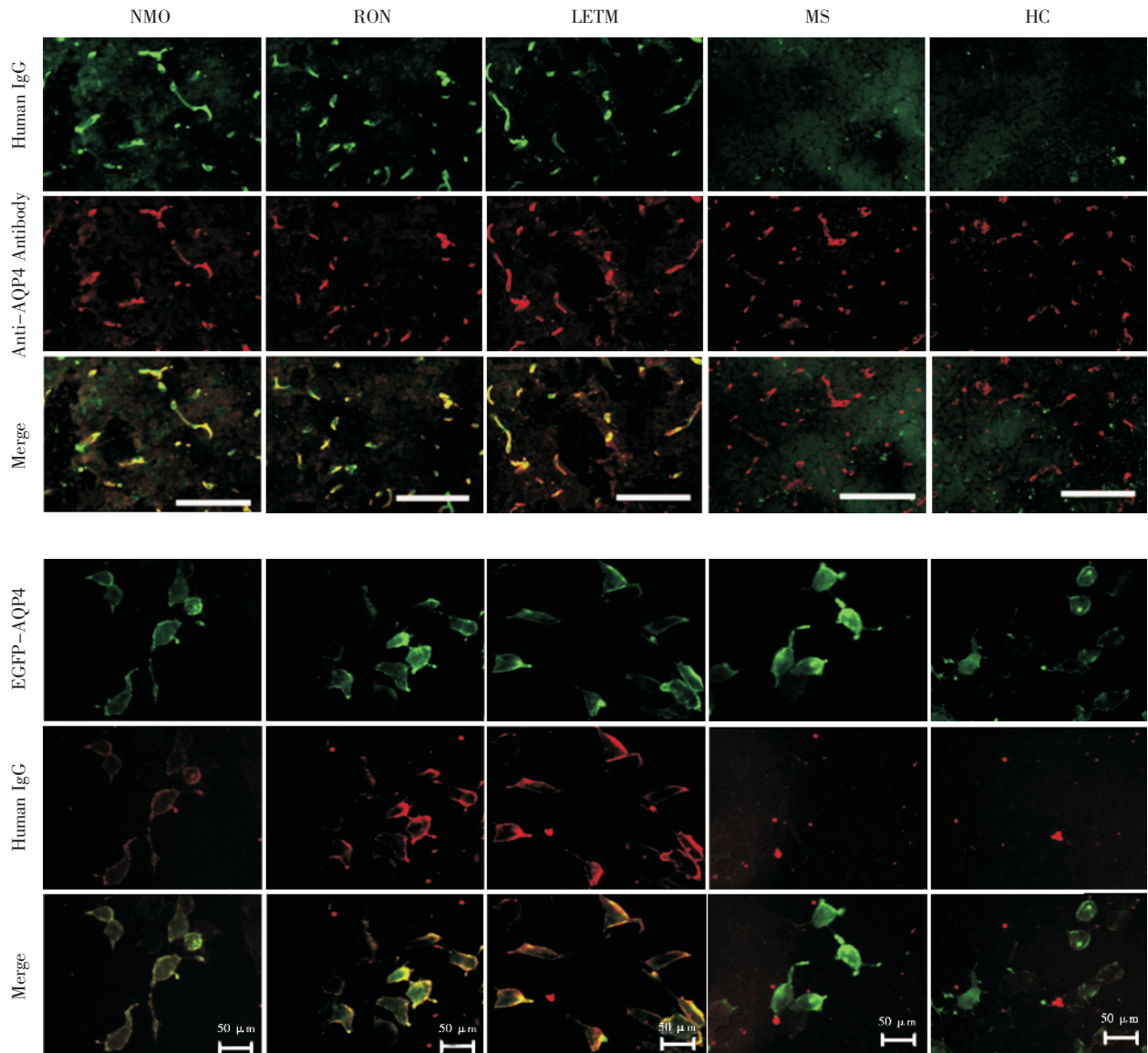


图 1 以鼠脑为底物检测血清中 NMO-IgG

Fig.1 NMO-IgG measured by indirect immunofluorescence based on mouse brain

Detection of serum NMO-IgG by dual-immunofluorescence staining. FITC (green) labelling human NMO-IgG, cy3 labelling anti-AQP4 antibody. NMO-IgG colocalization with AQP4 in merged images (yellow); NMO: neuromyelitis optica; RON: recurrent optic neuritis; LETM: longitudinally extensive transverse myelitis; MS: multiple sclerosis; HC: health controls. Bar: 100 μm

图 2 以稳定表达 AQP4 的细胞为底物检测血清中的 AQP4 抗体

Fig.2 Serum anti-AQP4 antibody measured by cell-based IIFA

Stably transfected cells expressed AQP4. cy3 (red) labelling human serum IgG. If the red fluorescence and the green fluorescence merged well, we judge it positive. $\times 50$; NMO, RON, LETM, MS, HC: same as Fig.1