

## · 临床研究 ·

# 毛细管电泳多重 RT-PCR 法在儿童呼吸道感染中的应用分析

李云 沈国松 杨帆 闵晶 李刚

**[摘要]** **目的** 分析毛细管电泳多重反转录聚合酶链(RT-PCR)法在儿童呼吸道感染中的应用效果。**方法** 收集呼吸道感染住院患儿的标本共478例,检测常见的13种呼吸道病原体,并对结果进行统计分析。**结果** 478例患儿中342例呼吸道病原体检测阳性,总阳性率为71.55%,检出病毒共381份,病毒检出率为79.71%,检出率前3位分别为呼吸道合胞病毒(HRSV)26.78%(128/478)、鼻病毒(HRV)18.20%(87/478)和副流感病毒(HPIV)10.67%(51/478)。单一感染率为63.81%(305/478),2种及以上病原体混合感染率为7.74%(37/478),其中以2种病原体混合感染多见。病原体在男性、女性患儿中的检出率比较,差异无统计学意义( $\chi^2=2.38, P>0.05$ );在年龄0~3个月组、4~6个月组、7个月~1岁组、2~3岁组和>3岁组检出率比较,组间差异有统计学意义( $\chi^2=113.55, P<0.05$ );在12月、1~3月份不同月份检出率比较,差异亦有统计学意义( $\chi^2=20.32, P<0.05$ )。**结论** 毛细管电泳的多重 RT-PCR 法可高效快速准确检测多种病原体,HRSV、HRV 和 HPIV 是引起冬春季节潮州市儿童呼吸道感染的主要病原体,且病原体检出率在不同年龄阶段和不同月份间存在一定差异。

**[关键词]** 儿童; 多重反转录聚合酶链法; 呼吸道病原体

**Application of capillary electrophoresis multiplex RT-PCR method in children with respiratory infections** LI Yun, SHEN Guosong, YANG Fan, et al. Department of Laboratory, Huzhou Maternal and Child Health Care Hospital Laboratory, Huzhou 313000, China.

**[Abstract]** **Objective** To analyze the effect of capillary electrophoresis multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in children with respiratory tract infection. **Methods** Totally 478 samples of hospitalized children with respiratory tract infection were collected to detect 13 common respiratory pathogens, and the results were statistically analyzed. **Results** Of 478 children, 342 were positive for respiratory pathogens, with a total positive rate of 71.55%, 381 viruses were detected, with a virus detection rate of 79.71%. The top three detection rates were respiratory syncytial virus (HRSV) 26.78% (128/478), rhinovirus (HRV) 18.20% (87/478), and parainfluenza virus (HPIV) 10.67% (51/478). The single infection rate was 63.81% (305/478), and the mixed infection rate of two or more pathogens was 7.74% (37/478), in which the mixed infection of two pathogens was more common. There was no significant difference in the detection rate of pathogens between male and female children ( $\chi^2=2.38, P>0.05$ ). There was a statistically significant difference between the groups in the detection rate of 0-3 months old group, 4-6 months old group, 7 month-1 year old group, 2-3 years old group and >3 years old group ( $\chi^2=113.55, P<0.05$ ). The difference of detection rate in different months from December, January to March was also statistically significant ( $\chi^2=20.32, P<0.05$ ). **Conclusion** The multiplex RT-PCR method of capillary electrophoresis can detect various pathogens efficiently, quickly and accurately. HRSV, HRV and HPIV are the main pathogens that cause respiratory tract infections in children in Huzhou City in winter and spring, and the detection rate of pathogens varies in different ages and months.

**[Key words]** children; multiplex RT-PCR; respiratory pathogens

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.002.009

基金项目:潮州市公益性应用研究项目(2020GY16)

作者单位:313000 浙江湖州,潮州市妇幼保健院检验科

急性呼吸道感染是儿科常见的感染性疾病之一,在婴幼儿及学龄期儿童中,呼吸道病毒感染率

远比成人多,年龄越小发生感染的比例越高<sup>[1]</sup>。病毒的流行特点、临床症状相似且感染力强、传播快,严重威胁小儿的生命健康。因此了解本地区病原体的流行病学特征,对儿童呼吸道感染的诊疗具有重要的临床意义<sup>[2]</sup>。本次研究分析毛细管电泳多重反转录聚合酶链(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法在儿童呼吸道感染中的应用效果。现报道如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2021年12月至2022年3月湖州市妇幼保健院呼吸道感染住院患儿的标本共478例,其中男性283例、女性195例;年龄13 d~16岁,平均年龄(1.68±1.62)岁;呼吸道感染诊断标准参照《诸福棠实用儿科学》第7版<sup>[3]</sup>。本次研究经医院伦理委员会审查通过,所有采样和资料收集均获得患儿监护人同意。

1.2 方法 采用睿司倍®13种呼吸道病原体核酸检测试剂盒(由宁波海尔施基因科技公司生产)检测13种呼吸道病毒,分别是甲型流感病毒(influenza A virus, InfA)、甲型流感病毒H1N1(influenza A H1N1 virus, H1N1)、季节性H3N2病毒(influenza A H3N2 virus, H3N2)、乙型流感病毒(influenza B virus, InfB)、腺病毒(human adenovirus, HADV)、博卡病毒(human bocavirus, HBoV)、鼻病毒(human rhinovirus, HRV)、副流感病毒(human parainfluenza virus, HPIV)、冠状病毒(human coronavirus, HCoV)、呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, HRSV)、偏肺病毒(human metapneumovirus, HMPV)、肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, Mp)和衣原体(chlamydia, Ch)。

1.2.1 标本采集 入选患儿住院后立即采集标本,采用绒毛拭子从患儿咽后壁涂抹咽部分泌物标本,立即置于专用保存管中,-70℃低温冰箱保存至检测。

1.2.2 病毒核酸提取 采用全自动核酸提取仪Smart Lab Assist-16(由台湾圆点奈米技术股份有限公司生产),按照核酸提取或纯化试剂盒(由宁波海尔施基因科技有限公司生产)说明书提取标本、阴阳性对照中的核酸。

1.2.3 多重RT-PCR扩增 使用13种呼吸道病原体多重检测试剂盒(由宁波海尔施基因科技有限公司生产),采用PCR毛细电泳片段分析法。多重PCR产物置于4℃环境下保存至电泳检测。

1.2.4 电泳检测扩增产物 采用1T400 Sanger测序仪(由宁波海尔施基因科技有限公司生产)对结果进行判读。

1.3 统计学方法 采用SPSS 22.00统计软件进行数据分析。计数资料用例数和百分比表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 呼吸道病原体的检出情况 478例患儿中共检出呼吸道病原体感染者342例,检测阳性率为71.55%(342/478)。共检出病毒381份,病毒检出率为79.71%(381/478)。13种呼吸道病原体的检出率见表1。

表1 13种呼吸道病原体检出结果

| 病原体名称 | 检出数 | 构成比/% | 检出率/% |
|-------|-----|-------|-------|
| InfA  | 1   | 0.26  | 0.21  |
| H1N1  | 0   | 0     | 0     |
| H3N2  | 0   | 0     | 0     |
| InfB  | 41  | 10.76 | 8.58  |
| HPIV  | 51  | 13.39 | 10.67 |
| HADV  | 16  | 4.20  | 3.35  |
| HBoV  | 2   | 0.52  | 0.42  |
| HRV   | 87  | 22.83 | 18.20 |
| HMPV  | 40  | 10.50 | 8.37  |
| HCoV  | 6   | 1.57  | 1.26  |
| HRSV  | 128 | 33.60 | 26.78 |
| Mp    | 4   | 1.05  | 0.84  |
| Ch    | 5   | 1.31  | 1.05  |
| 合计    | 381 | 100   | 79.71 |

由表1可见,HRSV的检出率最高,达26.78%(128/478),其次为HRV和HPIV,检出率分别为18.20%(87/478)和10.67%(51/478)。H1N1和H3N2未检出。

2.2 呼吸道病所原体混合感染的检出情况 478例呼吸道病原体感染阳性标本中,1种病原体单一感染305例,占89.18%(305/342),感染率63.81%(305/478);2种及以上病原体混合感染37例,占10.82%(37/342),感染率7.74%(37/478)。混合感染具体感染类型及检出率见表2。

由表2可见,在混合感染中,以2种病原体合并感染为主,占94.59%(35/37),HRV合并感染最多,占75.68%(28/37),其中以HRV+HRSV混合感染多见。有2例是3种病原体混合感染,分别是HRV+HRSV+HPIV和HRV+HPIV+HCoV混合感染。

表2 混合感染类型检出情况

| 混合感染类型        | 检出数 | 构成比/% | 检出率/% |
|---------------|-----|-------|-------|
| HRV+HRSV      | 11  | 29.73 | 2.30  |
| HRV+HPIV      | 7   | 18.92 | 1.46  |
| HRV+HMPV      | 4   | 10.81 | 0.84  |
| HRV+HADV      | 3   | 8.11  | 0.63  |
| HPIV+InfB     | 2   | 5.41  | 0.42  |
| HRSV+InfB     | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HPIV+HADV     | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HPIV+HCoV     | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HPIV+HRSV     | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HADV+HMPV     | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HRV+HBoV      | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HMPV+MP       | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HRSV+Ch       | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HRV+HRSV+HPIV | 1   | 2.70  | 0.21  |
| HRV+HPIV+HCoV | 1   | 2.70  | 0.21  |
| 合计            | 37  | 100   | 7.74  |

2.3 呼吸道病原体在不同性别中的检出情况 478例呼吸道感染患儿中男性283例、女性195例。男性患儿中呼吸道病原体检测阳性率为68.90% (195/283), 女性患儿为75.38% (147/195), 二者比较, 差异无统计学意义( $\chi^2=2.38, P>0.05$ )。在男、女性患儿中, 检出率最高的前3种病原体均为HRSV、HRV和HPIV。

2.4 呼吸道病原体在不同年龄组中的检出情况见表3

由表3可见, 5个年龄组组间的13种呼吸道病原体检出率比较, 差异均有统计学意义( $\chi^2=113.55, P<0.05$ )。其中InfB、HADV、HRV、HRSV和Ch在不同年龄组患儿中的检出率比较, 差异均有统计学意义( $\chi^2$ 分别=16.78、12.24、14.21、65.80、15.24,  $P$ 均 $<0.05$ )。

2.5 呼吸道病原体在不同月份中的检出情况见表4

表3 13种呼吸道病原体在不同年龄组中的检出率/例(%)

| 病原体名称 | 0~3个月      | 4~6个月     | 7个月~1岁    | 2~3岁      | >3岁       |
|-------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| InfA  | 0          | 0         | 0         | 0         | 1(2.13)   |
| H1N1  | 0          | 0         | 0         | 0         | 0         |
| H3N2  | 0          | 0         | 0         | 0         | 0         |
| InfB  | 10(8.40)   | 1(0.88)   | 11(8.80)  | 12(16.44) | 7(14.89)  |
| HPIV  | 11(9.24)   | 10(8.77)  | 18(14.40) | 8(10.96)  | 4(8.51)   |
| HADV  | 0          | 1(0.88)   | 8(6.40)   | 4(5.48)   | 3(6.38)   |
| HBoV  | 1(0.84)    | 0         | 0         | 1(1.37)   | 0         |
| HRV   | 28(23.53)  | 8(7.02)   | 25(20.00) | 18(24.66) | 8(17.02)  |
| HMPV  | 7(5.88)    | 5(4.39)   | 14(11.20) | 10(13.70) | 4(8.51)   |
| HCoV  | 2(1.68)    | 1(0.88)   | 2(1.60)   | 1(1.37)   | 0         |
| HRSV  | 64(53.78)  | 20(17.54) | 31(24.80) | 10(13.70) | 3(6.38)   |
| Mp    | 0          | 0         | 1(0.80)   | 1(1.37)   | 2(4.26)   |
| Ch    | 5(4.20)    | 0         | 0         | 0         | 0         |
| 总计    | 116(97.48) | 42(36.84) | 99(79.20) | 56(76.71) | 29(61.70) |

由表4可见, 各月份组间的检出率比较, 差异有统计学意义( $\chi^2=20.32, P<0.05$ )。其中HMPV、HCoV和HRSV在各月份组间的检出率比较, 差异均有统计学意义( $\chi^2$ 分别=38.64、10.82、11.21,  $P$ 均 $<0.05$ )。

### 3 讨论

急性呼吸道感染大多是由病毒引起的, 病毒在不同地区、不同人群的病原学和流行病学表现均存在一定的差异, 甚至在相同地区的不同年份也存在

一定的差异。因此了解本地区的流行病学特征, 对儿童呼吸道感染的诊断与治疗具有重要的临床意义。

本次研究采用基于毛细管电泳的多重RT-PCR方法对13种呼吸道病原体进行检测, 在本次研究中呼吸道病原体的总检出率为71.55%, 稍高于刘文渊等<sup>[4]</sup>报道的宁波市儿童呼吸道感染病原体的检出率(66.16%), 明显高于姚娟等<sup>[5]</sup>报道的2011~2013年住院儿童呼吸道感染病原体的检出率(21.96%)。

表4 13种呼吸道病原体在不同月份的检出率/例(%)

| 病原体名称 | 12月       | 1月         | 2月        | 3月        |
|-------|-----------|------------|-----------|-----------|
| InfA  | 1(1.03)   | 0          | 0         | 0         |
| H1N1  | 0         | 0          | 0         | 0         |
| H3N2  | 0         | 0          | 0         | 0         |
| InfB  | 10(10.30) | 19(11.24)  | 7(7.78)   | 5(4.10)   |
| HPIV  | 16(16.49) | 18(10.65)  | 8(8.89)   | 9(7.38)   |
| HADV  | 4(4.12)   | 5(2.96)    | 3(3.33)   | 4(3.28)   |
| HBoV  | 1(1.03)   | 1(0.59)    | 0         | 0         |
| HRV   | 19(19.59) | 35(20.71)  | 12(13.33) | 21(17.21) |
| HMPV  | 0         | 10(5.92)   | 4(4.44)   | 26(21.31) |
| HCoV  | 4(4.12)   | 0          | 2(2.22)   | 0         |
| HRSV  | 34(35.05) | 53(31.36)  | 18(20.00) | 23(18.85) |
| Mp    | 0         | 1(0.59)    | 0         | 3(2.46)   |
| Ch    | 2(2.06)   | 2(1.18)    | 1(1.11)   | 0         |
| 总计    | 81(83.51) | 128(75.74) | 50(55.56) | 83(68.03) |

病原体的总检出率不同,考虑可能与检测方法、检测病原种类以及地区、季节差异有关。本次研究和刘文渊等<sup>[4]</sup>采用的都是高灵敏度的分子检测方法,检出率结果更接近,差异可能是由于研究的地区和季节不同引起的,而姚娟等<sup>[5]</sup>采用的则是直接免疫荧光法检测病毒抗原,该方法的缺点是敏感性低,且检测结果易受采样的质量和操作过程影响,结果的判断也与实验室检测人员的技术水平有关。而基于毛细管电泳的多重 RT-PCR 法灵敏度高、特异性强,且病原体检测范围广,因此方法学的不一样导致同一地区病原体检出率差异明显。

本次研究还发现,年龄段不同的儿童病毒检出率存在差异。纳入研究的住院病例中,1岁以下患儿占绝大多数,因为年龄越大,免疫力也随之提高,感染呼吸道病毒的概率在下降,感染的严重程度也在减轻,因此呼吸道感染的住院病例就越少。1岁以下婴幼儿免疫系统还未成熟,3~6个月婴幼儿体内尚存有来自母体的抗体,因而感染率相对较低,但随着与外界环境接触增加,来自母体的抗体逐渐消失而自身免疫系统发育尚不完全时,发生呼吸道感染的概率就会相应增加。1~3岁幼儿群体间交叉感染机会增多,容易感染各类呼吸道病毒。其中

RSV是1岁以内,尤其是3个月以下新生儿检出的主要感染病毒,在本次研究中0~3个月婴儿中RSV检出率53.78%,这与安徽地区感染特点一致<sup>[6]</sup>。

本次研究统计结果显示,呼吸道病原体在12月、1~3月份间的检出率虽然有所不同,但主要检出的病原体均为HRSV和HRV。这与刘文渊等<sup>[4]</sup>报道的Mp检出率最高,其次为HRV和HADV有所不同,考虑可能与各自分析的季节不同有关,本次研究分析的是冬春季节,而刘文渊等<sup>[4]</sup>研究的是7~10月份夏秋季节,由此也可推出不同病原体流行与地区及气候有关。

综上所述,儿童呼吸道病毒感染在不同地区、不同年龄、不同月份均有一定差异。毛细管电泳的多重 RT-PCR 方法可高效快速准确地检测多种病原体,及早明确病原体,也能防止临床上抗生素的滥用。同时本次研究也存在一些不足,由于基于毛细管电泳的多重 RT-PCR 方法在本地区尚处于初步发展阶段,开展时间短,纳入病例少,数据的积累量还不够多,一些病原体检出率低,尚不能反映其感染的流行特点,同时缺乏本地区多个季节的数据比较,在后续研究中将逐步完善。

#### 参考文献

- 1 王颖硕. 儿童呼吸道病毒感染[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(2): 100-104.
- 2 刘宇奇, 黄艳智, 孙利伟, 等. 基于毛细管电泳多重PCR方法对小儿呼吸道感染病原分析[J]. 中国小儿急救医学, 2019, 26(10): 764-770.
- 3 胡亚美, 江载芳, 诸福棠. 实用儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1167-1216.
- 4 刘文渊, 张艺之, 周城波, 等. 基于多重RT-PCR检测法的儿童呼吸道病原体流行特征[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2021, 35(4): 467-471.
- 5 姚娟, 沈国松, 范丽红, 等. 6089例住院儿童呼吸道感染常见病毒病原学检测分析[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(6): 664-666.
- 6 蒋华芳, 李锦亮, 李丽, 等. 潍坊地区儿童急性呼吸道感染病毒病原学分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32(3): 272-276.

(收稿日期 2022-05-20)

(本文编辑 高金莲)