论　　著

DOI:10.19538/j.ek2020110613

多重PCR检测方法在儿童流感样病例病原检测中的临床价值(附94例报告)

史大伟[1a],张艳茹[2],董　艳[3],葛丽霞[4],李　丹[1b],李　静[3],邵俊彦[4],
郭东星[1b],窦海伟[1b],宛瑞杰[1b],涂　鹏[1b],王　红[2],辛德莉[1b]

【摘要】　目的　探讨多重聚合酶链反应(PCR)检测方法在儿童流感样病例病原检测中的临床应用价值,了解儿童流感样病例病原情况。**方法**　收集2018年11月至2019年2月北京地区94例儿童流感样病例咽拭子标本,采用多重PCR核酸检测技术测定甲型流感病毒(InfA)、甲型流感病毒H1N1(InfA-H1N1)、甲型流感病毒H3N2(InfA-H3N2)、乙型流感病毒(InfB)、人副流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、人腺病毒(HADV)、人鼻病毒(HRV)、人博卡病毒、人偏肺病毒(HMPV)、人冠状病毒(HCoV)和肺炎支原体(MP)、衣原体13种病原核酸。**结果**　94例标本中78例(82.98%)可测出病原,其中69例(73.40%)检出1种病原,9例(9.57%)检出2种病原;94例标本中52例(55.32%)检出流感病原,26例(27.66%)检出非流感病原。单一病原检出由多到少为InfA-H1N1 31例,InfA-H3N2 10例,RSV 9例,HMPV 7例,InfA、HRV、HADV各3例,InfB、HCoV及MP各1例。9例检出2种病原的标本中,6例检出流感分别合并其他病毒(HRV、HADV、RSV、HCoV、HMPV),1例检出甲流H1N1和H3N2,2例分别检出RSV、HRV及HCoV、HADV。**结论**　非流感病原微生物引起流感样病例并不少见,多重PCR检测有助于全面了解流感样病例的病原和混合感染情况。

【关键词】　多重PCR检测;流感样病例;呼吸道病原;儿童
中图分类号:R72　**文献标志码**:A

Clinical value of multiple PCR detection for influenza-like cases in children: A report of 94 cases　*SHI Da-wei*, ZHANG Yan-ru, DONG Yan, et al. *Department of Pediatrics, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing　100050, China*
Corresponding author: WANG Hong, E-mail: 1027david@vip.sina.com; XIN De-li, E-mail: xindl48@126.com

Abstract　Objective　To investigate the clinical value of multiple PCR method in detecting pathogens in influenza-like cases in children and to understand the distribution of respiratory pathogens in pediatric influenza-like cases. **Methods** A total of 94 throat swabs of childhood flu-like cases admitted from November 2018 to February 2019 in Beijing area were collected. Multiple PCR method was used to detect influenza A virus, influenza A virus-H1N1, influenza A virus-H3N2, influenza B, parainfluenza virus, RSV, human adenovirus, human rhinovirus, human bocavirus, human metapneumovirus, human coronavirus, mycoplasma pneumonia and chlamydia gene. **Results**　Of the 94 specimens, 78(82.98%) were detected pathogens, of which one pathogen was detected in 69 cases(73.40%), and 2 pathogens in 9 cases(9.57%). Fifty-two(55.32%) of 94 specimens were detected influenza pathogens and 26 cases(27.66%) detected non-flu pathogens. The number of single pathogens detected was 31 cases of InfA-H1N1, 10 cases of InfA-H3N2, 9 cases of RSV, 7 cases of HMPV, 3 cases of InfA, HRV and HADV each, and 1 case of InfB, HCoV and MP each. Of the 9 specimens with 2 pathogens detected, 6 were with influenza combined with other viruses(HRV, HADV, RSV, HCoV, HMPV), 1 with H1N1 and H3N2, and 2 with RSV, HRV and HCoV, HADV, respectively. **Conclusion**　Influenza-like cases caused by non-influenza pathogenic microorganisms are common. Multiple PCR detection can help to understand the pathogen distribution and mixed infection in influenza-like cases.

Keywords　multiple PCR detection; influenza-like cases; respiratory pathogen; child

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81271890)
作者单位:1.首都医科大学附属北京友谊医院 a儿科,b北京热带医学研究所 热带病防治研究北京市重点实验室,北京 100050;2.民航总医院儿科,北京　100025;3.北京市昌平区中西医结合医院儿科,北京　100096;4.应急总医院儿科,北京　100028
通讯作者:王红,电子信箱:1027david@vip.sina.com;辛德莉,电子信箱:xindl48@126.com

流行性感冒（流感）是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病，传染性强，常引起季节性流行，其中以甲型流感病毒（influenza A virus，InfA）和乙型流感病毒（influenza B virus，InfB）引起的最为多见，人群普遍易感[1]。按照《全国流感监测方案（2017年版）》要求，我国目前对于流感样病例（influenza-likeillness，ILI）的临床标本主要进行流感病毒的检测[2]。既往研究曾报道在ILI患者中检测到肠道病毒[3-4]，提示流感样症状并非全部由流感病毒感染所致。近年来多重聚合酶链反应（PCR）检测在呼吸道感染病原检测中的应用日益广泛，已有国产试剂通过临床验证上市，通过该项技术不仅有助于提高呼吸道病原的检出率，也有利于拓展我们对呼吸道感染病原谱的认识[5-6]。本研究采用呼吸道病原多重PCR检测技术对2018年11月至2019年2月间北京地区94例儿童ILI的咽拭子标本进行检测，以了解儿童ILI的病原分布情况，探讨多病原检测在ILI病原检测中的临床价值，现报告如下。

1　研究对象与方法

1.1　研究对象　收集2018年11月至2019年2月民航总医院、北京市昌平区中西医结合医院、应急总医院收治的儿童ILI咽拭子标本。纳入标准：以《全国流感监测方案（2017年版）》ILI为标准[2]，即发热（体温≥38℃），伴咳嗽或咽痛之一者。排除标准：（1）病程＞72 h；（2）有明确细菌感染或明确诊断为其他疾病的患者。

1.2　方法

1.2.1　咽拭子标本采集　采用尼龙材质植绒拭子采集咽拭子标本，采集后置于病毒采样管中，置于-80℃冰箱中冰冻保存，集中进行核酸提取。

1.2.2　核酸提取　核酸提取采用核酸提取或纯化试剂BD-Micro型（宁波市重鼎生物技术有限公司，批号20190212），具体按照试剂盒说明书要求进行。

1.3　13种呼吸道病原多重PCR检测

1.3.1　检测的病原　13种呼吸道病原多重检测试剂盒购自宁波海尔施基因科技有限公司（批号109103001）。病原包括InfA、InfA-H1N1（2009）、季节性H3N2病毒、InfB、人副流感病毒（human para-inluenza virus，HPIV）、人腺病毒（humanadenovirus，HADV）、人博卡病毒（human bocavirus，HBoV）、鼻病毒（human rhinovirus，HRV）、肺炎衣原体（chlamydia pneumoniae，CP）、人偏肺病毒（human metapneumovirus，HMPV）、肺炎支原体（mycoplasma pneumoniae，MP）、冠状病毒（human coronavirus，HCoV）和呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）。

1.3.2　多重PCR扩增　按以下比例在PCR管内加入试剂和样品以进行目的片段的反转录步骤：DNase/RNase Free H_2O 8 μL+5x RT Buffer 4 μL+RT primer mix 2 μL+Reverse transcriptase 1 μL+Sample 5 μL，合计20 μL，混匀后按以下温度孵育：48℃ 1 min、42℃ 60 min、95℃ 5 min，然后在4℃保存。之后按以下比例在新的PCR管内加入试剂和样品以进行目的片段的PCR步骤：10×PCR Buffer 2 μL+25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μL+PCR primermix 2 μL+Solution X 2 μL+Taq DNA Polymerase 0.7 μL+RT产物9.3 μL，合计20 μL，混匀后按以下温度进行热循环反应94℃ 1 min、94℃ 30 min、60℃ 30 min、70℃ 1 min，上述步骤重复35次，70℃ 1 min，然后在4℃保存[5]。

1.3.3　毛细电泳片段分离　配制下述毛细电泳体系：上样液38.5 μL+DNA内标0.5 μL+PCR产物1 μL，合计40 μL，将约220 μL分离液加入96孔分离液板上对应的孔中。用遗传分析仪对各样品的PCR产物进行毛细电泳分离[5]。

1.3.4　结果分析　每个样品的峰型图中3个内参的峰（人RNA、人DNA和反应内参）必须出现，说明样品未发生明显降解且实验流程正常；所有病原体的PCR产物片段长度需要与参考大小的差距＜1.5 bp[5]。

1.4　统计学分析　采用SPSS20.0软件进行统计学分析。计数资料采用卡方检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　一般资料　2018年11月至2019年2月间共收集到儿童ILI的咽拭子标本94例，其中男46例，女48例。年龄分布为0～3岁25例，＞3～6岁48例，＞6～14岁21例。

2.2　多重PCR呼吸道病原检测结果　94例标本中78例（82.98%）检测到病原阳性，其中69例（73.40%）检出1种病原，9例（9.57%）检出2种病原。单一病原检出按例数由多到少分别为InfA-H1N1 31例（32.98%），InfA-H3N2 10例（10.64%），RSV 9例（9.57%），HMPV 7例（7.45%），HRV 3例（3.19%），其他InfA亚型3例（3.19%），HADV 3例（3.19%），InfB1例（1.06%），HCoV 1例（1.06%），MP 1例（1.06%）。9例检出2种病原标本中，其中

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

6例(6.38%)检出流感合并其他病毒,分别为合并HRV、HADV、RSV、HCoV、HMPV;1例(1.06%)检出InfA-H1N1和InfA-H3N2;1例(1.06%)检出RSV和HRV;1例(1.06%)检出HCoV和HADV。未检测到HPIV、HBoV及CP(见表1)。94例标本中52例(55.32%)检出流感病原,26例(27.66%)检出非流感病原。26例非流感病原中24例检出1种病原,2例检出2种病原,按照检出例数由多到少依次为RSV 9例(9.57%),HMPV 7例(7.45%),HRV 3例(3.19%),HADV 3例(3.19%),HCoV 1例(1.06%),MP 1例(1.06%)。2例2种病原标本1例为RSV和HRV,1例为HCoV和HADV(见表1)。

2.3 不同年龄组病原检出情况 不同年龄组病原检出率分别为0~3岁组76.00%(19/25),>3~6岁组87.5%(42/48),>6~14岁组80.96%(17/21),各组间阳性率差异无统计学意义($\chi^2=1.618$,$P=0.445$)。单一病原检出阳性率分别为0~3岁组72.00%(18/25),>3~6岁组79.17%(38/48),>6~14岁组61.90%(13/21),各组间阳性率差异无统计学意义($\chi^2=2.264$,$P=0.332$)。混合感染病原检出阳性率分别为0~3岁组4.00%(1/25),>3~6岁组8.33%(4/48),>6~14岁组19.05%(4/21),各组间阳性率差异无统计学意义($\chi^2=3.159$,$P=0.206$)(见表1)。不同年龄组间流感(InfA-H1N1、InfA-H3N2、InfA、InfB)检出率分别为0~3岁组36.00%(9/25),>3~6岁组54.17%(26/48),>6~14岁组47.62%(10/21),各组间阳性率差异无统计学意义($\chi^2=4.392$,$P=0.111$)。不同年龄组间RSV检出率分别为0~3岁组28.00%(7/25),>3~6岁组2.08%(1/48),>6~14岁组4.76%(1/21),各组间阳性率差异有统计学意义($\chi^2=13.476$,$P=0.001$);0~3岁组检出率高于>3~6岁组($\chi^2=8.815$,$P=0.003$)。不同年龄组间HMPV检出率分别为0~3岁组4.00%(1/25),>3~6岁组10.42%(5/48),>6~14岁组4.76%(1/21),各组间阳性率差异无统计学意义($\chi^2=1.265$,$P=0.531$)。

2.4 流感病原分布情况 94例标本中,流感阳性52例(55.32%),其中InfA-H1N1 31例(32.98%),InfA-H3N2 10例(10.64%),其他亚型InfA 3例(3.19%),InfB 1例(1.06%),1例(1.06%)同时存在InfA-H1N1、InfA-H3N2阳性,6例(6.38%)标本检测出InfA合并其他病毒,其中2例合并HRV感染,另外4例分别合并HADV、RSV、HCoV、HMPV。

3 讨论

儿童不仅是流感的易感人群,也是重症流感和死亡病例的高危人群,2岁以下婴幼儿在流感季节因患流感的住院率是2岁以上年龄组的12倍[6]。国家卫生健康委员会颁布的《流行性感冒诊疗方案(2019年版)》指出早诊早治是减少重症和死亡病例的关键[7]。既往文献研究发现在温带地区,流感的流行季节一般是冬春季节,在我国,甲型流感随纬度变化周期性有所不同,具备多样化的空间模式和季节性特征,北方地区呈每年1~2月份单一高峰[8]。郭倩等[9]报道2018年10月1日至2019年3月3日,季节性流感以甲型流感为主,其中141079例(71.0%)为InfA-H1N1流感,57729例(29.0%)为InfA-H3N2流感。本文通过对同期北京地区儿童ILI的病原学检测提示52例流感阳性标本中,以InfA为主,其中以InfA-H1N1为主,符合全球流感的流行情况。52例流感阳性标本中,有1例标本同时检测出InfA-H1N1、InfA-H3N2核酸,提示该患儿同时存在上述两种亚型流感感染。Odun-Ayo等[10]也曾报道分离检出InfA-H1、H3亚型共同感染的病例,提示临床中存在InfA-H1、H3亚型共同感染的情况,尚需扩大样本量并结合临床症状及转归进一步研究。52例流感阳性标本中,有6例(11.54%)同时合并其他病毒感染,其中2例合并HRV感染,另外4例分别合并HADV、RSV、HCoV、HMPV,提示由流感病毒合并其他病毒感染引起的ILI并不少见,临床中应引起重视。

目前我国对ILI的病原学检测,主要检测流感病毒及相关亚型。近年来对ILI的非流感病原检测研究逐渐增多,文献[3-4]分别报道在流感病原阴性

表1 各年龄组病原检出情况

组别(岁)	阳性[例(%)]	单病原感染[例(%)]													混合感染[例(%)]
		H1N1	H3N2	InfA	InfB	RSV	HMPV	HADV	HRV	HCoV	MP	HPIV	HBoV	CP	
0~3($n=25$)	19(76.00)	6(24.00)	3(12.00)	0	0	7(28.00)	1(4.00)	1(4.00)	0	0	0	0	0	0	1(4.00)
>3~6($n=48$)	42(87.50)	20(41.67)	4(8.33)	1(2.08)	1(2.08)	1(2.08)	5(10.42)	2(4.16)	2(4.16)	1(2.08)	1(2.08)	0	0	0	4(8.33)
>6~14($n=21$)	17(80.96)	5(23.81)	3(14.29)	2(9.52)	0	1(4.76)	1(4.76)	0	1(4.76)	0	0	0	0	0	4(19.05)
合计($n=94$)	78(82.98)	31(32.98)	10(10.64)	3(3.19)	1(1.06)	9(9.57)	7(7.45)	3(3.19)	3(3.19)	1(1.06)	1(1.06)	0	0	0	9(9.57)

(C)1994-2020 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的ILI患者中检测到肠道病毒。文献[11]对640例ILI的咽拭子标本进行分析,在9例标本中检测到了新型冠状病毒(SARS-CoV2)。本研究94例ILI标本中,26例(27.66%)检测出非流感病原,其中24例检出1种病原,2例检出2种病原,提示流感样症状并非均为流感病毒感染导致,其他病原体感染或混合感染同样可引起发热、咳嗽或咽痛等流感样症状,且并不少见,临床工作中应注意病原辨别,针对性用药。

儿童急性呼吸道感染是常见的儿童呼吸道疾病,可引发急性上呼吸道感染、急性支气管炎、肺炎等多种疾病,也是目前5岁以下儿童最主要的死亡原因之一。敏感、特异、快速的病原诊断是正确诊治的重要保证[12-13]。分子生物学方法中的PCR技术因其敏感度和特异度较好,已成为实验室常规检测手段,传统PCR一次只能检测1种病原,多重PCR又称多重引物PCR或复合PCR,其原理、反应和操作过程均与普通PCR相似,但可在同一PCR反应体系里加入2对或2对以上引物,从而在一次反应中同时扩增出多个核酸片段,能同时检测多种病原体,在临床混合感染的鉴别诊断上具有独特的优势和较高的实用价值[6]。张海邻等[5]应用多重PCR技术检测儿童下呼吸道感染病毒和不典型病原体,发现多重PCR法阳性率高于直接免疫荧光法且可检测更多的呼吸道病原。王乐等[14]应用多重RT-PCR技术检测了20种儿童呼吸道感染病毒,特异度强、灵敏度高,与荧光定量PCR检测结果一致率达97.5%。由SARS-CoV2感染引起的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019,COVID-19)严重威胁着人们的健康和生命安全。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第7版)》中指出:COVID-19主要与流感病毒、HADV、RSV等其他已知病毒性肺炎及肺炎支原体感染相鉴别,尤其是对疑似病例要尽可能采取包括快速抗原检测和多重PCR核酸检测等方法,对常见呼吸道病原体进行检测[15]。本研究使用的多重PCR核酸检测试剂可同时检测流感病毒、RSV、HADV、HMPV、MP等13种常见病原微生物,具有高效性、系统性、经济、简便等优势,并可区分甲型流感的常见亚型。因此,多重PCR核酸检测技术不仅能全面了解儿童ILI的病原特点,监测流感的流行状况,还有助于我们进一步发现混合感染。同时可为SARS-CoV2感染的鉴别诊断提供全面、高质量的病原体检查结果,有利于疫情的防控和临床诊治。

综上所述,2018年11月至2019年2月期间,北京地区儿童流感以InfA为主,其中InfA-H1N1占多数。由非流感病原微生物引起ILI并不少见,部分ILI存在多病原混合感染情况,应引起临床的重视。多重PCR核酸检测可同时检测多种常见病原,灵敏度高、特异性强、可提高样本的使用率,有助于全面了解ILI的病原和混合感染情况,对实现早期病原学诊断及鉴别诊断,指导临床治疗有意义。

参考文献

[1] Paules C,Subbarao K. Influenza[J]. Lancet,2017,390(10095):697-708.

[2] 国家卫生和计划生育委员会. 全国流感监测方案[Z]. 2017年版. 2017-03-30.

[3] 孙宝昌,卢姝姝,吴矛矛,等.2017-2018年浙江省温州市流感病毒检测阴性的流感样病例中肠道病毒病原谱调查[J].疾病监测,2019,34(12):1096-1099.

[4] 沈玲羽,杜嘉鑫,刘芳遥等. 北京地区流感样病例中肠道病毒血清型分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(3):176-180.

[5] 张海邻,陈小芳,吕芳芳,等. 多重PCR技术检测儿童下呼吸道感染病毒和不典型病原体的价值[J]. 温州医科大学学报,2017,47(11):791-795,800.

[6] 艾军红,谢正德. 儿童呼吸道病毒感染的实验室诊断方法及合理应用[J]. 中国实用儿科杂志,2019,34(2):104-108..

[7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会,国家中医药管理局. 流行性感冒诊疗方案(2019年版)[J]. 中华临床感染病杂志,2019,12(6): 451-455.

[8] 邓继岿,张锐沐. 儿童流感流行病学及防治策略[J]. 中国实用儿科杂志,2018,33(6):409-413.

[9] 郭倩,陈涛. 2018~2019年冬春季全球流感流行情况[J]. 热带病与寄生虫学,2019,17(1):1-4,13.

[10] Odun-Ayo F, Odaibo G, Olaleye D. Influenza virus A (H1 and H3) and B co-circulation among patient presenting with acute respiratory tract infection in Ibadan,Nigeria[J]. Afr Health Sci,2018,18(4):1134-1143.

[11] Kong WH, Li Y, Peng MW, et al. SARS-CoV-2 detection in patients with influenza-like illness[J]. Nat Microbiol,2020,5:675-678.

[12] Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, et al. WHO estimates of the causes of death in children[J]. Lancet,2005,365(9465):1147-1152.

[13] 钱渊. 儿童呼吸道病毒感染的病原诊断现状与挑战[J]. 中国实用儿科杂志,2019,34(2):97-99.

[14] 王乐,赵梦川,石仲仁,等.GeXP多重RT-PCR技术在儿童呼吸系统病毒感染病原体检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(12):852-856.

[15] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室.《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第7版)》[Z]. 2020-03-04.

(2020-05-15收稿 2020-09-18修回)