

四川地区儿童呼吸道感染人博卡病毒的 流行特征与基因变异分析*

杨晶艳^{1,2}, 胡鹏威¹, 陈蕊¹, 鲁蕾¹, 裴晓方^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 医学检验学教研室(成都 610041);

2. 成都中医药大学医学技术学院 微生物及免疫学检验教研室(成都 611137)

【摘要】 目的 分析四川地区儿童呼吸道感染人博卡病毒(HBoV)的流行概况和临床特征,探讨 HBoV 四川分离株衣壳蛋白基因(VP1)变异特征。**方法** 收集 787 例呼吸道感染儿童鼻咽分泌物标本,PCR 方法检测 HBoV,扩增 VP1 基因序列全长并测序,分析核苷酸和氨基酸变异特征。**结果** HBoV 的检出率为 8.26%(65/787),50.77%(33/65)混合感染其它呼吸道病毒。全年均有检出,主要感染<3 岁的儿童,其中男童检出率高于女童。引起的呼吸道症状主要有咳嗽、发热及咳痰。系统进化树分析表明 8 株四川分离株均为 HBoV1 基因型。碱基变异以 GA+AG 转换为主,非同义突变大于同义突变。**结论** HBoV 是四川地区儿童呼吸道感染的重要病原之一;VP1 基因核苷酸序列变异以碱基转换为主;氨基酸突变位点可能与免疫逃避有关。

【关键词】 呼吸道感染 人博卡病毒 儿童 衣壳蛋白基因 系统进化树

Study of Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of Human Bocavirus in Children with Respiratory Tract Infection

in Sichuan YANG Jing-yan^{1,2}, HU Peng-wei¹, CHEN Rui¹, LU Lei¹, PEI Xiao-fang^{1△}. 1. Department of Medical Technology, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Microbiology and Immunology Technology, School of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

△ Corresponding author, E-mail: xxpei@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the epidemiological features and clinical features of human bocavirus (HBoV) infection in children with respiratory tract infection in Sichuan, and to analysis the HBoV VP1 gene mutation characteristics of Sichuan clinical strains. **Methods** Nasopharyngeal secretions were collected from 787 hospitalized children with respiratory tract infection. PCR was used to detect HBoV. The VP1 genetic variations of the nucleotide and amino acid were analysed respectively. **Results** Out of 787 specimens from respiratory tract, 8.26% (65/787) were positive for HBoV, 50.77% (33/65) were co-detected with other respiratory viruses. HBoV is usually detected in children under 3 years of age, the positive rate of male children was higher than female children. Most frequently clinical symptoms of HBoV were cough, fever and expectoration. Phylogenetic analyses showed that all the 8 clinical strains were HBoV1 genotype. GA+AG transitions were the most frequent transitions detected, while the nonsynonymous mutations were more than synonymous mutations. **Conclusion** HBoV is an important pathogen of respiratory tract infection in children in Sichuan. The main type of nucleotide variation is transitions. Amino acids mutations may relate to immune evasion.

【Key words】 Respiratory tract infection Human bocavirus Children Coat protein gene
Phylogenetic tree

人博卡病毒(human bocavirus, HBoV)是 2005 年在呼吸道感染儿童患者的鼻咽分泌物中发现的一种新型呼吸道病毒^[1],随后又在胃肠道疾病患者粪便中发现了 HBoV 另 3 种基因型:HBoV2、HBoV3

和 HBoV4^[2-4]。已有的研究表明,HBoV 在全球普遍流行,在呼吸道分泌物中 HBoV1 至 3 型均有检出,HBoV4 尚未发现检出于呼吸道中。截止目前,我国仅有天津、长春、湖南、兰州等地^[5-8]对 HBoV 在呼吸道感染中的流行病规律进行了监测。HBoV 在上述地区呼吸道感染患者中普遍存在,但是由于不同地区、不同人群的差异,HBoV 检出率变化范围较大,流行病特征各异。我国幅员广阔,南北气温差异大,许多地区病原体的流行规律不同,不同地区的

* “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“传染病监测技术平台”项目“云南及周边省市传染病病原谱流行规律研究”课题(No. 2012ZX10004-212)资助

△ 通讯作者, E-mail: xxpei@sina.com

HBoV 分子流行病学特征对该地区的疾病的预防和控制均有着重大的意义。在四川地区,有关 HBoV 在呼吸道感染患者中的流行情况的研究目前还处于空白状态。为探讨 HBoV 与四川地区儿童呼吸道感染的关系,阐明其在四川地区儿童呼吸道感染中的流行情况及其变异特征,本研究运用 PCR 技术,对本地区发热呼吸道感染儿童呼吸道分泌物样本进行检测,并通过对 HBoV 阳性样本中的核苷酸片段测序,确定 HBoV 基因型,分析 HBoV 衣壳蛋白基因(VP1)的变异情况,阐明 HBoV 在呼吸道的分子生物学特征和基因变迁,为四川地区 HBoV 的流行情况积累基础信息,并为传染病的防控提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Viral Nucleic Acid Extraction Kit VR100 (Geneaid 公司); *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U)、DNA Marker I、Gold View™ Nucleic Acid Stain(天根生化科技北京有限公司); dNTPs(10 mmol/L, 瑞士 Roche 公司); 引物购于 Invitrogen(上海)公司; PowerPacbasic 电泳仪(BIO-RAD)、MyCycler PCR 扩增仪(BIO-RAD)、紫外凝胶成像仪(天呈科技); 胶回收纯化试剂盒(Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System)。

1.2 研究对象

于 2010 年 5 月至 2011 年 8 月,收集四川大学华西第二医院呼吸道感染儿童病例(787 例)呼吸道分泌物标本,所有病例均为住院病例。其中男 477 例,女 310 例,男女比为 1.54 : 1。年龄最小 <1 月,最大 18 岁,平均 2.59 岁。同时收集患者病历信息。

1.3 方法

1.3.1 样本采集与处理 采集患儿当日呼吸道分泌物标本,包括鼻咽抽吸物、鼻/咽拭子、痰等,以鼻咽抽吸物为主(占 96.7%)。标本采集后置于冰盒中尽快送检。样本如黏液成分较重,可进行液化处理;按 1 : 1 体积比加入 1% pH7.6 的胰蛋白酶溶液,37 °C 消化 15~30 min。

1.3.2 HBoV 检测 取 200~400 μ L 标本(标本使用量最多不超过 1 mL)用于核酸的提取,其余部分分装后置 -70 °C 冰箱留存,保存期间避免反复冻融。运用 Viral Nucleic Acid Extraction Kit VR100 试剂盒提取呼吸道分泌物中病毒核酸,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。病毒核酸收集于 50 μ L

RNase free 水中。提取的核酸运用 PCR 检测 HBoV,上游引物:5'-GACCTCTGTAAGTACTAT TAC-3',下游引物:5'-CTCTGTGTTGACTGAA TACAG-3'^[9]。PCR 扩增产物长度为 354 bp。扩增温度循环参数:第 1 阶段,94 °C 预变性 5 min;第 2 阶段,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;第 3 阶段,72 °C 终延伸 7 min。20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

1.3.3 HBoV VP1 基因变异分析 运用 PCR 方法获取 HBoV 阳性标本 VP1 基因全长,上游引物:5'-GATAACTGACGAGGAAATG-3',下游引物:5'-GAGACGGTAACACCACTA-3'^[10]。PCR 扩增产物长度为 2 191 bp。由于目的片段较长,设计测序中间引物 HBoV_M:5'-GACACTCCTCCAT TCATGGT-3',以获得目的片段全长。扩增温度循环参数:第 1 阶段,95 °C 预变性 8 min;第 2 阶段,95 °C 变性 50 s,47 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环;第 3 阶段,72 °C 终延伸 10 min。获得目的片段经胶回收纯化试剂盒纯化回收。具体操作步骤按手册提供的方法进行。将纯化回收的目的片段产物送 Invitrogen(上海)贸易有限公司进行序列测定和序列拼接。运用 Clustal X1.8、Mega 5.0 等软件构建 Neighbor joining 系统发生树,Bootstrap test 验证系统发生树的可靠性。运用 NCBI 在线分析工具 Open Reading Frame Finder (ORF Finder; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)、BioEdit 7.0 等软件分析分离株核苷酸和氨基酸序列,阐明基因变异情况。

1.3.4 统计学方法 采用 χ^2 检验对结果进行统计学分析, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 呼吸道感染患儿鼻咽分泌物 HBoV-DNA 检测结果

787 例呼吸道感染的住院患儿鼻咽分泌物样本中共检出 HBoV-DNA 阳性样本 65 例,总阳性率为 8.26%。

2.2 HBoV 与其他常见呼吸道病毒的混合感染情况

65 例 HBoV 阳性样本中,混合有其他呼吸道病毒的样本 33 例,占 HBoV 阳性感染总数的 50.77% (33/65)。其中混合感染一种呼吸道病毒的样本 28 例,占 43.08% (28/65),混合感染两种呼吸道病毒的样本 5 例,占 7.69% (5/65)。见表 1。

表 1 HBoV 与其他常见呼吸道病毒混合感染分布情况

Table 1 The distribution of co-infection of HBoV with other respiratory virus

Co-pathogens	Patients (constituent ratio)
HBoV+ Respiratory syncytial virus	15 (23. 08%)
HBoV+ Parainfluenza virus	5 (7. 69%)
HBoV+ Adenovirus	5 (7. 69%)
HBoV+ Influenza virus	2 (3. 08%)
HBoV+ Human metapneumovirus	1 (1. 54%)
HBoV+ Respiratory syncytial virus+Parainfluenza virus	2 (3. 08%)
HBoV+ Adenovirus+Respiratory syncytial virus	1 (1. 54%)
HBoV+ Adenovirus+Influenza virus	1 (1. 54%)

2.3 HBoV 感染的临床流行病学特征

2.3.1 HBoV 感染病例性别分布 HBoV 阳性患儿中,男性患儿 47 例,男性患儿阳性率为 9.85%;女性患儿 18 例,女性患儿阳性率为 5.81%;经 χ^2 检验,男女性患儿 HBoV 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=4.06, P<0.05$),男性患儿 HBoV 阳性率高于女性患儿。

2.3.2 HBoV 感染病例年龄分布 在 HBoV 阳性患儿中,感染年龄最小为<1 月的新生儿,最大的 14 岁,平均 1.98 岁。阳性病例年龄主要分布在<3 岁的幼儿,占有阳性病例的 84.62%。不同年龄组阳性样本检出情况见表 2。其中 1 岁~年龄组和 2 岁~年龄组患儿 HBoV 阳性检出率较高,达 13% 左右。运用 χ^2 检验经过两两比较,0.5 岁~年龄组、1 岁~年龄组、2 岁~年龄组与<0.5 岁年龄组 HBoV 阳性检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.56, P>0.05$; $\chi^2=2.52, P>0.05$; $\chi^2=2.75, P>0.05$)。

表 2 HBoV 在不同年龄组呼吸道感染患儿中的分布

Table 2 The distribution of HBoV infection in different age groups of children

Age	n	HBoV positive patients [case (%)]
<0.5 yr.	292	22 (7.53)
0.5 yr. -	101	10 (9.90)
1 yr. -	93	12 (12.90)
2 yr. -	82	11 (13.41)
3 yr. -	63	1 (1.59)
5 yr. -	98	6 (6.12)
10-18 yr.	58	3 (5.17)
Total	787	65 (8.26)

2.3.3 HBoV 感染病例时间分布 HBoV 阳性病例在全年各月份分散检出,季节分布不明显。其中 2010 年 5 月、7 月 8 月和 12 月检出率较高,达到 10% 以上。HBoV 不同月份阳性检出率如图 1 所示。

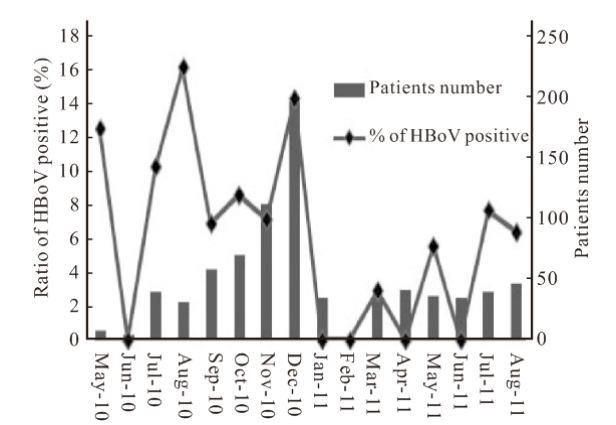


图 1 不同月份呼吸道感染患儿 HBoV 感染分布情况

Fig 1 The distribution of HBoV infection in different months

2.3.4 HBoV 感染病例临床表现 65 例 HBoV 阳性呼吸道感染患儿中主要临床症状有咳嗽(61 例,占 93.85%),发热(39 例,占 60.00%),咳痰(34 例,占 52.31%),流涕(16 例,占 24.62%),呼吸困难(8 例,占 10.77%)。另外有 8 例病例伴有腹痛、腹泻(每天稀便≥3 次)等胃肠道症状(占 12.31%)。

2.3.5 不同呼吸道感染疾病中 HBoV 的检出情况 787 例呼吸道感染病例的临床诊断以肺炎(包括支气管肺炎、新生儿肺炎等)为主,其次为支气管炎、急性上呼吸道感染或发热待诊等。HBoV 在不同呼吸道疾病中的检出情况见表 3。在已明确临床诊断的患儿中(不含发热待诊),毛细支气管炎患儿的 HBoV 阳性率最高,111 例新生儿肺炎无 HBoV 阳性检出。

表 3 不同呼吸道感染疾病中 HBoV 检出率

Table 3 The positive rate of HBoV infection in different diseases

Clinical diagnosis	n	HBoV positive patients [case (%)]
Pneumonia	597	52 (8.71)
Asthmatoid bronchiti	12	1 (8.33)
Capillary bronchitis	29	5 (17.24)
Bronchitis	33	3 (9.09)
Fever for diagnosis	23	4 (17.39)

2.4 HBoV VP1 基因变异分析

2.4.1 核苷酸变异分析 随机选取 8 株四川分离株(分别编号为 sc/r/7468、sc/r/2337、sc/r/4176、sc/r/4234、sc/r/5363、sc/r/7757、sc/r/7872、sc/r/4226)测序获得的 VP1 基因全长,系统进化分析均与 HBoV1 基因型位于同一进化簇,见图 2。四川分离株与瑞典最初发现的 HBoV st2 参考株 VP1 基因相似率最高,为 99.65%~99.90%。8 株四川分离株 HBoV1 VP1 基因核苷酸的平均遗传距离(P-

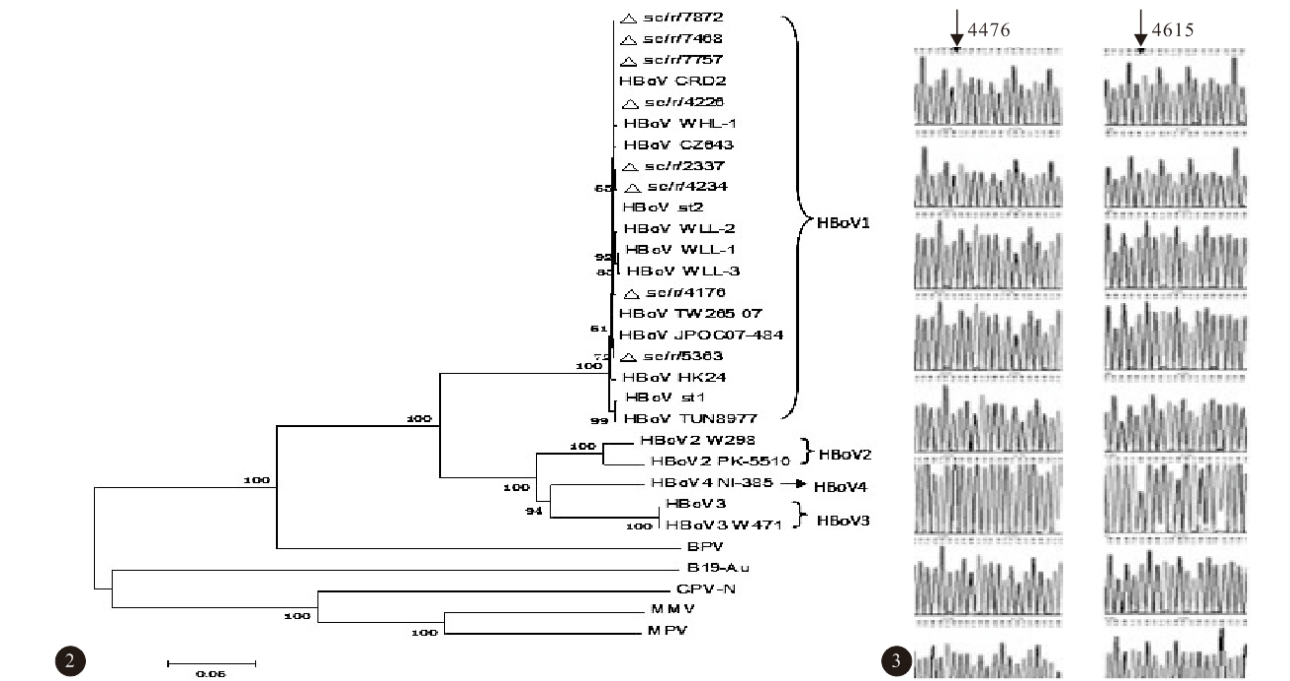


图 2 HBoV 四川分离株与其他细小病毒属病毒 VP1 核苷酸序列 NJ 进化树分析

图 3 HBoV 四川分离株 VP1 基因测序图

Fig 2 Phylogenetic analysis of the VP1 gene of HBoV between Sichuan strains and other Parvovirus

Fig 3 Genetic sequencing diagram of the VP1 gene of HBoV

Fig 2: Δ means HBoV Sichuan strains, other reference strains nucleotide sequences were downloaded from NCBI GenBank database. Bovine parvovirus (BPV), B19-Au, Canine (CPV-N), Minute virus of mice (MMV), Mouse parvovirus (MPV) were served as the outgroup sequences; Fig 3: The diagrams from top to bottom are sc/r/7468, sc/r/2337, sc/r/4176, sc/r/4234, sc/r/5363, sc/r/7757, sc/r/7872, sc/r/4226. The VP1 gene of all the 8 clinical strains had AG transitions in the site 4476 and 4615

distance)为0.002。以HBoV1 st2为参考,发现29处核苷酸碱基转换,未见核苷酸颠换、缺失和插入,以GA+AG转换为主。位于VP1基因的第4476、4615位点发生了较为一致的AG转换(图3)。

2.4.2 氨基酸变异分析 以HBoV st2为参考,氨基酸平均遗传距离为0.001。29处碱基转换突变中,引起氨基酸突变的共9处,所有四川分离株核苷酸第4476位点AG转换导致VP1基因氨基酸第474位点天冬酰胺(AAC)突变为丝氨酸(AGC)。另外,分离株sc/r/4226核苷酸第3174位点TC转换导致VP1基因氨基酸第40位点亮氨酸(TTA)突变为丝氨酸(TCA),其余的碱基突变均为同义突变。

3 讨论

3.1 HBoV 感染流行病特征

自2005年HBoV在呼吸道感染儿童鼻咽分泌物中发现以来,世界各国相继有报道,检出率为1.5%~24.5%。近年来,国内对HBoV的研究逐渐增多,天津、长春、湖南、兰州等地报道的检出率在2.92%~11.4%^[5-8]。本研究HBoV阳性检出率

为8.26%,检出率较高。表明该病毒普遍存在,不同地区,不同人群的调查,阳性率存在差异。

HBoV常与其他呼吸道病毒混合感染,混合感染率最高可达90%^[11]。本调查中混合感染率达到50.77%,最常见的混合感染病毒是呼吸道合胞病毒。在国内,杭州地区最近的一项调查中,HBoV混合感染率为45.5%^[12],天津地区的一项调查则达到64.3%^[5],与本次调查结果相似。HBoV是否依赖其他病毒发挥感染作用,目前的研究还不能给出合理的解释,还需要进一步的研究来证实。

以往的报道中HBoV主要感染2岁以下的婴幼儿^[1,11],但是这其中不乏有许多的研究本身纳入调查的患者年龄偏小。本次调查纳入的儿童年龄跨度比较大,但阳性病例年龄主要分布在<3岁的婴幼儿(占84.62%)。另外,有报道显示<6个月和>3岁的婴儿HBoV的检出率较低^[11],这与母体的抗体保护和幼儿自身免疫功能的逐步完善有关,本次调查与此前的报道相符。

值得一提的是,本次研究的男、女性患儿的检出率差异有统计学意义,男性患儿(9.85%)检出率高于女性患儿(5.81%)。与长沙、长春地区的调查结

果相似^[6,7]。是否男性患儿更容易感染 HBoV,其原因还值得深入的探讨。

一般来说,冬季是 HBoV 感染的高发季节。调查中亦发现气温较低的冬季是呼吸道病毒的高发期,医院就诊的患者明显增多,应加强婴幼儿的预防保健。

3.2 HBoV 感染临床特征

本次研究中 HBoV 呼吸道感染临床上主要表现为支气管肺炎、毛细支气管炎、支气管炎、喘息性支气管炎;主要临床症状是咳嗽、发热、咳痰、流涕、呼吸困难以及胃肠道症状。近来的研究显示 HBoV 感染与婴幼儿喘息密切相关^[13],儿童喘息主要包括 4 种常见疾病:喘息性支气管炎、喘息性肺炎、毛细支气管炎和支气管哮喘。在本次研究中,在喘息性肺炎和支气管哮喘患儿中没有 HBoV 阳性检出,喘息性支气管炎和毛细支气管炎患儿中 HBoV 阳性检出率分别为 8.33% 和 17.24%,尤其是毛细支气管炎阳性率较高,在临床诊断中值得注意。另外,本次调查中 111 例新生儿肺炎患儿无 HBoV 检出,这一现象可能是因为在成人的血清中 HBoV 抗体普遍存在,这些新生儿能得到来自母体的抗体的保护,这在临床诊断中具有一定的价值。

3.3 HBoV 四川分离株变异特征

HBoV 基因组包含 3 个开放阅读框架(ORF),共编码 4 种蛋白——非结构蛋白 NS1、非结构蛋白 NP1、衣壳蛋白 VP1 和 VP2。VP1 和 VP2 为典型的嵌套基因,终止密码子在同一位置,而 VP2 的起始密码子位于 VP1 蛋白基因序列内,因此 VP1 基因序列包括 5'端的独有序列(VP1U)和 VP2 序列。

本次研究获得的四川分离株,VP1 基因同源性较高(>99%),碱基置换中 4 种转换的频率比 8 种颠换的频率高,这符合生物化学性质相近的碱基之间的取代频率较高的普遍规律。氨基酸分析中,VP1 蛋白同义突变率高于非同义突变率,氨基酸平均遗传距离小于核苷酸。

已有的研究报道,影响 HBoV 抗原性的主要区域有 VP1U、VP2 的 N 端和 β G- β H 区域。其中 VP1U 区域磷脂酶 A₂(PLA₂)活性是细小病毒科病毒侵入细胞的关键,该区域包被在病毒衣壳内部,但入侵时会外翻;VP2 的 N 端区域富含甘氨酸,且易于旋转;细小病毒在 β G- β H 区域氨基酸序列高度可变,其插入序列具有高度抗原性。在影响抗原性的主要区域,为了逃避宿主打击,氨基酸突变较为频繁。本研究中,VP1 基因第 40 位氨基酸由亮氨酸

突变为丝氨酸,第 474 位由天冬酰胺突变为丝氨酸,与贵州^[14]、福州^[15]两地的研究结果报道一致。但是这些突变并未发生在维持活性的关键氨基酸上,可能与 HBoV 的感染适应力和免疫逃逸能力有关。

综上所述,本研究通过对四川地区 787 例儿童呼吸道感染患者 HBoV 核酸的检测,结合临床资料进行统计分析,首次获得在本地区呼吸道 HBoV 感染住院儿童的流行病特征和临床特征概况;同时基因变异研究发现四川分离株抗原性的关键区域有个别氨基酸发生突变,可能与免疫逃逸有关,研究结果不仅可为临床诊断和疾病预防提供参考,而且为 HBoV 的分子流行病学提供了基础数据,为病毒疫苗的研制提供了基础资料。

参 考 文 献

- 1 Allander T, Tammi MT, Eriksson M, *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102(36): 12891-12896.
- 2 Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, *et al.* A newly identified bocavirus species in human stool. *Infect Dis*, 2009; 199(2): 196-200.
- 3 Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, *et al.* A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*, 2009; 5(4): e1000391.
- 4 Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, *et al.* Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *Infect Dis*, 2010; 201(11): 1633-1643.
- 5 孔 梅, 李晓燕, 苏 旭等. 天津地区儿童急性下呼吸道感染病毒病原学分析. *天津医药*, 2011; 39(8): 685-687.
- 6 许 爽, 祝洪珍, 李 静等. 长春地区冬季儿童上呼吸道感染病毒病原学检测结果分析. *中国卫生工程学*, 2011; 10(3): 227-229.
- 7 肖霓光, 张 兵, 段招军等. 1165 例急性下呼吸道感染住院儿童的病毒病原学分析. *中国当代儿科杂志*, 2012; 14(1): 28-32.
- 8 瞿小旺, 漆正宇, 段招军等. 儿童急性呼吸道博卡病毒感染. *病毒学报*, 2006; 22(2): 79-82.
- 9 Chung JY, Han TH, Kim CK, *et al.* Bocavirus infection in hospitalized children, South Korea. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12(8): 1254-1256.
- 10 Qu XW, Duan ZJ, Qi ZY, *et al.* Human bocavirus infection, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2007; 13(1): 165-168.
- 11 Kaplan NM, Dove W, Abu-Zeid AF, *et al.* Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerg Infect Dis*, 2006; 12(9): 1418-1420.
- 12 周银燕, 于新芬, 潘劲草等. 杭州地区急性呼吸道感染患儿人博卡病毒的检测及分析. *中国预防医学杂志*, 2011; 12(6): 494-497.
- 13 Allander T, Jartti T, Gupta S, *et al.* Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*, 2007; 44(7): 904-910.
- 14 漆正宇, 瞿小旺, 刘文培等. 人博卡病毒基因克隆及衣壳编码基因序列变异分析. *病毒学报*, 2007; 23(6): 447-453.
- 15 修文琼, 刘光华, 康玉兰等. 人博卡病毒全基因组序列测定与种系分析. *中国人兽共患杂志*, 2010; 26(2): 158-162.

(2013-06-07 收稿, 2013-09-27 修回)

编辑 沈 进