

南京地区 100 例呼吸道感染患儿博卡病毒感染状况初步研究

张 琴*, 喻文亮, 葛许华, 赵邵懂, 陈 俊

(南京医科大学附属南京儿童医院 ICU, 江苏 南京 210008)

[摘要] **目的:**了解人博卡病毒(human bocavirus, HBoV)在南京地区呼吸道感染患儿中的致病情况。**方法:**选取 2009 年 11 月~2010 年 6 月因呼吸道感染住院的患儿鼻咽吸取物标本共 100 份,采用聚合酶链反应(PCR)方法检测 HBoV 的 NP1 基因片段,并对阳性产物进行测序,利用多功能分析软件 DNASTar 进行同源性分析,MEGA 软件绘制遗传进化树。分析感染患儿的临床资料。**结果:**在 100 例鼻咽吸取物标本中共检测到 5 例阳性,阳性率为 5%。DNASTar 分析发现 5 例阳性标本之间核苷酸同源性达 99.7%~100.0%,与其他国家 HBoV 的株同源性为 99.4%~100.0%。临床资料显示这 5 例患儿临床症状主要表现为咳嗽、喘息、发热等,临床诊断为肺炎 2 例、毛细支气管炎 1 例、支气管炎 1 例及喘息性支气管炎 1 例。患儿经常规治疗后均痊愈出院。**结论:**南京地区呼吸道感染患儿中有 HBoV 的流行。

[关键词] 人博卡病毒;呼吸道感染;儿童

[中图分类号] R373.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1099-04

Detection of human bocavirus in 100 children with acute respiratory tract infection in Nanjing

ZHANG Qin*, YU Wen-liang, GE Xu-hua, ZHAO Shao-dong, CHEN Jun

(Department of Emergence, the Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To understand whether human bocavirus(HBoV) is one of the pathogens leading to the children's respiratory infections in Nanjing. **Methods:** The patients hospitalized for respiratory tract infections (RTIs) were enrolled in the present study. Nasopharyngeal aspirates (NPAs) were collected from November 2009 to June 2010. HBoV NP1 gene in the samples was determined by polymerase chain reaction (PCR). The amplified positive NP1 fragments were sequenced and alignment with other HBoVs by DNASTar. Phylogenetic trees were drawn with MEGA software. The clinic findings of the children with HBoV infection were collected and analyzed. **Results:** Of all the 100 NPAs, five positive ones were founded. Among the five positive samples, the sequence homogeneity of the amplified NP1 gene fragment were 99.7%~100.0% at the nucleotide level. As compared with HBoVs from other countries, the homogeneity were 99.4%~100.0%. Among the five patients, the diagnoses were bronchopneumonia, bronchiolitis and bronchitis. Clinic findings included fever, cough, wheezing, etc. The patients were all recovered with conventional therapy. **Conclusion:** HBoV was one of the pathogens leading to the children's respiratory tract infection in Nanjing.

[Key words] human bocavirus; respiratory infection; children

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1099-1102]

呼吸道感染是儿科临床最为常见的疾病,也是 5 岁以下儿童死亡的重要原因之一。尽管一些较为迅速灵敏的检测手段得以发展,但除呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)、流感病

毒 A 型、副流感病毒及腺病毒等常见病毒外,迄今仍有相当部分呼吸道感染病原未能明确。2005 年,瑞典学者 Tobias Allander 在下呼吸道感染患儿呼吸道标本中发现一种新的病毒,命名为人博卡病毒(human bocavirus, HBoV),随即日本、美国、德国及我国均报道有该病毒的流行。HBoV 作为一种新发现的与儿童呼吸道感染密切相关的病毒病原,对其在不同地区的流行情况进行调查很有必要,为此本

[基金项目] 南京医科大学校科技发展基金(09NJ-MUM043)

*通讯作者, E-mail: zhangqin241@yahoo.com.cn

研究就南京地区该病毒流行情况进行了初步的研究。

1 对象和方法

1.1 对象

选取2009年11月~2010年6月,南京医科大学附属南京儿童医院住院的呼吸道感染患儿100例,年龄1个月~6岁,其中男60例,女40例,住院当天采集鼻咽分泌物标本。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

患儿住院后,吸痰管吸取鼻咽分泌物,将标本分为2份,1份取200 μ l用于提取病毒DNA,另1份标本经1 000 r/min离心10 min后,细胞沉渣重悬于5 ml PBS用直接免疫荧光法(DFA)检测常见呼吸道病毒。

1.2.2 DFA检测标本中的常见呼吸道病毒感染情况

标本处理后,细胞沉渣用于DFA检测RSV、流感病毒A、B亚型、副流感病毒1、2、3型及腺病毒。使用D3 Ultra™ DFA Respiratory Virus ID Kit(美国Diagnostic Hybrids公司)检测常见呼吸道病毒病原,操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 PCR扩增HBoV核酸片段NP-1

取200 μ l标本用TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit(日本,TaKaRa公司)提取病毒基因组DNA,具体操作按照试剂盒说明书进行。提取的DNA用于HBoV目的核酸片段NP-1的扩增。参考文献,设计引物,扩增NP-1基因片段(354 bp),引物序列如下:上游5'-GAGCTCTG-TAAGTACTATTAC-3';下游5'-CTCTGT GTTGACT-GAATACAG-3'。PCR扩增条件为:94℃预变性4 min;94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃延伸10 min。扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,PCR试剂用TaKaRa Ex Taq Hot Start Version(日本,TaKaRa公司)。

1.2.4 序列测定及比对分析

将阳性HBoV PCR产物进行序列测定,于GenBank中与HBoV ST1和HBoV ST2及北京的2株(No.DQ988934及No.DQ988933)进行序列比对;利用DNASar软件对其核苷酸的同源性进行分析,并通过MEGA5.0软件建立进化树。

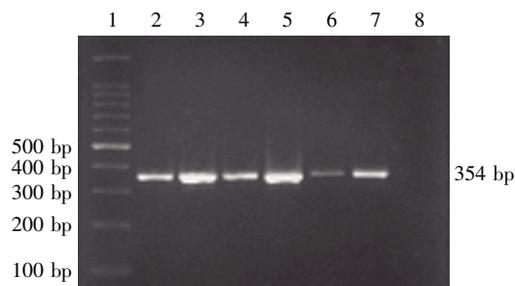
1.2.5 资料分析

分析HBoV感染的临床特征、HBoV与其他呼吸道病毒病原协同感染情况等。

2 结果

2.1 PCR检测结果

在100份痰标本中,共检测到5份HBoV阳性扩增产物,琼脂糖凝胶电泳结果见图1。



1:DNA marker;2~6:354 bp NP-1 扩增产物;7:阳性对照;8:阴性对照。

图1 HBoV NP-1 基因PCR扩增结果

Figure 1 PCR results against HBoV NP-1 gene

2.2 其他病毒检出情况

100份鼻咽吸取物标本中检出RSV21例、副流感病毒1型3例、副流感病毒3型3例、腺病毒2例、流感病毒A型1例。未检测出流感病毒B型和副流感病毒2型。发现的5例HBoV阳性标本中2例存在协同感染,均为与RSV协同感染。

2.3 临床资料分析

5例HBoV感染患儿中,有2例诊断为肺炎,1例诊断为毛细支气管炎,1例诊断为支气管炎,还有1例为喘息性支气管炎。患儿体温波动于37℃~39℃,临床表现有咳嗽、喘息、发热等。5例患儿给予常规治疗后均痊愈出院(表1)。

2.4 遗传发生进化分析

遗传发生进化分析显示5份HBoV的阳性扩增产物与猪细小病毒(MVC)和牛细小病毒(BPV)之间的距离要近于人细小病毒B19。这支持了HBoV与MVC、BPV同属博卡病毒属的结论。且这5份阳性产物与HBoV ST1和ST2株及北京BJ3722距离非常近,可视为同一进化簇。这5份阳性扩增产物与新发现的HBoV2距离较远(图2)。

2.5 序列变异分析

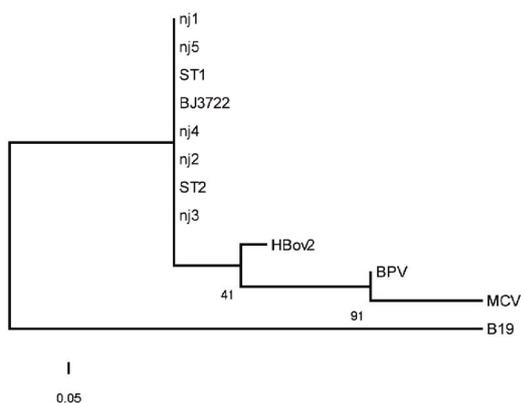
通过多功能分析软件DNASar进行序列变异分析发现,5例HBoV阳性标本之间核苷酸同源性高达99.7%~100.0%。这5例阳性标本与其他HBoV株如瑞典ST1、ST2、美国株CRD2、湖南株CZ643、北京株BJ3722和BJ3064同源性99.4%~100.0%。同时,以上各株与HBoV2同源性较差,在69.6%~77.3%(图3)。

表 1 HBoV 感染阳性患儿临床表现

Table 1 Clinical characteristics of patients positived for HBoV DNA by PCR

编号	性别	年龄	发病时间	诊断	最高体温(°C)	咳嗽	喘息	胸片	WBC($\times 10^9$ 个/L)	住院(d)
1	男	5 个月	2009 年 10 月	毛细支气管炎	38.0	+	+	肺炎	10.5	8
2	男	2 岁 6 个月	2009 年 12 月	支气管肺炎	39.0	+	-	肺炎	13.4	10
3	女	3 岁	2010 年 1 月	支气管炎	37.0	+	-	-	7.1	5
4	女	9 个月	2010 年 3 月	右侧肺炎	38.6	+	-	肺炎	8.9	9
5	男	1 岁 9 个月	2010 年 4 月	喘息性支气管炎	37.3	+	+	-	6.9	6

WBC:白细胞;+,:症状存在;-,:症状不存在。



基因注册号:ST1:DQ000495;ST2:DQ000496;BJ3722:DQ988934;HBoV2:FJ170279;BPV:NC_001540;MCV:NC_004442;B19:DQ234778。

图 2 5 例 HBoV 阳性标本与其他 HBoV 株系统进化树分析
Figure 2 Phylogenetic analysis of NP-1 gene nucleotide sequences of the Nanjing HBoV strains and other reference strains was prepared using MEGA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	■	99.8	99.8	99.5	77.3	99.5	99.7	100.0	99.8	100.0	99.7	99.7	1	BJ3064
2	0.2	■	100.0	99.7	77.3	99.7	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.8	2	BJ3722
3	0.2	0.0	■	99.7	77.3	99.7	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.8	3	CRD2
4	0.5	0.3	0.3	■	77.3	99.4	99.5	99.7	99.7	99.7	99.5	99.8	4	CZ643
5	27.3	27.3	27.3	■	77.3	77.2	69.6	77.3	71.7	77.2	77.5	77.5	5	HBoV2
6	0.5	0.3	0.3	0.6	27.3	■	99.8	99.7	99.7	99.7	99.5	99.5	6	nj1
7	0.3	0.2	0.2	0.5	27.5	0.2	■	100.0	99.8	100.0	99.7	99.7	7	nj2
8	0.0	0.0	0.0	0.3	39.5	0.3	0.0	■	100.0	100.0	100.0	100.0	8	nj3
9	0.2	0.0	0.0	0.3	27.3	0.3	0.2	0.0	■	100.0	99.8	99.8	9	nj4
10	0.0	0.0	0.0	0.4	35.8	0.4	0.0	0.0	0.0	■	100.0	100.0	10	nj5
11	0.3	0.2	0.2	0.5	27.5	0.5	0.3	0.0	0.2	0.0	■	99.7	11	ST1
12	0.3	0.2	0.2	0.2	27.1	0.5	0.3	0.0	0.2	0.0	0.3	■	12	ST2

左下方显示各病毒株间的变异度,右上方显示各病毒株间的同源性。基因注册号:CRD2:DQ340570;CZ643:DQ457413。

图 3 5 例 HBoV 阳性标本与其它国家 HBoV 核苷酸同源性分析

Figure 3 Homogeneity analysis of NP-1 genes of nanjing HBoV strains and others reference strains

3 讨论

自 2005 年瑞典学者 Allander 等^[1]运用随机 PCR 扩增、测序和生物信息学结合的方法,在儿童急性呼吸道感染标本中发现了 HBoV 后,很多国家如澳大利亚、日本、加拿大、法国、德国、韩国、美国等,相继报道了该病毒的流行^[2-3]。我国湖南、北京、

重庆^[4-5]等地也报道有该病毒的流行。本研究显示,2009 年 11~2010 年 6 月期间,在检测的 100 例患有呼吸道感染的患儿鼻咽吸取物标本中共检测到 5 例 HBoV 阳性,提示南京地区同样有 HBoV 的流行。根据文献,目前该病毒的感染率在 1.5%~18.3%,本研究结果显示感染阳性率 5%(5/100),结果差异考虑可能与地区、流行年份、气候以及选取标本时期、标本保存、试验条件等因素有关。在本研究中,RSV 的感染阳性率为 21%,仍然是小儿呼吸道感染的首位病毒病原。

在对这 5 例 HBoV 阳性产物进行核苷酸比对、同源性分析及遗传进化分析发现,这 5 例阳性标本之间的核苷酸同源性达 99.7%~100.0%,说明这 5 株病毒属于同一进化簇。与其他 HBoV 株如瑞典 ST1、ST2、美国株 CRD2、湖南株 CZ643、北京株 BJ3722 和 BJ3064 同源性也高达 99.4%~100.0%,而与新近发现的 HBoV2 同源性较差,仅 69.6%~77.3%。遗传进化树发现这 5 株 HBoV 与 ST1、ST2 及 BJ3722 距离非常近,说明南京地区流行的 HBoV 与以上各株为同一进化簇。同时与 HBoV2 距离较远,与国外相关文献相同。HBoV2 是于 2009 年 Kapoor 等^[6]在急性迟缓性麻痹和急性胃肠炎患者粪便标本中发现的一种新病毒,其与已发现的 HBoV 核苷酸水平有 23% 的差异。很快 HBoV3^[7]、HBoV4^[8]相继于粪便标本中被发现。目前研究显示这 4 种博卡病毒粪便感染阳性率 HBoV2 为最高,为 20%~26%^[8-9]。有观点认为粪便中博卡病毒表现为多种系及高度的遗传变异,而呼吸道博卡病毒却显示高度的遗传同源性,似乎提示呼吸道 HBoV 起源于肠道 HBoV^[8]。以上各博卡病毒在呼吸道及肠道疾病中的作用尚需进一步研究。

对这 5 例阳性标本的临床资料分析发现,男女比例为 3:2,但由于阳性标本较少,尚不能说明 HBoV 感染的性别趋势。目前相关研究尚没有发现 HBoV 感染有性别差异。这 5 例 HBoV 感染患儿发病时间分别是 11、12、1、3、和 4 月份。研究资料显示

HBoV 在温带地区主要是晚冬早春流行^[10],本研究结果与之相似。HBoV 感染引起的临床表现与 RSV 无明显差异,可引起上、下呼吸道感染,如喉炎、中耳炎、气管炎、肺炎、哮喘等。而本研究中 5 例 HBoV 感染患儿分被诊断为毛细支气管炎、支气管肺炎及支气管炎及喘息性支气管炎,临床表现有咳嗽、喘息、发热等,与其他病毒如 RSV、副流感病毒 3、腺病毒感染临床症状无明显差别,给予常规治疗后患儿均痊愈出院。同时在本研究中发现 HBoV 与其它病毒协同感染情况,且均与 RSV 协同感染,那么在致病过程中 HBoV 到底是“搭车”还是“肇事”尚不得而知。HBoV 每年的流行情况存在差别,需要对该病毒进行长期检测以明确该病毒的流行特点。

[参考文献]

- [1] Allander T, Mammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(36): 12891-12896
- [2] Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, et al. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children[J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(1): 99-102
- [3] Bastien N, Brandt K, Dust K, et al. Human Bocavirus infection, Canada [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(5): 848-850
- [4] 瞿小旺, 漆正宇, 段招军, 等. 儿童急性呼吸道博卡病毒感染[J]. *病毒学报*, 2006, 22(2): 79-82
- [5] 赵林清, 钱 渊, 朱汝南, 等. 北京地区婴幼儿急性呼吸道感染与新近报道的人细小病毒相关性的初步研究[J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2006, 26(5): 385-386
- [6] Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool [J]. *J Infect Dis*, 2009, 199(2): 196-200
- [7] Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(4): e1000391
- [8] Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(11): 1633-1643
- [9] Cheng W, Chen J, Xu Z, et al. Phylogenetic and recombination analysis of human bocavirus 2 [J]. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 50
- [10] Weissbrich B, Neske F, Schubert J, et al. Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections [J]. *BMC Infect Dis*, 2006, 6: 109

[收稿日期] 2012-01-15