

# 江西省九江市健康婴儿中 TTV 感染的调查

彭宜红 曹继红 王清 胡烈谱 赵学森 彭进

**【摘要】** 目的 了解九江市健康婴儿血清中输血传播病毒(TTV)感染状况及传播途径。方法 用改良非编码区聚合酶链反应(UTR PCR)和 N22 PCR 法,分别检测婴儿和献血员血清中 TTV DNA。结果 用改良 UTR PCR 检测 86 例婴儿中 51 例(53.5%) TTV DNA 为阳性,59 例献血员中 TTV DNA 全部阳性。而 N22 PCR 在这两类人群中阳性检出例数分别为 14 例(16.3%)和 22 例(37.3%)。在 <30 天龄、1~6 月龄和 7~12 月龄婴儿中,TTV DNA 检出率分别为 0、33.3%、95.0% (UTR PCR)和 0、7.4%、30.0%(N22 PCR)。结论 用 UTR PCR 检测表明,九江市 95% 的半岁以上婴儿及 100% 成人都感染有 TTV,而用 N22 PCR 在相同人群中检测的结果明显偏低,两种方法的检出率差异有显著性,婴儿中 TTV 的原发感染可能是出生后从环境中获得,并且随其年龄增长感染逐渐增多,半岁后可接近同一地区健康成人的感染水平。

**【关键词】** 输血传播病毒;聚合酶链反应;流行病学;分子

**Frequency of transfusion transmitted virus in healthy infants in Jiujiang city Jiangxi province** PENG Yi-hong\*, CAO Ji-hong, WANG Qing, HU Lie-pu, ZHAO Xue-sen, PENG Jin. \*Department of Microbiology, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China

**【Abstract】 Objective** Transfusion transmitted virus (TTV) DNA was detected in serum samples obtained from healthy infants and volunteer blood donors living in Jiujiang city in an attempt to shed light on the prevalence of TTV infection and the transmission route of TTV infection in infants. **Methods** Modified untranslated region, polymerase chain reaction (UTR PCR) and N22 PCR were performed to test TTV DNA in serum samples from 86 infants and 58 blood donors. **Results** TTV DNA was detected by UTR PCR in 51 (53.5%) infants and 58 (100%) in blood donors, while that tested by N22 PCR was 14 (16.3%) and 22 (37.3%) in infants and blood donors, respectively. Among infants younger than 30 days, 1-6 months and 7-12 months of age, TTV DNA was detected by UTR PCR and N22 PCR at rates of 0, 33.3%, 95.0% and 0, 7.4%, 30.0%, respectively. **Conclusion** The prevalence rates of TTV DNA detected by UTR PCR were 95% in infants of 7-12 months after birth and 100% in healthy blood donors in Jiujiang city. However the results obtained by N22 PCR were much less frequently in the same population. Results showed that significant difference did exist in the prevalence of TTV DNA detected by the two different PCR systems. Age-dependent increase of TTV infection was observed in early childhood, while environmental sources were considered to be the most common route of TTV acquisition as the primary infection in infants. However, the prevalence of TTV in infants of 7-12 months was similar to that in healthy adults in the same region.

**【Key words】** Transfusion transmitted virus; Polymerase chain reaction; Epidemiology; molecular

输血传播病毒(transfusion transmitted virus, TTV)是 1997 年末由 Nishizawa 等<sup>[1]</sup>在非甲~戊型肝炎患者血清中发现的一种 DNA 病毒。最初利用有限的 TTV N22 区核苷酸序列建立的 N22 PCR (聚合酶链反应)法<sup>[2]</sup>,用来检测人群中 TTV 的感

染,各国的感染情况基本介于 2%~30% 之间,并认为 TTV 可能是非甲~戊型肝炎的病因<sup>[1,2]</sup>。随着报道序列的增加,Takahashi 等<sup>[3]</sup>利用非编码区(untranslated region, UTR)中某些高度保守的序列建立了 TTV 的 UTR PCR 技术,此检出率大大高于用 N22 PCR 所得的结果。中国学者对不同人群中 TTV 的感染情况也进行了大量的研究<sup>[4,5]</sup>,但多用 N22 区域衍生的 PCR 引物建立的检测方法,尚缺乏用 UTR PCR 法检测的报道,特别是有关婴儿感染的详细研究报道。本项研究用 UTR PCR 和 N22

基金项目:留学回国人员科研启动基金(教外司留[2002]247号)

作者单位:100083 北京大学医学部病原生物学系(彭宜红、赵学森);江西省九江市传染病院(曹继红);九江市妇幼保健院(王清、胡烈谱、彭进)

PCR 两种方法,对九江市健康婴儿血清中 TTV 感染情况进行了检测,并结合当地志愿献血员的感染情况进行了研究。

### 对象与方法

1. 血清标本来源:江西省九江市妇幼保健院门诊体检的健康婴儿[5~364 天龄,平均年龄(168±112)天龄]血清标本 86 份;健康献血员[20~56 岁,平均年龄(35±10)岁]血清标本 59 份。在采集婴儿和献血员血清前均征得其父母及有关人员的同意。

2. DNA 的抽提:采用高纯度病毒核酸提取试剂盒(high pure viral nucleic acid kit, Roche Molecular Biochemicals 产品)参照文献[6]进行。获得 DNA 沉淀用 20 μl 不含核酸酶的 dH<sub>2</sub>O 充分溶解,各 10 μl 分别作为方法 3 中 UTR PCR 和 N22 PCR 体系的扩增模板。

3. TTV DNA 的检测:分别用改良 UTR PCR 和 N22 PCR 两种方法检测。

(1)改良 UTR PCR:参考 GenBank 中不同型别的 TTV 全基因序列,特别是参考了 13 株中国株 TTV 全基因序列[6],设计 2 套 TTV 特异性简并 PCR 引物,对 Okamoto 等[7]的 UTR PCR 方法进行了一定的改良。引物的序列及位置见表 1。其中 NG472 和 NG352 为外引物,NG473 和 NG351 为内引物,PCR 扩增产物分别为 91 bp 和 71 bp。PCR 扩增体系和循环参数参照文献[6]进行。PCR 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,用紫外检测仪观察结果,出现 71 bp DNA 扩增带者为阳性。

(2)N22 PCR:Okamoto 等[2]根据早期报道的 TTV N22 区核苷酸序列,建立的半巢式 PCR 法。N22 PCR 引物是从核酸序列高度变异的开放读码(open reading frame, ORF1)中衍生而来的,本研究应用的是 Okamoto 等[7]随后报道的 N22 PCR 改良方法。

4. 分子克隆、序列测定及分析:用改良 UTR

PCR 方法获得 TTV DNA 第 2 轮扩增产物,经凝胶电泳纯化后连接到 pT7Blue T-载体(Novagen Inc. 产品),并导入大肠埃希菌 TG-1 中,获得 TTV UTR DNA 重组质粒,采用美国 PE 公司测序试剂盒和 M13 Universal 及 Reversal 引物,用 PE Applied Biosystems ABI 3100 自动测序仪分别从目的基因的两端进行自动测序[6]。核酸序列同源性比较采用分子生物学软件 Genetyx-Mac version 10.1.4 (Software Development, 东京,日本)进行。

表1 PCR 扩增 TTV DNA 引物的名称、位置和序列

引物	位置*	序列(5'→3')
NG472	162~182	GCG TCC CGW GGG CGG GTG CCG
NG352	3602~3625	GAG CCT TGC CCA TAG CCC GGC CAG
NG473	174~97	CGG GTG CCG DAG GTG AGT TTA CAC
NG351	221~244	CCC ATR GCC CGG CCA GTC CCG AGC

\* 表示的位置以 TTV 原型株 TA278(AB008393)为准,引物序列中 D=G or A or T; W=A or T; R=A or G

5. 统计学分析:平均年龄以均数加减标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;方差分析显著性检验采用 Epi Info 6 软件进行。

### 结 果

1. 改良 UTR PCR 方法的建立:经本法扩增获得的第 2 轮 UTR PCR 阳性产物长度为 71 bp,与预期大小一致。按方法 4 随机选择 2 例 TTV DNA 阳性的血清,挑取其扩增产物重组质粒转化菌各 3 个克隆进行序列测定,以便对 PCR 产物进行定性确证。获得的 TTV UTR 的部分基因序列与 TTV 原型株 TA278 同区域相比,核酸序列的同源性为 95.8%~97.2%,而在 GenBank 中检索其与人类基因组、大肠埃希菌、酵母菌以及其他病毒的核苷酸序列无明显的同源性,表明用该法扩增的 PCR 产物是 TTV DNA(图 1)。

2. 改良 UTR PCR 法的检测结果:86 份婴儿血清标本中,51 份(53.5%)TTV DNA 阳性,而 59 例健康献血员中 TTV DNA 全部为阳性。

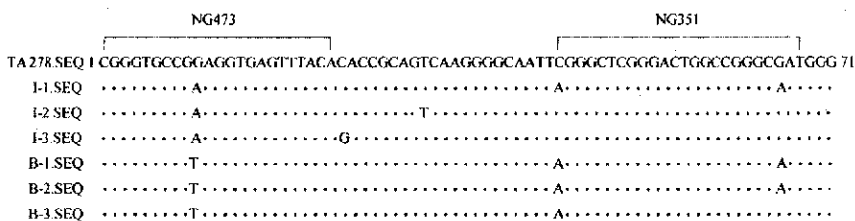


图1 6 株 TTV UTR 部分核苷酸序列与 TTV 原型株 TA278 相同区域核苷酸同源性比较

3. N22 PCR 法的检测结果:检测 86 份婴儿血清标本,14 份(16.3%) TTV DNA 阳性,而 59 份健康献血员中 TTV DNA 阳性 22 份(37.3%)。

4. 不同年龄段婴儿中 TTV DNA 检出率:86 例婴儿中<30 天龄、1~6 月龄和 7~12 月龄者,用改良 UTR PCR 法 TTV DNA 检出率分别为 0、33.3% 和 95.0%,而 N22 PCR 法的检出率分别为 0、7.4% 和 30.0%(表 2)。

表 2 两套 PCR 系统的 TTV DNA 检出率

组别	阳性标本份数/被检标本数(%)		$\chi^2$ 值	P 值
	UTR PCR	N22 PCR		
婴儿				
<30 天龄	0/19(0)	0/19(0)		
1~6 月龄	9/27(33.3)	2/27(7.4)	4.11	0.0426
7~12 月龄	38/40(95.0)	12/40(30.0)	33.33	0.0001
献血员	59/59(100.0)	22/59(37.3)	51.03	0.0001

注:括号内为阳性检出率

## 讨 论

TTV 是新近发现的一种 DNA 病毒,随着研究的深入发现其核酸序列高度变异<sup>[6-11]</sup>。此变异主要表现在病毒基因组的编码区,特别是 ORF1,其中有 3 个核酸序列高变区(hypervariable region, HVR),而 TTV 中最早发现的基因片段 N22 区域则与此高变区相互重叠<sup>[8]</sup>。相反,UTR 中特定区域的核苷酸序列则十分保守<sup>[3,6,7]</sup>。

目前,TTV 唯一切实可行的检测方法是 PCR 技术,基于 TTV 核酸序列高度变异的特点,PCR 引物的位置对检测结果影响极大<sup>[3,7]</sup>。早期 TTV 感染情况的研究主要是根据 N22 PCR 技术进行的。该法是基于最早报道的核苷酸序列而建立的,各国学者用来检测 TTV 感染的 PCR 技术也是利用 N22 区域衍生的引物建立的<sup>[2,7,9-11]</sup>,实际上是不同的 N22 PCR 改良法。虽然 N22 PCR 经过不同学者的多次改良,但由于引物位于核酸序列高度变异的 ORF1 中,有相当多的变异株无法检测到。从目前的研究来看,N22 PCR 检测到的是以原型株 TA278 为代表的 TTV 第 1 基因群的变异株,而其他 4 个基因群的变异株由于核苷酸序列的差异而不能检测到<sup>[6]</sup>。因此,用此法检测的感染率偏低,不能反映人群实际的感染水平,但该法在 TTV 研究的早期起到相当重要的作用。随着研究的深入,Takahashi 等<sup>[3]</sup>利用保守的 UTR 区域建立了 UTR PCR 技术,发现日本健康人群中 TTV 感染率>92%,此检出

率大大高于用 N22 PCR 所得的日本健康人群中 5%~16%的感染率<sup>[1,2,7]</sup>。许多学者用 UTR PCR 技术对本国的感染情况也进行了研究,各国的感染情况介于 80%~100%之间<sup>[6,7,9,12]</sup>。UTR PCR 技术的建立是 TTV 研究中的一个重要进展,使人们对 TTV 致病性、传播途径和流行病学特点有了新的认识。

中国学者对不同疾病和人群中 TTV 的感染情况进行了大量的研究,但多见于利用 N22 区域衍生的 PCR 引物建立的检测方法,尚缺乏用 UTR PCR 法的检测结果报道。为了解 TTV 在我国不同人群中的感染情况,特别是婴儿中的感染情况,本研究应用两套 PCR 检测体系对九江市健康婴儿和志愿献血员血清中 TTV DNA 进行了检测。改良 UTR PCR 结果表明半数以上的婴儿血清 TTV DNA 阳性,当地被检健康成人 TTV DNA 均为阳性,阳性的 DNA 产物经序列测定后 GenBank 检索发现,其与人类基因组、大肠埃希菌、酵母菌以及其他病毒的核苷酸序列无明显的同源性,而与 TTV 原型株 TA278 同区域的同源性高达 95.8%~97.2%,表明用该法扩增的 PCR 产物是 TTV DNA。这一结果与各国用同一方法报道的感染情况类似<sup>[6,7,9,12]</sup>。另外,用 N22 PCR 获得的 TTV DNA 检出率仅为 UTR PCR 的 1/3,且 N22 PCR 检测为阳性者 UTR PCR 检测也均为阳性,但两种方法在同一人群中的检出率差异存在着显著性(表 2)。其原因主要是与检测方法本身的特异性,即与 PCR 引物的位置有关<sup>[3,6,9]</sup>。本研究所用的改良 UTR PCR 建立于核酸序列高度保守的 UTR 内(图 1),特别是参考了 TTV 中国株核酸序列<sup>[6]</sup>,该方法可检测目前已知的不同基因群及基因型的 TTV 变异株,特异性好,故检出率高。而 N22 PCR 由于引物位置的局限性,故有相当程度的漏检<sup>[3,6,9]</sup>,从而感染率偏低,其检测结果不能反映我国人群中实际的感染情况。

本研究结果表明,TTV 在中国婴儿和成人中有很高的感染率,这一结果有助于对 TTV 致病性、流行病学特点及传播途径等更深入的了解和认识。同时也表明 PCR 引物的位置对其检测结果影响极大。鉴于包括婴儿在内的正常人群中存在如此多的无症状 TTV 携带者,结合目前临床研究情况,即尚未发现 TTV 有引起任何疾病的能力<sup>[12-14]</sup>,因此 TTV 在人体中存在的意义需要重新评估,是否 TTV 是人体内部“正常病毒群”<sup>[13,15]</sup>,尚需进一步深入研究。

此外,本文对 1 岁内不同年龄段婴儿的感染情况进行了分析,值得注意的是,在 < 30 天龄的婴儿中用上述两套 PCR 体系均未检测到 TTV DNA 的存在(表 2)。但在 30 天龄以上的婴儿中,随着年龄的增长 TTV DNA 检出率逐渐增多,7~12 月龄后可接近同地区健康成人的水平。因为 TTV 自感染到病毒血症的出现约需 4~5 周潜伏期<sup>[1]</sup>,故婴儿中的原发感染可能主要是出生后从环境中获得,而不支持在母体内经胎盘途径而传播的方式,这与国外报道的情况一致<sup>[11]</sup>。可能自婴儿期感染 TTV 后,病毒在机体内可长期感染持续存在,直至成年期甚至终身,这可能是我国人群中普遍携带 TTV 的一个原因。但是 TTV 在机体中存在的作用或意义尚不清楚。

(本研究得到了 Dr. Nishizawa 和 Okamoto 的指导与庄辉院士的帮助,特此致谢)

#### 参 考 文 献

- 1 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241:92-97.
- 2 Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res*, 1998, 10:1-16.
- 3 Takahashi K, Hoshino H, Ohta Y, et al. Very high prevalence of TT virus (TTV) infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatol Res*, 1998, 12:233-239.
- 4 周伯平,马为民,孙彤,等. TTV 在非甲—庚型肝炎患者中的检测、克隆及测序. *中华传染病杂志*, 1998, 16:131-133.
- 5 何忠平,周育森,张启云,等. 北京地区 TT 病毒分离株全基因的

- 克隆及序列测定. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2000, 14:65-68.
- 6 Peng Y, Nishizawa T, Takahashi M, et al. Analysis of the entire genomes of the thirteen TT virus variants classifiable into fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. *Arch Virol*, 2002, 147:21-41.
  - 7 Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus, demonstrated by PCR with primers from coding and non-coding regions. *Virology*, 1999, 259:428-436.
  - 8 Nishizawa T, Okamoto H, Tsuda F, et al. Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol*, 1999, 73:9604-9608.
  - 9 Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, et al. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol*, 1999, 80:2115-2120.
  - 10 Prescott LE, MacMonald DM, Davidson F, et al. Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. *J Gen Virol*, 1999, 80:1751-1758.
  - 11 Davidson F, MacDonald D, Mokili, et al. Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis*, 1999, 179:1070-1076.
  - 12 Huang LY, Oystein Jonassen T, Hungnes O, et al. High prevalence of TT virus-related DNA (90%) and diverse viral genotypes in Norwegian blood donors. *J Med Virol*, 2001, 64:381-386.
  - 13 Mushahwar IK. Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J Med Virol*, 2000, 62:399-404.
  - 14 张军,罗文新,杨海杰,等. TT 病毒与肝炎关系的临床流行病学研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20:19-22.
  - 15 Simmonds P. TT virus infection: a novel virus-host relationship. *J Med Microbiol*, 2002, 51:455-458.

(收稿日期 2002-11-25)

(本文编辑:尹廉)

## · 读者 · 作者 · 编者 ·

### 本刊开设发表论文的“快速通道”

为了更迅速反映我国流行病学及相关学科的新进展和成果,本刊编委会决定对有重大创新和国内首创的科研成果采用“快速通道”方式,使其尽早刊出。凡要求在“快速通道”发表的论文,作者应提供单位正式介绍信、查新报告和两位同行专家的推荐信,以说明该项成果的学术价值。论文投寄本刊后经国内同行专家、本刊总编辑审阅和编委会讨论同意后,将在收到稿件后 4 个月内予以发表。

本刊编辑部