

# 2010—2011 年苏州地区腹泻婴幼儿感染人博卡病毒的分子特征研究

付建光 蒋翠莲 秦圆方 艾静 刘成 吴斌 祁贤 鲍昌俊 朱叶飞 汤奋扬

**【摘要】** 目的 明确苏州地区腹泻婴幼儿博卡病毒感染情况、病毒主要基因型别及其流行病学特征。方法 收集 2010—2011 年苏州市儿童医院疑似病毒性腹泻患儿粪便标本 832 例(份),采用荧光定量 PCR 方法检测粪便中博卡病毒 DNA,并对部分阳性标本测序明确病毒基因型。结果 832 份粪便标本检出博卡病毒阳性 51 份,阳性率为 6.1%。7—9 月为博卡病毒感染高峰;96% 的患儿为 <2 岁,其中 7~12 月龄为高发年龄段;男性患儿多于女性;36 例合并其他腹泻病毒感染。对 35 份博卡病毒阳性标本进行测序,其中 28 份为 HBoV-1 型,5 份为 HBoV-2 型,2 份型别未确定,未发现 HBoV-3 型及 HBoV-4 型。结论 苏州地区婴幼儿腹泻标本中博卡病毒以 HBoV-1 型为主,同时存在 HBoV-2 型感染。

**【关键词】** 博卡病毒; 基因型; 婴幼儿腹泻

**Molecular features of human bocavirus from infantile diarrhea in Suzhou area, Jiangsu province in 2010–2011** FU Jian-guang<sup>1</sup>, JIANG Cui-lian<sup>2</sup>, QIN Yuan-fang<sup>1</sup>, AI Jing<sup>1</sup>, LIU Cheng<sup>3</sup>, WU Bin<sup>1</sup>, QI Xian<sup>1</sup>, BAO Chang-jun<sup>1</sup>, ZHU Ye-fei<sup>1</sup>, TANG Fen-yang<sup>1</sup>. 1 Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology, Ministry of Health, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China; 2 Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital; 3 Suzhou Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: TANG Fen-yang, Email: tfyepi@jscdc.cn

This work was supported by grants from the Jiangsu Province Health Development Project with Science and Education (No. ZX201109, No. RC2011084, No. RC2011085).

**【Abstract】** Objective To investigate the status of human bocavirus and to identify its epidemiological characteristics as well as genotype distribution in patients with infantile viral diarrhea in Suzhou, Jiangsu province. **Methods** 832 fecal specimens from patients with infantile virus diarrhea cases were collected from Suzhou Children's Hospital in 2010–2011. Human bocavirus were detected by Real-Time RT-PCR, and genotype were determined by sequence analysis. **Results** Among all the fecal specimens, 51 (6.1%) cases were positive for human bocavirus. The peak season of rotavirus infection was between July and September. Of all the episodes on rotavirus diarrhea, 96% occurred before 2 years of age, with peaks in children with 7–12 months of age. Data from Nucleotide Sequence analysis showed that among 28 samples that carrying HBoV-1, 5 strains belonged to HBoV-2, HBoV type 3 but type 4 were absent. **Conclusion** Human bocavirus were detected from fecal specimens of infantile virus diarrhea in Suzhou, with genotype HBoV-1 as the major strain. HBoV-2 genotype was also found.

**【Key words】** Human bocavirus; Genotype; Infantile diarrhea

人博卡病毒(HBoV)属细小病毒科,首先由瑞典科学家 Allander 等<sup>[1]</sup>在 2005 年从下呼吸道感染患儿标本中分离获得。目前有 4 个血清型(HBoV-1 ~

4),其中 HBoV-2 又可进一步分为 2A 和 2B<sup>[2-4]</sup>。血清流行病学调查显示, HBoV 存在早期暴露, <5 岁人群阳性率为 90%,不同的 HBoV 型特异性抗体阳性率存在差异,但以 HBoV-1 感染最为常见<sup>[5,6]</sup>。本研究分析苏州地区腹泻婴幼儿中 HBoV 感染情况及其分子特征。

## 材料与方法

1. 病毒性腹泻疑似病例定义:①每日排便 ≥3 次且性状有改变(稀便、水样便等),便常规镜检白细

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.012.014

基金项目:江苏省“十二五”科教兴卫工程(ZX201109);江苏省医学重点人才基金(RC2011084, RC2011085)

作者单位:210009 南京,江苏省疾病预防控制中心 卫生部肠道病原微生物重点实验室(付建光、秦圆方、艾静、吴斌、祁贤、鲍昌俊、朱叶飞、汤奋扬);南京市妇幼保健院(蒋翠莲);苏州市疾病预防控制中心(刘成)

通信作者:汤奋扬, Email: tfyepi@jscdc.cn

胞数 < 15 个/HP, 未见红细胞者; ②腹泻次数 < 3 次/日, 但伴有大便性状改变和呕吐症状者; ③腹泻次数 < 3 次/日, 呕吐为主要症状者。凡具备其中一条即为本研究病毒性腹泻疑似病例。

2. 标本来源及其处理: 2010 年 1 月至 2011 年 12 月收集苏州市儿童医院 < 5 岁住院病毒性腹泻疑似病例标本共计 832 例(份), -70 °C 冰冻保存。检测时加入 1 ml 生理盐水至 1.5 ml EP 管中, 加入 0.1 g 固体粪便标本或 0.1 ml 液体粪便标本, 置于漩涡振荡器混匀, 室温静置 10 min, 室温下 ≥ 5000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液, 置 -20 °C 冰箱保存。

3. 检测方法: ①核酸提取: 利用 ABI 自动核酸提取仪, 试剂采用 ABI 5X MagMAX™-96 Viral Isolation Kit (美国 ABI 公司), 提取方法按照试剂盒说明书。②实时荧光反转录-聚合酶链反应 (Real Time RT-PCR): HBoV 的定性检测采用文献报道的引物探针及反应条件<sup>[7]</sup>, 试剂盒采用 QuantiTect Probe RT-PCR Kit (德国 QIAGEN 公司); 扩增后对扩增曲线平滑且 Ct 值 < 33 的样本判定为该组 HBoV 阳性。③RT-PCR: 扩增 VP1/VP2 重叠区片段 将 35 份 HBoV 阳性标本进行普通 RT-PCR 扩增。试剂盒为 QIAGEN One Step RT-PCR Kit (德国 QIAGEN 公司)。反应采用文献报道的引物及反应条件<sup>[8]</sup>, -20 °C 保存 PCR 产物。④序列测定分析: 将 PCR 阳性产物送公司纯化和测序。从 GenBank 的核酸序列数据库中下载多株国内外 HBoV 的核酸序列片段, 将下载序列同本研究检测的 HBoV 序列用 DNASTar 公司 Mega 5.1 软件, 采用 CLUSTALW 方法进行序列比对, 利用 neighbor-joining 法构建进化树。

4. 统计学分析: 采用 SPSS 13.0 软件统计, 计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。

### 结 果

1. 流行病学分析: 2010—2011 年收集的 832 例(份)粪便标本中, 共检出 HBoV 阳性 51 例(份), 阳性率为 6.1% (表 1)。HBoV 感染在不同年龄段儿童中均有检出, 96% 感染患儿 < 2 岁, 其中 7~12 月龄为高发年龄段, 但各年龄段间差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 6.0374, P = 0.110$ ); 感染可发生于各季节, 高峰季节在 7—9 月间 ( $\chi^2 = 27.9364, P < 0.001$ ); HBoV 感染患儿中男性 33 例(阳性率 6.0%), 女性 18 例(阳性率 6.3%), 但两者间差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.0261, P = 0.872$ ); 有 36 例(70.6%) 合并其他腹泻病毒(轮状病毒、诺如病毒、札如病毒、肠道腺病毒及星

表 1 2010—2011 年苏州地区 HBoV 感染患儿年龄和季节分布

儿童月龄	HBoV 阳性份数	检测样本份数	HBoV 阳性率 (%)	季节 (月)	HBoV 阳性份数	检测样本份数	HBoV 阳性率 (%)
0~	7	223	3.1	1—	1	69	1.4
7~	32	407	7.9	4—	6	132	4.5
13~	10	152	6.6	7—	38	339	11.2
25~	2	50	4.0	10—12	6	292	2.1
合计	51	832	6.1	合计	51	832	6.1

状病毒) 感染。

2. 病原学检测: 通过对 VP1/VP2 重叠区的序列分析比对, 发现 HBoV 各毒株核苷酸同源性有较大差异, 每一基因型内不同毒株核苷酸序列也有一定差异(图 1)。测序的 35 份 HBoV 阳性标本中 28 株为 HBoV-1 型, 与参考株的同源性为 88.9%~100.0%, 28 株间的同源性为 90.2%~100.0%; 5 株为 HBoV-2A 型, 与参考株的同源性为 93.4%~98.9%, 彼此间的同源性为 99.6%~100.0%; 未发现 HBoV-3 型及 HBoV-4 型。此外, SZ-5 分离株在分支上接近 HBoV-1 型, 但同源性分析显示更接近 HBoV-2A 型, 而 SZ-17 分离株则很难归类, 与其他毒株的同源性较低, 为 48.4%~76.4%, 其分型还有待进一步研究。

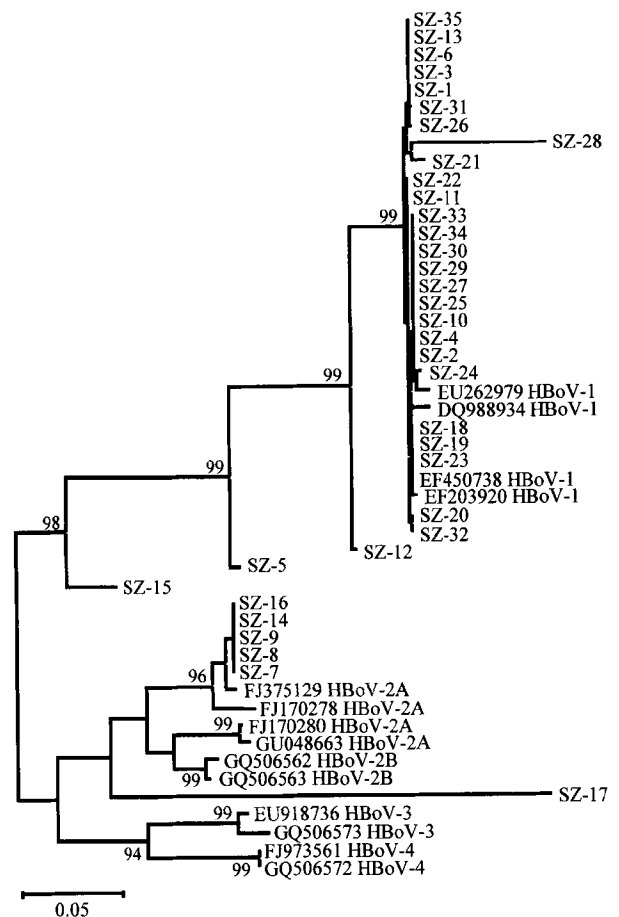


图 1 HBoV 的 VP1/VP2 重叠区核苷酸序列进化分析

## 讨 论

HBov 在世界均有流行,腹泻患者中的检出率为 0.8%~25.6%<sup>[3,8-11]</sup>,本研究检出率为 6.1%。本次调查不同年龄段儿童均检出 HBov,但 <2 岁感染患儿占 96%,其中 7~12 月龄为高发年龄段,可能与该年龄段婴幼儿母体免疫逐渐减弱,感染率随之增加相关<sup>[12]</sup>。苏州地区各个季节均可检测到 HBov 感染,其中 7~9 月间出现一个高峰,与广州地区报道相似<sup>[13]</sup>,但由于整体检出率偏低,连续性也不理想,因此苏州地区 HBov 感染的高峰季节还有待进一步证实。HBov 感染可单独存在,也可与其他病毒共同检出,而多数情况下为后者<sup>[4,14,15]</sup>,本研究表明 70.6% 的 HBov 感染是同其他病毒的合并感染。

HBov 为 21~28 nm 无包膜病毒,病毒基因组为线性单链 DNA,全长约 5.2 kb,含 3 个开放读码框,编码一个非结构蛋白 NS1,核蛋白 NP1,两个衣壳蛋白 VP1 和 VP2<sup>[16]</sup>。研究表明 VP2 蛋白包含了 HBov 的主要抗原,可形成病毒样颗粒,在形态学上及抗原活性上模拟 HBov 粒子,同时可作为抗原检测 HBov 抗体<sup>[6]</sup>。VP1 和 VP2 含有一个共同的重叠区,是病毒衣壳的重要结构蛋白,也是 HBov 研究的热点区域。本研究扩增的基因片段即位于 VP1 和 VP2 重叠区。

对扩增序列分析比对,发现 HBov-1 型为苏州地区主要感染型别(28/35),与北京分离株(DQ988934)的同源性很高,28 株间同源性也较高(90.2%~100.0%),提示以 VP1 与 VP2 区域序列分析,各地 HBov 核苷酸序列变异并不明显。目前 HBov-1 型主要是作为呼吸道病原体被检出,而粪便标本中则是以 HBov-2 型为主,本研究粪便标本检测显示以 HBov-1 型为主,这与其他地区报道不同。有研究显示<sup>[11,14]</sup>,健康对照组粪便中可检测到 HBov,阳性率高达 14.8%,阳性检出率及病毒载量与病例组的差异均无统计学意义,说明 HBov 也许是一种伴随病毒而不是胃肠炎的致病病原体。因此本研究虽然检测到以 HBov-1 型感染为主,但是否为腹泻病原体尚不清楚。本研究同时检测出 5 株 HBov-2,进化分析显示均为 HBov-2A,与广东株(FJ375129)的同源性高达 100%,说明 HBov-2A 毒株的保守性很高,几乎未出现变异。虽然 HBov-1~4 型都可以在粪便标本中检出(检出率为 1%~20%),但是仅 HBov-2 可能与出现的急性胃肠炎症状有关<sup>[3]</sup>。然而,HBov-2 作为病原体引起胃肠炎的具体机制尚不清楚。

本研究结果显示苏州地区婴幼儿中 HBov 感染

遍及各年龄组、各季节且无性别差异,流行株为 HBov-1 型,但同时存在其他型别毒株的感染。

## 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 USA*, 2005, 102: 12891-12896.
- [2] Kapoor A, Simmonds P, Slikas E, et al. Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent in enteric infections. *J Infect Dis*, 2010, 201: 1633-1643.
- [3] Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis*, 2009, 199: 196-200.
- [4] Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, et al. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*, 2009, 5(4): e1000391.
- [5] Kantola K, Hedman L, Arthur J, et al. Seroepidemiology of human bocaviruses 1-4. *J Infect Dis*, 2011, 204: 1403-1412.
- [6] Guo L, Wang Y, Zhou H, et al. Differential seroprevalence of human bocavirus species 1-4 in Beijing, China. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39644.
- [7] Campe H, Hartberger C, Sing A. Role of human bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Virol*, 2008, 43(3): 340-342.
- [8] Yu JM, Li DD, Xu ZQ, et al. Human bocavirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in China. *J Clin Virol*, 2008, 42: 280-285.
- [9] Christensen A, Nordb SA, Krokstad S, et al. Human bocavirus in children: mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection. *J Clin Virol*, 2010, 49(3): 158-162.
- [10] Khamrin P, Malasao R, Chaimongkol N. Circulating of human bocavirus 1, 2, 3, and 4 in pediatric patients with acute gastroenteritis in Thailand. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(3): 565-569.
- [11] Cheng WX, Chen J, Xu ZQ, et al. Phylogenetic and recombination analysis of human bocavirus 2. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 50.
- [12] Kahn JS, Kesebir D, Cotmore SF, et al. Seroepidemiology of human bocavirus defined using recombinant virus-like particles. *J Infect Dis*, 2008, 198(1): 41-50.
- [13] Liu WK, Chen DH, Liu Q. Detection of human bocavirus from children and adults with acute respiratory tract illness in Guangzhou, southern China. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 345.
- [14] Cheng WX, Jin Y, Duan ZJ, et al. Human bocavirus in children hospitalized for acute gastroenteritis: a case-control study. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(2): 161-167.
- [15] Chow BD, Esper FP. The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med*, 2009, 29(4): 695-713.
- [16] Chen AY, Cheng F, Lou S, et al. Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology*, 2010, 403: 145-154.

(收稿日期:2013-08-01)

(本文编辑:张林东)