

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.01.009

论著·临床研究

## 住院呼吸道感染患儿博卡病毒检测分析

王维<sup>1</sup> 林书祥<sup>1</sup> 李胜英<sup>1</sup> 侯晓巨<sup>1</sup> 黄敬孚<sup>1</sup> 祝益民<sup>2</sup> 杨洪江<sup>3</sup>

(1. 天津市儿童医院 / 天津市儿科研究所, 天津 300134;  
2. 湖南省儿童医院急救中心, 长沙 410007; 3. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**[摘要]** **目的** 了解人博卡病毒(HBoV)在天津地区急性呼吸道感染患儿中的检测情况和基因的遗传进化特征。**方法** 收集2012年1~12月确诊为急性呼吸道感染患儿的鼻咽抽吸物标本1259份,提取病毒核酸,采用实时荧光定量PCR法检测HBoV,并采用PCR法扩增阳性标本HBoV核衣壳蛋白基因片段;随机选取部分产物进行测序确证,将所获得的序列与已知的HBoV基因序列进行比对并进行系统进化分析;同时对所有标本进行其他多种呼吸道相关病毒检测。**结果** 1259份标本中HBoV阳性检出率为4.53%(57/1259),其中75%(43/57)发生在6~36月龄的患儿;检出高峰主要集中在夏季(6~8月);存在与其他病毒的混合感染情况。对其中36份阳性标本的PCR产物进行序列分析,证实检测结果确为HBoV,且与已知HBoV的基因序列同源性较高。**结论** 天津地区部分儿童的急性呼吸道感染可能与HBoV感染相关,且HBoV感染在6~36月龄的婴幼儿中更为常见,夏季为流行高峰;系统进化分析显示与已知HBoV的基因序列同源性高,基因序列变异较小。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(1): 39-43]

**[关键词]** 人博卡病毒;急性呼吸道感染;基因同源性;儿童

## Detection and analysis of bocavirus in hospitalized children with respiratory infection

WANG Wei, LIN Shu-Xiang, LI Sheng-Ying, HOU Xiao-Ju, HUANG Jing-Fu, ZHU Yi-Min, YANG Hong-Jiang. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China (Email: cosette801204@126.com)

**Abstract: Objective** To detect human bocavirus (HBoV) and investigate its genetic and evolutionary characteristics in children with acute respiratory infection in Tianjin, China. **Methods** A total of 1259 samples of nasopharyngeal aspirates were collected from children with a confirmed diagnosis of acute respiratory infection between January and December, 2012. Viral nucleic acid was extracted, HBoV was detected by real-time quantitative PCR, and the gene segments of nucleocapsid protein of HBoV in positive samples were amplified by PCR. Several products were randomly selected and sequenced. The sequence obtained was compared with the known sequence of HBoV, and a phylogenetic analysis was performed. All the samples were examined to detect for other common respiratory tract viruses. **Results** Among the 1259 samples, the positive rate of HBoV was 4.53% (57/1259), and among the 57 samples with positive HBoV, 75% (43/57) were positive in children with an age of 6-36 months. The positive rate of HBoV in children peaked in summer (from June to August), and there was a mixed infection with other viruses. Sequence analysis was performed for the PCR products from 36 positive samples, and the presence of HBoV was confirmed, with a higher homology to the known sequence of HBoV. **Conclusions** In Tianjin, acute respiratory infection in some children may be associated with HBoV infection, which is commonly seen in infants with an age of 6-36 months. The peak of HBoV infection occurs in summer. The phylogenetic analysis shows a high homology to the known sequence of HBoV, with few gene sequence variations.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(1): 39-43]

**Key words:** Human bocavirus; Acute respiratory infection; Genetic homology; Child

[收稿日期] 2015-09-17; [接受日期] 2015-10-28

[基金项目] 国家十二五科技支撑计划(2012BAI04B01); 国家自然科学基金项目(31370205)。

[作者简介] 王维,女,硕士,助理研究员。

在世界范围内,病毒感染是导致儿童呼吸道感染发病和死亡的重要原因之一<sup>[1]</sup>。人类博卡病毒(human bocavirus, HBoV)是由瑞典学者 Allander 等<sup>[2]</sup>于2005年9月在对儿童急性呼吸道感染的鼻咽分泌物标本进行大规模筛查时分离得到的一种新病毒。随后,世界上许多国家和地区陆续报道了在呼吸道感染患儿中检测出 HBoV,感染率为1.5%~19%,表明该病毒普遍存在,呈全球性分布<sup>[2-6]</sup>。

本研究收集天津市儿童医院住院治疗的急性呼吸道感染患儿的鼻咽分泌物标本进行 HBoV 的分子生物学检测,以对该地区 HBoV 分子流行病学做初步研究,探讨 HBoV 与儿童呼吸道感染的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取2012年1~12月天津市儿童医院收治入院的急性呼吸道感染患儿1259例为研究对象,其中男880例(69.90%),女379例(30.10%),男女比例为2.3:1;年龄均在6岁以下,最小者年龄为生后9h。入组患儿均有明显的呼吸道感染症状,采集所有患儿的鼻咽抽吸物标本,共计1259份。

### 1.2 标本收集与处理

入院后用一次性吸痰管吸取患儿鼻咽分泌物1~2 mL,置于含有6~8 mL PBS的离心管中充分混合。样本悬液以2000 r/min离心10 min,收集细胞做细胞涂片,采用直接免疫荧光测定法检测7种常见的呼吸道病毒:即流感病毒A、B型(IFV A、IFV B)、腺病毒(ADV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、副流感病毒1、2、3型(PIV1、PIV2、PIV3)。试剂盒为D3 Ultra DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit(DIAGNOSTIC HYBRIDS公司,美国),操作步骤按照试剂盒说明书进行。剩余标本立即于-70℃保存,供后续HBoV检测使用。

### 1.3 病毒核酸提取

标本室温解冻后,采用TIANGEN DNA/RNA共提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取病毒核酸。操作过程严格按照说明书进行,提

取的核酸保存于-20℃备用。

### 1.4 HBoV 实时荧光定量 PCR 筛查检测

采用HBoV荧光定量试剂盒检测HBoV DNA,试剂由中山大学达安基因股份有限公司生产,操作、结果读取均按说明书进行。

### 1.5 HBoV 特异性核酸 PCR 扩增

对上述实验确认的HBoV阳性标本采用PCR方法扩增HBoV特异性核酸片段。根据GeneBank上HBoV基因组(DQ000495)的核衣壳蛋白基因VP1/VP2序列设计VP基因扩增引物。VP1/VP2上游引物:5'-GCAAACCCATCACTCTCAATGC-3', VP1/VP2下游引物:5'-GCTCTCTCCTCCCAGTGACAT-3',片段长度404 bp。PCR反应体系为25 μL,包括模版DNA 2 μL, 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 10 pmol/μL的上下游引物各0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR反应条件:94℃预变性5 min; 94℃变性45 s, 50℃退火45 s, 72℃延伸1 min, 35个循环;最后72℃延伸10 min。

反应结束后取5 μL PCR扩增产物,用2%的琼脂糖凝胶(内含0.5 g/mL的溴化乙锭)进行电泳检测,以500 bp DNA marker为参照,在紫外线投射分析仪下观察电泳条带。

### 1.6 核苷酸序列测定及对比分析

选取部分阳性PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。所测得的序列通过BLAST与GenBank中的已知HBoV基因序列进行比对,并通过MEGA 5.0软件采用邻接法(neighbor-joining method, NJ法)绘制进化树,Bootstrap值基于1000次重复。

### 1.7 其他病毒检测

除上述检测的7种常见呼吸道病毒外,运用PCR方法,对1259份鼻咽抽吸物标本中的鼻病毒<sup>[7]</sup>、WU多瘤病毒<sup>[8]</sup>、KI多瘤病毒<sup>[9]</sup>与HBoV进行同期检测。

### 1.8 统计学分析

采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;计数资料以百分率(%)表示,两组间比较采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HBoV 实时荧光定量 PCR 筛查情况

1259 例急性呼吸道感染患儿鼻咽抽吸物中共检测到 57 例阳性，总阳性率为 4.53%。实时荧光定量 PCR 扩增结果见图 1。

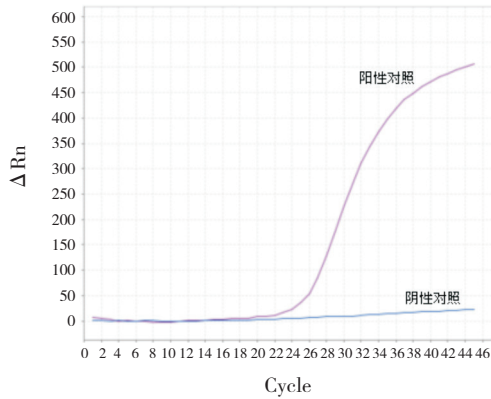
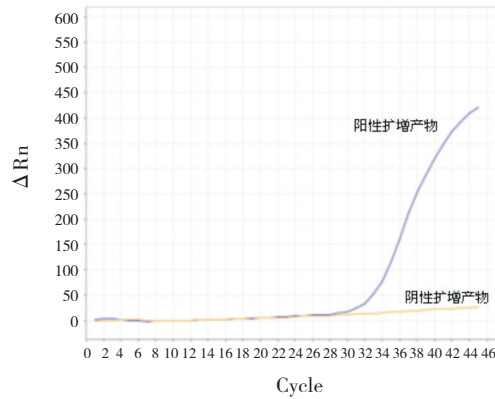


图 1 HBoV 实时荧光定量 PCR 扩增结果图  
Cycle 表示扩增循环数。

### 2.2 HBoV PCR 检测结果

将 57 份阳性产物进行 HBoV VP1/VP2 基因片段 PCR 扩增并将扩增产物电泳，片段大小与预期一致（图 2）。将扩增产物测序，并在 GeneBank 上比对证明为 HBoV。



ΔRn 的值表示 PCR 过程中，探针降解的量，即 PCR 产物的量；

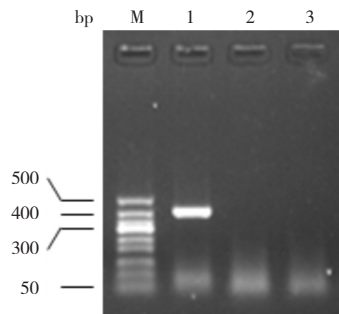


图 2 HBoV PCR 电泳结果 M 为 500 bp DNA marker；  
1 为 HBoV 阳性扩增产物；2 为 HBoV 阴性扩增产物；3 为阴性对照。

### 2.3 HBoV 感染患儿的性别和年龄分布

男性患儿 HBoV 阳性率为 5.0% (44/880)，阳性构成为 77% (44/57)；女性患儿 HBoV 阳性率为 3.4% (13/379)，阳性构成为 23% (13/57)；不同性别患儿的 HBoV 阳性率比较差异无统计学意义 ( $\chi^2=1.511, P>0.05$ )。57 例阳性患儿平均年龄为  $9 \pm 5$  个月，且全部为 3 岁以下患儿，75% (43/57) 发生在 6~36 月龄患儿中，其中以 12~36 月龄组的阳性检出率最高 (42%，24/57)。不同月龄患儿 HBoV 的检出率比较差异有统计学意义 ( $\chi^2=20.432, P<0.01$ )。具体分布见表 1。

表 1 不同月龄组患儿 HBoV 检出情况 [例 (%) ]

年龄 (月)	例数	阳性检出率	HBoV 阳性构成比
≤ 1	205	2(1.0)	2(4)
>1~	419	12(2.9)	12(21)
6~	328	19(5.8)	19(33)
12~	288	24(8.3)	24(42)
36~72	19	0(0)	0(0)
合计	1259	57(4.5)	57(100)

### 2.4 HBoV 感染的季节分布

从月份上看，除 2012 年 10 月未检测到 HBoV，其他各月均有检出，其中以 2012 年 7 月检出率最高，为 15.1% (16/106)，阳性构成为 28% (16/57)，其次为 8 月，阳性率为 8.6% (9/105)，阳性构成为 16% (9/57)，具体分布见图 3。从季节上看，HBoV 在各季节的检出率比较差异有统计学意义 ( $\chi^2=23.035, P<0.01$ )，其中夏季 (6~8 月) 的检出率均高于其他 3 个季节，是 HBoV 感染的高峰期，见表 2。

### 2.5 核苷酸序列比对及系统进化分析

从 57 份阳性标本中，随机选取其中 36 份测序。将测序结果提交 GenBank 与已知的 HBoV 序列进行 Blast 比对，结果显示其与标准株的核苷酸同源

性在98%~100%之间。利用MEGA 5.0构建的系统进化树显示此36份阳性标本序列与瑞典分离的原型株ST2(DQ000496, 1b簇)、北京株BJ3722(DQ988934)、泰国株CU6(EF203920)、湖南株CZ643(DQ457413)、香港株HK19(EF450735)、西安株KU2(GQ925675)在同一基因进化簇主分枝中,而与另一原型株ST1(DQ000495, 1a簇)稍远。

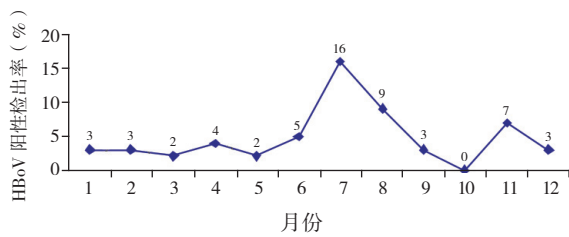


图3 HBov检出的时间分布

表2 HBov检出的季节分布

季节	HBov		总计	阳性检出率(%)
	阳性	阴性		
春季	8	304	312	2.6
夏季	30	293	323	9.3
秋季	10	286	296	3.4
冬季	9	319	328	2.7
合计	57	1202	1259	4.5

注:春季指3~5月,夏季指6~8月,秋季指9~11月,冬季指12月至次年2月。

### 2.6 混合感染情况

检测结果表明HBov与其他病毒存在混合感染的情况,混合感染率为40%(23/57),男19例,女4例,平均年龄8.2个月。其中混合感染鼻病毒2例,WU多瘤病毒5例,KI多瘤病毒7例,PIV1 1例,PIV3 2例,RSV 1例;有3例同时感染鼻病毒及KI多瘤病毒,2例同时感染KI多瘤病毒及PIV3。

### 2.7 临床病例特征

57例HBov阳性患者中,诊断为肺炎23例,支气管炎20例,急性支气管炎7例,急性喘息性支气管炎2例,支原体性肺炎2例,链球菌性肺炎1例,病毒性脑炎1例,另有1例为外科疾病。

## 3 讨论

HBov是新近发现的一种与儿童呼吸道感染密切相关的病毒病原,为单链无胞膜的DNA病毒,属于细小病毒科,基因组全长5.2~5.3 kb<sup>[10-11]</sup>。HBov的发现为小儿呼吸道疾病的诊疗和病因研究提供了新的依据。

虽然自2005年HBov被发现以来,许多国家都报道了儿童中HBov的感染情况,但是检出率以及年龄季节分布各地报道不一。本研究结果显示HBov阳性率为4.5%,与台湾(5.6%)<sup>[12]</sup>、香港(5.0%)<sup>[13]</sup>、上海(5.5%)<sup>[14]</sup>的研究结果相似,高于韩国(2.1%)<sup>[15]</sup>、昆明(3.3%)<sup>[16]</sup>、广州(1.7%)<sup>[17]</sup>的研究结果,低于巴西(10.7%)<sup>[18]</sup>、苏州(7.1%)<sup>[19]</sup>、南京(8.3%)<sup>[20]</sup>和长沙(11.4%)<sup>[21]</sup>的研究结果。

国外研究结果显示2岁以下的婴幼儿是HBov的易感人群<sup>[22]</sup>。台湾地区<sup>[12]</sup>的文献指出2岁以下年龄组占全部HBov阳性患儿的56.67%。北京<sup>[23]</sup>的研究结果也认为2岁以下儿童易感。长沙<sup>[24]</sup>的研究结果发现HBov在6~12月年龄段检出率最高。苏州<sup>[19]</sup>的研究中应用实时PCR检测3826例患儿的痰标本,发现6~18月龄组检出率最高。本研究也发现,HBov感染患儿年龄全部为3岁以下,其中75%的感染发生在6~36月龄患儿中,说明HBov感染在低年龄组的婴幼儿中更为常见。

流行病学研究证实,HBov感染呈全年发病,但关于感染的高峰季节报道不一。昆明<sup>[16]</sup>的研究报道HBov检出高峰为秋冬季。广州<sup>[17]</sup>的研究对5家哨点医院的监测显示,HBov在5~6月发病率较高。长沙<sup>[21]</sup>的研究报道大多数感染发生在冬春季。而本文的研究结果显示夏季阳性率最高,与苏州<sup>[19]</sup>关于HBov夏季流行的报道具有一致性。这提示HBov在不同地区的流行时间及高峰月份的不同可能与研究时期和地理差异有关。

HBov分为两型——HBov ST1和ST2,两型之间在序列上仅有26个核苷酸位点的差异<sup>[4]</sup>。系统进化树分析显示研究周期内天津地区儿童呼吸道的HBov感染以ST2为主。HBov VP1/VP2基因序列与其他已知序列同源性在98%~100%,序列变异很小。

HBov 与其他病毒不同之处在于其混合其他病原体感染率较高(香港 33%<sup>[13]</sup>, 南京 57.6%<sup>[20]</sup>, 昆明 94.4%<sup>[16]</sup>), Manning 等<sup>[22]</sup>报道在能引起急性呼吸道感染的病毒出现的时期, HBov 的感染率也随之上升。国内外报道 HBov 与其他病毒的混合感染率巴西<sup>[18]</sup>为 51.1%, 苏州<sup>[19]</sup>为 18.4%, 四川<sup>[25]</sup>为 50.8%, 其中多以混合感染鼻病毒、RSV、ADV 和 PIV 为主。本文检出的 40% 的混合感染率与文献报道基本一致。

综上所述, 本研究报道在天津地区呼吸道感染患儿中检测到 HBov, 对天津市儿童呼吸道感染病原谱做了重要补充, 但今后还应该增加患儿详细临床资料、实验室指标、患儿预后情况等方面进行进一步研究, 以便更客观地评价 HBov 的病原学作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2003, 36(6): 469-474.
- [2] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [3] Bastien N, Brandt K, Dust K, et al. Human bocavirus infection, Canada[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(5): 848-850.
- [4] Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children[J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(7): 904-910.
- [5] Smuts H, Hardie D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa[J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(9): 1457-1458.
- [6] Choi EH, Lee HJ, Kim SJ, et al. The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean children, 2000-2005[J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 43(5): 585-592.
- [7] Lee WM, Kiesner C, Pappas T, et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants[J]. *PLoS One*, 2007, 2(10): e966.
- [8] Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections[J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(5): 595-604.
- [9] 侯晓巨, 林书祥, 王维, 等. 急性呼吸道感染患儿 KI 多瘤病毒的检出和鉴定[J]. *中华检验医学杂志*, 2013, 36(10): 933-935.
- [10] 刘爱玲, 陆学东, 陈群. 呼吸道新发现病毒的研究进展[J]. *现代检验医学杂志*, 2010, 25(2): 47-51.
- [11] 傅希, 伍严安. 博卡病毒的研究进展[J]. *医学综述*, 2007, 13(15): 1124-1126.
- [12] Lin JH, Chiu SC, Lin YC, et al. Clinical and genetic analysis of Human Bocavirus in children with lower respiratory tract infection in Taiwan[J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(3): 219-224.
- [13] Lau SK, Yip CC, Que TL, et al. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong[J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(7): 986-993.
- [14] 叶颖子, 沈军, 曾玫, 等. 人博卡病毒在上海地区儿童下呼吸道感染中的流行病学[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(4): 246-249.
- [15] Choi JH, Chung YS, Kim KS, et al. Development of real-time PCR assays for detection and quantification of human bocavirus[J]. *J Clin Virol*, 2008, 42(3): 249-253.
- [16] 李秀云, 孔艳, 马克玲, 等. 昆明地区 5 岁以下儿童博卡病毒和偏肺病毒感染的临床流行病学调查[J]. *昆明医科大学学报*, 2012, 33(9): 42-46.
- [17] 何霞, 冯发深, 王铸, 等. 广州地区流感病毒和人博卡病毒感染的流行病学调查[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2012, 33(3): 417-420.
- [18] Durigon GS, Oliveira DB, Vollet SB, et al. Hospital-acquired human bocavirus in infants[J]. *J Hosp Infect*, 2010, 76(2): 171-173.
- [19] 李蓓荃, 季伟, 蔡利红, 等. 2009-2010 年苏州地区博卡病毒感染住院患儿临床特征分析[J]. *临床儿科杂志*, 2012, 30(8): 753-756.
- [20] 陈倩, 曹新, 胡正, 等. 南京地区急性呼吸道感染患儿人博卡病毒的检出与分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(5): 437-442.
- [21] 肖霓光, 张兵, 段招军, 等. 长沙地区急性下呼吸道感染住院儿童人博卡病毒感染的初步研究[J]. *临床儿科杂志*, 2011, 29(6): 510-513.
- [22] Manning A, Russell V, Eastick K, et al. Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses[J]. *J Infect Dis*, 2006, 194(9): 1283-1290.
- [23] 李亚敏, 周为民, 王延群, 等. 重症急性呼吸道感染儿童中人博卡病毒的分型检测与基因进化分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2014, 28(5): 346-348.
- [24] 刘沁, 张兵, 谢志萍, 等. 长沙地区急性下呼吸道感染住院儿童的病毒病原学分析[J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2015, 12(1): 26-31.
- [25] 杨晶艳, 胡鹏威, 陈蕊, 等. 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[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(1): 57-61.

(本文编辑: 万静)