

呼吸道合胞病毒基因分型的研究进展*

梁有才¹, 陆学东² (1. 广东医学院, 广东湛江 524000;
2. 广东医学院附属福田医院, 广东深圳 518033)

摘要: 呼吸道合胞病毒(RSV)是引起婴幼儿呼吸道感染的主要病原体之一。研究 RSV 基因型与疾病的相关性, 将在病毒疫苗研制与疾病防治方面发挥重大作用。该文阐述了 RSV 新的基因分型及其依据, 讨论了 RSV 的两种主要基因型在疾病感染中的优势对比, 以及各基因型与疾病轻重的相关性。

关键词: 呼吸道合胞病毒; 基因型; 疾病

中图分类号: R373.14; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)06-161-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.06.048

Research Progress of Respiratory Syncytial Virus Genotyping

LIANG You-cai¹, LU Xue-dong²

(1. Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524000, China;

2. Affiliated Futian Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong Shenzhen 518033, China)

Abstract: Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the leading cause of respiratory infection in infants. Studying the relationships between RSV genotype and disease, could be efficiently helpful for vaccine development and disease prevention. Here they expound the recent genotype of RSV, and the basis of genotyping; discuss the domination of the main genotype in disease infection, and the relationships between the genotype and the severity of disease.

Keywords: respiratory syncytial virus; genotype; disease

人类呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)是引起婴幼儿严重呼吸道感染的主要病原体之一^[1]。RSV 的流行受地理位置、季节、气候因素影响;在温带地区,无论南北半球,以冬春季节流行为主;靠近赤道地区常年流行^[2]。RSV 感染者一般是两岁以内的婴幼儿,或者是老年人与免疫缺陷者;随着儿童年龄增长,感染概率降低。RSV 所导致的症状包括呼吸道感染、发烧、中耳炎、哮喘、严重的细支气管炎和肺炎等^[3~6]。世界卫生组织在全球疫苗计划中优先发展 RSV 疫苗,RSV 融合蛋白是国外仅有的被批准用于预防高危婴幼儿感染 RSV 的单克隆抗体,但在中国尚未被批准使用,中国还没有预防 RSV 感染的有效疫苗^[4]。

因此,研究准备更多 RSV 基因与疾病关系的资料,将在 RSV 感染的疫苗研制、诊治和卫生保健方面发挥重要作用。本文拟对 RSV 的基因分型,及其与疾病的相关性做讨论。

1 RSV 的基因结构 呼吸道合胞病毒是一种有包膜的 RNA 病毒,属于副黏病毒科,肺炎病毒属,基因有 15 222 个核苷酸(nt),共含有 10 个基因,其侧翼序列有 44nt 的前导序列(leader)与 155nt 的拖尾区(trail),顺序为:3'-Leader-NS1-NS2-N-

P-M-SH-G-F-M2-L-Trailer-5',在 L 基因起始与 M2 基因结尾序列之间有 68nt 的重叠基因。除 L 基因外的其它基因都有保守的起始序列,这些基因包含有病毒复制转录的启动子,L 基因的起始序列为 3'-CCCCGUUUA.....5',它包含了能让病毒直接转录所需的启动信息。10 个基因能编码至少 11 种已知蛋白:NS1 和 NS2 为非结构蛋白,是干扰素系统的拮抗物;N 是核壳蛋白;P 是磷酸蛋白,是聚合酶复合物的重要成分;M 是基质蛋白;SH 是一种小疏水横跨膜表面糖蛋白;G 是一种 N 端和 O 端糖基化的 II 型横跨膜黏附糖蛋白;F 是 N 端糖基化的 I 型横跨膜糖蛋白,与细胞质膜融合,在物质通过胞膜时产生作用;M2 基因至少编码了两种产物(其中的 M2-1 是一种独特的转录因子,而 M2-2 是一种调节因子);L 基因编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的催化亚基。除了 NS1,NS2 和 M2-2 以外,所有的蛋白都是病毒颗粒的结构成分。G 和 F 蛋白是主要的保护与中和抗原。N,F,M2-1 和 SH 蛋白是细胞毒性 T 细胞的靶位^[1]。

2 RSV 的基因分型 目前 RSV 基因检测相关技术有:各种 PCR 技术,包括巢式 PCR,RT-PCR,实时荧光定量 PCR 等;还包括 DNA 测序、核酸杂交技术、基因芯片技术、多重基因表达遗传分析系统

* 作者简介:梁有才(1986-),男,硕士研究生,专业:临床检验诊断,研究方向:微生物学检验,Tel:13413679931,E-mail:912313855@qq.com。
通讯作者:陆学东,广东医学院附属福田医院,检验医学部主任,Tel:13688806602,E-mail:luxuedong2004@163.com。

(GeXP)等。分子生物学技术的发展使 RSV 基因检测分型更加快捷准确,越来越多新的 RSV 基因型被发现与研究。

已经报道的 RSV 基因型包括 RSV-A 与 RSV-B。RSV-A 包括:SAA1,GA1,GA2… GA6,GA7,NA1,NA2,ON1,CB-A。RSV-B 包括:URU1,URU2,GB1,GB2,GB3,GB4,SAB1,SAB2,SAB3,SAB4,BA1,BA 2… BA11,BA12,AB4,CB-B,GB5(CB1) [1,3~5,7~9]。

RSV 的两种主要的基因型 A(RSV-A)和 B(RSV-B),分型依据为 RSV 的 G 蛋白与单克隆抗体反应的不同,以及 G 蛋白基因的不同(也有报道,RSV 基因分型是基于单克隆抗体对 G 蛋白、F 蛋白的反应,以及这两种蛋白的基因分析[8],更细的基因分型基于 G 蛋白基因 C 末端结尾第二高度可变区核苷酸序列分析[3,9]。G 蛋白总体构架类似于黏蛋白,但缺少了其它副黏病毒黏附蛋白中所具有的血细胞凝集素和神经氨酸酶的活性[1]。G 蛋白极易发生基因突变,典型的 RSV-A 和 RSV-B 之间,G 蛋白氨基酸序列的 50%可以改变,不同基因型间 G 蛋白氨基酸的同源性可仅有 53%,抗原相关性可仅为 5%[10]。

RSV-A 和 RSV-B 各自的型内也存在主要源于 G 蛋白的抗原与基因的较大差异(可存在 20%的氨基酸改变),还有 SH 和 N 蛋白的有限变异。氨基酸序列的变异处于 G 蛋白的两个胞外区,横跨膜区与胞内中心富含半胱氨酸区则高度保守,但位于保守区旁边的两个区域是高度可变区。分析这两个区域的变化提示有三个突变的机制:①替换;②三个可读框移码突变;③终止密码子的改变,导致不同长度的蛋白的产生[1]。基因型内差异为进行更细基因分型提供了依据,也提供了型内进化的基础。对 RSV 毒株进行种系遗传学分析显示,RSV-A 基因进化率估计在 6.72×10^{-4} 替代/位点/年(95%HPD: 5.61×10^{-4} , 7.6×10^{-4}),而 RSV-B 的进化率估计在 7.69×10^{-4} 替代/位点/年(95%HPD: 6.81×10^{-4} , 8.62×10^{-4}) [5]。

此外,有学者提出,不仅仅 RSV 的基因编码序列可以变异,控制基因表达的信号也可以改变,所以调整关键蛋白的表达进而影响基因表达是导致抗原变异的第二个原因[1]。推测这可能已经影响到了之前的基因分型结果,或可能会成为基因分型的又一个依据。

3 RSV-A 与 RSV-B 的感染优势对比 RSV 的两种主要基因型 RSV-A 和 RSV-B 以各种混合形式传播[4],它的流行受地理位置和季节因素的影响,两种主要基因型的交替流行可能跟人体免疫导

致的选择压力有关[2,10]。

很多研究对比了 RSV 两种主要基因型的疾病感染优势:De-Pairs 等[6]发现,南巴西的 RSV-A 占疾病感染优势。Bose 等[5]发现,乌拉圭蒙得维的亚地区通常 RSV-A 占疾病感染优势,但某些感染中,RSV-B 会更频繁地被检测到。Obodai 等[11]发现,加纳的 RSV-B 占疾病感染优势。Biswas 等[8]发现,东北印度阿萨姆邦地区 2009~2012 年间只检测到 RSV-A (NA1,GA5) 感染,未能检测到 RSV-B。Choudhary 等[4]总结发现,西印度 2009~2012 年 RSV-B 总体上占疾病感染优势。但 2009~2010 年期间 RSV-B 占疾病感染优势,2011 年 RSV-A 占疾病感染优势,在 2012 年 RSV-A 占疾病感染优势。Geis 等[12]发现,德国海德尔堡地区 RSV-A 占疾病感染优势。杜丽娜等[10]发现,中国重庆地区 2008~2009 年度 RSV-B 占疾病感染优势。Ren 等[7]发现,中国重庆儿童医院检出的 RSV-A 总体上占疾病感染优势。进一步分析发现,在 2009 年夏季到 2010 年的春季 RSV-B 占疾病感染优势;而在 2010 年夏季到 2012 年春季 RSV-A 占疾病感染优势;在 2012 年夏季到 2013 年春季,RSV-B 占疾病感染优势。

综上世界各地资料,总体上看起来 RSV-A 在更多地方占疾病感染的优势地位,但并不是在所有地方都占据优势,而且同一个地方的不同时间段优势流行的基因型可不同。目前研究资料提示,相对于 RSV-B 来说,更多地方 RSV-A 占据了感染优势,但没有某一基因型能稳定地占据流行的主导地位。在某一地区或者某一时间段的疾病感染中,可能出现两种基因型同时流行的情况,或者其中的某种基因型占优势的情况[10]。

4 RSV 各基因型与呼吸道疾病的严重性 RSV 的 G 和 F 蛋白是病毒中和反应,抗原性和毒力的主要抗原。G 蛋白是 RSV 感染后人体免疫反应的主要靶位(包括 F 糖蛋白)。G 蛋白抗原和基因变异比 F 蛋白更加频繁,如此高的变异可能导致 G 蛋白在促进 RSV 感染的过程发挥重要作用[13]。

RSV 亚型的改变与 RSV 的反复感染有关。G 蛋白相关免疫是基于其对应亚型的特征产生的,不同亚型的 G 蛋白,不能诱导机体产生不同亚型间交叉保护作用的有效抗体,毒株之间的基因变异可以改变其致病性和逃避免疫防御而复发感染和暴发流行[1,6,10]。

G 蛋白胞外区经历了强烈的阳性选择,RSV-A 的 G 蛋白就有 29 个阳性氨基酸选择位点,比如在 GA2 与 GA3 的 G 蛋白氨基酸序列对比中发现了一些阳性选择位点(Pro226Leu, Ser269Thr,

Pro289Ser 和 Pro290Leu)。其中的 Pro226Leu 是用来辨别 GA3 的位点,而某些位点(226 和 290)是 RSV-A 的抗原表位。在严重疾病比如细支气管炎中,氨基酸这些位点的变化可能发挥了重要作用^[13]。

很多研究发现,RSV 不同基因亚型导致的疾病严重程度不同:Goto-sugai 等^[13]认为,某些 RSV 基因型和疾病严重性的关系存在轻微不同。Goto-sugai 等^[13]对 G 蛋白的基因分析时发现,GA3 与很严重的疾病相关,例如细支气管炎、肺炎。有报道认为^[14],相对于 B7 和 B9,NA1 与严重的住院病情更紧密相关。Panayiotou 等^[3]指出,先前有报道认为 RSV-A 导致疾病的严重性大于 RSV-B,而他们的研究提示 RSV-BA(属于 RSV-B)导致疾病的严重性大于 RSV-A。他们还发现,相对于 GA2 与 BA 基因亚型,ON1 亚型所致疾病较轻。另外,与其它人不同,Goto-sugai 等^[13]发现,GA2 和 BA 与细支气管炎相关,而 RSV-A 所引起疾病的严重性与 RSV-B 所引起疾病的严重性没有明显不同。

综上所述,G 蛋白的高度变异在 RSV 病毒感染与复发感染中发挥了重要作用。G 蛋白的基因改变是 RSV 分型的基础,因此它的变异也是 RSV 不同亚型导致疾病轻重不同的关键。目前对 RSV 基因型与疾病的相关性研究,已经从讨论 RSV-A 及 RSV-B 向讨论更细的基因亚型过渡,比如 BA, ON1,GA2,GA3,GA5 等。RSV-A 与 RSV-B 两者都有可能导致相对严重的临床症状,就本文所知,总体上 RSV-A 比 RSV-B 导致了更多的严重疾病,但其相关性尚未完全明确。RSV-A 与 RSV-B 究竟哪一种更能导致更严重的疾病,尚未定论,有待后续更多系统性研究来证实。另外,有报道认为,相对基因型来说,呼吸道所感染的病毒量跟疾病轻重相关性更为明显^[3,13]。

5 展望 我们知道,RSV 的基因分型与疾病严重性的关键,主要源于 G 蛋白的基因和抗原的改变。但 RSV 各基因型与疾病的相关性尚未完全明了。RSV 各基因型的流行病学资料还不够齐全,系统阐述尚需进一步的调查研究。

今后应从以下几个方面努力:①系统地、有计划地在世界各地进行 RSV 基因检测及分型,统计好各地 RSV 各基因型流行病学资料,建立其全世界范围的 RSV 基因型流行病学资料库。②系统地研究 RSV 各基因型与所致疾病的关系,统计其与疾病轻重及临床症状的相关性,建立针对特定基因型的预防诊疗方案。③寻找药物可以有效作用的 RSV 基因靶位及其表达抗原,寻找可用于疫苗研制的基因序列。④重视分子诊断技术与医学交叉

结合的学科,开发更先进适用的分子生物学分析技术并应用于临床诊断治疗。

总之,新的分子生物学技术的发展给 RSV 基因及其分型的研究带来了极大便利和机遇。继续推进 RSV 基因及其分型的研究,会推动 RSV 疫苗研制和感染风险模型的建立,会给 RSV 感染的预防、诊治、卫生保健等带来重大帮助。

参考文献:

- [1] Wertz GW, Moudy RM, et al. Antigenic and genetic variation in human respiratory syncytial virus[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, 23(suppl 1):19-24.
- [2] 唐圣辉,王宇清. 儿童呼吸道合胞病毒感染与气候因素的关系研究[J]. *儿科药学杂志*, 2013, 19(5):1-3.
Tang SH, Wang YQ. The relationship between meteorological conditions and respiratory syncytial virus infection in hospitalized children[J]. *Journal of Pediatrics Pharmacy*, 2013, 19(5):1-3.
- [3] Panayiotou C, Richter J, Koliou M, et al. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010 ~ 2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity[J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(11):2406-2411.
- [4] Choudhary ML, Anand SP, Wadhwa BS, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus in Pune, Western India[J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2013, 20(12):369-377.
- [5] Bose ME, He J, Shrivastava S, et al. Sequencing and analysis of globally obtained human respiratory syncytial virus A and B genomes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):0120098.
- [6] De-Pairs F, Beck C, de Souza Nunes L, et al. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil[J]. *Virology Journal*, 2014, 11(1):1-6.
- [7] Ren L, Xiao Q, Zhou L, et al. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus subtype B: a novel genotype of subtype B circulating in China[J]. *Journal of Medical Virology*, 2015, 87(1):1-9.
- [8] Biswas D, Ysdav K, Borkakoty B, et al. Molecular characterization of human respiratory syncytial virus NA1 and GA5 genotypes detected in Assam in north-east India, 2009~2012[J]. *Journal of Medical Virology*, 2013, 85(9):1639-1644.
- [9] Avadhanula V, Chemaly RF, Shah S, et al. Infection with novel respiratory syncytial virus genotype On-

- tario (ON1) in adult hematopoietic cell transplant recipients, Texas, 2011~2013[J]. *Journal of Infection Diseases*, 2015, 211(4):582-589.
- [10] 杜丽娜, 张志勇, 任妍, 等. 重庆地区急性呼吸道感染患儿呼吸道合胞病毒流行特征及其 G 基因序列分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(3): 213-217.
- Du LN, Zhang ZY, Ren Y, et al. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in children with acute respiratory tract infections and sequence analysis of G gene in Chongqing area[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2010, 30(3): 213-217.
- [11] Obodai E, Asmah R, Boamah I, et al. Respiratory syncytial virus genotypes circulating in urban Ghana: February to November 2006[J]. *Pan African Medical Journal*, 2014(19):128.
- [12] Geis S, Prifert C, Weissbrich B, et al. Molecular characterization of a respiratory syncytial virus outbreak in a hematology unit in Heidelberg, Germany [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(1): 155-162.
- [13] Goto-Sugai K, Tsukagoshi H, Mizuta K, et al. Genotyping and phylogenetic analysis of the major genes in respiratory syncytial virus isolated from infants with bronchiolitis[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2010, 63(6): 393-400.
- [14] Luchsinger V, Ampuero S, Palomino M, et al. Comparison of virological profiles of respiratory syncytial virus and rhinovirus in acute lower tract respiratory infections in very young Chilean infants, according to their clinical outcome[J]. *Journal Clinical Virology*, 2014, 61(1):138-144.

收稿日期:2015-07-09

修回日期:2015-12-27

(上接 160 页)人员记录的政策和过程,因为人员记录提供了人员管理整个生命周期中所执行的活动的证据。实验室管理层需负责维护完成的人员记录,并及时转发任何要求的记录给 HR 专业人员。根据 ISO 15189:2012 中对人员记录的要求,实验室管理层应该确保准确收集每个雇员整个雇用期间所有要求的记录(包括教育和专业资质;证书或执照的复印件;以前的工作经历;岗位描述;新员工上岗前介绍;当前岗位的培训;能力评估;继续教育和成果记录;员工表现评估;事故报告和职业危险暴露记录;免疫状态)^[2,3]。根据实验室已建立的记录保存时间表,将这些记录保存到员工的人事文件夹中,并通过受控访问的方式被安全的保存。但是这些记录不一定都保存在实验室,可根据各部门的功能,保存在组织的其他部门,但在需要时可以获取。

7 小结 本文对实验室人员管理的四个连续过程进行了描述,为实验室管理层维持 QMS 中有效的人员活动提供了有用的资源。实验室管理层通过遵照 QMS16 中的相关建议和条例,便可以较容易地满足国际、国家、地区和监管机构对 QSE 人员的要求。

参考文献:

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute QMS01-A4. Quality Management System; A Model for Laboratory Services; Approved Guideline-Fourth Edition [S]. Wayne: PA, CLSI QMS01-A4, 2011.
- [2] International Organization for Standardization. Medical laboratories-Requirements for quality and competence[S]. ISO 15189, 2012.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute QMS16-A. Quality Management System; Laboratory personnel management; Approved Guideline-First Edition [S]. Wayne: PA, CLSI QMS16-A, 2015.
- [4] International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories [S]. ISO/IEC 17025, 2005.
- [5] International Organization for Standardization 9001: 2008. Quality management systems-Requirements [S]. ISO 9001, 2008.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute QMS14-A. Quality Management System; Leadership and Management Roles and Responsibilities; Approved Guideline[S]. Wayne: PA, CLSI QMS14-A, 2012.
- [7] Adams B. The Everything Leadership Book: The 20 Core Concepts Every Leader Must Know (Everything Series) [Z]. MA: Adams Media Corporation, 2001: 136-137.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute QMS03-A3. Training and Competence Assessment; Approved Guideline-Third Edition [S]. Wayne: PA, CLSI QMS03-A3, 2009.
- [9] Kotter JP. Management is (still) not leadership [OL]. <https://hbr.org/2013/01/management-is-still-not-leadership/>.
- [10] Business Dictionary. Definition continuing education program [OL]. <http://www.businessdictionary.com/definition/continuing-education-program.html>.

收稿日期:2016-08-18

修回日期:2016-09-19