

论著·临床研究

## 2009~2014年度浙江南部呼吸道合胞病毒 分子流行病学研究

董翌玮 歹丽红 叶文静 陈小芳 董琳

(温州医科大学附属第二医院/育英儿童医院儿童呼吸科, 浙江温州 325027)

**[摘要]** **目的** 了解浙江南部呼吸道合胞病毒(RSV)基因型流行趋势,并研究A亚型G蛋白基因特征。**方法** 采集2009年7月至2014年6月浙江南部3家医院因肺炎和毛细支气管炎住院的5岁以下儿童下呼吸道分泌物,应用直接免疫荧光法检测RSV抗原。在每个流行年度(7月至次年6月)RSV阳性标本中随机抽取200份,应用RT-PCR方法检测RSV亚型,扩增A亚型G蛋白近全基因序列并测序,鉴定其基因型。**结果** 2009~2014 5个年度共采集25449份下呼吸道分泌物标本,其中6416份(25.21%)RSV阳性。随机抽样的1000份RSV阳性标本中检出A亚型462株(46.2%),B亚型538株(53.8%),A亚型依次占各年度的22.5%、74.5%、84.5%、19.0%、30.5%。每年度随机抽样25株RSVA亚型病毒株外送双向测序,结果获得A亚型阳性52株,其中得到4种A亚型基因型,包括NA1(39株)、NA4(1株)、ON1(10株)、GA2(2株)基因型,其中NA1是2009~2012年度的优势基因型,ON1是2013~2014年度A亚型的唯一基因型。A亚型G蛋白基因与原型株A2的核苷酸同源性和氨基酸同源性分别为80.7%~89.3%和74.4%~82.6%;分离株之间的核苷酸及氨基酸同源性分别为81.5%~100%和80.2%~100%。**结论** 2009~2014年度浙江南部地区出现RSVA、B亚型共循环,A亚型有多个不同的基因型共循环,其G蛋白基因变异明显。 [中国当代儿科杂志, 2018, 20(11): 904-910]

**[关键词]** 呼吸道合胞病毒; G蛋白; 亚型; 基因型; 儿童

### A molecular epidemiological study of respiratory syncytial virus circulating in southern Zhejiang Province, China, from 2009 to 2014

DONG Yi-Wei, DAI Li-Hong, YE Wen-Jing, CHEN Xiao-Fang, DONG Lin. Department of Pulmonology, Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Dong L, Email: 13761523248@163.com)

**Abstract: Objective** To find out the prevalence of respiratory syncytial virus (RSV) genotypes in southern Zhejiang Province, China, and to study the genetic characteristics of G protein from subtype A of RSV. **Methods** The lower respiratory tract secretions of children under 5 years of age who were hospitalized for pneumonia and bronchiolitis in three hospitals in southern Zhejiang Province from July 2009 to June 2014 were collected. Direct immunofluorescence assay was used to detect RSV antigens from the collected secretions. A total of 200 samples were randomly selected from RSV-positive specimens in each prevailing year (from July of a specific year to June of the next year). RT-PCR was used to determine RSV subtypes, and the near-full length gene sequence of G protein from subtype A was amplified and sequenced to identify the genotype. **Results** A total of 25449 samples of lower respiratory tract secretions were collected from 2009 to 2014, among which 6416 (25.21%) samples were RSV-positive. Among the 1000 RSV-positive specimens randomly sampled, 462 strains (46.2%) were subtype A, and 538 strains (53.8%) were subtype B. Subtype A accounted for 22.5%, 74.5%, 84.5%, 19.0%, and 30.5% of the total strains in each year from 2009 to 2014. A total of 25 RSV subtype A strains were randomly sampled and sent out for bidirectional sequencing in each year, which confirmed 52 positive subtype A strains. Four genotypes of subtype A strains were obtained from the above strains, including NA1 (39 strains), NA4 (1 strain), ON1 (10 strains), and GA2 (2 strains). NA1 was the dominant genotype between 2009 and 2012,

[收稿日期] 2018-06-29; [接受日期] 2018-09-10

[基金项目] 浙江省公益性技术应用研究项目(2012C33049); 国家临床重点专科开放项目(20140105)。

[作者简介] 董翌玮,男,硕士研究生。

[通信作者] 董琳,女,主任医师。

and ON1 was the only genotype of subtype A during 2013-2014. The nucleotide homology and amino acid homology between the G protein of subtype A and the prototype strain A2 were 80.7%-89.3% and 74.4%-82.6%, respectively. The nucleotide homology and amino acid homology between the isolates of subtype A were 81.5%-100% and 80.2%-100%, respectively. **Conclusions** In southern Zhejiang Province from 2009 to 2014, there was a co-circulation of RSV subtypes A and B, as well as a co-circulation of several different genotypes of RSV subtype A, which had highly variable G protein genes.

[Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(11): 904-910]

**Key words:** Respiratory syncytial virus; G protein; Subtype; Genotype; Child

呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 是世界范围内婴幼儿下呼吸道感染 (lower respiratory tract infection, LRTI) 最主要的病原, 至今尚无安全有效的疫苗<sup>[1]</sup>。RSV 是非节段性、单股负链 RNA 病毒, 包括 10 个蛋白编码基因表达 11 种蛋白, 其中 G 蛋白是最易发生抗原变异的包膜糖蛋白。病毒发生抗原变异后可逃避宿主的免疫攻击, 是导致 RSV 感染暴发和重复感染的重要原因之一<sup>[2]</sup>, G 蛋白基因的变异及进化特征已成为 RSV 分子流行病学的研究热点。本研究对浙江南部 3 个地区 5 个连续流行年度住院儿童进行 RSV 检测及亚型分型, 并对 RSV A 亚型 G 蛋白进行基因测序及进化分析, 探讨 A 亚型基因型分布及其 G 蛋白基因变异特征, 为 RSV 疾病防控及疫苗研制提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及标本采集

以 2009 年 7 月 1 日至 2014 年 6 月 30 日, 浙江省温州、台州及丽水地区 3 家三级甲等医院因肺炎和毛细支气管炎住院的 5 岁以下患儿为研究对象。患儿入院 48 h 内取鼻咽分泌物约 1 mL 置于 2 mL 生理盐水中, 应用直接免疫荧光法 (DIF) 筛查 RSV 抗原。按照简单随机抽样法, 每个流行年度 (以每年的 7 月 1 日到次年 6 月 30 日) 抽取 RSV 抗原阳性标本 200 份以检测 RSV 亚型。

### 1.2 主要仪器及设备

DIF 试剂购自美国 Chemicon 公司; RNA 提取试剂盒购自北京博凌科为生物科技有限公司, 逆转录试剂盒均购自于 TaKaRa (大连) 有限公司; PCR MasterMix 购自北京天根科技有限公司; DNAMarker 购自上海捷瑞生物有限公司; ABI-PCR 仪购自美国 ABI 公司; 电泳仪 BIO-RAD power/PAC 3000 型购自北京六一仪器厂。

### 1.3 实验方法

(1) 病毒总 RNA 提取及反转录: 取标本上清 200  $\mu$ L, 采用 RNA 提取试剂盒提取患儿标本上清中的 RSV RNA。反转录采用 TaKaRa 公司的试剂盒进行。以反转录体系 20  $\mu$ L 为例: 取 RNA 5  $\mu$ L, 按照说明书加入 5xPrimeScript<sup>®</sup>Buffer 4  $\mu$ L, PrimeScript<sup>®</sup>RT Enzyme Mix I、Oligo dTPrime 各 1  $\mu$ L、Random 6 mers 4  $\mu$ L, 取 RNA 4  $\mu$ L, 加入 RNase free dH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu$ L; 反应条件为 37 $^{\circ}$ C 逆转录反应 15 min, 85 $^{\circ}$ C 逆转酶失活 5 s; -20 $^{\circ}$ C 保存。

(2) RSV 亚型鉴定: 引物设计及扩增反应参照文献<sup>[3]</sup>。第一步 PCR 扩增产物覆盖 G 蛋白全基因序列, 反应体系 (40  $\mu$ L): cDNA 模板 2  $\mu$ L, P1、P2 各 1  $\mu$ L, 2 $\times$  PCR Master Mix 20  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 16  $\mu$ L; 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C、3 min; 94 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、72 $^{\circ}$ C 各 1 min 扩增 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。第二步 PCR 扩增的产物长度为 250 bp 的 A 亚型基因片段或长度为 341 bp 的 B 亚型基因片段, 反应体系 (20  $\mu$ L): PCR 第一步产物 1.0  $\mu$ L, P3、P4、P5 各 0.5  $\mu$ L, 2 $\times$  PCR Master Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu$ L; 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C 各 30 s, 70 $^{\circ}$ C、40 s, 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取第二步 PCR 产物 5  $\mu$ L, 加入制备的 2% 琼脂糖凝胶加样孔, 电泳缓冲液为 1 $\times$  TBE 100 V 恒压, 电泳 30~40 min, 阴性对照为 ddH<sub>2</sub>O, 阳性对照为标准株 A2 株 (首都儿科研究所馈赠) 及 CH18537 株 (购自美国 ATCC), 电泳结束后将琼脂糖凝胶放入凝胶成像系统拍照并记录结果。

(3) 基因测序: 使用 SPSS 19.0 统计软件自带抽样功能, 每个流行年度随机抽取 25 株 A 亚型 G 蛋白基因序列产物 (依次编号为 WENZHOUA1-WENZHOUA125 等), 送上海英骏公司完成测序。

(4) 系统进化分析: 使用 DNASTAR 软件中 EditSeq 和 MegAlign 等方法, 对 A 亚型的核苷酸

和氨基酸序列与 GenBank 中已有 RSV 原型株的序列进行比较和分析,并在 MEGA6.06 软件上应用 N-J 法绘制基因进化树进行分析,比较方法采用 Clustal W 法。

### 1.4 临床资料收集

由专人收集所有 RSV 阳性患儿的临床资料,包括性别、年龄、发病季节、临床诊断、诊治经过等。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析,计数资料以例数和百分率(%)表示,组间比较采用卡方检验。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RSV 亚型的检出情况

2009~2014 年度共送检 25 449 份下呼吸道分泌物标本,其中 6 416 份(25.21%)标本 RSV 阳

性,各年度检出率依次为 20.31%(941/4 631)、26.37%(1 184/4 490)、36.79%(1 799/4 890)、20.96%(1 071/5 109)和 22.45%(1 421/6 329)。

所抽取的 1 000 份 RSV 阳性标本经过巢氏 PCR 扩增共检出 A 亚型株有 462 株(46.2%),B 亚型株有 538 株(53.8%)。A 亚型依次占 2009~2014 年各年度的 22.5%(45/200)、74.5%(149/200)、84.5%(169/200)、19.0%(38/200)、30.5%(61/200),B 亚型依次占各年度的 77.5%(155/200)、25.5%(51/200)、15.5%(31/200)、81.0%(162/200)、69.5%(139/200)。结果显示 2010~2012 年度中,与 B 亚型相比,A 亚型占主导,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。图 1 示 2009~2014 年 5 个年度 1 000 份阳性标本 RSV 亚型检出数及不同月份 RSV 亚型检出情况,可见每年的 12 月到次年的 3~4 月,RSV 检出阳性率最高,其中 2010~2012 两个年度 RSV 以 A 亚型流行为主,其余 3 个年度均以 B 亚型流行为主。

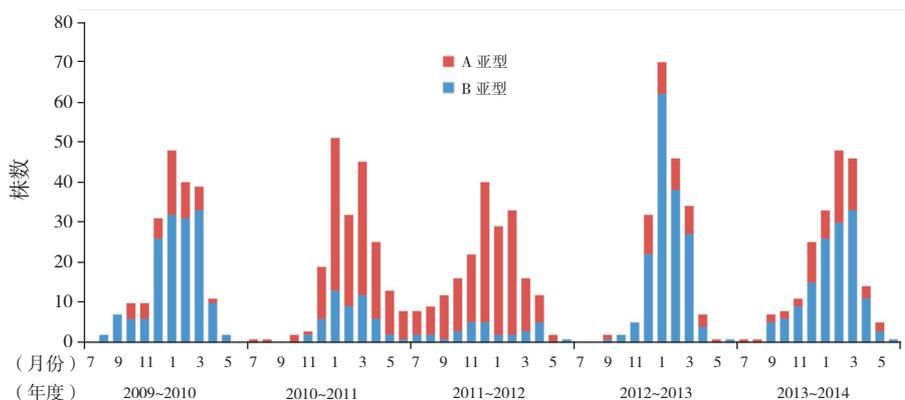


图 1 2009~2014 年度 RSV 亚型检出情况 显示 2010~2012 两个年度 RSV 以 A 亚型流行为主,其余 3 个年度均以 B 亚型流行为主。

### 2.2 RSV 亚型感染的流行病学特征

462 例 A 亚型感染患儿中,男 307 例(66.5%),女 155 例(33.5%),男女比为 1.98:1;其中小于 6 月龄 258 例(55.8%),6 月龄至 2 岁 184 例(39.8%),2 岁以上至 5 岁 20 例(4.3%)。感染发生在每年的 12 月至次年 4 月有 354 例(76.6%)。临床诊断为毛细支气管炎 261 例(56.5%),支气管肺炎 201 例(43.5%)。145 例(31.4%)有低热,151 例(32.7%)出现呼吸费力,12 例有肝功能损害,8 例合并心功能不全。89 例有基础疾病,64 例需吸氧,入住重症监护室 41 例,机械通气 14 例。

538 例 B 亚型感染患儿中,男 360 例(66.9%),女 178 例(33.1%),男女比为 2.02:1;其中小于 6 月龄 302 例(56.1%),6 月龄至 2 岁 234 例(43.5%),2 岁以上至 5 岁 2 例(0.4%)。感染发生在每年的 12 月至次年 4 月有 413 例(76.8%)。临床诊断为毛细支气管炎 333 例(61.9%),支气管肺炎 205 例(38.1%)。236 例(43.9%)有低热,198 例(36.8%)出现呼吸费力,15 例有肝功能损害,10 例合并心功能不全。112 例有基础疾病,82 例需吸氧,入住重症监护室 23 例,机械通气 6 例。

### 2.3 RSV 亚型的基因型分布

每个流行年度随机抽取 25 株 A 亚型基因共 125 株进行测序，获得 52 株 A 亚型 G 蛋白基因序列，对第二高变区（HVR2）区域进行基因序列比对及构建系统进化树，结果显示 A 亚型基因型分布于 4 个分枝，其中 39 株基因序列与 NA1 原型株 NG-016-04 的同源性达 94.1%~99.6%，属于 NA1 基因型，均于 2009~2013 年度检出，是这 4 个流行年度的优势基因型。10 株 HVR2 含有 72 个重复核苷酸序列插入，与 ON1 原型株 ON138-0111A 的同源性达 98.2%~100%，属于 ON1 基因型，其中首株（WENZHOUA68）于 2011 年 12 月检出，其余 9 株均于 2013~2014 年度检出，并且是该年度 A 亚型唯一的基因型。2 株（WENZHOUA15、WENZHOUA22）与 GA2 原型株 CH28 的同源性达 99.3%，属 GA2 基因型，于 2009~2010 年度检出。WENZHOUA64 与原型株 BJ/36578 的同源性达 99.3%，属 NA4 基因型，于 2011~2012 年度检出。B 亚型中以 BA9 基因型最多（44/60，73.3%），5 个流行年度均有检出，是除 2010~2011 年度外 B 亚型的优势基因型，并且是 2013~2014 年度 B 亚型唯一基因型，其次为 BA8 基因型（6/60，10.0%）。本研究将针对 A 亚型及其各类基因型进行分析与讨论，结果详见表 1、图 2。

表 1 2009~2014 5 个流行年度 A 亚型基因型检出分布 (株)

年度	NA1	NA4	ON1	GA2	合计
2009~2010	4	0	0	2	6
2010~2011	7	0	0	0	7
2011~2012	21	1	1	0	23
2012~2013	7	0	0	0	7
2013~2014	0	0	9	0	9
合计	39	1	10	2	52



图 2 A 亚型 G 蛋白系统进化树 依据 RSV A 亚型 HVR2 构建无根进化树，采用 neighbor-joining 方法，每种基因型的参考序列来自 GenBank; Bootstrap 1000 次，计算方法采用 Kimura 2-parameter model，标尺表示遗传距离，进化树枝上仅显示 Bootstrap value  $\geq 60\%$  的数值。显示 A 亚型基因型分布于 4 个分枝，其中 39 株属于 NA1 基因型，10 株属于 ON1 基因型，2 株属于 GA2 基因型，1 株属于 NA4 基因型。

### 2.4 A 亚型 G 蛋白基因的同源性比较

A 亚型 G 蛋白基因与原型株 A2 的核苷酸同源性为 80.7%~89.3%，氨基酸同源性为 74.4%~82.6%；52 株 A 亚型之间的核苷酸及氨基酸同源性分别为 81.5%~100% 和 80.2%~100%。

NA1 和 ON1 基因终止密码子全部为 TGA，GA2 和 NA4 基因终止密码子均为 TAG。通过氨基酸序列比对发现，N237 糖基化存在于 NA1 和 GA2 基因型中；N251 糖基化存在于除 WENZHOUA53、72、79 外的其他 NA1 基因型中；除 WENZHOUA42、48 外，其他 A 亚型均存在 N294 糖基化。ON1 基因型插入的 23 个重复氨

基酸与原型株之间也存在差异，WENZHOUI12 第 262 位、WENZHOUI21 第 271 位均发生 E 突变为 K (E262K、E271K)，WENZHOUI05 第 295 位发生 S 突变为 N (S295N)，但其对应位点 286、295、271 没有改变。也有对应氨基酸位点同时突变为同一个氨基酸残基的，如 WENZHOUI17 氨基酸第 274 位点 L 突变为 P，其对应第 298 位点也发生 L 突变为 P。此外，HVR2 其他位点的突变如 E232G、T253K 存在于所有 ON1 基因株中。WENZHOUA64 替代包括 N242I、P274Q、T293S、N251D。RSV A 亚型 G 蛋白氨基酸序列比较见图 3。

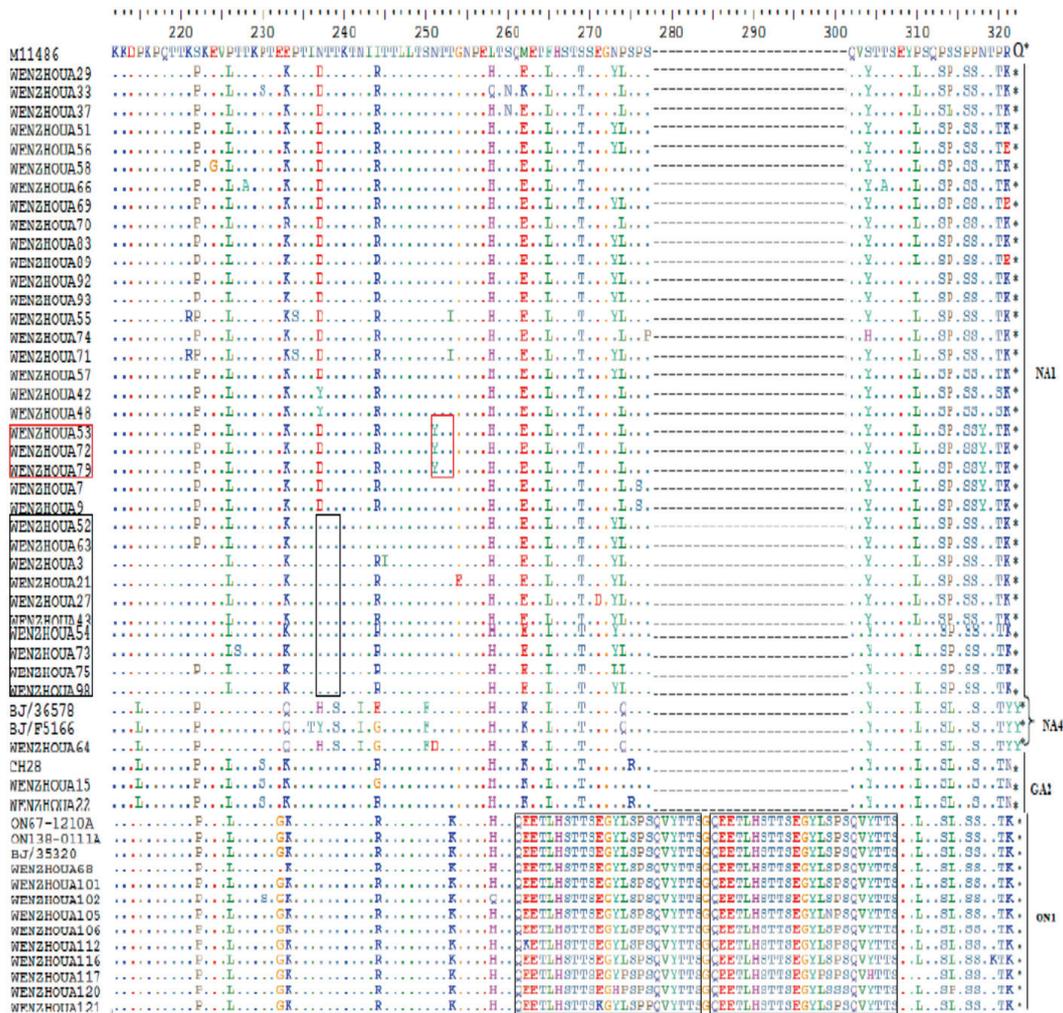


图 3 RSV A 亚型 G 蛋白氨基酸序列比较 显示 N237 糖基化存在于 NA1 和 GA2 基因型中，ON1 基因型插入的 23 个重复氨基酸与原型株之间也存在差异，包括突变、替代。E: 谷氨酸；K: 赖氨酸；S: 丝氨酸；N: 天冬酰胺；L: 亮氨酸；P: 脯氨酸；G: 甘氨酸；T: 苏氨酸；I: 异亮氨酸；Q: 谷氨酰胺；D: 天冬氨酸。

### 3 讨论

RSV感染可全年散发但以冬春季为主,流行常在每年的11月或12月开始,1月或2月达高峰,持续4~5个月<sup>[4-5]</sup>。本研究结果显示浙江南部地区儿童RSV感染流行季节为每年的12月到次年的3~4月,与Yoshihara等<sup>[6]</sup>报道一致。2009~2014各流行年度均可检出A亚型,其中A亚型是2010~2012两个流行年度的优势亚型,与北京、上海、重庆的报道一致<sup>[7-9]</sup>。然而深圳市2012~2013流行年度中以B亚型为主<sup>[10]</sup>,武汉市2014~2015流行年度中以A亚型检出为多<sup>[11]</sup>,北京地区2006~2016流行年度中,大部分流行年度以一个亚型为主,但也有两个流行年度为A、B亚型共同主导<sup>[12]</sup>。显示不同流行年度我国不同地区不同气候下RSV优势亚型存在差异,因此有必要连续监测本地区RSV亚型流行趋势,为预防和控制RSV感染提供指导,为筛选疫苗株提供参考。

本研究在2009~2014连续5个流行年度共检出4种A亚型基因型(NA1、NA4、ON1、GA2),其中前4个流行年度的优势基因型为NA1,最后一个流行年度仅检出ON1基因型,表明存在不同RSV A亚型基因型的共循环。NA1基因型曾经是多个地区A亚型的优势基因型<sup>[6-7,10,12-13]</sup>。然而自2010年加拿大首次检出ON1基因型后<sup>[14]</sup>,ON1基因型已成为部分国家A亚型的优势基因型<sup>[11,15-16]</sup>。韩国学者研究发现,2010~2013连续3个流行年度中ON1基因型依次占A亚型的0.0%、17.4%、94.6%,表明ON1基因型存在快速传播趋势<sup>[16]</sup>。ON1基因型也是意大利2010~2013流行年度A亚型的优势基因型,其快速传播可能由G蛋白变异所致<sup>[17]</sup>。ON1基因型在避免当前宿主免疫方面具有优势<sup>[18]</sup>。研究ON1基因型的传播对于了解RSV遗传变异对其流行病学特征的影响非常重要<sup>[11]</sup>。国内多地也于2011~2012年度检出少量ON1基因型<sup>[7-9]</sup>,Cui等<sup>[18]</sup>报道ON1已快速取代其他基因型成为2012~2014年度北京地区的优势基因型。本研究于2011年12月在浙江南部地区首次检出1株ON1型RSV菌株,2013~2014年度检出数增至9株,并且是A亚型菌株唯一的基因型,表明ON1已成为本地区该流行年度的优势基因型,有必要进一步监测未来ON1基因型的流行趋势。

各地检出的RSV亚型株之间核苷酸及氨基酸的同源性有明显差异,其中北京分离株之间核苷酸的同源性在87.8%~100%之间,氨基酸同源性在77.9%~100%之间<sup>[19]</sup>,重庆A亚型分离株之间核苷酸序列和氨基酸序列的差异分别为13%~14.8%和20.5%~26.1%<sup>[18]</sup>。本研究显示2009~2014浙江南部地区RSV A亚型分离株之间核苷酸及氨基酸的同源性分别为80.7%~89.3%和74.4%~82.6%,分离株之间的遗传变异较大,表明2009~2014年度有多个不同的RSV A亚型基因型毒株在浙江南部地区共循环。

RSV A亚型G蛋白核苷酸的变异并同时存在氨基酸变异。NA4基因型的变异特点是N242I、P274Q和T293S的替代突变,WENZHOUA64属于NA4基因型,与原型株BJ/36578的同源性达99.3%,显示两者有非常近的亲缘关系<sup>[7]</sup>,这些变异可使其逃避宿主的免疫攻击,导致反复感染<sup>[20]</sup>。ON1基因型的变异特点则是G蛋白C末端23个重复氨基酸序列的插入,经过与ON1原型株(ON67-1210A、JN257693)及GenBank中的代表株比对,本研究中ON1基因型插入的重复氨基酸也存在替代突变,如WENZHOU67(L274P、L298P),WENZHOU62(E262K)和WENZHOU71(E271K)的突变,但其对应位点286、295却没有发生突变。ON1基因型的替代突变与欧洲学者的报道相似<sup>[16-17]</sup>。ON1基因型插入片段已经发生了核苷酸的替换,这些变异可能帮助病毒逃逸,可能是ON1基因型取代其他基因型成为优势基因型的原因,这一特征对提供人群免疫力的疫苗具有潜在影响,在确定疾病严重程度中的作用需要进一步研究<sup>[20]</sup>。另外, Kim等<sup>[17]</sup>报道了8株ON1基因型的框移突变,即G蛋白HVR2缺失1个核苷酸,从而导致比其他的ON1基因型多两个氨基酸残基,但本研究未发现上述突变。G蛋白HVR2的变异是RSV逃避宿主免疫的基础,也可能是亚型内新基因型流行的原因<sup>[7]</sup>。NA1基因型的变异特点是N糖基化位点突变,N237、N250糖基化位点消失<sup>[21]</sup>,但本研究检出10株存在N237糖基化位点的NA1基因型,与北京地区报道一致<sup>[7]</sup>。有学者认为G蛋白N-糖基化位点的变异最终使病毒的抗原性改变,是病毒进化的优势<sup>[16]</sup>,基于N-糖基化位点的阳性选择可能在驱动病毒多样性中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。

本研究针对浙江南部地区不同城市 RSV 分子流行病学研究,地域较为局限,且由于课题经费有限,外送基因型检测的样本量偏小,因此有必要进一步监测和测序 RSV 病毒株,以确定这些优势基因型是否仍在本地区流行,是否这些优势基因型会持续主导或随时间推移而逐年波动。

综上所述,RSV A 亚型为浙江南部地区 2010~2012 流行年度的主导亚型,存在多种优势基因型共循环。ON1 基因型已成为 2013~2014 流行年度的优势基因型。A 亚型变异显著,包括替代、插入和重复突变。

#### [参 考 文 献]

- [1] Vanover D, Smith DV, Blanchard EL, et al. RSV glycoprotein and genomic RNA dynamics reveal filament assembly prior to the plasma membrane[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 667.
- [2] Fuentes S, Coyle EM, Beeler J, et al. Antigenic fingerprinting following primary RSV infection in young children identifies novel antigenic sites and reveals unlinked evolution of human antibody repertoires to fusion and attachment glycoproteins[J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(4): e1005554.
- [3] 丁雅馨, 田润, 钱渊, 等. 人呼吸道合胞病毒快速抗原检测方法的床旁检测适用性探讨[J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(2): 139-143.
- [4] Noveroske DB, Warren JL, Pitzer VE, et al. Local variations in the timing of RSV epidemics[J]. *BMC Infect Dis*, 2016, 16(1): 674.
- [5] Pitzer VE, Viboud C, Alonso WJ, et al. Environmental drivers of the spatiotemporal dynamics of respiratory syncytial virus in the United States[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(1): e1004591.
- [6] Yoshihara K, Le MN, Okamoto M, et al. Association of RSV-A ON1 genotype with increased pediatric acute lower respiratory tract infection in Vietnam[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27856.
- [7] Cui G, Zhu R, Qian Y, et al. Genetic variation in attachment glycoprotein genes of human respiratory syncytial virus subgroups A and B in children in recent five consecutive years[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75020.
- [8] Liu J, Mu Y, Dong W, et al. Genetic variation of human respiratory syncytial virus among children with fever and respiratory symptoms in Shanghai, China, from 2009 to 2012[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 27: 131-136.
- [9] 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]. *J Med Virol*, 2015, 87(1): 1-9.
- [10] 吴春利, 陈洁润, 阳帆, 等. 2012~2013 年深圳市呼吸道合胞病毒流行规律及分子变异分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2014, 34(10): 737-741.
- [11] 董琳, 歹丽红, 樊节敏, 等. 浙南地区下呼吸道感染儿童呼吸道合胞病毒基因型流行病学特征及与病情的关系[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(7): 537-541.
- [12] 张拓慧, 邓洁, 钱渊, 等. 毛细支气管炎患儿呼吸道合胞病毒分子生物学及临床特征分析[J]. *中华儿科杂志*, 2017, 55(8): 586-592.
- [13] Ren L, Xia Q, Xiao Q, et al. The genetic variability of glycoproteins among respiratory syncytial virus subtype A in China between 2009 and 2013[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 27: 339-347.
- [14] Martinelli M, Frati ER, Zappa A, et al. Phylogeny and population dynamics of respiratory syncytial virus (RSV) A and B[J]. *Virus Res*, 2014, 189: 293-302.
- [15] Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32807.
- [16] Prifert C, Streng A, Krempel CD, et al. Novel respiratory syncytial virus A genotype, Germany, 2011-2012[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(6): 1029-1030.
- [17] Kim YJ, Kim DW, Lee WJ, et al. Rapid replacement of human respiratory syncytial virus A with the ON1 genotype having 72 nucleotide duplication in G gene[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 26: 103-112.
- [18] Cui G, Zhu R, Deng J, et al. Rapid replacement of prevailing genotype of human respiratory syncytial virus by genotype ON1 in Beijing, 2012-2014[J]. *Infect Genet Evol*, 2015, 33: 163-168.
- [19] Zhang ZY, Du LN, Chen X, et al. Genetic variability of respiratory syncytial viruses (RSV) prevalent in Southwestern China from 2006 to 2009: emergence of subgroup B and A RSV as dominant strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(4): 1201-1207.
- [20] Otieno JR, Kamau EM, Agoti CN, et al. Spread and evolution of respiratory syncytial virus A genotype ON1, Coastal Kenya, 2010-2015[J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(2): 264-271.
- [21] Palomo C, Cane PA, Melero JA. Evaluation of the antibody specificities of human convalescent-phase sera against the attachment (G) protein of human respiratory syncytial virus: influence of strain variation and carbohydrate side chains[J]. *J Med Virol*, 2000, 60(4): 468-474.
- [22] Do LA, Wilm A, Van Doorn HR, et al. Direct whole-genome deep-sequencing of human respiratory syncytial virus A and B from Vietnamese children identifies distinct patterns of inter- and intra-host evolution[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(12): 3470-3483.

( 本文编辑: 邓芳明 )