

河北省卢龙县 1999~2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究

吕红霞 方肇寅 谢华萍 唐景裕 胡海宽 郑丽舒 叶青
章青 ZHONG Wei-min Jiang XI

RSI A

【摘要】 目的 研究河北省卢龙县 5 岁以下婴幼儿杯状病毒腹泻的流行特点。方法 应用酶联免疫吸附试验(ELISA)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测人类杯状病毒(HuCVs)。部分阳性标本的 PCR 产物经克隆测序,结合参考毒株相应的核苷酸序列进行进化分析。利用住院腹泻患者粪便样本中 HuCVs 的检出率,估计 HuCVs 腹泻住院率。结果 HuCVs 检出率为 31.6%,住院患者 HuCVs 阳性率为 17.5%,主要分布在 3~17 月龄婴幼儿,发病主要集中在冬季。11 株测序病毒之间的核苷酸序列同源性为 55.1%~100%,均属于诺瓦克病毒(NLV)G II 遗传组。卢龙县 2000 年 HuCVs 流行株为 NLV G II-4 和 G II-7,2001 年为 NLV G II-3 和 G II-7。初步估计 HuCVs 腹泻患者住院率为 3.6%。结论 河北省卢龙县婴幼儿中存在不同基因型杯状病毒感染,以 NLV G II 组毒株为主,其疾病负担仅次于轮状病毒。

【关键词】 人类杯状病毒; 序列分析; 流行病学

Epidemiological study of human caliciviruses among children with acute diarrhea in Lulong county, 1999-2001 LV Hong-xia*, FANG Zhao-yin, XIE Hua-ping, TANG Jing-yu, HU Hai-kuan, ZHENG Li-shu, YE Qing, ZHANG Qing, ZHONG Wei-min, Jiang XI. *Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the epidemiological characteristics of human caliciviruses (HuCVs) among children under 5 years of age with acute diarrhea and to estimate the disease burden in Lulong county. **Methods** HuCVs were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Some PCR amplicons were cloned and sequenced. Phylogenetic tree was constructed for strain characterization. The rate of HuCVs-attributed hospitalization was estimated according to the positive rate of HuCVs detection in fecal specimens collected from hospitalized diarrhea patients. **Results** Between July 1999 and June 2001, 708 fecal specimens were collected, of which 393 rotavirus-negative and 5 rotavirus-positive specimens were detected for HuCVs. Thirty-one point six percentage of fecal specimens from patients with diarrhea was HuCVs positive. Among inpatients, HuCVs positive rate was 17.5%. HuCVs detection was mainly distributed in 3-17 month-old children, in winter. All 11 strains belonged to NLV G II in which 6 strains G II-3, 2 strains G II-4 and 3 strains G II-7, and they shared 55.1%-100% nucleotide identity. NLV G II-4 and G II-7 were identified in 2000, while NLV G II-3 and G II-7 in 2001. The preliminary estimate of HuCVs-attributed hospitalization rate was 3.6%. **Conclusion** Human caliciviruses with different genotypes circulated among children in Lulong county with G II NLVs were the prevalent strains. The disease burden of HuCVs was second to rotavirus.

【Key words】 Human calicivirus; Sequence analysis; Epidemiology

人类杯状病毒(human caliciviruses, HuCVs)是

引起儿童和成人非细菌性胃肠炎的主要病原之一,常在医院、餐馆、学校、托儿所、孤老院、军队、家庭及其他人群中引起爆发。此外,它也常在人群中引起急性胃肠炎的散发。HuCVs 的传播主要通过共同污染的食物或水源,也可通过人-人接触进行传播。HuCVs 是一群具有高度遗传多样性的单链 RNA 病毒,根据病毒聚合酶或衣壳蛋白编码区核苷酸和氨

基金项目:美国国立卫生研究所基金资助项目(RO3 TW01192);国家“863”课题资助项目(2001AA212171)

作者单位:100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(吕红霞、方肇寅、谢华萍、郑丽舒、章青);河北省卢龙县卫生防疫站(唐景裕、胡海宽);秦皇岛市卫生防疫站(叶青);Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA (ZHONG Wei-min, Jiang XI)

核酸序列同源性,可将其分为两个属:诺瓦克样病毒(NLVs)和扎幌样病毒(SLVs)。其中 NLVs 又可分为两个遗传组 G I 和 G II,每个遗传组还可进一步分为不同的群(cluster)^[1]。近年来,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法的建立和不断改进,大大提高了 HuCVs 检测的敏感性。通过对病毒基因组部分序列的测定和分析,不仅可以对 HuCVs 进行分型,而且可以进行分子流行病学调查。我们收集河北省卢龙县 1999~2001 年非菌性婴幼儿腹泻标本和相关的临床资料,进行杯状病毒腹泻流行病学研究。

对象与方法

1. 研究对象:为河北省卢龙县 1999 年 7 月至 2001 年 6 月 0~5 岁非菌性腹泻患儿,所采集的 708 份腹泻粪便标本经轮状病毒检测 315 份阳性,393 份轮状病毒阴性和 5 份轮状病毒阳性标本用于杯状病毒检测。粪便标本经 50 mmol/L Tris HCl 超声、离心后制备成 20% 的粪便悬液, -20℃ 保存备用。

2. 酶免疫法(EIA)检测 NLVs:本实验中采用的多价混合抗血清由纯化的杯状病毒表达重组病毒样颗粒(VLPs)作抗原免疫家兔和豚鼠制备,重组抗原包括 rNV(G I-1), rC59(G I-2), rI15(G I-3), rHV(G II-1), rMxV(G II-3), rGrV(G II-4)和 r387(G II-4),以及 r207(Amsterdam)和 rMOH(Hillingdom)。EIA 采用双抗体夹心法^[2,3]。

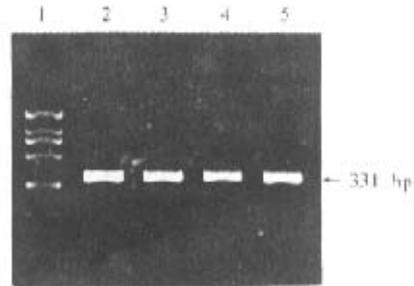
3. RT-PCR 检测 HuCVs:用 Trizol(GIBCO-BRL 公司)法从 150 μl 的 20% 粪便悬液上清中提取病毒 RNA,溶解于 20 μl 经 DEPC 处理过的水中。引物 289(H: 5'-TGACGATTTTCATCATCACCATA-3', I: 5'-TGACGATTTTCATCATCCCCGTA-3')和 290(H: 5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC-3', I: 5'-GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC-3', J: 5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC-3', K: 5'-GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC-3')用于逆转录和 PCR,方法参照文献[4,5]。NLVs 的 PCR 扩增产物为 319 bp 的 DNA 片段,SLVs 的 PCR 扩增产物大小为 331 bp。

4. DNA 序列测定和分析:PCR 产物采用 Promega 公司 Wizard PCR Preps DNA Purification System 试剂盒回收后克隆于 pGEM-T 载体,转化 DH-5a 宿主菌,通过蓝白斑筛选和双酶切鉴定,阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

测序采用 T7 通用引物,在 ABI PRISMTM 377DNA 测序仪上完成。应用 ClaustalX 和 DNASTar 进行核苷酸序列比对同源比较和种系进化分析,所用参考病毒株序列从 GeneBank 中收集。

结果

1. EIA 和 RT-PCR 检测结果:本实验采用的 398 份标本,分别经 EIA 和 RT-PCR 检测(RT-PCR 产物电泳结果见图 1),HuCVs 阳性标本共 127 份(31.9%),其中 EIA 检测阳性为 110 份(27.6%),RT-PCR 检测阳性为 28 份(7.0%),两者均为阳性的有 11 份,占阳性标本的 8.7%。在 127 份阳性标本中,96 份(75.6%)来自住院患者,31 份(25.4%)来自门诊患者。实验中有 5 份轮状病毒阳性标本 EIA 和 RT-PCR 检测 HuCVs 均为阴性。



1: DL 2 000 DNA Marker(2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); 2: 阳性对照; 3~5: 阳性标本 RT-PCR 产物

图1 398 份标本 HuCVs RT-PCR 产物电泳结果

2. 婴幼儿杯状病毒腹泻年龄分布:HuCVs 阳性标本从年龄分布看(表 1),以 12~17 月龄组为最多,其次为 6~8 月龄组,9~11 月龄组和 3~5 月龄组,3~17 月龄腹泻患儿占有所有阳性的 87.2%。HuCVs 腹泻年龄分布趋势两年监测结果差异无显著性($P > 0.05$)。

表1 卢龙县婴幼儿杯状病毒腹泻的年龄分布

年龄组 (月龄)	HuCVs 阳性患者例数		合计
	1999 年 7 月至 2000 年 6 月	2000 年 7 月至 2001 年 6 月	
1~	3(4.4)	1(2.0)	4(3.4)
3~	13(19.1)	6(12.2)	19(16.2)
6~	16(23.5)	14(28.6)	30(25.6)
9~	10(14.7)	11(22.4)	21(17.9)
12~	20(29.4)	12(24.5)	32(27.4)
18~	4(5.9)	2(4.1)	6(5.1)
24~	2(2.9)	3(6.1)	5(4.3)

注:括号内数据为阳性百分率(%)。

3. 婴幼儿杯状病毒腹泻季节分布:从表 2 可见,由杯状病毒所致的婴幼儿腹泻在全年都有发生,但有一个明显的发病高峰,从当年 12 月份开始逐步升高,到次年 1 月份为最高,持续至 2 月份。

表2 卢龙县婴幼儿杯状病毒腹泻的季节分布

月份	HuCVs 阳性患者例数		合计
	1999 年 7 月至 2000 年 6 月	2000 年 7 月至 2001 年 6 月	
7	3	2	5
8	0	1	1
9	1	2	3
10	1	3	4
11	0	0	0
12	10	8	18
1	34	17	51
2	7	7	14
3	4	4	8
4	3	5	8
5	4	0	4
6	5	6	11
合计	72	55	127

4. 测序结果及序列分析:选择 11 株 HuCVs 阳性标本进行 PCR 产物的克隆和测序。对去除引物后的 DNA 片段(274 nt)进行序列分析(图 2)。11 株 HuCVs 彼此核苷酸同源性为 55.1%~100%,均为 NLVs G II 组。

讨 论

1972 年,美国学者 Kapikian 用免疫电镜在腹泻

患者的粪便中发现 Norwalk 病毒原型株。由于此类病毒在感染患者的粪便样本中排毒量少,排毒时间短,病毒的抗原性和基因组核苷酸序列呈高度多样性,给此类病毒的检测带来了很大困难。本研究采用最新方法,以重组 NLVs 杆状病毒表达两个遗传组 9 个参考株衣壳蛋白组装的病毒样颗粒为基础设计的 ELISA 方法,大大地提高了 HuCVs 检测的灵敏度。同时应用 RT-PCR 方法,以 2 个负链引物进行逆转录,4 个正链引物进行 PCR 扩增,能检测更多样的毒株。

398 份标本中 HuCVs 检出率为 31.6%(这里尚未考虑与轮状病毒混合感染的 HuCVs 病例),收集的住院腹泻患儿 549 份标本中 HuCVs 检出率为 17.5%,表明 HuCVs 在此地区感染比较普遍,仅次于轮状病毒^[8],这与长春地区 HuCVs 腹泻流行情况相似^[9]。HuCVs 腹泻年龄分布以 <2 岁的儿童为主,与靖宇等^[10]1998 年对我国人群 NLVs 血清抗体调查结果相符。本研究两年监测表明,与轮状病毒相似, HuCVs 高发季节为冬季,此流行特征与 Anthony 等^[11]的研究结果一致。6 月份 HuCVs 阳性率较高(8.7%),可能与 2001 年 6 月卢龙县一起 HuCVs 引起的急性胃肠炎爆发有关。

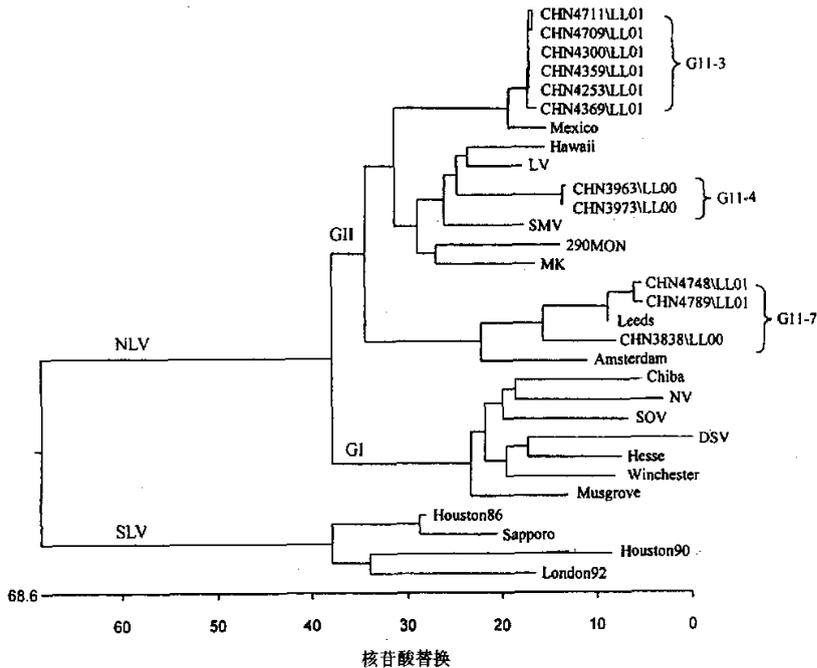


图2 卢龙县分离的 11 株 HuCVs 与 17 株 HuCVs 参考株 RDRP 基因区(nt 4 591~4 864)核苷酸序列种系进化树

采用住院腹泻患者粪便样本中 HuCVs 的检出率可计算出 HuCVs 腹泻住院数。1999 年 7 月到 2001 年 6 月, 卢龙县 < 5 岁儿童腹泻住院患者总数为 1 056 例, HuCVs 腹泻住院数则为 96 例, 根据卢龙县 < 5 岁儿童数 (25 812 人) 估计出 HuCVs 腹泻住院率为 3.6‰。由于卢龙县医院无门诊静脉输液病床, 所有因腹泻静脉补液的患儿, 可能住院 ≤ 24 h, 亦被计算为住院总数内, 因此 3.6‰ 的 HuCVs 腹泻住院率可能有些偏高。另外, 实验中只是检测轮状病毒阴性的标本, 可能全部 HuCVs 腹泻病例数会多些, 但从随机检测的 5 例轮状病毒阳性标本 HuCVs 全为阴性来看, 这对住院率的估计影响不大。为做出更精确的 HuCVs 疾病负担估计, 对卢龙县的腹泻病监测工作仍在继续进行。

目前, PCR 方法检测 HuCVs 的引物多为针对 RNA 聚合酶 (RDRP) 区设计的, 以其他区域如 2C 螺旋酶区、衣壳蛋白区和 ORF3 区设计引物建立的 RT-PCR 也有报道。除了极少数可能为重组的病毒株以外, 在根据 ORF1、ORF2、ORF3 区核苷酸序列所做的进化发育树中, 某一病毒株的位置一般是一致的^[12]。本实验采用的引物为针对 RDRP 区设计的, 可同时检测 NLVs 和 SLVs。本试验对部分阳性标本克隆测序的结果均为 NLVs, 但由于 SLVs 的产物大小在 2% 琼脂糖凝胶上难与 NLVs 相区别, 因此尚不能断定卢龙地区没有 SLVs 流行。本研究测序标本均为 NLVs G II 组, 与全球 NLVs 的流行趋势相符^[13-15], 但核苷酸序列差异较大, 分别属于不同的基因型。其中 6 株属于 NLVs G II-3, 相互之间核苷酸同源率为 98.5% 以上; 3 株属于 G II-7, 相互之间核苷酸序列有较大差异 (17.3%); 2 株为 G II-4, 核苷酸同源率为 99.6%。从时间看, 2000 年流行株为 G II-4 和 G II-7; 2001 年流行株主要为 G II-3 (6/8), 2 株为 G II-7, 但与 2000 年流行的 G II-7 毒株有些差异。卢龙县以 G II-3 为优势流行株, 这与我国 1996 年以来以 G II-4 优势株流行不同^[9, 16]。HuCVs 在我国各地的流行情况正在研究中。

参 考 文 献

1 Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the Caliciviruses. *J Infect Dis*, 2000, 180 (suppl 2): s323-s330.

- 2 Huang PW, Goudar R, Wilton N, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies by cross-immunizing mice with multiple recombinant capsid antigens from Norwalk-like viruses. Presented at 19th Annual Meeting of American Society for Virology. Fort Collins, Co, USA, abstracts, 2000. 112.
- 3 Jiang X, Wilton N, Zhong WM, et al. Diagnosis of human caliciviruses by using of enzyme immunoassays. *J Infect Dis*, 2000, 180 (suppl 2): s349-s359.
- 4 Jiang X, Wang J, Graham DY, et al. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 2529-2534.
- 5 Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al. Design and evaluation of a primer that detects both Norwalk and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Method*, 1999, 83: 145-154.
- 6 Jiang X, Graham DY, Wang K, et al. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, 1990, 250: 1580-1583.
- 7 吕红霞, 方肇寅. 分子生物学方法在人类杯状病毒诊断和分型中的应用. *国外医学病毒学分册*, 2002, 9: 36-40.
- 8 Fang ZY, Tang JY, Zheng LS, et al. Rotavirus diarrhea among children in Lulong county, Hebei, China: a surveillance in 1999-2001. *J Infect Dis* (in press).
- 9 谢华萍, 方肇寅, 王光, 等. 长春市儿童医院 1998~2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究. *病毒学报*, 2002, 18: 332-336.
- 10 靖宇, 钱渊, 王洛平. 北京地区人群诺瓦克样病毒血清抗体水平调查. *病毒学报*, 1998, 14: 322-328.
- 11 Anthony W, Mounts, Tamie Ando, et al. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*, 2000, 181 (suppl): s284-s287.
- 12 Vinjé J, Green J, Lewis DC, et al. Genetic polymorphism across regions of three open reading frames of NLVs. *Arch Virol*, 2000, 145: 223-241.
- 13 Goin P, Couillard M, d' Halewyn MA. Genetic diversity and molecular epidemiology of Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*, 2000, 182: 691-697.
- 14 Koopmans M, Vinje J, de Wit M, et al. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands. *J Infect Dis*, 2000, 181 (suppl): s262-s269.
- 15 Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, et al. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis*, 1999, 179: 1134-1144.
- 16 Fang ZY, Wang QH, Ushijima H, et al. Human calicivirus and astrovirus infection in association with acute diarrhea in China. Abstract book for 11th International Congress of Virology, Sydney, Australia, 1999. 199.

(收稿日期: 2002-11-20)

(本文编辑: 尹廉)