

· 实验研究 ·

广州市某医院儿童秋冬季腹泻诺瓦克样病毒感染
的分子流行病学研究

刘翼 戴迎春 姚英民 李建栋 詹惠春 陈清 俞守义 聂军

【摘要】 目的 了解广州市某医院 2003 年秋冬季儿童腹泻中诺瓦克样病毒(NLVs)感染的流行病学特点及病毒的基因型。方法 收集 2003 年 10 月至 2004 年 1 月临床诊断为病毒性腹泻而就诊的患儿粪便标本,采用引物 JV12Y/JV13I 进行逆转录-聚合酶链反应检测 NLVs,阳性标本的 PCR 产物经纯化、测序进行基因分析。结果 收集的 358 份标本中检测出 NLVs 42 份,阳性率 11.73%。3 岁以下的婴幼儿阳性 40 例,占 95.24%,其中 6 月龄~1 岁组与 1~2 岁组阳性率最高,分别占 38.10%、35.71%。年龄最小者只有 25 天龄。4 个月中,11 月阳性率最高为 17.27%,其次是 2004 年 1 月、2003 年 10、12 月,阳性率分别为 15.79%、8.11%、11.36%。抽取 11 份阳性标本进行测序分析,结果 5 份为 G II-3 群,5 份为 G II-4 群,1 份为 G II 型,但尚不确定所属群。随机抽取 20 份轮状病毒阳性标本检测 NLVs,未发现合并感染。结论 广州市某医院儿童腹泻的散发与 NLVs 感染有关,并且存在着不同的基因型,流行优势株为 G II-3 群与 G II-4 群的病毒株。

【关键词】 诺瓦克样病毒;腹泻;流行病学,分子

Molecular epidemiology of diarrhea among children with Norwalk-like virus in a hospital of Guangzhou in Autumn and Winter LIU Yi*, DAI Ying-chun, YAO Ying-min, LI Jian-dong, ZHAN Hui-chun, CHEN Qing, YU Shou-yi, NIE Jun. *Epidemiology Department of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: NIE Jun, Email: niejun@fimmu.com

【Abstract】 **Objective** To explore the epidemiological characteristics of Norwalk-like virus(NLVs) infection in children with diarrhea and to study the genotype and predominant cluster at a hospital in Guangzhou city. **Methods** Fecal specimens from 358 children with acute gastroenteritis from October 2003 to January 2004 and information about the cases were collected. NLVs was detected from the specimens by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the PCR products were purified and sequenced. **Results** Forty-two positive specimens were detected from the 358 fecal specimen with a positive rate of 11.73% (42/358). Of these, 40 specimens were obtained from infants younger than 3 years of age. The youngest infant infected with NLVs in this study was only 25 days. The positive rate in November (17.27%) was the highest. Eleven positive PCR products were selected and sequenced. Nucleotide sequence analysis revealed that 11 strains all belong to genogroup II (G II), and of these, 5 strains belonged to G II-3 cluster, with another 5 strains belonged to G II-4 cluster. However, one strain with its cluster could not be determined. **Conclusion** NLVs served as one of the important pathogens causing sporadic acute gastroenteritis among children at a hospital in Guangzhou. The predominant strains were identified as G II-3 and G II-4 cluster.

【Key words】 Norwalk-like virus; Diarrhea; Epidemiology, molecular

诺瓦克样病毒(Norwalk-like virus, NLVs)属人类杯状病毒,是引起成人和儿童非菌性急性胃肠炎爆发和散发的重要病原体,它所致的腹泻在世界多

个国家均有报道^[1]。近年来我国学者在北京、长春和广州等地区的研究证明我国儿童中也存在 NLVs 的感染^[2-4],我们于 2003 年 10 月至 2004 年 1 月在广州市南方医院儿科门诊开展腹泻病监测并进行了 NLVs 感染的研究。

作者单位:510515 广州,南方医科大学流行病学教研室(刘翼、戴迎春、李建栋、詹惠春、陈清、俞守义、聂军);广州南方医院儿科(姚英民)

通讯作者:聂军, Email:niejun@fimmu.com

对象与方法

1. 对象:2003 年 10 月至 2004 年 1 月在南方医

院儿科就诊的临床诊断为病毒性腹泻的患儿 358 例, 年龄 0~4 岁, 男 237 例、女 121 例。

2. 方法: 采集腹泻患儿粪便标本并利用自制的流行病学调查表收集有关信息。粪便标本筛检轮状病毒(RV), 阴性者用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 NLVs, 并进行序列分析。标本置 -20℃ 保存备用。

(1)RV 检测: 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(兰州生物制品研究所产品)检测 RV, 方法参照试剂盒说明书进行。

(2)病毒 RNA 提取^[5]: 取 1 g 粪便样品加 Hank's 液 10 ml(含庆大霉素 8000 U), 并彻底振荡使之悬浮, 4℃ 3000 r/min 离心 20 min, 取上清并保存在 -70℃ 冰箱中备用。提取病毒核酸用 Trizol (Gibco 方法)从 100 μl 粪便悬液中提取、纯化待检标本中的 RNA, RNA 保存于 -70℃。

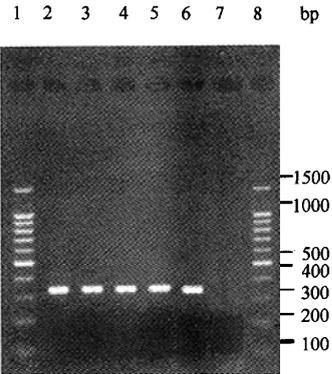
(3) RT-PCR 检测 NLVs: RT-PCR 采用 Koopmans 引物 JV12Y/JV13I^[6], 引物序列位于 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因区; 引物 JV12Y: 5'-ATACCACTATGATGCAGAYTA-3', 位于 4552~4572 bp; 引物 JV13I: 5'-TCATCATCACCATAGAAIGAG-3', 位于 4858~4878 bp。扩增 NLVs 基因相应片段得到 327 bp 的扩增产物。RT-PCR: 10× buffer 2.50 μl, dNTP (10 mmol/L each) 1.00 μl, RNAsin (40 U/μl) 0.15 μl, AMV (Promega 公司产品, 10 U/μl) 0.35 μl, JV13I (15 pmol/μl) 2.00 μl, H₂O 17.00 μl, 模板 RNA 2.00 μl, 42℃ 1 h。PCR 反应过程: 10× buffer 2.50 μl, Taq DNA 聚合酶(北京鼎国生物技术有限责任公司产品, 2 U/μl) 2.50 μl, JV12Y(15 pmol/μl) 1.00 μl, H₂O 19.00 μl, 加入第一管, 94℃ 3 min, 然后 94℃ 1 min, 37℃ 1.5 min, 74℃ 1 min, 40 个循环, 74℃ 7 min。PCR 产物采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 分子量标准采用大连宝生物 100 bp DNA Ladder Marker。阳性对照为 EP20020005 Musgrove, 由荷兰国立公共卫生和环境研究院 Erwin Duizer 博士惠赠。

(4) 测序与序列分析: PCR 产物由上海博亚公司纯化测序。用软件 DNASTAR 进行基因序列分析, BLASTN 进行基因库比较, CLUSTAL X 进行序列排队, 做进化树, 用 TREEVIEW 绘制进化树。基因序列来自 GenBank。

结 果

1. 粪便标本的收集及检测: 2003 年 10 月至

2004 年 1 月共收集到腹泻患儿粪便标本 358 份。检出 RV 189 份, 阳性率 52.79% (189/358)。用随机数字表采用简单随机抽取 RV 阳性标本 20 份经 RT-PCR 检测 NLVs, 未发现 RV 与 NLVs 合并感染。RV 阴性的标本, 经 RT-PCR 检出 NLVs 42 份, 阳性率为 11.73% (42/358)。检测 NLVs 阳性标本 PCR 产物电泳图见图 1。



1, 8: 100 bp DNA Marker; 2: 阳性对照; 3~6: 阳性标本; 7: 阴性对照

图1 NLVs 阳性标本 PCR 产物电泳图

2. NLVs 腹泻患儿的年龄、性别分布: 42 例 NLVs 阳性患儿年龄为 25 天龄~4 岁; 6 月龄~1 岁组与 1~2 岁组所占比例最大, 两者总共占 NLVs 阳性例数的 73.81% (31/42)。男性 NLVs 阳性例数为女性的 2 倍(29/13), 但在 358 例患儿中男性 237 例, 女性 121 例, 男性约是女性的 2 倍(表 1)。

表1 广州市 NLVs 腹泻患儿的年龄、性别分布

年龄	例 数		合计	构成比 (%)
	男	女		
≤6 月龄	4	1	5	11.90
6 月龄~	10	6	16	38.10
1~岁	11	4	15	35.71
2~岁	2	2	4	9.53
≥3 岁	2	0	2	4.76
合计	29	13	42	100.00

3. NLVs 腹泻患儿的月份分布: 在冬季的 4 个月中, NLVs 腹泻患儿例数在 2003 年 11 月阳性率最高, 为 17.27% (19/110), 其次是 2004 年 1 月、2003 年 10、12 月, NLVs 阳性率分别为 15.79% (3/19)、8.11% (15/185)、11.36% (5/44)。

4. NLVs 流行优势株及遗传进化树分析: 随机抽取 11 株检出的 NLVs 进行 PCR 产物的纯化和测序, 将测序结果在网上于 GenBank 进行 BLASTN 库

比较,证实 11 株 PCR 产物均为 NLVs。将引物序列去除后与参考株进行比较,并绘制了遗传进化树(图 2)。同源性比较(表 2)与进化树分析表明本研究检测的 CH03062、CH03100、CH03280、CH03296、CH03396 五株病毒与参考株 Camberwell virus (CAV) 同源性最高,属 G II -4 群(cluster)^[7]。而 CH03007、CH03009、CH03121、CH03278、CH03399 与参考株 Mexico virus(MXV)同源性最高,属 G II -3 群。CH03055 株核苷酸序列与参考株 Hawaii virus (HV)、Snow Mountain virus(SMV)、Melksham virus (MKV)、Lordsdale virus (LV) 同源性分别为 85.16%、83.71%、82.81%、83.26%,同源性均较低,可能属于新的群。基因序列来自 GenBank,编号为 CAV, AF145896; MXV, U22498; HV, U07611; SMV, L23831; MKV, X81879; LV, X86557; Bristol virus(BV), X76716; Norwalk virus(NV), M87661。

讨 论

NLVs 是世界范围急性非菌性胃肠炎的重要病原,临床症状以腹泻、呕吐、发热为主要表现,其中呕吐发生率较高。又因该病在冬季多有流行,所以曾被称为“冬季呕吐病”。调查结果表明,腹泻患儿粪便 NLVs 阳性率为 11.73%,是重要的致泻病原体。在芬兰曾对 2~24 月龄儿童进行了 2 年的前瞻性队列研究^[8],检测腹泻患儿粪便标本中 NLVs 阳性率为 20.2%,其中约一半患儿到医院就诊。本次研究是在三级甲等医院收集的腹泻患儿的粪便标本,可能低于社区人群中的 NLVs 感染性腹泻发病率。研究的 4 个月中以 11 月份发病率最高(17.27%),其他 3 个月也均有较高的发病率。与我国长春地区的研究结果稍有不同^[3],以 12 月份发病率最高,其次为 1、2 及 11 月份,而 10 月份发病率很低,这种差异提示我国南方地区发病高峰期可能早于北方地区。本资料研究时间较短,要明确广州地区全年发病情况还需扩大时间范围及进行社区人群的研究。

NLVs 可导致成人与儿童腹泻病的发生,但初次发病的年龄很小(本研究中患儿最小为 25 天龄)。我国北京、太原市的血清学研究资料表明^[9,10],3 岁时 NLVs 血清抗体水平就已达到 80%~90%,前期研究显示,在 3 岁以前的婴幼儿血清中也存在较高的 NLVs 抗体水平(63.9%)^[4],所以 NLVs 感染在婴幼儿期应相当普遍。本次研究中 NLVs 感染患儿主要分布于 2 岁以下,占检测阳性数的 85.71% (36/42),其中又以 6~12 月龄、1~2 岁两组阳性率最高,共占 73.81% (31/42),与我国其他地区研究结果相似。NLVs 阳性患儿性别分布存在着明显差异,男性约是女性的 2 倍(29/13),这种差异的原因是由于总体腹泻患儿性别比例的差异所导致,存在着性别差异的原因还有待进一步探索。

国外有关研究资料表明,有 RV 与 NLVs 合并感染的情况很少见,但我国 NLVs 感染情况是否如此则没有相关的研究结果。我们随机抽取了 20 份 RV 检测阳性标本检测 NLVs,未发现合并感染者。

经测序鉴定的 11 株 NLVs 中,有 5 株属 G II -3 群,5 株属于 G II -4 群,1 株尚不能确定所属群,说明广州地区的流行株有 G II -3 群和 G II -4 群两个群的 NLV 株。G II -4 群病毒株是我国北方的流行株^[3],也是全球 NLVs 流行的优势株,本研究证实 G II -4 群 NLVs 株也是我国南方的流行优势株。与北京、长

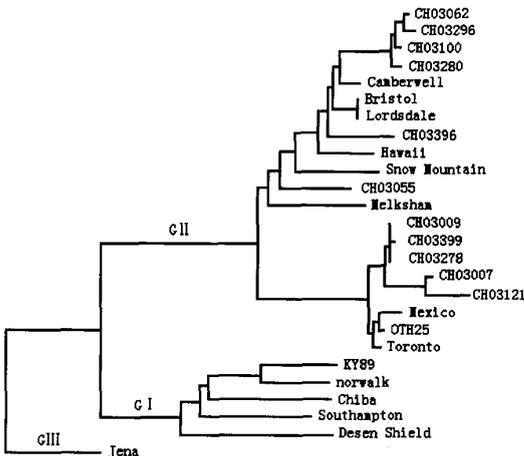


图2 NLVs RNA 依赖的 RNA 聚合酶区部分核苷酸序列(HV nt4329~4549)遗传进化树

表2 10 株 NLVs 与所选的 NLVs RNA 依赖的 RNA 多聚酶区部分核苷酸序列同源性(%)

毒株	CAV	BV	LV	HV	NV
CH03062	90.95	89.14	89.14	85.52	58.33
CH03100	91.40	89.59	89.59	85.97	59.28
CH03280	91.40	89.59	89.59	85.97	57.92
CH03296	90.95	89.14	89.14	85.52	58.27
CH03396	90.05	90.05	90.05	85.97	55.20
毒株	MXV	MKV	HV	NV	
CH03007	94.12	78.73	75.11	61.09	
CH03009	94.12	78.73	75.11	61.09	
CH03121	94.12	78.73	75.11	61.09	
CH03278	94.12	78.73	75.11	61.09	
CH03399	93.67	78.28	75.57	61.54	

春地区的研究资料不同的是, GII-3 群病毒株也是我国南方的流行优势株, 而长春测序的 17 株中仅 1 株属 GII-3 群^[3], 表明我国不同的地区存在着不同的流行优势株。在测序的 11 株 NLVs 中无 GI 型, 可能 GI 型 NLVs 在本地的流行居次要位置。

采用 JV12Y/JV13I 引物进行 RT-PCR 检测 NLVs, 阳性率为 11.73% (42/358), 该结果明显低于国内其他研究结果, 差别较大。其原因除研究时间、地点不同和标本多来自门诊患者外, 可能与下列因素有关。如采用了两种检测方法(但符合率不足 15%)^[3]、阳性结果没有进行序列测定^[11]、显色检测判定结果没有采用盲法等^[2], 上述原因均可造成假阳性结果。研究中对阳性标本随机抽取了 11 份进行测序分析, 测得序列进行 BLASTN 于 GenBank 库比较, 结果全为 NLVs, 证实了检测结果的可靠性。

上述研究结果表明, NLVs 是引起广州地区某医院儿童秋冬季腹泻的重要病原体, 其所造成的危害应当引起重视并开展正规和广泛协作的流行病学研究, 以全面、系统的了解我国人群中 NLVs 感染情况的规律和特点, 为控制 NLVs 感染提供理论依据。此外, 研究证实 NLVs 感染病例中 2 岁以内患儿占 80% 以上, 患儿不伴有或与 RV 共同感染, GII-3 群与 GII-4 群 NLVs 株同为本研究季节的流行优势株。

参 考 文 献

1 Rebecca L, Fandhauser SS, Monroe JS, et al. Epidemiologic and

molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, 2002, 186: 1-7.

2 陈东梅, 张又, 钱渊, 等. 北京地区婴幼儿人类杯状病毒感染状况及型别分析. *中华儿科杂志*, 2002, 40: 398-401.

3 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.

4 戴迎春, 聂军, 刘翼, 等. 广州地区人类杯状病毒感染的初步研究. *第一军医大学学报*, 2004, 24: 296-299.

5 Levett NP, Gu M, Luan B, et al. Longitudinal study of molecular epidemiology of small round structured viruses in a pediatric population. *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 1497-1501.

6 Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol*, 2002, 25: 233-235.

7 Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis*, 2000, 181 suppl 2: s336-s348.

8 Pang XL, Honma S, Nakata S, et al. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis*, 2000, 181 suppl 2: s288-s294.

9 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.

10 靖宇, 钱渊, 王洛平, 等. 太原部分人群诺瓦克病毒血清抗体水平的调查. *中华儿科杂志*, 1999, 37: 559-561.

11 陈军林, 王滔, 高建民, 等. 福州地区腹泻患者诺瓦克样病毒感染的分子流行病学特点. *中国人兽共患病杂志*, 2003, 19: 83-85.

(收稿日期: 2004-07-19)

(本文编辑: 尹廉)

· 书 讯 ·

《临床医院感染学》(修订版)征订启事

为迎接“医院管理年”和准备医院分级评审, 由卫生部殷大奎、于宗河、王羽等领导主审, 全国医院感染监控管理培训基地、中南大学湘雅医院徐秀华教授主编的《临床医院感染学》修订版(1998年初版)将于 2005 年 7 月正式出版发行。该书包括理论与实践两部分, 内容除医院感染的基础知识及进展外, 还体现了临床各科感染性疾病的新进展; 并根据国内外医院感染控制指南更新了感染控制的指导方案, 如呼吸机相关感染、抗菌药物临床应用指导原则, 以及相关检验方面内容。本书由湖南科学技术出版社出版发行, 全书 180 万字, 售价 148 元/本, 加寄 15% 邮费, 合计 170 元/本(订购 2 本以上者, 邮费酌减为 10%)。

联系地址与联系人: 湖南省长沙市中南大学湘雅医院医院感染控制中心, 邮编: 410008, 联系人: 龚瑞娥、王曼平、吕一欣, 电话: 0731-4327429, 传真: 0731-4327237。