

杭州地区2009—2010年急性腹泻患者中杯状病毒的检测和分型

诸葛小玲 崔大伟 吴英萍 郑书发 靳森 段招军 余斐 许世佳 陈凌晓 陈瑜

【摘要】 目的 了解2009—2010年杭州地区急性腹泻患者中杯状病毒基因型别和分子流行病学特征。方法 收集2009—2010年杭州地区920例急性腹泻患者的粪便标本和流行病学资料,用多重PCR方法进行杯状病毒检测,测定部分标本的阳性扩增片段基因序列,并对序列进行系统进化分析。结果 急性腹泻患者杯状病毒检出率为21.8%(201/920),其中诺如病毒(NV)G I型25例、G II型170例、札如病毒(SAV)11例,4例为NV I型和II型混合感染、1例为NV II型和SAV混合感染。NV基因型别包括:G I-1(3株)、G I-2(1株)、G II-4/2006b变异株(7株)、G II-2(1株)、G II-7(1株)和G II-4/2008变异株(2株);SAV基因型别包括:G I-2(5株)、G I-1(4株)和G II-1(1株)。杯状病毒的流行在不同季节、年龄组人群均有发病。结论 杯状病毒是2009—2010年引起杭州地区急性腹泻的主要病原之一,其病原具有病毒多样性和基因型别多样性,NV G II-4/2006b变异株或类似株可能是2009—2010年杭州地区流行的优势株。

【关键词】 杯状病毒; 诺如病毒; 札如病毒; 基因型别

Detection and typing of caliciviruses from patients with acute diarrhea in Hangzhou area, 2009–2010 ZHUGE Xiao-ling¹, CUI Da-wei¹, WU Ying-ping², ZHENG Shu-fa¹, JIN Miao³, DUAN Zhao-jun³, YU Fei¹, XU Shi-jia⁴, CHEN Ling-xiao¹, CHEN Yu¹. 1 Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Yiwu Hospital, College of Medicine, Zhejiang University; 3 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 4 Department of Clinical Laboratory, Pinghu First People's Hospital
Corresponding author: CHEN Yu, Email: chen_yu_zy@163.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Key Projects for the "Eleven Five-Year Plan" of China (No. 2009ZX10004-210).

【Abstract】 **Objective** To investigate the molecular-epidemiologic characteristics and genotypes of human calicivirus (HuCVs) in acute diarrhea patients in Hangzhou from 2009 to 2010. **Methods** Epidemiologic data and fecal specimens were collected from patients with acute diarrhea. HuCVs of 920 specimens were detected by PCR. PCR products of several positive samples were randomly selected and sequenced. All the sequences were analyzed, phylogenetically. **Results** 201 HuCVs positive cases were identified from 920 fecal specimens (21.8%). 25 isolates would include norovirus G I-type, G II-type for 170 strains and sapovirus for 11 strains. Norovirus G I-type and G II-type were detected in four specimens at the same time. Other specimens were mixed infection with norovirus G II-type and sapovirus. Genotypes of HuCVs showed that norovirus G I subtypes were G I-1 (3 strains) and G I-2 (1 strain). Norovirus G II subtypes were G II-4/2006b variant strains (7 strains), GII-2 (1 strain), G II-7 (1 strain) and G II-4/2008 variant strains (2 strains); Sapovirus subtypes were G I-2 (5 strains), G I-1 (4 strains) and G II-1 (1 strain). The prevalence rates of HuCVs were different in seasons and age groups. **Conclusion** HuCVs were one of the major pathogens causing acute diarrhea. Both multiple viruses and genotypes of HuCVs were found in the specimens. G II-4/2006b variant and similar strains were identified, probably as the prevalent strains from 2009 to 2010 in Hangzhou, Zhejiang province.

【Key words】 Human caliciviruses; Norovirus; Sapovirus; Genotype

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.016

基金项目: 国家“十一五”科技重大专项(2009ZX10004-210)

作者单位: 310003 杭州, 浙江大学医学院附属第一医院检验科(诸葛小玲、崔大伟、郑书发、余斐、陈凌晓、陈瑜); 浙江大学医学院附属义乌医院检验科(吴英萍); 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(靳森、段招军); 浙江省平湖市第一人民医院检验科(许世佳)

诸葛小玲、崔大伟同为第一作者

通信作者: 陈瑜, Email: chen_yu_zy@163.com

人类杯状病毒(HuCVs)包括诺如病毒(NV)和札如病毒(SAV),是引起儿童和成年人急性病毒性腹泻的主要病原之一^[1,2]。为了解杭州地区病毒性腹泻中HuCVs的分子流行病学特点,本研究收集杭州地区急性腹泻患者的粪便标本和相关临床资料进行HuCVs分子流行病学研究。

材料与方法

1. 标本收集:收集2009年7月至2010年8月浙江大学医学院附属第一医院、附属儿童医院和杭州市彭埠镇社区卫生服务中心门诊920例急性腹泻就诊患者的粪便标本,随机采样,采样例数不超过10例/天。采样标准:急性起病,每日排便≥3次,且粪便伴有水样、黏液样和脓血样等性状改变,优先采集就诊前未使用过抗生素的病例标本。标本于-80℃保存备用。

2. 病毒核酸提取:采用PBS溶液将粪便标本制备成10%的悬液,离心后取200 μl上清,采用台湾Geneaid公司的Viral nucleic acid extraction kit II抽提病毒核酸,按试剂盒说明书操作,收集终体积为50 μl的核酸提取液备用。

3. 多重PCR检测:

(1)反转录:采用日本TOYOBO公司的FSK-100反转录试剂盒,按试剂盒说明书操作。反应条件:42℃反转录20 min,99℃灭活反转录酶5 min,迅速放入冰内备用。

(2)多重PCR检测:以上述反转录产物作为模板对NV、SAV进行多重PCR检测。引物参照文献[3],采用日本TaKaRa公司的ExTaq DNA聚合酶。扩增条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃终延伸7 min,4℃终止反应。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,紫外灯下观察结果,根据DNA Marker确定目的条带大小。

4. 克隆、测序和序列分析:PCR产物采用德国Qiagen公司凝胶回收试剂盒回收,纯化产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果应用DNAMAN 5.1软件进行多重比对,利用MEGA 4.0软件绘制进化树。参考毒株序列来源于GenBank。

5. 统计学方法:采用SPSS 13.0软件分别对年龄、季节和HuCVs等资料进行χ²检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

结果

1. HuCVs检测:920例患者粪便标本HuCVs阳

性率为21.8%(201/920),其中,NV-G I、NV-G II和SAV阳性率分别为2.7%(25/920)、18.5%(170/920)、1.2%(11/920),见表1。4例为NV-G I和NV-G II混合感染,1例为NV-G II和SAV混合感染。

表1 2009—2010年杭州地区920份腹泻患者粪便标本HuCVs检测结果

采样时间 (年-月)	标本 例数	阳性标本数			HuCVs 阳性率(%)	
		NV-G I	NV-G II	SAV		
2009-07	79	2	9	1	12	15.2
08	61	0	9	0	9	14.8
09	49	0	7	0	7	14.3
10	53	2	10	1	13	24.5
11	62	3	13	2	18	29.0
12	55	2	14	2	18	32.7
2010-01	47	3	15	1	16*	34.0
02	45	4	11	2	15*	33.3
03	92	2	20	1	23	25.0
04	88	3	17	1	21	23.9
05	75	2	14	0	16	21.3
06	65	1	11	0	12	18.5
07	72	1	9	0	10	13.9
08	77	0	11	0	11	14.3
合计	920	25	170	11	201	21.8

注:*其中3例为NV-G I和NV-G II混合感染;*其中1例为NV-G II和SAV混合感染,1例为NV-G I和NV-G II混合感染

2. 流行病学特征:①年龄分布:201例HuCVs阳性患者中,<5岁、5~18岁和>18岁组的阳性率分别为19.2%(105/546)、20.7%(17/82)和27.1%(79/292);不同的年龄组中,均为NV-G II阳性率较高,分别为18.1%(99/546,<5岁)、15.9%(13/82,5~18岁)和19.9%(58/292,>18岁)(表2)。②季节分布:HuCVs所致腹泻全年均有发生,但有1个明显的季节高峰,以11月至次年2月为高发季节,高峰期阳性率平均达32.0%。

表2 2009—2010年杭州地区920份腹泻患者标本感染HuCVs的年龄分布

年龄 (岁)	标本 例数	阳性标本数			HuCVs 阳性率(%)	
		NV-G I	NV-G II	SAV		
<5	546	7	99	3	105*	19.2
5~18	82	2	13	2	17	20.7
>18	292	16	58	6	79*	27.1
合计	920	25	170	11	201	21.8

注:同表1

3. 系统进化分析:随机选择4株NV-G I、11株NV-G II和10株SAV阳性标本进行测序及系统进化分析。

(1)NV-G I衣壳蛋白N/S区进化分析:4株NV-G I中,3株属于G I-1型、1株属于G I-2型。3株G I-1型与Norwalk病毒原型株(GenBank号为

M87661)核苷酸同源性的 91.1%~92.5%, 3 株 G I -1 型之间同源性的 99.2%~100.0%。1 株 G I -2 型与该型代表株 Southampton 同源性的 97.3%(图 1)。

(2)NV- G II 衣壳蛋白 N/S 区进化分析: 11 株 NV-G II 系统进化分析结果显示, 1 株属于 G II -2 型, 1 株属于 G II -7 型, 其他 9 株均属于 G II -4 型。1 株 G II -2 型与该型参考株 Snowmountain 株 (GenBank 号为 U70059) 同源性的 93.9%; 1 株 G II -7 型与该型参考株 Leeds 株 (GenBank 号为 AJ277608) 同源性的 97.9%; 9 株 G II -4 型进一步与该型不同变异株划分群, 其中 7 株与 G II -4/2006b 变异株划为一群, 与 2006b 变异株参考株 Kobe 株 (GenBank 号为 AB291542) 同源性的 96.1%~99.6%, 另外 2 株与 G II -4/2008 变异株划为一群, 与 2008 变异株参考株

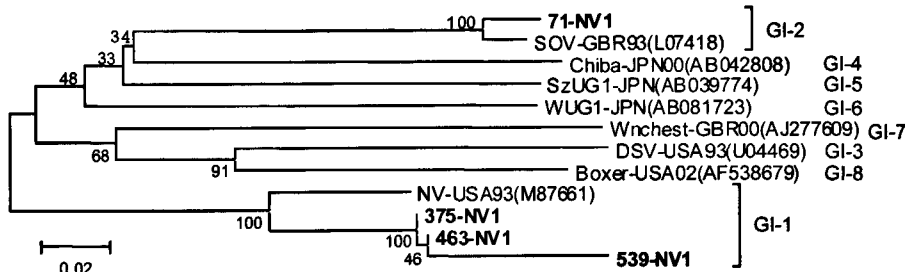
NSW001P 株 (GenBank 号为 GQ845367) 同源性的 98.9%~99.3%(图 2)。

(3)SAV 衣壳蛋白 N/S 区进化分析: 10 株 SAV 系统进化分析结果显示, 4 株属于 G I -1 型, 5 株属于 G I -2 型, 1 株属于 G II -1 型。4 株 SAV-G I -1 与该型参考株 Sapporo82 株 (GenBank 号为 U65427) 同源性的 97.1%~97.4%; 5 株 SAV-G I -2 与该型参考株 Parkville 株 (GenBank 号为 U73124) 同源性的 96.4%~97.4%; 1 株 SAV-G II -1 与该型参考株 London 株 (GenBank 号为 U95645) 同源性的 96.4%(图 3)。

讨 论

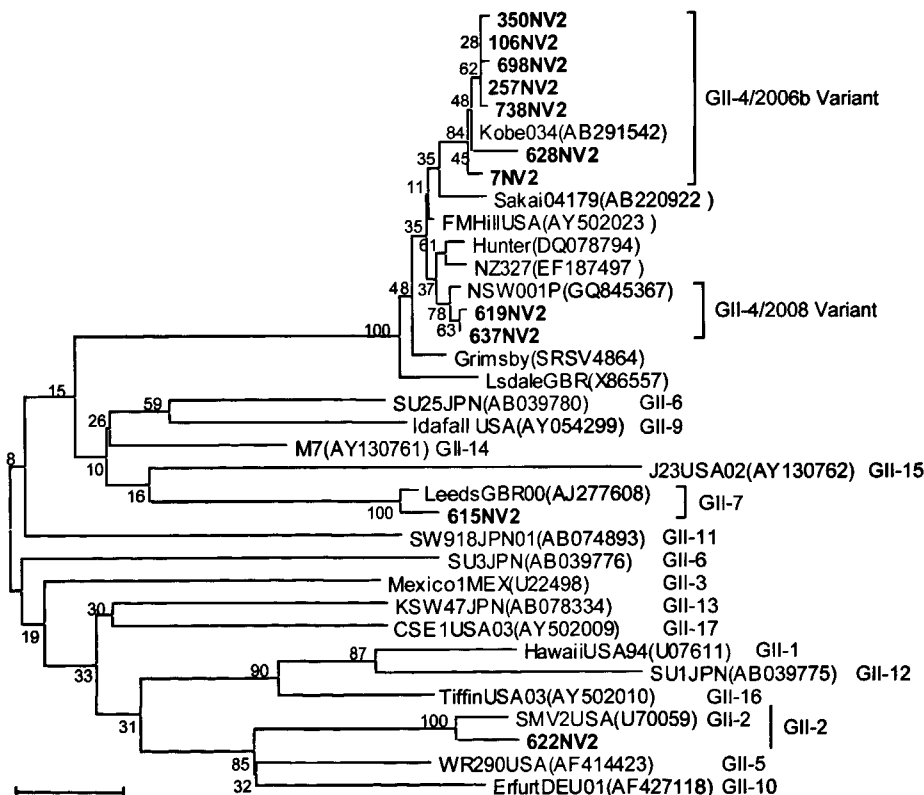
本研究结果显示, 急性腹泻患者 HuCVs 感染率以成年人较高 ($P=0.045$), 婴幼儿和青少年相近; 全年均有 HuCVs 感染, 但以冬春季节 (11-2 月) 感染较多 ($P=0.001$), 与我国其他地区报道基本一致^[4-6]。本研究中 NV 检出率相对较高 ($P<0.001$), 可能与医院数量较少有关 (仅有 3 家), 导致数据分析存在一定的偏差。

在过去的几十年中, NV 引起全球胃肠炎暴发和流行与新的 G II -4 变异株出现有关。95/96US 变异株先后在德国、日本等引起流行^[7,8]。欧洲和全球食源性病毒监测网 2009-2010 年监测信息显示, 欧洲 NV 的暴发主要由新的 2010 变异株、2006b 变异株和 2008 变异株引起。G II -4/2006b 变异株也是引起我国 5 岁以下儿童和成年人 NV 散发病例的主要病原之一^[3,9]。本研究结果表明, 杭州地区 NV 以 G II 为主, G I 次之。通过系统进化分析表明, NV 呈基因多样性, 包括 G I -1、G I -2、G II -2、G II -7 和 G II -4。其中



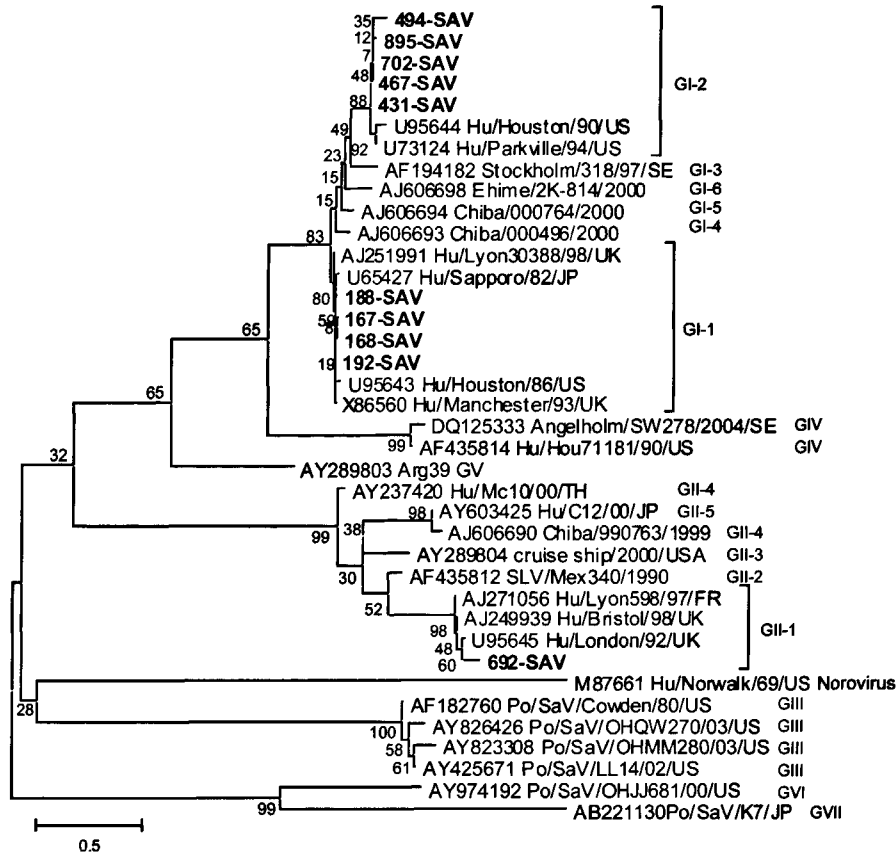
注: 黑体为本研究分离株

图 1 2009-2010 年杭州地区 NV- G I 衣壳蛋白 N/S 区系统进化树



注: 同图 1

图 2 2009-2010 年杭州地区 NV- G II 衣壳蛋白 N/S 区系统进化树



注: 同图 1

图 3 2009—2010 年杭州地区 SAV 衣壳蛋白 N/S 区系统进化树

G II-4 是最主要的基因型别, 特别是 G II-4/2006b 变异株或类似株可能是 2009—2010 年本地区散发流行的优势株, 与国内外研究结果基本一致^[3-8]。此外还发现国内少见的 2 株(619-NV II 和 637-NV II) G II-4/2008 变异株, 该变异株曾于 2008 年在南非引起胃肠炎的暴发和流行^[10]。HuCVs 基因的累积突变或重组导致衣壳蛋白序列差异可能是逃避机体免疫反应和引起新流行株的重要原因^[11]。

SAV 检出率虽然低于 NV, 但已有研究显示它已呈全球性分布, 常引起胃肠炎暴发和流行, 已成为腹泻散发病例的重要病原之一^[12-14]。本研究检测到的 SAV 基因型别包括 G I-1(4 株)、G I-2(5 株) 和 G II-1(1 株)。这些基因型为常见的基因型别。

本研究结果表明, 杭州地区的 HuCVs 感染既有 NV 又有 SAV, 其中 NV-G II-4/2006b 变异株或类似株是流行优势株, 但是 G II-4/2008 变异株也需要密切关注。由 HuCVs 引起的急性腹泻患者中 NV 和 SAV 均具有基因型别多样性, 这种特点可能增加感染概率和波及范围。

参 考 文 献

[1] Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the

caliciviruses. *J Infect Dis*, 2000, 181 Suppl 2: S322-330.

[2] Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, et al. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, 1998, 178 (6): 1571-1578.

[3] Jin M, Xie HP, Duan ZJ, et al. Emergence of the G II-4/2006b variant and recombinant noroviruses in China. *J Med Virol*, 2008, 80 (11): 1997-2004.

[4] Liu LJ, Liu W, Liu YX, et al. Identification of norovirus as the top enteric viruses detected in adult cases with acute gastroenteritis. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82 (4): 717-722.

[5] Jin M, Sun JL, Chang ZR, et al. Outbreaks of noroviral gastroenteritis and their molecular characteristics in China, 2006-2007. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31 (5): 549-553. (in Chinese)

靳森, 孙军玲, 常昭瑞, 等. 中国 2006—2007 年诺如病毒胃肠炎暴发及其病原学特征分析. *中华流行病学杂志*, 2010, 31 (5): 549-553.

[6] Gong LM, Ge Q, Lu YY, et al. Molecular epidemiology of norovirus in outbreaks of gastroenteritis in Zhejiang from 2006 to 2007. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30 (2): 147-150. (in Chinese)

龚黎明, 葛琼, 卢亦愚, 等. 浙江省 2006—2007 年暴发性胃肠炎中诺如病毒的分子流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 2009, 30 (2): 147-150.

[7] Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus G II-4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis*, 2009, 200 (5): 802-812.

[8] Lecarpentier T, Benezit A, Marostica A, et al. Epidemics of gastroenteritis caused by norovirus in Parisian children. *Arch Pediatr*, 2010, 17 (11): 1522-1526.

[9] Gao Y, Jin M, Cong X, et al. Clinical and molecular epidemiologic analyses of norovirus-associated sporadic gastroenteritis in adults from Beijing, China. *J Med Virol*, 2011, 83 (6): 1078-1085.

[10] Mans J, de Villiers JC, du Plessis NM, et al. Emerging norovirus G II-4 2008 variant detected in hospitalised paediatric patients in South Africa. *J Clin Virol*, 2010, 49 (4): 258-264.

[11] Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, et al. Mechanisms of G II-4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*, 2008, 5 (2): 269-289.

[12] Jin M, Yu JM, Li HY, et al. Genetic diversity of porcine sapoviruses from Lutong county in China. *Chin J Virol*, 2010, 26 (3): 255-259. (in Chinese)

靳森, 虞结梅, 李慧莹, 等. 中国河北省卢龙地区猪札如病毒的基因多样性. *病毒学报*, 2010, 26 (3): 255-259.

[13] Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, et al. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol*, 2010, 54 (8): 483-486.

[14] Chan-it W, Thongprachum A, Okitsu S, et al. Epidemiology and molecular characterization of sapovirus and astrovirus in Japan, 2008-2009. *J Infect Dis*, 2010, 63 (4): 302-303.

(收稿日期: 2011-03-31)

(本文编辑: 万玉立)