

· 现场调查 ·

中国七个地区 1998 - 2005 年急性腹泻住院患儿中星状病毒感染研究

方肇寅 孙亚萍 叶新华 王慧 章青 段招军

Xi Jiang Duncan Steele Roger Glass

【摘要】 目的 研究中国 5 岁以下腹泻住院患儿中星状病毒感染的流行病学特点, 确定流行毒株血清型。方法 选择国内 7 个地区收集 5 岁以下腹泻住院患儿粪便标本, 应用酶联免疫或 PCR 方法检测星状病毒, 对星状病毒阳性标本应用 RT-PCR 方法分型并经测序确证。结果 1998 - 2005 年在 7 个地区的调查点共收集 1668 份急性腹泻粪便标本, 检测出星状病毒阳性标本 91 份, 平均检出率为 5.5%; 病例全年均有发生, 发病高峰主要集中在 10 月份到次年 1 月份; 95% 患儿年龄在 2 岁以下, 其中以 9~11 月龄儿童发病最多, 检出率为 7.4%, 12~17 月龄、6~8 月龄、0~6 月龄儿童的检出率依次为 6.1%、5.6%、5.6%。确定型别的 49 份标本中 45 份为 HAstV-1 型, 1 例为 HAstV-3 型, 2 例为 HAstV-5 型, 1 例为 HAstV-8 型。结论 星状病毒是中国婴幼儿病毒性腹泻的重要病原之一, 流行毒株以 1 型为主, 同时存在多个型别的散在流行。

【关键词】 星状病毒; 巢式逆转录聚合酶链反应; 流行病学

Astrovirus infection among hospitalized children with acute diarrhea in seven regions of China, 1998 - 2005 FANG Zhao-yin*, SUN Ya-ping, YE Xin-hua, WANG Hui, ZHANG Qing, DUAN Zhao-jun, XI Jiang, Duncan Steele, Roger Glass. *National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

【Abstract】 Objective To study the epidemiology and strain variations of astrovirus infection among children under 5 years of age, hospitalized for acute diarrhea in China. **Methods** Inpatients under 5 years of age with acute diarrhea in hospitals of seven provinces between 1998 and 2005 were enrolled in the study. Stool specimens were collected and tested for astrovirus using the Dako Amplified IDEIA™ Astrovirus kits or reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Genetic identities of the strains were determined using RT-PCR with serotype-specific primers and confirmed by sequencing of the RT-PCR products. **Results** A total of 1668 diarrheal stool samples tested for both rotavirus and calicivirus negative were examined. The detection rate of astrovirus infection was 5.5% (91/1668) and the diarrhea cases caused by astrovirus infection could be found in any season of the year but mainly occurred in cold season from October to next January. Astrovirus detection rates were: 7.4% among infants aged 9-11 months followed by 6.1% in 12-17 month-olds, and 6-8 months 5.6% & 0-2 months 5.6% before 8 months. Over 95% of astrovirus infections occurred in children before 2 years of age. Among 49 strains typed, serotype 1(45/91) was most commonly seen while serotype 5 was in two cases and serotype 3 and 8 were detected in only one case respectively. **Conclusion** Astrovirus seemed an important etiologic agent in young children with acute diarrhea in China and Serotype 1 was the most prevalent one.

【Key words】 Astrovirus; Reverse-transcription nested-polymerase chain reaction; Epidemiology

人星状病毒 (HAstV) 是由 Appleton 和 Higgins

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270069); 世界卫生组织基金资助项目 (V27/181/123); 美国适宜卫生科技组织基金资助项目 (GAV. 1142-01-07228-LPS)

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 (方肇寅、孙亚萍、叶新华、王慧、章青、段招军); Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, USA (Xi Jiang); World Health Organization, Switzerland (Duncan Steele); Respiratory and Enteric Virus Branch, CDC, Atlanta, USA (Roger Glass)

于 1975 年通过电镜检测儿童病毒性腹泻粪便标本时首次发现^[1]。目前已证实 HAstV 是导致婴幼儿、老年人、免疫缺陷患者腹泻的重要病原之一^[2]。HAstV 为单股正链 RNA 病毒, 含有三个开放读码框 (ORFs), 其中 ORF1a 和 ORF1b 分别编码丝氨酸蛋白酶和 RNA 聚合酶, ORF2 编码结构蛋白^[3]。通过对 ORF2 的序列分析, 目前可将 HAstV 分为 8 个血清型 (HAstV 1~8)^[4]。HAstV 早期流行病学研

究大多以电镜和酶联免疫技术为基础,近几年随着 RT-PCR 技术的日益应用,HAstV 引起的腹泻病例检出率明显提高。目前认为 HAstV 是继轮状病毒之后儿童病毒性胃肠炎的第二位病因^[5-7]。我国目前还缺少较全面的 HAstV 流行病学资料,为掌握 HAstV 在我国婴幼儿中的感染情况,本研究选取全国 7 个地区收集腹泻住院患儿的粪便标本进行 HAstV 检测,并进一步用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法鉴定病毒血清型,调查我国 HAstV 的流行病学特点。

材料与方 法

1. 标本来源:1998 - 2005 年在我国 7 个地区 (长春、北京、河北卢龙、郑州、福州、兰州、昆明市) 收集 5 岁以下腹泻住院患儿的粪便标本,经轮状病毒、杯状病毒检测结果为阴性的标本进行 HAstV 检测。粪便标本使用前保存在 -20℃。

2. 试剂:Trizol 为 invitrogen 公司产品;引物合成和测序均由上海生工生物技术有限公司完成;逆转录酶和载体质粒 pGEM-T 为 Promega 公司产品;DNA 凝胶纯化回收试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品;EcoR I 限制性内切酶为大连宝生物有限公司产品;大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞为天为时代科技有限公司产品;2000 bp DNA Ladder Marker 购自大连宝生物公司;EIA 诊断试剂盒为英国 DaKo 公司产 IDEMA Astrovirus。

3. 核酸提取:应用 Trizol 从 10% 粪便悬液中提取病毒 RNA,溶于 20 μl DEPC 水中,使用前保存在 -20℃。

4. HAstV 检测:采用 ELISA 或 PCR 方法。ELISA 检测采用 EIA 诊断试剂盒依据说明书操作。PCR 检测 HAstV 方法参照文献^[8]。

5. HAstV 的 RT-PCR 分型:在 200 μl 反应管中加入 3.5 μl RNA 和引物 For、End 各 0.75 μl,混匀后 95℃ 油浴加热 5 min,然后放入冰浴中至少冷却 5 min。向上述反应管中再加入:1 μl 10 mmol/L dNTP, 2.5 μl 5× reaction buffer, 1 μl 25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μl 10 mmol/L DTT, 0.5 μl 200 U/μl AMV-RT, 0.5 μl 26.4 U/μl RNasin, 13.9 μl dH₂O, 混匀后 42℃ 反转录 60 min,然后向反应管中加入 0.1 μl 5 U/μl 的 Taq 聚合酶,总体积为 25 μl。第一次 PCR 程序如下:94℃ 1 min、45℃ 2 min、72℃ 3 min,经 30 个循环后 72℃ 7 min;第二次 PCR 是

从第一次 PCR 产物中取出 3 μl,加入引物 End 和分型引物 S1~S8 (引物序列见表 1) 各 0.75 μl,以及 1 μl 10 mmol/L dNTP, 1 μl 25 mmol/L MgCl₂, 2.5 μl 10× Taq reaction buffer, 0.1 μl 5 U/μl Taq 聚合酶, 10.65 μl dH₂O, 反应体系共 25 μl, PCR 程序同上。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,从电泳带分子量大小鉴定毒株血清型,HAstV1~8 型 PCR 产物大小分别为 212 bp、158 bp、119 bp、258 bp、388 bp、427 bp、548 bp、599 bp^[9-11]。

表 1 用于 PCR 扩增的寡核苷酸引物

引物	核苷酸序列 (5'-3')	位置*	方向
For	5'-AAAGAAGTGTGATGGCTAGCA-3'	1~21	+
End	5'-TCCTACTCGGGCTGGCCGC-3'	2377~2359 [#]	-
S1	5'-AACCAAGGAGGAATGACAATGAC-3'	2166~2185	+
S2	5'-ACCTGCGCTGAGAACTG-3'	2247~2264	+
S3	5'-CTGCTTCGATCTGGTCTTTCA-3'	2283~2303	+
S4	5'-TGATGATGAAGACTCTAATAC-3'	2071~2091	+
S5	5'-TAGTAACTTATGATAGCC-3'	2014~2031	+
S6	5'-TGCCACCTTGTTCCTCAGA-3'	1951~1971	+
S7	5'-CTAGACAACAACCCCG-3'	1842~1859	+
S8	5'-GGTAAGTGGTACCTGCTAACTAG-3'	1753~1775	+

* 起始位置为每个血清型衣壳蛋白区的 5' 端; # 引物 End 的位置是从 HAst-1 型衣壳蛋白区的 5' 端计算

6. PCR 产物测序:将第二次 PCR 产物采用 QIAGEN Quick Gel Extraction Kit 纯化后插入载体质粒 pGEM-T,经转化大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞,扩增后质粒 DNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和限制性酶切鉴定,阳性克隆用通用引物 T7 和 SP6 测序。

7. 序列分析:序列排队应用 CLUSTALX 软件,用 MEGA 3.1 绘制进化树。对库比较采用 BLASTN 软件,参考序列均来源于 GenBank。

结 果

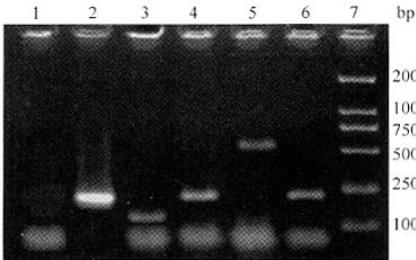
1. HAstV 检测:7 个地区收集的 1668 份粪便标本中共检出 91 份阳性标本,平均阳性率为 5.5% (1.0%~9.5%),见表 2。

表 2 1998 - 2005 年我国 7 个地区 HAstV 检测结果

地区	标本份数	检测方法	HAstV 阳性		型别分布*				
			份数	率 (%)	1	3	5	8	未知
卢龙	262	EIA	9	3.4	-	-	-	-	9
长春	156	EIA	5	3.2	-	-	-	-	5
北京	84	EIA	8	9.5	4	1	1	-	3
昆明	352	EIA/PCR	13	3.7	4	-	-	-	9
福州	200	PCR	2	1.0	-	-	-	-	2
郑州	96	PCR	9	9.4	8	-	1	-	0
兰州	518	EIA/PCR	45	8.7	29	-	-	1	14
合计	1668	-	91	5.5	45	1	2	1	42

* 2、4、6、7 血清型未检出

2. HAstV 的 RT-PCR 分型: 对 91 份 HAstV 阳性标本通过 RT-PCR 分型, 共发现 1、3、5、8 四个血清型, 其中以 HAstV-1 型为主 (91.4%), 其次 HAstV-3 和 HAstV-8 型分别占 2.2%, HAstV-5 型占 4.2%。2 株 HAstV-5 型均为测序证实^[18], PCR 产物电泳图见图 1, 血清型分布见表 2。



1: 阴性对照; 2、4、6: HAstV-1 型 (212 bp); 3: HAstV-3 型 (119 bp); 5: HAstV-8 型 (599 bp); 7: 2000 bp DNA Ladder Marker

图 1 HAstV RT-PCR 方法分型电泳图

3. HAstV 的核苷酸测序鉴定: 选取 6 株不同型毒株, 其中 4 株 HAstV-1 型 (CHLZ43339、CHLZ43227、CHLZ44082、CHKM3873)、1 株 HAstV-3 型 (CHLZ43996)、1 株 HAstV-8 型 (CHLZ433276) 进行 PCR 产物测序, 4 株 HAstV-1 型彼此核苷酸序列同源性达 98% 以上, 与 GenBank 中 3 株 HAstV-1 型参考株 (L23513、S68561、Z11682) 核苷酸序列同源性均在 92% 以上。1 株 HAstV-3 型 (CHLZ43996) 和 1 株 HAstV-8 型 (CHLZ433276) 与参考株 AF141381 (H3) 和 AF720891 (H8) 核苷酸序列同源性分别为 94.1%、95.7%, 证实 RT-PCR 分型结果准确可靠。毒株间核苷酸序列同源树见图 2。

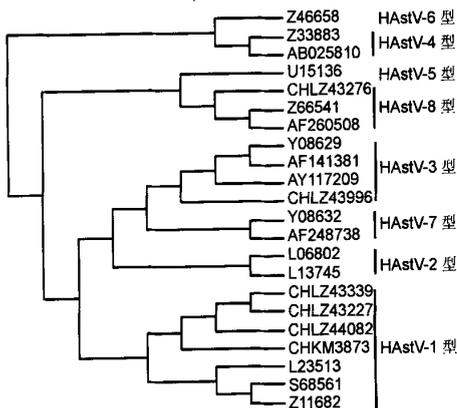


图 2 我国分离的 HAstV 毒株和 8 个血清型的参考株基因组 ORF2 部分区段核苷酸序列同源树

4. HAstV 的年龄分布: 本研究中 0~5 岁各年龄组均有 HAstV 腹泻病例发生, 91 份 HAstV 阳性粪便标本的 95.2%, 患儿年龄在 2 岁以下, 各年龄组的病例分布情况见图 3。

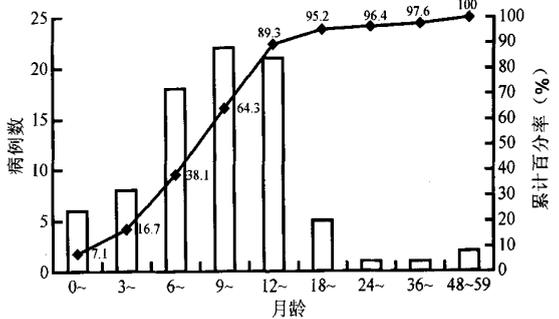


图 3 1998-2005 年我国 7 个地区 HAstV 腹泻患儿年龄分布

5. HAstV 的季节分布: 全年各月份都有 HAstV 阳性标本检出, 但主要集中在 10 月份至次年 1 月份, HAstV 的季节分布与轮状病毒相似, 以秋冬季多见, 具体分布情况见图 4。

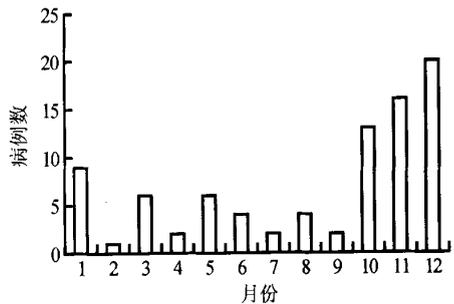


图 4 1998-2005 年我国 7 个地区 HAstV 腹泻的季节分布

讨论

本研究对我国 7 个地区 1998-2005 年收集的 1668 份住院腹泻患儿粪便标本进行 HAstV 检测, 平均阳性率为 5.5% (1.0%~9.5%), 该结果与其他发展中国家报道的 2%~9% 的检出率基本一致^[12-14]。值得注意的是, 本研究中检测的标本排除了轮状病毒、杯状病毒感染, 所以检测的 HAstV 阳性反映的是单独由 HAstV 感染导致的腹泻病例。但是, 近年来对不同腹泻病毒的混合感染监测显示, HAstV 与其他病原体的混合感染率可达 33%~65%^[15-17], 且多与轮状病毒混合感染为主, 墨西哥、美国、法国研究报道 HAstV 与轮状病毒混合感染率为 16%~42%^[13], 我国的研究报道北京市儿童医院 2002 年二者混合感染率为 19.2%^[11], 兰州地区

2004-2005 年二者混合感染率为 5.5%，兰州住院腹泻患儿检测到的 HAstV 阳性标本中与轮状病毒混合感染占 55.3% [18]。

研究中检出的 91 份 HAstV 阳性标本中 47 份成功应用 RT-PCR 进行分型，表 2 中另有 2 株 HAstV-5 型是由本实验室在 1999 年经测序鉴定的 [19]。实验中采用的分型引物用于 HAstV RT-PCR 分型经测序证明分型结果准确可靠。但尚有 42 株 HAstV 阳性标本未能分型，这些阳性标本基本都是 ELISA 方法检测为阳性，可能由于标本运输或/和标本 -20℃ 长期保存过程中病毒颗粒破坏，造成病毒基因组单链 RNA 降解，虽然病毒抗原性仍能被 ELISA 检测，另外由于 HAstV 衣壳蛋白区的核苷酸序列多样性，这 8 个分型引物还不能检测发生变异的或新血清型的 HAstV，这有待于进一步研究。

研究证实 HAstV-1 型为我国主要的流行毒株，这与目前欧洲、美国、澳大利亚和日本等国研究结果相一致，研究中发现的 HAstV-3 和 HAstV-8 型在我国属首次报道，这说明我国 HAstV 感染在以 HAstV-1 为主同时，也存在多个型别的散在流行。而且随着研究的深入，其他型别的 HAstV 还会不断被发现 [14]。

本研究中 HAstV 感染病例主要集中在 10 月份至次年 1 月份，与轮状病毒的流行季节相似，而且 HAstV 腹泻病例中 95.2% 的患儿年龄小于 2 岁，平均年龄比轮状病毒腹泻低。

我国目前对于婴幼儿 HAstV 腹泻的资料还不多，对于正常儿童中 HAstV 的感染，以及 HAstV 与其他腹泻病毒的混合感染，我们正进行更深入研究，以便为 HAstV 腹泻的预防和控制决策提供科学依据。

参 考 文 献

- 1 Madeley CR, Cosgrove BP. 28-nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, 1975, 2:451-452.
- 2 Jolan E, Walter MD, Douglas K, et al. Role of astroviruses in childhood diarrhea. *Curr Opin Infect Dis*, 2003, 16:247-253.
- 3 Jiang B, Monroe SS, Koonin EV, et al. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *J Microbiol*, 1993, 11:10539-10543.
- 4 Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, et al. Typing of human astroviruses

- from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol*, 1995, 33:797-801.
- 5 Dennehy PH, Nelson SM, Spangenberg S, et al. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalised young children. *J Infect Dis*, 2001, 184:10-15.
- 6 Dalton RM, Roman ER, Negrodo A, et al. Astrovirus acute gastroenteritis among children in Madrid, Spain. *Pediatr J Infect Dis*, 2002, 21:1038-1041.
- 7 Espul C, Martinez N, Noel JS, et al. Prevalence and characterisation of astroviruses in Argentinean children with acute gastroenteritis. *J Med Virol*, 2004, 72:75-82.
- 8 Hainian Y, Fumihiko Y, Shoko O, et al. Detection of norovirus (G I, G II), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Methods*, 2003, 114:37-44.
- 9 Sakamoto T, Negishi H, Wang QH, et al. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1 to 8). *J Med Virol*, 2000, 61:326-331.
- 10 Mihoko M, Hiroshi U, Masahiko H, et al. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol Immunol*, 1998, 42:539-547.
- 11 Liu CY, Shen KL, Wang SX. Astovirus infection in young children with diarrhea hospitalized at Beijing Children's Hospital. *Chin Med J*, 2004, 117:353-356.
- 12 Bon F, Fascia P, Dauvergne M, et al. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:3055-3058.
- 13 Gaggero A, O'Ryan M, Noel JS, et al. Prevalence of astrovirus infection among Chilean children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 1998, 36:3691-3693.
- 14 Mustafa H, Palombo EA, Bishop RF. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:1058-1062.
- 15 Cruz JR, Bartlett AV, Herrmann JE, et al. Astrovirus-associated diarrhea among Guatemalan ambulatory rural children. *J Clin Microbiol*, 1992, 30:1140-1144.
- 16 Martinez, Rosales G, Velázquez FR, et al. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico city. *J Infect Dis*, 1998, 17:723-727.
- 17 Unicomb LE, Banu NN, Azim T, et al. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis*, 1998, 17:611-614.
- 18 叶新华, 金玉, 方肇寅, 等. 兰州地区 2004-2005 年度婴幼儿病毒性腹泻的病原学研究. *中华流行病学杂志*, 2006, 27:117-122.
- 19 方肇寅, 章青, 赵章华, 等. 我国河南与北京腹泻患儿中的星状病毒感染. *病毒学报*, 2000, 16:123-126.

(收稿日期:2006-02-17)

(本文编辑:张林东)