

文章编号:1673-5501(2008)05-0340-05

2001 至 2005 年上海部分地区腹泻住院患儿诺若病毒分子临床流行病学研究

徐 锦 孙家娥 丁韵珍 苏犁云 杨 毅

摘要 目的 通过对上海地区腹泻住院患儿进行诺若病毒检测,对其流行株进行基因序列的测定,以了解诺若病毒在上海地区的流行特征,为该病原体所致腹泻的防治提供基础数据和理论依据。**方法** 收集 2001 至 2005 年复旦大学附属儿科医院 5 岁以下腹泻住院患儿的粪便标本。首先进行轮状病毒的检测,在轮状病毒抗原阴性标本中,每隔 8 个标本按编号顺序行机械随机抽样,建立 RT-PCR 方法进行诺若病毒的检测。对 PCR 产物进行双向测序,测序结果通过 Clustal W 和 Mega 4.1 软件进行分析。**结果** 研究期间共收集腹泻患儿粪便标本 5 534 份,轮状病毒抗原阴性 4 084 份,机械随机抽得 484 份用于诺若病毒检测,45/484 份(9.3%)检测到诺若病毒。对诺若病毒感染季节分布和患儿年龄特点的分析表明,除 4 月和 7 月份未检测到诺若病毒外,其余各月份均检测到诺若病毒,其高发的月份是 8 至 11 月。5~6 月也呈一个小高峰。77.8%(35/45)的患儿 <2 岁,其中 6~11 个月的患儿所占比例最高,达 35.6%(16/45), <6 个月的婴儿占 20%(9/45)。G II-4 型是这 5 年间尤其是 2003 年之后的主要流行型别,2001 至 2002 年尚存在其他的流行型别 G II-3 和 G II-7 型。**结论** 上海地区近 5 年来诺若病毒感染的分子流行病学特征呈现一定的规律,今后需要进行更详细和深入的监测,为儿童急性腹泻病的防控提供依据。

关键词 诺若病毒; 基因组; 基因型; 分子流行病学; 儿童

Molecular epidemiology of norovirus infection in hospitalized children with diarrhea in partial areas of Shanghai, China, 2001-2005

XU Jin, SUN Jia-e, DING Yun-zhen, SU Li-yun, YANG Yi Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China)

Corresponding Author: XU Jin, E-mail: jinxu_125@163.com

Abstract Objective As a genus of human calicivirus, norovirus has been recognized as the most common cause of food-borne and nosocomial outbreaks of acute non-bacterial gastroenteritis in humans worldwide and the secondly important pathogen for viral diarrhea in hospitalized children. The aim of the present study was to evaluate the prevalence of norovirus in hospitalized children under 5 years old with acute gastroenteritis in the biggest pediatric hospital in Shanghai, China over a long period. The information will provide important data and theoretical basis for development of norovirus vaccine and control of norovirus infection. **Methods** A total of 5 534 stool samples were collected from hospitalized children with acute diarrhea in children's hospital, Fudan University during 2001 to 2005. 96% of the samples were collected within 5 days after illness onset. After all the samples were tested for rotavirus antigen, systematic sampling was applied to collect 484 samples from all the rotavirus negative stools. RNA was purified from 10% (W/V) of fecal suspensions using TRIzol. RT-PCR was applied for determination of norovirus. A multiple sequence alignment of 170nt nucleotide sequence from region B of the polymerase region sequence was constructed using Clustal W. Phylogenetic trees were constructed using Mega 4.1 software by the neighbor-joining methods. **Results** Of the 45 norovirus infected children, more than one-third (35.6%) were at 6-11 months of age, followed by 12-23 months (22.2%) and 0-5 months (20%). The monthly distribution of norovirus infection illustrated a seasonal peak from August (17%) to November (9.8%). Another small peak was found in May and June. Among the 6 norovirus positive samples in 2001, 2 were identified to be G II-7, one was G II-3 and the other 3 strains were G II-4 genotype. 1 sample belonged to G II-3 and the other 3 were G II-4 in the years of 2002. All the 27 samples during the years of 2003 to 2005 were identified to be G II-4 genotype. **Conclusions** A seasonal and age distribution of norovirus infections was found in hospitalized children in Shanghai. G II-4 was the most

作者单位 复旦大学附属儿科医院 上海,201102

通讯作者 徐锦, E-mail: jinxu_125@163.com

predominant genocluster circulating in the 5 years. Our findings will provide useful data for prevention of norovirus diseases in children in Shanghai.

Key words Norovirus; Genome; Genotype; Molecular epidemiology; Children

诺若病毒是人类杯状病毒属中感染人类的最常见病毒,但由于其不能在体外进行细胞培养,一直以来缺乏快速敏感的检测方法,故对其危害性认识不足。直至20世纪90年代,分子生物学的进展加速了人类对诺若病毒的认识。该病毒无包膜,直径为27~35 nm,内有一条长度为7.5~7.7 kb的单链RNA。整条基因有3个开放阅读框架(ORF),即编码RNA多聚酶等非结构蛋白的ORF1和编码衣壳蛋白的ORF2及ORF3。根据ORF1和ORF2的差异将诺若病毒分成GI~V 5个不同的基因组(genomes),同一组内又可以分成不同的基因型(genotype)。目前认为,感染人类的诺若病毒主要是GI、GII和GIV基因组,每组中分别包括8、17和1种基因型^[1]。

诺若病毒感染后,常在12~48 h的潜伏期后出现呕吐、恶心、水样泻及发热等病毒性腹泻的常见症状。诺若病毒是人类暴发性腹泻的最常见病毒,美国的研究数据显示1994至2005年74%的非细菌性急性胃肠炎均由诺若病毒引起^[2]。在日本、新西兰和欧洲,超过70%的急性暴发性腹泻与诺若病毒相关^[3~5]。大多数的研究是基于发生食物源性腹泻的较大年龄儿童和成人,而近年来通过对散发性腹泻的研究认为:诺若病毒同时也是5岁以下儿童急性腹泻的主要病原体之一^[6,7]。世界范围内因腹泻而就诊和住院的患儿中,诺若病毒的感染率达3.5%~20.0%,但目前总体上尚缺乏更详细的、特别是长时间段内的儿童诺若病毒感染分子流行病学资料。

本研究通过建立诺若病毒检测的方法,对2001至2005年上海部分地区腹泻住院患儿进行诺若病毒的检测,对流行株基因测序,以了解诺若病毒在上海地区的流行特征,为该病原体所致疾病的防治提供基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本收集 标本来自于2001至2005年复旦大学附属儿科医院<5岁的急性腹泻住院患儿,出现腹泻症状后1~14 d采集粪便,96%的标本在急性腹泻期(发病后5 d内)收集。腹泻的粪便标本由护士统一收集后送至复旦大学附属儿科医院病毒室,按标本收到的时间先后进行顺序编号,-20℃保存,超过1年的标本转入-70℃长期保存。所有标本均用ELISA方法对轮状病毒(RV)抗原进行检测,在RV抗原阳性标本中,按原编号顺序再进行从1开始的顺序编号,之后每隔8个数字行机械随机抽样,即按顺序取1、9、17等编号的标本。

1.2 诺若病毒检测 用生理盐水制备10%~20%的粪便悬液,离心取200 μL上清,加1 mL TRIzol 抽提RNA, RNA

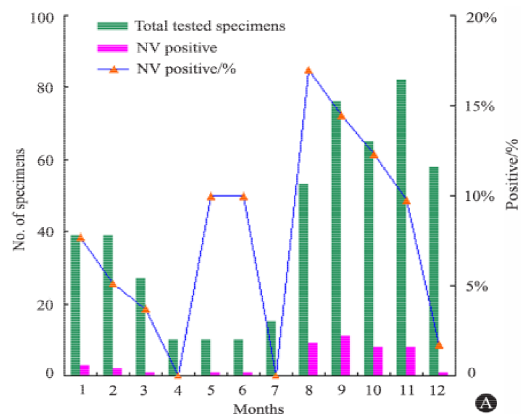
沉淀以DEPC水30 μL溶解。抽提的RNA 10 μL分别用上游引物 Mon431 和 Mon432 进行逆转录反应^[8]。反应体系为:引物1 μmol, dNTP 50 μmol, MMLV 200 U, 总体积20 μL。反应条件为:首先将RNA和引物混合后70℃ 5 min,取出立即置冰上,然后加入其他反应物,42℃ 1 h, 95℃ 5 min。取上述逆转录的产物10 μL进行PCR扩增。反应体系为:Mon431-432引物0.25 μmol, Mon 433-434引物0.5 μmol, dNTP100 μmol, 热启动Taq酶1.25 U, 总体积50 μL。反应条件:95℃ 20 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s 和72℃ 30 s, 35个循环,72℃ 延伸7 min。观察电泳条带。

1.3 DNA序列测定和分析方法 诺若病毒的扩增片段长度是213 bp,电泳后割胶纯化,在ABIsequencer3730上进行双向测序,测序结果通过Clustal W和Mega 4.1软件分析,绘制进化树。

2 结果

2.1 一般情况 2001至2005年共收集粪便标本5 534份,在4 084份RV抗原阴性的标本中机械随机抽得484份标本行诺若病毒检测。依据复旦大学附属儿科医院住院患儿地区分布的粗略统计,80%的腹泻患儿来源于上海市徐汇区、闵行区、松江区、金山区、青浦区和奉贤区,20%主要来自上海其他区县。

2.2 诺若病毒腹泻的流行季节和年龄分布 2001至2005年484份粪便标本中,45/484份(9.3%)检测到诺若病毒。2001至2005年分别为7、6、7、8和17例。对诺若病毒感染季节分布和患儿年龄特点的分析表明,除4月和7月份未检测到诺若病毒外,其余各月份均检测到诺若病毒,其高发为8~11月份(图1A)。77.8%(35/45)的患儿均<2岁,其中6~11个月的患儿达35.6%(16/45), <6个月占20%(9/45)(图1B)。



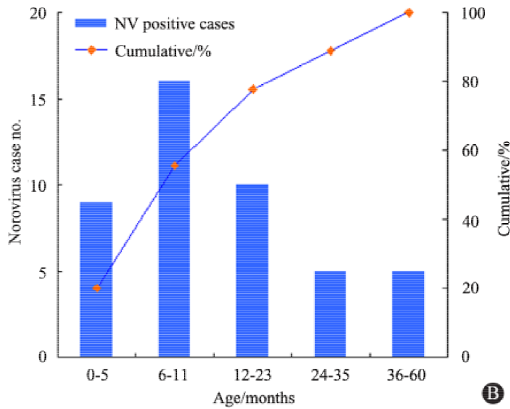


图1 2001至2005年诺若病毒腹泻住院患儿的季节(A)和年龄(B)分布

Fig 1 Seasonal (A) and age (B) distributions of norovirus diarrhea children during the years of 2001-2005

2.3 诺若病毒流行型别的分布 45例诺若病毒阳性标本中有8例电泳条带较淡,无法进行DNA测序,故未进行DNA测序。对37个标本测序结果的分析表明,G II-4型2001至2005年尤其是2003年之后的主要流行型别。其中2001至2002年尚存在其他的流行型别G II-3和G II-7型

(图2)。图3显示了与标准株比较后绘制的诺若病毒进化树。

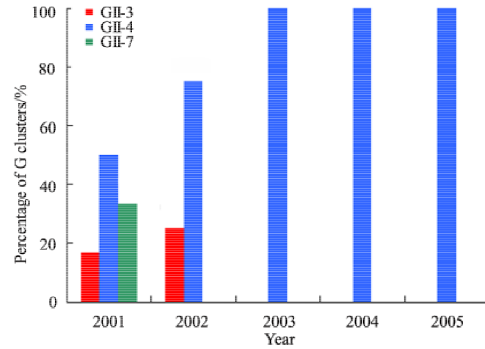


图2 2001至2005年诺若病毒腹泻住院患儿37个诺若病毒株基因型别的分布

Fig 2 Yearly distribution of 37 norovirus strains by genera and genetic cluster in hospitalized children with acute gastroenteritis during the years of 2001-2005

Notes: 3, 3, 7, 8, 12 samples were identified to be G II-4 genotypes in the years 2001-2005, respectively. 2 samples were identified to be G II-7 genotypes in the years 2001. 1 sample was identified to be G II-3 genotypes in years 2001 and 2002

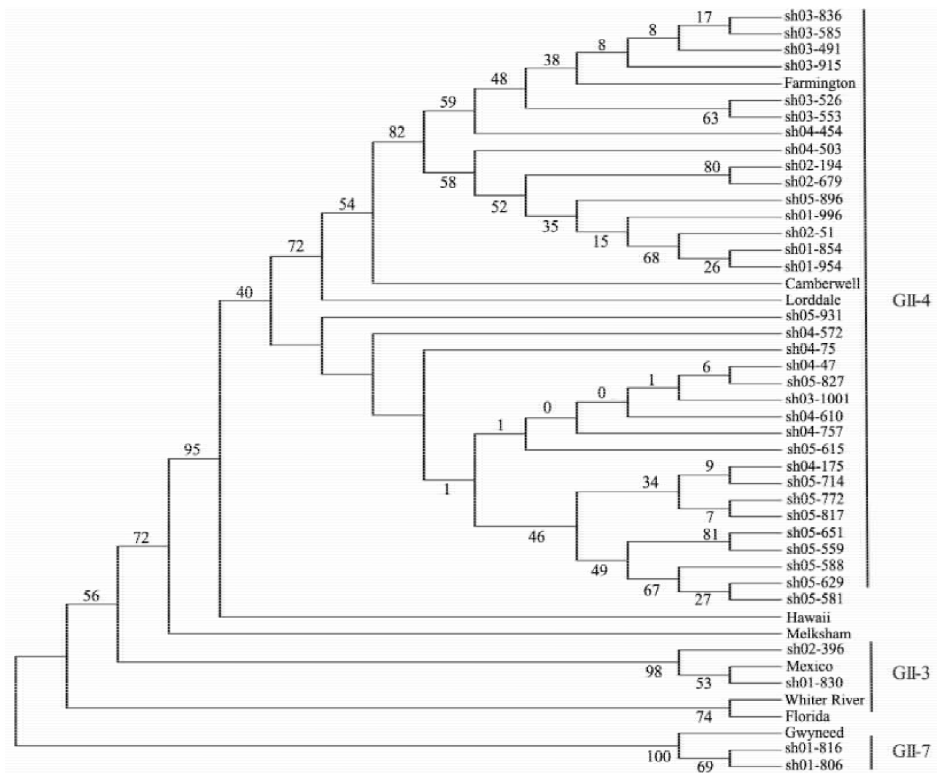


图3 根据PCR扩增的213 bp产物绘制的37个诺若病毒株和标准株的进化树

Fig 3 The phylogenetic tree of 37 norovirus strains identified in Shanghai and 9 reference strains from NCBI Genbank, based on 170nt sequence from DNA polymerase

3 讨论

本研究首次报道了上海地区 2001 至 2005 年住院的腹泻患儿诺若病毒感染的分子流行病学特征。 <5 岁 RV 抗原阴性的腹泻患儿中, 9.3% (45/484) 是由诺若病毒引起。由于诺若病毒抗原性和基因遗传性差异较大, 目前抗原检测方法仍不成熟, 大多数研究采用 PCR 方法检测, 但由于选取的引物各不相同, 使得不同研究者得出的诺若病毒的感染率差异较大。从上海地区诺若病毒感染患儿的年龄分布特征上看, 77.8% 的患儿 <2 岁, 其中 6~11 个月的患儿所占比例最高, 达 35.6%, <6 个月的婴儿占 20%, 整体趋势与国内、外的报道相似^[9~14]。儿童诺若病毒的感染类似于 RV 感染, 好发于 <2 岁的婴幼儿, 可见来自母亲的抗体还不足以帮助小婴儿完全免于诺若病毒的感染, 此结果也提示诺若病毒疫苗的接种策略应选择婴儿出生后及早接种。

诺若病毒感染的季节分布较为复杂, 常因地理位置、气候和检测方法的不同存在很大差异, 至今还没有定论。我国疾病控制和预防中心 (CDC) 的多中心研究表明, 中国北方地区的高发季节在 11 月份至次年 2 月份, 而 9~12 月份是南方的高发季节^[12]。但也有报道认为有些地区诺若病毒的感染缺乏明显的季节性^[10,11]。相比其他月份, 上海地区 8~11 月份是一个高发期, 更接近于南方的特征, 而 5 月和 6 月份诺若病毒感染也呈现了一个小高发期, 这与中国 CDC、长春地区的报道相似, 可能与夏季食用不洁食物和水的机会增加有关^[9,12]。由于本研究的诺若病毒阳性病例较少, 季节分布的准确特征尚需今后积累更多数据后再做进一步的分析。

2002 至 2005 年上海地区诺若病毒的主要流行株是 G II-4 型, 再次证实了 G II-4 型是世界范围内诺若病毒引发暴发性或散发性腹泻的最优势型别^[2,7,10~20]。在所有被鉴定的型别中, 有 2 株 G II-3 型, 分别分布在 2001 和 2002 年。1999 至 2001 年日本发生的一次较大规模的急性诺若病毒腹泻的型别是 G II-3 型, 该型别在澳大利亚、越南和中国其他地区的不同年份中也均有流行^[7,11,21,22], 其中 2000 至 2001 年河北省卢龙地区、2003 至 2005 年广州地区的主要流行型别包括 G II-3 型。2001 年上海地区发现 2 株 G II-7 型, 此型别被认为是某些地区在某些年份的非优势株, 中国 CDC 对中国范围内 1999 至 2005 年的研究表明仅在河北省卢龙地区发现了 2 株 G II-7 型^[7,11,16]。本研究结果表明, 上海地区流行的 3 种诺若病毒型别均在 2001 年出现, 2002 年尚有 2 种型别的流行, 但 2003 年之后只有 G II-4 单一型别的存在, 显示上海地区诺若病毒不同型别的流行因年份而发生变化的特征。在中国某些地区检测到的非主要流行型别, 如 G I-2、G II-5、G II-6、G II-8 型, 此次未在本组标本中检测到。

本研究的不足之处: 首先, 由于在所有标本中只检测到

45 份诺若病毒阳性标本, 样本量的不足使得对年龄和季节的分布尚不能得出非常确切的结论。其次, 由于诺若病毒型别众多, 不同基因型和基因类群间的基因差异较大, 因此对共同引物的设计和选择一直困扰众多研究者。本研究采用的检测方法使用两对变性引物 (degenerate primer) 以期能够检测到更多不同型别的诺若病毒。今后亦可采用不同位点引物并用或将 PCR 检测基因与 ELISA 检测抗原的方法结合起来, 以进一步提高阳性标本的检出率。

参考文献

- [1] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 2006, 346(2): 312-323
- [2] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel 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): 1-7
- [3] Lopman BA, Reacher MH, Duijnhoven Y, et al. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(1): 90-96
- [4] Lopman B, Vennema H, Kohli E, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 2004, 363(9410): 682-688
- [5] Vinjie J, Altena SA, Koopmans MP. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis*, 1997, 176(5): 1374-1378
- [6] Glass RI, Noel J, Ando T, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis*, 2000, 181(S2): 254-261
- [7] Kirkwood CD, Clark R, Bogdanovic-Sakran N, et al. A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998-2002). *J Med Virol*, 2005, 77(1): 96-101
- [8] Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, et al. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and Southern hybridization. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(1): 64-71
- [9] Xie HP (谢华萍), Fang Z, Wang G, et al. The epidemiological study of human calicivirus among children with acute diarrhea in Changchun Children's hospital in 1998-2001. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2002, 18(4): 332-336
- [10] Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, et al. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J*, 2007, 26(7): 602-606

- [11]Dove W, Cunliffe NA, Gondwe JS, et al. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. *J Med Virol*, 2005, 77(4): 522-527
- [12]Fang ZY(方肇寅), Xie HP, Lv HX, et al. Investigation of human calicivirus(HuCV) diarrhea among infantile and young children in China. *Chin J Virol(病毒学报)* 2007, 23(1): 9-15
- [13]Zhan HC(谿惠春), Nie J, Liu Y, et al. Molecular epidemiological study of human calicivirus infection in diarrheal children in autumn and winter at a hospital in Guangzhou. *J South Med Uni(南方医科大学学报)*, 2006, 26(7): 967-970
- [14]Jin Y(金玉), Huang X, Fang Z, et al. Molecular epidemiology of human caliciviruses diarrhea among infants and young children in Lanzhou from December 2001 to June 2004. *Chin J Pediatr(中华儿科杂志)*, 2005, 43(9): 657-660
- [15]Liu Y(刘翼), Dai Y, Yao Y, et al. Molecular epidemiology of diarrhea among children with Norwalk-like virus in a hospital of Guangzhou in Autumn and Winter. *Chin J Epidemiol(中华流行病学杂志)*, 2005, 26(7): 525-528
- [16]Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in northern Italy. *J Med Virol*, 2006, 78(11): 1486-1492
- [17]Lindell AT, Grillner L, Svensson L, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(3): 1086-1092
- [18]Wu ET, Oka T, Katayama K, et al. Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Arch Virol*, 2006, 151(7): 1319-1327
- [19]Zhong JY(钟家禹), Zhou R, Zhu B, et al. The genotype of Norovirus infection in infants in Guangzhou. *Chin J Evid Based Pediatr(中国循证儿科杂志)*, 2006, 1(4): 273-278
- [20]Sumi A, Kobayashi N, Ohtomo N. Proportion of sporadic gastroenteritis cases caused by rotavirus, norovirus, adenovirus and bacteria in Japan from January 2000 to December 2003. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(8): 745-756
- [21]Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, et al. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J Med Virol*, 2007, 79(5): 582-590
- [22]Iritani N, Seto Y, Kubo H, et al. Prevalence of Norwalk-like virus infections in cases of viral gastroenteritis among children in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1756-1759

(收稿日期: 2008-07-24 修回日期: 2008-08-26)

(本文编辑: 丁俊杰)

复旦大学附属儿科医院 2008 年 10 ~ 11 月份国家级继续医学教育项目

项目名称	项目编号	学分	举办日期
小儿癫痫综合诊治新进展学习班	20080601083	10	10 月中旬
儿童心理行为量表学习班	20080604025	10	10 月中旬
听力筛查-诊断-干预-康复新技术研讨班	20080604027	10	10 月中旬
小儿危重症护理进展	20081404019	12	10 月下旬
儿科呼吸道疾病高级医师进修班	20080601085	6	11 月上旬
小儿超声心动图临床应用学习班	20080604029	16	11 月中旬
小儿先天性心脏病诊断和治疗进展	20080604023	10	11 月中旬

举办时间与应得学分以所发通知为准, 欢迎来电询问! 欢迎报名参加! 联系地址: 上海市闵行区万源路 399 号, 邮政编码: 201102, 复旦大学附属儿科医院科教科, 问讯与报名电话: 021-64931990 转 1913。

医学试题精编丛书《儿科学》出版

由复旦大学上海医学院儿科学系、复旦大学附属儿科医院黄国英教授主编的医学试题精编丛书——《儿科学》已于 2006 年 11 月由复旦大学出版社出版。本书根据儿科学教学大纲要求进行编写, 在 2001 年出版的《儿科学试题与题解》第 1 版内容的基础上, 参照近年来新编写的教育部和卫生部全国规划教材《儿科学》的内容进行相应的更新。全书共分为 17 章, 基本涵盖儿科学各专业。本书由复旦大学、上海交通大学和上海同济大学的知名儿科学专家参加编写, 本书题型多样, 包括了“国家医学考试中心”规范的多种多选题题型、名词解释以及问答题, 还提供 30% 左右超出教学大纲范围的选择題, 均附有答案。本书有利于广大医学生、研究生和临床医生适应多选题考试, 且对于复习、掌握和巩固儿科学知识也具有重要作用。全书 344 千字, 每册定价 35 元, 可在新华书店或医学书店购买。