文章编号:1000-5404(2010)01-0077-04

论著

重庆婴幼儿轮状病毒分子流行病学特征及相关临床资料分析

廖 炀,陈军华,朱朝敏,许红梅,刘作义 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院感染消化科)

[摘要] 目的 研究重庆地区婴幼儿轮状病毒的分子流行病学特征和相关临床资料分析。**方法** 收集2008年10月至2009年2月在重庆儿童医院就诊的患非细菌性急性腹泻的婴幼儿大便和问卷。先用胶体金法检测轮状病毒抗原,并经RT-PCR(逆转录PCR)方法证实为轮状病毒,然后用巢式RT-PCR方法进行VP7(G)、VP4(P)基因分型并分析相关临床资料。**结果** 共收集到507份大便标本,胶体金法检测轮状病毒抗原阳性率50.69%(257/507)。147份轮状病毒VP6基因阳性标本中G分型结果:G1型占40.14%(59/147);G2型6.80%(10/147);G3型17.01%(25/147);G4型2.04%(3/147);G9型0.68%(1/147);尚有49份未能分型,占33.33%(49/147)。P分型结果:P[8]型占60.54%(89/147);P[4]型占6.12%(9/147);P[9]型和P[10]型各有1例,分别占0.68%(1/147);尚有47份未能分型。G、P型别组合最常见的是G1/P[8]型,占58.93%(33/56)。各G、P型别间临床症状比较无统计学差异。**结论** G、P分型结果与其他地区明显不同,G分型显示出多样性特点,P分型仍以P[8]型占优势。

[关键词] 腹泻;婴幼儿;轮状病毒感染;轮状病毒属;基因型
[中图法分类号] R725.125; R181.33; R373.2 **[文献标志码]** A

Molecular epidemiologic characterization and related data analysis of rotavirus in infants of Chongqing

Liao Yang, Chen Junhua, Zhu Chaomin, Xu Hongmei, Liu Zuoyi (Department of Infection and Digestion, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] Objective To explore the molecular epidemiological characterization and analyze the related clinical data of rotavirus diarrhea among infants in Chongqing region. Methods Fecal specimens and questionnaires were collected from infants with non-bacterial acute diarrhea who were admitted at Children's Hospital of Chongqing Medical University from October 2008 to February 2009. Nested reverse transcription polymerase chain reaction (nested RT-PCR) method was used for rotavirus-positive specimens which been verified by screening method with colloidal gold and proved by RT-PCR in order to analyze the VP7 and VP4 genotypes (G- and P-typing). All the results and clinical questionnaires were analyzed. Results A total of 507 fecal specimens were collected. Rotavirus antigen positive rate was 50.69% (257/507). Out of the 147 rotavirus-positive specimens, G1-type accounts for 40.14% (59/147), G2 6.80% (10/147), G3 17.01% (25/147), G4 2.04% (3/147), and G9 0.68% (1/147), respectively. While 49 cases (33.33%) were failed to detect G-genotypes. Correspondingly, P[8] type accounted for 60.54% (89/147), P[4] 6.12% (9/147), P[9] and P[10] each of 0.68% (1/147), respectively, and 47 cases of failed P-genotyping. Conclusion Comparing with other areas, the constitutions of rotavirus G- and P-genotypes is different distinctly, and G-genotype shows the characterization of diversity in Chongqing region, however P[8]-genotype is still dominant. However, no significant different result is found when we compare different symptoms about acute diarrhea among almost every G and P-genotypes or G/P combinations.

[Key words] rotavirus infections; genotype; diarrhea; infants

Corresponding author: Liu Zuoyi, Tel: 86-23-63624014, E-mail: zuoyi.liu@163.com

[通信作者] 刘作义,电话:(023)63624014, E-mail: zuoyi.liu@163.com

轮状病毒肠炎仍然是世界范围内引起儿童急性腹泻的主要原因。据统计每年全球(尤其是在发展中国家)有超过60万儿童死于轮状病毒肠炎。Luquero-Alcalde等[1]认为轮状病毒肠炎是导致儿童急性腹泻病住院的重要原因,由此带来了沉重的医疗负担。轮状病毒在全世界广泛分布,由于其基因型别多而且变化大,各地流行病毒株有很大差别,因此研制和引进有效的轮状病毒疫苗尤其需要注重其地区差异性。另外,轮状病毒各型别及其组合之间的临床特征和腹泻严重程度是否具有显著差异性,以及是否需要重点关注和防治某些型别或组合,这在临床工作和卫生政策制定方面也是不可回避的话题。近些年重庆地区的轮状病毒分子流行病学资料缺乏。本研究分析重庆地区秋冬季节轮状病毒G、P型别及其临床特征,旨在为本病的防治提供资料,并为研制针对性强的疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本采集、存放和初筛

采集2008年10月至2009年2月在重庆医科大学附属儿童医院儿科(门诊及住院部)就诊的1个月至3岁急性腹泻患儿大便标本共507份。轮状病毒肠炎患儿中男性140例,女性117例,男女比例无统计学差异($\chi^2=2.058$, $P>0.05$)。轮状病毒肠炎患儿平均年龄为11个月($P_{25}=7$个月, $P_{50}=11$个月, $P_{75}=15$个月),发病频度最高的是1岁患儿,达10.5%。对采集的标本在当日尽快放置于-20 ℃冰箱保存。对收集的所有大便标本采用胶体金法检测轮状病毒抗原作A组轮状病毒初筛(试剂购于深圳市惠安生物科技有限公司生产的轮状病毒检测试条)。

1.2 标本核酸提取

经初筛呈阳性的标本采用由大连普肽生物科技有限公司生产的DNA/RNA提取试剂盒,按其说明书提取轮状病毒RNA。

1.3 RT-PCR检测轮状病毒

采用由TaKaRa公司生产的逆转录试剂盒按其说明合成cDNA第1链。扩增轮状病毒VP6基因以验证初筛结果。采用巢式PCR方法对轮状病毒常见G型(G1~G4、G9)以及P型(P[4]、P[6]、P[8]、P[9]、P[10]、P[11])进行分型。对未能明确G分型的标本应加作G8、G10、G12分型。所用引物参考Samajdar等[2]、于秋丽等[3]、Iturriza-Gomara等[4]发表的文献(表1)。参考反应条件为94 ℃预变性5 min,94 ℃变性1 min,42 ℃退火2 min,72 ℃延伸1 min,循环35次后,72 ℃终延伸7 min。扩增VP6基因时将退火温度调整至54 ℃,余同1.3所述。

1.4 统计学方法

采用SPSS 16.0统计软件,中位数比较使用非参数Mann-Whitney U检验,多个非正态分布独立样本中位数比较使用非参数Kruskal-Wallis检验,率的比较使用χ^2检验。

表1 轮状病毒G/P分型引物

引物	G/P分型	极性	位置(bp)	序列(5′→3′)	产物大小(bp)
VP6-F[a]	VP6	F	916~936	CAAACATGACGCCAGCCGTA	402
VP6-R[a]	VP6	R	1 298~1 317	ACGTAGCGAACATGGAGCCA	
9Con1	1stPCR	F	37~56	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	905
9Con2	1stPCR	R	922~941	GTATAAAATACTTGCCACCA	
G1	G1	R	176~195	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	159
G2	G2	R	262~281	GTTAGAAATGATTCTCCACT	245
G3	G3	R	484~503	GTCCAGTTGCAGTGTTAGC	467
G4	G4	R	423~440	GGGTCGATGGAAAATTCT	404
G9	G9	R	131~147	TATAAAGTCCATTGCAC	111
G12	G12	R	475~498	TAACGCTAATGAATTTTGGTACTG	461
VP7-F	1stPCR	F	51~71	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	881
VP7-R	1stPCR	R	914~932	AACTTGCCACCATTTTTTCC	
G8	G8	F	178~198	GTCACACCATTTGTAAATTCG	754
G10	G10	F	666~687	ATGTCAGACTACAGATACTGG	266
4Con3	1stPCR	F	11~32	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	876
4Con2	1stPCR	R	868~887	ATTTCGGACCATTTATAACC	
P[4]	P[4]	R	474~494	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	483
P[6]	P[6]	R	259~278	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	267
P[8]	P[8]	R	339~356	TCTACTGGATTAACGTGC	345
P[9]	P[9]	R	385~402	TGAGACATGCAATTGGAC	391
P[10]	P[10]	R	575~594	ATCATAGTTAGTAGTCGG	583
P[11]	P[11]	R	305~323	GTAAACATCCAGAATGTG	312

F:上游引物; R:下游引物;VP6-F、VP6-R:1对用于扩增轮状病毒VP6基因序列的引物;9Con1、9Con2:1对用于扩增轮状病毒(G1~G4、G9、G12型)VP7基因全长序列的引物;VP7-F、VP7-R:1对用于扩增轮状病毒(G8、G10型)VP7基因全长序列的引物;4Con3、4Con2:1对用于扩增轮状病毒VP4基因全长序列的引物 a:VP6基因引物根据Human rotavirus a strain CMH95/02 inner capsid protein (VP6) Gene(基因库号EU37274)设计

2 结果

2.1 一般资料

胶体金法检测轮状病毒抗原阳性率为50.69%(257/507),高峰月份在11月和12月,分别为63.27%(62/98)和62.16%(69/111)。

2.2 G、P分型结果

对257份轮状病毒抗原呈阳性的标本按比例(以采集时间先后顺序重新排序编号,每月门诊抽取奇数号,住院全查)共抽取出153份标本(门诊104份,住院49份)进行VP6基因检测,发现有6份标本呈阴性。胶体金法检测轮状病毒假阳性率为3.92%(6/153)。对剩下147份VP6基因呈阳性的标本全部进行G、P基因分型。G分型结果:G1型占40.14%(59/147);G2型占6.80%(10/147);G3型占17.01%(25/147);G4型占

2.04%(3/147);G9型占0.68%(1/147);未发现G8、G10、和G12型;尚有49份未能分型(GNT),占33.33%(49/147)。P分型结果:P[8]型占60.54%(89/147);P[4]型占6.12%(9/147);P[9]和P[10]型各有1例,分别占0.68%(1/147);未发现P[6]和P[11]型;尚有47份未能分型(PNT)。147份标本中同时能明确G、P分型的共56份。G、P型别组合最常见的是G1/P[8]型,占58.93%(33/56);其次是G3/P[8]和G2/P[4]型,分别占17.86%(10/56),14.29%(8/56)。

2.3 各G、P型别及其组合间腹泻病情比较

根据Ruuska和Vesikari等[5]提出的20点评分法对不同G、P型别及其组合的腹泻患者病情严重程度进行评分,评分范围包括腹泻天数、每天腹泻最高次数、呕吐天数、每天呕吐最高次数、每天平均呕吐次数、发热度数、脱水程度7个方面,最高分值20分,分值越高表示腹泻程度越严重。G1与G3型、P[4]与P[8]型以及P[8]型与PNT比较显示腹泻严重程度无统计学差异($P>0.05$)。在G/P组合中我们比较了G1和G3型分别与P[8]型组合成G1/P[8]、G3/P[8]型别时严重程度评分情况,结果显示在统计学上两者无统计学差异($P>0.05$)。见表2。

在发热和呕吐症状、日均呕吐次数、日均腹泻次数、腹泻天数方面上对各个G、P型别之间进行比较,结果均显示无统计学差异($P>0.05$)。

表2 不同G、P型别或组合的腹泻综合评分及其比较

型别或组合	例数	综合评分情况
G1	59	$P_{25}=6.0, P_{50}=9.0, P_{75}=13.0$
G3	25	$P_{25}=6.0, P_{50}=7.0, P_{75}=11.0$
P[4]	9	$P_{25}=5.0, P_{50}=8.0, P_{75}=9.5$
P[8]	89	$P_{25}=6.0, P_{50}=8.0, P_{75}=11.0$
PNT	47	$P_{25}=5.0, P_{50}=7.0, P_{75}=11.0$
G1/P[8]	33	$P_{25}=6.0, P_{50}=9.0, P_{75}=14.5$
G3/P[8]	10	$P_{25}=5.75, P_{50}=6.5, P_{75}=12.5$

3 讨论

轮状病毒核心由11个片段的双链RNA组成,基因组片段的平均长度为660~3 300个碱基对,每个RNA片段各编码一种蛋白,包括6种结构蛋白,即VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7和6种非结构蛋白NSP1~NSP6。VP6位于中层衣壳的表面,是由第6基因片段编码的亚组特异性蛋白,根据其抗原性的差异,将RV分为A~G 7组。成熟病毒的最外层衣壳包括VP7和VP4 2种蛋白。VP7为一种糖蛋白,由第9或7、8基因片段编码而成,不同病毒株有所不同,是主要的型特异性中和抗原,可刺激产生保护性中和抗体,这轮状病毒疫苗研制很重要。VP4是一种非糖蛋白,由第4基因片段编码,也可刺激产生中和抗体,它与VP7产生的中和抗体是相互独立的。

人类A组轮状病毒是世界范围内引起婴幼儿腹泻的主要病原,它在全球都有流行,但流行季节和型别在各个地方有差异。不同国家、地区,不同年份流行的轮状病毒的G、P型别及其组合可发生变化导致轮状病毒复杂、多变的分子流行病特征。按照NCBI的分类标准按VP7基因分型为(G型)有12个(G1、G2、G3、G4、G5、G6、G8、G9、G10、G11、G12)和GNTP(未能分型),其中5个(G1、G2、G3、G4、G9)型最为常见,且G9有增多趋势[6]。近年印度、日本、韩国等国家[7-9]有G8、G10、G12型感染儿童的报道。我国河北省卢龙县曾有罕见G5型报道[10]。我国2005年前的主要流行型别是G1型,现转向G3型为主。按照VP4区分的血清型(P型)至少有12个,引起婴幼儿腹泻的P型以P[8]和P[4]最为常见。

我们对重庆地区婴幼儿A组轮状病毒进行G、P分型,结果显示它与2001年张静等[11]报道的重庆地区G分型结果型别单一不同,也与先前其他地区报道的明显以某型占绝对优势的结果不同。重庆地区的轮状病毒G分型呈现多样化特点,其中仍以G1、G3型呈现小优势,分别占40.14%(59/147)和17.01%(25/147)。此外,除了目前国内常见的流行型别,G1、G2、G3、G4、G9各个G型别基本都能检测到外,尚有33.33%(49/147)的轮状病毒阳性标本未能够明确G分型,明显高于兰州[12,13]、苏州[14,15]、杭州[16]、河北卢龙县[17]等地先前报道的未能分型比例。我们对未能成功进行G分型的标本全部进行了G8、G10、G12分型,结果仍然没有阳性发现。由于147份标本经过特异性检测VP6基因均为阳性,故标本RNA降解的可能性很小。我们认为重庆地区的轮状病毒G型别与往年不同,也与其他地区的优势流行型别不同,呈现G型多样性特点。我们考虑重庆地区轮状病毒G型有可能存在其他独特未能分型的优势流行型别,不排除有其他种属的轮状病毒感染或过路于患者肠道的可能性。另外,Solberg等[18]在对轮状病毒作G、P分型时发现使用常用的分型引物不能进行常规G、P分型的比例分别高达63%和77%,他们认为不能分型的主要原因是引物错配引起的,这一现象在轮状病毒型别多样性的地区尤为明显。G分型在重庆地区出现多样性的这一现象明显有别于其他地区,值得重视和有待于进一步研究证实。P分型和全国其他地区一致,显示P[8]仍是主要的型别占有绝对优势,构成比高达60.54%(89/147)。在已经明确分型的G/P组合型别中G1/P[8]占有绝对优势,为58.93%。其次为G3/P[8]和G2/P[4],分别占

17.86%、14.29%。值得注意的是本研究发现了1例在国内少见的G9/P[8]组合,该组合可能出现于免疫力低下的患者,它曾在国外的老年看护所引起过小爆发[19]。

近年来,Bourdett-Stanziola等[20]在对轮状病毒分型研究中也发现在巴拿马、哥斯达黎加、多米尼加共和国收集的2 089份轮状病毒标本呈现出明显的G、P分型多样性和独特性特点,提示下一代轮状病毒疫苗研制工作需要考虑到为预防一些不常见的独特型病毒株提供充分保护。由于重庆地区轮状病毒G分型呈现出多样性特点,疫苗研制工作同样需要考虑多价疫苗才能获得更好的保护效应。

本研究在对轮状病毒G、P型别的临床症状比较后发现各个型别之间的临床症状均未发现有统计学差异,G1和G3分别与P[8]组合成G1/P[8]、G3/P[8]型别时腹泻严重程度评分也无统计学差异。这一结果与张丽杰等[21]的研究结果不同,这可能与不同地区流行的优势病毒株不同有关。重庆地区婴幼儿轮状病毒肠炎在临床表现方面缺乏型别或组合特异性,各个型别及组合都有可能出现严重腹泻,这在制定重庆地区轮状病毒肠炎的临床诊治措施和卫生防疫政策上需要注意。

总之,轮状病毒肠炎仍是引起重庆地区秋冬季婴幼儿急性胃肠炎的首要原因[22]。轮状病毒型别多样性是其在重庆地区的重要特点,疫苗研制与引进需要考虑多价疫苗;各个主要型别及组合之间临床特征无显著差异性,临床诊治工作需要引起注意。本研究为重庆地区研制和引进有效的轮状病毒新型多价疫苗以及制定重庆地区婴幼儿轮状病毒肠炎防治措施和政策提供科学依据,丰富了重庆地区轮状病毒感染的流行病学资料和临床研究资料。

参考文献:

[1] Luquero-Alcalde F J, Eiros-Bouza J M, Rubio A P, *et al*. Gastroenteritis by rotavirus in Spanish children. Analysis of the disease burden [J]. Eur J Pediatr, 2008, 167(5): 549 - 555.

[2] Samajdar S, Varghese V, Barman P, *et al*. Changing pattern of human group A rotaviruses: emergence of G12 as an important pathogen among children in eastern India[J]. J Clin Virol, 2006, 36(3): 183 - 188.

[3] 于秋丽, 刘立, 刘京生, 等. 2006年河北省病毒性腹泻的病原学监测分析[J]. 中国全科医学, 2008, 11(6): 479 - 481.

[4] Iturriza-Gomara M, Kang G, Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses[J]. J Clin Virol, 2004, 31(4): 259 - 265.

[5] Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes[J]. Scand J Infect Dis, 1990, 22(3): 259 - 267.

[6] Samajdar S, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, *et al*. Increase in prevalence of human group A rotavirus G9 strains as an important VP7 genotype among children in eastern India[J]. J Clin Virol, 2008, 43(3): 334 - 339.

[7] Le V P, Kim J Y, Cho S L, *et al*. Detection of unusual rotavirus genotypes G8P[8] and G12P[6] in South Korea[J]. J Med Virol, 2008, 80(1): 175 - 182.

[8] Castello A A, Nakagomi T, Nakagomi O, *et al*. Characterization of genotype P[9] G12 rotavirus strains from Argentina: high similarity with Japanese and Korean G12 strains[J]. J Med Virol, 2009, 81(2): 371 - 381.

[9] Sharma S, Ray P, Gentsch J R, *et al*. Emergence of G12 rotavirus strains in Delhi, India, in 2000 to 2007[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(4): 1343 - 1348.

[10] Li D D, Duan Z J, Zhang Q, *et al*. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China[J]. J Clin Virol, 2008, 42(2): 141 - 148.

[11] 张静, 王宁遂, 邓兵, 等. 重庆地区婴幼儿轮状病毒腹泻vp7型别分析[J]. 中华流行病学杂志, 2001, 22(4): 300 - 303.

[12] 张春芳, 金玉, 张又, 等. 兰州地区婴幼儿腹泻轮状病毒的分型特点[J]. 中华儿科杂志, 2002, 40(7): 409 - 412.

[13] 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[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(2): 117 - 122.

[14] 宋晓波, 陶方标, 丁慧, 等. 马鞍山、苏州地区婴幼儿轮状病毒腹泻临床特征和G血清型研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(3): 208 - 210.

[15] 武庆斌, 顾红英, 唐伟国, 等. 苏州地区轮状病毒腹泻的分子流行病学特征[J]. 江苏医药, 2005,31(2): 99 - 101.

[16] 童美琴, 陈黎勤, 尚世强, 等. 2001 - 2003年杭州地区婴幼儿腹泻轮状病毒vp7型别分析[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(8): 595 - 598.

[17] 方肇寅, 张丽杰, 唐景裕, 等. 中国河北省卢龙县儿童轮状病毒腹泻研究[J]. 病毒学报, 2005, 21(1): 21 - 26.

[18] Solberg O D, Hasing M E, Trueba G, *et al*. Characterization of novel VP7, VP4, and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus[J]. Virology, 2009, 385(1): 58 - 67.

[19] Sanz J C, Barbas J F, Lasheras M D, *et al*. Detection of a rotavirus G9P[8] outbreak causing gastroenteritis in a geriatric nursing home [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009, 27(4): 219 - 221.

[20] Bourdett-Stanziola L, Jimenez C, Ortega-Barria E. Diversity of human rotavirus G and P genotypes in Panama, Costa Rica, and the Dominican Republic[J]. Am J Trop Med Hyg, 2008, 79(6): 921 - 924.

[21] 张丽杰, 方肇寅, 曾光, 等. 轮状病毒G血清型和P基因型与腹泻严重程度的关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(2): 144 - 146.

[22] 刘凯军, 李晋涛, 魏昆, 等. 轮状病毒非结构蛋白1与种属限制性的相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 194 - 197.

(**收稿**:2009-05-06;**修回**:2009-06-26)

(编辑 邓强庭)