流行病学调查研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0242-04

重庆地区儿童诺如病毒基因型别特点研究

廖 炀,陈军华,刘作义,彭 哲,幸琳琳,张爱华,朱朝敏
(重庆医科大学附属儿童医院感染消化科,重庆 400014)

【摘 要】目的:了解重庆地区儿童诺如病毒(Norovirus,NV)基因型别特点。方法:收集 2008 年 8 月至 2009 年 7 月全年轮状病毒抗原阴性的急性非细菌性腹泻标本,用 real-time RT-PCR 方法扩增 NV ORF1-ORF2 结合区,测序扩增片段后进行比对并分型及构建系统进化树。结果:全年获得 806 份标本,共检测出 251 份为 NV 阳性标本,其中 GⅠ组 4 例,GⅡ组 247 例。NV 以 7~10 月份为高发月份,以 6~12 月龄婴儿最多见。已分型的 NV GⅡ基因组(108 例)以 GⅡ.4/2006b 占绝对优势,其构成比达 62.96%(68/108),其余次为 GⅡ.3 占 25.93%(28/108);GⅡ.6 占 6.48%(7/108);GⅡ.2 占 1.85%(2/108);此外还分别检测出 GⅡ.7、GⅡ.12、GⅡ.13 各有 1 例(1/108)。结论:重庆地区 NV 夏季发病率较高,流行毒株以 GⅡ.2006b 为主。

【关键词】诺如病毒;基因分型;婴幼儿;分子流行病学;RT-PCR
【中国图书分类法分类号】R725.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-13

The characterization of norovirus genotypes in children in Chongqing

LIAO Yang, et al
(*Department of Gastroenterology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the characteristics of norovirus genotype of children in Chongqing. *Methods*: Stool specimens of nonbacterial acute diarrhea with rotavirus antigen-negative were collected from August 2008 to July 2009. Real-time RT-PCR was used to detect the ORF1-ORF2 junction regions of norovirus. The sequencing fragments of RT-PCR products were blasted in GenBank and classified. Phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining method. *Results*: 251 of 806 stool specimens were detected for the norovirus-positive, of which 4 cases belonged to G Ⅰ group and 247, G Ⅱ group. It was most likely to occur in summer (from July to October)and in 6~12 months children. Among the sub-genotypes of G Ⅱ group (108 cases had been genotyped successfully), GⅡ.4/2006b was dominant, with a constituent ratio of 62.96% (68/108), and GⅡ.3 accounted for 25.93%(28/108); GⅡ.6, 6.48%(7/108); GⅡ.2, 1.85%(2/108). Besides, GⅡ.7, GⅡ.12, and GⅡ.13 were also detected. *Conclusion*: The prevalence of norovirus is found higher in summer in Chongqing, and GⅡ.2006b is the dominant genotype.

【Key words】norovirus; genotype; infant; molecular epidemiology; RT-PCR

诺如病毒(Norovirus,NV)是引起急性非细菌性胃肠炎的重要病原之一,NV 感染性腹泻在全世界范围内均有流行[1,2]。1995 年我国报道了首例 NV 感染,其后全国各地相继发生多起 NV 感染性腹泻暴发疫情。既往的研究表明不同国家、同一国家不同地区感染率都有所不同[3]。重庆地区对 NV 的研究资料比较缺乏。本研究调查了重庆地区非细菌性腹泻中 NV 的感染情况并对其进行基因分型,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 标本收集

定期收集 2008 年 8 月~2009 年 7 月全年因急性腹泻在重庆儿童医院门诊就诊或住院的儿童大便,经过胶体金免疫法作轮状病毒初筛试验后选取轮状病毒阴性的标本并经大便镜检或培养排除细菌性肠炎。符合上述条件的大便标本尽快存放于 -20℃中以备检测。全年共收集到所需标本 806 份。

1.2 病毒 RNA 提取

采用 Trizol 法提取大便标本中病毒核酸 RNA。用 Trizol 法提取病毒核酸。从 150 μl 的 20%大便悬液上清中提取 RNA,溶解于 25 μl 经 DEPC 处理过的去离子水中。

1.3 NV 检测与分型

1.3.1 采用 Real-time PCR 检测 NV GⅠ和 GⅡ 引物和探针根据文献合成[4],详见表 1。为提高 real-time PCR 荧光信号和扩增效率,对 5'引物做了修饰,增加 12 个碱基 AATAAATCATAA[5]。扩增 GⅠ型引物为 Cog1F flap/Cog1R flap 探针为 Ring 1a 和 Ring1b,扩增 GⅡ型引物为和探针为 Cog 2F flap/Cog 2R flap, 探针为 Ring 2。引物由上海生物工程技术有限公司合

作者介绍:廖 炀(1978-),男,主治医师,硕士,研究方向:儿童感染消化性疾病研究。
通信作者:朱朝敏,女,教授,Email: zhuchaomin@yahoo.com.cn。

成。检测试剂盒采用 Invitrogen 生产的 SuperScript™ Ⅲ Platinum™ One-Step Quantitative Kit 一步法定量试剂盒，加 5 μl RNA 模板，实验条件按说明书进行。50℃逆转录 15 min，95℃变性 2 min，接着进行 40 次 PCR 循环，每 1次循环温度为：95℃15 s，60℃ 30 s。Cycle threshol(CT)<40，判断为阳性，每 1 批实验设阴性对照(水)和阳性标准株对照(GⅡ阳性对照病毒株由中国 CDC 提供，GⅠ阳性株由实验筛选，测序确定为 GⅠ基因型)。阴性对照检测结果阴性且阳性对照株检测阳性被视为实验有效。

1.3.2 PCR 扩增和测序 为了对 NV 阳性株进一步鉴定基因亚型，将 real-time RT-PCR 扩增阳性的高信号标本(CT 值 <30)利用简并引物进一步做普通 RT-PCR 扩增 ORF1-ORF2 结合区，引物合成和扩增测序方法根据文献[6]进行。

1.3.3 NV 序列拼接和种系进化分析 根据 NV 衣壳蛋白 N/S 区的核苷酸序列对病毒做基因分型，用于 GⅠ型分型的核苷酸序列为 295 bp，相应于 Norwalk/68 第 5 358(编码 ORF2 密码子起始位点)~5 652 之间的核苷酸序列，用于 GⅡ分型的核苷酸序列为 282 bp，相应于 Lordsdal 第 5 085(编码 ORF2 密码子起始位点)~5 366 之间的核苷酸序列[6]。所有的序列用 Clustal X 进行比对，用 MRGA4.0 软件进行序列拼接比对及进化树分析，建进化树用邻接法(Neighbor-Joining，NJ)，bootstrap 检验重复 1 000 次。所有的原始序列与 Genbank 公布的 NV 序列做 Blast 比对，证实扩增的序列为 NV。

表 1 real time RT-PCR 检测 NV 的引物和探针序列

引物及探针	序列(5'→3')	极性	位置
Cog1F flap	5'-CGYTGGATGCGNTTYCATGA-3'	+	5 291
Cog1R flap	5'-CTTAGACGCCATCATCATTYAC-3'	-	5 375
Cog2F flap	5'-CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG-3'	+	5 003
Cog2R flap	5'-TCGACGCCATCTTCATTCACA-3'	-	5 100
Ring 1a	5'-FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA-3'	-	5 340
Ring 1b	5'-FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA-3'	-	5 240
Ring 2	5'-FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA-3'	+	5 048

注：Y 代表 C 或 T；R 代表 A 或 G；B 代表非 A；N 代表任何。FAM 代表报告基团，TAMRA 代表猝灭基团。+代表正向引物；-代表反向引物

2 结 果

全年获得轮状病毒抗原阴性标本共 806 例(门诊 695例，住院 111 例)，其中经 NV 检测共有 251 例阳性(门诊 221例，住院 30 例)，NV 阳性率为 31.14%。NV 患儿感染年龄1~114 月。详见表 2 所示。男女比例(158:93)。NV 每月检测阳性情况见表 3。NV 阳性标本中 GⅠ组 4 例，GⅡ组 247 例。选取高信号标本(CT 值 <30)进一步做普通 RT-PCR 扩增，PCR 产物直接用于测序分型。成功分型的标本共有 108 例(全部为 GⅡ群)。分型结果见表 4。软件构建系统进化树拓扑图见图 1。

3 讨 论

NV 最早于 1968 年在美国发现，当时根据发现地而取名为诺瓦克病毒。此后，世界各地陆续分离出多种与之相似的此类病毒样颗粒，称为诺瓦克样病毒(Norwalk-like virus，NLV)直至2002 年 8 月第八届国际病毒命名委员会批准名称为 NV。NV 在全球广泛分布，在急性非侵袭性腹泻病原中仅次于轮状病毒。本研究一共检测出 NV 251 例，在除外轮状病毒的急性非侵袭性腹泻病例中 NV 感染阳性检出率高达 31.14%(251/806)。这一结果与方肇寅等报道的检出率一致[3]。从 NV 患儿感染年龄分布情况 1~114月(P_{25}=7；P_{50}=10；P_{75}=14；Meadian=10；Mode=8)。年龄分布主要在小年龄组，尤其在 6~

表 2 感染 NV 患者年龄分布情况

分组情况	检出例数	构成比(%)
0月~	53	21.12%
6月~	120	47.81%
1岁~	63	25.10%
2岁~	8	3.19%
3岁~	1	0.40%
4岁~	0	0.00%
5岁~	6	2.39%

表 3 重庆地区每月 NV 检测情况

检测月份	检测样本数	NV 检出阳性例数	NV 检出阳性率(%)
2008 年 8 月	98	50	51.02%
2008 年 9 月	86	34	39.53%
2008 年 10 月	62	33	53.23%
2008 年 11 月	36	9	25.00%
2008 年 12 月	40	3	7.50%
2009 年 1 月	52	7	13.46%
2009 年 2 月	58	13	22.41%
2009 年 3 月	68	19	27.94%
2009 年 4 月	57	19	33.33%
2009 年 5 月	81	13	16.05%
2009 年 6 月	84	20	23.81%
2009 年 7 月	84	31	36.90%

表 4 NV 基因型别检测情况

型别	例数	构成比(%)
GⅡ.2006b	68	62.96%
GⅡ.2	2	1.85%
GⅡ.3	28	25.93%
GⅡ.6	7	6.48%
GⅡ.7	1	0.93%
GⅡ.12	1	0.93%
GⅡ.13	1	0.93%

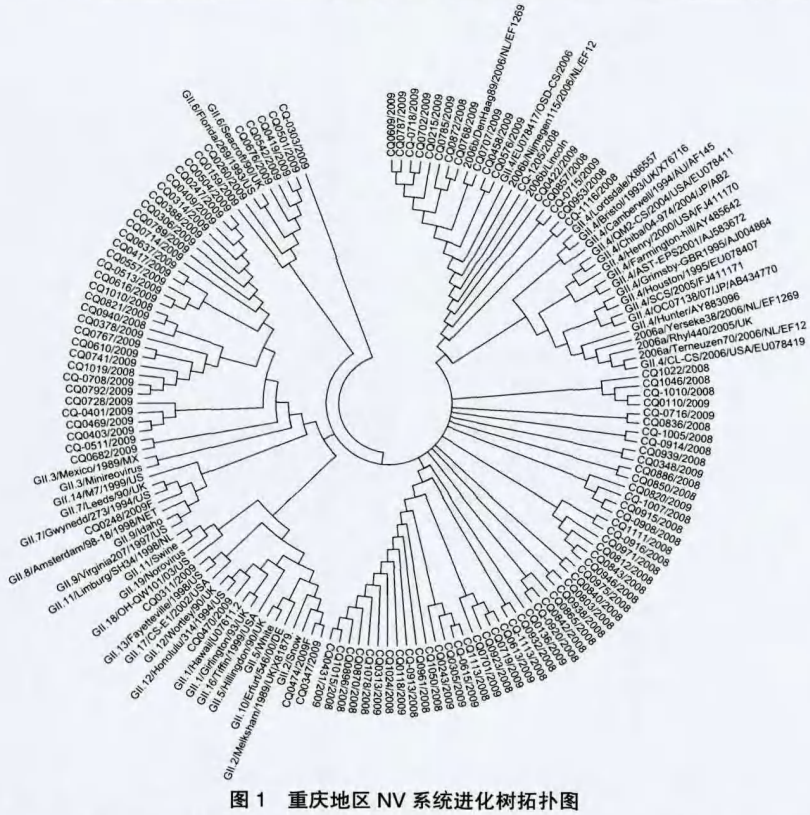


图 1 重庆地区 NV 系统进化树拓扑图

12 月年龄组,其构成比高达47.81%。本研究显示 NV 感染对象以 6 月后小婴儿最多见,这结果与国内目前资料一致[3]。NV 男女比例 (158:93), 其阳性率分别为: 男性为 31.54% (158/501), 女性为 30.49%(93/305),NV 发病率在男女性别上无统计学差异性(P=0.756)。从 NV 的流行季节来看,重庆地区全年 NV 感染高发季节为夏季(7 ~ 10 月),这与上海地区的调查结果基本一致[7],但较国内外其他地区秋冬季为高发季节有明显不同[3,8,9]。影响 NV 流行季节的因素很复杂[10],推测重庆夏季高发的可能原因是 NV 通过污染水或食品而引起感染流行[11-13],这与本地区夏季炎热和居民饮食习惯有关。

NV 是一种未被包裹的单股正链 RNA 病毒,病毒基因组包括 3 个开放读码框(Open reading frame, ORF)。ORF1 含有保守的 RdRp 区 (RNA dependent RNA polymerase),决定其分组属性。NV 主要分为 5 个基因组(GⅠ、GⅡ、GⅢ、GⅣ和GV), GⅠ和 GⅡ是引起人类急性胃肠炎的 2 个最主要基因组。ORF2 编码衣壳蛋白,包括 N 区、P 区和 S 区。衣壳蛋白不仅提供病毒的衣壳结构,并且也包含细胞受体结合位点和病毒血清型决定簇。衣壳蛋白序列组间差异可达 60%,型别间差异在 20% ~ 30%之间。Kageyama 等[14]认为 ORF2 基因的 N/S 区相对保守,是基因型 (Genotype)分型的最合适区域,并系统地把 GⅠ和 GⅡ 分别分为 14 个和 17 个亚型。近年研究发现 ORF1-ORF2 结合区同时包含有两个保守区(RdRp 区和 N/S 区)的绝大部分序列,针对 ORF1-ORF2 结合区设计引物能够明显提高 NV 的检出率并且有利于快速分型[4,6]。本研究运用针对 ORF1-ORF2 结合区的特异性分组引物检测出 NV 阳性标本中 GⅠ组 4 例,GⅡ组 247 例。重庆地区的感染以 GⅡ为多见,占 98.41%(247/251),与印度一致[15]。通过对 ORF 1-ORF 2 结合区扩增并测序比对,本研究资料显示 NV 基因分型以GⅡ.2006b 占绝对优势,其构成比达 62.96%(68/108),其次为 GⅡ.3,占 25.93%(28/108)。GⅡ.2006b 属于 GⅡ.4 基因型中的变异型别,它最早于 2006 年在欧洲发现,迅速向全球蔓延

并成为流行的优势型别[16-21]。GⅡ.2006b 变异毒株于 2006 年秋季开始在我国广东[22]、兰州[23]、北京[24]、辽宁[25]等地区出现流行,并在短时间内遍及全国各省。重庆地区的基因型构成符合上述流行变化情况,GⅡ.2006b 检出率高达 62.96%,其结果同中国疾病控制中心数据相一致[24]。

NV 测序得到核酸序列后使用 MRGA4.0 软件进行序列拼接比对及进化树分析。从进化树结果分析来看,重庆地区流行的优势毒株属于 GⅡ.4 型,尤其是该型中的变异毒株 GⅡ.2006b 为主要的流行毒株之一。同时结果还显示在重庆地区 NV 序列同源性较差,病毒多样性特点尤其明显,提示 NV 在重庆地区变异大,这可能与 NV 的进化重组有关。许多文献根据 ORF1 中 RdRp 区和 ORF2 衣壳蛋白基因的序列比对后,NV 可分属于不同的类群,认为病毒可能发生了遗传重组[26]。NV 重组位点就处在 ORF1 和 ORF2 之间的结合区。重庆 GⅡ.2006b 变异毒株与 DenHaag89/2006/NL 株同源性较高,该毒株同样属于 NV 重组毒株[27]。

重庆地区 NV 夏季发病率较高,流行毒株以 GⅡ.2006b 为主,病毒重组现象明显,在以后的疾病监测及预防工作中尤其需要注意。

参 考 文 献

[1] Sakai Y,Nakata S,Honma S,et al. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido,Japan[J]. Pediatr Infect Dis J,2001,20(9):849-853.

[2] Koo H L,Ajami N J,Atmar R L,et al.Noroviruses:The leading cause of gastroenteritis worldwide[J]. Discov Med, 2010,10(50): 61-70.

[3] 方肇寅,谢华萍,吕红霞,等. 1999～2005 年我国婴幼儿人杯状病毒腹泻研究[J]. 病毒学报,2007,23(1):9-15.

[4] Kageyama T,Kojima S,Shinohara M,et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR[J].J Clin Microbiol,2003,41(4):1548-1557.

[5] Afonina I, Ankoudinova I, Mills A, et al. Primers with 5' flaps improve real-time PCR[J]. Biotechniques, 2007,43(6): 770, 772,774.

[6] Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan[J].J Clin Microbiol,2004,42(7): 2988-2995.

[7] Xu J, Yang Y, Sun J, et al. Molecular epidemiology of norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Shanghai, China, 2001-2005[J]. J Med Virol, 2009,81(10): 1826-1830.

[8] 沈纪川,刘于飞,蔡衍珊,等. 广州市 2003-2007 年诺如病毒胃肠炎暴发疫情分析[J]. 华南预防医学,2008,34(6):44-45,47.

[9] Napiorkowska A, Sadkowska-Todys M. Epidemiological situation of human norovirus infections in Poland during 2004-2008[J].Przegl Epidemiol,2010,64(1): 27-33.

[10] Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change[J]. Clin Microbiol Infect, 2009,15(6): 524-527.

[11] Westrell T,Dusch V,Ethelberg S,et al. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010[J]. Euro Surveill,2010,15(12): pii:19524.

[12] Yu J H,Kim N Y,Koh Y J,et al.Epidemiology of foodborne norovirus outbreak in incheon, Korea[J].J Korean Med Sci,2010,25(8): 1128-1133.

[13] Webby R J,Carville K S,Kirk M D,et al. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia[J]. Clin Infect Dis,2007,44(8):1026-1031.

[14] Katayama K,Shirato-Horikoshi H,Kojima S,et al.Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses[J].Virology, 2002,299(2): 225-239.

[15] Chhabra P, Dhongade R K,Kalrao V R,et al. Epidemiological, clinical, and molecular features of norovirus infections in western India[J]. J Med Virol, 2009,81(5): 922-932.

[16] Pang X L,Preiksaitis J K,Wong S,et al. Influence of novel norovirus GⅡ.4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the Northern Territories,Canada between 2000 and 2008[J].PLoS One,2010,5(7): e11599.

[17] Le V P,Jung Y C,Kang K S,et al. Genetic characterization of norovirus GⅡ.4 2006b variants from Jeju island,South Korea[J].J Med Virol,2010,82(6): 1065-1070.

[18] Kittigul L,Pombubpa K,Taweekate Y,et al. Norovirus GⅡ-4 2006b variant circulating in patients with acute gastroenteritis in Thailand during a 2006-2007 study[J]. J Med Virol, 2010,82(5): 854-860.

[19] Belliot G,Kamel A H, Estienney M, et al. Evidence of emergence of new GGⅡ.4 norovirus variants from gastroenteritis outbreak survey in France during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 winter seasons[J]. J Clin Microbiol, 2010,48(3): 994-998.

[20] Chung J Y,Han T H,Park S H,et al. Detection of GⅡ-4/2006b variant and recombinant noroviruses in children with acute gastroenteritis, South Korea[J]. J Med Virol, 2010,82(1): 146-152.

[21] Bruggink L D,Marshall J A. Molecular changes associated with altered patterns of norovirus outbreak epidemics in Victoria, Australia, in 2006 to 2007[J]. J Clin Microbiol, 2010,48(3): 857-861.

[22] Li H,Mo Y L,Ke C W, et al. Molecular epidemiological characteristics of norovirus gastroenteritis outbreaks in Guangdong from 2005 to 2008[J]. Bing Du Xue Bao, 2010,26(3):202-207.

[23] Cheng W X,Ye X H,Yang X M,et al. Epidemiological study of human calicivirus infection in children with gastroenteritis in Lanzhou from 2001 to 2007[J]. Arch Virol, 2010,155(4): 553-555.

[24] Jin M,Xie H P,Duan Z J,et al. Emergence of the GⅡ4/2006b variant and recombinant noroviruses in China[J].J Med Virol,2008,80(11):1997-2004.

[25] 王作麟,韩 悦,安淑一,等. 诺如病毒 RT-PCR 检测及进化树分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2008,18(5): 783-785.

[26] 钟家禹,周 荣,朱 冰,等. 广州地区婴幼儿感染 Noro 病毒基因型的初步研究[J].中国循证儿科杂志, 2006,1(4):273-278.

[27] Nayak M K,Balasubramanian G,Sahoo G C,et al. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata,India[J].Virology, 2008,377(1): 117-123.

(责任编辑:关蕴良)