DOI:10.16016/j.1000-5404.201504160

2014年重庆地区511例急性腹泻儿童中诺如病毒腹泻流行特点与分子亚型鉴定

乔英琴,余 凤,陈婉冰,许红梅 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院感染科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室)

[**摘要**] **目的** 了解2014年重庆地区诺如病毒(norovirus,NV)感染所致儿童急性腹泻的感染现状、流行基因型以及发生基因重组情况。**方法** 2014年在重庆医科大学附属儿童医院门诊检验科收集符合纳入条件的腹泻标本511例,采用RT-PCR分别对NV GⅠ和GⅡ基因组的衣壳蛋白区进行扩增、测序,并对序列进行基因分型及构建进化树;为进行重组分析,再次对NV阳性标本的RdRp区和capsid区同时进行扩增,并用SimPlot进行重组鉴定。**结果** 共收集到符合条件的标本511例(男性290例,女性221例),检出NV GⅡ型67例,NV检出率为13.1%;8~10月为NV检出高峰,阳性率最高的年龄组为7~12月龄。67例NV阳性标本在capsid区测序成功,检测到5种基因型,依次是GⅡ.4 Sydney 2012型42例(62.7%),GⅡ.3型8例(11.9%)和GⅡ.17型8例(11.9%),GⅡ.6型7例(10.4%),GⅡ.14型2例(3.0%)。59例NV病毒阳性标本同时在RdRp区和capsid区测序成功,共检测到52例重组株,4种重组型分别是GⅡ.e/GⅡ.4 Sydney 2012型42例、GⅡ.12/GⅡ.3型6例、GⅡ.7/GⅡ.6型2例、GⅡ.7/GⅡ.14型2例。**结论** 2014年重庆地区NV检出率为13.1%,GⅡ.4 Sydney 2012为最主要流行基因型,且NV重组现象十分明显。

[**关键词**] 诺如病毒;腹泻;基因型;基因重组
[**中图法分类号**] R195.4; R373.2; R446.5 [**文献标志码**] A

Epidemiological characteristics and molecular subtype identification of norovirus-associated diarrhea in 511 children from Chongqing region during the year of 2014

Qiao Yingqin, Yu Feng, Chen Wanbing, Xu Hongmei (Department of Infectious Diseases, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the prevalence of norovirus-associated acute viral diarrhea in children from Chongqing in the year of 2014, and analyze the genotypes and recombination. **Methods** All norovirus-associated diarrhea samples were collected from children with acute viral diarrhea admitted in our hospital during the year of 2014. RT-PCR was used to amplify the capsid region of NV GⅠ and GⅡ. All the positive products were sequenced, and the obtained sequences were analyzed for genotyping and phylogenetic tree. To study the NV recombination, both RdRp and capsid regions of all the positive products were amplified, and the recombination was identified by SimPlot software. **Results** There were 511 specimens collected from 290 male and 221 female children, and 67 of them positive to NV GⅡ, with a positive rate of 13.1% (67/511). The NV epidemic peak was from August to October, and the peak age group was between 7 to 12 months old groups. Five genotypes based on capsid gene diversity were identified in 67 norovirus strains, including GⅡ.4 Sydney 2012 (42/67, 62.7%), GⅡ.3 (8/67, 11.9%), GⅡ.17 (8/67,

[**基金项目**] "十二五"国家科技重大专项(2012ZX10004212-003)
[**通信作者**] 许红梅,E-mail:xuhongmwpx@yahoo.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.021.html(2015-11-24)

11.9%), GⅡ.6 (7/67, 10.4%), and GⅡ.14 (2/67, 3.0%). Fifty-nine norovirus strains were sequenced successfully in the both RdRp and Capsid regions at the same time. Fifty-two specimens were recombination strains, and 4 recombination types of NV GⅡ were detected, including GⅡ.e/GⅡ.4 Sydney 2012 (42/52, 80.8%), GⅡ.12/GⅡ.3 (6/52, 11.5%), GⅡ.7/GⅡ.6 (2/52, 3.8%), and GⅡ.7/GⅡ.14 (2/52, 3.8%). **Conclusion** The positive rate of NV is 13.1% in Chongqing region in the year of 2014, GⅡ.4 Sydney 2012 is the predominant strain, and NV recombination is very common.

[**Key words**] norovirus diarrhea; genotypes; recombination

Supported by the Major Special Project of the "Twelfth Five-year Plan" for National Science and Technology (2012ZX10004212-003). Corresponding author: Xu Hongmei, E-mail: xuhongmwpx@yahoo.com

腹泻严重影响着全球儿童的健康,每年有30亿~50亿人患急性腹泻,其中有150万~250万5岁以下的儿童死于腹泻及腹泻相关并发症。轮状病毒(rotavirus,RV)和诺如病毒(norovirus,NV)是造成儿童非细菌性胃肠炎的主要病原体,然而在轮状病毒疫苗使用之后,NV所致腹泻在儿童急性腹泻中担当着越来越重要的角色,成为引起儿童病毒性腹泻的第二大病原。据统计,NV每年可造成100万人次的住院和近20万5岁以下儿童的死亡[1]。目前我国大多数医院已将轮状病毒列为腹泻的常规检查病原,但未将NV列入其中,在不同地区NV的优势流行株存在差异,而且随着基因重组越来越多,NV的流行日趋复杂。因此,为了解重庆地区NV的分子流行病学特点,本研究对2014年重庆区域急性病毒性腹泻患儿的粪便标本进行收集并检测,为重庆区域NV感染提供更多的流行病学相关资料,也为NV相关腹泻预防和控制措施的制定提供有意义的参考依据。

1 材料与方法

1.1 标本材料

以2014年1-12月在重庆医科大学附属儿童医院门诊检验科收集的临床诊断为急性病毒性胃肠炎的粪便标本511例为研究对象。标本纳入标准:①腹泻病程必须在2周以内;②粪便性状有改变以及每日排便次数在3次及以上;③镜检白细胞数每高倍视野小于10个[2]。排除标准:因其他系统感染长期使用抗生素而导致的腹泻。

1.2 主要试剂

QIAamp核酸提取试剂盒购自德国QIAGEN公司;SuperScript Ⅲ逆转录试剂盒购自美国Invitrogen公司;RT-PCR试剂盒和琼脂糖购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 RT-PCR 用RT-PCR对NV进行检测和序列分析 QIAamp核酸提取试剂盒病毒提取NVRNA,用SuperScript逆转录试剂盒逆转录为DNA,然后用RT-PCR试剂盒对NV衣壳蛋白区(capsid)进行扩增(分别用G1SKF/G1SKR为引物扩增NV GⅠ基因组,CoG2F/G2SKR为引物扩增NV GⅡ基因组,扩增区域见图1,引物序列及反应条件见参考文献[3-4])。再将PCR产物用琼脂糖凝胶电泳对进行鉴定,对所有阳性PCR产物进行胶回收、纯化,然后送上海英骏公司测序。所测序列用NV基因分型工具(http://www.Rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool/)进行分型[5],最后使用MEGA 5.05构建进化树(遗传距离采用Kimura's 2-parameter,置信度运用boot-strap法检验,重复1 000次)。

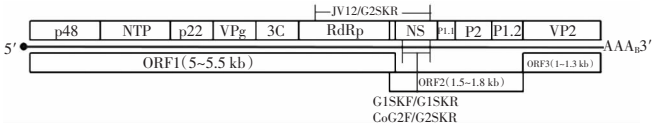


图1 RT-PCR对诺如病毒进行扩增示意图

1.3.2 NV重组分析 整理上述检测分型成功的NV阳性的cDNA标本,再次用RT-PCR同时扩增部分RdRp区和capsid的部分基因片段(所用引物为JV12/G2SKR,扩增区域见图1,引物序列及反应条件见参考文献[6]),扩增成功后再次测序,然后用NV基因分型工具分别按照RdRp区和capsid区进行基因分型,分型不一致则考虑基因重组,然后随机选取重组代表株用SimPlot再次进行重组鉴定。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件对各项实验数据进行分析,使用χ^2检验对率进行比较。

2 结果

2.1 NV检出率及患儿年龄分布

511份标本纳入本研究(男性290例,女性221例,

男女比例1.3∶1),未检测出NV GI型,共检出NV GⅡ型67例,NV总检出率13.1%(67/511)。NV阳性的患儿中,男性38例,女性29例,男女NV检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。对511例患儿的年龄进行统计分析,年龄分布为1月龄至14岁,年龄中位数为12月龄。NV检测阳性率最高年龄组为7-12月龄,再对NV阳性的患儿按照年龄组进行统计分析,结果见表1。

表1 2014年重庆地区儿童NV腹泻年龄分布

年龄	总例数	NV阳性数(例)	NV检出率(%)	NV阳性病例累计构成比(%)
0~6月	97	7	7.2	10.4
7~12月	167	28	16.8	52.2
13~18月	108	15	13.9	74.6
19~24月	64	8	12.5	86.6
25~60月	64	8	12.5	98.5
>60月	11	1	9.1	100.00
合计	511	67	13.1	—

2.2 NV腹泻季节分布及临床特征

对NV腹泻进行季节性分析,除2014年4月份外,其余各月份均有NV GⅡ型检出,NV以8-10月为检出高峰(图2),不同月份间NV检出率的差异具有统计学意义($\chi^2=58.583$,$P<0.05$)。NV感染阳性的患儿均有腹泻表现,大便性状多为水样便,其中阳性患儿中36例(53.7%,36/67)患儿伴有呕吐,呕吐时间为1~3 d,呕吐多在进食后出现,呕吐物均为胃内容物,没有胆汁及咖啡色样的物质,另外有19例(28.4%,19/67)合并呼吸道症状(流涕、咳嗽、打喷嚏等),此外还有7例(10.4%,7/67)患儿伴有发热,除1例为中热外,体温38.8 ℃,其余6例均为低热。

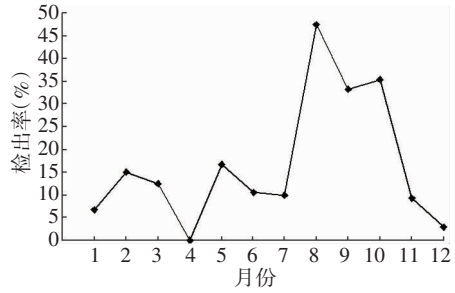


图2 2014年重庆地区儿童NV腹泻季节性分布

2.3 NVGⅡ基因型分型

67例NV阳性均测序成功,然后按照衣壳区分型,共5种基因型,依次是GⅡ.4 Sydney 2012(62.7%,42/67),GⅡ.3(11.9%,8/67),GⅡ.17(11.9%,8/67),GⅡ.6(10.4%,7/67),GⅡ.14(3.0%,2/67)。将所测序列与GenBank下载的标本毒株(参考毒株为AB901276、KF306213、AB919088、GU017903、KJ533134)的参考序列一起构建系统进化树(图3),为了使基因树更简洁、形象,图3中只列出了每种基因型的代表株,并未将全部67株加入进化树的构建。

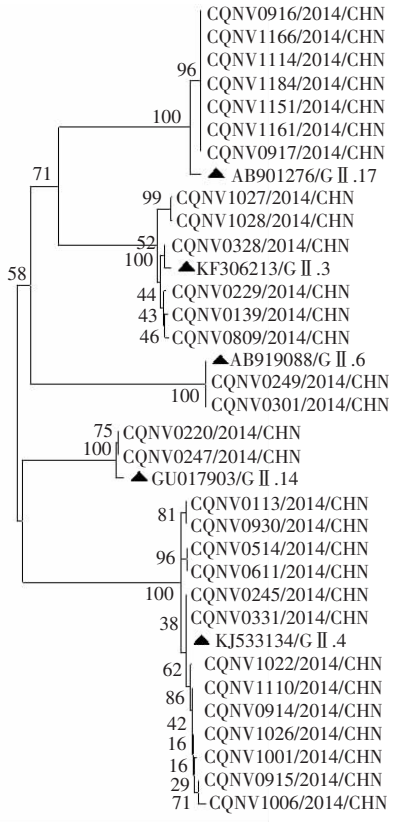


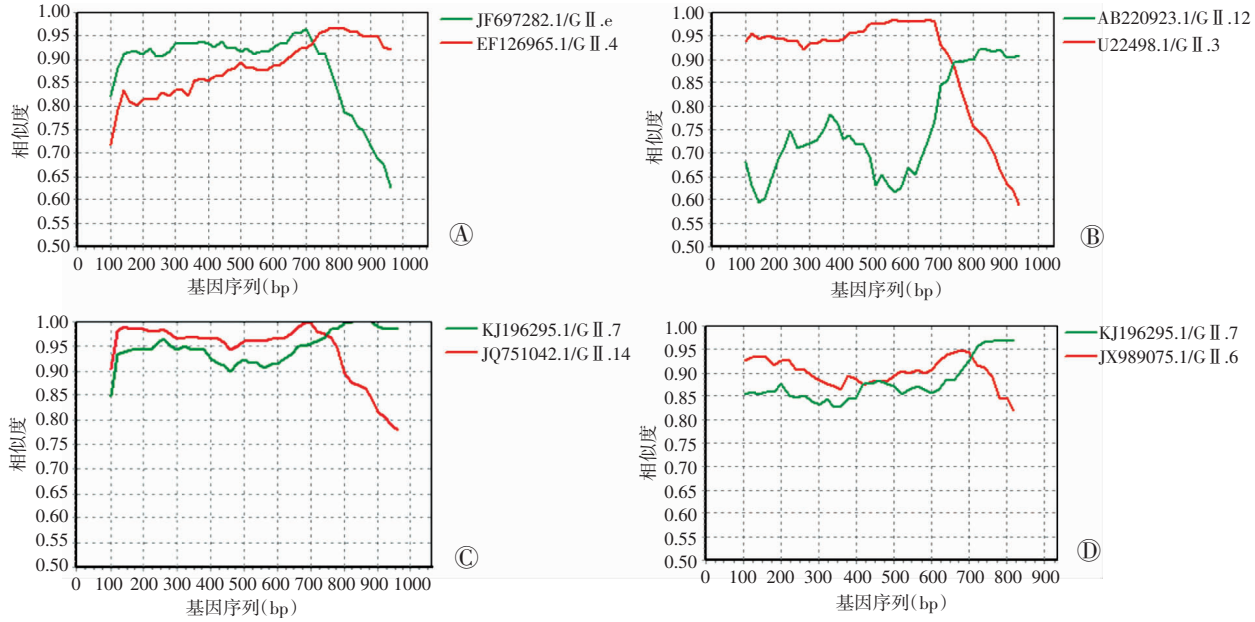
图3 2014年重庆地区NV按capsid区分型构建系统进化树

2.4 NV重组分析结果

67例阳性标本中59例同时扩增RdRp区和capsid区测序成功,另外8例因产物浓度低导致测序失败。所有59例标本同时按RdRp区和capsid区进行基因分型,通过统计分析,包括5种基因型,依次是GⅡ.e/GⅡ.4型42例、GⅡ.12/GⅡ.3型6例,GⅡ.7/GⅡ.14型2例、GⅡ.7/GⅡ.6型2例、GⅡ.17/GⅡ.17型7例。发现其中52例按这两种方法的分型结果不一致,则考虑为可疑重组株,为进一步确定是由于两种病毒混合感染还是因NV病毒重组引起,再次用SimPlot3.5.1软件对52例标本的基因序列进行重组鉴定,通过分析鉴定发现均为重组株(图4中随机列出了4种重组类型的代表株各1例CQNV0113/2014/CHN、CQNV0229/2014/CHN、CQNV0220/2014/CHN、CQNV0249/2014/CHN)。重组株在不同性别及年龄中分布如下表所示(表2)。

表 2 诺如病毒重组株在不同性别及年龄组中分布

重组型别	总数(例)	性别		年龄组					
		男	女	0~6 月	7~12 月	13~18 月	19~24 月	25~60 月	>60 月
GⅡ.7/GⅡ.6	2	1	1	1	0	0	1	0	0
GⅡ.7/GⅡ.14	2	1	1	0	2	0	0	0	0
GⅡ.12/GⅡ.3	6	4	2	2	3	1	0	0	0
GⅡ.e/GⅡ.4	42	25	17	4	19	11	5	3	0
合计	52	31	21	7	24	12	6	3	0



A:CQNV0113/2014/CHN(GⅡ.e/GⅡ.4);B:CQNV0229/2014/CHN(GⅡ.12/GⅡ.3);C:CQNV0220/2014/CHN(GⅡ.7/GⅡ.14);D:CQNV0249/2014/CHN(GⅡ.7/GⅡ.6)

图 4 用 SimPlot 对代表株的基因序列进行重组分析结果

3 讨论

本研究发现 NV 检出率为 13.1%,比重庆 2009 年(31.1%)及 2012 年(21.88%)、杭州 2013 年(17.9%)NV 检出率低[7-9]。2012 年衢州市(11.18%)及 2012 年安徽(12.02%)检出率相近[10-11]。NV 检出率最低的是 0-6 月龄(7.2%),NV 检出率最高的年龄组为 7-12 月龄(16.8%),与重庆(2009、2012 年)、南京(2012 年)[7-8,12]等全国大多数地区报道的高发年龄一致,可能与该年龄段婴儿的自身免疫体系还未发育完全,而从母体胎盘得到的自身保护性抗体又渐渐消失密切相关。对 NV 阳性的患儿进行年龄组统计,发现 2 岁以内婴幼儿占总阳性数的 86.6%,提示 2 岁以内儿童仍是 NV 腹泻的主要群体,其中又以 7-12 月龄的婴幼儿为最重要的组成部分,因此以后在临床工作中需对该年龄段的儿童重点关注。

2014 年以 8-10 月为检出高峰,本研究与之前同样在重庆地区 2009 年及 2012 年的调查研究 NV 的检出高峰相一致。本研究 8-10 月标本数量与其他季节比较相对较少,考虑到与夏季腹泻的患儿较少且多以细菌性腹泻为主,造成标本收集困难有关,但结合前几年重庆地区 NV 腹泻的流行病学资料,仍在一定程度上说明在重庆地区 NV 病毒的流行高峰季节为温度较高的 8-10 月。同样也与上海地区(2009-2011 年)[13] NV 所致儿童腹泻的高发季节一致。严寒秋等[14]报道北京地区 10 月为 NV 感染高峰;日本、韩国及欧美等发达国家则以冬春季流行为主[15]。NV 在不同地区的高发季节会有所差异,受所在地的温度、湿度、饮食结构及习惯、人群免疫力及新型变异株等影响,因此,应根据当地的流行特点对 NV 的流行来进行监控。

目前,全球对 NV 的分型主要针对 capsid 区进行分型,本研究检测发现 NV GⅡ.4 型依然是重庆地区的优势流行株,所占病例高达 62.7%,与国内外报道一致[16-18]。本研究结果显示 GⅡ.4 只检测出 GⅡ.4 Sydney 2012 变异株。在我国前几年 NV 的流行株主要是 GⅡ.4 2006b 和 GⅡ.4 New Orleans 2009,但近两三年来 GⅡ.4 Sydney 也逐渐在我国上海、北京、香港等地区被检出,并逐渐成为流行优势株。在重庆地区 GⅡ.4 Sydney 首次在 2012 年冬季检出,并取代 GⅡ.4_2006b 成为 2012 年重庆地区冬季的优势流行株[19]。本研究发现,在 2014 年重庆地区的优势流行株依然是 GⅡ.4 Sydney 2012,且未再检测出 GⅡ.4 2006b 和 GⅡ.4 New Orleans。GⅡ.3 和 GⅡ.6 基因型既往在 2008、2009、2011、2012 年重庆地区均有检出过[7-8,20],说明这两种基因型仍继续在重庆地区持续流行。本研究还检测出 2 例 GⅡ.14,该基因型既往在重庆地区未曾有过报道,但在我国上海(2009 年)、广西(2011 年)等地区曾报道过该基因型[13,21]。本研究还检测出 8 例 GⅡ.17,该基因型在重庆地区同样为首次报道,靳淼等[22]曾在一起暴发性胃肠炎中检测报道过该基因型,在我国其他省市对该基因型的报道也很少。本研究可以看出,重庆地区 2014 年 NV 的流行以 GⅡ.4 Sydney 2012 为主,但其他流行基因型的变化更加复杂多样,复杂多变的基因型对我们 NV 防控措施的制定又是一个很大的挑战,所以还有待长期监测研究。

基因重组是 NV 进化的主要驱动力,也是 NV 基因多样性及产生暴发流行的最重要原因,通常 NV 基因重组是指 RdRp 区和 capsid 区分别属于不同的基因型,重组位点通常位于 OFR1 和 OFR2 的重叠区,第 1 例重组株由 Jiang 等[23]首先发现。目前全球不断有新的重组类型出现。NV 基因重组最常发生在 GⅡ.b/GⅡ.3、GⅡ.12/GⅡ.3、GⅡ.4/GⅡ.3 之间[24]。我国常见的重组株为 GⅡ.7/GⅡ.6 和 GⅡ.12/GⅡ.3。本研究重组鉴定发现 2014 年重庆地区 NV 基因重组的现象十分明显,GⅡ.e/GⅡ.4 Sydney 2012 既往在重庆、上海等地区有过报道[8,25],GⅡ.12/GⅡ.3 重组株在 2011-2013 年重庆地区也有过报道[19],说明 GⅡ.12/GⅡ.3 重组株近4年来仍在重庆地区持续流行,GⅡ.7/GⅡ.6 重组株仅在 2012 年重庆地区有过 1 例报道[8],本研究还在重庆地区发现一种新的病毒重组株 GⅡ.7/GⅡ.14。本研究发现 2014 年重庆地区 NV 的流行以重组株 GⅡ.e/GⅡ.4 Sydney 2012 型和 GⅡ.12/GⅡ.3 为主,且 NV 重组现象十分明显,说明流行日趋复杂,对 NV 疫苗的研制又提出了巨大的挑战。

参考文献:

[1] Patel M M, Widdowson M A, Glass R I, *et al*. Parashar Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14 (8): 1224-1231. DOI: 10.3201/eid1408.071114

[2] 方鹤松. 中国腹泻病诊断治疗方案[J]. 临床儿科杂志, 1994, 12(3): 148-151.

[3] Vinje J, Vennema H, Maunula L, *et al*. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1423-1433.

[4] Khamrin P, Okame M, Thongprachum A, *et al*. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea[J]. J Virol Methods, 2011, 173(2): 390-393. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.02.012

[5] Kroneman A, Vennema H, Deforche K, *et al*. An automated Genotyping tool for enteroviruses and noroviruses[J]. J Clin Virol, 2011, 51(2): 121-125. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.03.006

[6] 谢晓丽, 张伟, 廖雪春, 等. 成都地区婴幼儿病毒性腹泻分子流行病学研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2012, 26(1): 2-4. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2012.01.002.

[7] 廖炀, 陈军华, 刘作义, 等. 重庆地区儿童诺如病毒基因型别特点研究[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(2): 242-245

[8] 唐香, 陈茹娟, 赖方方, 等. 2012 年重庆单中心腹泻患儿感染诺如病毒及其基因型别和重组的研究[J]. 中国循证儿科杂志, 2014, 9(3): 167-171. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2014.03.002.

[9] 王海燕, 涂林修, 叶鸿雁. 婴幼儿急性腹泻病毒检测结果[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(8): 848-850.

[10] 张建民, 陈旭富, 黄世腾, 等. 衢州市 2011 年-2012 年 5 岁以下儿童病毒性腹泻监测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(10): 1468-1470.

[11] 史永林, 查震球, 胡万富, 等. 2011-2012 年安徽省哨点医院婴幼儿病毒性腹泻分子流行病学特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(6): 508-511.

[12] 林谦, 金玉, 周进苏, 等. 2009 至 2010 年南京儿童医院 5 岁以下儿童病毒性腹泻分子流行病学特点[J]. 中国循证儿科杂志, 2012, 7(1): 31-36. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2012.01.006.

[13] 姚玮蕾, 蔡洁皓, 王相诗, 等. 上海地区 2009 至 2011 年

儿童诺如病毒腹泻病的监测研究[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(5): 339 - 344. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.05.005.

[14] 严寒秋, 李伟红, 高志勇, 等. 2011 年北京地区婴幼儿病毒性腹泻病原学研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(10): 919 - 921, 956.

[15] Ham H, Oh S, Seung H, *et al*. Molecular Characteristics of noroviruses genogroup I and genogroup Ⅱ detected in patients with acute gastroenteritis[J]. Ann Lab Med, 2015, 35(2): 242 - 245. DOI: 10.3343/alm.2015.35.2.242

[16] Lu L, Zhong H, Xu M, *et al*. Molecular epidemiology of human calicivirus infection in children with acute diarrhea in Shanghai: a retrospective comparison between inpatients and outpatients treated between 2006 and 2011[J]. Arch Virol, 2014, 159(7): 1613 - 1621. DOI: 10.1007/s00705-013-1881-6

[17] 张海龙, 李苑, 姚相杰, 等. 2010 - 2011 年深圳市宝安区诺如病毒的分子特征分析[J]. 国际病毒学杂志, 2013, 20(3): 118 - 122. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2013.03.006.

[18] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, *et al*. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(8): 1389 - 1395. DOI: 10.3201/eid1708.101837

[19] Lu Q B, Huang D D, Zhao J, *et al*. An increasing prevalence of recombinant GⅡ norovirus in pediatric patients with diarrhea during 2010 - 2013 in China[J]. Infect Genet Evol, 2015, 31: 48 - 52. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.01.008

[20] 任增志, 孔元梅, 王倩倩, 等. 重庆地区 5 岁以内儿童腹泻病毒病原及流行病学特点[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(4): 548 - 552.

[21] Tan D, Deng L, Wang M, *et al*. High prevalence and genetic diversity of noroviruses among children with sporadic acute gastroenteritis in Nanning City, China, 2010 - 2011[J]. J Med Virol, 2015, 87(3): 498 - 503. DOI: 10.1002/jmv.24103

[22] 靳淼, 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[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(5): 549 - 553. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.017.

[23] Jiang X, Espul C, Zhong W M, *et al*. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant[J]. Arch Virol, 1999, 144(12): 2377 - 2387.

[24] Hoa-Tran T N, Trainor E, Nakagomi T, *et al*. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GⅡ.4 variants[J]. J Clin Virol, 2013, 56(3): 185 - 193. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.11.011

[25] 沈震, 王刚, 宰淑蓓, 等. 诺如病毒新型 GⅡ.4 流行株 Sydney_2012 在上海地区的检出和鉴定[J]. 病毒学报, 2013, 29(6): 608 - 614.

(**收稿**:2015-03-10;**修回**:2015-06-30)

(编辑 黄 超)