

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.02.006

论著·临床研究

天津地区急性胃肠炎患儿诺如病毒分子流行病学分析

方玉莲¹ 王维¹ 王萍¹ 赵煜² 张同强³ 李璇¹ 范超萌¹ 林书祥¹

(1. 天津市儿童医院 / 天津市儿科研究所, 天津 300134; 2. 天津市儿童医院消化科, 天津 300134;
3. 天津市儿童医院呼吸科, 天津 300134)

[摘要] **目的** 了解2017年天津地区急性胃肠炎患儿诺如病毒(NoV)分子流行病学特征。**方法** 收集2017年1~12月天津市儿童医院疑似由病毒感染引起的急性胃肠炎患儿的粪便标本758份,采用荧光定量RT-PCR方法对NoV进行初筛,运用传统RT-PCR方法对阳性标本的衣壳蛋白VP1区进行基因扩增、基因测序和鉴定基因型别。**结果** 758份粪便标本中检出GII型NoV 241份,阳性率为31.8%。对阳性标本进行衣壳蛋白VP1区测序,发现GII型标本中以GII.4亚型为主,占28.6%(69/241);其次为GII.3亚型,占21.2%(51/241);GII.2亚型占10.0%(24/241);其他亚型占7.5%(18/241)。不同年龄组间NoV检出率差异有统计学意义($P=0.018$),其中1~<4岁组阳性检出率最高(37.3%)。不同季节的NoV检出率差异具有统计学意义($P<0.001$),其中冬季为高发季节(48.1%)。27份(3.6%)标本存在NoV和轮状病毒(RtV)的混合感染。**结论** NoV是2017年天津地区该组急性胃肠炎患儿的主要病原体之一;GII基因型特别是GII.4亚型是流行优势毒株;NoV感染在4岁内儿童更为常见;冬季为流行高峰;存在与RtV混合感染的情况。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(2): 139-143]

[关键词] 急性胃肠炎; 诺如病毒; 基因型; 儿童

Molecular epidemiology of norovirus in children with acute gastroenteritis in Tianjin, China

FANG Yu-Lian, WANG Wei, WANG Ping, ZHAO Yu, ZHANG Tong-Qiang, LI Xuan, FAN Chao-Meng, LIN Shu-Xiang. Pediatric Research Institute, Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300134, China (Lin S-X, Email: ljunjund@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the molecular epidemiological characteristics of norovirus (NoV) among children with acute gastroenteritis in Tianjin in 2017. **Methods** A total of 758 stool specimens were collected from the children with acute gastroenteritis possibly caused by viral infection in Tianjin Children's Hospital between January and December, 2017. Quantitative real-time RT-PCR was used for primary screening of NoV, and conventional RT-PCR was used for gene amplification, sequencing and genotype identification of the VP1 region of capsid protein in positive specimens. **Results** Among the 758 specimens, 241 (31.8%) were found to have GII NoV. Sequencing of the VP1 region of capsid protein in positive specimens showed that among the 241 specimens with GII NoV, 69 (28.6%) had GII.4 subtype, 51 (21.2%) had GII.3 subtype, 24 (10.0%) had GII.2 subtype, and 18 (7.5%) had other subtypes. There was a significant difference in NoV detection rate between different age groups ($P=0.018$), and the 1-<4 years group had the highest NoV detection rate (37.3%). There was also a significant difference in NoV detection rate across seasons ($P<0.001$), and there was a highest NoV detection rate in winter (48.1%). Twenty-seven children (3.6%) had co-infections with NoV and rotavirus. **Conclusions** NoV is one of the major pathogens of the children with acute gastroenteritis from Tianjin in 2017. GII genotype, especially GII.4 subtype, is the prevalent strain. NoV infection is commonly seen in children less than 4 years and reaches the peak in winter. Some children are found to have co-infections with rotavirus.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(2): 139-143]

Key words: Acute gastroenteritis; Norovirus; Genotype; Child

[收稿日期] 2018-09-14; [接受日期] 2018-12-14

[基金项目] 天津市卫生局科技基金(2011KZ33; 2015KZ038)。

[作者简介] 方玉莲, 女, 硕士研究生, 研究实习员。

[通信作者] 林书祥, 男, 副主任技师。Email: ljunjund@sina.com。

诺如病毒 (norovirus, NoV) 是引起暴发性和散发性非细菌性胃肠炎的重要病原体, 全世界约有 20% 急性胃肠炎病例是由 NoV 引起^[1]。NoV 属于杯状病毒科诺如病毒属, 其基因组全长约 7.5 bp。NoV 分为 5 个基因组 (GI~V), 可感染人类的有 GI、GII 和 GIV 组毒株^[2], 其中以 GII 型感染最为常见, 且每组病毒又包含多种基因型。人类 NoV 基因组由 3 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 组成, ORF1 编码 6 个非结构蛋白, 其中包括 RNA 聚合酶 (RNA dependent RAN polymerase, RdRp), ORF2 和 ORF3 分别编码主要衣壳蛋白 VP1 及小衣壳蛋白 VP2^[3]。研究表明 NoV 通常可导致轻微和自限性疾病, 典型临床表现为急性腹泻、发热和呕吐等症状, 严重者可导致死亡^[4]。NoV 具有高度的变异性, 持续监测 NoV 感染性急性胃肠炎的病原学特征及基因型的演化情况有助于 NoV 感染的预防和控制。本研究对天津地区住院急性胃肠炎患儿中 NoV 的分子流行病学特征进行分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2017 年 1~12 月期间就诊于天津市儿童医院疑似由病毒感染引起的急性胃肠炎患儿的粪便标本 758 份, 其中男 469 例, 女 289 例, 年龄 1 个月至 12 岁。纳入标准: (1) 24 h 排便 ≥ 3 次, 且大便性状有改变 (呈稀便、水样便等), 大便常规镜检白细胞 < 15 个, 未见红细胞; (2) 24 h 排便 < 3 次, 但伴有大便性状改变和呕吐症状或以呕吐为主要症状^[5]。

1.2 样本的采集和病毒 RNA 提取

采集患儿入院 3 d 内的粪便标本于专用无菌便盒中, 取约 500 μ L 大便标本, 加生理盐水至 1 L, 配置 50% 的混悬液, 充分震荡混匀后, 离心 10 min (12000 r/min), 严格按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 的操作说明进行病毒 RNA 提取。

1.3 病毒初筛

应用湖北朗德医疗科技有限公司生产的 NoV 核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 对临床样本进行 NoV 的初筛, 所用仪器为 ABI7500。反应体系: 反应液 35.8 μ L, 酶 4.2 μ L, 待测样本 RNA 10 μ L, 总体系 50 μ L。扩增条件: 42 $^{\circ}$ C 30 min,

95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。结果判断: 如果扩增曲线呈 S 型且 Ct 值 ≤ 36 , 则结果为阳性; 如果扩增曲线不呈明显 S 型或 $36 < Ct$ 值 < 40 , 则对样本进行复检, 若复检结果仍为 $36 < Ct$ 值 < 40 , 则结果为阴性; 如果扩增曲线不呈 S 型、Ct 值显示为 “undet” 或无 Ct 值, 则结果为阴性。采用金标法检测轮状病毒 (rotavirus, RtV) 和腺病毒 (adenovirus, ADV) (艾博生物医药杭州有限公司)。

1.4 VP1 区序列扩增及测序

首先将样本 RNA 用随机六聚体引物逆转录合成 cDNA (Quant cDNA 第一链合成试剂盒, 天根生化科技有限公司), 保存 -20° C 备用。随后应用试剂盒 (TaKaRa Premix Taq, 大连宝生物有限公司) 对 NoV 初筛为阳性的标本进行 VP1 区的扩增, 扩增引物参照文献^[6]。反应体系: 10 \times Ex Taq buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mM) 2 μ L, 上下游引物 (10 pmol/ μ L) 1 μ L, Ex Taq hot start 酶 0.25 μ L (5 U/ μ L), 模板 5 μ L, 去离子水补至 25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 将阳性扩增产物送至苏州金唯智生物科技有限公司测序, 并在 GenBank 上比对。

1.5 生物信息学分析

采用 DNASTar 软件对测定的序列进行同源性分析; 运用 MEGA 5.05 软件进行多序列比对, 使用邻近法 (neighbor-joining)、Kimura2-parameter 模型构建亲缘进化树, 通过 Bootstrap 值评估建树的可靠性。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理与分析。计数资料用频数和百分率 (%) 表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病原学检测结果

荧光定量 PCR 定性检测显示, 在 758 份急性胃肠炎患儿的粪便标本中检测出 NoV 阳性 241 份, 阳性率为 31.8%, 均为 GII 型, 未检测出 GI 型。对 NoV 初筛为阳性标本的 VP1 区进行测序分析,

发现 GII.4 亚型的阳性率最高, 占 28.6% (69/241); 其次为 GII.3 亚型, 占 21.2% (51/241); GII.2 亚型占 10.0% (24/241); 其他亚型占 7.5% (18/241)。尚有 78 份阳性标本未成功测序分型。

金标法检测粪便标本显示, RtV 的阳性率为 15.6% (118/758), ADV 阳性率为 1.3% (10/758)。其中 NoV 和 RtV 混合感染 27 例, 混合感染率为 3.6% (27/758); NoV 和 ADV 混合感染 1 例, 混合感染率为 0.1% (1/758)。

2.2 临床资料分析

经 NoV 或 RtV 检测为阳性的患儿临床上均主要表现为发热 (>38℃)、呕吐、腹泻、腹痛和脱水等症状。241 例 NoV 检测阳性的患儿中 147 例 (61.0%) 出现发热; 呕吐 126 例 (52.3%); 腹泻 149 例 (61.8%); 腹痛 22 例 (9.1%); 脱水 10 例 (4.1%)。而 118 例 RtV 检测阳性的患儿中, 发热 93 例 (78.8%); 呕吐 84 例 (71.2%); 腹泻 92 例 (78.0%); 腹痛 5 例 (4.2%); 脱水 8 例 (6.8%)。与 RtV 感染的患儿相比, NoV 感染的患儿较少出现发热、呕吐和腹泻等症状 ($P < 0.05$)。27 例 NoV 和 RtV 混合感染患儿的性别、年龄及病情严重程度与 NoV 或 RtV 单独感染的患儿相比, 差异均无统计学意义。

2.3 NoV 感染患儿的性别和年龄分布

241 例 NoV 阳性患儿中, 4 岁以内占 87.6% (211/241)。不同年龄组的 NoV 检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.083, P = 0.018$), 其中 1~<4 岁组检出率最高 (37.3%), 见表 1。男女患儿的 NoV 检出率差异无统计学意义 [30.9% (145/469) vs 33.2% (96/289)]; $\chi^2 = 0.437, P = 0.509$ 。

表 1 各年龄组患儿粪便标本中 NoV 检出情况 [n (%)]

年龄分组 (岁)	n	阳性检出
<1	277	75(27.1)
1~	365	136(37.3)
4~	68	19(27.9)
8~12	48	11(22.9)
χ^2 值		10.083
P 值		0.018

2.4 NoV 的季节分布

不同季节 NoV 阳性检出率差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 68.837, P < 0.001$), 其中冬季检出率最高, 12 月为检出高峰, 见表 2 和图 1。如图 1 所示, 1~4 月主要以 GII.3 为主, 占 66.7% (34/51); 5~8 月以 GII.2 为主, 占 62.5% (20/32); 9~12 月以 GII.4 为主, 占 62.5% (50/80)。此外, 发现 18 例重组株, 其中 GII.P16/GII.3 占 6 例, 且均分布在 12 月; 其次 GII.P16/GII.2、GII.Pe/GII.4、GII.16/GII.13 各 3 例, 散发在不同月份。

表 2 NoV 检出的季节分布 [n (%)]

季节	n	阳性检出率
春季 (3~5 月)	210	45(21.4)
夏季 (6~8 月)	148	22(14.9)
秋季 (9~11 月)	136	47(34.6)
冬季 (1 月、2 月、12 月)	264	127(48.1)
χ^2 值		68.837
P 值		<0.001

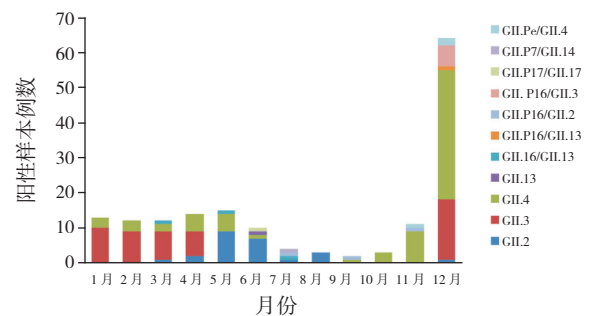


图 1 2017 年 NoV 检出的时间分布

2.5 进化树分析

本研究随机选取 16 株测序成功的 NoV, 与 GenBank 数据库中参考株构建分子遗传进化树。结果显示, 本次调查的毒株衣壳蛋白 VP1 区核苷酸序列高度同源且聚集成簇, 分别分布在 GII.2 型、GII.3 型和 GII.4 型的分枝上, 见图 2。其中 5 株为 NoV GII.2 型, 核苷酸序列的同源性为 97.7%~99%, 与参考株 DQ456824 核苷酸序列的同源性为 94.7%~98.7%; 6 株为 NoV GII.3 型,

核苷酸序列的同源性为 91.9%~98.4%，与参考株 AY845056 核苷酸序列的同源性为 91.1%~98.4%；5 株为 NoV GII.4 型，核苷酸序列的同源性为 92.5%~96.5%，与参考株 JX459908 核苷酸序列的同源性为 93.7%~99.3%。

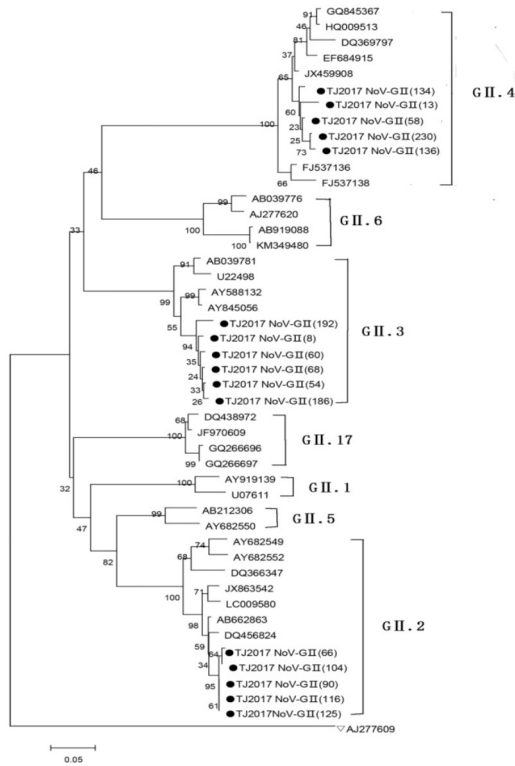


图 2 NoV 衣壳蛋白区系统进化树 该图采用临近法制作 NoV 衣壳蛋白 VP1 区的基因进化树。●表示本研究测序的 16 株 NoV 序列，▽表示 GI 参考株作为外群，其他参考株均来自 GenBank。

3 讨论

NoV 感染是引发急性胃肠道疾病最常见的病原体，是全世界公认所有年龄段急性胃肠炎散发和暴发的主要病因^[7-8]。变异和同源重组是导致 NoV 基因和抗原性具有多样性的主要原因，以致于不同地区之间可存在相同或不同的优势流行毒株，因此 NoV 分子流行病学监测对于疾病的预防与控制至关重要。

自 1995 年首次在婴幼儿腹泻患儿粪便中检测到 NoV 以来，全世界各地陆续报道了儿童 NoV 感染的情况。如近年文献显示，南京地区腹泻婴幼儿 NoV 检出率为 15.2%^[5]，苏州地区急性胃肠炎患儿 NoV 检出率为 26.9%^[9]，美国亚特兰大地区急性

胃肠炎患儿中也检出了 NoV^[10]。本研究收集 2017 年 1~12 月因疑似病毒感染所致急性胃肠炎住院患儿粪便标本 758 份，荧光定量 PCR 检测显示 NoV 阳性率为 31.8% (241/758)，提示该病毒感染可能是造成儿童急性胃肠炎的主要原因之一。本研究中，NoV 阳性患儿主要集中在 4 岁以内患儿，占比 87.6% (211/241)，其原因可能与患儿年龄小，免疫力低有关，这与以往研究结果相符^[11]。尚未发现 NoV 检出率在不同性别间存在差异，这与以往研究结果一致^[12]。NoV 散发感染虽然常年均可发生，但相关文献报道台湾地区 NoV 流行季节是冬季或寒冷季节^[13]；韩国其流行季节在晚秋到春季^[14]。本研究显示冬季 NoV 的检出率高于其他季节。这说明 NoV 感染存在明显的季节性，其原因可能是干冷的气候有利于 NoV 的活动^[15]。

相关研究表明，NoV GII 型比 GI 型的传播更为广泛^[16-17]。虽然 GII 和 GI 型均存在多种亚型，但 GII.4 型是造成全球急性胃肠炎暴发的优势流行株^[18]，其可能与 GII.4 的基因型抗原漂移和基因重组导致进化速度快有关^[19]。有研究显示，NoV GII.P16/GII.2 重组株是引起 2016~2017 年湖州地区急性胃肠炎暴发的主要原因^[20]。随着 NoV 的不断进化，出现了多种 GII.P16 的重组株，目前发现的有 GII.P16/GII.16, GII.P16/GII.2, GII.P16/GII.3, GII.P16/GII.13 以及 GII.P16/GII.4 等。本组病例以 GII.4 型为主，占 28.6% (69/241)。此外在本组病例中，还检测到了 NoV 7 种重组株，其中以 GII.P16/GII.3 为主。在孟加拉^[21]、巴西^[22]和西班牙^[23]等地也曾检出过 GII.P16/GII.3 重组株。由此可见，GII.4 基因型是导致天津地区该组病例 NoV 感染的主要流行株，与既往研究结果一致^[24-25]，而既往天津地区从未在散发或暴发病例中检测到重组株 GII.P16/GII.3，提示本地区除了要对 GII.4 进行重点检测外，也要关注 NoV 重组株的流行情况。

综上所述，本研究通过对来自天津地区的急性胃肠炎患儿的粪便标本进行检测，发现 NoV 的阳性率为 31.8%，且 NoV 感染具有明显的季节性，这一发现有利于以后根据其季节流行特点进行重点监测。随后通过对阳性标本进行测序发现，主要以 GII.4 为主，其次为 GII.2、GII.3，此外还检测到 7 种重组毒株。通过对 NoV VP1 区基因进行进化树分析显示，本研究中 GII.2、GII.3、GII.4 与

参考株具有较高的同源性,说明 NoV 在全球范围流行暴发的过程中存在着不同基因型持续共同进化和循环,进一步发生重组分布到各地区。因此,加强对 NoV 感染情况的检测和对其开展分子病原学研究,以及完善 NoV 感染性急性胃肠炎监测网络对于疾病的预防和控制具有十分重要的意义。

[参 考 文 献]

- [1] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8): 725-730.
- [2] Karst SM, Zhu S, Goodfellow IG. The molecular pathology of noroviruses[J]. *J Pathol*, 2015, 235(2): 206-216.
- [3] Hernandez JM, Silva LD, Junior ECS, et al. Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 147.
- [4] Hall AJ, Wikswo ME, Manikonda K, et al. Acute gastroenteritis surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8): 1305-1309.
- [5] 蒋翠莲, 叶莉莉, 许焯, 等. 南京地区腹泻婴幼儿新型诺如病毒 GII.17 变异株的检出及基因分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(20): 4717-4720.
- [6] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses[J]. *J Virol Methods*, 2002, 100(1-2): 107-114.
- [7] Jain S, Thakur N, Grover N, et al. Prevalence of rotavirus, norovirus and enterovirus in diarrheal diseases in Himachal Pradesh, India[J]. *Virusdisease*, 2016, 27(1): 77-83.
- [8] Andrade JSR, Fumian TM, Leite JPG, et al. Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/ GII.17 Norovirus in Brazil, 2015[J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 51: 28-32.
- [9] Fu JG, Ai J, Zhang J, et al. Molecular epidemiology of genogroup II norovirus infection among hospitalized children with acute gastroenteritis in Suzhou (Jiangsu, China) from 2010 to 2013[J]. *J Med Virol*, 2016, 88(6): 954-960.
- [10] Yi J, Wahl K, Sederdahl BK, et al. Molecular epidemiology of norovirus in children and the elderly in Atlanta, Georgia, United States[J]. *J Med Virol*, 2016, 88(6): 961-970.
- [11] Rahman M, Rahman R, Nahar S, et al. Norovirus diarrhea in Bangladesh, 2010-2014: prevalence, clinical features, and genotypes[J]. *J Med Virol*, 2016, 88(10): 1742-1750.
- [12] Chan MC, Leung TF, Chung TW, et al. Virus genotype distribution and virus burden in children and adults hospitalized for norovirus gastroenteritis, 2012-2014, Hong Kong[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11507.
- [13] Yang SY, Hwang KP, Wu FT, et al. Epidemiology and clinical peculiarities of norovirus and rotavirus infection in hospitalized young children with acute diarrhea in Taiwan, 2009[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2010, 43(6): 506-514.
- [14] Park K, Yeo S, Jeong H, et al. Updates on the genetic variations of norovirus in sporadic gastroenteritis in Chungnam Korea, 2009-2010[J]. *Virology*, 2012, 9: 29.
- [15] Lopman B, Armstrong B, Atchison C, et al. Host, weather and virological factors drive norovirus epidemiology: time-series analysis of laboratory surveillance data in England and Wales[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6671.
- [16] Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15(6): 524-527.
- [17] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis[J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(8): 1224-1231.
- [18] Hoa Tran TN, 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.
- [19] White PA. Evolution of norovirus[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(8): 741-745.
- [20] Han J, Wu X, Chen L, et al. Emergence of norovirus GII.P16-GII.2 strains in patients with acute gastroenteritis in Huzhou, China, 2016-2017[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 342.
- [21] Nahar S, Afrad MH, Matthijnsens J, et al. Novel intergenotype human norovirus recombinant GII.P16/GII.3 in Bangladesh[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 20: 325-329.
- [22] Fumian TM, da Silva Ribeiro de Andrade J, Leite JP, et al. Norovirus recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreak in Southern Brazil, 2004-2011[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0145391.
- [23] Arana A, Cilla G, Montes M, et al. Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009-2012[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98875.
- [24] Chen Y, Li Z, Han D, et al. Viral agents associated with acute diarrhea among outpatient children in southeastern China[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32(7): e285-e290.
- [25] Zou W, Cui D, Wang X, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of noroviruses in outpatient children with acute gastroenteritis in Huzhou of China[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127596.

(本文编辑: 邓芳明)