

宁夏地区2011年病毒性腹泻病例病原学研究

詹军 马江涛 陈慧 袁芳 马学旻 刘翔 郝琼

【摘要】 目的 了解2011年宁夏地区腹泻病例中轮状病毒(HRV)、杯状病毒(HuCV)、星状病毒(HAstV)及肠道腺病毒(HAdV)感染情况。方法 2011年收集宁夏不同地区腹泻病例的粪便标本,采用ELISA法检测A组HRV,阳性标本采用RT-PCR法进行分型鉴定;采用RT-PCR或PCR法检测HuCV、HAstV和HAdV。结果 共收集腹泻病例粪便标本690份,其中HRV占2.17%(15/690)、HuCV占21.74%(150/690)、HAstV占3.19%(22/690)、HAdV占6.52%(45/690)、混合感染占4.20%(29/690)。15份HRV G血清型与P基因型以G1、G3、P[4]型为优势株。结论 2011年宁夏地区病毒性腹泻主要以<2岁婴幼儿为主,HuCV是主要病原体。

【关键词】 病毒性腹泻; 轮状病毒; 杯状病毒; 星状病毒; 肠道腺病毒

Etiological study on cases with viral diarrhea in Ningxia during 2011 Zhan Jun, Ma Jiangtao, Chen Hui, Yuan Fang, Ma Xuemin, Liu Xiang, Hao Qiong. Ningxia Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750004, China

Corresponding author: Zhan Jun, Email: nx_zhanjun@126.com

This work was supported by grants from the Ningxia Natural Science Foundation (No. NZ13219) and Key Scientific Research Program of Health Department of Ningxia (No. 2012040).

【Abstract】 Objective To investigate the etiological characteristics of human rotavirus (HRV), human calicivirus (HuCV), human astrovirus (HAstV) and human enteral adenovirus (HAdV) in Ningxia province during 2011. **Methods** Stool specimen was collected from acute diarrhea case of Ningxia during 2011. HRV was detected by ELISA and serotype/genotype identified on those RT-PCR positive specimens. HuCV, HAstV and HAdV were detected by RT-PCR. **Results** In this study, a total of 690 specimens were detected, with the infection rates of HRV, HuCV, HAstV and HAdV as 2.17%, 21.74%, 3.19% and 6.52%, respectively. Co-infections were found in 4.20% of all the samples being tested. Among 15 HRV positive cases, serotypes G1, G3 and P[4] were the most predominant strains. **Conclusion** Children who were under 2 years of age were the majority among patients infected by diarrhea viruses while HuCV was recognized as the main pathogen responsible for the viral diarrhea cases in Ningxia, 2011.

【Key words】 Viral diarrhea; Human rotavirus; Human calicivirus; Human astrovirus; Human enteral adenovirus

近年来关于病毒性腹泻的研究对象主要针对婴幼儿。为了解宁夏地区全年龄组人群病毒性腹泻感染现况和病原学分布情况,本研究收集2011年度宁夏地区腹泻病例标本进行病原检测。

材料与方法

1. 标本来源:腹泻监测点分布于宁夏银川市、中卫市、青铜峡市、平罗县和海原县不同地区,采集

2011年各监测点医院全部人群(0~87岁)住院和门诊腹泻病例粪便标本。病例诊断标准:每日大便次数增加(≥ 3 次),且粪便性状异常,如稀水样、蛋花样、黏液样或稀糊样,无脓血。每份病例标本采集5g左右,置于无菌粪便采样杯中,-75℃保存。

2. 研究方法:

(1)ELISA:采用丹麦Dako Cytomation公司的IDE IATM Rotavirus试剂盒检测轮状病毒(HRV),按试剂盒说明书进行。

(2)病毒核酸提取和引物设计:HRV阳性标本的分型、杯状病毒(HuCV)、星状病毒(HAstV)和肠道腺病毒(HAdV)的检测均采用RT-PCR方法,所有标本采用德国Qiagen公司的QIAamp MinElute

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.025

基金项目:宁夏自然科学基金项目(NZ13219);宁夏卫生厅重点科研计划课题(2012040)

作者单位:750004 银川,宁夏回族自治区疾病预防控制中心

通信作者:詹军, Email: nx_zhanjun@126.com

Virus Kit 提取病毒核酸, RT-PCR 分型所用引物序列参考《全国病毒性腹泻监测方案》, 见表 1。

(3) RT-PCR: 采用一步法 RT-PCR 扩增试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 反应体系: 2× 反应缓冲液 12.5 μl, 酶混合物 0.5 μl, 上、下游引物 (0.1 mmol/L) 各 1 μl, 模板 RNA 3 μl, 补足无 RNA 酶水至 25 μl。反应条件: 45 °C 30 min, 94 °C 2 min; 94 °C 15 s, 50 °C 30 s, 68 °C 60 s, 40 个循环; 68 °C 延伸 10 min。

3. 统计学分析: 用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 率或构成比的比较用 χ^2 和 Fisher 确切概率值检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况: 2011 年共检测宁夏不同地区腹泻病例标本 690 份。检测到 261 份阳性病毒性腹泻标本, 阳性率为 37.83%, 其中 HRV 15 份、HuCV 150 份、HAstV 22 份、HAdV 45 份、混合感染 29 份。261 名病毒性腹泻阳性病例中, 主要以 HuCV 感染为主, 其次为 HAdV 感染, HAstV 和 HRV 感染病例所占比例较少, 混合病毒感染病例较多。

2. HRV 分型与流行病学特点: 对 15 份抗原检测阳性标本进行 HRV G/P 分型检测, 结果显示, G1 和 G3 混合型 2 份、G1 型 4 份、G2 型 2 份、G3 型 7 份 (图 1); P[4] 型 12 份、P[8] 型 3 份 (图 2), 未发现 G4、G8、G9 型和 P[6]、P[9]、P[10] 型。15 份 HRV 阳性标本的 G 血清型和 P 基因型组合见表 2。

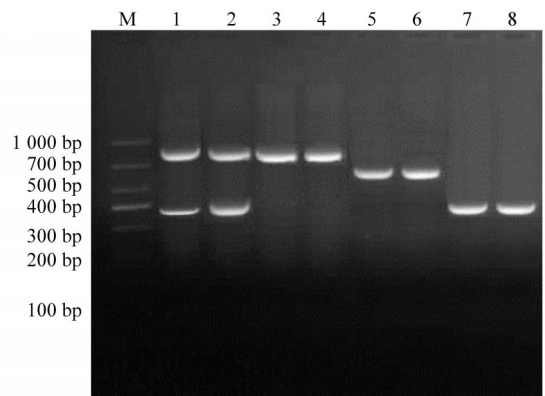
HRV 腹泻在宁夏地区的发病高峰集中在秋冬季 (9—11 月), 高峰期病例数占全年病例数的 80%, 有 3 例病例为非高峰期发病, 其中 2 例为成年人腹泻 (表 3)。从年龄分布来看, HRV 感染主要以 ≤ 1 岁婴幼儿 (包括 1 岁患儿 3 例, < 1 岁患儿 10 例) 为主, 占全年龄组的 86.7% (表 4), 为主要易感人群。

3. HuCV 分型与流行病学特点: 对 150 份 HuCV 阳性标本进行札如病毒 (SV) 和诺如病毒 (NV) 分型, 检测到 NV 阳性 129 份 (G1 型占 64 份、G2 型占 58 份、G1 和 G2 混合型占 7 份)、SV 阳性 41 份 (图 3)。

150 例 HuCV 腹泻病例主要集中在 7—9 月, 占病例总数的 54.0%, 发病率以 9 月最高 (表 3)。从年

表 1 HRV、HuCV、HAstV 和 HAdV 引物序列

病毒	引物	分型与方向	序列(5' ~ 3')	产物大小 (bp)
HRV	4Con3	P(+)	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	
	4Con2	P(-)	ATTCGGACCATTATAACC	877
	1T1	P[8](-)	TCTACTTGGATAACGTGC	346
	2T1	P[4](-)	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	484
	3T1	P[6](-)	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	268
	4T1	P[9](-)	TGAGACATGCAATTGGAC	392
	5T1	P[10](-)	ATCATAGTTAGTAGTCGG	584
	Beg9	G(+)	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	
	End9	G(-)	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1 062
	HRVg9	G(-)	GGTCACATCATAACAATTCT	
HuCV	aAt8	G8(+)	GTCACACCATTGTAAATTCG	885
	aBT1	G1(+)	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	749
	aCT2	G2(+)	CAATGATATTAACACCTTTTCTGTG	652
	aDT4	G4(+)	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	583
	aET3	G3(+)	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	374
	aFT9	G9(+)	CTAGATGTAACACTACAACACTAC	306
	SLV-5317	+	CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT	434
	SLV-5749	-	CGGRCYTCAAAVSTACCBCCCCA	
	G1-SKF	+	CTGCCCGAATTYGTAAATGA	330
HAstV	G1-SKR	-	CCAACCCARCCATRTTACA	
	CoG2F	+	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	387
	G2-SKR	-	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	
	Mon269	+	CAACTCAGGAAACAGGGTGT	449
HAdV	Mon270	-	TCAGATGCATTGTCAATTGGT	
	Ad1	+	TTCCCCATGGICAYAAACAC	482
	Ad2	-	CCCTGGTAKCCRATRTTGTGA	

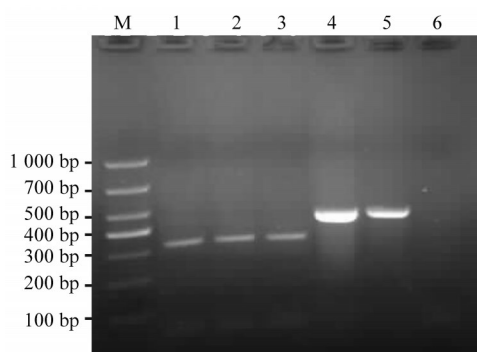


注: M: DL 1 000; 1, 2: G1+G3 型; 3, 4: G1 型; 5, 6: G2 型; 7, 8: G3 型

图 1 A 组 HRV G 血清型分型电泳

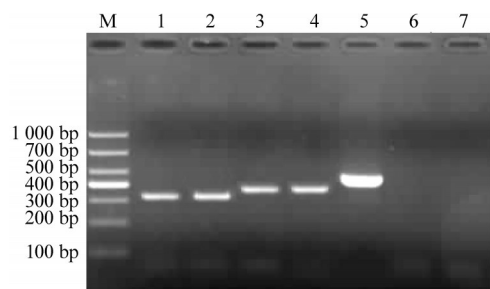
表 2 HRV 的 G 血清型和 P 基因型组合

分型	P[4]	P[8]	合计
G1	4	0	4
G2	2	0	2
G3	4	3	7
G3+G1	2		2
合计	12	3	15



注: M: DL 1 000; 1~3: P[8]型; 4, 5: P[4]型; 6: 阴性对照

图2 A组 HRV P 基因型分型电泳



注: M: DL 1 000; 1, 2: G1 型 NV; 3, 4: G2 型 NV; 5: SV; 6, 7: 阴性对照

图3 HuCV 基因型分型电泳

表3 宁夏地区4种腹泻病毒感染人群不同月份发病率

月份	检测数	HRV	HuCV	HAstV	HAdV	混合感染
1	10	0	0	0	0	0
2	14	0	0	0	0	0
3	10	0	0	0	0	0
4	6	0	0	0	0	0
5	54	3(5.56)	10(18.52)	0	5(9.26)	2(3.70)
6	61	0	12(19.67)	1(1.64)	6(9.84)	4(6.56)
7	89	0	25(28.09)	1(1.12)	8(8.99)	6(6.74)
8	137	0	30(21.90)	6(4.38)	10(7.30)	6(4.38)
9	86	1(1.16)	26(30.23)	7(8.14)	5(5.81)	5(5.81)
10	79	3(3.80)	15(18.99)	2(2.53)	3(3.80)	2(2.53)
11	118	8(6.78)	31(26.28)	5(4.24)	8(6.78)	4(3.39)
12	26	0	1(3.85)	0	0	0
合计	690	15(2.17)	150(21.74)	22(3.19)	45(6.52)	29(4.20)

注: 括号外数据为阳性数, 括号内数据为阳性率(%)

龄分布来看, 全年龄组人群均有发病, 其中以 1~2 岁婴幼儿和 40~50 岁成年人发病率最高(表 4), 差异有统计学意义($\chi^2=300.297, P=0.000$)。

4. HAstV 的流行病学特点: 690 例腹泻中, 22 例为 HAstV 腹泻病例, 按发病月份来看, 病例主要集中在 8、9 月, 占病例总数的 59.10%, 标本阳性率也以 8、9 月最高(表 3)。全年龄组人群均有感染, 其中以 10~30 岁人群发病率最高, 为 7.79%(表 4), 差异有

表4 宁夏地区4种腹泻病毒感染人群年龄构成

年龄组 (岁)	检测数	HRV	HuCV	HAstV	HAdV	混合感染
0~	191	10(5.24)	40(20.94)	5(2.62)	15(7.85)	8(4.19)
1~	66	3(4.55)	18(27.27)	1(1.52)	4(6.06)	2(3.03)
2~	55	0	12(21.82)	2(3.64)	7(12.73)	3(5.45)
6~	19	0	1(5.26)	1(5.26)	2(10.53)	0
10~	38	0	6(15.79)	3(7.89)	0	1(2.63)
20~	39	0	8(20.51)	3(7.69)	4(10.26)	4(10.26)
30~	46	1(2.17)	7(15.22)	1(2.17)	2(4.35)	1(2.17)
40~	87	1(1.15)	24(27.59)	2(2.30)	3(3.45)	4(4.60)
50~	60	0	13(21.67)	2(3.33)	3(5.00)	2(3.33)
60~	56	0	8(14.29)	1(1.79)	2(3.57)	1(1.79)
70~87	33	0	13(39.39)	1(3.03)	3(9.09)	3(9.09)
合计	690	15(2.17)	150(21.74)	22(3.19)	45(6.52)	29(4.20)

注: 同表 3

统计学意义(Fisher 确切概率值, $P=0.000$)。该病毒感染主要以农民和学生为主。

5. HAdV 的流行病学特点: 690 例腹泻中, HAdV 感染 45 例, 发病时间除 1—4 月监测病例较少, 没有 HAdV 感染病例发生外, 其余月份均有病例发生。但发病率以 5、6 月明显高于其他月份(表 3)。HAdV 腹泻病例中, 全年龄组人群均有发病, 其中以 2~6 岁人群发病率最高, 为 12.73%(表 4), 差异具有统计学意义(Fisher 确切概率值, $P=0.000$)。该病毒感染主要以散居儿童和农户家庭为主。

6. 混合感染情况: 690 份检测标本中, 混和感染标本 29 份, 占总阳性标本的 11.11%(29/261), 混合感染阳性率女性(5.19%)高于男性(3.49%)。混合感染率以青年(20~30 岁)和老年人群(70~87 岁)为高(表 4)。混合感染的高峰发生在 6—7 月, 阳性率 6.67%(10/150)。混合感染病毒主要以 HuCV 混合其他病毒为主, 占 96.55%(28/29)。2 种病毒混合感染以 HuCV 和 HAdV 的双重感染最多, 占混合感染病例总数的 62.07%(18/29), 其次是 HuCV 和 HAstV 双重感染 6 例(20.69%), HAstV 和 HAdV 双重感染 1 例(3.45%); 三重感染为 HRV、HuCV 和 HAdV 共感染 2 例, HuCV、HAstV 和 HAdV 共感染 2 例。

讨 论

本研究对各哨点医院采集的 690 份病例标本进行 HRV、HuCV、HAstV 和 HAdV 病原学检测, 结果显示, 病毒总检出率为 37.83%, 其中以 HuCV 检出率最高, 是引起宁夏地区病毒性腹泻的主要病原, 其次是 HAdV、HAstV 和 HRV。

从总体趋势来看,宁夏地区腹泻病毒检出阳性率比其他地区较低^[1],这主要是由于本地区婴幼儿 HRV 检出阳性率(4.16%)远远低于其他地区所致^[2-4]。HRV 尽管检出率低,但其 G 血清型和 P 基因型仍然呈现多样型和复杂性,其中 G1 型 4 份、G2 型 2 份、G3 型 7 份、不同 G 型混合感染 2 份、P[4] 型 12 份、P[8] 型 3 份,分型结果与兰州地区 HRV 流行株分型结果相似^[2]。HuCV 作为当地病毒性腹泻的主要病原体,各年龄组人群均可感染发病。HAstV 和 HAdV 在宁夏地区的感染情况与我国其他地区的检出率基本一致^[5,6],从年龄组人群看,HAstV 和 HAdV 感染主要以农民和学生为主,提示其感染与人群生活卫生状况有很大的关系。本研究部分结果与其他地区不相一致,一方面可能与某地区地理位置、气候条件和人群密度有关^[7,8],另一方面可能与选择人群范围有关^[2,9],如本次调查对象是全年龄段人群,而其他地区调查对象是 <5 岁住院儿童。

本研究显示,2011 年宁夏地区病毒性腹泻病例中,门诊腹泻病例最多的是 <6 岁儿童。但是从感染阳性率来看,除 HRV 阳性率以 <1 岁婴幼儿最高外(5.24%),其他病毒阳性率最高的却是其他年龄组人群,如 HuCV 阳性率最高的是 40~49 岁人群(27.59%)、HAstV 阳性率最高的是 10~19 岁人群(7.89%)、HAdV 阳性率最高的是 2~5 岁人群(12.73%)、混合感染阳性率最高的是 20~29 岁人群(10.26%)。虽然病毒性腹泻一般情况下难以引起重视,但是作为婴幼儿的日常接触人群,往往会成为婴幼儿病毒性腹泻的传染源。因此,扩大监测人群范围有利于全面了解地区内病原构成。

参 考 文 献

- [1] Fang ZY, Xie HP, Lyu HX, et al. Investigation of human calicivirus diarrhea among infantile and young children in China, 1999-2005[J]. Chin J Virol, 2007, 23(1): 9-15. (in Chinese)
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.
- [2] Ye XH, Jin Y, Fang ZY, et al. Etiological study on viral diarrhea among children in Lanzhou from July 2004 to June 2005 [J]. Chin J Epidemiol, 2006, 27(2): 117-122. (in Chinese)
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.
- [3] Gong ZX, Zeng M, Zhu QR, et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea in children in Shanghai [J]. Chin J Infect Dis, 2012, 30(5): 288-292. (in Chinese)
龚智翔,曾玫,朱启镛,等. 上海地区儿童 A 组轮状病毒腹泻的分子流行病学[J]. 中华传染病杂志, 2012, 30(5): 288-292.
- [4] Liu HX, Meng L, Liu XF, et al. A matched case-control study on risk factors of rotavirus diarrhea in young children under five years old in Gansu province [J]. Chin J Epidemiol, 2012, 33(8): 877-878. (in Chinese)
刘海霞,孟蕾,刘新风,等. 婴幼儿轮状病毒腹泻发病危险因素 1:2 配对病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(8): 877-878.
- [5] Fang ZY, Sun YP, Ye XH, et al. Astrovirus infection among hospitalized children with acute diarrhea in seven regions of China 1998-2005 [J]. Chin J Epidemiol, 2006, 27(8): 673-676. (in Chinese)
方肇寅,孙亚萍,叶新华,等. 中国七个地区 1998-2005 年急性腹泻住院患儿中星状病毒感染研究[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(8): 673-676.
- [6] Gao WJ, Li XL, Liu N, et al. Molecular and epidemiological study of human adenovirus among infants with diarrhea in Nanjing [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2013, 27(3): 167-169. (in Chinese)
高文娟,李晓乐,刘娜,等. 南京地区腹泻患儿腺病毒感染的分子流行病学研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(3): 167-169.
- [7] Wu P, Zhang Q, Qin YP, et al. Epidemiology of infectious diarrhea diagnosed clinically in prosperous economy area: analysis of 1 240 patients [J]. Chin J Nosocomiol Vol, 2011, 18(21): 3886-3888. (in Chinese)
吴培,张群,秦燕萍,等. 经济发达地区成人感染性腹泻的流行病学特点[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 18(21): 3886-3888.
- [8] Jin Y, Cheng WX, Yang XM, et al. Viral agents associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Lanzhou, China [J]. J Clin Virol, 2009, 44(3): 238-241.
- [9] Li XJ, Chen Q, Ren JS, et al. Advances in the epidemiologic study of virus diarrhea [J]. Modern Prev Med, 2013, 40(12): 2341-2343. (in Chinese)
李学军,陈茜,任建莎,等. 病毒性腹泻的流行病学研究进展[J]. 现代预防医学, 2013, 40(12): 2341-2343.

(收稿日期: 2013-11-28)

(本文编辑: 万玉立)