

· 北京地区病毒学监测 ·

北京地区诺如病毒分子生物学特点初步研究

高志勇 严寒秋 罗明 刘桂荣 刘园 吴晓娜 贾蕾 王全意 黄芳 吴疆 庄辉

【摘要】 目的 了解北京地区诺如病毒的分子生物学特点。方法 收集北京市 2007 年 1-3 月非细菌性胃肠炎暴发和散发病例,采集患者粪便标本,使用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对粪便标本进行诺如病毒 RNA 检测,对 RT-PCR 阳性标本的 PCR 产物进行克隆测序。结果 检测 38 例粪便标本,共有 27 例阳性。随机选择其中 4 例 PCR 产物进行克隆测序,获得 4 株诺如病毒序列进行比对分析,结果显示,该 4 株病毒序列与诺如病毒 G II/4 型参考株同源性最高,其中与荷兰和日本提交的诺如病毒 G II/4 型变异株最为接近,同源性分别为 97.8%~98.5% 和 95.2%~95.9%。系统发生树分析表明,该 4 株诺如病毒与荷兰、日本流行的 G II/4 型变异株处于同一分支上。结论 北京地区存在诺如病毒 G II/4 型变异株流行,其与 2006 年荷兰和日本的诺如病毒流行株属同一类 G II/4 型变异株。

【关键词】 诺如病毒;急性胃肠炎;基因变异

A preliminary study on molecular characteristics of noroviruses detected in Beijing GAO Zhi-yong*, YAN Han-qiu, LUO Ming, LIU Gui-rong, LIU Yuan, WU Xiao-na, JIA Lei, WANG Quan-yi, HUANG Fang, WU Jiang, ZHUANG Hui. *Beijing Municipal Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the molecular characteristics of noroviruses detected in Beijing. **Methods** From January to March 2007, cases from both outbreaks and sporadic episodes of acute nonbacterial gastroenteritis were investigated in Beijing, and the fecal specimens of the patients were collected. Noroviruses were detected by a reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), and then the PCR products were cloned and sequenced. **Results** A total of 27 positive cases were identified as caused by noroviruses among the 38 patients with acute viral gastroenteritis, and four PCR products were randomly selected for further studies on sequencing. When comparing to the nucleotide sequences of norovirus reference strains from GenBank, the highest homology was found between the four isolates and the norovirus G II/4 strains. The four strains isolated from Beijing were almost identical to the G II/4 variants that causing epidemics in the Netherlands and in Japan with the homology of 97.8%-98.5% and 95.2%-95.9%, respectively. Phylogenetic analysis revealed that the four isolates were located at the same branch as the norovirus G II/4 variants in Netherlands and Japan. **Conclusion** New norovirus G II/4 variants were found in Beijing, and data from sequence analysis showed that the four isolates and the epidemic strains isolated from both the Netherlands and Japan in 2006 belonged to the same group of norovirus G II/4.

【Key words】 Norovirus; Acute gastroenteritis; Gene variation

胃肠炎是世界上一个严重的公共卫生问题。目前诺如病毒被认为是引起非细菌性急性胃肠炎暴发的主要病原体。在美国,每年发生诺如病毒感染 2300 余例。2000 年 7 月至 2004 年 6 月美国发生的急性胃肠炎暴发疫情中,约 80% 与诺如病毒有关^[1]。诺如病毒抵抗力强,在外环境中的生存能力强,可耐受常规的消毒剂。小剂量诺如病毒即可感染(<100 个病毒颗粒);人群对其普遍易感;感染

后缺乏持久的免疫力;存在多种传播途径(粪-口传播、接触传播和空气飞沫传播等)^[2]。诺如病毒感染常引起暴发。近年来,诺如病毒在全球连续引起暴发和流行。继欧洲、澳大利亚及北美洲地区之后,日本最近也暴发了 25 年来由诺如病毒引起的严重急性感染性腹泻疫情。我国广州等地也出现诺如病毒感染暴发。2006 年底至 2007 年初,在北京市腹泻患者的粪便标本中,诺如病毒的检出率也明显上升。鉴此,北京市疾病预防控制中心(CDC)于 2007 年 1 月 15 日启动了医院门诊病例诺如病毒的病原学监测工作,并对北京地区诺如病毒的分子生物学特点

作者单位:100013 北京市疾病预防控制中心传染病地方病控制所(高志勇、严寒秋、罗明、刘桂荣、刘园、吴晓娜、贾蕾、王全意、黄芳、吴疆);北京大学医学部(庄辉)

进行了初步分析。

材料与方法

1. 研究对象:从北京市 2007 年 1 月 15 - 27 日法定传染病报告的“其他感染性腹泻”病例中,选取 38 例怀疑诺如病毒感染者,采集其粪便标本。该 38 例患者均有腹泻或呕吐等临床症状,潜伏期为 24 - 48 h,水样便或稀便,粪便细菌培养阴性。

2. 标本处理:加入 1 ml 样品稀释液(来自 DAKO 公司的诺如病毒 ELISA 检测试剂盒)至 1.5 ml Eppendorf 管中,然后,加入 0.1 g 固体粪便标本或 0.1 ml 液体粪便标本,置于漩涡震荡器混匀,室温静置 10 min,室温下 ≥ 5000 r/min 离心 5 min,进行检测或置 -20℃ 冰箱保存备用。

3. 病毒 RNA 的提取:采用美国 QIAGEN 公司病毒核酸提取试剂盒(QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit),操作按试剂盒说明书进行。

4. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR):扩增区域位于诺如病毒基因组 ORF1,基因位点在 nt4568~4886 之间(参考株序列号为 M87661)。逆转录采用 Promega 公司 RNA 逆转录试剂盒。反应体系:10× 缓冲液 2.5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μ l, 1% BSA 2.5 μ l, 0.2 μ g/ μ l 引物 289 混合引物 1 μ l, 10 U/ μ l AMV-RT 0.35 μ l, 50 U/ μ l RNasin 0.1 μ l, DEPC 处理 H₂O 8.05 μ l, 模板 RNA 1.5 μ l。轻微离心,42℃ 反转录 1 h。PCR 反应体系:10× 缓冲液 5 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ l, 10 mmol/L dNTPs 1 μ l, 0.2 μ g/ μ l 引物 289 混合液 1 μ l, 0.1 μ g/ μ l 引物 290 混合液 1 μ l, 5 U/ μ l Taq 酶 0.4 μ l, DEPC 处理 H₂O 29.6 μ l, cDNA 8 μ l, 总体积为 50 μ l。轻微离心,放入 PCR 仪中扩增,反应条件:94℃ 变性 3 min 后,94℃ 60 s, 58℃ 80 s, 72℃ 60 s, 进行 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。反应结束后于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, -20℃ 保存 PCR 产物(研究中所用的引物见表 1)。

表1 RT-PCR 引物

引物	位置	方向	核酸序列(5'~3')
289H	4865~4886	-	TGACGATTTTCATCATCACCATA
289I	4865~4886	-	TGACGATTTTCATCATCCCCGTA
290H	4568~4590	+	GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC
290I	4568~4590	+	GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC
290J	4568~4590	+	GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC
290K	4568~4590	+	GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC

PCR 产物采用 Promega 公司 Wizard PCR Preps

DNA Purification System 试剂盒回收后,克隆于 pGEM-T 载体,转化 DH-5 α 宿主菌,通过蓝白斑筛选、酶切及 PCR 鉴定,阳性克隆送公司测序。应用 DNASTAR 软件对测序结果进行编辑,获得大小为 314 bp 的诺如病毒 DNA 序列片段。将这些 DNA 序列片段进行 Blast 比对,以确定所测诺如病毒的序列。根据文献检索,获得诺如病毒各型参考序列的 GenBank 序列号,从 GenBank 下载这些序列,进行编辑获得与待分析序列大小一致的 DNA 序列,应用 Clustal W 软件进行多序列比对和分析,使用 MEGA 3.1 软件绘制系统发生树。

结 果

1. 北京地区诺如病毒与其他参考株核苷酸序列比较:选择 4 份诺如病毒阳性的 PCR 产物进行克隆测序,对所得序列进行编辑后,获得 nt4592~4864 间的序列,该 4 株序列分别命名为 BJNV01、BJNV02、BJNV03 和 BJNV06,将其与参考株序列进行多序列比对和分析,结果该 4 株病毒的组内核苷酸同源率为 98.5%~99.6%,与诺如病毒 G II/4 型参考株的同源性最高,其中与荷兰 2006 年流行的诺如病毒 G II/4 型变异株序列(于 2006 年 12 月 19 日提交到 GenBank,序列号为 EF126965、EF126966)最为接近,核苷酸同源率为 97.8%~98.5%,与日本提交的诺如病毒株(2006 年 11 月引起神户多起暴发疫情,序列于 2007 年 3 月 2 日提交到 GenBank,序列号为 AB291542)同源性次之,为 95.2%~95.9%,而日本的病毒株与荷兰株的同源性为 96.7%(图 1)。

2. 北京地区诺如病毒与其他参考株的氨基酸序列比较:将所得诺如病毒序列翻译成相应的氨基酸,位置在诺如病毒 ORF1 产物 1530~1620 位氨基酸,将该 4 株诺如病毒的氨基酸序列与荷兰(EF126965、EF126966)和日本(AB291542)毒株序列进行比对(图 2),发现该 4 株诺如病毒在 1611 位氨基酸为 T(苏氨酸),而荷兰(EF126965、EF126966)和日本(AB291542)的毒株则为 I(异亮氨酸),其他位置无明显差异。

3. 系统发生树分析:应用 Clustal W 软件进行核苷酸多序列比对,使用 MEGA 3.1 软件构建系统发生树(Neighbor-Joining 法),bootstrap 1000 次进行验证(图 3)。结果发现该 4 株病毒虽然与荷兰(EF126965、EF126966)、日本来源的毒株(AB291542)

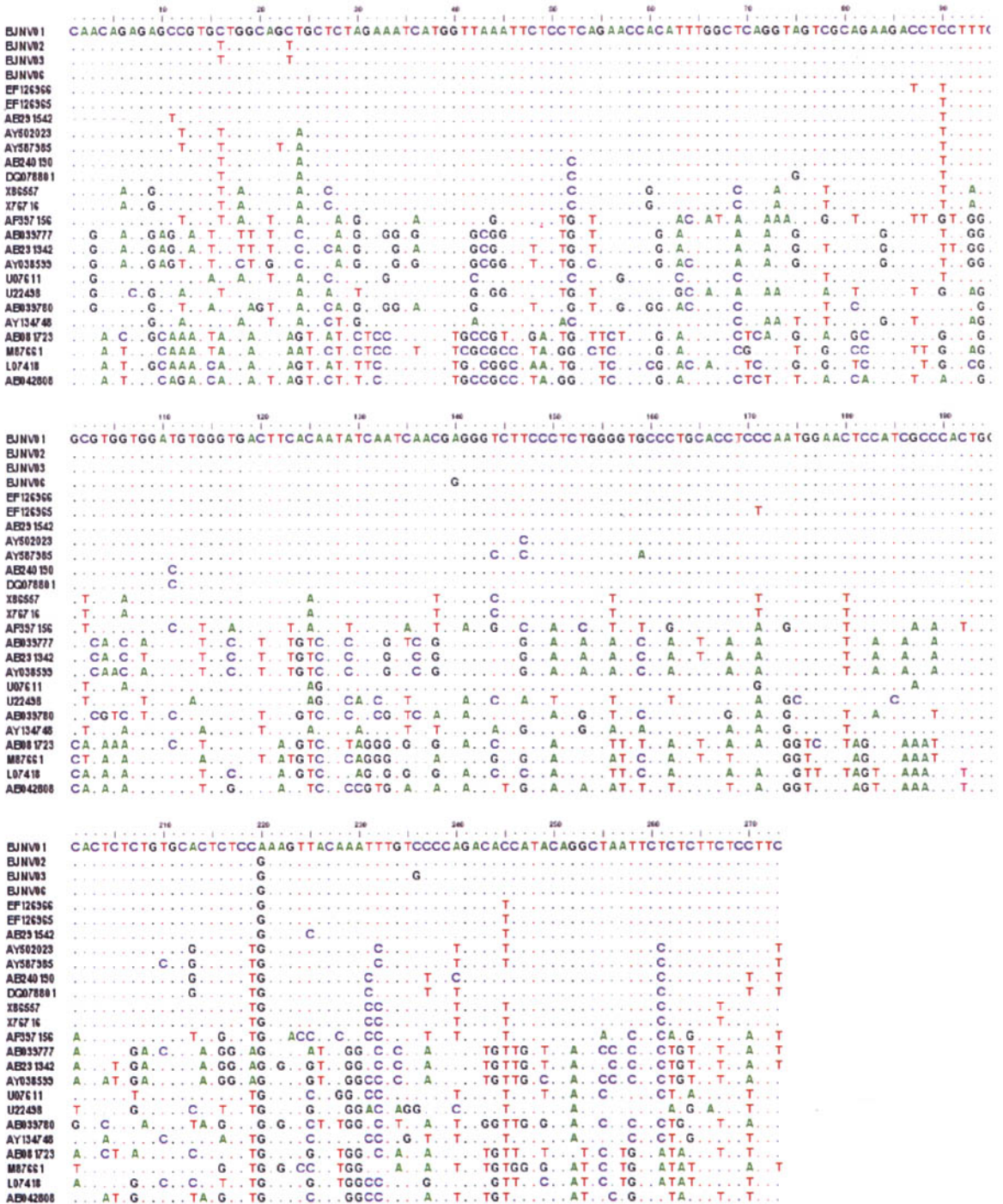


图1 诺如病毒 RNA 聚合酶区核苷酸序列比对

位于一个大的分支上,但该 4 株病毒集中在一个单独的小分支上,而荷兰和日本的则位于另一个小分支上。

讨 论

诺如病毒是单股正链 RNA 病毒,易发生变异,

存在众多的型别。到目前为止,诺如病毒尚无统一的分类标准。根据衣壳基因序列的分子生物学特征,诺如病毒可分为 5 个基因组:GI、GII、GIII、GIV和GV,其中GI、GII、GIV组感染人,GI组也可感染猪,GIII和GV组分别感染牛和鼠^[3]。最近

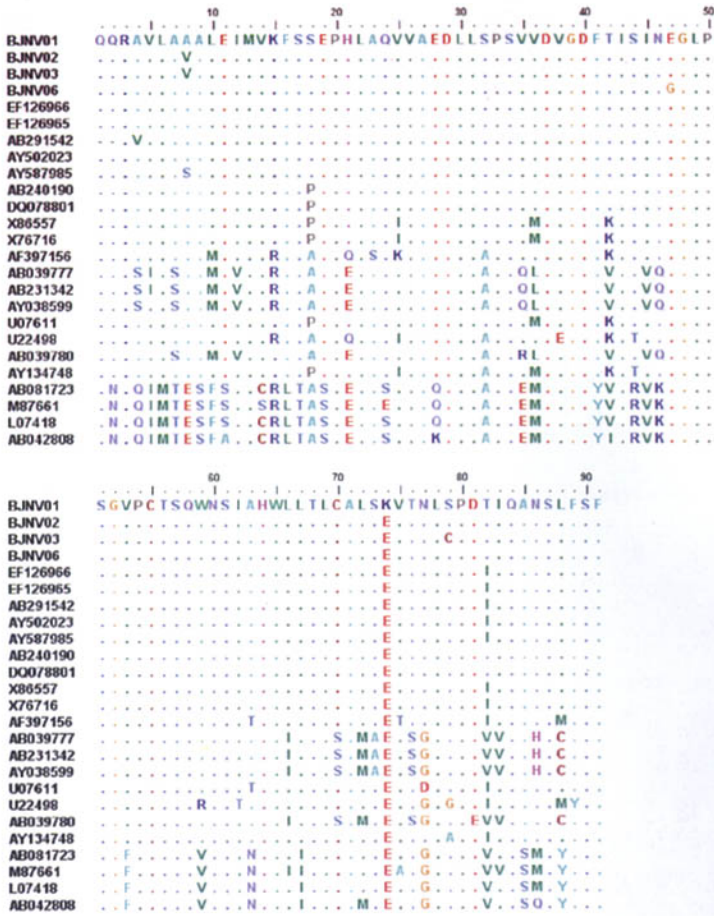


图2 诺如病毒 RNA 聚合酶区氨基酸序列比对

的研究进一步把诺如病毒分为 29 个基因型,其中 G I 组有 8 个,G II 组有 17 个,G III 组有 2 个,G IV 和 G V 组各 1 个。G II/4 型是传播最广的基因型,自 1993 年以来,曾引起世界上绝大多数的胃肠炎暴发疫情^[4]。方肇寅等^[5]于 1995 年首先报道了我国婴幼儿腹泻中有诺如病毒感染,此后的研究表明,我国诺如病毒感染十分普遍,其流行株为 G II/4 型^[6-10]。

目前,RT-PCR 法是检测诺如病毒最灵敏、也是应用最广的方法。本研究选用针对 RNA 多聚酶区设计的 P289/P290 混合引物进行 RT-PCR 检测,此法检出率较高,对于诺如病毒的扩增产物大小为 319 bp^[11]。但该混合引物可同时扩增出扎如病毒,其产物大小为 331 bp,与诺如病毒分子量接近,较难通过琼脂糖凝胶电泳区分,需通过测序分析鉴定。

由于诺如病毒易发生变异,同一地区不同时期有不同的流行株,新变异株的出现常是新一轮诺如病毒活跃期的预警,而现代社会的交通发达,人员、物品往来愈加频繁,因此,诺如病毒的传播速度加快,可涉及到更多的地区。1995-1996 年诺如病毒 G II/4 型变异株 US95/96 引起了全美国 55% 的胃肠炎暴发疫情,随后该变异株也在巴西、加拿大、中国、德国、荷兰、英国和澳大利亚等国被发现^[12]。2002 年一个诺如病毒 G II/4 型变异株 Farmington Hills 在欧洲出现,导致欧洲胃肠炎暴发疫情显著增加^[13]。2004 年名为 Hunter 的 G II/4 型变异株,引起了澳大利亚诺如病毒感染的明显增加。随后该变异株在

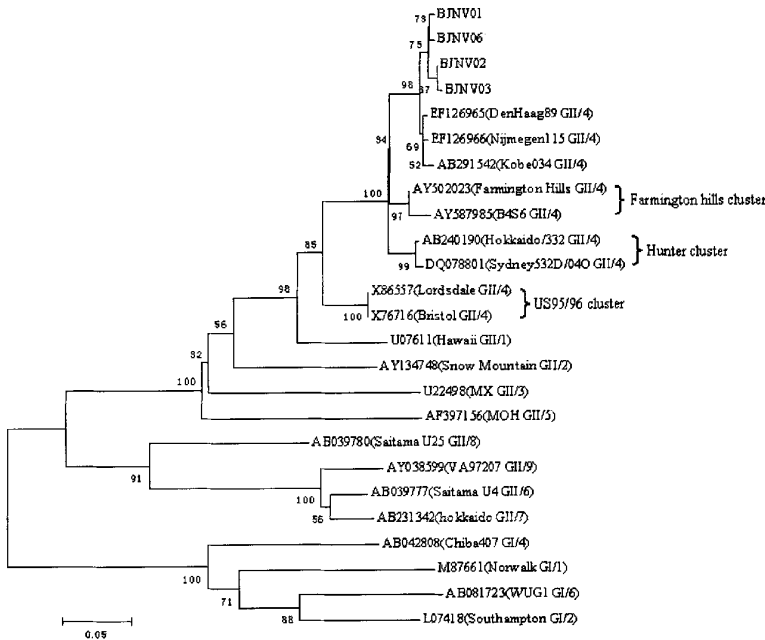


图3 诺如病毒 RNA 聚合酶区核苷酸序列系统发生树

荷兰、日本和中国台湾等地被发现^[14]。近年来, 诺如病毒在全球连续引起暴发和流行, 继欧洲、澳大利亚和北美洲地区之后, 日本也暴发了 25 年来最严重的诺如病毒急性胃肠炎疫情, 并迅速蔓延至日本全国。据推算, 日本至少近 304 万余人感染, 数人死亡, 其中 195 万名患者是在 12 月 10 日前 1 个月内发病, 检出的诺如病毒大部分属于 G II/4 基因型^[15]。

序列分析结果表明, 本研究获得的 4 株病毒 (BJNV01、BJNV02、BJNV03 和 BJNV06) 组内核苷酸的同源性为 98.5%~99.6%, 与诺如病毒 G II/4 型参考株同源性最高, 其中与荷兰 2006 年流行的诺如病毒 G II/4 型变异株最为接近, 同源性为 97.8%~98.5%, 与日本提交的诺如病毒株 (GenBank 序列号 AB291542) 同源性次之, 为 95.2%~95.9%, 2006 年 11 月该毒株曾引起了日本神户的多次诺如病毒感染的暴发疫情。利用 MEGA 3.1 软件绘制系统发生树结果显示, 本研究获得的 4 株诺如病毒与荷兰 (GenBank 序列号 EF126965 和 EF126966) 和日本的毒株 (GenBank 序列号 AB291542) 位于一个大分支上, 提示该 4 株病毒属诺如病毒 G II/4 型, 且与近期国际上流行的毒株属同一类 G II/4 型变异株, 说明 2007 年初北京市诺如病毒的流行株和 2006 年世界上其他国家引起暴发的毒株有共同的起源。但该 4 株病毒位于一个单独的小分支上, 而荷兰和日本的毒株则位于另一个小分支上, 说明两者存在一定差异。分析其氨基酸序列发现, 该 4 株病毒在 ORF1 产物 1611 位氨基酸全部为 T (苏氨酸), 而荷兰和日本的变异株则为 I (异亮氨酸)。但此位点变异的意义目前尚不清楚。

发达国家如美国、法国等早在 20 世纪 90 年代就开始诺如病毒的病原学监测工作。我国对诺如病毒感染缺乏足够的认识, 尚未对诺如病毒进行系统的监测, 相关研究也较为薄弱。由于诺如病毒易发生变异, 人群普遍易感, 主要引起人群胃肠炎暴发, 并可迅速传播, 感染的规模较大, 甚至可导致全球流行。因此, 我国今后应加强健康教育, 提高人们对诺如病毒的认识, 并建立病原学监测系统, 及时发现新的变异株, 以便及时控制诺如病毒急性胃肠炎的流行。

参 考 文 献

- [1] Blanton LH, Adams SM, Beard RS, et al. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000 - 2004. *J Infect Dis*, 2006, 193(3):413-421.
- [2] Marshall JA, Hellard ME, Sinclair MI, et al. The incidence and characteristics of endemic Norwalk-like virus-associated gastroenteritis. *J Med Virol*, 2003, 69(4):568-578.
- [3] Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 19(5):467-474.
- [4] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 2006, 346(2):312-323.
- [5] 方肇寅, 温乐英, 晋圣谨, 等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染. *病毒学报*, 1995, 11(3):215-219.
- [6] 靖宇, 钱渊, 王洛平. 北京地区人群诺瓦克样病毒血清抗体水平调查. *病毒学报*, 1998, 14(4):322-328.
- [7] 戴迎春, 聂军, 刘翼, 等. 广州地区人类杯状病毒的初步研究. *第一军医大学学报*, 2003, 24(3):296-299.
- [8] 谢华萍, 方肇寅, 王光, 等. 长春市儿童医院 1998 - 2001 年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究. *病毒学报*, 2002, 18(4):332-336.
- [9] 陈冬梅, 张又, 钱渊, 等. 北京地区婴幼儿人类杯状病毒感染状况及亚型分析. *中华儿科杂志*, 2002, 40(7):398-401.
- [10] 金玉, 黄湘, 方肇寅, 等. 2001 - 2004 年兰州地区婴幼儿杯状病毒腹泻的流行病学调查. *中华儿科杂志*, 2005, 43(9):657-660.
- [11] 孙亚萍, Hiroshi Ushijima, 谢华萍, 等. 分型引物 RT-PCR 法在杯状病毒分子流行病学研究中的应用. *国际病毒学杂志*, 2006, 13(5):129-133.
- [12] Noel JS, Fankhauser RL, Ando T, et al. Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution. *J Infect Dis*, 1999, 179:1334-1344.
- [13] Lopman B, Vennema H, Kohli E, et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 2004, 363(9410):682-688.
- [14] Bull RA, Tu ET, McIver CJ, et al. Emergence of a new norovirus genotype II-4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(2):327-333.
- [15] 日本诺如病毒感染性腹泻疫情信息. available at <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n273736/n273781/n3346251/n3346252/15689.html>.

(收稿日期:2007-04-10)

(本文编辑:张林东)