

# 中国 2006—2007 年诺如病毒胃肠炎暴发及其病原学特征分析

靳森 孙军玲 常昭瑞 李慧莹 刘娜 章青 崔淑娟 张静 王子军 段招军

**【摘要】** 目的 了解中国 2006—2007 年诺如病毒胃肠炎暴发及其病毒基因型别。方法 收集 2006—2007 年 19 起胃肠炎暴发的流行病学资料以及腹泻粪便样本,用 RT-PCR 方法对 201 份粪便标本进行诺如病毒、轮状病毒、星状病毒、腺病毒和札如病毒检测,对扩增产物进行序列测定。用 Clustal X 1.83 和 MEGA 4.0 生物软件对诺如病毒序列进行序列比对和系统进化分析。结果 诺如病毒是引起病毒性胃肠炎暴发的主要病原之一(12/19, 63.2%)。在 12 起诺如病毒胃肠炎暴发中,变异株 G II-4/2006b 是引起暴发的流行优势株(11/12, 91.7%),其他型别包括 G II-17、G II-6 和 G II-3。诺如病毒引起的疫情暴发主要集中在冬春季节(12 月至 4 月),发生场所多样,且各年龄组人群均有发病。同时,12 起诺如病毒暴发中有 2 起与其他腹泻病毒混合感染,且在同一起暴发中病原具有病毒多样性和基因型别多样性。结论 诺如病毒是 2006—2007 年引起胃肠炎暴发疫情的主要病原之一,变异株 G II-4/2006b 为流行优势株。

**【关键词】** 诺如病毒; 胃肠炎; 暴发; 基因分型

**Outbreaks of noroviral gastroenteritis and their molecular characteristics in China, 2006 – 2007** JIN Miao<sup>1</sup>, SUN Jun-ling<sup>2</sup>, CHANG Zhao-rui<sup>2</sup>, LI Hui-ying<sup>1</sup>, LIU Na<sup>1</sup>, ZHANG Qing<sup>1</sup>, CUI Shu-xian<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, WANG Zi-jun<sup>2</sup>, DUAN Zhao-jun<sup>1</sup>. 1 Institute for Viral Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052; 2 Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: DUAN Zhao-jun, Email: zhaojund@126.com

This work was supported by a grant from National Science and Technology Mega-projects of China (No. 2008ZX10004-013)

**【Abstract】** **Objective** To acknowledge the epidemiology of gastroenteritis outbreaks caused by noroviruses and their genotypes. **Methods** Epidemiologic data and specimens were collected from 19 gastroenteritis outbreaks. 201 specimens were detected for norovirus, rotavirus, astrovirus, adenovirus and sapovirus by RT-PCR methods and PCR products were sequenced. Sequence alignment and phylogenetic analysis were performed by Clustal X 1.83 and MEGA 4.0 programs. **Results** Noroviruses were one of the most predominant pathogens causing viral gastroenteritis outbreaks (12 of 19 outbreaks, accounting for 63.2%). Variant G II-4/2006b was the predominant strain responsible for 11 of the 12 NV-associated outbreaks. Other genotypes would include G II-17, G II-6 and G II-3. The NV-associated gastroenteritis outbreaks occurred mainly in winter and spring between December 2006 and April 2007. These gastroenteritis outbreaks caused by noroviruses would involve all age groups in various locations. Meantime, 2 out of 12 outbreaks were caused by norovirus or other viruses. In addition, multiple viruses and multiple genotypes of noroviruses were found in the same outbreak. **Conclusion** Noroviruses were one of the most major pathogens causing gastroenteritis outbreaks while G II-4/2006b variant was identified as the predominant strain in China.

**【Key words】** Norovirus; Gastroenteritis; Outbreak; Genotype

诺如病毒(norovirus)目前被认为是引起急性胃

肠炎暴发的最主要病原<sup>[1]</sup>。在美国每年 2300 万胃肠炎病例中,有 95% 的急性病毒性胃肠炎暴发是由诺如病毒引起<sup>[2]</sup>。诺如病毒具有高度传染性,可通过被污染的食物或水,以及接触等途径进行传播,通常在学校、餐馆、军队、养老院、游轮等聚集场所引起大规模暴发。1995 年以来,全球诺如病毒胃肠炎暴发大部分都由 G II-4 型变异株引起,包括 95/96US 株

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.017

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX10004-013)

作者单位: 100052 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(靳森、李慧莹、刘娜、章青、崔淑娟、段招军); 中国疾病预防控制中心应急办公室(孙军玲、常昭瑞、张静、王子军)

靳森、孙军玲同为第一作者

通信作者: 段招军, Email: zhaojund@126.com

(1995—2002 年)<sup>[1]</sup>、Farmington Hills 株(2002—2004 年)<sup>[3]</sup>、Hunter 株(2004—2006 年)<sup>[4]</sup>、Sakai 株(2004—2006 年)<sup>[5]</sup>、2006a 株和 2006b 株(2006 年至今)<sup>[6]</sup>。为了解诺如病毒胃肠炎在我国的流行情况,本研究对收集的 2006—2007 年 19 起胃肠炎暴发疫情标本进行诺如病毒及其他腹泻病毒的检测,并对诺如病毒的分子特征进行了研究。

材料与方法

1. 标本来源:2006 年 1 月至 2007 年 12 月收到全国病毒性腹泻监测网络送至的 19 起胃肠炎暴发疫情粪便标本共 201 份。

2. 标本处理:取 100 μl 粪便标本(固体取豌豆大小),加入 900 μl 标本稀释液,漩涡振荡混匀,室温静置 10 min,室温 8000 r/min 离心 5 min,于 -20 ℃ 保存。

3. 病原检测:用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA 试剂盒提取病毒核酸,按说明书操作;多重 RT-PCR 检测轮状病毒、腺病毒和星状病毒<sup>[7]</sup>,用 Jiang 等<sup>[8]</sup>方法检测诺如病毒和札如病毒。引物名称、扩增区域、引物序列及扩增片段大小见表 1。

4. 克隆及测序:扩增的 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,胶回收试剂盒(Qiagen, 德国)切胶回收,与克隆载体 pGEM-T easy(Promega 公司,美国)连接,转化 *E.coli* DH5α(北京天根生化科技有限公司),质粒小提试剂盒(OMEGA)抽提质粒 DNA,经 EcoR I (大连 TaKaRa 公司)单酶切鉴定后,送上海生物工程技术服务有限公司测序。

5. 序列分析:根据 Zheng 等<sup>[9]</sup>对诺如病毒的分类选取参考株,应用 Clustal X(1.83)软件进行序列的多重比对和分析;应用 MEGA 4.0 软件(<http://www.megasoftware.net/>)构建系统发生树。

结 果

1. 病原学检测:19 起胃肠炎暴发主要由诺如病毒引起(12/19, 63.2%),其次是轮状病毒(4/19, 21.1%),1 起由札如病毒引起,2 起疫情 5 种病毒检测均为阴性。12 起诺如病毒引起的暴发中,10 起疫情为单一诺如病毒感染,另 2 起为诺如病毒和其他病毒混合感染[分别为与札如病毒混合感染(广西南宁疫情)以及与札如病毒、腺病毒混合感染(贵州龙里疫情)],见表 2。

2. 疫情特点:12 起诺如病毒暴发疫情均为病程短,大部分患者 1~2 d 自愈,各年龄段均有感染病例;所有病例均有腹泻症状,每日腹泻 3~13 次,多数为 3~5 次,粪便性状多数为水样,此外伴有腹痛、恶心、腹胀、呕吐、头晕头痛、食欲不振、乏力,部分个体有发热症状。无危重病例和死亡病例。

12 起胃肠炎暴发疫情集中发生在 2006 年 12 月至 2007 年 4 月,其中以 2007 年 1 月暴发起数最多(图 1)。12 起诺如病毒暴发疫情发生在 7 个省,暴发的场所较多,4 起发生在学校,4 起发生在村庄或社区,2 起发生在监狱,1 起发生在工厂,还有 1 起在村庄和工厂(表 2)。各年龄组人群均有发病,有别于轮状病毒暴发疫情(主要发生于儿童),特别是发生在社区或村庄的疫情。

3. 诺如病毒分子生物学特征:诺如病毒暴发相关的 83 份粪便标本中,51 份确定为诺如病毒阳性(阳性率为 63.9%),2 份检出札如病毒。对 51 份阳性诺如病毒序列进行系统进化分析(图 2),其中 46 份(90.2%)为 G II-4,3 份为 G II-17,1 份为 G II-3,1 份为 G II-6。根据系统进化分析,G II-4 除 1 株属于 Farmington Hills 群外,其他均属于变异株 2006b 群。由单一病毒株 G II-4/2006b 诺如病毒引起的暴

表 1 诺如病毒、札如病毒、轮状病毒、腺病毒及星状病毒检测所用到的引物

病 毒	扩增区域	引物	极性	引物序列(5' - 3')	产物(bp)
轮状病毒	VP7	Beg9	+	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTC CGTCTGG	395
		VP7-1	-	ACTGATCCTGTTGGCCATCCTTT	
腺病毒	hexon	Ad1	+	TTCCCCATGGCICAYAACAC	482
		Ad2	-	CCCTGGTAKCCRATRTTGTA	
星状病毒	capsid	Precap1	+	GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG	719
		82b	-	GTGAGCCACCAGCCATCCCT	
诺如病毒/札如病毒	polymerase	P290H	+	GATTACTCCAGGTGGGACTCCAC	331/319
		290I	+	GATTACTCCAGGTGGGACTCAAC	
		290J	+	GATTACTCCAGGTGGGATTCAAC	
		290K	+	GATTACTCCAGGTGGGATTCCAC	
		289H	-	TGACGATTTTCATCATCACCATA	
		289I	-	TGACGATTTTCATCATCCCCTGA	

表 2 2006—2007 年中国不同地区胃肠炎暴发疫情病原学检测

编号	地点	发生时间	波及人数	发病例数 (罹患率%)	发生场所	样本份数	阳性份数 (阳性率%)	基因型/亚型
1	广西三江	2006-02	1 156	37(3.2)	村庄	9	5(56)	RV
2	山西朔州*	2006-12	不详	不详	不详	9	6(67)	RV
3	广西融水	2006-12	652	41(6.3)	村庄	7	5(71)	RV
4	广西大新	2006-12	4 000	155(3.9)	村庄	7	7(100)	RV
5	山西临汾	2006-05	2 900	49(1.7)	村庄	10	1(10)	NV(G II -3)
6	福建厦门*	2006-09	不详	不详	社区	6	4(67)	NV(G II -4/2006b)
7	广西南明	2006-11	110	30(27.3)	村庄	2	2(100)	NV(G II -4/2006b)
8	广西南宁	2006-12	3 800	181(4.8)	学校	8	8(100)	NV(G II -4/2006b)
9	广东江门	2007-02	924	71(7.7)	工厂	8	7(87.5)	NV(G II -4/2006b)
10	福建龙岩*	2007-03	不详	不详	社区	7	5(71)	NV(G II -4/2006b)
11	湖南长沙	2007-03	5 694	160(2.8)	学校	10	4(40)	NV(G II -4/2006b)
12	福建泉州	2007-04	850	22	监狱	7	6(86)	NV(G II -4/2006b)
13	福建泉州	2007-04	850	22(2.6)	监狱	8	5(63)	NV(G II -4/2006b)
14	广西南宁	2007-01	2 128	184(8.6)	学校	4	3(75)	NV(G II -4/2006b) (2), SV(1)
15	江苏仪征	2007-01	1 211	181(14.9)	学校	2	2(100)	NV(G II -4/2006b, Farmington Hills)
16	贵州龙里	2007-12	997	165(16.5)	工厂和村庄	11	8(73)	NV(G II -4/2006b, G II -6, G II -17) SV, Ad
17	广西柳州	2007-01	1 471	18(1.2)	学校	2	1(50)	SV
18	四川广元	2007-01	70 500	103(0.2)	村庄	37	15(41)	不确定
19	陕西阎良	2006-06	243 321	636(0.3)	村庄、社区和工厂	47	0(0)	不确定

注: NV: 诺如病毒, RV: 轮状病毒, Ad: 人类腺病毒, SV: 札如病毒; \*未经全国病毒性腹泻监测网络直接送至中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所实验室检测

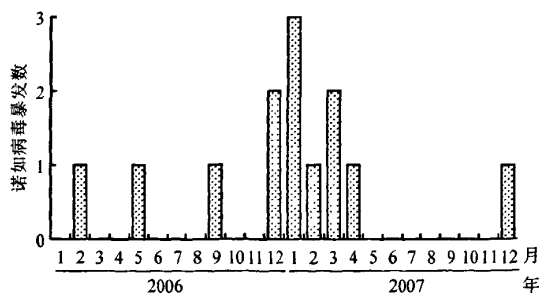


图 1 中国 2006—2007 年诺如病毒胃肠炎暴发季节分布

发为 8 起(66.7%), G II -3 引起的暴发 1 起, 江苏仪征地区暴发的 2 株阳性中, 1 株属于 G II -4/2006b 群, 1 株属于 G II -4/Farmington Hills 群。广西南宁警官学校暴发疫情的 3 株阳性病毒株中, 2 株属于 G II -4/2006b 群, 1 株属于札如病毒。贵州龙里地区暴发疫情检测 11 份样本, 2 份为腺病毒阳性, 8 份为杯状病毒阳性(其中 3 份为 G II -4/2006b 群诺如病毒, 3 份为 G II -17 型诺如病毒, 1 份为 G II -6 型诺如病毒, 1 份为札如病毒)。与腺病毒混合感染有 2 份标本, 分别为腺病毒和 G II -6 诺如病毒混合感染、腺病毒和 G II -4/2006b 诺如病毒混合感染。

讨 论

越来越多的流行病学资料表明, 诺如病毒在一

些地区是引起急性胃肠炎暴发、流行的最重要病原。该病毒具有高度传染性和感染剂量低等特点, 能在相对封闭的环境中迅速传播, 给社会带来巨大的经济负担和社会恐慌。因此, 进行诺如病毒胃肠炎暴发的流行病学调查和对流行株的监测有重要意义。

2006 年 1 月至 2007 年 12 月, 通过全国病毒性监测网络, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所实验室共收到 19 起胃肠炎暴发疫情的样本, 经 RT-PCR 检测确定诺如病毒是这些暴发的主要病原之一(12/19, 63.2%), 以往报道证明, 诺如病毒虽然在 5 岁以下婴幼儿胃肠炎散发中是仅次于轮状病毒的病原, 但胃肠炎暴发主要由诺如病毒引起, 本研究的结果与其他国家的报道一致<sup>[1,6,10-14]</sup>。12 起由诺如病毒引起的暴发主要集中在冬春季, 说明诺如病毒在该季度活动增加, 但也有在其他季度活动增加的报道, 表明诺如病毒在全年均有检出。本研究诺如病毒引起的暴发主要集中在我国南方地区如广西和福建省, 广东省暴发的报道也比较频繁, 表明诺如病毒在我国的暴发可能存在一定的地域性, 但目前我国还没有建立诺如病毒暴发监测。

本研究确定了 2006—2007 年暴发的诺如病毒基因多样性, 基因型包括 G II -3、G II -6、G II -17 和 G II -4。在这些基因型别中, G II -4 是最主要的基

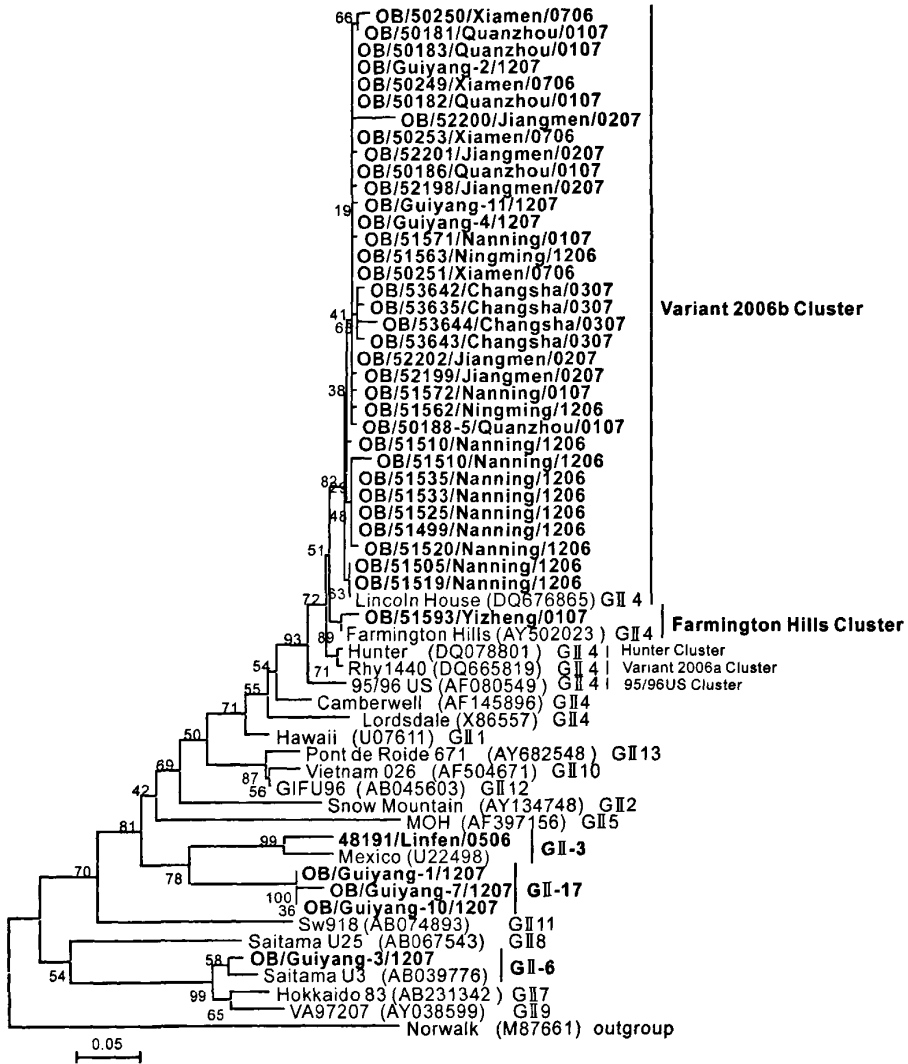


图2 以聚合酶片段为基础的诺如病毒系统进化分析

因型别,占88.2%(45/51)。12起诺如病毒感染暴发中有9起为变异株2006b引起,还有2起为变异株2006b与其他病毒混合感染。表明变异株2006b是引起中国2006—2007年暴发的流行优势株。G II-4/2006b的广泛流行和其他国家研究报道的临床流行病学数据相一致<sup>[6,15]</sup>。在过去的几十年中,诺如病毒引起的全球胃肠炎暴发和流行都与新的G II-4变异株出现有关。95/96US变异株曾引起1995—1996年整个美国55%的胃肠炎暴发,之后在德国、英国、日本、巴西、荷兰等地均引起流行<sup>[1,16]</sup>。2002年美国64%的舰船及45%的陆地相关胃肠炎暴发均为Farmington Hills株引起<sup>[3]</sup>;2004年新的变异株Hunter株引起澳大利亚600多起胃肠炎暴发,之后迅速传遍全球,在新西兰、日本、中国台湾和整个欧

洲均有发生<sup>[4,15,17]</sup>。2004年另一株变异株Sakai株引起日本236个卫生保健机构胃肠炎暴发,之后在美国和荷兰也有此变异株引起的暴发<sup>[5]</sup>。根据欧洲食源性病毒监测网报道,在2005年首次检测到新变异株2006a和2006b,2006年以共同流行的形式引起全球性暴发。如在澳大利亚186起胃肠炎暴发中,变异株2006a和2006b引起的胃肠炎暴发分别占61.8%和11.3%<sup>[6]</sup>;来自欧洲13个国家报告的108起胃肠炎暴发中,87起由G II-4型诺如病毒引起,其中变异株2006a和2006b分别占47%和22%<sup>[6,15]</sup>。本研究中,暴发疫情均未检测到变异株2006a。中国香港报道了类似的情况,2006年5—7月诺如病毒胃肠炎暴发疫情均由变异株2006b引起,未检测到变异株2006a<sup>[18]</sup>。人类组织血型抗原最近已被确

定为诺如病毒感染的受体<sup>[19]</sup>,组织血型抗原具有多态性,人种不同,血型分布也不同。亚洲和欧洲诺如病毒变异株流行的不同,组织血型抗原多态性可能是原因之一。本实验室2007—2009年对诺如病毒监测表明,变异株2006b仍然是流行优势株。

经RT-PCR检测及序列分析确定贵州省龙里县胃肠炎暴发由多种胃肠炎相关病毒(诺如病毒、腺病毒和札如病毒)以及多种型别诺如病毒(G II-4/2006b、G II-17和G II-6)引起,表明此起暴发具有病毒多样性和诺如病毒基因型别多样性,这种特点可能增加了感染的概率和波及范围。

过去的几十年中,诺如病毒的流行和传播与甲型流感病毒非常相似。每隔2~3年就有新抗原性的甲型流感病毒变异株出现,和感染流行相关。与之相比,引起流行的新的G II-4变异株分别在2002、2004和2006年出现。流感病毒HA1蛋白抗原区仅有一个氨基酸的变异足可以避免机体的中和免疫。诺如病毒不同流行株之间在衣壳蛋白基因VP1序列有4.0%~7.9%的氨基酸差异。由累积突变或重组导致衣壳蛋白序列的差异可能是逃避免疫反应和新流行株出现的原因。

总之,诺如病毒在我国是引起急性胃肠炎暴发的主要病原之一,G II-4/2006b变异株是流行优势株。

#### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5: 607-625.
- [3] Isakbaeva ET, Widdowson MA, Beard RS, et al. Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11: 154-158.
- [4] 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: 327-333.
- [5] Okada M, Tanaka T, Oseto M, et al. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol*, 2006, 151: 1635-1641.
- [6] Tu ET, Bull RA, Greening GE, et al. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus G II 4 variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis*, 2008, 46: 413-420.
- [7] Phan TG, Nguyen TA, Yan H, et al. Development of a novel protocol for RT-multiplex PCR to detect diarrheal viruses among infants and children with acute gastroenteritis in Eastern Russia. *Clin Lab*, 2005, 51: 429-435.
- [8] Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al. Design and evaluation of a primer pair that detects both norwalk- and sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods*, 1999, 83: 145-154.
- [9] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 2006, 346: 312-323.
- [10] Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, et al. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis*, 2000, 181 Suppl 2: S270-274.
- [11] Buesa J, Collado B, Lopez-Andujar P, et al. Molecular epidemiology of caliciviruses causing outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis in Spain. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 2854-2859.
- [12] Lau CS, Wong DA, Tong LK, et al. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. *J Med Virol*, 2004, 73: 113-117.
- [13] Medici MC, Martinelli M, Abelli LA, et al. Molecular epidemiology of norovirus infections in sporadic cases of viral gastroenteritis among children in Northern Italy. *J Med Virol*, 2006, 78: 1486-1492.
- [14] Johnston CP, Qiu H, Ticehurst JR, et al. Outbreak management and implications of a nosocomial norovirus outbreak. *Clin Infect Dis*, 2007, 45: 534-540.
- [15] Kroneman A, Vennema H, Harris J, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill*, 2006, 11: E061214.
- [16] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis*, 2002, 186: 1-7.
- [17] Ramirez S, De Grazia S, Giammanco GM, et al. Detection of the norovirus variants GGII. 4 hunter and GGII b/hilversum in Italian children with gastroenteritis. *J Med Virol*, 2006, 78: 1656-1662.
- [18] Ho EC, Cheng PK, Lau AW, et al. Atypical norovirus epidemic in Hong Kong during summer of 2006 caused by a new genogroup II/4 variant. *J Clin Microbiol*, 2007, 45: 2205-2211.
- [19] Huang P, Farkas T, Zhong W, et al. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. *J Virol*, 2005, 79: 6714-6722.

(收稿日期:2009-11-18)

(本文编辑:张林东)