

北京地区急性胃肠炎患者诺如病毒分子流行病学调查

桑少伟 赵仲堂 索继江 邢玉斌 贾宁 高岩 杜明梅
谢丽君 刘伯伟 任世旺 刘运喜

【摘要】 目的 探讨北京地区急性胃肠炎患者诺如病毒分子流行病学特征。方法 采用 RT-PCR 扩增核酸和测序分型方法。结果 共收集腹泻标本 685 份, 检测诺如病毒阳性 66 份, 阳性率为 9.6%。检出率在患者性别、年龄、住院和门诊间的差异均无统计学意义; 诺如病毒胃肠炎患者时间分布也无明显季节性。66 份阳性标本采用 ORF2 区测序分型, 其中 43 份可分型。G I 组占 22.7%, 包括 G I .3 型 2 份、G I .4 型 1 份、G I .5 型 4 份、G I .7 型 3 份; G II 组占 77.3%, 其中以 G II .4 型为主 (60.6%), 其他包括 G II .2 型 1 份、G II .3 型 1 份、G II .5 型 1 份、G II .6 型 2 份、G II .7 型 1 份、G II .12 型 7 份。6 例出现 G I 组和 G II 组混合感染, 其中可分型的有 G I .3/G II .7、G I .5/G II .5、G I .4/G II .4。结论 北京地区急性胃肠炎患者诺如病毒呈现基因多样性, 且以 G II 组为主, 其中 G II .4/2006a 和 2006b 是主要的流行变种, 存在 G I 和 G II 组混合感染现象。

【关键词】 诺如病毒; 急性胃肠炎; 分子流行病学

Study on the molecular epidemiological characteristics of norovirus in acute gastroenteritis of Beijing SANG Shao-wei^{1,2}, ZHAO Zhong-tang¹, SUO Ji-jiang², XING Yu-bin², JIA Ning², GAO Yan², DU Ming-mei², XIE Li-jun², LIU Bo-wei², REN Shi-wang², LIU Yun-xi². 1 Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China; 2 Department of Infection Management and Disease Control, Chinese PLA General Hospital

Corresponding author: LIU Yun-xi, Email: Yunxiliu6511@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30872155, 30972523), the National Science and Technology Major Project of China (No. 2009ZX10004-204) and the Twelfth Five Year Research Foundation of Military Medical Sciences and Technology [the Key Program (No. AWS11L009) and the Special Grant for Health Protection (No. 11BJZ01)].

【Abstract】 **Objective** To study the prevalence, genotypes and molecular characteristics of norovirus (NoV) in acute gastroenteritis. **Methods** RT-PCR was used to determine the molecular epidemiology of NoV. **Results** Out of 685 samples, 66 positive specimens were identified and the prevalence was 9.6% (66/685), 9.9% in males and 9.4% in females, respectively, with no significant difference. The prevalence rates showed no differences between age groups or between inpatients and outpatients. NoV gastroenteritis did not present any seasonal distribution. 43 out of the 66 specimens were classified, with 10 (22.7%) belonged to G I including 2 G I .3, 1 G I .4, 4 G I .5 and 3 G I .7. Other 33 (77.3%) belonged to G II genogroup, including G II .4 accounted for 60.6% (20/33) and followed by 7 G II .12, 2 G II .6, 1 G II .2, 1 G II .3, 1 G II .5. Six specimens mixed with G I and G II and 3 specimens were classified as G I .3/G II .7, G I .5/G II .5 and G I .4/G II .4. **Conclusion** The main symptoms of acute gastroenteritis were abdominal pain, nausea, vomit and fever. There were many genotypes identified in our study and the main genotypes were G II .4/2006a and 2006b. G I and G II could be coinfecting with each other.

【Key words】 Norovirus; Acute gastroenteritis; Molecular epidemiology

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.03.014

基金项目: 国家自然科学基金 (30872155, 30972523); 国家科技重大专项 (2009ZX10004-204); 全军医学科技“十二五”科研项目 (AWS11L009, 11BJZ01)

作者单位: 250012 济南, 山东大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学教研室 (桑少伟、赵仲堂); 解放军总医院感染管理与疾病控制科 (桑少伟、索继江、邢玉斌、贾宁、高岩、杜明梅、谢丽君、刘伯伟、任世旺、刘运喜)

通信作者: 刘运喜, Email: Yunxiliu6511@yahoo.com.cn

诺如病毒分为 5 个基因组(G I ~ V),而感染人类的只有 G I、G II 和 G IV 组,其中以 G I 和 G II 组导致急性胃肠炎最常见。每组诺如病毒又包括若干基因型。目前诺如病毒尚不能在体外培养,也无针对该病毒的疫苗。为探讨北京地区诺如病毒流行现状,本研究采用医院急性胃肠炎病例腹泻标本分析诺如病毒分子流行病学特征。

材料与方 法

1. 腹泻标本:2009 年 4 月至 2011 年 11 月收集解放军总医院急性腹泻 (<24 h 腹泻稀便或水样便 ≥3 次)标本 685(男性 365,女性 320)份,患者年龄 1~91 (M=34)岁。腹泻标本在收集后的 2 h 内送实验室,并分装至含 PBS(pH=7.2)溶液的 EP 管内,配成 10%粪便悬液后-20 ℃条件下储存。

2. 检测方法:采用 Viral Nucleic Acid Extraction Kit II 试剂盒,按照说明书方法提取病毒 RNA。采用 RT-PCR 检测诺如病毒(表 1)。将 5 μl PCR 扩增产物点样在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳,稳压 140 V,时间 40 min,用凝胶成像系统观察 PCR 产物电泳条带,并用凝胶成像系统照相。将扩增条带良好的诺如病毒片段递交公司测序,使用 Mega 5.0 软件对核酸序列比对并采用邻近法建进化树,对核苷酸序列重复抽样,bootstrap 值为 1000。

表 1 检测诺如病毒所用的引物、扩增区域、引物序列及扩增片段

| 分组 | 扩增区域 | 引物序列(5'~3') | 片段(bp) |
|------------------|-------|------------------------------------|--------|
| G I Capsid(Vp1) | | | 330 |
| | G1SKF | CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA | |
| | G1SKR | CCA ACC CAR CCA TTR TAC A | |
| G II Capsid(Vp1) | | | 387 |
| | G2SKF | CNT GGG AGG GCG ATC GCAA | |
| | G2SKR | CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT | |
| G II Capsid(Vp1) | | | 387 |
| | COG2F | CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG | |
| | G2SKR | CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT | |

3. 统计学分析:使用 SPSS 16.0 软件对诺如病毒检出率在性别、年龄、门诊和住院患者间的差别,利用χ²检验进行分析。

结 果

1. 阳性检出率及临床症状:共收集到合格标本 685 份(其中 2009 年 167 份,2010 年 160 份,2011 年 358 份),检测诺如病毒阳性 66 份,阳性率为 9.6%

(66/685)。其中男性 36 份和女性 30 份阳性,阳性率分别为 9.9%(36/365)和 9.4%(30/320),差异无统计学意义(P=0.845),各年龄组间阳性检出率也无统计学的关联(表 2)。对 3 年的数据综合分析,3—11 月均未呈现明显的季节性趋势(图 1)。诺如病毒检出阳性患者中腹痛 37 例(60.7%,37/61),呕吐 32 例(49.2%,32/65),恶心 40 例(63.5%,40/63),发热(最高 39.3 ℃) 17 例(27%,17/63)。

表 2 685 例急性腹泻患者检出诺如病毒阳性标本的年龄、性别和不同就诊情况分布

| 分组 | 人数 | 阳性例数 | χ ² 值 | P 值 |
|-------|-----|------|------------------|-------|
| 年龄(岁) | | | 3.175 | 0.529 |
| <6 | 14 | 3 | | |
| ~20 | 53 | 6 | | |
| ~40 | 336 | 34 | | |
| ~60 | 168 | 13 | | |
| >60 | 83 | 9 | | |
| 性别 | | | 0.038 | 0.845 |
| 男 | 365 | 36 | | |
| 女 | 320 | 30 | | |
| 就诊情况 | | | 0.235 | 0.628 |
| 门诊 | 541 | 58 | | |
| 住院 | 59 | 5 | | |

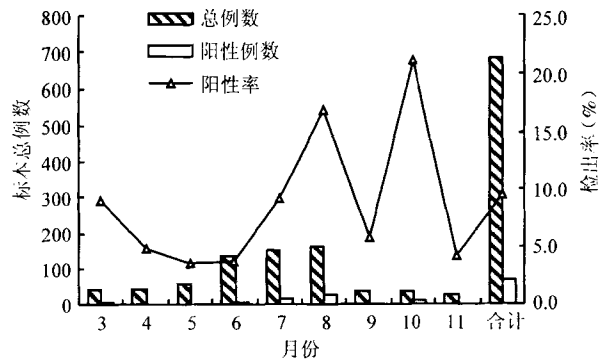
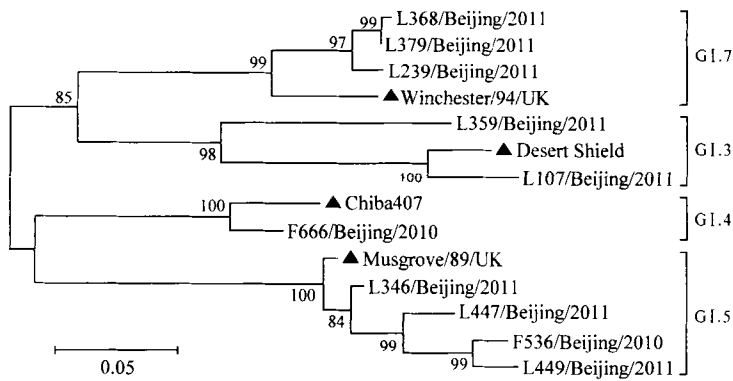


图 1 2009—2011 年北京地区 685 例急性腹泻患者诺如病毒检出率季节变化趋势

2. 病毒测序分型:66 份阳性标本中成功分型 43 份。共检测到 G I 组诺如病毒 10 份(22.7%),其中 G I .3 型 2 份、G I .4 型 1 份、G I .5 型 4 份、G I .7 型 3 份(图 2)。

用 COG2F/G2SKR 引物成功扩增 7 份阳性标本,用 G2SKF/G2SKR 引物扩增共检测到阳性标本 26 份,本次共检测到 G II 组诺如病毒 33 份(77.3%)。其中包括 G II .2 型 1 份、G II .3 型 1 份、G II .4 型 20 份、G II .5 型 1 份、G II .6 型 2 份、G II .7 型 1 份、G II .12 型 7 份(图 3)。出现 G I 组和 G II 组诺如病毒混合感染的有 6 份标本,成功分型的有 G I .3/G II .7、G I .5/G II .5、G I .4/G II .4。



注:进化树通过扩增 ORF2 部分序列构建。DesertShield(U04469)、Chiba407 (AB042808)、Musgrove(AJ277614)、Winchester(AJ277609)为参考株;L368/Beijing/2011、L379/Beijing/2011、L239/Beijing/2011、L359/Beijing/2011、L107/Beijing/2011、F666/Beijing/2011、L346/Beijing/2011、L447/Beijing/2011、F536/Beijing/2011、L449/Beijing/2011 为本研究检测株

图2 GI 组诺如病毒进化树分析

讨论

随着分子生物学技术的发展,尤其是 RT-PCR 技术的应用,发现诺如病毒是导致急性胃肠炎的主要病毒之一。由于各研究采用的引物不一致,或实验方法敏感程度有差异,获得的诺如病毒阳性率不尽相同,但 Patel 等^[1]利用 Meta 分析得出各年龄组人群诺如病毒散发急性胃肠炎的阳性率为 12% (95% CI: 9% ~ 15%)。本研究对诺如病毒 G II 组 VP1 区域的扩增采用两套引物,首先单独采用 G2SKF/G2SKR,然后将结果为阴性的标本再采用 COG2F/G2SKR 扩增,发现如果单独采用第一对引物,可使假阴性率升高。2007 年 7 月至 2008 年 6 月北京地区非细菌性胃肠炎病例中诺如病毒检出率为 26.6%^[2]。本研究检出率为 9.6%。研究中发现诺如病毒检出率在各年龄段间并无明显差别,且尚未发现诺如病毒阳性率在性别间的差异。有研究发现诺如病毒更容易感染组织——血型组抗原 (HBGAs) “分泌性”(Se⁺) 人群^[3],即诺如病毒感染人群具有选择性,但也有研究发现诺如病毒感染与 HBGAs 并不存在相关性^[4]。

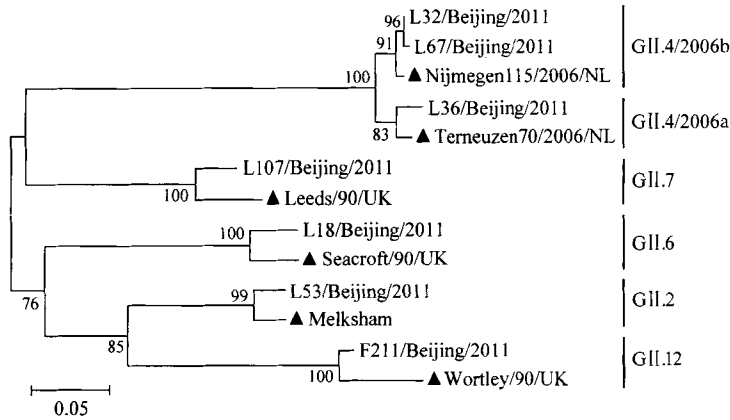
由于诺如病毒在冬季发病率相对于其他季节明显升高,即诺如病毒急性胃肠炎发病存在季节性,已有研究提示干、冷的气候更利于诺如病毒的活动^[5]。但在澳大利亚,诺如病毒胃肠炎在暖季节流行^[6]。韩国 2009—2010 年的数据显示,诺如病毒的流行季节是从晚秋到春季^[7];陈美芳等^[8]研究发现北京地区 2005—2006 年流行季节是秋季,2007 年 7 月至 2008 年 6 月流行季节是 1 月和 4 月。由此可见诺如病毒并无明显的季节流行趋势。本研究将 2009—2011

年每年 3—11 月(2 月仅收集到 2 份标本,12 月和次年 1 月缺少数据)收集的数据合并分析,以 8 月和 10 月诺如病毒检出率最高,尚不能确定出现冬季流行,但也未发现夏季流行的趋势。

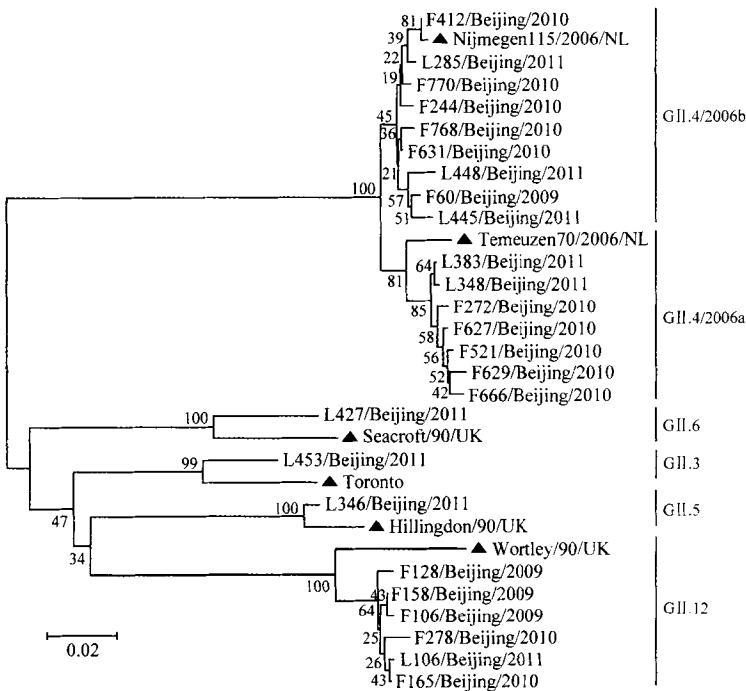
诺如病毒中以 G II .4 型导致的暴发和散发最常见,有研究发现 G II .4 的基因型抗原漂移速度快,进化速度是其他基因型的 1.7 倍^[9]。从 1996 年开始,基因型 G II .4 毒株已成为世界流行株,且从 2002 年开始每 2 ~ 3 年就会出现新的变种,并导致世界范围的诺如病毒暴发和流行,其中包括 G II .4 95/96、2002、2004、2006a 和 2006b 变种。2006 年 4 月至 2007 年 9 月日本检出的诺如病毒急性胃肠炎病例均为 G II 组,G II .4 基因型占 93.9%,其中 G II .4/2006b 变种占 90.3%,G II .4/2006a 变种占 9.7%^[10];在 2007 年 4 月至 2008 年 3 月散发性急性胃肠炎中 G II .4 基因型占 87%,且全部为 G II .4/2006b 变种^[11]。北京地区 2007 年 10 月至 2008 年 9 月调查数据显示^[12],G II .4/2006b 是主要基因型(77.1%)。本研究成功分型的诺如病毒中,以 G II .4 基因型为主(45.5%, 20/44),且全部是 G II .4/2006a、G II .4/2006b 亚型,分别占 40%(8/20)和 60%(12/20)。由此可见 2006—2011 年 G II .4/2006b 变种仍然是流行株,并无被替代的趋势,但 Mathijs 等^[13]通过对比比利时 2006—2010 年诺如病毒分析发现,G II .4/2006b 变种已经被 G II .4/2010 变种取代。可见 G II .4 基因型仍然流行,且 G II .4/2006a 和 2006b 还在世界范围内流行,其中 2006b 似乎比 2006a 致病能力更强。需要强调的是 G II .2 型,虽只在 2011 年检测到 1 份,但 G II .2 型在 2009—2010 年是日本的主要基因型,并导致诺如病毒感染的暴发或散发,其优势甚至超过 G II .4 基因型^[14],因此必须警惕此型病毒的致病能力。本研究仅采用了 ORF2 区域进行测序分型,尚不能鉴别是否存在基因重组,因此有必要对 ORF1 区域进行测序分型,以确定是否有重组的发生。

参考文献

- [1] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(8): 1224-1231.
 - [2] Wu J, Gao ZY, Liu GR, et al. Study on the epidemiologic characteristics of norovirus infection in Beijing. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(7): 667-670. (in Chinese)
- 吴疆,高志勇,刘桂荣,等.北京地区诺如病毒感染的流行病学



注:进化树利用引物 COG2F/G2SKR 扩增 ORF2 部分序列构建; Nijmegen115 (EF126966)、Terneuzen70 (EF126964)、Leeds (AJ277608)、Seacroft (AJ277620)、Melksham (X81879)、Wortley (AJ277618) 为参考株; L32/Beijing/2011、L67/Beijing/2011、L36/Beijing/2011、L107/Beijing/2011、L18/Beijing/2011、L53/Beijing/2011、F211/Beijing/2011 为本研究检测株



注:进化树利用引物 G2SKF/G2SKR 扩增 ORF2 部分序列构建; Nijmegen115 (EF126966)、Terneuzen70 (EF126964)、Toronto (U02030)、Hillingdon (AJ277607)、Seacroft (AJ277620)、Wortley (AJ277618) 为参考株; F412/Beijing/2011、L285/Beijing/2011、F770/Beijing/2010、F244/Beijing/2010、F768/Beijing/2010、F631/Beijing/2010、L448/Beijing/2011、F60/Beijing/2009、L445/Beijing/2011、L383/Beijing/2011、L348/Beijing/2011、F272/Beijing/2010、F627/Beijing/2010、F521/Beijing/2010、F629/Beijing/2010、F666/Beijing/2010、L427/Beijing/2011、Seacroft/90/UK、L453/Beijing/2011、Toronto、L346/Beijing/2011、Hillingdon/90/UK、Wortley/90/UK、F128/Beijing/2009、F158/Beijing/2009、F106/Beijing/2009、F278/Beijing/2010、L106/Beijing/2011、F165/Beijing/2010 为本研究检测株

图3 G II 组诺如病毒进化树分析

调查. 中华流行病学杂志, 2007, 28(7): 667-670.

[3] Tan M, Jin M, Xie H, et al. Outbreak studies of a G II -3 and a G II -4 norovirus revealed an association between HBGA phenotypes and viral infection. *J Med Virol*, 2008, 80(7): 1296-1301.

[4] Halperin T, Vennema H, Koopmans M, et al. No association between histo-blood group antigens and susceptibility to clinical infections with genogroup II norovirus. *J Infect Dis*, 2008, 197(1): 63-65.

[5] 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. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6671.

[6] Bruggink LD, Marshall JA. The incidence of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia (2002-2007) and their relationship with rainfall. *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7(7): 2822-2827.

[7] Park K, Yeo S, Jeong H, et al. Updates on the genetic variations of norovirus in sporadic gastroenteritis in Chungnam Korea, 2009-2010. *Virology*, 2012, 9(1): 29.

[8] Chen MF, Gao Y, Cong X, et al. Etiological study on sporadic viral gastroenteritis among adult in Beijing. *Natl Med J Chin*, 2008, 88(4): 265-267. (in Chinese)
陈美芳, 高燕, 丛旭, 等. 成人散发病毒性胃肠炎的病原学分析. *中华医学杂志*, 2008, 88(4): 265-267.

[9] Bull RA, Eden JS, Rawlinson WD, et al. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the G II.4 lineage. *PLoS Pathog*, 2010, 6(3): e1000831.

[10] Kitahori Y, Inoue Y, Imanishi Y. Detection and genetic characterization of sporadic noroviruses in Nara Prefecture between April 2006 and September 2007. *Jpn J Infect Dis*, 2008, 61(1): 89-90.

[11] Kitahori Y, Inoue Y, Imanishi Y. Genetic characterization of sporadic noroviruses in Nara Prefecture: April 2007-March 2008. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(1): 82-83.

[12] Gao Y, Jin M, Cong X, et al. Clinical and molecular epidemiologic analyses of norovirus-associated sporadic gastroenteritis in adults from Beijing, China. *J Med Virol*, 2011, 83(6): 1078-1085.

[13] Mathijs E, Denayer S, Palmeira L, et al. Novel norovirus recombinants and of G II.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virology*, 2011, 8: 310.

[14] Iritani N, Kaida A, Abe N, et al. Increase of G II.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka city, Japan. *J Med Virol*, 2012, 84(3): 517-525.

(收稿日期: 2012-10-09)
(本文编辑: 张林东)