

浙江省 2006—2007 年暴发性胃肠炎中诺如病毒的分子流行病学分析

龚黎明 葛琼 卢亦愚 张严峻 严菊英 周敏 余昭

【摘要】 目的 分析浙江省 2006—2007 年暴发性病毒性胃肠炎中诺如病毒感染的分子流行病学特征。方法 收集监测期间暴发性病毒性胃肠炎疫情患者的粪便标本及相关流行病学资料。采用 RT-PCR 及荧光定量 RT-PCR 检测诺如病毒。随机选择部分阳性标本扩增部分多聚酶区和衣壳蛋白片段,进行序列测定,结合诺如病毒 I (G I)、II (G II) 基因型参考株进行进化分析。结果 诺如病毒感染暴发性胃肠炎共 5 起, 发生时间均集中于 9—12 月, 送检标本 63 份, 诺如病毒检测阳性 45 份。序列分析结果显示, 浙江省诺如病毒序列与诺如病毒 G II/4 型参考株同源性最高, 其中与北京 2006 年、荷兰 2006 年诺如病毒 G II/4 型变异株最为接近, 核苷酸同源性分别为 99.7% 和 98.5%~99.0%。诺如病毒与北京、荷兰流行的 G II/4 型变异株处于同一分支。结论 诺如病毒是浙江省病毒性腹泻暴发疫情的重要病原体, 流行时间集中于秋季, 其流行株为 G II/4 型变异病毒株。

【关键词】 诺如病毒; 暴发性病毒性胃肠炎; 分子流行病学

Molecular epidemiology of Norovirus in outbreaks of gastroenteritis in Zhejiang from 2006 to 2007
GONG Li-ming, GE Qiong, LU Yi-yu, ZHANG Yan-jun, YAN Ju-ying, ZHOU Min, YU Zhao. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 **Objective** To study the molecular epidemiological characteristics of Norovirus gastroenteritis outbreaks in Zhejiang. **Methods** During January 2006 and December 2007, fecal specimens of patients collected from outbreaks of acute viral gastroenteritis were tested for Norovirus. Epidemiological data were also collected. Noroviruses were detected by a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Real-time RT-PCR. Some positive samples were randomly selected and RT-PCR products were sequenced. Comparing to the nucleotide sequences of norovirus genotype I, II reference strains from GenBank, sequence analysis was undertaken based on partial sequence of RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and capsid protein (VP1) gene. **Results** 5 outbreaks of viral gastroenteritis caused by Norovirus were reported. A total of 63 stools were obtained from cases with acute gastroenteritis. Noroviruses alone were detected in 45 cases and the illness appeared in autumn. Phylogenetic analysis revealed that Norovirus belonged to G II/G II 4 type. The strains isolated from Zhejiang were almost identical on G II/4 variants that causing epidemics in Beijing and in the Netherlands with the homology of 99.7% and 98.5%~99.0% respectively. Phylogenetic analysis revealed that the isolates were located at the same branch as the norovirus G II/4 variants found in Beijing and Netherlands. **Conclusion** Norovirus is a major cause of outbreaks of viral gastroenteritis in Zhejiang province. Genogroup II/4 variants viruses were the prevalent strains.

【Key words】 Norovirus; Outbreaks of gastroenteritis; Molecular epidemiology

诺如病毒(Noroviruses)属杯状病毒科, 是全世界引起急性病毒性胃肠炎暴发和散发最主要的病原体之一^[1]。诺如病毒感染的胃肠炎常发生于学校、医院、幼托机构、养老院等相对封闭的场所, 可通过食物、水、气溶胶和接触等多种途径进行传播, 少量病毒就能引起感染。2006 年 1 月至 2007 年 12 月浙江省共报告 5 起病毒性胃肠炎的暴发疫情, 发病 251 例, 无死亡病例。为了解浙江省暴发性病毒性胃肠

炎中诺如病毒的分子流行病学特点, 对暴发疫情的 63 例送检标本进行病毒核酸检测、序列分析, 并收集相关流行病学资料, 结果报道如下。

材料与方法

1. 调查方法和标本采集: 采用自制的流行病学调查表, 以村、居委会、学校等为单位, 对 2006—2007 年凡 1 周内出现 20 例及以上或 1 d 内出现 5 例及以上疑似病毒性胃肠炎病例的疫情, 进行就餐、饮用水、外环境等情况的流行病学调查, 并采集现症患

者的粪便或肛拭标本送检。

2. RT-PCR:

(1)病毒 RNA 的提取:标本采用 PBS 溶液制成 10% 悬液,取上清液 200 μl 提取病毒核酸,采用 Roche 公司的高 Pure Viral RNA Kit,按照试剂盒说明书进行。最终收集 RNA 提取液 50 μl。

(2)诺如病毒的 RT-PCR 确认:采用多对 RT-PCR 引物对送检标本进行检测(表 1)^[2-4],运用 TaKaRa 公司 One Step RNA PCR Kit 进行 RT-PCR,反应条件为:48℃ 30 min 反转录,94℃ 2 min 后以 94℃ 30s、51℃ 30 s、72℃ 1 min,循环 35 次,72℃ 延伸 7 min,然后转入 4℃。取 RT-PCR 产物 7 μl,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,根据 Marker 位置确认反应产物。

表 1 RT-PCR 引物

引物	基因型	位置	方向	序列(5' ~ 3')
JV12	G I 和 G II	4277 ~ 4297	+	ATA CCA CTA TGA TGC AGA TTA
JV13		4583 ~ 4603	-	TCA TCA TCA CCA TAG AAA GAG
P290	G I 和 G II	4568 ~ 4590	+	GAT TAC TCC AAG TGG GAC TCC AC
P289		4865 ~ 4886	-	TGA CAA TGT AAT CAT CAC CAT A
Calman-1	G II	4193 ~ 4213	+	GCA CAC TGT GTT ACA CTT CC
Calman-2		4997 ~ 5015	-	ACA TTG GCT CTT GTC TGG
Calman-29	G I	4868 ~ 4891	+	TAT GGT GAT GAT GAA ATA GTG TC
Calman-32		5338 ~ 5356	-	ATT TCG GGC AGA AGA TTG

3. 诺如病毒的荧光定量 RT-PCR 确认:同时采用荧光定量 RT-PCR 方法(引物及 TaqMan 探针序列见表 2)对上送标本进行检测^[5],运用 TaKaRa 公司的 One Step RT-PCR Kit (Perfect Real Time) 进行荧光定量 RT-PCR 扩增诺如病毒核酸。扩增条件为 42℃ 30 min 反转录,95℃ 2 min 后以 95℃ 5 s、51℃ 35 s、读板,共 40 个循环。

4. 诺如病毒部分多聚酶区 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) 和衣壳蛋白的序列测定:选取每起疫情的部分阳性标本运用 Rohayem 等^[2]方法

表 2 荧光定量 RT-PCR 引物和探针

引物	基因型	位置	方向	序列(5' ~ 3')
JJV1F	G I	5282 ~ 5299	+	GCCATGTTCCGITGGATG
JJV1R		5358 ~ 5377	-	TCCTTAGACGCCATCATCAT
JJV1P		5319 ~ 5341	+	FAM-TGTGGACAGGAGATC GCAATCTC -TAMRA
JJV2F	G II	5003 ~ 5028	+	CAAGAGTCAATGTTTAGGT GGATGAG
COG2R		5080 ~ 5100	-	TCGACGCCATCTTCATTCACA
RING2-TP		5048 ~ 5067	+	FAM-TGGGAGGGCGCATCGC AATCT-TAMRA

扩增病毒的 RdRp 片段;应用本实验室设计的引物 P462 5'-TCC TGC GGA GAA CTG TGA-3' 和 P1977 5'-CCT GGA TGA CAC CGA CTG G-3', 扩增部分衣壳蛋白片段。采用罗氏公司 DNA 纯化试剂盒,按试剂盒说明书进行纯化与标记,扩增产物经纯化后,在 ABI 3710 avant 全自动核酸测序仪上测序,应用 BioEdit 及 MEGA3.1 等软件,采用 Neighbour joining 的 kimura two-parameter distance 方法进行分析,用于构建系统发生树的诺如病毒基因 I、II 型基因序列均来自 GenBank。

结 果

1. 疫情概况:2006—2007 年浙江省共报告 5 起诺如病毒性胃肠炎暴发疫情,其中 2006 年 4 起,2007 年 1 起,分别发生在单位、学校、乡村,其中单位 2 起,学校 1 起,乡村 2 起,共发病 251 例,罹患率为 6.77% (表 3),无死亡病例。5 起疫情分布于杭州、宁波、丽水、衢州 4 个市。5 起疫情中 4 起有共同的食物史。

表 3 2006—2007 年浙江省诺如病毒性胃肠炎暴发疫情分布

地区	发病例数	罹患率 (%)	采样份数	诺如病毒检测阳性率 (%)
宁海(宁波)	26	8.39	23	15 65.3
遂昌(丽水)	34	17.00	15	7 46.7
衢江(衢州)	122	4.07	12	12 100.0
衢江(衢州)	54	1.80	5	5 100.0
某学校(杭州)	15	7.50	8	6 75.0
合计	251	6.77	63	45 71.4

2. 人群及时间分布:患者的年龄、性别构成比经 χ^2 检验 $P > 0.05$, 差异无统计学意义。患者中年龄最小的为 10 月龄,最大为 84 岁,其中 20 ~ 60 岁占 71.7%,患者中男性占 65%。5 起疫情集中发生于 9 月底至 12 月初,以 11 月为多。

3. 临床症状:患者主要临床表现均以呕吐 (46.75%)、腹痛/腹泻 (100%) 为主;腹泻以每日 3 ~ 5 次 (58.4%) 居多,其次为 6 ~ 9 次 (26.0%),有 14.3% 的病例 > 10 次,个别病例腹泻达 20 次之多。大部分病例病程短 (1 ~ 3 d),病情较轻,无明显脱水症状。

4. 病毒流行毒株的遗传进化分析:5 起疫情共送检标本 63 份,经 RT-PCR 及荧光定量 RT-PCR 检测阳性 45 份,均为诺如病毒 G II 基因型,检测阳性率 71.4%。随机选取每起疫情的阳性标本 2 ~ 5 份扩增诺如病毒部分 RdRp 和衣壳蛋白片段,进行序列测定及分析,RdRp 区域分析发现浙江省 2006—2007 年诺如毒株与北京 G II/4 型变异毒株 Beijing/2006 株 (GenBank 序列号 EU36613) 的核苷酸序列同源性

最高为 99.7%^[6]，与荷兰的 G II/4 型变异株 Nijmegen115/2006 株、DenHaag89/2006 株（序列号 EF126965、EF126966）同源性次之，为 98.5%~99.0%，与日本毒株 Kobe 034（序列号 AB291542）同源性也高达 98.3%~98.5%。而与诺如病毒 G II/4 型其他变异毒株 Farmington 群、Hunter 群 532D、US95/96 Bushwash Landing 群毒株的核苷酸序列同源性分别为 93.0%、90.8%、91.6%；与 G I 型各基因型毒株的核苷酸同源性为 45.9%~50.2%；与 G II/1、G II/2、G II/3、G II/5、G II/6、G II/7、G II/9、G II/10、G II/12 各基因型毒株核苷酸序列的同源性分别为 83.4%~83.9%、71.4%~71.0%、68.4%~69.8%、74.2%~75.1%、59.6%~59.9%、58.9%~59.3%、55.5%~55.9%、86.5%~87.1%、86.3%~87.1%。浙江省诺如病毒毒株衣壳蛋白区域的序列分析结果相似，毒株未发生遗传重组。2006—2007 年 5 起疫情诺如病毒阳性毒株之间变异很小，核苷酸序列同源性均在 99% 以上。选取部分毒株 RdRp 和衣壳蛋白核苷酸序列与诺如病毒 G I、G II 组部分参考株进行比较并绘制遗传进化树（图 1、2）。在两个进化树中，浙江省暴发疫情的毒株均被分在 G II/4 型，在整个 G II/4 型中，浙江省诺如病毒毒株与北京毒株 Beijing/2006 株、荷兰 2006 年流行的诺如病毒 G II/4 变异株 Nijmegen115/2006 株、DenHaag89/2006 株以及日本毒株 Kobe 034 形成一个独立的分支。

5. 流行毒株 RdRp 区内保守基序分析：诺如病毒 RdRp 区的 GDD 基序相对保守，通过其是否发生变异可以定义诺如病毒一个新的变异株^[7]。将浙江省 2006、2007 年诺如病毒毒株与部分 G II/4 型诺如病毒毒株 RdRp 区的 GDD 基序序列（图 3，GDD 基序以黑框表示）进行比较，结果显示浙江省 2006、2007 年毒株的 GDD 基序变为 AATTTG，与北京 Beijing/2006 株、荷兰 Nijmegen115/2006 株、DenHaag89/2006 株、日本毒株 Kobe 034 及 2006 年欧洲变异毒株 2006b-EU 相同，而与 G II/4 型其他变异毒株 Farmington 群、Hunter532D 群、US95/96 Bushwash Landing 群毒株不同。

讨 论

诺如病毒是世界范围内急性病毒性胃肠炎的重要病原体之一，在发达国家，有 68%~80%

的暴发性病毒性腹泻是由诺如病毒引起。本研究收集 2006—2007 年间浙江省 5 起病毒性胃肠炎暴发疫

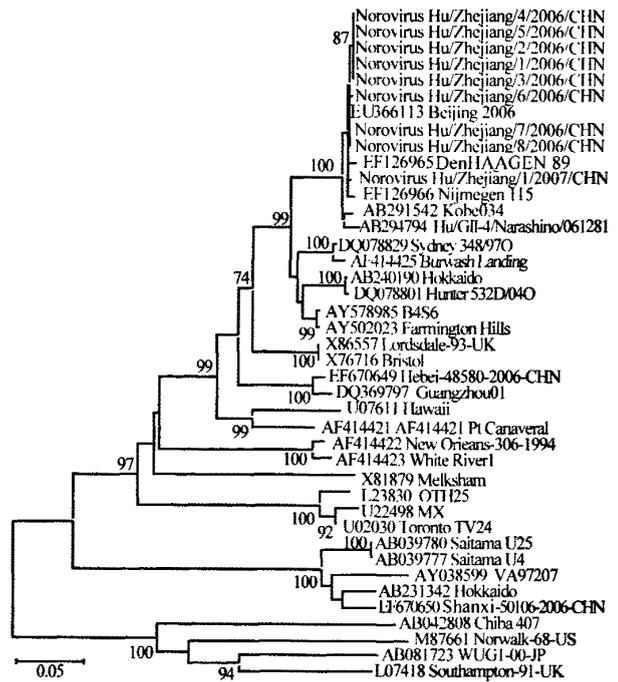


图 1 诺如病毒 RdRp 区核苷酸序列系统发生树

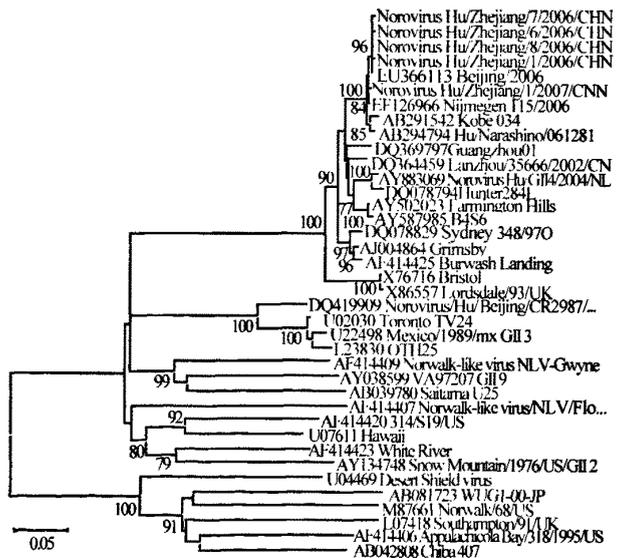


图 2 诺如病毒衣壳蛋白区核苷酸序列系统发生树

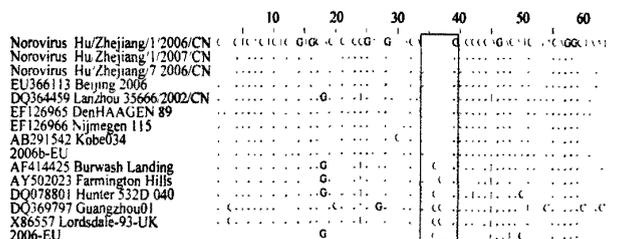


图 3 诺如病毒 RdRp 区 GDD 基序分析

情的临床标本,采用多对 RT-PCR 通用引物和荧光定量 RT-PCR 同时进行检测,在一定程度上提高了检出率。该 5 起疫情均由诺如病毒引起,样本中诺如病毒的检出率高达 71.4%,高于散发病例 11%~55% 的诺如病毒检出率^[8-10]。浙江省暴发疫情的流行高峰分布于秋季,11 月是流行的高峰季节,此结果类似于广东省,而我国其他地区报道资料显示,流行高峰主要在冬季^[8,9]。与散发病例主要集中在 5 岁以下儿童不同,暴发疫情中患者的年龄、性别构成比之间的差异无统计学意义。

根据诺如病毒基因组的 RdRp 和衣壳蛋白核苷酸序列差异可分为 5 个基因组,感染人类的主要为 G I、G II 和暂定的 G IV 基因组,G I 包含 14 个基因型,G II 至少包含 17 个基因型,G IV 为 1 个基因型^[11-14]。重组病毒的出现使基因型更为复杂,目前已经发现 23 株诺如病毒 RdRp 和衣壳蛋白属于不同的基因型^[9],而且自然重组断点一般位于 ORF1/ORF2 重叠区,因此本研究选择了较为保守的病毒 RdRp 区及部分衣壳蛋白区同时进行分析。结果显示 2006—2007 年浙江省流行的诺如病毒毒株均为 G II/4 变异株,RdRp 区和衣壳蛋白区分析结果一致,毒株未发生遗传重组。

诺如病毒 G II/4 型无论在国外还是国内一直都是流行的优势毒株,占散发病例的 43.7%,暴发病例的 85.8%^[16]。由于诺如病毒易发生变异,而新变异株的出现往往是新一轮疫情的预警。诺如病毒 G II/4 型变异株 US95/96 群、FarmingtonHills 群、Hunter 群的出现,曾引起全世界多个地区和国家暴发疫情^[17,17]。近年来,除了欧美国家外,2006 年日本也暴发了 25 年来最严重的诺如病毒急性胃肠炎疫情,至少有近 304 万余人感染,检出的诺如病毒大部分属于 G II/4 基因型^[18],2006 年我国北京地区也出现了较多的诺如病毒急性胃肠炎疫情。

通过对浙江省 2006—2007 年诺如毒株 RdRp 区序列分析发现,与 Beijing/2006 变异株的核苷酸序列同源性最高为 99.7%,与荷兰 G II/4 型变异株同源性次之,为 98.5%~99.0%,而与日本 Kobe 034 变异毒株的同源性也高达 98.3%~98.5%,该毒株 2006 年 11 月曾引起日本神户多次诺如病毒感染暴发疫情。系统发生树的结果也显示浙江省 2006—2007 年暴发疫情的诺如病毒毒株与中国北京、荷兰、日本的毒株位于同一分支上,形成了不同于诺如病毒 G II/4 型变异株 US95/96 群、FarmingtonHills 群、Hunter 群毒株的独立分支。RdRp 区的 GDD 基序分

析也表明浙江省 2006—2007 年的诺如病毒与我国北京 Beijing/2006 株、荷兰 Nijmegen115/2006 株、DenHaag89/2006 株、日本毒株 Kobe 034 及 2006 年欧洲变异毒株 2006b-EU 相同,均为 AATTTG。提示浙江省 2006—2007 年的诺如病毒与同时期国内、国际上流行的毒株属同一类 G II/4 变异株,有着共同的起源。且这 5 起疫情来自于省内不同地区,其毒株核苷酸同源性高达 99% 以上,表明该诺如病毒 G II/4 变异株在浙江省有着较为广泛的流行。

参 考 文 献

- [1] 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): 1-7.
- [2] Rohayem J, Berger S, Juretzek T, et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. *J Virol Methods*, 2004, 118(1):49-59.
- [3] 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 (1-2): 145-154.
- [4] Vinje J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (4): 1423-1433.
- [5] Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, et al. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(4):1870-1875.
- [6] 吴疆,高志勇,刘桂荣,等.北京地区诺如病毒感染的流行病学调查. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(7):667-670.
- [7] 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.
- [8] 陈军林,王滔,高建民,等.福州地区腹泻患者诺如病毒感染的分子流行病学特点. *中国人兽共患病杂志*, 2003, 19(2):83-84.
- [9] 吕红霞,方肇寅,谢华萍,等.河北省卢龙县 1999—2001 年婴幼儿轮状病毒腹泻流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2003, 24(12):1118-1121.
- [10] 刘翼,戴迎春,姚英民,等.广州市某医院儿童秋冬季腹泻诺如病毒感染的分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(7):525-528.
- [11] Koopmans MG, Bonsdorff CH, Vinje J, et al. Foodborne enteric viruses. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26: 187-205.
- [12] Ando T, Noel JS, Fankhauser RL. Genetic classification of "Norwalk-like Viruses". *J Infect Dis*, 2000, 181: S336-348.
- [13] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 2003, 299(5612): 1575-1578.
- [14] Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on Real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4):1548-1557.
- [15] Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, et al. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(7):1079-1085.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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/n33462511n3346252/15689.html>.

(收稿日期:2008-08-15)
(本文编辑:张林东)