

浙江省 2008—2009 年三起诺如病毒 胃肠炎暴发的病原分子特征分析

龚黎明 葛琼 陈寅 卢亦愚 张严峻 严菊英 周敏 史雯

【摘要】 目的 分析浙江省 3 起病毒性胃肠炎暴发疫情的诺如病毒分子特征。方法 收集监测期间病毒性胃肠炎暴发疫情患者的粪便标本,采用荧光定量 RT-PCR 方法检测诺如病毒,并选择部分阳性标本扩增部分多聚酶区 (RdRp) 和衣壳蛋白区,同时采用 3' RACE (rapid amplification of cDNA 3' ends) 扩增诺如病毒基因组 3' 末端,获得完整的开放读码框架 (ORF) 2 和 ORF3 序列。结果 3 起暴发疫情共检测标本 62 份,诺如病毒阳性 41 份,其中诺如病毒 I (G I) 基因组阳性 27 例, II 基因组 (G II) 阳性 9 例, G I + G II 阳性 5 例。结果显示,引起浙江省 2008—2009 年 3 起病毒性胃肠炎暴发疫情的诺如病毒具有病毒基因型的多样性,包括 G I .8、G II .b、G I .2 与 G I .6 重组株、G I .8 和 G II .b 混合感染。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,呈现出病毒基因型的多样性,并在省内首次检测到诺如病毒的重组和混合感染毒株。

【关键词】 诺如病毒; 分子特征; 重组; 混合感染

Molecular characteristics of norovirus in 3 outbreak-episodes of gastroenteritis in Zhejiang from 2008 to 2009 GONG Li-ming, GE Qiong, CHEN Yin, LU Yi-yu, ZHANG Yan-jun, YAN Ju-ying, ZHOU Min, SHI Wen. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

Corresponding author: GONG Li-ming, Email: glmzq@163.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology in Infection Diseases of China (No. 2009ZX10004-210).

【Abstract】 **Objective** To study the molecular characteristic of norovirus in 3 outbreaks of gastroenteritis in Zhejiang province. **Methods** During January 2008 and December 2009, fecal specimens of patients were collected from 3 outbreaks of acute viral gastroenteritis. Noroviruses were detected by Real-time RT-PCR. Part of the positive samples were randomly selected and detected by RT-PCR. PCR products were sequenced. Sequence analysis was undertaken based on partial sequence of RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and capsid protein gene. Some positive samples were amplified by 3' RACE (rapid amplification of cDNA 3' ends), 3200 bp in length. The exact whole ORF2, ORF3 and 3' untranslated regions (UTR) gene of norovirus were identified. **Results** There were in total 3 outbreaks of viral gastroenteritis caused by norovirus being reported. A total of 62 stools were obtained from cases with acute gastroenteritis. Noroviruses were detected in 41 cases including 27 strains of genogroup I norovirus and 9 strains of genogroup II norovirus, 5 strains of genogroup I + II norovirus. Four genotypes including G I .8, G II .b, G I .2/G I .6 recombination together with co-infection of G I .8 and G II .b were detected. **Conclusion** Norovirus was confirmed as the major cause of outbreaks of viral gastroenteritis in Zhejiang province and multiple genotype of norovirus were identified from the outbreaks. It was the first time to have found a recombinant of G I .6 capsid and G I .2 polymerase norovirus as well as the co-infection of G I .8 and G II .b norovirus in the same sample.

【Key words】 Norovirus; Molecular characteristics; Recombinant; Co-infection

诺如病毒是在世界范围内引起急性病毒性胃肠炎暴发和散发主要的病原体之一。2008—2009 浙江省共报告 3 起学校病毒性胃肠炎的暴发疫情,发病 775 例,无死亡病例,经流行病学调查,确定为不合格桶装饮用水引起的暴发疫情^[1,2]。为了解这 3 起暴发疫情的病原分子特征,本研究对相关样本进行

病毒核酸检测和序列分析。

材料与方法

1. 标本采集:由疫情发生地的疾病预防控制中心进行现场流行病学调查,采集现症患者的粪便或肛拭标本置 -80 ℃ 保存。

2. 病毒 RNA 的提取:标本采用 PBS 溶液制成 10% 悬液,离心取上清液 200 μl 提取病毒核酸,采用德国 QIAGEN 公司的 Rneasy mini Kit,按照试剂盒

说明书进行,最终收集RNA提取液30 μl。

3. RT-PCR:采用荧光定量RT-PCR方法检测诺如病毒G I、G II型^[3];按照Rohayem等^[4]、Yan等^[5]的RT-PCR方法检测星状病毒、肠道腺病毒和札如病毒;轮状病毒检测采用兰州生物制品研究所轮状病毒酶标诊断试剂盒。引物、Taqman探针序列及实验方法参照文献。

(1)序列测定:选取诺如病毒检测阳性标本,运用多对引物JV12/JV13、p290/p289、Calman-1/Calman-2、Calman-29/Calman-32、COG2F/G2-SKR^[4,5]扩增病毒的多聚酶区(RdRp)片段和部分衣壳蛋白片段,并根据已测序列设计相关引物,逐步获得完整的开放读码框架(ORF)2序列。

(2)3'RACE扩增病毒基因组3'末端:选取部分诺如病毒阳性样本,在AMV(TaKaRa)酶的作用下,采用Oligo dT引物反转录合成病毒cDNA。取cDNA 3 μl进行扩增,采用JV12为上游特异性引物,PCR扩增的3.2 kb特异性片段经分离、切胶回收纯化后,利用T4 DNA连接酶将纯化后的PCR产物连接到pGEM-T Easy载体(promega)上,转化大肠埃希菌DH5α,在含IPTG、x-gal和氨苄青霉素的LB平板上筛选白色菌落,培养后小量提取质粒,用M13引物测序,以获得3'末端3.2 kb整段序列。

(3)序列分析:运用BioEdit、DNASTAR及MEGA 3.1软件进行序列比对分析及构建系统发生树。

结 果

1. 疫情概况:2008—2009年浙江省共报告3起诺如病毒性胃肠炎暴发疫情(表1),分别发生于2、3、4月,均发生在学校。患者主要临床表现以呕吐(64%)、腹痛及腹胀(59%)、腹泻(74%)为主,发热病例仅11例。大部分病例病程短(1~3 d),病情较轻,无明显脱水症状。经检测,确定为诺如病毒引起的暴发,并排除轮状病毒、札如病毒、星状病毒及肠道腺病毒感染。

表1 2008—2009年浙江省诺如病毒性胃肠炎暴发疫情概况

标本来源地区 (年份)	病例 数	罹患率 (%)	采样 份数	检测阳性份数			阳性率 (%)
				G I	G II	G I+G II	
杭州余杭(2008)	155	5.94	40	21	0	0	52.5
湖州安吉(2008) ^a	578	25.58	12	6	4	1	91.7
湖州安吉(2009) ^a	42	1.91	10	0	5	4	90.0
合 计	775	10.97	62	27	9	5	66.1

注:^a两起疫情发生于同一学校

2. 病毒流行株的基因进化分析:根据测序结果构建系统发生树(图1、2)。杭州余杭样本6份

图1 诺如病毒G I基因组RdRp区与衣壳蛋白区核苷酸系统进化树

(Hu-2008-ZJ-YH)来自3所中学,样本间核苷酸序列同源性为98.9%,在RdRp区域和衣壳蛋白区与G I .8参考株的同源性为97.4%~99.9%,为G I .8型病毒株,未发生自然重组。湖州安吉2008年疫情的G I型阳性标本(Hu-2008-ZJ-HZ)之间核苷酸同源性达99.5%,其RdRp区域与G I .2参考株的核苷酸同源性为87.6%,衣壳蛋白区的核苷酸同源性仅为78.0%,而与G I .6参考株同源性为85.5%;与G I .2/G I .6重组株WUGI/00/JP的RdRp区和衣壳蛋白区同源性分别达90.7和93.9%,在系统发生树上与该病毒株位于同一分支,为浙江省首次发现的G I型重组病毒株。2008年湖州疫情的G II型阳性标本及混合感染病例未能成功扩增。选取湖州安吉2009年疫情G II型阳性标本及混合感染病例各1例,经序列分析证实G II型阳性标本Hu-2009-ZJ-HZ-18为G II .b型,其与印度G II .b株PC03/2006/India在RdRp区域和衣壳蛋白区的核苷酸同源性分别为98.1%和97.8%。混合感染病例为G I .8型和G II .b型混合感染,其病毒株编号分别为

Hu-2009-ZJ-HZ-19-1 和 Hu-2009-ZJ-HZ-19-2, 其中 Hu-2009-ZJ-HZ-19-1 与 2008 年杭州余杭分离株核苷酸同源性达 98.6%, 而 Hu-2009-ZJ-HZ-19-2 则与本次疫情 G II.b 型单独阳性病例分离株高度同源, 核苷酸同源性可达 99.5%, 这两种不同基因型的病毒株在同一病例的标本中未发生自然重组。

3. 病毒的 ORF2 和 ORF3 分析: 诺如病毒 G I 型毒株 Hu-2008-ZJ-YH-1、Hu-2008-ZJ-HZ-3、Hu-2009-ZJ-HZ-19-1 与 G II 型毒株 Hu-2009-ZJ-HZ-18、Hu-2009-ZJ-HZ-19-2 的 ORF2 全长分别为 1632、1623、1632、1620、1620 个碱基, 编码 543、540、543、539、539 个氨基酸。同一基因组内相同基因型病毒株之间 ORF2 氨基酸高度同源, 而不同基因型之间差异较大(图 3)。浙江省 G I.8 型株与 G I.2/G I.6 重组株之间氨基酸同源性仅为 64.1%, 病毒株在 S 区与 P 区结合部位的铰链序列部分保守。在 P1 亚区的胰岛素酶切位点 KT 或 RT 序列保守, 在 P 区 C 末端均存在保守精氨酸 R 簇; P2 区高度变异, 黑框依次表示 P2 区形成结合袋负责与人外周组织的血型抗原(HBGAs)结合的 4 个位点(I ~ IV)。比对氨基酸序列在 I 位点, 浙江省分离株的氨基酸为 RGR/K/M 样 motif, 其余 3 个分散的特异性氨基酸结合位点也各不相同; 在 II 位点为 H、N; III 位点为 P、N、T; IV 位点为 R、D、S。

G II.b 毒株、G I.8 型毒株 ORF3 全长分别为 642、759 个碱基, 编码 213、252 个氨基酸。G I、G II 基因组间 ORF3 差异较大, 但 G I、G II 基因组内相对保守。

讨 论

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 G IV, 其中 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^[6]。由于诺如病毒易变异, 存在着多种抗原类型和基因型, 出现重组株更表现出抗原的多样性, 易引起疫情暴发。

2006—2007 年浙江省 5 起病毒性胃肠炎暴发疫情均由优势株 G II.4 变异株引起。但与此不同, 2008—2009 年出现了 3 起病毒性胃肠炎暴发, 均发生于冬春季, 出现了单纯 G I 型、单纯 G II 型及 G I 重组株和 G I、G II 型株混合感染, 呈现病毒基因型的多样性。该现象在浙江省病毒性腹泻监测中尚属首次发现。

2008 年 3 月余杭地区的疫情波及数所中学, 但其感染的病毒株均为 G I.8 型, 分离株间高度同源,

图 2 诺如病毒 G II 基因组 RdRp 区与衣壳蛋白区核苷酸系统进化树

图3 诺如病毒G I、G II毒株ORF2氨基酸序列比对

提示疫情有着共同的起源。同年4月湖州地区疫情却由完全不同的病毒株引起,并首次检测到重组株G I.2/G I.6。WUGI/01/JP为此类重组株的原型株,其类似的重组株于2000—2004年在日本、美国流行^[7];2009年2月该地区同一所学校又发生病毒性腹泻疫情,但与2008年不同,此次疫情由G II.b株和G I.8与G II.b混合株引起。其中G I.8株与2008年余杭地区分离株的核苷酸序列高度同源,提示G I.8株可能在浙江省局部地区流行。有报道G II.b株在住院病例和院外病例中感染率可达12.5%和75.0%^[8],且易发生自然重组^[9],其重组株涉及G II.b/G II.1、G II.b/G II.2、G II.b/G II.3、G II.b/G II.4,逐渐成为继G II.4后重要的流行株。在本次疫情的混合感染病例标本中,G I.8与G II.b病毒株并未发生重组,是否因为不同基因组间病毒株不易发生重组,尚需更进一步研究。

诺如病毒的衣壳蛋白为其主要抗原决定簇,同时具有与受体结合的功能。有学者^[10]认为在该病毒S区和P区结合部位的铰链序列FLVPPTVE在G I、G II型中均高度保守,但浙江省分离的G I.8、G II.b株及重组株G I.2/G I.6的铰链序列分别为FLVPPDI、YLVPPSVE、FLVPPSVE,仅LVPP部分保守,这样的改变是否与其结合能力改变有关,尚不清楚。浙江省诺如病毒分离株P1亚区的胰岛素酶切位点KT或RT氨基酸序列和P区C末端精氨酸R簇均相对保守,Tan等^[11]认为C末端保守精氨酸R簇在受体识别过程中起了重要作用。P2区袋状样结构与HBGAs结合有关,结合袋底部包含一个保守的RGD样motif(结合位点I)和包围motif的3个分散特异性氨基酸结合位点(II~IV)。RGD样motif前两位氨基酸保守,而第三位则相对多变^[12]。本次研究的病毒株出现类似结果,RG保守,而第三位氨基

酸则出现M、K、R三种情况。其余3个分散的特异性氨基酸结合位点也出现了不同程度的改变,可能导致与HBGAs受体的结合模式发生变化,从而影响感染与发病。

参 考 文 献

- [1] Han JK, Shen JY, Yao WT, et al. An investigation and analysis on an outbreak of acute gastroenteritis caused by genogroup I and II norovirus. *Chin J Exp Clin Virol*, 2008, 2(4):263-265. (in Chinese) 韩建康,沈建勇,姚文庭,等.一起诺如病毒I型、II型混合感染急性胃肠炎暴发疫情调查分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 2(4):263-265.
- [2] Xie L, Sun Z, Deng J, et al. Risk factors of norovirus I gastroenteritis outbreak. *Chin J Sch Health*, 2009, 30(5):453-454. (in Chinese) 谢立,孙晔,邓晶,等.一起诺如病毒I型胃肠炎暴发疫情危险因素分析. *中国学校卫生*, 2009, 30(5):453-454.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Yan H, Yagyu F, Okitsu S, et al. Detection of norovirus (G I, G II), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J Virol Meth*, 2003, 114(1):37-44.
- [6] Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, et al. Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 4):909-919.
- [7] Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol*, 2007, 88(12):3347-3359.
- [8] Chhabra P, Chitambar SD. Norovirus genotype II b associated acute gastroenteritis in India. *J Clin Virol*, 2008, 42(4):429-432.
- [9] Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, et al. Detection of a novel intergenogroup recombinant norovirus from Kolkata, India. *Virology*, 2008, 377(1):117-123.
- [10] Tan M, Fang P, Chachiyo T. Norovirus P particle: structure, function and applications in virus-host interactions. *Virology*, 2008, 382(1):115-123.
- [11] Tan M, Meller J, Jiang X. C-terminal arginine cluster is essential for receptor binding of norovirus capsid protein. *J Virol*, 2006, 80(15):7322-7331.
- [12] Tan M, Huang P, Meller J, et al. Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. *J Virol*, 2003, 77(23):12562-12571.

(收稿日期:2010-10-18)

(本文编辑:张林东)