

杭州地区 2014—2015 年急性胃肠炎患者感染诺如病毒的流行病学特征分析

崔大伟 李中杰 林洁 靳森 杨先知 谢国良 郑书发 余斐 陈瑜

作者单位: 310003 杭州, 浙江大学医学院第一附属医院检验科(崔大伟、杨先知、谢国良、郑书发、余斐、陈瑜); 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制处, 传染病监测预警中国疾病预防控制中心重点实验室(李中杰); 310002 杭州市清波街道社区卫生服务中心检验科(林洁); 102206 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(靳森)

崔大伟, 李中杰同为第一作者

通信作者: 陈瑜, Email: chen_yu_zy@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.02.021

【摘要】 目的 了解 2014—2015 年杭州地区急性胃肠炎患者中诺如病毒的流行病学特征。**方法** 收集 1 109 份急性胃肠炎患者的临床流行病学资料和粪便样本, 采用一步法双重荧光 RT-PCR 对样本中诺如病毒(G I、G II 型)进行初筛, 然后随机选择诺如病毒阳性的样本核酸进行多重 RT-PCR 扩增, 对产物进行测序分析。**结果** 1 109 份的粪便样本中, 诺如病毒检出率为 26.87%(298/1 109), 以 G II 亚型为主, 占 25.52%(283/1 109), G I 亚型占 1.35%(15/1 109); 不同性别人群诺如病毒检出率差异无统计学意义($P>0.05$); 不同年龄组人群中诺如病毒检出率分别为 16.94%(<5 岁)、19.45%(5~18 岁)和 32.26%(≥18 岁); 全年均可检出诺如病毒感染, 高发季节为 12 月至次年 3 月, 阳性率为 29.67%~37.08%。序列分析显示, G II 基因亚型中以 G II-4/Sydney 株为主(46.43%, 13/28), 其次为 G II-4/2006b 株; G I 基因亚型中以 G I-1 亚型为主(55.56%, 5/9)。**结论** 诺如病毒是导致 2014—2015 年杭州地区急性胃肠炎的主要病原之一, G II 基因亚型特别是 G II-4/Sydney 变异株和 G II-4/2006b 变异株是该地区流行的优势毒株。

【关键词】 诺如病毒; 急性胃肠炎; 聚合酶链反应; 基因型

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004-210)

Epidemiologic characteristics of noroviruses isolated in outpatients with acute gastroenteritis in Hangzhou area, from 2014 to 2015 Cui Dawei, Li Zhongjie, Lin Jie, Jin Miao, Yang Xianzhi, Xie Guoliang, Zheng Shufa, Yu Fei, Chen Yu

Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China (Cui DW, Yang XZ, Xie GL, Zheng SF, Yu F, Chen Y); Division of Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Communicable Disease Surveillance and Early Warning, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Li ZJ); Department of Clinical Laboratory, Center of Community Health Service of Qingbo Street, Hangzhou 310002, China (Lin J); National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Jin M)

Cui DW and Li ZJ are the first authors who contributed equally to the article.

Corresponding author: Chen Yu, Email: chen_yu_zy@163.com

【Abstract】 Objective To explore the epidemiologic characteristics of noroviruses isolated in patients with acute gastroenteritis in Hangzhou between March 2014 and April 2015. **Methods** Stool specimens and clinical data were collected from 1 109 patients with acute gastroenteritis. Specimens were detected for noroviruses with G I and G II subtypes by one-step double real-time RT-PCR. Some of the positive specimens were then randomly selected and amplified by multiplex RT-PCR. Those positive PCR products were sequenced and analyzed phylogenetically for testing the partial capsids of noroviruses. **Results** Of the 1 109 stool specimens, positive rate of noroviruses was 26.87% (298/1 109).

G II genotype was the major viruses with the proportion as 25.52% (283/1 109), while 1.35% (15/1 109) belonged to G I genotypes. There was no significant difference in the noroviruses detection rate of the different genders ($P>0.05$). However, in different age groups, G II genotypes were predominant types of noroviruses, and the positive rates of G II genotypes were 16.94% (<5 years-old), 19.45% (5–18 years-old) and 32.26% (≥ 18 years-old), respectively. In different seasons, noroviruses could be detected all year round, with positive rate as 29.67%–37.08% in the highly epidemic seasons (between December and March of the following year). The distribution trends were seen certain difference between noroviruses-G II and G I types. Additionally, results from the sequence analysis demonstrated that G II –4 genotype was the prevalent strain of G II genotypes, clustered into G II –4/Sydney (46.43%, 13/28) and G II –4/2006b (25.0%, 7/28), while G I strains clustered into G I –1. **Conclusion** Noroviruses appeared one of the major pathogens, leading to acute gastroenteritis. G II genotypes of noroviruses, especially the G II –4/Sydney variant strains and G II –4/2006b variant strains, were considered to be the prevalent strains prevailed in Hangzhou areas from 2014 to 2015.

【Key words】 Noroviruses; Acute gastroenteritis; Polymerase chain reaction; Genotype

Fund program: National Science and Technology Major Project of China (2012ZX10004–210)

诺如病毒包括G I、G II型,是导致各年龄组人群急性胃肠炎暴发和散在流行的主要病原^[1-3]。研究表明,诺如病毒通常导致轻微和自限性疾病,典型临床表现为急性腹泻、发热和呕吐等症状,严重者可导致死亡^[4-5]。诺如病毒具有高度变异性,持续监测急性胃肠炎患者中诺如病毒的分子流行病学特征有助于诺如病毒感染的预防和控制。本研究对杭州地区急性胃肠炎门诊患者中诺如病毒的分子流行病学特征进行分析。

材料与方法

1. 临床样本收集:2014年3月至2015年4月采集浙江大学医学院附属第一医院和杭州市清波街道社区卫生服务中心门诊就诊的1 109例急性胃肠炎患者的粪便样本和临床资料,患者就诊前均未使用过抗生素。样本于 -80°C 保存备用。

2. 病毒核酸提取:用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)将每份粪便样本稀释制备成10%的悬液,7 104 $\times g$ 离心后吸取140 μl 上清液,利用德国Qiagen公司QIAamp Viral RNA Mini试剂盒提取病毒核酸。严格按试剂盒操作说明书进行,收集终体积为50 μl 的RNA提取液,采用NanoDropND–2000核酸检测仪器检测RNA纯度和浓度, -80°C 保存备用。

3. 病毒初筛:应用上海辉睿生物科技有限公司生产的诺如病毒G I/G II型分型RNA检测试剂盒(荧光RT-PCR法)(货号:VR–II–202)对临床样本进行诺如病毒G I、G II型初筛,所用PCR仪器为ABI7500。反应体系:诺如病毒G I/G II反应液15 μl ,酶混合液5 μl ,待测样本RNA 5 μl ,总体积25 μl ;扩增条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 反转录30 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,40个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸及荧光检测共45 s),检测通道:FAM(G I),VIC(G II)。结果

判断:在阴/阳性对照及扩增曲线均良好的情况下, C_t 值 <35 为阳性; C_t 值 ≥ 38 或0为阴性; $35 \leq C_t$ 值 <38 为疑似,重复测定, C_t 值 ≥ 38 为阴性; C_t 值 <38 为阳性。

4. 多重PCR检测:应用大连宝生物公司的TaKaRa PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis试剂盒(Cat#6210A),将诺如病毒初筛为阳性的RNA反转录为cDNA。反应条件:42 $^{\circ}\text{C}$ 反转录20 min,99 $^{\circ}\text{C}$ 灭活反转录酶5 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。将上述反转录产物cDNA作为模板,对诺如病毒G I、G II型进行双重PCR扩增。扩增引物参照文献[2]。反应体系:25 μl :2.5 μl 的10 $\times$ ExTaq缓冲液,2.0 μl 的2.5 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs,0.5 μl 的10 $\mu\text{mol/L}$ 混合引物(GI-SKF, GI-SKR;CoG2F,G2SKR),0.25 μl 的ExTaq酶(5 U/ μl),2 μl 的cDNA模板,其余用去离子水补足。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35个循环;70 $^{\circ}\text{C}$ 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR产物应用2%琼脂糖凝胶进行电泳、显色、分析。

5. 序列分析和系统进化树构建:随机选择电泳阳性的PCR产物送杭州博尚生物技术有限公司进行测序。其测序结果采用DNAMAN 5.1软件进行比对,并利用Mega 4.0软件绘制进化树,所有诺如病毒G I、G II型参考株均来源于GenBank数据库。

6. 统计学分析:采用SPSS 13.0软件,对年龄、季节分布等资料进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 诺如病毒检出率:在1 109份急性胃肠炎患者的粪便样本中,诺如病毒检出率为26.87%(298/1 109),其中G I亚型为1.35%(15/1 109),G II基因

亚型为25.52%(283/1 109)。男性患者诺如病毒的阳性率为27.53%(158/574),其中G I 和G II 亚型分别为1.39%和26.13%;女性患者诺如病毒的阳性率为26.17%(140/535),其中G I 和G II 亚型分别为1.31%和24.86%。不同年龄组中,以≥18岁组的诺如病毒检出率较高,为33.87%(190/561),其中G I 和G II 亚型分别为1.60%(9/561)和32.26%(181/561);以<5岁年龄组中的诺如病毒检出率最低,为18.03%(33/183),其中G I 和G II 亚型分别为1.09%(2/183)和16.94%(31/183),见表1。

表1 2014—2015年杭州地区急性胃肠炎患者中诺如病毒的检测

基本特征	样本人数	诺如病毒		
		合计	G I 型	G II 型
性别				
男	574	158(27.53)	8(1.39)	150(26.13)
女	535	140(26.17)	7(1.31)	133(24.86)
年龄组(岁)				
<5	183	33(18.03)	2(1.09)	31(16.94)
5~	365	75(20.55)	4(1.10)	71(19.45)
≥18	561	190(33.87)	9(1.60)	181(32.26)
合 计	1 109	298(26.87)	15(1.35)	283(25.52)

注:括号外数据为人数,括号内数据为阳性率(%)

2. 诺如病毒的季节分布:诺如病毒引起的急性胃肠炎全年均可发生,以12月至次年3月为高发季节,高峰期的阳性率为29.67%~37.08%,最高峰发

生在2月。诺如病毒G II 型的分布趋势与诺如病毒基本一致,而诺如病毒G I 型的季节分布无明显变化趋势,见表2。

表2 2014—2015年杭州地区急性胃肠炎患者中诺如病毒的季节分布

采样时间 (年-月)	样本 人数	阳性样本数		G II 型 阳性率(%)	G I 型 阳性率(%)	总阳性率 (%)
		G II 型	G I 型			
2014-03	83	21	1	25.30	1.20	26.51
2014-04	74	18	1	24.32	1.35	25.68
2014-05	73	16	1	21.92	1.37	23.29
2014-06	67	13	0	19.40	0.00	19.40
2014-07	98	17	1	17.35	1.02	18.37
2014-08	75	12	1	16.00	1.33	17.33
2014-09	85	17	1	20.00	1.18	21.18
2014-10	74	18	1	24.32	1.35	25.68
2014-11	82	23	1	28.05	1.22	29.27
2014-12	91	27	1	29.67	2.00	30.77
2015-01	78	27	2	34.62	2.56	37.18
2015-02	89	33	2	37.08	2.25	39.33
2015-03	75	23	1	30.67	1.33	32.00
2015-04	65	18	1	27.69	1.54	29.23
合 计	1 109	283	15	25.52	1.35	26.87

3. 诺如病毒进化分析:随机选择9株诺如病毒G I 型、28株诺如病毒G II 型阳性PCR产物进行测序和系统进化分析(图1)。结果显示,诺如病毒G I 型:5株为诺如病毒G I -1型,与M87661/NVUSA93/G I -1株的核苷酸同源性的91.8%~

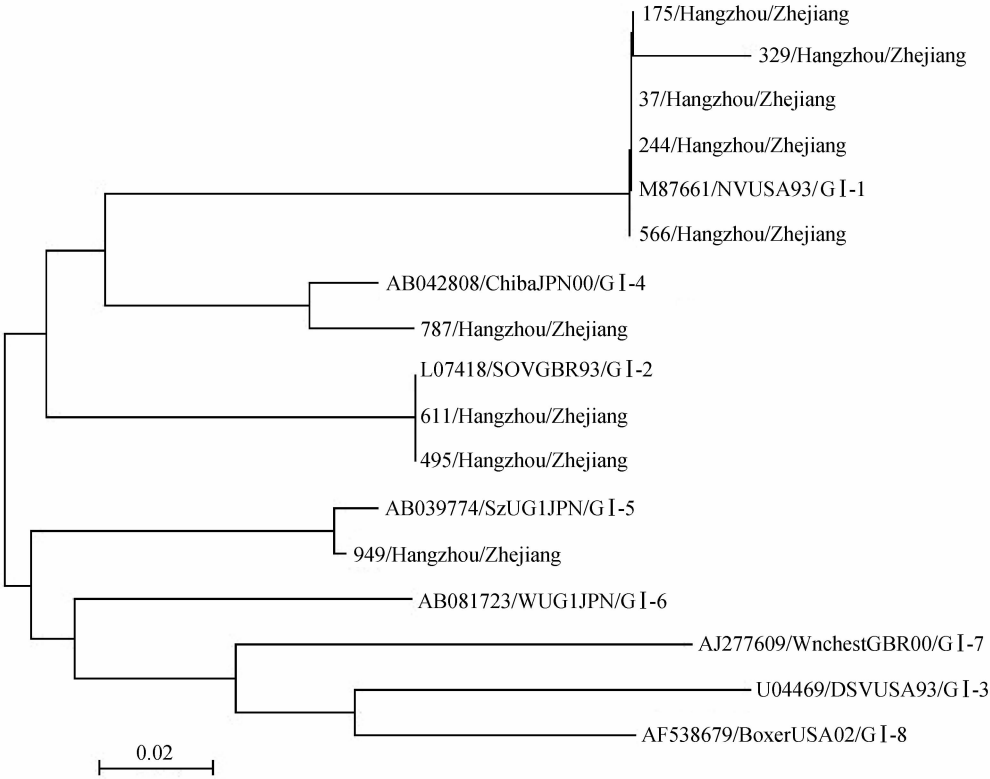


图1 诺如病毒G I 病毒衣壳蛋白N/S区系统进化树

92.5% ; 2 株为诺如病毒 G I -2 型 , 与 L07418/ SOVGBR93/G I -2 株的核苷酸同源性为 97.3% ~ 98.0% ; 1 株为诺如病毒 G I -4 型 , 与 AB042808/ ChibaJPN00/G I -4 株的核苷酸同源性为 89.8% ; 1 株为诺如病毒 G I -5 型 , 与 AB039774/SzUG1JPN/G I -5 株的核苷酸同源性为 95.2% 。 诺如病毒 G II 型 : 13 株为诺如病毒 G II -4 型 , 与 JX459908/Sydney/ NSW0514/2012/AU G II -4 株的核苷酸同源性为 91.8% ~ 92.5% ; 7 株也为诺如病毒 G II -4 型 , 与 AB291542/Kobe034/2006b/ JP/G II -4 株的核苷酸同源性为 97.3% ~ 98.0% ; 4 株为诺如病毒 G II -6 型 , 与 AB039776/Saitama U3/G II -6 株的核苷酸同源性为 95.2% ; 3 株为诺如病毒 G II -3 型 , 与 U22498/MX/ G II -3 株的核苷酸同源性为 95.2% ; 1 株为诺如病毒 G II -13 型 , 与 AB078334 KSW47JPN G II -13 株的核苷酸同源性为 89.8% , 见图 2 。

讨 论

急性胃肠炎是人类最常见的传染病之一 , 在发展中国家和发达国家造成较高的发病率和死亡率^[5-7] , 病毒感染在所有急性胃肠炎原因中占 50% 以上^[8-9] 。 A 组轮状病毒、诺如病毒、札幌病毒、星状病毒和肠道腺病毒是病毒性急性胃肠炎腹泻的主要病原^[2,10-11] 。 诺如病毒是公认的全世界所有年龄组人群急性病毒性胃肠炎散在病例和暴发的主要原因^[6,12] 。 本研究显示 , 门诊采集的急性胃肠炎患者的粪便标

本中 , 诺如病毒阳性率为 26.87% , 其中诺如病毒 G II 型为 25.52% , 高于国内其他地区的报道 , 而诺如病毒 G I 型与国内其他地区的报道基本一致^[8-11] , 这种差异可能与研究时间、选择医院的数量较少 (2 家) , 以及人口流动等因素有关。

不同性别、不同年龄段人群 , 诺如病毒 G I 、 G II

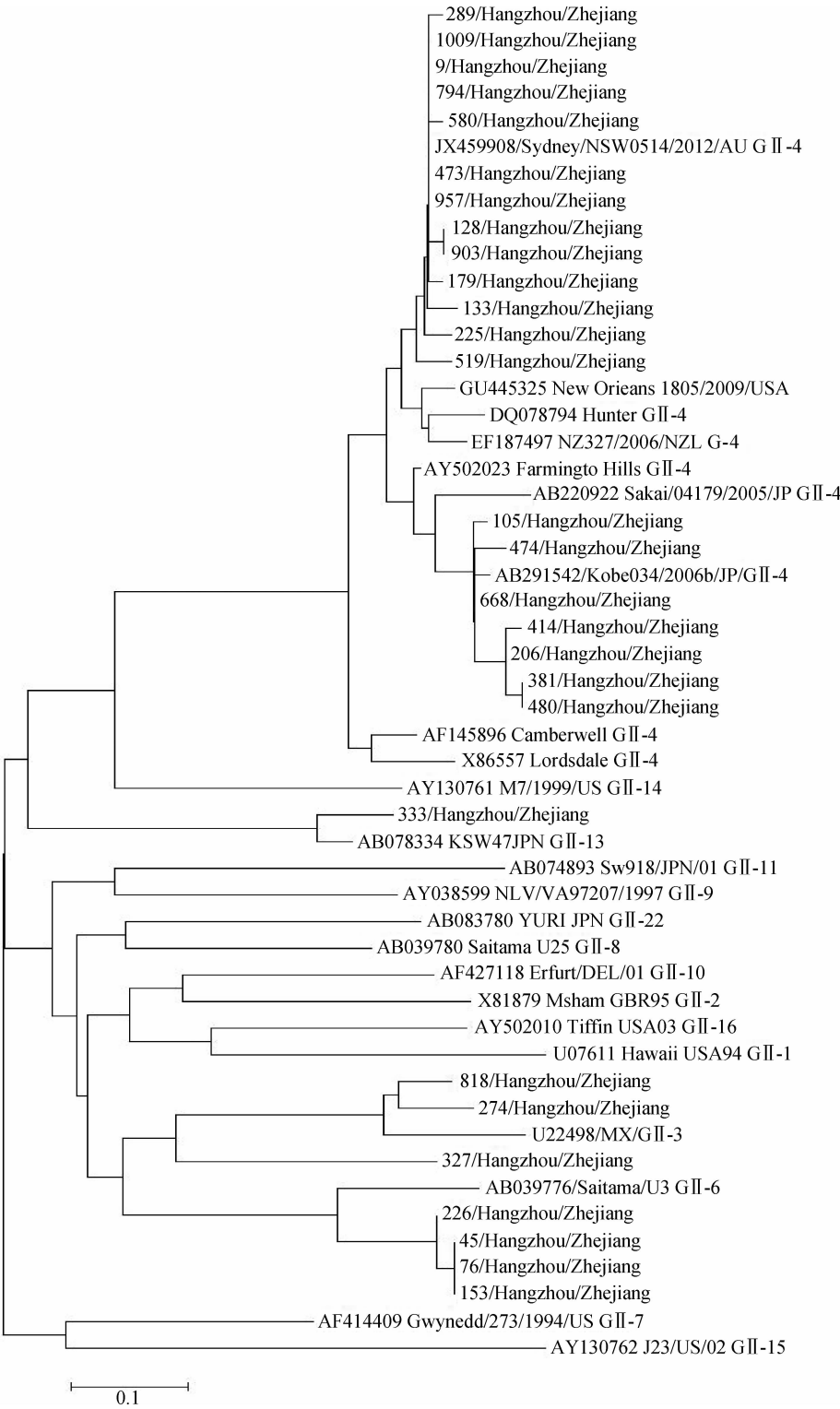


图2 诺如病毒 G II 病毒衣壳蛋白 N/S 区系统进化树

型的检测率与国内外其他的地区的报道也基本一致^[6, 10-13],提示诺如病毒对人类普遍易感,与诺如病毒的高度变异可能存在一定关系。成年人的感染率高于未成年人及其婴幼儿($P<0.05$),可能与成年人接触诺如病毒感染的物品、食品等机会较多有关^[6, 10-12]。许多研究表明,诺如病毒感染受到季节影响,通常发生在春、夏和冬季^[10, 14]。本研究显示,诺如病毒散发感染常年均有发生,而高峰通常发生在冬、春季,峰值在 2 月,与我国东南部地区报道类似^[8-10]。提示杭州地区的气候、饮食等有关因素对诺如病毒常年的散发流行和高峰期有一定的影响。

诺如病毒分子流行病学调查显示,诺如病毒 G II 基因型比 G I 基因型的传播更为广泛^[6, 14-15]。虽然 G I 和 G II 基因型均存在多样性,但 G II-4 基因型才是造成全球急性肠胃炎暴发的优势流行株^[15-17]。本研究显示,诺如病毒 G II 是杭州地区急性胃肠炎的主要病原之一,且以 G II-4 基因型为主,与已有研究基本一致^[2, 8, 10]。自 2006 年以来,在中国 G II-4/2006b 变异株是引起儿童和成人急性腹泻散发和流行的优势株^[5]。本研究中显示,杭州地区 G II-4/Sydney/2012 变异株作为散发病例的优势株,比 G II-4/2006b 变异株及其他基因型菌株更为重要,这种差异可能与人口流动、监测区域的地理分布以及宿主和人类行为如饮食等因素相关^[5, 16-18]。国内其他地区也陆续报道 G II-4/Sydney/2012 变异株是导致人群发生急性胃肠炎的散发和暴发的流行株^[3, 9-10, 18]。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Dennehy PH. Viral gastroenteritis in children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30(1): 63-64. DOI: 10.1097/INF.0b013e3182059102.
- [2] Chen Y, Li Z, Han D, et al. Viral agents associated with acute diarrhea among outpatient children in southeastern China [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32 (7): e285-290. DOI: 10.1097/INF.0b013e31828c3de4.
- [3] Tian G, Jin M, Li HY, et al. Clinical characteristics and genetic diversity of noroviruses in adults with acute gastroenteritis in Beijing, China in 2008-2009 [J]. *J Med Virol*, 2014, 86 (7): 1235-1242. DOI: 10.1002/jmv.23802.
- [4] Bresee JS, Marcus R, Venezia RA, et al. The etiology of severe acute gastroenteritis among adults visiting emergency departments in the United States [J]. *J Infect Dis*, 2012, 205 (9): 1374-1381. DOI: 10.1093/infdis/jis206.
- [5] 靳森,孙军玲,常昭瑞,等. 中国 2006-2007 年诺如病毒胃肠炎暴发及其病原学特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31 (5): 549-553. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.017. Jin M, Sun JL, Chang ZR, et al. Outbreaks of noroviral gastroenteritis and their molecular characteristics in China, 2006-2007 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31 (5): 549-553. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.017.
- [6] Kittigul L, Pombubpa K, Taweekate Y, et al. Molecular characterization of rotaviruses, noroviruses, sapovirus, and adenoviruses in patients with acute gastroenteritis in Thailand [J]. *J Med Virol*, 2009, 81 (2): 345-353. DOI: 10.1002/jmv.21380.
- [7] Nakanishi K, Tsugawa T, Honma S, et al. Detection of enteric viruses in rectal swabs from children with acute gastroenteritis attending the pediatric outpatient clinics in Sapporo, Japan [J]. *J Clin Virol*, 2009, 46 (7): 94-97. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.06.014.
- [8] 诸葛小玲,崔大伟,吴英萍,等. 杭州地区 2009-2010 年急性腹泻患者中杯状病毒的检测和分型 [J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32 (10): 1022-1025. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.016. Zhuge XL, Cui DW, Wu YP, et al. Detection and typing of caliciviruses from patients with acute diarrhea in Hangzhou area, 2009-2010 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32 (10): 1022-1025. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.016.
- [9] 沈震,王刚,宰淑蓓,等. 诺如病毒新型 G II. 4 流行株 Sydney_2012 在上海地区的检出和鉴定 [J]. *病毒学报*, 2013, 29 (6): 608-613. Shen Z, Wang G, Zai SB, et al. The emergence of novel G II. 4 norovirus variant, Sydney_2012, in Shanghai, China [J]. *Chin J Virol*, 2013, 29 (6): 608-613.
- [10] Zou WH, Cui DW, Wang X, et al. Clinical characteristics and molecular epidemiology of noroviruses in outpatient children with acute gastroenteritis in Huzhou of China [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127596. DOI: 10.1371/journal.pone.0127596.
- [11] Wu W, Yang H, Zhang HL, et al. Surveillance of pathogens causing gastroenteritis and characterization of norovirus and sapovirus strains in Shenzhen, China, during 2011 [J]. *Arch Virol*, 2014, 159 (8): 1995-2002. DOI: 10.1007/s00705-014-1986-6.
- [12] Yang Y, Xia M, Tan M, et al. Genetic and phenotypic characterization of G II-4 noroviruses that circulated during 1987 to 2008 [J]. *J Virol*, 2010, 84 (18): 9595-9607. DOI: 10.1128/JVI.02614-09.
- [13] Bull RA, Tu ET, McIver CJ, et al. Emergence of a new norovirus genotype II. 4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(2): 327-333. DOI: 10.1128/JCM.44.2.327-333.2006.
- [14] Rohayem J. Norovirus seasonality and the potential impact of climate change [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15(6): 524-527. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02846.x.
- [15] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14(8): 1224-1231. DOI: 10.3201/eid1408.071114.
- [16] Mladenova Z, Korsun N, Geonova T, et al. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses detected in outbreak and sporadic cases of acute gastroenteritis in Bulgaria [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(12): 2161-2168. DOI: 10.1002/jmv.21307.
- [17] Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, et al. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(8): 1381-1388. DOI: 10.3201/eid1708.101533.
- [18] Mai H, Jin M, Guo XL, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of norovirus G II.4 Sydney during winter 2012-13 in Beijing, China following its global emergence [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71483. DOI: 10.1371/journal.pone.0071483.

(收稿日期: 2015-08-17)

(本文编辑: 万玉立)