

2013—2014 年江苏省食源性疾病中诺如病毒的分子流行病学分析

唐震,郑东宇,马恺,周翌婧,王燕梅,甄世祺,周永林*

(江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:研究探讨江苏省食源性疾病患者中诺如病毒的分子流行病学特点。方法:收集 2013—2014 年的 16 658 例食源性疾病患者的粪便或肛拭子标本,并应用 RT-PCR 方法进行分组检测;选择部分阳性标本进行核苷酸序列测定和遗传进化树分析,确定基因型。同时收集患者相关的流行病学资料。结果:在 16 658 例食源性疾病病例中,检出诺如病毒 1 208 例(7.25%),其中 1~4 岁儿童阳性率最高(9.85%);不同性别检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.63, P=0.43$),检出时间主要集中在每年 10 月—次年 4 月。71 份阳性标本中采用 ORF2 区域测序成功分型 63 份。G I 组占 9.5%,包括 G I.3 型 3 份, G I.9 型 2 份, G I.4 型 1 份; G II 组占 90.5%,全部为 G II.4 型。结论:诺如病毒是引起食源性疾病的重要病原体之一,具有分布广、流行时间集中在冬春季、发病人群多为儿童等特点,其造成的危害应引起重视。引起食源性疾病的诺如病毒主要为 G II 组,现阶段的优势毒株为 G II.4 型。

[关键词] 诺如病毒;食源性疾病;分子流行病学

[中图分类号] R183.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)10-1213-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20161013

Molecular characteristics of norovirus(NV) in acute foodborne disease in Jiangsu Province from 2013 to 2014

Tang Zhen, Zhen Dongyu, Ma Kai, Zhou Yijing, Wan Yanmei, Zhen Shiqi, Zhou Yonglin*

(Center for Disease Control and Prevention of Jiangsu Province, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the prevalence, genotypes and molecular characteristics of norovirus (NV) in acute foodborne disease of Jiangsu Province. **Methods:** Feces or anal swab specimens of 16 658 patients with foodborne disease from 2013 to 2014 were collected and detected by RT-PCR. Positive samples were of randomly selected and analyzed by nucleotide sequence determination and phylogenetic tree analysis to determine the genotype. Meanwhile, we collected the relevant epidemiological data. **Results:** In the 16 658 samples, 1 208 positive specimens were identified with NV(7.25%). Positive rate was 7.11% in males and 7.45% in females, which had no statistical significance ($\chi^2=0.63, P=0.43$). The prevalence of the children aged 1 to 4 years was the highest (9.85%). Prevalence time was mainly concentrated in October-the following year in April. A total of 63 out of the 71 positive specimens were classified, with 6 (9.5%) belonged to G I, including 3 G I.3, 2 G I.9, and 1 G I.4. Other 57 (90.5%) all belonged to G II.4. type. **Conclusion:** Norovirus is one of the most important pathogens causing foodborne diseases with the characteristics of wide distribution, prevalence time in winter and spring, and high risk incidence in children, and the harm caused by it should be paid more attention to. The main genotypes which caused NV are the G II group, and the dominant strain of the present stage is G II.4 type.

[Key words] norovirus; foodborne disease; molecular epidemiology

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(10): 1213-1217, 1236]

诺如病毒又称诺瓦克病毒 (Norwalk viruses, NV), 属于杯状病毒科 (Caliciviridae) 诺如病毒属

[基金项目] “十二五”科技重大专项计划(2012ZX10004-210-004); 卫生部肠道病原微生物重点实验室; 江苏省重大新发传染病综合防控科技示范工程(BE2015714)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zyl@jscdc.cn

(norovirus), 1972 年通过免疫电镜的方法从美国俄亥俄州诺瓦克镇的一起急性非细菌性胃肠炎暴发中首次发现, 是引起儿童和成人急性病毒性胃肠炎的重要病原体^[1-2]。近年来, 对食源性疾病研究的进展发现, 诺如病毒是重要的食源性病毒之一, 常在医院、餐馆、学校、养老院、家庭等人群中引起急性

胃肠炎暴发。该病毒的主要传播途径为食用受污染的食品、水及生活接触^[3-4]。

诺如病毒直径 26~35 nm,无包膜,表面粗糙,球形,呈二十面体对称;基因组全长 7 400~7 700 个核苷酸,NV 根据其 RNA 聚合酶和衣壳蛋白编码区的基因特征,可分为 5 个基因组(G I~G V),其中 G I 和 G II 是感染人类的 2 个最常见基因组^[2]。近几年诺如病毒引起急性胃肠炎暴发增多,北京、广东、广西、浙江、江苏等地均有报道^[5-9]。但是对于由诺如病毒引起的散发食源性疾病的了解较少。2011 年起,江苏省全面推进食源性疾病哨点医院监测工作,对引起食源性腹泻的致病病原体进行了综合监测,本文对 2013—2014 年的监测数据进行分析,旨在调查引起散发食源性疾病的诺如病毒的流行病学特点和基因型分布情况,为今后的预防控制工作提供科学依据。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2013 年 1 月—2014 年 12 月江苏省 68 家食源性疾病哨点医院以腹泻症状为主诉并自觉与食品有关的就诊患者,2 年收集病例 16 658 例,由哨点医院采集患者的人口学信息、社会学信息、临床表现、食物暴露因素等流行病学资料,采集患者粪便或肛拭子标本 16 658 份,患者年龄 1 个月~87 岁。

1.2 方法

1.2.1 标本处理

制备 10% 的粪便悬液,将 0.2 g 或 200 μ L 粪便

标本加到 2 mL Eppendorf 管中,加入无菌生理盐水,充分混匀(震荡 3 次,每次 10 s)。然后静置 10 min,再以 8 000 r/min 离心 5 min,吸取上清进行下一步试验或-20 $^{\circ}$ C 短期保存。

1.2.2 病毒核酸提取

按照 FortiusBio 粪便提取卡片(福蒂斯生物公司,美国)说明书,取 10 μ L 粪便悬液滴加在卡片的 5 mm 滤纸圆片上;卡片在 37 $^{\circ}$ C 完全干燥;用移液器尖将小纸片推至 96 孔板小孔孔底;每孔加入 100 μ L 水;在平板摇床上中速摇晃 10 min,或用移液器吹打 20 次;洗脱液可直接用于病原菌的 PCR 检测,或保存在-20 $^{\circ}$ C 以备将来使用。

1.2.3 逆转录

cDNA 合成采用 SuperScript III 逆转录酶(Thermo 公司,美国)进行,终浓度为 10 μ mol/L,RNA 模板 7.5 μ L,反应总体积 15 μ L,反应程序为:50 $^{\circ}$ C 逆转录 1 h,99 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,迅速放入冰内。所得 cDNA 在-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)

基因组 G I 和 G II NV 基因扩增按《国家食源性疾病预防工作手册》方法,选择引物和探针(表 1)。采用 Premix Ex TaqTM 反应体系(大连 TaKaRa 公司),PCR 方法进行检测。反应体积 25 μ L,95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 循环。72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中 120 V 电泳,照相。或使用毛细管电泳进行 PCR 产物检测与分析。

表 1 检测诺如病毒所用的引物探针、扩增片段及引物序列

Table 1 Probes, amplified fragments and primer sequences for NV detection

分组	扩增片段	引物序列(5'→3')	目的片段(bp)
G I	G1-SKF	CTGCCCGAATTAAATGA	330
	G1-SKR	CCAACCCARCCATTRACA	
G II	CoG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	387
	G2-SKR	CCRCNCGCATRHCCRTTTACAR	

1.2.5 基因克隆及核苷酸序列测定

随机挑选 PCR 检测阳性样本 71 份,参照 Kageyama 等^[10]的方法,对其 ORF1 和 ORF2 连接区进行 PCR 扩增(表 2)。PCR 产物经凝胶电泳后切胶回收,用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 公司,德国)进行纯化后,插入 DNA 克隆载体 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega 公司,美国),再转化大肠埃希菌感受态细胞 DH5 α ,挑选阳性克隆进行核苷酸序列测定。

诺如病毒(NV)各基因型参考株核苷酸序列[美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的基因数据库 (GenBank)],所用参考株名称及 GenBank 收录号如下:G I 组:AB294752 (Chiba/2006);AF145709 (Stavanger/1995);EU0722228 (Beijing2007);JN603254 (Sweden/2008);U04469 (Desert Shield/2000)。G II 组:AB972478 (Fukui3/2012);AJ277618 (Wortley/UK/2005);AJ277607 (Hillingdon/UK/2001);EF126966 (Nijmegen115/2006);EF126964 (Terneuzen70/

2006a);EU078417(Minerva/2006b);EU839594(Beijing2007);GQ246801(Dijon/2009);GQ266695(Zuerich/2009);HM596586(Nsk—N370/2010);U22498(Mexico/1989);X81879(Melksham/1989)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行流行病学数据统计分

析,NV 阳性率比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。测序得到的 NV 核苷酸序列剔除两端的引物序列后,进行核苷酸序列编辑、BLASTN 比对及多序列同源性比对分析;使用分子遗传进化分析软件 MEGA 5.1,按照邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树,确信限度估计设为 500。

表 2 测序诺如病毒所用的引物探针、扩增片段及引物序列

Table 2 Probes, amplified fragments and primer sequences for NV sequencing

分组	扩增片段	引物序列(5'→3')	目的片段(bp)
G I	G1FF1	ATHGAACGYCAAATYTTCTGGAC	596
	G1FF2	ATHGAAAGACAAATCTACTGGAC	
	G1FF3	ATHGARAGRCARCTNTGGTGGAC	
	G1SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	
G II	G2FB1	GGHCCMBMDTTYTACAGCAA	468
	G2FB2	GGHCCMBMDTTYTACAAGAA	
	G2FB3	GGHCCMBMDTTYTACARNAA	
	G2SKR	CCRCNCGATRHCRTTRTACAT	

简并碱基:H=A、C、T;Y=C、T;R=A、G;N=A、C、G、T;M=A、C;B=G、T、C;D=A、G、T。

2 结果

2.1 NV 阳性率、年龄性别及季节分布

16 658 份粪便标本中,检出 NV 阳性 1 208 份,总阳性率为 7.24%;其中 G II 组 1 136 份(94.0%),G I 组 72 份(6.0%)。2013 年度标本 6 775 份,阳性率为 8.70%;2014 年检测标本 9 883 份,阳性率为 6.20%。男性 NV 阳性率为 7.11%(722/10 161),女性为 7.45%(486/6 524),差异无统计学意义 ($\chi^2=0.63,P=0.43$)。各年龄组间阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=87.15,P < 0.001$,表 3),其中 0~4 岁占 9.85%,其次是 15~24 岁为 9.36%,其他年龄段阳性率均低于 8.00%。NV 感染全年均有发生,每年 10 月—次年 4 月出现明显发病高峰(图 1)。

2.2 NV 阳性病例发病特点比较

1 208 例 NV 阳性病例中,有水样性腹泻占 79.14%,腹痛占 40.07%,呕吐占 30.46%,恶心占 25.08%。与 NV 阴性胃肠炎患者比较结果显示,NV 阳性和 NV 阴性病例除口渴、里急后重、症状差异无统计学意义外,其余临床表现差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05 ,表 4)。

2.3 核苷酸序列测定和对比

从 1 208 份阳性标本中随机抽取 71 份进行测序分析,进行 ORF1 和 ORF2 连接区域 PCR 扩增和核苷酸序列测定,经 BLAST 搜索比对,63 例 NV G II 基因组中确证 60 例属于 G II 组 NV,核苷酸序列相似度 94.9%~100%,有 3 例为非 NV;8 例 NV GI 组均为

表 3 16 685 例食源性疾病患者不同年龄、性别诺如病毒检出情况

Table 3 NV detection in 16 685 patients with different age and gender

指标	病例数	阳性数	阳性率(%)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				87.15	<0.001
0~	4 266	420	9.85		
5~	982	57	5.80		
15~	994	93	9.36		
25~	2 787	195	7.00		
35~	1 800	90	5.00		
45~	2 056	120	5.84		
55~64	1 682	125	7.43		
≥65	2 118	108	5.10		
性别				0.63	0.43
男	10 161	722	7.11		
女	6 524	486	7.45		
合计	16 685	1 208	7.24		

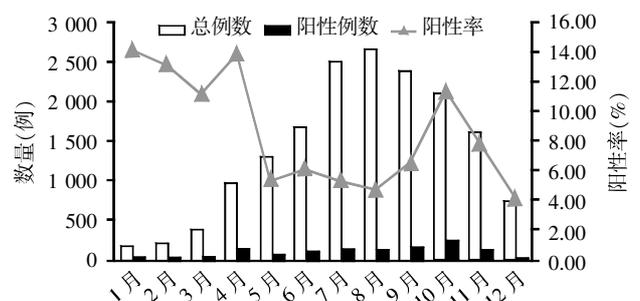


图 1 2013—2014 江苏省食源性疾病患者诺如病毒检出率及季节分布

Figure 1 Prevalence and seasonal distribution of NV in acute foodborne disease

表4 食源性疾病中诺如病毒阳性和阴性患者临床表现差异
Table 4 Different clinical symptoms of positive and negative NV patients

临床症状	NV 阳性 (n=1 208)	NV 阴性 (n=15 477)	χ^2 值	P 值
水样便	956(79.14)	10 826(48.63)	355.13	<0.01
腹痛	484(40.07)	6 888(30.94)	28.44	<0.01
呕吐	368(30.46)	2 891(12.99)	257.34	<0.01
恶心	303(25.08)	3 002(13.48)	106.68	<0.01
发热	169(13.99)	2 209(9.92)	14.87	<0.01
口渴	53(4.39)	743(3.34)	2.49	>0.05
里急后重	9(0.75)	165(0.74)	0.02	>0.05
寒战	6(0.50)	270(1.21)	5.73	<0.05

G I 组 NV,核苷酸序列相似度 95.3%~100.0%。

2.4 遗传进化树分型分析

68 例测序成功的阳性标本中成功分型 64 份。共检测G I 组诺如病毒 6 份(9.5%),其中 G I .3 型 3 份,与 G I .3 型参考株 U04469(Desert_Shield2000)位于同一分支;G I .9 型 2 份,与 G I .9 型参考株 JN603254 位于同一分支;G I .4 型 1 份,与参考株 AB294752 位于同一分支(图 2)。

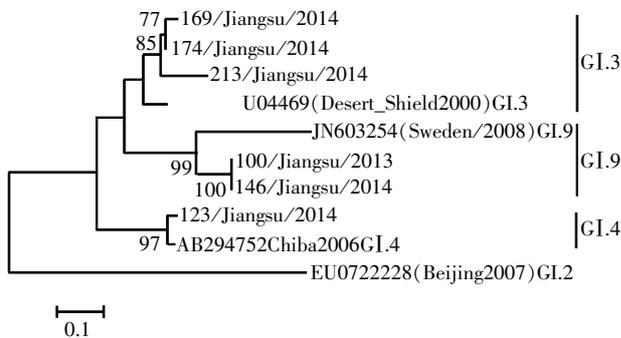


图2 诺如病毒 G I 组遗传进化树构建
Figure 2 Phylogenetic trees of NV GI

成功分型 G II 组标本 57 份 (90.5%), 其中 12 份与G II .4 参考株 EF126964(Terneuzen70/2006a 变异株) 位于同一分支,44 份与 G II .4 参考株 JN176913(Nijmegen115/2006b 变异株)位于同一分支,鉴定为 G II .4 型,1 份与 1989 年分离到的 Mexico 的 U22498 在同一分支,鉴定为 G II .4 型(图 3)。

3 讨论

本文针对江苏省食源性疾病中 NV 感染情况进行研究,首次以腹泻症状为主诉并自觉与食品有关的就诊患者为对象,对 NV 引起的食源性疾病的发病情况、流行特征、分子型别等较以往在感染性腹泻或暴发性事件中的研究更有针对性。本研究显

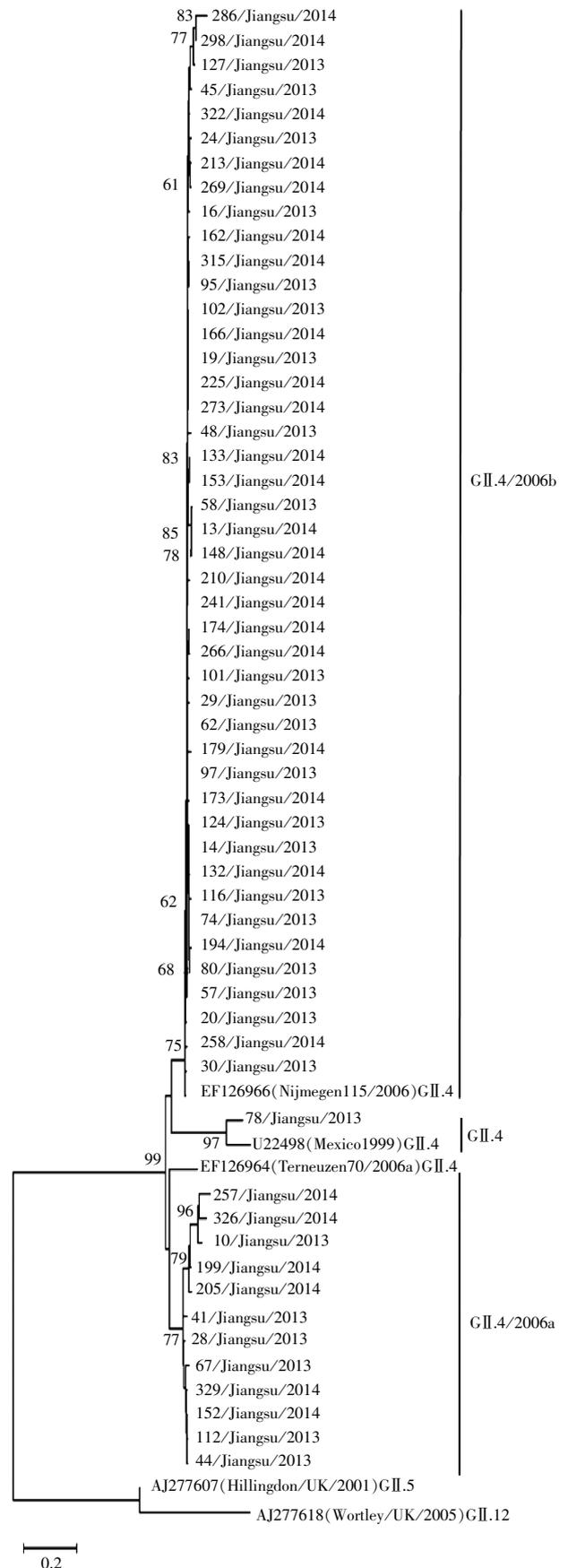


图3 诺如病毒G II 组遗传进化树构建
Figure 3 Phylogenetic trees of NV GII

示,江苏省食源性疾病病例中 NV 阳性率为 7.25%,表明 NV 是引起江苏地区散发食源性腹泻的重要病原体之一,其造成的危害应引起重视。本文结果与全国感染性腹泻监测中获得的数据相比,略低于全国(11.6%)、北京(14.2%)、广西(26.3%)等地区^[5-6,8];提示 NV 感染水平存在地域性差异;另因本文的监测对象主要为食源性疾病的病例,跟感染性腹泻的数据来源不完全相同,是否提示由 NV 引发的食源性疾病的发生率略低,需在今后的监测中进一步关注。

通过监测显示,0~4岁的婴幼儿这一高发群体 NV 的阳性构成比高达 34.77%,与付建光等^[9]的江苏省婴幼儿腹泻中 NV 的监测阳性数据(38.5%)一致,提示婴幼儿免疫力低下,是 NV 的易感人群;其次是 25~34 岁年龄组为 16.14%(195/1 208),考虑该年龄段的人群为外出就餐的主要人群,频繁在外就餐增加了食入被污染的食物和水的几率,患者主诉的可疑食物种类多为饮料、鲜榨饮料、生食海鲜等,提示被污染的食物和水是 NV 感染人的重要途径。本研究中,男、女性腹泻病例的 NV 检测阳性率差异无统计学意义,说明 NV 易感性无明显的性别差异。未观察到 ≥60 岁老年人中检测阳性率明显高于其他年龄组的现象,说明所有人群均为 NV 感染引起散发性腹泻的易感人群。

江苏省食源性疾病 NV 阳性患者的症状和体征以水样便、腹痛、呕吐、恶心为主,部分有发热、口渴、里急后重和寒战,其中水样便、腹痛、恶心呕吐和发热的比例明显高于 NV 阴性病例,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示在肠道门诊食源性腹泻病诊断中,可将水样便、腹痛、呕吐、恶心等作为 NV 感染性胃肠炎的指示症状。江苏省 NV 散发性腹泻全年均有发生,高发季节是冬春季,流行特征与国内外大部分研究结果一致^[1-4]。值得注意的是,国内外有些地区 NV 感染在夏天也会出现高峰^[11-13],这可能与夏季食物和水被 NV 污染机会增加有关。

NV 是导致急性胃肠炎的重要病原体之一,近 1/5 的急性胃肠炎病例发病与其相关。由于诺如病毒缺乏有效的细胞培养系统和动物模型,在早期研究中,电镜是确诊的唯一手段^[1-2]。近年来,随着科学技术的发展,各种分子生物学技术已被广泛用于 NV 的诊断和研究。Kojima 等^[11]的研究表明,ORF1 和 ORF2 连接区域更具保守性和多样性,适合用于 NV 的检测与分型。同世界其他地区一样,本研究发现在 NV 引起的胃肠炎散发患者中,GI 组只占很小

比例。获得测序分型成功的 NVGI 基因组为 6 株,6 株 GI 组 NV 分属于 GI.3、GI.4、GI.9 基因型,表明江苏地区流行的 GI 组 NV 存在较高的遗传多样性,有必要继续开展监测以加深对 GI 组 NV 遗传变异和流行规律的认识。

NV G II 组感染中,G II.4 型一直都是流行优势株,约占 G II 组 NV 比例为 55.00%~89.50%。该毒株通常每 1~2 年就会发生变异,成为广泛传播的新流行株^[11-16]。本研究结果显示,57 例有效分型的 G II 组毒株中,全部为 G II.4 型。结果表明江苏地区流行的 NV 毒优势株仍是 G II.4/2006 a 变异株和 G II.4/2006 b 变异株,毒株的进一步演变情况值得继续关注。

本研究证实了 NV 是引起江苏地区食源性疾病的主要病原之一,存在多种基因型感染。应考虑着手实施有针对性的干预措施,加强健康教育,以降低 NV 导致的疾病负担。为加强江苏散发性腹泻的预防控制提供科学依据。

[参考文献]

- [1] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1): 7-15
- [2] Division of Viral Diseases. National center for immunization and respiratory diseases, centers for disease control and prevention. updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2011, 60(RR/3): 1-18
- [3] White PA, Eden JS, Hansman GS. Molecular epidemiology of noroviruses and sapoviruses and their role in Australian outbreaks of acute gastroenteritis [J]. *Microbiol Aust*, 2012, 33(2): 70-73
- [5] 余建兴, 赖圣杰, 王鑫, 等. 中国 27 省(市、自治区) 2009-2013 年门诊腹泻病例诺如病毒流行特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(3): 199-204
- [6] 刘白薇, 高志勇, 王全意, 等. 北京市 2013-2014 年肠道门诊腹泻患者中诺如病毒感染的流行病学及临床特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(4): 383-385
- [7] 谭冬梅, 刘巍, 邓丽丽, 等. 南宁市散发性腹泻诺如病毒分子流行病学分析 [J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(11): 1372-1375
- [8] 龚黎明, 葛琼, 卢亦愚, 等. 浙江省一起由桶装水所致的诺如病毒胃肠炎暴发调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(8): 800-803
- [9] 付建光, 吴斌, 嵇红, 等. 江苏省苏州及南京地区 2010 年婴幼儿腹泻中诺如病毒分子流行病学研究 [J].

(下转第 1236 页)