

# 一起诺沃克病毒引起的急性胃肠炎爆发的分子流行病学研究

杨洪, 何雅青, 李庆, 张海龙, 赵锦, 阳帆

**摘要:** 目的 查明 2005 年深圳市一起急性胃肠炎的病原体,为制定控制疾病流行策略及指导临床合理用药提供依据。方法 收集该次腹泻患者及相关人员的粪便标本 15 份,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时荧光 PCR 方法检测诺沃克病毒核糖核酸(RNA)。结果 15 份标本中,RT-PCR 及实时荧光 PCR 方法均检测出 10 例诺沃克病毒阳性,阳性率为 66.7%;2 种方法的符合率为 100%。同时对其中的 10 份 RT-PCR 阳性标本进行脱氧核糖核酸(DNA)序列测定,并进行同源性分析和进化分析。结论 该次群体性胃肠炎是由诺沃克病毒 G2 型感染引起;10 份阳性标本中 9 株的核苷酸同源性为 100%,另外 1 株与其他 9 株的同源性为 99.8%;本次流行的毒株(05-53-61 及 05-63)与日本东京的 SaitamaU201 及 SaitamaU18 亲缘关系较近,核苷酸同源性分别为 96%及 95%,而与 1997 年深圳本地株 97-11 及 97-30 亲缘关系则较远,核苷酸同源性分别为 76.4%及 76.7%。

**关键词:** 诺沃克病毒;胃肠炎;逆转录-聚合酶链反应;荧光逆转录-聚合酶链反应;同源性分析

中图分类号: R516.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2007)03-0153-04

**Molecular epidemiology research on an outbreak of acute gastroenteritis by Norwalk-like virus**  
YANG Hong, HE Ya-qing, LI Qing, ZHANG Hai-long, et al. Shenzhen Municipal CDC of Guangdong Province, Shenzhen 518020, China

**Corresponding Author:** YANG Hong, Email: gangqiyang@tom.com

**Abstract:** **Objective** This study was conducted to investigate the pathogen of an outbreak of acute gastroenteritis in 2005, and to provide scientific data for the control of infectious diseases and instructions on clinical therapy. **Methods** 15 stool samples from diarrhea patients and related people were collected, and RT-PCR and real-time PCR were used to detect the virus RNA. **Results** 10 out of 15 samples had been confirmed for tested positive (66.7%), the coincidence rate between of the two methods was 100%. The DNA sequence was tested in positive samples were partially sequenced and analyzed for homology and evolutionary analysis. **Conclusion** The outbreak was caused by Norwalk-like virus G2 type, and 9 out of 10 cases was 100% homological, and the 1 left is 99.8% homological to the others. The epidemic strain (05-53-61 and 05-63) was 96% and 95% homological to Norwalk virus strain SaitamaU201 and SaitamaU18, respectively. It was 76.4% and 76.7% homological to the strain 97-11 and 97-30 in Shenzhen.

**Key words:** norwalk-like virus, gastroenteritis, RT-PCR, real-time RT-PCR, homological analysis

CLC: R516.1

Document code: A

Article ID: 1003-9961(2007)03-0153-04

诺沃克病毒(Norwalk-like virus, NLV)是一种直径 27 nm 的小圆状结构病毒(SRSV)。1968 年在美国 Norwalk 镇发生了一起胃肠炎爆发流行,该病毒是在这些患者的粪便中首次被发现,因此得名<sup>[1]</sup>。NLV 是在社区、学校、机关、军营和家庭中爆发流行的非细

菌性胃肠炎的主要病原,感染对象主要是成人和学龄儿童,全年均有发生。2005 年 9 月 12 日深圳市某幼儿园有幼儿及教师出现呕吐、腹泻症状,为明确此次爆发的病原体,采集该幼儿园患者粪便标本 11 份(其中 1 份为该园某一患者的姐姐)、无症状的厨工及厨师粪便标本 4 份,总共 15 份粪便标本进行诺沃克病毒核糖核酸(RNA)检测,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 标本的采集 于 2005 年 9 月 13 日,从深圳某幼儿园采集了呕吐、腹泻症状者粪便样本 9 份;9 月

项目资助:深圳市卫生局科技立项(WSTJJ20051018410103651019374)

作者单位:深圳市疾病预防控制中心,深圳 518020

作者简介:杨洪(1970-),女,广东省普宁人,副主任技师,主要从事肠道及腹泻病毒的研究工作

作者简介:杨洪,Email: gangqiyang@tom.com

收稿日期:2006-05-24

16 日采集 2 份幼儿及该园无症状的厨工及厨师粪便标本 4 份,共 15 份标本。

1.2 试剂 Roche High Pure viral RNA kit 试剂盒;无水乙醇;大连宝公司提供的 Takara one step PCR kit;1×TAE;1.5%的琼脂糖;Invitrogen 公司提供的逆转录酶、Taq 酶及 buffer。

1.3 样本中 RNA 的提取 取绿豆大小的粪便标本,放入 1.5 ml 的 Eppendorf 管中,加生理盐水 500 μl 振荡混匀,制成粪便悬液,8000 r/min 离心 5 min;以下用 Roche High Pure viral RNA kit 试剂盒提取 RNA:取 200 μl 标本上清加 400 μl 结合液,混合均匀,加入纯化过滤管中,10 000 r/min,15s;弃去过滤液,换一新的收集管,加入 500 μl inhibitor removal buffer,10 000 r/min 离心 1 min;弃去过滤液,换一新的收集管,加入 450 μl 洗液,10 000 r/min 离心 1 min;重洗一次;最后离心,13 000 r/min,10 s,弃去残余的洗液;去掉收集管,换一个干净的无 RNA 的 1.5 ml Eppendorf 离心管,用 50 μl 洗脱液加入过滤管中,10 000 r/min 离心 1 min,将提取的 RNA 移到一个新的离心管中。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 针对 NLV 核酸序列的保守区设计 PCR 引物,序列为上游引物 5'-gTgTgRTKg ATgTgggTgACTTC-3' 及下游引物 5'-TCgACgCCATCTTCATTACACA-3',用大连宝公司的 Takara one Step RNA PCR kit 配制反应液,在 9700 型 PCR 仪中进行 PCR 反应。反应条件为 50 °C,30 min;94 °C,3 min;90 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 45 s,40 个循环;72 °C,5 min;4 °C,保温。取 10 μl PCR 产物,用 1×TAE 配制的 1.5%的琼脂糖进行电泳后,在 Gene Genirus 凝胶成像系统中观察结果,若在 680 bp 处出现特异性条带则为诺沃克病毒核酸阳性,否则为阴性。

1.5 实时荧光 RT-PCR 以提取的病毒 RNA 为模板,应用随机引物在逆转录酶的作用下逆转录为 cDNA,反应条件为:42 °C 1 h,95 °C 3 min,4 °C 2 min。取 0.5 μl cDNA 使用×4000 荧光 PCR 仪进行 PCR 反应,引物和探针序列见表 1,反应条件为:95 °C 10 min;然后 95 °C 15 s,56 °C 1 min,50 个循环。

1.6 序列分析 对 10 份 NLV 核酸阳性标本进行基因序列测定 (TaKaRa 公司),并利用 Bio Edit 和 CustalW 软件对测序结果进行序列分析和同源性比较,参比序列取自 Gen Bank 库。

2 结果

2.1 概况 共采集不同症状标本 15 份 (编号 53-

表 1 实时荧光 RT-PCR 检测的引物和探针序列

Table 1 Sequence of probe and primer in the real-time RT-PCR

检测诺沃克病毒型别	引物和探针序列
G1 型	COG1F:5'-CTT AgA CgC CAT CAT CAT TYA C-3'
	COG1R:5'-CgY Tgg Atg CgN TTY CAT gA -3'
	G1 Probe:(HEX)AgA TYg CgA TCY CCT gTC CA(TAMRA)
G2 型	COG2F:5'-CAR gAR BCN ATg TTY AgR Tgg ATg Ag-3'
	COG2R:5'-TCg ACg CCA TCT TCA TTC ACA-3'
	G2 Probe:(FAM)Tgg gAg ggC gAT CgC AAT CT(TAMRA)

67),NLV G1 型未检出,检测出 NLV G2 型阳性 10 例,阳性率 66.67%,见表 2。

表 2 15 份标本的临床症状及检测结果

Table 2 Test results and clinical symptoms of 15 samples

症状	标本编号	NLV 阳性标本编号		NLV 阳性率(%)	
		G1 型	G2 型	G1 型	G2 型
水样便	55,62	无	55	0	50.00
水样便、呕吐	53,54,60,63	无	53,54,60,63	0	100.00
水样便、呕吐、发热	56,59	无	56,59	0	100.00
水样便、呕吐、咳嗽	57,61	无	57,61	0	100.00
呕吐、发热	58	无	58	0	100.00
无症状(厨工及厨师)	64,65,66,67	无	无	0	0.00
合计	15	无	10	0	66.67

2.2 RT-PCR 检测诺沃克病毒 RNA 9 月 13 日采集的 9 份标本(53-61),在 680 bp 处均出现特异性条带,全部为诺沃克病毒阳性,见图 1;9 月 16 日采集的 6 份标本(62~67)中,只有 63 号标本为诺沃克病毒阳性,其余 5 份标本为阴性,见图 2;NLV 阳性对照为阳性质粒,NLV 阴性对照为以前检测的阴性标本。

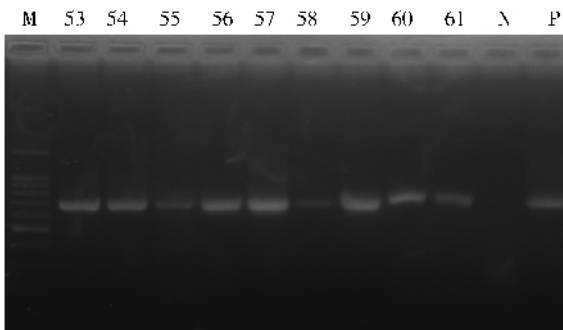


图 1 NLV 的 RT-PCR 电泳图(9 月 13 日标本)  
Figure 1 RT-PCR sdspace of NLV (sample of 13th Sep)

M:DNA Marker;53-61:NLV 阳性标本  
M:DNA Marker;53-61:NLV positive  
N:NLV 阴性对照;P:NLV 阳性对照  
N:NLV negative control;P:NLV positive control

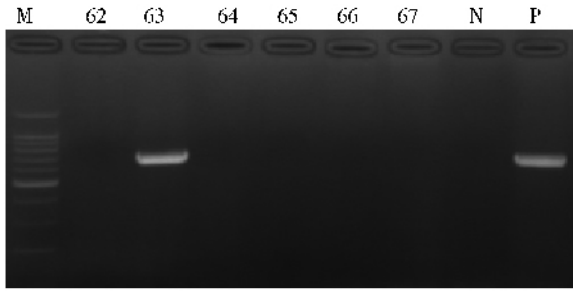


图 2 NLV 的 RT-PCR 电泳图(9 月 16 日标本)

figure 2 RT-PCR dspsage of NLV (sample of 16th Sep)

M:DNA Marker; 63:NLV 阳性标本  
 M:DNA Marker; 63:NLV positive  
 62,64-67:NLV 阴性标本  
 62,64-67:NLV negative control  
 N:NLV 阴性对照;P:NLV 阳性对照  
 N:NLV negative control;P:NLV positive control

2.3 荧光 RT-PCR 分型结果 对 9 月 13 日采集的 9 份标本的 RNA 分别用诺沃克病毒 G1 和 G2 型引物和探针进行荧光 RT-PCR 反应, 结果 G1 型全部为阴性, G2 型均为阳性; 9 月 16 日采集的 6 份标本(62~67)中, 结果 G1 型全部为阴性, G2 型只有 63 号标本为阳性, 其余 5 份标本为阴性。

2.4 基因片段的序列测定 对 RT-PCR 检测诺沃克病毒核酸阳性的 10 份标本进行核酸序列测定, 结果 10 株病毒核苷酸序列比较显示, 05-54、05-55、05-56、05-57、05-58、05-59、05-60、05-61 及 05-63 完全相同; 05-53 与其他 9 株只相差 1 个核苷酸, 同源性达到 99.80%。

用 ClustalW 软件对核苷酸序列进行进化分析, 得到如下树图, 从树图中可以看出本次流行的毒株与日本东京的 SaitamaU201 及 SaitamaU18 亲缘关系较近, 核苷酸同源性分别达到 96% 和 95%, 而与 1997 年深圳本地株 97-11 及 97-30 亲缘关系较远<sup>[1]</sup>, 核苷酸同源性为 76.40% 和 76.70%, 见图 3。

### 3 讨论

诺沃克病毒感染对象为儿童和成年人, 临床表现包括恶心、呕吐、腹痛、腹泻(水样便), 可伴有头痛、低热、乏力及食欲减退, 病程一般 2~3 d<sup>[2]</sup>。与轮状病毒等引起的其他病毒性腹泻相比, NLV 引起的腹泻多伴有呕吐症状。本次检测的 10 例阳性患者中, 除 1 例只有水样便外, 其余 9 例均有呕吐症状, 也即 90% 阳性病例有恶心呕吐症状, 这与多数报道相吻合。诺沃克病毒的传播方式是通过粪-口途径传播, 主要是通过污染的水源、食物和人-人密切接触

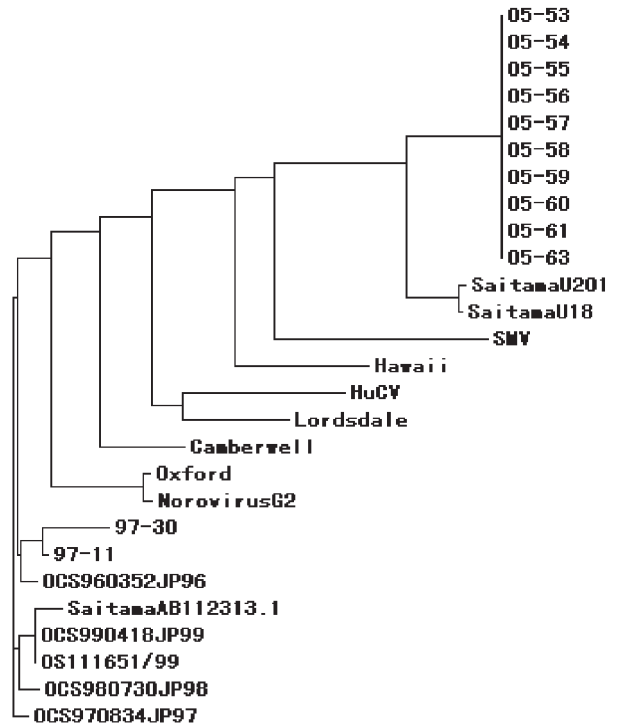


图 3 基因进化分析树

Figure 3 Evolution tree of gene analysis

传播。对本次爆发进行流行病学调查, 该园共有 4 个年级 9 个班共 270 名幼儿, 教职工 57 人, 但病例全部集中于小小班, 即 9 月 13 日采集的 9 例阳性标本中, 其中 3 例为该班跟班老师, 6 例为该班 2~3 岁幼儿, 另 4 名厨师及厨工均为阴性, 说明本次流行是由人-人接触传播引起, 而不是通过食用污染的食物或者水源引起的。要培养孩子养成良好的卫生习惯, 饭前便后要洗手, 建议洗手盆用感应水龙头, 同时加强对学校师生防病意识的宣传教育, 防止病从口入。

诺沃克病毒成员庞杂, 目前已对其 100 多个分离株进行基因测序。根据 RNA 聚合酶区或衣壳蛋白区核苷酸序列的同源性比较, 分为 G1 和 G2 型两个遗传组, 很多检测工作都是基于这种分型来进行。由于诺沃克病毒不能人工培养, 限制了对其检测方法的发展<sup>[3]</sup>。RT-PCR 及荧光 PCR 方法能够准确、灵敏地检测标本中的诺沃克病毒, 并且可以进一步对病毒进行血清型和基因型的研究, 对流行病学的研究具有重要意义。本研究表明深圳该次群体性胃肠炎是由诺沃克病毒 G2 型感染引起, 这与刘满清<sup>[4]</sup>、陈林军等对武汉和福州地区报道的结果一致, 提示在中国可能以诺沃克病毒 G2 型为主要流行株<sup>[5]</sup>。本次研究通过对 10 株诺沃克病毒阳性株的核苷酸序列测定, 05-53 与其他 9 株毒株相比发生一个核苷酸

(下转第 161 页)

的变异,毒株的同源性达到 99.80%,从流行病学的角度分析,在一次时间较短的小爆发中毒株发生变异的可能性应该比较小,05-53 病例为发病班级(小小班)的一名 24 岁跟班女老师,病毒发生变异的原因尚待作进一步的研究;基因进化分析表明本次流行的毒株(05-53-61 及 05-63)与日本东京的 Saitama U201 及 Saitama U18 亲缘关系较近,而与 1997 年深圳本地株 97-11 及 97-30 亲缘关系较远,提示本次爆发的流行株可能是外地的输入毒株,因该所幼儿园是香港人在深圳投资的托幼机构,大部份幼儿往返于深圳-香港之间,而香港又是中国同世界各地经济联络中心枢纽,且本次的首发病例为一港商的儿子,可能该病例在香港已经感染了诺沃克病毒;还有一种可能性是本次的流行株是深圳本地毒株已经发生了变异,导致与 1997 年深圳本地株只有

76%的核苷酸同源性,这可能具有流行病学意义。

#### 参 考 文 献

- [1] 赵锦,何雅青,谢萍,等. 用 PCR 及荧光 PCR 方法检测诺瓦克样类病毒[J]. 中国公共卫生,2004,20(增刊):81-82.
- [2] 陈炳卿,刘志诚,王茂起. 现代食品卫生学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:806-807.
- [3] Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, et al. Genogroup-specific PCR Primers for detection of Norwalk-like viruses [J]. J Virolog Methods, 2002, 100:107-114.
- [4] 刘满清,谭慧,王斌,等. 90 例非轮状病毒腹泻患儿粪便中诺瓦克样病毒的检测[J]. 疾病监测,2005,20(7):362-363.
- [5] 陈军林,王滔,高建民,等. 福州地区腹泻患者诺瓦克样病毒感染的分子流行病学特点[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(2):83-84.