

·信息研究·

广州市群体性食物中毒事件中诺如病毒分子流行病学分析

吴新伟¹, 杨霞², 蒋力云¹, 沈纪川¹, 谢华萍¹, 李向忠¹, 伍业健¹, 刘于飞¹, 高国全²

(1. 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510080;

2. 中山大学中山医学院生物化学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】初步了解广州市社区食物中毒事件中诺如病毒的分子流行病学情况。【方法】在 2003 年 10 月至 12 月期间,从 5 个不同流行现场,采集急性期胃肠炎患者的粪便标本 76 份,用 RT-PCR 对标本中的诺如病毒核酸进行扩增,将阳性产物回收、纯化并测序,与 GenBank 中的相关序列进行比较分析,绘制系统发生树。【结果】76 份样品中共检出阳性 36 份,阳性率为 47.37%。从 5 个流行现场获得 5 个代表株,分别为 DX1106、PY1106、HM1121、PY1202 和 HD1219,其中 DX1106 与 PY1202 的序列完全一致,而其他毒株间的序列同源性在 35%~85%之间。系统发生树分析发现 5 个代表株都属于 GII 组诺如病毒,但分属于不同的基因型。其中 DX1106 与 PY1202 株属于 GII-3 型, HM1121 和 HD1219 株属于 GII-4 型, PY1106 株介于 GII-6、7、8 型之间,尚不能确定型别。【结论】广州市存在诺如病毒引起的食物中毒,流行优势株为 GII 组,但其基因型别存在多样性。

关键词:诺如病毒;食物中毒;分子流行病学;系统发生树

中图分类号:Q784

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)04-0486-04

Molecular Epidemiologic Analysis of Norovirus from Food Poisoning Affairs in Guangzhou

WU Xin-wei¹, YANG Xia², JIANG Li-yun¹, SHEN Ji-chuang¹, XIE Hua-pin¹,

LI Xiang-zhong¹, WU Ye-jian¹, LIU Yu-fei¹, GAO Guo-quan²

(1. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Biochemistry, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the molecular epidemiological characters of the Norovirus from food poisoning affairs in Guangzhou City. 【Methods】Fecal specimens from 76 patients with acute gastroenteritis from 5 outbreak sites from October to December 2003 were collected. Norovirus was detected from the specimens by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the PCR products were purified and sequenced. The sequences were analyzed by comparing to GenBank and the phylogenetic tree was created. 【Results】Thirty-six in 76 specimens were detected positive. Five representative sequences (DX1106, PY1106, HM1121, PY1202, and HD1219) were obtained from 5 outbreak sites, respectively. The homological rate between these representative sequences were 35%~85% except that of DX1106 and PY1202 was 100%. They belonged to same genogroup (GII) but different genotypes, DX1106 and PY1202 belonged to GII-3, HM1121 and HD1219 belonged to GII-4, but PY1106 remained uncertain. 【Conclusion】Norovirus was detected in the food poisoning affairs in Guangzhou City. Genogroup II was the prevalence but the genotypes were widely distributed.

Key words: norovirus; food poisoning; molecular epidemiology; phylogenetic tree

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(4): 486-489]

收稿日期:2008-03-07

基金项目:国家自然科学基金(30570372);国家自然科学基金(30600724);教育部新世纪人才计划(NCET-04-0792);广东省自然科学基金团队项目(06201946);广东省科技计划项目重大专项(2005A10902003);广东省科技计划项目重大专项(2006B35502001);广州市科技攻关重点基金(2007Z3-E5041);广州市科技计划项目(2006J1-C0141);广州市医学科学技术研究重点项目(2006-ZDi-10)

作者简介:吴新伟(1972-),男,四川成都人,副主任技师;高国全,通讯作者,教授, E-mail: gaogq@mail.sysu.edu.cn

诺如病毒(Norovirus)是引起儿童和成人非细菌性胃肠炎的主要病原,常在医院、餐馆、学校、托儿所、军队等人群密集的地方引起急性暴发。我国北京、太原市的诺如病毒血清学调查发现,4~6岁后人群 IgG 阳性率均接近或超过 90%^[1,2],表明诺如病毒在我国的感染普遍存在。之前的研究对象多集中于到医院就诊的腹泻患者,而社区中由诺如病毒引起食物中毒的情况则报导较少^[3,4]。2003 年 10 月至 12 月期间,在广州市内位于不同行政区的几家幼儿园和学校,先后暴发多起诺如病毒造成的群体性食物中毒事件。我们使用 RT-PCR 方法对病人的粪便进行了检测,并测序分析了诺如病毒的 RNA 复制酶部分区段,以初步了解广州地区社区中诺如病毒的分子流行病学情况。

1 材料和方法

1.1 标本收集

在 2003 年 10 月至 12 月期间,从 5 个不同流行现场,采集急性期胃肠炎患者的粪便标本 76 份。

1.2 样品前处理

取 1~2 g 粪便标本,用 10 mL 生理盐水浸泡、混悬样品,4℃,800×g 离心 10 min,取上清液。

1.3 RNA 的提取

取经前处理的样品上清液 140 μL,使用 QIAamp Viral RNA 试剂盒提取病毒 RNA。

1.4 RT-PCR 反应

针对 II 型诺如病毒基因组中 RNA 复制酶的保守区段设计一对引物,P1:5'-TGTCACGATCTC ATCATCA-3',P2:5'-TGGAATTCCATCGCCCACTGG-3',产物大小约为 120 bp。取上述 RNA 提取物,用 Invitrogen™ SuperScript™ One-Step RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应,反应条件如下:50℃ 30 min 逆转录,94℃ 2 min 变性,94℃ 30 s,50℃ 1 min,60℃ 1 min,30 个循环,最后 72℃ 保温 7 min。

1.5 琼脂糖电泳

用 TBE 缓冲液配制含 0.5 μg/mL 溴化乙锭的 15 g/L 琼脂糖凝胶,取 5 μL PCR 产物,与 1 μL 上样缓冲液混和,在 TBE 缓冲液中以 80 V 恒压电泳 1 h,在透射式紫外分析仪上观察,并照相记录实验结果。以出现 120 bp 特异性条带为阳性结果。

1.6 测序及分析

将上述特异性条带挖胶回收,用 Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System 试剂盒纯化,送上海申友生物技术有限公司测序。测序结果用 DNASTar 软件包进行基因序列分析,BLASTN 进行基因库比较,CLUSTAL X 进行序列排队,用 MEGA3.1 绘制系统发生树。病毒参考株基因序列均来自 GenBank:U07611 (Hawaii/1971/US),AY134748 (Snow Mountain/1976/US),U22498 (Mexico/1989/MX),X86557 (Lordsdale/1993/UK),AF397156 (MOH/99/HUN),AB039776 (Saitama U3/JP),AJ277608 (Leeds/2000/UK),AB039780 (Saitama U25/JP)。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

诺如病毒 RT-PCR 的结果见图 1,阳性标本在 120bp 处出现明亮清晰的特异性条带。76 份样品中共检出阳性 36 份,阳性率为 47.37%。

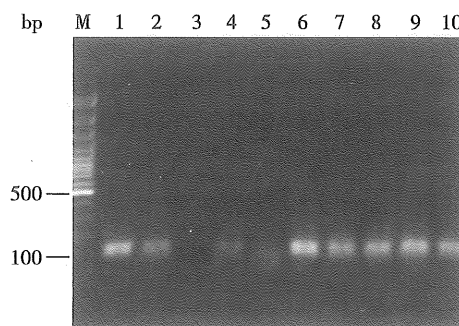


图 1 诺如病毒 RT-PCR 结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of Norovirus

M:100 bp DNA Ladder; 1,2,6~10: positive results; 3~5: negative results

2.2 RT-PCR 产物测序结果

对琼脂糖电泳阳性标本挖胶回收,测序结果见图 2。36 份阳性标本中,采自同一流行现场的序列均相同,因此从 5 个流行现场获得 5 个代表株,分别为 DX1106、PY1106、HM1121、PY1202 和 HD1219,其中英文字母表示采样地点,数字表示采样时间。5 株病毒测序结果之间的同源性比较见表 1,DX1106 与 PY1202 的序列完全一致,而其他毒株间的序列同源性在 35%~85% 不等。

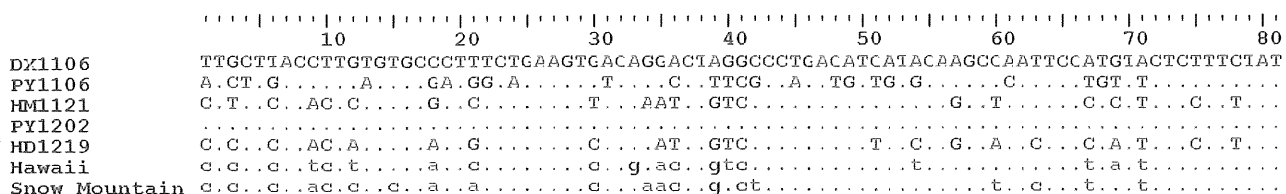


图 2 诺如病毒 RT-PCR 产物测序结果

Fig.2 The sequences of RT-PCR product of Norovirus

表 1 测序结果同源性比较

Table 1 Comparison of the sequences of Norovirus (%)

	PY1106	HM1121	PY1202	HD1219
DX1106	47.22	64.2	100	59.72
PY1106		35.71	47.22	40.09
HM1121			64.2	84.67
PY1202				59.72

2.3 系统发生树分析

将 4 株代表株病毒的基因序列与 GenBank 中的参考株进行比较并绘制系统发生树(图 3)。结果发现这 4 株都属于 GII 型诺如病毒,但分属于不同的群。其中 DX1106 株属于 GII-3 群, HM1121 和 HD1219 株属于 GII-4 群, PY1106 株介于 GII-6、7、8 群之间,尚不能确定所属群。

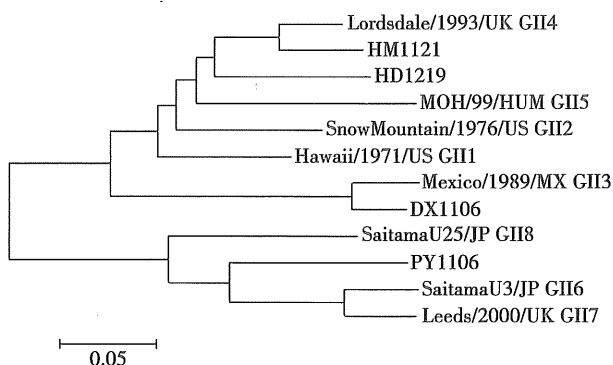


图 3 诺如病毒系统发生树分析

Fig.3 The phylogenetic tree analysis of Norovirus

3 讨论

诺如病毒主要的传播途径为粪口传播^[2,5]。有资料表明发生诺如病毒感染最常见的地方是饭店,其次是托儿所和医院^[6,7],且发病没有季节性。在上世纪 90 年代,方肇寅等^[4]就在腹泻患儿中发现了诺如病毒,证实我国也存在诺如病毒的感染。之前的研究对象多集中于到医院就诊的腹泻患者,而社

区中由诺如病毒引起食物中毒的情况则报导较少。2003 年 10 月至 12 月期间,在广州市内位于不同区的几家幼儿园和学校,暴发多起群体性食物中毒事件,病人急性期主要症状是恶心、呕吐、腹痛、腹泻,特别是恶心呕吐表现最为突出。后经流行病学调查和实验室检测证实为诺如病毒造成的^[8]。在如此短的时期内,在同一地区爆发多起诺如病毒引起的食物中毒事件,这在国内是少见的,因此我们对这几次事件的病原体进行了分子流行病学研究,以期能了解社区中诺如病毒的情况。

诺如病毒可分为 5 个基因组 (genogroup),其中 GI、GII 和 GIV 都能感染人。在这些基因组中, GII 组引起的腹泻占诺如病毒引起腹泻的 73%^[9],在另一项对儿科病人的长期调查中也发现, GII 组流行范围最广,也最常见^[10]。根据 RT-PCR 产物的测序结果,2003 年 10 月至 12 月期间在广州市引起食物中毒事件的,也属于 GII 组的诺如病毒。根据病毒 RNA 复制酶和衣壳蛋白的基因序列,每一个基因组又可进一步划分为许多的基因型 (genotype),仅 GII 组就有 17 种基因型,目前 GII-4 基因型为全球流行的优势株。将代表株病毒的基因序列与 GenBank 中的参考株序列进行比较,并绘制系统发生树,发现我们获得的代表株虽然都属于 GII 组,但却分属于不同的基因型,与之前广东省的报道一致^[11]。其中 HM1121 和 HD1219 株属于 GII-4 基因型, DX1106 与 PY1202 株属于 GII-3 基因型, PY1106 株介于 GII-6、7、8 型之间,尚不能确定所属型别。

采自不同流行地点的样品序列分析比较表明,同一暴发点、同一时间、不同发病者获得的序列完全一致,说明他们可能是由同一病毒株引起的感染,跟进的流行病学调查也证实他们有进食同一食品的历史。而不同暴发点、不同时间获得的毒株间差异则较大,序列同源性在 35% ~ 85% 不等,表明不同暴发点或同一暴发点、不同时间的流

行株具有不同来源。其中值得注意的一点是,DX1106与PY1202采自2个不同的地点,发病时间间隔一个月,所测得的序列竟完全一致,提示可能为同一传染源,结合进一步流行病学调查推测,有可能是2个地区的患者在不同时间食用了来自同一厂家的保鲜食品。

总之,我们的研究发现,在广州市的食物中毒事件中,诺如病毒是一个非常值得注意的病原体。目前诺如病毒在广州市的流行优势株属于GII组,但基因型有较大差异。在广州市社区中同时存在多种基因型的诺如病毒,并且可以在短时期内造成多处暴发疫情,这为我们的防治工作带来了一定的困难。从分子流行病学角度来分析诺如病毒的变化,将有助于我们更好地发现其传播规律,从而更有针对性地对病毒进行监控。

参考文献:

- [1] 靖宇,钱渊,吴立平,等.太原市部分人群诺瓦克样病毒血清抗体水平的调查[J].中华儿科杂志,1999,37(9):559-561.
- [2] 靖宇,钱渊,王洛平.北京地区人群诺瓦克样病毒血清抗体水平调查[J].病毒学报,1998,14(4):322-328.
- [3] 谢华萍,方肇寅,王光,等.长春市儿童医院1998-2001年婴幼儿杯状病毒腹泻流行病学研究[J].病毒学报,2002,18(4):332-336.
- [4] 方肇寅,温乐英,晋圣瑾,等.在我国腹泻患儿中发现诺如病毒[J].病毒学报,1995,11(3):215-218.
- [5] 戴迎春,聂军,詹惠春,等.某高校不同地域学员诺如病毒抗体阳性水平的调查研究[J].热带医学杂志,2007,7(9):914-915,922.
- [6] 方肇寅.诺如病毒胃肠炎及其防控对策[J].中华流行病学杂志,2007,28(03):222-223.
- [7] 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]. J Infect Dis, 2002,186(1):1-7.
- [8] 蒋力云,吴新伟,刘于飞,等.用RT-PCR和ELISA对暴发性急性胃肠炎事件中诺如病毒检测的比较[J].中国人兽共患病杂志,2005,21(3):247-249.
- [9] Vinjé J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses [J]. J Clin Microbiol, 2003,41(4):1423-1433.
- [10] Levett PN, Gu M, Luan B, et al. Longitudinal study of molecular epidemiology of small round-structured viruses in a pediatric population [J]. J Clin Microbiol, 1996,34(6):1497-1501.
- [11] 李晖,方苓,邹丽容,等.广东省暴发性胃肠炎中诺如病毒的分子流行病学特点分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2007,27(1):5-8.

(编辑 徐杰)

(上接485页 from page 485)

- year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer [J]. N Engl J Med, 2002,347(16):1227-1232.
- [7] Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer [J]. N Engl J Med, 2002,347(16):1233-1241.
 - [8] 闫春梅,刘杰,王慧琳,等.不同术式对早期乳腺癌病人生活质量的影响[J].护理研究,2004,10(18):1797-1799.
 - [9] Vicini F, Winter K, Straube W, et al. A phase I/II trial to evaluate three-dimensional conformal radiation therapy confined to the region of the lumpectomy cavity for Stage I/II breast carcinoma: initial report of feasibility and reproducibility of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) Study 03197 [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005,63(5):1531-1537.
 - [10] Veronesi U, Orecchia R, Luini A, et al. A preliminary report of intraoperative radiotherapy (IORT) in limited-stage breast cancers that are conservatively treated [J]. Eur J Cancer, 2001,37(17):2178-2183.
 - [11] Baglan KL, Sharpe MB, Jaffray D, et al. Accelerated partial breast irradiation using 3D conformal radiation therapy (3D-CRT) [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003,55(2):302-311.
 - [12] Solin LJ, Chu JCH, Sontag MR, et al. Three-dimensional photon treatment planning of the intact breast [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1991,21(1):193-203.
 - [13] Cuttino LW, Todor D, Pacyna L, et al. Three-dimensional conformal external beam radiotherapy (3D-CRT) for accelerated partial breast irradiation (APBI): what is the correct prescription dose [J]. Am J Clin Oncol, 2006,29(5):474-478.

(编辑 徐杰)