

诺如病毒感染的研究进展

徐丹¹综述, 陆学东²审校

(1. 深圳市南山人民医院, 广东 深圳 518052; 2. 广东医学院附属深圳市福田区人民医院检验医学部, 广东 深圳 518033)

摘要: 小儿腹泻病是世界范围内影响儿童健康的常见病、多发病, 其发病率高, 是引起婴幼儿死亡的主要原因之一。病毒是造成非细菌性腹泻的主要病原体, 包括轮状病毒、诺如病毒、星状病毒和肠腺病毒等。近年来, 诺如病毒感染呈上升趋势, 我国目前对该病毒性疾病一直缺乏系统的研究和监测。因此, 诺如病毒感染已成为危害人类健康的公共卫生问题, 引起了各国研究者的关注。本文从病毒学特征、流行病学等几方面对诺如病毒感染的研究进展进行了综述。

关键词: 诺如病毒; 流行病学; 致病性

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1672-3619(2011)01-0109-04

诺如病毒(norovirus, NoV)是1968年在美国俄亥俄州诺瓦克地区的一所学校中暴发的一起流行性腹泻的患者粪便中发现的, 因此而得名, 是首个被确认为引起人类急性胃肠炎的病毒^[1]。但因为缺乏现成的、敏感的、常规的诊断方法, 人们对其作为病原体的重要性的认识十分有限。近来随着对诺如病毒分子生物学研究的发展, 再结合新型诊断技术的应用, 从根本上改变了人们对其影响的评价。现在人们认为诺如病毒是造成胃肠炎流行的首要原因, 也是儿童和成人散发性胃肠炎的重要原因。尽管诺如病毒性胃肠炎通常症状轻微, 病程短, 但新的证据表明, 该疾病可能会很严重, 有时甚至会致命, 特别是在易感人群——幼儿和老人中, 是因为胃肠炎而住院的一个常见原因^[2]。本文就其生物学性状、流行病学特点及致病性等方面的研究现状作简要综述。

1 生物学性状

1.1 病毒学特征 诺如病毒是一个单股正链无包膜RNA病毒。在电镜下是有结构的小圆病毒, 直径26~35 nm, 呈二十面体对称, 外壳是由180个同一种外壳蛋白组成的90个二聚体构成。诺如病毒对各种理化因子有较强的抵抗力, pH 2.7环境中暴露3 h, 或者4℃、20%乙醚处理18 h, 或者60℃孵育30 min, 仍具有感染性。饮用水中的氯浓度仍不能灭活诺如病毒, 但可被10 mg/L氯的水溶液灭活。诺如病毒只有在含氯消毒剂作用30 min后才被杀死。

1.2 基因组结构 人们对诺如病毒的基因组排序

后, 发现它的基因组是一个含7 654个核苷酸的单股正链RNA^[3], 由3个开放阅读框架(open reading frames, ORFs)组成(图1), 附着于一个无包膜的蛋白层内, 具有明显的杯状切迹。诺如病毒的原型被指定为GI.1型(即基因组I基因型1), 一种被称作为VPg的病毒蛋白以共价键的方式结合于RNA的5'末端, 其3'末端有一个多聚A尾。进入的基因组RNA是作为信使RNA起作用的, 且其是为3个开放阅读框(ORFs)进行编码的。ORF1为长约5 kb的非结构蛋白, 编码一个约200 kD的多蛋白, 被病毒编码蛋白酶切割后产生病毒复制必需的RNA多聚酶蛋白, ORF1编码包括保守的具有RNA多聚酶在内的非结构蛋白; ORF2和ORF3编码结构蛋白: ORF2长约1.8 kb, 编码57 kD的主要结构蛋白VP1; ORF3长约0.6 kb, 编码一个22 kD的小结构蛋白, 可能与基因组包装成病毒体有关。所有已知的诺如病毒从ORF1的C端到ORF2的N端是高度保守的。目前, 大部分GII的诊断是用RT-PCR扩增ORF1的RNA多聚酶的末端, 同样也可用于分子流行病学的研究, ORF1比ORF2相对保守。根据诺如病毒RNA多聚酶区和衣壳区的核苷酸序列, 将NoV分为5个基因组: GI、GII、GIII、GIV、GV。最新研究表明, 根据ORF2全基因序列, GI可分为14个基因型, NoV GII可分为19个基因型。感染人的NoV包括GI、GII和GIV, 而基因组III和V分别感染牛和鼠^[4]。我国主要的感染株是GII1、GII3和GII4型, GII2型在我国尚未发现。其中GII4又分为GII-4A、GII-4B、GII-4C、GII-4D、GII-4E。VP1区基因编码的氨基酸同源性应大于80%, 或者GI、GII RNA多聚酶区基因编码的氨基酸同源性分别大于85%和90%则属于同一个基因型。

对多次疾病暴发流行的分析已经确认了GII基

作者简介: 徐丹(1972-), 女, 副主任技师, 主要从事病原生物学研究

通讯作者: 陆学东, 男, 研究员, 硕士生导师, 从事病原微生物分子生物学研究工作, E-mail: luxuedong2004@yahoo.com.cn

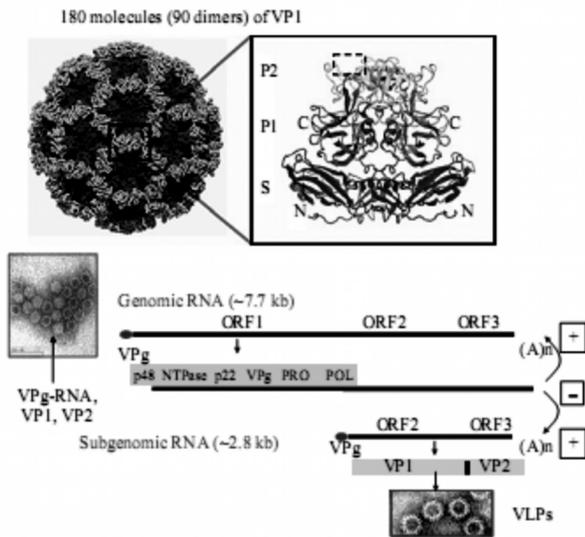


图 1 诺如病毒外壳和基因组结构

Fig.1 Structure of norovirus capsid and genome

因组的诺如病毒是世界范围内最常见的病毒株。在过去的 20 多年中,只有一些病毒株,主要是那些基因组 II 基因型 4(II.4)的病毒株,导致了多数病例的暴发和流行,因为随着高度变异区域突变的积累,不同的 GII.4 诺如病毒的组织血型抗原结合模式已经出现变化。这一观察支持了包括碳水化合物—蛋白相互反应在内的受人群免疫力驱动的诺如病毒基因的进化趋势这一想法^[5,6]。该结果是类似于流感的新进化的一种模式,随着诺如病毒变种的出现,代替了以前主要的病毒株,并导致新的世界范围内的流行^[6,7]。

2 流行病学特点

对于大多数临床医生而言,诺如病毒仍然缺乏常规的诊断方法,但流行病学研究已经确认了快速区域传播和在全球蔓延的新的诺如病毒毒株的出现,与流感的模式相类似,有人把诺如病毒引起的胃肠炎称为“胃肠流感”,为控制诺如病毒爆发流行提出了一个重大的挑战。在世界各地,大约 90%非细菌性肠胃炎的暴发流行都可归咎于诺如病毒^[8]。这些暴发流行波及到各个年龄段、各种环境的人群,比如私人疗养院、医院病房、日托中心、游船、餐馆等,主要发生于一些高危人群,尤其是幼儿和老人、旅游者、士兵和某些免疫受损或接受过器官移植的患者。1995 年我国报道了首例诺如病毒感染后,国内许多地区多次暴发诺如病毒感染性急性胃肠炎疫情。目前,我国东南沿海地区为高发区,在北京、天津、河北、兰州和山西等北方地区也有该病毒感染病例的发生。实际上,在我国大部分地区都存在该病毒的感染和发病,由于过去未列入常规检测项目或报告项目,对该病毒感染和发病的状况了解不够。

诺如病毒如今也被认为在散发性胃肠炎疾患中起着主要的作用。近期的一项回顾性研究显示,5%~31%因为胃肠炎而住院的病人可被检出诺如病毒,5%~36%的门诊胃肠炎病人可被检出诺如病毒,使得它成为成人腹泻的最常见的原因,同时可能是年龄小于 5 岁的儿童因腹泻而住院的第二大常见病因,仅次于轮状病毒^[9]。

人类是诺如病毒的唯一宿主。粪口传播是基本的传播途径,可发生于所有的年龄段,大多数诺如病毒感染的患者、隐性感染者及病毒携带者均可作为传染源,传染源的排泄物污染水源、食物、物品、空气而造成流行。人与人之间的直接传播也很重要,主要由呕吐物等传播,常在社区、学校、餐馆、医院、托儿所、孤老院及军队等地引起集体暴发。暴发期间空气和污染物也是不容忽视的传播媒介,患者和感染者是重要的传染源^[10]。

诺如病毒的数项特征促进了它的播散,首先,低感染剂量(大约 18~1 000 个病毒颗粒)使得病毒可通过飞沫、污染物、个人接触和环境污染传播,表现为在有过亲密接触的人群和家人中,发病率高达 30%或更高;其次,病毒排出常发生于疾病出现之前,在暴露的人群中高达 30%,在疾病发生之后可持续很长一段时间,从而增加了二次播散的潜在危险,这一点在食品工作者和家人中尤其值得注意^[11];第三,该病毒能忍受较大范围的温度变化(0~60℃),可持续存在于环境表面、娱乐设施和饮用水中,还有各种食物中,包括用污水灌溉水果和蔬菜,生吃的牡蛎之中;第四,因为诺如病毒株的高度变异性,我们又缺乏完全的交叉保护和长期的免疫力,人的一生当中可发生重复感染;最后,诺如病毒基因很易发生突变,从而引起抗原转换和重组,后者反过来导致新病毒株的进化进而感染易感的宿主们。

3 临床表现

在疾病暴发的调查中,诺如病毒感染在一些暴露的人群中引起腹泻,而在另一些人中则引起呕吐,突发性呕吐在儿童更为常见,腹泻则在成人更常见,24 h 内腹泻 4~8 次,腹泻的粪便通常不含血、粘液或白细胞,约三分之一的人无症状性感染。经过 24~48 h,最短 12 h,最长 72 h 的潜伏期后,感染的人们通常发病突然,开始出现呕吐,继而是腹部绞痛、发热(45%的病例体温为 37℃)、水样稀便以及其它诸如头痛、寒战和肌肉疼痛等其它躯体症状。病程自限,症状通常只持续 2~3 d,恢复后无后遗症,但易反复感染。但发生在医院和年纪小于 11 岁的儿童患者中的暴发流行也可持续更长的时间(4~6 d)^[12]。

在既往体格健康的人群中病毒排出可持续 8 周的时间,在有免疫损害和接受过器官移植的患者身上可持续超过 1 年,当胃肠道症状可能是药物排斥反应或副作用的一个早期征象时,诊断的确立就显得很重要^[13]。严重的症状是罕见的,尽管人们通常需要在急诊接受治疗,但他们很少住进医院。而在美国,死于诺如病毒感染的人数估计每年约 300 名,多发生于幼儿、老人和免疫力低下的人。如果脱水症状被忽视或不处理,可能成为威胁生命的重要原因^[14]。在英国年龄超过 64 岁的老人中,每年估计有 80 例死于诺如病毒感染^[15]。近来的报道提示诺如病毒感染在新生儿中可伴有坏死性小肠结肠炎,婴儿可伴随有良性癫痫,儿科患者可出现炎性肠道疾病的加重与恶化,明确这些关联需要进一步的研究^[16-18]。另外,在日本暴发的一次 644 例感染者疫情中有 15 人出现眼睛不适,应予注意。

4 发病机制

尽管诺如病毒引起的疾病和高致病株的出现可能产生较大的影响,因为缺乏细胞培养系统和动物模型,人类对诺如病毒引起腹泻的机制仍不完全清楚。由重组主要衣壳蛋白形成的病毒样颗粒与 ABH 组织-血型抗原的连接和 ABH 组织-血型抗血清的阻断实验证实,ABH 组织-血型抗原可能为诺如病毒与胃肠道黏膜上皮细胞结合的受体。最近, Harrington 等^[19]用磁珠-病毒捕获法证实,野型诺如病毒也可与 ABH 组织-血型抗原结合,进一步证明 ABH 组织-血型抗原为诺如病毒与胃肠道黏膜上皮细胞结合的受体。不同基因群的诺如病毒,其结合的 ABH 组织-血型抗原不完全相同,即诺如病毒与 ABH 组织-血型抗原的结合有相对特异性。

诺如病毒感染主要病变部位在十二指肠和空肠上段,诺如病毒与胃、十二指肠上皮细胞结合,将其遗传物质转移至上皮细胞内,在其中复制产生新的病毒,然后再感染十二指肠和空肠上段并造成上皮细胞空泡变性和微绒毛变短。诺如病毒转移其遗传物质的机制尚不清楚,但其直接的细胞病变效应已显示在细胞培养模型中。对参加暴露试验的志愿者的活组织病理检查结果指出,病毒侵犯空肠近端,使肠绒毛增宽变钝,隐窝细胞增大,胞浆空泡形成,中性粒细胞和单核细胞浸润至肠壁固有层中,但粘膜仍保持完整。胃底、胃体或结肠粘膜未见到组织学改变,未观察到肠上皮细胞坏死和肠粘膜下炎症细胞浸润。肠上皮细胞损伤造成一系列生物大分子的数量和活性发生改变,引起糖类和脂类吸收障碍,导致肠腔渗透压升高,体液进入肠腔,屏障功能受损,通透性增加,因而出现呕吐和腹泻。小肠受累的程度仍

属未知,因为我们无法研究小肠更远端的病变且无法确认病毒复制的部位。

5 实验室检测

电镜检测病毒颗粒是诊断诺如病毒感染的金标准,但灵敏度低,要求样品中病毒 $\geq 10^6/\text{ml}$,只能用于早期大量排毒时采集的样本,且技术条件要求高;免疫电镜的灵敏度比直接电镜高 1 000 倍。从临床样本中检测诺如病毒最初仅使用电镜和免疫电镜,需要复杂的设备和技术,限制了诺如病毒的流行病学研究。

酶联免疫法检测病毒核衣壳抗原操作简单且价格低廉,是目前广泛应用的检测方法,单克隆抗体检测的灵敏度较高,样品中病毒核衣壳抗原 $\geq 25 \text{ pg/ml}$ 即可检出,但特异性有限;多克隆抗体检测的灵敏度很高,但也存在特异性有限的问题。放免法检测病毒核衣壳抗原灵敏度比酶免法高 10~100 倍,但操作复杂且价格昂贵,目前还没有商品化供应。诺如病毒的细胞和组织培养技术尚不完全成熟。诺如病毒基因组和抗原的广泛差异限制了酶免疫方法在其检测中的应用。现有的酶免疫试剂敏感性和特异性不高,敏感性在 31.00%~39.00%之间,特异性在 47.00%~96.00%之间^[20]。

近年来随着分子生物学技术的应用,特别是逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)方法,具有高敏感性和特异性,已经成为检测在粪便标本、水和食物中的诺如病毒的最主要手段。RT-PCR 方法既可以用于大规模流行病学研究中诺如病毒的筛查,也可以进行诺如病毒血清型分型。扩增模板的质量、引物和酶等试剂的选择是 RT-PCR 反应的重要影响因素,其关键的要素是引物的选择。为了适应病毒株的高度变异性,要求扩增诺如病毒的引物要持续更新,目前,有学者将已有的代表性引物所在的扩增部位划分为 A、B、C、D 4 个区^[21]。A 区位于开放读码框 1 (ORF1),A 区的基因编码 RNA 依赖的 RNA 多聚酶(RdRp);B 区位于 ORF1 的 3'端;C 区和 D 区分别位于开放读码框 2(ORF2)的 5'端和 3'端。其中,针对 A 区和 C 区设计的引物最多,应用也最广。随着诊断技术的进展,RT-PCR 现在已被实时 RT-PCR 所替代,后者更为敏感快速,并且在与 Taqman 探针同用时,可一次性进行定性定量分析。

6 治疗

诺如病毒感染一般病程自限,不需使用抗菌药物,绝大多数预后良好,目前无特效的抗病毒药物,因此,对症或支持治疗为主要治疗措施。如果患者清醒可以饮水,口服补充液体和电解质;如果呕吐和脱水严重,则静脉输液。抗动力药和抗胃液分泌药在成

人中可能会有用，能降低病情严重患者的腹泻情况。尽管迄今为止没有抗病毒药开发出来，人们已经了解了病毒聚合酶和蛋白酶的 X 线晶体结构，它们是组织血型抗原颗粒的结合位点，这些为药物的研发提供了可能的目标。干扰素和利巴韦林可有效抑制诺如病毒在细胞中的复制^[22]，它们潜在的治疗价值需要进一步的评估。在接受免疫抑制治疗的患者中，若对诺如病毒感染，有人建议经胃肠外或口服的方式给予高免疫性质的人类免疫球蛋白，但该治疗从未在临床实验中加以研究。

7 结 语

综上所述，国内外对于诺如病毒已经有很多全面、深入的研究报道，其研究成果对于诺如病毒疾病的诊断、治疗和防制具有重要的指导意义。诺如病毒引起的病毒性胃肠炎已经成为一个全球公共卫生问题，目前尚无疫苗供使用，因此预防措施应遵循以切断传播途径为主的原则，包括注意饮水卫生、清洁环境表面、避免食品污染等，尽量防止疾病的传播和流行。

参考文献

[1] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infections nonbacterial gastroenteritis [J]. J Virol, 1972, 10: 1075-1081.

[2] Dolin R. Noroviruses—challenges to control [J]. N Engl J Med, 2007, 357(11): 1072-1073.

[3] Hardy ME. Norovirus protein structure and function [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 253(1): 1-8.

[4] Ramirez S, Giammanco GM, De Grazia S, et al. Genotyping of GI.4 and GIIb norovirus RT-PCR amplicons by RFLP analysis [J]. J Virol Methods, 2008, 147(2): 250-256.

[5] Le Pendu J, Ruvoen-Clouet N, Kindberg E, et al. Mendelian resistance to human norovirus infections [J]. Semin Immunol, 2006, 18(6): 375-386.

[6] Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, et al. Epochal evolution of GI.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006 [J]. J Virol, 2007, 81(18): 9932-9941.

[7] Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, et al. Mechanisms of GI.4 norovirus persistence in human populations [J]. PloS Med, 2008, 5(2): e31.

[8] Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, et al. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection [J]. Nat Med, 2003, 9

(5): 548-553.

[9] 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.

[10] Wu HM, Fornek M, Schwab KJ, et al. A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2005, 26(10): 802-810.

[11] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(10): 1553-1557.

[12] Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, et al. Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings [J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(3): 318-324.

[13] Kaufman SS, Chatterjee NK, Fuschino ME, et al. Characteristics of human calicivirus enteritis in intestinal transplant recipients [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2005, 40(3): 328-333.

[14] Goodgame R. Norovirus gastroenteritis [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2006, 8(5): 401-408.

[15] Harris JP, Edmunds WJ, Pebody R, et al. Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(10): 1546-1552.

[16] Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit [J]. J Pediatr, 2008, 153(3): 339-344.

[17] Chen SY, Tsai CN, Lai MW, et al. Norovirus infection as a cause of diarrhea-associated benign infantile seizures [J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(7): 849-855.

[18] Khan RR, Lawson AD, Minnich LL, et al. Gastrointestinal norovirus infection associated with exacerbation of inflammatory bowel disease [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009, 48(3): 328-333.

[19] Harrington PR, Lindesmith L, Yount B, et al. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice [J]. J Virol, 2002, 76(23): 12335-12343.

[20] Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, et al. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6): 2587-2595.

[21] Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses [J]. J Virol Methods, 2004, 116(2): 109-117.

[22] Chang KO, George DW. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells [J]. J Virol, 2007, 81(22): 12111-12118.

收稿日期: 2010-07-15

(上接第 71 页)

参考文献

[1] 黄洁夫. 腹部外科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

[2] 张雄文, 王楚平, 欧远德, 等. 胃大部切除术后并发内疝误诊临床分析 [J]. 赣南医学院学报, 2007, 27(1): 99-100.

[3] 苏仕功, 任伍保, 高成钢. 胃大部切除术后内疝的原因及预防 [J]. 中国厂矿医学, 2007, 20(6): 602-603.

[4] 刘细平, 钟德歼, 林辉. 胃次全切除、胃空肠吻合术后腹内疝发

生因素及其预防的探讨 [J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(9): 679-681.

[5] 梁国刚, 季成春, 齐清会. 胃大部切除术后腹内疝误诊为急性坏死性胰腺炎 [J]. 临床误诊误治, 2005, 18(12): 889-890.

[6] 龚水根, 周成刚. 胃毕氏 Ⅱ 式术后吻合口后间隙内疝的 X 线诊断——着重误诊分析 [J]. 中国罕见病杂志, 1995, 2(3): 1-3.

收稿日期: 2010-09-02