

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.025

诺如病毒疫情暴发的分子流行病学特征

钟逵迤,姚云英,李 燕,姚 炜,罗淑华,刘滕颖子,汪东篱
(广东省深圳市光明新区疾病预防控制中心检验中心 518000)

摘 要:**目的** 了解深圳市光明新区诺如病毒疫情暴发的病原体基因分型情况和分子流行病学特征。**方法** 收集 2016 年 12 月至 2017 年 3 月感染性腹泻暴发疫情患者的肛拭子标本,通过荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测诺如病毒核酸,阳性标本采用巢式 PCR 扩增诺如病毒 VP1 基因区(ORF1-ORF2),PCR 扩增产物经琼脂糖电泳鉴定后进行测序分析。**结果** 9 起暴发疫情共检测标本 101 份,诺如病毒阳性标本共 54 份,总阳性率为 53.47%,其中 GⅡ型标本 52 份,GⅠ型标本 1 份,GⅠ和 GⅡ型混合感染标本 1 份。测序成功获得 48 份阳性标本 GⅡ型诺如病毒 VP1 基因序列,47 份为 GⅡ.P16/GⅡ.2 亚型,其中 45 份与 2016 年中国香港株(KY771081)和中国广东株(KY485113)同源性最高,2 份与 2017 年中国江苏株(KY806301)和 2016 年泰国清迈株(MF972308)同源性最高;1 份为 GⅡ.P7/GⅡ.6 亚型,与 2014 年中国台湾株(KM267741)同源性最高。**结论** 2017 年该区诺如病毒疫情暴发的主要型别为 GⅡ型,优势流行株为 GⅡ.P16/GⅡ.2 亚型。

关键词: 诺如病毒; 疫情; 流行特征; 分子分型

中图法分类号:R378;R181.3

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)24-3735-03

Molecular epidemiological characteristics of norovirus epidemic outbreaks

ZHONG Weiyi, YAO Yunying, LI Yan, YAO Wei, LUO Shuhua, LIU Tengyingzi, WANG Dongli

(Test Center of Guangming District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518000, China)

Abstract:**Objective** To comprehend the genotype of the pathogens and molecular epidemiological characteristics associated with the epidemic outbreaks of norovirus in Guangming new district. **Methods** Specimens of anal swabs from patients with infectious diarrhea outbreaks from December 2016 to March 2017 were collected. Norovirus was detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). The VP1 gene region of Norovirus was amplified by nested PCR. The amplified products were identified by agarose electrophoresis and sequenced. **Results** 54 positive samples of norovirus was detected in 101 anal swab specimens of 9 outbreaks, the total positive rate was 53.47%, there were 52 positive samples of norovirus GⅡ, 1 positive sample of norovirus GⅠ, 1 positive sample of GⅠ/GⅡ co-infection. The VP1 sequencing results of norovirus in 9 outbreaks showed that 48 strains were GⅡ. Among them, 47 strains were genotype GⅡ.P16/GⅡ.2, and they were close to the China Hongkong strain (KY771081) and China Guangdong strain (KY485113) in 2016. 2 strains were close to China Jiangsu strain (KY806301) in 2017 and Thailand Chingmai (MF972308) in 2016. 1 strain was genotype GⅡ.P7/GⅡ.6, and it was close to the China Taiwan strain in 2014 (KM267741). **Conclusion** The main genogroups of norovirus in Guangming new district were GⅡ, and GⅡ.P16/GⅡ.2 was the most major genotype of norovirus.

Key words: norovirus; outbreaks; epidemiological characteristic; molecular typing

诺如病毒为杯状病毒属的单链 RNA 病毒,是引起全球急性肠胃炎最重要的病原体之一^[1]。诺如病毒共分为 GⅠ~GⅦ 7 个基因组和 30 个基因型^[2]。自 2014 年 11 月起就有报道显示,在中国广东、江苏和浙江,以及日本等亚洲地区均有新型诺如病毒 GⅡ.17 引起的疫情暴发,对世界公共卫生造成极大的影响^[3-7]。从 2016 年底至今,深圳地区不同区域连续暴发诺如病毒疫情引起了相关卫生部门的重视。本研究对 2016 年 12 月至 2017 年 3 月光明新区幼儿园和小学因腹泻的患者进行诺如病毒 GⅠ/GⅡ/A 组轮状病毒检测,检测阳性标本进一步测序分型,以了解

造成疫情的主要病原体和腹泻病毒的分子特征,以期对深圳地区诺如病毒暴发的流行状况和疫情防控提供科学依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 2016 年 12 月至 2017 年 3 月 9 起感染性腹泻疫情患者的肛拭子标本 101 份。101 份标本均来自光明新区幼儿园和小学,主要临床表现为呕吐、腹痛、低热、恶心想等。

1.2 仪器与试剂 天隆科技全自动核酸提取仪(型号 NP 968-S),达安基因诺如病毒 GⅠ/GⅡ/A 组轮状病毒三通道核酸检测试剂盒,采用聚合酶链反应

(PCR)-荧光探针法。

1.3 方法

1.3.1 标本前处理 将肛拭子加入含有 3 mL 标本稀释液的采样管中,混匀振荡,静置 5 min 后进行病毒核酸检测。

1.3.2 病毒 RNA 提取 吸取标本处理液 200 μ L,采用天隆科技全自动核酸提取仪 NP 968-S 提取病毒 RNA,具体操作见说明书。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 采用达安基因的诺如病毒 G I /G II /A 组轮状病毒三通道核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)对疫情标本进行核酸快速检测。

1.3.4 PCR 扩增 阳性标本核酸采用 2 对扩增引物进行诺如病毒 VP1 基因 PCR 扩增,扩增片段大小为 1 000 bp,2 对 PCR 引物分别为 G II PF800M;5'-GAT-GCWGAYTAYTCYMGNTGGGA-3' (4289-4311);G II CR1450;5'-ACCCARGMNTCAAAYCTRAART-3' (6622-6643);G II PF750M;5'-CNGCHHTAGAR-RTNATGGT-3' (4341-4359);G II -R1M;5'-CCRCC-NGCATRNCCRTTTRTACAT-3' (5367-5389)。首次 PCR 采用引物 G II PF800M/G II CR1450 进行扩增,反应体系为 25 μ L,PCR 扩增条件为:45 $^{\circ}$ C 30 min 反转录,94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,94 $^{\circ}$ C 1 min,47 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 3 min,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 7 min 延伸。首次 PCR 扩增产物采用引物 G II PF750M/G II -R1M 进行二次巢式 PCR 扩增,反应体系为 25 μ L,PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,94 $^{\circ}$ C 1 min,47 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,29 个循环后 72 $^{\circ}$ C 7 min 延伸。2%琼脂糖凝胶电泳鉴定目的条带,大小为 1 000 bp。

1.3.5 测序分析 委托北京六合华大基因科技有限公司对 PCR 产物进行测序,测得序列结果在 BLAST 上进行对比寻找同源序列,并在 GenBank 上寻找参考株毒株。

1.4 统计学处理 采用 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor-joining 方法(N-J 法)构建系统进化树,选择 Bootstrap 程序进行 1 000 次重复取样数目来分析进化树。

2 结 果

2.1 流行病学调查及实验室检测结果 101 份肛拭子标本经诺如病毒 G I /G II /A 组轮状病毒三通道核酸检测共获得阳性标本 54 份,总阳性率为 53.47%,其中 G II 型标本 52 份,G I 型标本 1 份,G I 和 G II 型混合感染标本 1 份。疫情暴发场所均为幼儿园和小学,高发人群为 3~8 岁幼年儿童,其次为青少年。暴发季节在冬春两季。

2.2 VP1 基因核苷酸系统进化分析 经荧光定量 PCR 检测出的 54 份阳性标本采用 2 对引物 G II PF800M/G II CR1450 和 G II PF750M/G II -R1M 进行诺如病毒 VP1 基因 PCR 扩增,PCR 产物经序列测定共获得 48 条基因序列,其余标本因保存原因或信号弱,测序未成功。成功测序的 48 份 NoV 毒株 VP1 基因核酸序列经比对分析见图 1。在 47 份 G II. P16/G

II. 2 亚型的 NoV 毒株中,有 45 份与 2016 年中国香港株(KY771081)和中国广东株(KY485113)的核苷酸序列位于系统进化树上同一分支,同源性较高;2 份 G II. P16/G II. 2 亚型的 NoV 毒株 (LB2017030310 和 LB2017030312) 与 2017 年中国江苏 NoV 重组株 (KY806301) 和 2016 年泰国清迈 NoV 重组株 (MF972308)核苷酸序列表现出高度同源性(99%),而与 2016 年中国香港株 (KY771081) 和中国广东株 (KY485113)序列亲缘性较远,并非同一进化分支上。1 份 G II. P7/G II. 6 亚型的 NoV 毒株 (LB201612120) 与 2014 年中国台湾株 (KM267741)的核苷酸序列位于系统进化树上同一分支,同源性高达 90% 以上。与其他 45 份 G II. P16/G II. 2 亚型 NoV 毒株不在同一进化分支上的 LB2017030310 和 LB2017030312 NoV 毒株却与 G II. P7/G II. 6 亚型的 NoV 毒株 (LB2016121260) 在同一进化支上。

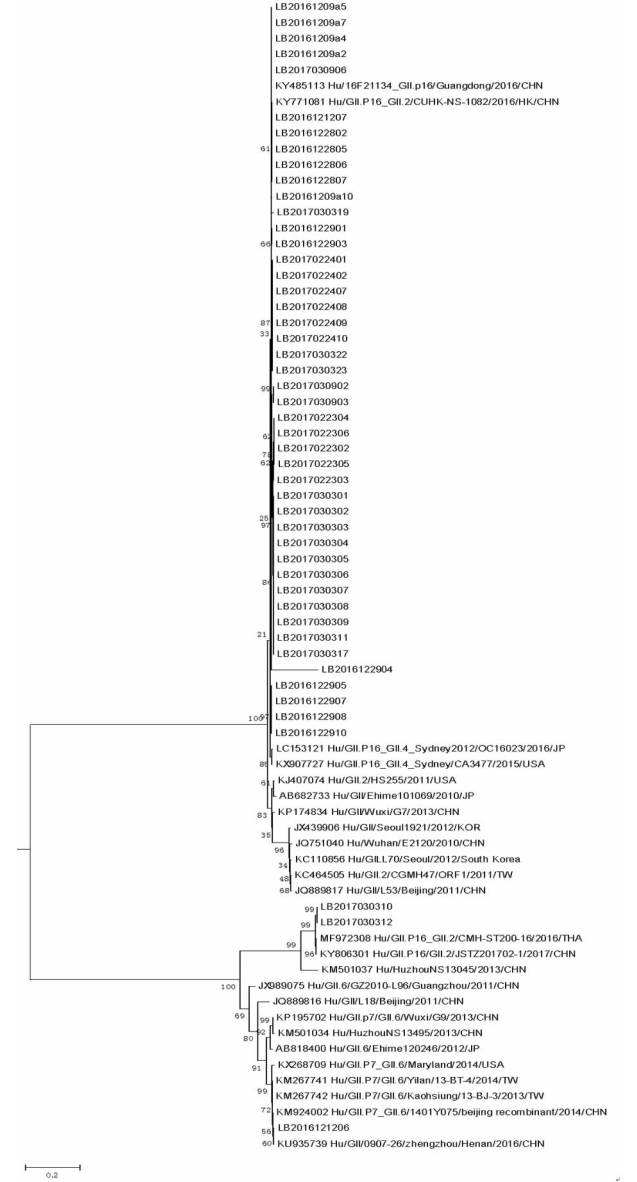


图 1 诺如病毒分离株 VP1 基因片段基因进化树

3 讨 论

诺如病毒是引起婴幼儿腹泻的主要病因,同时也

是引起成人腹泻的第 2 病因,每年导致 100 万人住院及 20 万儿童(<5 岁)死亡。伴随着轮状病毒疫苗的研制成功和逐步推广,诺如病毒有可能成为引起急性非细菌性胃肠炎和食源性疾病的首要病因。近年来,诺如病毒在世界范围内频繁暴发,中国的感染率也不断上升。本研究结果显示,深圳市光明新区 2016 年 12 月至 2017 年 3 月暴发的 9 起诺如病毒疫情流行高峰在冬春季,与往年报道深圳地区诺如病毒感染的暴发季节一致^[8]。101 份诺如病毒感染性腹泻病例以光明新区幼儿园和小学 3~8 岁幼年儿童为主,提示哨点监测应掌控在病毒主要的流行季节,并在相关场所做好相应防护措施。

诺如病毒具有丰富的遗传多样性,其基因组全长 7.5~7.8 kb,包括 3 个开发阅读框(OORFs):ORF1、ORF2 和 ORF3。ORF2 区编码衣壳蛋白 VP1,包括 S 区和 P 区,P 区进一步分为 P1、P2 区,其中 P2 区域含有结合受体的关键位点和病毒抗原性表位^[9]。本研究选择诺如病毒 ORF1-ORF2 区为靶基因,采用 2 对引物进行 PCR 扩增并进行分型测序。综合 9 起暴发疫情测定病例标本 VP1 全基因序列遗传进化分析表明,48 份阳性标本中 47 份为 GⅡ. P16/GⅡ. 2 亚型,其中 45 份与 2016 年中国香港株(KY771081)和中国广东株(KY485113)核苷酸同源性最高,2 份与 2017 年中国江苏 NoV 重组毒株(KY806301)和 2016 年泰国清迈 NoV 重组毒株(MF972308)核苷酸同源性最高;1 份为 GⅡ. P7/GⅡ. 6 亚型,与 2014 年中国台湾株(KM267741)核苷酸同源性最高。2 份 GⅡ. P16/GⅡ. 2 亚型的 NoV 毒株(LB2017030310 和 LB2017030312)与 1 份 GⅡ. P7/GⅡ. 6 亚型的 NoV 毒株(LB201612120)在同一进化分支上,提示这 2 株 NoV 毒株可能为重组株。基因重组是病毒进化的重要手段,本研究发现, NoV 毒株(LB2017030310 和 LB2017030312)可能是近年来新出现的 GⅡ. P16/GⅡ. 2 亚型重组毒株,需要引起注意。同时,探索 VP1 区域变异与重组的相关性对于 GⅡ. 2 亚型流行株重组机制的研究有重要意义。

近 20 年研究表明,诺如病毒 GⅡ 型是引起感染的主要基因组,GⅡ. 4 亚型则是最流行的基因亚型^[10]。本研究结果显示,深圳市光明新区诺如病毒疫情暴发的主要型别为 GⅡ 型,优势流行株为 GⅡ. P16/GⅡ. 2 亚型,并且出现 2 株可能为 GⅡ. 2 亚型重组株。2016 年深圳市诺如病毒主要流行株为 GⅡ. 2 亚型,表明近 2 年流行株基因型由 GⅡ. 4 亚型转变为 GⅡ. 2 亚型;同时显示在光明新区 GⅡ. 2 亚型毒株比其他毒株有更高的侵袭力。从 2016 年冬季到 2017 年春季,9 起诺如病毒疫情在光明新区呈地区聚集性暴发,而往年并没有同类情况出现,引起这些聚集性暴发疫情的原因还有待进一步调查研究。

本研究初步对深圳市光明新区诺如病毒疫情暴发的病原体基因分型情况和分子流行病学特征进行研究,为今后的预防控制积累了经验。由于深圳地区

人口流动性大,而诺如病毒的基因型较多,每年都有不同的流行株,医院、学校及食堂等公共场所成为诺如病毒大肆流行的主要聚集地^[11-13]。因此,长期对诺如病毒流行情况实施监测很有必要。

参考文献

- [1] HUANG X Y, SU J, LU Q C, et al. A large outbreak of acute gastroenteritis caused by the human norovirus GⅡ. 17 strain at a university in Henan Province, China[J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1): 6-11.
- [2] KOO E S, KIM M S, CHOI Y S, et al. Occurrence of novel GⅡ. 17 and GⅡ. 21 norovirus variants in the coastal environment of South Korea in 2015[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0172237.
- [3] PAN L, XUE C, FU H, et al. The novel norovirus genotype GⅡ. 17 is the predominant strain in diarrheal patients in Shanghai, China[J]. Gut Pathogens, 2016, 8(1): 49-53.
- [4] LU J, SUN L, FANG L, et al. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GⅡ. 17, Guangdong Province, China, 2014-2015[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(7): 1240-1242.
- [5] FU J, AI J, JIN M, et al. Emergence of a new GⅡ. 17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in Jiangsu, China, September 2014 to March 2015[J]. Euro Surveill, 2015, 20(24): 21157-21161.
- [6] HAN J, JI L, SHEN Y, et al. Emergence and predominance of norovirus GⅡ. 17 in Huzhou, China, 2014-2015[J]. Virol J, 2015, 12(1): 139-142.
- [7] MATSUSHIMA Y, ISHIKAWA M, SHIMIZU T, et al. Genetic analyses of GⅡ. 17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region[J]. Euro Surveill, 2015, 20(26): 21173-21176.
- [8] 杨慧, 李静媚, 陈应坚, 等. 2014 年深圳市龙岗区诺如病毒胃肠炎暴发的分子流行病学特征[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(9): 1208-1211.
- [9] ZHANG P, CHEN L, FU Y, et al. Clinical and molecular analyses of norovirus-associated sporadic acute gastroenteritis; the emergence of GⅡ. 17 over GⅡ. 4, Huzhou, China, 2015[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 717-721.
- [10] 吴微, 张宏斌, 张海龙, 等. 2010 年深圳地区诺如病毒的基因分型[J]. 病毒学报, 2012, 28(3): 219-223.
- [11] ZENG M, XU X H, ZHU C M, et al. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in childhood diarrhea in China[J]. J Med Virol, 2011, 84(1): 145-151.
- [12] JIN M, XIE H, DUAN Z, et al. Emergence of the GⅡ 4/2006b variant and recombinant noroviruses in China[J]. J Med Virol, 2010, 80(11): 1997-2004.
- [13] 吴清平, 薛亮, 张菊梅. 诺如病毒流行株 GⅡ. 4 型进化研究进展[J]. 微生物学报, 2012, 52(12): 1431-1438.