

一起急性胃肠炎暴发疫情中诺如病毒的分子流行病学分析

张爽¹, 荆红波¹, 马红梅¹, 李颖¹, 靳淼²

1. 北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 101300; 2. 中国疾病预防控制中心

摘要: **目的** 研究导致本次急性胃肠炎暴发疫情的诺如病毒的分子流行病学特征。 **方法** 对 2015 年 2 月 7 日北京市某旅行团急性胃肠炎暴发疫情病例标本进行实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测, 并对感染病例的诺如病毒进行 RNA 依赖性 RNA 聚合酶基因 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 和 VP1 区基因序列的检测和分析。 **结果** 18 份便标本经 Real-time PCR 检出 12 份 G II 型诺如病毒阳性标本, RdRp 区和 VP1 区序列扩增各得到 11 条诺如病毒基因序列。根据 RdRp 区和 VP1 区系统进化分析证明感染病例的诺如病毒分型为 G II. 17 型。该病毒株与引起暴发疫情的诺如病毒 G II. 17 型新变异株珠海 ZHITHC-12 株高度同源, RdRp 区和 VP1 区核苷酸差异分别为 0% 和 0.1%, 氨基酸差异均为 0%。 **结论** 引发北京某旅行团旅客急性胃肠炎暴发疫情的病原体是引起中国 2015 年暴发流行的诺如病毒 G II. 17 型新变异株。

关键词: 诺如病毒; 胃肠炎; 暴发; 分子流行病学

中图分类号: R512.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)01-0015-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.01.005

Molecular epidemiology of norovirus in an outbreak of acute gastroenteritis

ZHANG Shuang*, JING Hong-bo, MA Hong-mei, LI Ying, JIN Miao

* Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China

Abstract: **Objective** To study the molecular epidemiology of norovirus causing an outbreak of acute gastroenteritis. **Methods** Specimens were collected from patients with acute gastroenteritis in a tour group in Beijing on February 7, 2015, and were subjected to norovirus detection by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). Gene detection and analysis of both RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and VP1 region were performed in the noroviruses isolated. **Results** Twelve out of 18 stool specimens were detected to be G II norovirus-positive by real-time PCR. And 11 norovirus sequences were obtained by gene amplification of both RdRp and VP1 region. Phylogenetic analysis of RdRp and VP1 region indicated that norovirus G II.17 was the pathogen. The virus strain was highly homologous with Zhuhai ZHITHC-12 strain, which had caused outbreaks of infectious diseases before. The nucleotide difference was 0% between the laboratory strain and Zhuhai ZHITHC-12 strain in the RdRp region, and 0.1% in the VP1 region. The amino acid differences were both 0%. **Conclusions** It is a new norovirus variant of G II.17 causing outbreaks of acute gastroenteritis in China in 2015 that leads to the outbreak of the acute gastroenteritis in a tour group in Beijing.

Key words: Norovirus; Gastroenteritis; Outbreak; Molecular epidemiology

诺如病毒是全球非细菌性急性胃肠炎的主要致病原。据报道,在急性胃肠炎病例中约 1/5 诺如病毒检测阳性,且各年龄段人群对其普遍易感^[1]。由于诺如病毒的潜伏期相对较短^[2]以及它的高度传染性和快速传播能力,使其易导致急性胃肠炎暴发疫情^[3-5]。由诺如病毒引起的感染性腹泻暴发疫情主要发生在冬季^[6],因此也被称为“冬季呕吐病”^[7]。

基金项目: 国家“十二五”科技重大专项 (2012ZX10004215); 卫生行业专项 (201302004)

作者简介: 张爽 (1987-), 女, 山东省淄博市人, 硕士, 初级技师, 主要从事病原微生物检验工作, E-mail: 43761191@qq.com。

诺如病毒属于杯状病毒科^[8], 为单股正链 RNA 病毒。根据基因差异, 诺如病毒被分为 GI~G VI 6 个基因群, 其中, GI 和 G II 群是引起人类急性胃肠炎的两个主要基因群。1995 年起, 全球报道多起诺如病毒 G II.4 型基因变异株与急性胃肠炎暴发流行相关^[9-11]。但在 2014 年冬季以来, 由 G II.17 型诺如病毒基因变异株所导致的急性胃肠炎暴发疫情大幅增加^[12-13]。

2015 年 2 月 7 日, 北京某赴海南旅行团旅客中发生一起以呕吐、腹泻等不适症状为主的急性胃肠炎暴发疫情。经实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检

测,确定引发本次疫情的致病病原体为 G II 型诺如病毒。此后,本研究对暴发疫情的送检标本进行了诺如病毒 RdRp 区和 VP1 区基因序列的检测,以进一步明确致病病原体的分子流行病学特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 本次暴发疫情的可能病例定义为:2015 年 2 月 7-8 日期间,某赴海南旅行团中,发生呕吐或腹泻(≥3 次/d),并伴有大便性状改变者。根据上述标准在 45 名旅客中确定 28 例可能病例。粪便标本经检测为诺如病毒阳性感染者的可能病例确定为确诊病例^[14]。本研究共采集到 12 例病例和 6 例同行无症状人员的便标本进行下一步检测。

1.1.2 主要仪器和试剂 美国 ABI 公司 ViiA7 型实时荧光定量 PCR 仪,美国伯乐公司 iCycler 型 PCR 仪、德国 Qiagen 公司 QIAxcel Advanced 全自动毛细管电泳仪、德国 Qiagen 公司 RNA 提取试剂盒 QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52906)、毛细管电泳试剂盒 QIAxcel DNA Screening Kit (Cat no. 929004),江苏硕世公司诺如病毒 G I/G II 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)(货号:JC50201)。美国 Invitrogen 公司 PCR 试剂盒 SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Cat no. 12574-026)。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 在 1.5 ml EP 管中加入 1 ml HBSS 标本处理液,再加入 0.1 g 固体粪便标本或 0.1 ml 液体粪便标本。涡旋振荡 3 次,室温静置 10 min,5 000 r/min 离心 5 min,制成 10%便悬液。

1.2.2 病毒核酸提取 按照 Qiagen 公司 RNA 提取试剂盒的说明书提取便悬液上清中的病毒核酸,所提核酸于-70℃暂存或立即进行下一步检测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 按照硕世公司诺如病毒 G I/G II 核酸检测试剂盒的说明书配制反应体系,并设置实时荧光定量 PCR 仪的扩增程序。对扩增曲线呈典型 S 型且 CT≤35.5 的标本结果判定为阳性,对无典型 S 型扩增曲线或 CT>35.5 结果判定为阴性。Real-time PCR 结果为诺如病毒阳性的标本进行下一步 RdRp 区和 VP1 区序列扩增。

1.2.4 诺如病毒 RdRp 区和 VP1 区序列扩增和分析 使用 Invitrogen 公司 One-Step RT-PCR 试剂盒进行序列扩增,反应体系按照试剂说明书配制。扩增 RdRp 区使用的混合引物为改良过的 P290/P289^[15],扩增 VP1 区的引物为根据诺如病毒 G II. 17 型 VP1 区设计

的两对特异性扩增引物,见表 1。

表 1 诺如病毒 RT-PCR 引物

扩增 基因	引物 名称	方向	引物 序列	产物 (bp)
RdRp 区	混合引物 P290	+	290H:5'-GAT TAC TCC AGG TGG GAC TCC AC-3'	331
		+	290I:5'-GAT TAC TCC AGG TGG GAC TCA AC-3'	
		+	290J:5'-GAT TAC TCC AGG TGG GAT TCA AC-3'	
		+	290K:5'-GAT TAC TCC AGG TGG GAT TCC AC-3'	
VP1 区	混合引物 P289	-	289H:5'-TGA CGA TTT CAT CAT CAC CAT A-3'	922
		-	289I:5'-TGA CGA TTT CAT CAT CCC CGT A-3'	
	VP1-1	+	5'-TGT GCC CAG ACA AGA GTC AAT G-3'	937
		-	5'-TTG GCC TTG TAA CTC ACC ATC-3'	
	VP1-2	+	5'-GTT CCC AGT CCC CAT CGA TTC-3'	
		-	5'-GAC ATG CTC ACG TCA TCT GTC-3'	

将配制的反应体系放入 PCR 仪按下述条件进行序列扩增反应:50℃逆转录 30 min;94℃预变性 15 min;94℃ 1 min,50℃ 80 s,72℃ 1 min,扩增 40 个循环;72℃延伸 10 min。序列扩增结束后,使用 Qiagen 全自动毛细管电泳仪进行电泳。电泳结果有阳性条带的序列扩增产物送上海生工生物公司进行双向测序。

测序得到的诺如病毒 RdRp 区和 VP1 区序列使用 Sequencher 4.8 软件进行序列比对,并将 VP1-1 和 VP1-2 扩增片段拼接成相对完整的 VP1 区序列。由于所得的 11 条 RdRp 区和 11 条 VP1 区序列分别完全一致,因此各取 1 条比对整理后的序列上传至 NCBI 网站,得到 RdRp 区 GenBank 序列号:KP857570.1,VP1 区 GenBank 序列号:KR858308.1。

将所得的 RdRp 区和 VP1 区序列与参考序列使用 MEGA 5.0 以及 BioEdit 软件建立系统进化树,以确定诺如病毒分型,同时进行核苷酸和氨基酸同源性分析。

1.2.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,组间计数资料的比较应用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况 病例为 2 月 3-7 日北京某赴海南旅行团中的部分旅客。该旅行团共有团员 45 人,于 2 月 7 日下午乘坐飞机返回北京,晚 21 时到达北京。旅游期间早中晚餐和居住宾馆均由团内统一组织,饮用水为旅行团提供的当地矿泉水。

2.2 流行病学特征 首发病例于 2 月 7 日 4:00 左右发病,末例于 2 月 9 日 20:00 左右发病。共有 28 人发病,年龄在 2.5~54 岁之间,总罹患率为 62.22%

(28/45)。旅行团中共有儿童 15 人,发病 11 人,罹患率为 73.33%(11/15);成人 30 人,发病 17 人,罹患率为 56.67%(17/30),两者差异无统计学意义($\chi^2 = 1.182, P = 0.277$)。

28 例可能病例的主要症状为呕吐,占总数的 85.71%(24/28);其次为腹痛,占 78.57%(22/28);恶心占 57.14%(16/28);发热(腋下体温 $\geq 37.5^\circ\text{C}$)及腹泻均占 28.57%(8/28);乏力占 14.29%(4/28);腹胀占 10.71%(3/28);寒战占 7.14%(2/28)。

28 例可能病例分布在 16 个家庭中,旅行期间居住较零散,没有明显的空间聚集性分布。可能病例的发病时间集中在 2 月 7 日 4:00–12:00,共发病 19 例(67.86%,19/28)。根据诺如病毒的潜伏期为 12~48 h 及其食源性传播特点^[14]推测,2 月 6 日中餐和晚餐暴露的可能性较大。

2.3 诺如病毒 Real-time PCR 检测结果 经 Real-time PCR 检测,18 份便标本共检出诺如病毒阳性 12 份,阳性检出率为 66.67%(12/18),且均为 G II 型诺如病毒。其中,12 例病例检出诺如病毒阳性 11 例,阳性检出率为 91.67%(11/12);6 例同行无症状人员仅有 1 例诺如病毒阳性,阳性检出率为 16.67%(1/6)。经 χ^2 检验,病例和同行无症状人员阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2 = 10.13, P = 0.008$),病例的诺如病毒阳性检出率较高。

2.4 诺如病毒系统进化分析 选取各型诺如病毒参考株 RdRp 区和 VP1 区序列分别与本次所得的 RdRp-290 和 Shunyi-18 VP1 区序列建立核苷酸系统发生树。RdRp-290 与 G II.17 型诺如病毒参考株中的 2015 年珠海 ZHITHC-12 株^[16]、台湾 CGMH70 株、日本 Kawasaki308^[17] 株以及 2014 年广州 41 621 株^[18]、香港 CUHK-NS-463 株、美国 Gaithersburg 株划分为一簇,与 2014 年日本 Kawasaki323 株^[17] 亲缘关系相对较远。见图 1。

Shunyi-18 VP1 区与 G II.17 型诺如病毒参考株中的 2015 年珠海 ZHITHC-12 株^[16]、江苏 JSWX15 027 株^[19]、台湾 CGMH70 株、日本 Kawasaki308 株^[17]、意大利 PR668 株以及 2014 年广州 41 621 株^[18]、香港 CUHK-NS-463 株、美国 Gaithersburg 株划分为一簇;与 2002 年美国 CS-E1 株亲缘关系相对较远。见图 2。

根据诺如病毒 RdRp 区和 VP1 区的系统进化分析可知:实验所得的序列与 G II.17 型诺如病毒参考株序列位于同一簇,提示引起本次胃肠炎暴发疫情的诺如病毒分组为 G II.17 型^[20]。

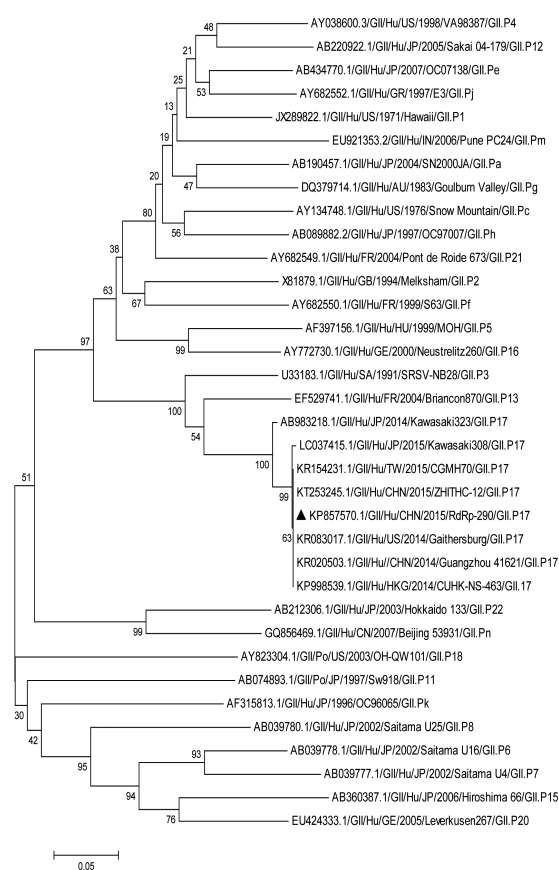


图 1 诺如病毒 RdRp 区核苷酸序列系统发生树

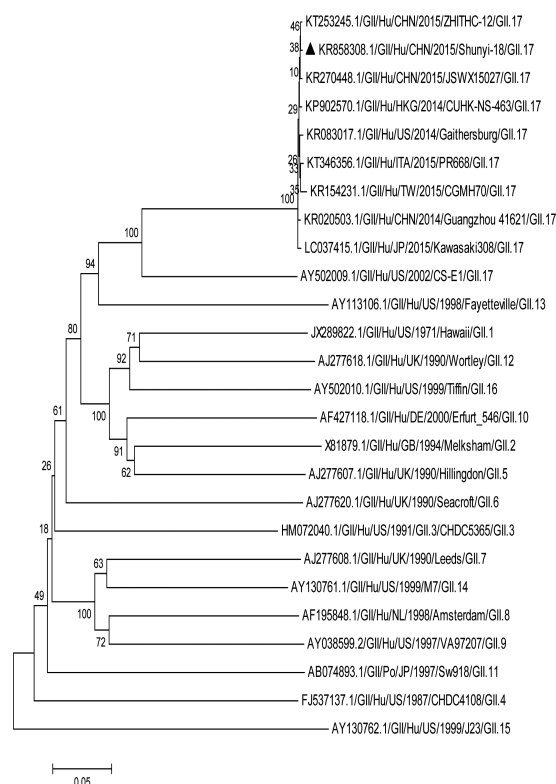


图 2 诺如病毒 VP1 区核苷酸序列系统发生树

2.5 诺如病毒同源性分析 RdRp-290 与 G II.17 型诺如病毒参考株经核苷酸同源性两两比较得知:其

与 2015 年珠海 ZHITHC-12 株^[16]、台湾 CGMH70 株以及 2014 年广州 41 621 株^[18]、香港 CUHK-NS-463 株、美国 Gaithersburg 株 RdRp 区的核苷酸差异为 0%;与 2015 年日本 Kawasaki308 株^[17]核苷酸差异为 0.4%;与 2014 年日本 Kawasaki323 株^[17]核苷酸差异为 1.9%。且,RdRp-290 与所选 G II. 17 型诺如病毒参考株 RdRp 区的氨基酸差异均为 0%。

Shunyi-18 VP1 与 G II. 17 型诺如病毒参考株经核苷酸同源性两两比较结果得知:其与 2015 年珠海 ZHITHC-12 株^[16]核苷酸差异最小,为 0.1%;与 2015 年江苏 JSWX15 027 株^[19]差异为 0.2%;与 2014 年广州 41 621 株^[18]、香港 CUHK-NS-463 株以及 2015 年日本 Kawasaki308 株^[17]差异为 0.3%;与 2015 年意大利 PR668 株、2014 年美国 Gaithersburg 株和 2015 年台湾 CGMH70 株差异分别为 0.4%、0.5%和 0.6%;与 2002 年美国 CS-E1 株核苷酸差异最大,为 28.3%。氨基酸同源性两两比较结果:其与 2015 年珠海 ZHITHC-12 株^[16]、江苏 JSWX15 027 株^[19]以及 2014 年广州 41 621 株^[18]、香港 CUHK-NS-463 株 VP1 区的氨基酸差异为 0%;与 2015 年日本 Kawasaki308 株^[17]、意大利 PR668 株和 2014 年美国 Gaithersburg 株差异为 0.2%;与 2015 年台湾 CGMH70 株差异为 0.6%;与 2002 年美国 CS-E1 株的氨基酸差异最大,为 10.9%。同源性分析得知,本次实验所得的诺如病毒毒株与曾引起诺如病毒暴发疫情的 G II. 17 新变异株珠海 ZHITHC-12 株^[16]的 RdRp 区及 VP1 区同源性最高,与其他参考株的同源性相对较低。推测本次分离到的诺如病毒毒株可能是先前其他诺如病毒毒株的重组株。

3 讨论

诺如病毒是全球非细菌性急性胃肠炎的主要致病原,疾病负担严重。据一项纳入了 48 个国家、175 篇文献的系统回顾文献报道,187 336 例急性胃肠炎病例中约 1/5 诺如病毒检测阳性,且各年龄段人群对诺如病毒普遍易感^[1]。我国的研究发现,急性胃肠炎病例中诺如病毒感染的比例较其他病原体高^[21-22],与其他国家报道^[1]相似。由于诺如病毒的潜伏期相对较短^[2]以及它的高度传染性和快速传播能力,使其易导致急性胃肠炎暴发疫情^[3-5]。

诺如病毒引起的感染性腹泻暴发疫情主要发生在冬季^[6],每年 10 月至次年 3 月是诺如病毒暴发流行的高发期。本次疫情发生在 2015 年 2 月,符合诺如病毒被称为“冬季呕吐病”的明显季节性特征^[7]。

诺如病毒属于杯状病毒科^[8],为单股正链 RNA 病毒。根据基因差异,诺如病毒被分为 GI~G VI 6 个基因群,其中,GI 和 G II 群是引起人类急性胃肠炎的两个主要基因群。诺如病毒的基因变异速度很快,每隔几年便出现可引起暴发流行的新变异株。1995 年起,全球报道多起 G II. 4 型基因变异株与急性胃肠炎暴发流行相关^[9-11]。2012 年起,诺如病毒逐渐成为我国其他感染性腹泻病暴发的优势病原体(60%~96%),特别是 2014 年冬季以来,由诺如病毒 G II. 17 型新变异株所导致的急性胃肠炎暴发疫情大幅增加。首先是日本的诺如病毒 G II. 17 型新变异株 Kawasaki 株^[17]在日本 2014 年 12 月-2015 年 3 月的诺如病毒暴发中占据了很大比例。随后,诺如病毒 G II. 17 型新变异株在广东^[12]、江苏^[19]、浙江^[13]等地都引起了急性胃肠炎的暴发流行,地位逐渐取代先前流行的诺如病毒 G II. 4 型基因变异株。

本次疫情通过对标本进行实时荧光定量 PCR 检测鉴定,确定了引发北京某旅行团旅客急性胃肠炎暴发疫情的病原体为 G II 型诺如病毒。为明确引发本次疫情的诺如病毒基因型别,本研究对送检标本进行了 RdRp 区和 VP1 区基因序列的扩增和序列测定,并将得到的 11 条 RdRp 区序列和 11 条相对完整的 VP1 区序列分别进行了核苷酸同源性分析。同源性分析结果显示 11 条 RdRp 区和 11 条 VP1 区序列分别完全一致。这说明引发各病例急性胃肠炎的诺如病毒为同一株,且在感染病例后病毒并未发生基因变异。

通过系统进化分析,可以看到所得的 RdRp 区(RdRp-290)和 VP1 区(Shunyi-18 VP1)序列与诺如病毒 G II. 17 型的各参考株在同一簇,这明确了引起本次胃肠炎暴发疫情的诺如病毒分组为 G II. 17 型,符合我国目前诺如病毒的流行趋势。RdRp 区与 VP1 区相比,所得毒株与各诺如病毒 G II. 17 型参考株核苷酸差异较小。这可能是由于 VP1 区较 RdRp 区序列长,且 VP1 区为主要结构蛋白编码区、核苷酸变异较大所致。RdRp-290 与各参考株的核苷酸虽有差异,但并未发生氨基酸变异。Shunyi-18 VP1 与部分参考株相比发生了氨基酸差异,且与 2002 年的美国 CS-E1 株相差最大。导致这种结果的原因可能是诺如病毒的基因变异大小与距参考株分离时间的长短有一定相关关系。系统进化分析和同源性分析显示,本研究分离到的诺如病毒与曾引起诺如病毒暴发疫情的 G II. 17 新变异株珠海 ZHITHC-12 株^[16]的 RdRp 区及 VP1 区同源性最高,与其他参考株的同源性相对较低。推测本次分离到的诺如病毒毒株可能是先前其他诺如病毒