

2017—2018 年成都地区诺如病毒聚集性疫情病原基因型分析

程悦¹, 孟建彤¹, 陈恒¹, 付芮², 黄薇¹, 梁娴¹

1. 成都市疾病预防控制中心, 四川 成都 610041; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 610075

摘要: **目的** 分析 2017—2018 年成都地区诺如病毒聚集性疫情中病毒基因型构成情况, 为疾病防控工作提供依据。**方法** 选取 2017—2018 年诺如病毒聚集性疫情标本, 对病毒基因 RdRp 及 VP1 区片段测序, 构建进化树并进行同源性分析。**结果** 测序结果显示, 68 份肛拭子标本中 16.2% (11/68) 为 G I 群 (包括 G I . 2、G I . 3 和 G I . 5 型), 83.8% (57/68) 为 G II 群 (包括 G II . P16-G II . 2、G II . P17-G II . 17、G II . P8-G II . 8、G II . P12-G II . 3、G II . P7-G II . 6 和 G II . P15-G II . 15 型)。2017 年以 G II . P16-G II . 2 型为主; 2018 年 G I 群及 G II . P17-G II . 17 型均显著增加, 同时检出其他 4 种基因型。各基因型病毒变异不明显, 核苷酸同源性为 93.4%~100%。**结论** 2018 年成都地区诺如病毒流行株基因型构成较 2017 年复杂, 可能与聚集性疫情增长有关。应持续监测诺如病毒基因型流行情况, 及时掌握病毒变异动态, 以期提高疾病防控的预警能力。

关键词: 诺如病毒; 基因型; 聚集性疫情

中图分类号: R181.8⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)03-0311-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.03.014

Viral genotype analysis of aggregation epidemics induced by norovirus infection in Chengdu region, 2017–2018

CHENG Yue¹, MENG Jian-tong¹, CHEN Heng¹, FU Rui², HUANG Wei¹, LIANG Xian¹

1. Chengdu Municipal Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China

Corresponding author: LIANG Xian, E-mail: 75539392@qq.com

Abstract: **Objective** To analyze the composition of viral genotypes in aggregation epidemics induced by norovirus infection in Chengdu region in 2017–2018, and to provide a basis for its prevention and control. **Methods** Anal swab samples from aggregation epidemics induced by norovirus infection in Chengdu region during 2017–2018 were selected, and then the sequence information of RdRp and VP1 was analyzed. The phylogenetic tree was constructed to analyze the nucleotide sequence homology. **Results** The sequence analysis revealed that 16.2% (11/68) samples belonged to NoV genogroup GI (including GI.2, GI.3 and GI.5). 83.8% (57/68) samples belonged to NoV genogroup GII (including GII.P16-GII.2, GII.P17-GII.17, GII.P8-GII.8, GII.P12-GII.3, GII.P7-GII.6 and GII.P15-GII.15). GII.P16-GII.2 was the main genotype circulating in 2017. Genogroups GI and GII.P17-GII.17 significantly prevailed in 2018; meanwhile, other four genotypes were detected. The variation of noroviruses with different genotypes was not obvious. The nucleotide sequence homology ranged from 93.4% to 100%. **Conclusions** The genotype composition of norovirus strains predominated in Chengdu region in 2018 was more complicated than that in 2017, which might be related to the increase of aggregation epidemics. It is necessary to continuously monitor the molecular epidemiology of norovirus strains and master the variation of norovirus in time so as to improve the early warning ability in disease prevention and control.

Key words: norovirus; genotype; aggregation epidemic

诺如病毒 (norovirus), 杯状病毒科, 诺如病毒属, 具有感染剂量低, 在环境中抵抗力强等特点, 常引起人

基金项目: 四川省卫生计生委重点项目 (17ZD046); 成都市卫生和计划生育委员会项目 (2017015)

作者简介: 程悦 (1990–), 女, 四川人, 硕士, 检验师, 主要从事微生物检验及相关工作。共同第一作者: 孟建彤。

通信作者: 梁娴, E-mail: 75539392@qq.com。

类急性胃肠炎的暴发。诺如病毒分为 6 个基因群 (genogroups, G I –G VI), 引起人类急性胃肠炎的以 G I 和 G II 群为主。诺如病毒变异迅速, 可能成为疫情暴发流行的高危因素。我国于 1995 年首次发现诺如病毒^[1], 此后全国各地相继报道相关疫情。尤其是 2014 年出现的 G II . 17 型突变株和 2016 年流行的 G II . 2 型, 都导致包括我国在内的许多亚洲国家暴发诺

如病毒的感染性疫情^[2-4]。

2016—2017 年冬季, G II. 2 型诺如病毒导致成都地区聚集性疫情呈暴发式增长。2018 年, 疫情再次呈高发态势, 范围波及幼儿园、中小学校、大型企业等人口聚集区域, 其中发生在托幼机构和中小学校的疫情数超过总数的 80%, 不仅严重影响正常教学活动, 还造成极大的社会影响。为提高诺如病毒暴发疫情的预警能力, 本研究拟对 2017 年以来的诺如病毒标本进行基因型分析, 掌握病毒流行动态, 为及时开展疾病防控工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 样本来源于 2017 年 1 月—2018 年 8 月成都地区诺如病毒聚集性疫情, 每起疫情随机选取标本 1 份, 共 77 份纳入本研究。标本均为肛拭子。

1.2 核酸提取 采用 Maxwell[®] 16 全自动核酸提取仪 (Promega, 美国) 提取样本 RNA, 试剂盒选用 Maxwell[®] 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, 美国)。样本取 200 μ l, 收集 RNA 100 μ l。

1.3 基因群鉴定 采用实时荧光定量 PCR (realtime-PCR, RT-PCR) 方法对样本进行基因群鉴定, 选用诺如病毒检测试剂盒 (达安基因, 广州)、诺如病毒 G I 群检测试剂盒 (达安基因, 广州)、诺如病毒 G II 群检测试剂盒 (达安基因, 广州)。按照试剂盒说明书配制三种试剂的反应体系并设置反应程序, 使用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国) 进行检测。

1.4 基因型检测 采用 [SuperScript[®] III One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq] 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 对基因群鉴定阳性的标本进行基因型检测。G I 群诺如病毒扩增 ORF2 的 5' 末端, 引物为 G1SKF 5'-CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA-3' 和 G1SKR 5'-CCA ACC CAR CCA TTR TAC A-3'。G II 群扩增 ORF1 与 ORF2 的连接区, 引物为 MON 431 (+) 5'-TGG ACI AGR GG I CCY AAY CA-3' 和 G2SKR (-) 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3'。配置 50 μ l 反应体系: PCR mix 25 μ l, 引物各 1 μ l, Taq mix 2 μ l, ddH₂O 16 μ l, 模板 5 μ l; 在 Thermal Cycler 型 PCR 仪 (ABI, 美国) 上进行反应。G I 群诺如病毒扩增程序为 42 $^{\circ}$ C 40 min; 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。G II 群为 42 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 60 s, 50 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 送至成都擎科梓熙生物技术有限公司, 基因测序反应在 3730 型测序仪 (ABI, 美

国) 进行。

1.5 基因型分析 测序结果在荷兰国家公共卫生与环境研究院 (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM) 建立的 NoroNet (<https://www.rivm.nl/en/noronet/databases/sequence-typing-tool>) 上在线比对, 分析诺如病毒基因型构成情况。MegaX 构建 NJ 系统进化树。

2 结果

2.1 样本基因群鉴定 经 RT-PCR 检测, 77 份样本检出诺如病毒 G I 群阳性 13 份, 诺如病毒 G II 群阳性 64 份。

2.2 样本基因型分析 77 份样本测序成功 68 份, 其中 G I 群 11 份, G II 群 57 份。利用 NoroNet 上的 Norovirus Typing Tool Version 2.0 工具比对样本的测序结果。G I 群包括 3 种基因型, 分别是 G I. 2、G I. 3、G I. 5。G II 群包括 6 种基因型, 分别是 G II. P16-G II. 2、G II. P12-G II. 3、G II. P7-G II. 6、G II. P8-G II. 8、G II. P15-G II. 15 和 G II. P17-G II. 17。G II 群为近两年成都地区主要流行的诺如病毒, 2017 年 G II. P16-G II. 2 型诺如病毒导致的聚集性疫情占全部疫情的 94. 4% (34/36)。2018 年 G II. P16-G II. 2 型逐渐减少, G II. P17-G II. 17 型增多, 且基因型构成更加复杂。同时 G I 群所占比例明显增加, 以 G I. 5 型最为显著, 见图 1。

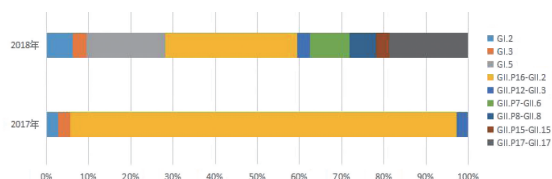


图 1 2017—2018 年成都地区诺如病毒基因型构成情况

2.3 同源性分析

2.3.1 G I 群诺如病毒分析 13 株 G I 群诺如病毒参考序列与本研究序列构建进化树 (图 2)。结果显示, 进化树具有 3 个明显分支, 即 2017—2018 年成都地区流行的三种 G I 群诺如病毒。其中 G I. 2 型差异不明显, 核苷酸相似度为 99. 0%, 与俄罗斯株 (2016, MF615618. 1) 和台湾株 (2016, KU954110. 1) 同源性较高。两年检出的 G I. 3 型病毒具有一定的差异, 核苷酸相似度为 93. 8%, 其中 2017 年与日本株 (2015, LC378991. 1) 较为接近, 2018 年与巴西株 (2013, MH393673. 1) 及英国株 (2014, MH218723. 1) 接近。另外, G I. 5 型的核苷酸相似度为 99. 6%, 与巴西株 (2015, MF784786. 1) 同源性较高, 也与南非研究者 2012 年在河水中检出的诺如病毒有一定的同源性。

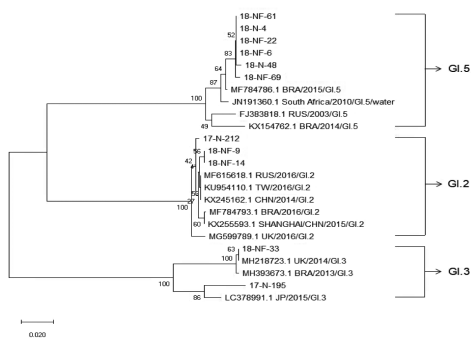


图2 2017—2018 年成都地区 G I 群诺如病毒系统进化树

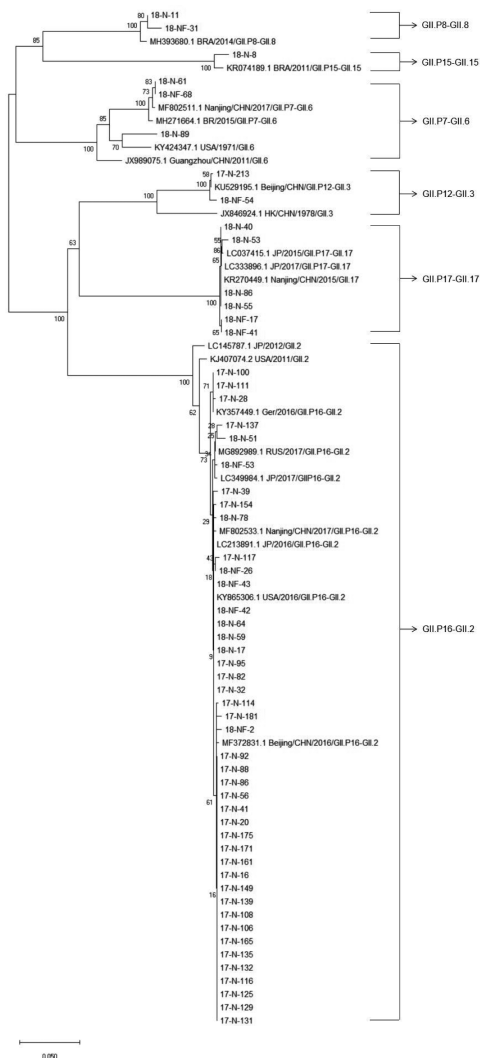


图3 2017—2018 年成都地区 G II 群诺如病毒系统进化树

2.3.2 G II 群诺如病毒分析 20 株 G II 群诺如病毒参考序列与本研究序列构建进化树(图 3)。结果显示,进化树分为 6 个分支。分别为 2017—2018 年成都地区流行的六种 G II 群诺如病毒。G II.P16-G II.2 型变异不明显,核苷酸相似度为 98.8%~100%,核苷酸转换率高于颠换率,但 2017 年与德国株(2016, KY357449.1)和北京株(2016, MF372831.1)较为接近,而 2018 年与俄罗斯株(2017, MG892989.1)、美国

株(2016, KY865306.1)和日本株(2017, LC349984.1)更接近。G II.P17-G II.17 型病毒核苷酸相似度大于 99%,碱基置换均为核苷酸转换,与南京株(2015, KR270449.1)和日本株(2015, LC037415.1; 2017, LC333896.1)同源性均较高。此外,两株 G II.P8-G II.8 型诺如病毒核苷酸相似度为 98.8%,与巴西株(2014, MH393680.1)同源性较高。一株 G II.P15-G II.15 型病毒也与巴西株(2011, KR074189.1)存在一定的同源性。三株 G II.P7-G II.6 型病毒中,两株与南京株(2017, MF802511.1)和巴西株(2015, MH271664.1)位于同一分支,另一株和以上两株病毒的核苷酸相似度为 93.4%,与美国株(1971, KY424347.1)位于同一分支。两株 G II.P12-G II.3 型病毒核苷酸相似度为 99.1%,与北京株(2016, KU529195.1)同源性较高。

3 讨论

2014 年冬季以来,成都地区诺如病毒聚集性疫情逐年增加。2016 年 12 月—2017 年 2 月,疫情数高达 78 起,占 2014 年以来的 44.3%。2018 年疫情继续呈现高发态势,为掌握诺如病毒的流行动态,提高诺如病毒聚集性疫情的预警能力,本研究对 2017 年以来的诺如病毒标本进行了分析。

病毒基因型分析显示,2017—2018 年 8 月成都地区流行的诺如病毒以 G II 群为主,2017 年仅 2 起聚集性疫情的病原为 G I 群(G I.2、G I.3 型),占总数的 5.6%。但 2018 年,由 G I 群导致的聚集性疫情出现增长趋势,截止 8 月,已有 9 起聚集性疫情由 G I 群诺如病毒导致,占总数的 28.1%,包括 G I.2 型、G I.3 型和 G I.5 型。G I.5 型自 2018 年出现以来,迅速超过 G I.2 型和 G I.3 型,占两年 G I 群总数的 54.5%,其引起聚集性疫情数量增加值得我们密切关注。

同源性分析显示,两年检出的 G I.2 型病毒差异不明显。G I.3 型病毒虽无明显变异,但分别趋向于不同地区检出的病毒,为重组和变异提供了可能。G I.5 型与南非研究者 2012 年在河水中检出的诺如病毒有一定的同源性,这也提示了我们在分析和处理聚集性疫情的时候需要关注水污染,从病原学的角度为寻找疫情发生的原因提供了参考。

另一方面,2018 年以来,G II 群诺如病毒引起的聚集性疫情占总数的 71.9%,比 2017 年的 94.4%有所下降,但仍为主要的病原。基因型分析显示,G II.P16-G II.2 型导致了 2017 年成都地区的绝大多数诺如病

毒聚集性疫情,占 G II 群总数的 97.1%,仅一起为 G II. P12-G II. 3 型。G II. P16-G II. 2 型诺如病毒由日本研究者于 2009-2010 年冬季首次发现^[5]。2016 年,德国和我国大部分地区都暴发了该病毒引起的胃肠炎疫情^[4,6]。成都地区的研究者在 2012 年就报道了 G II. 2 型诺如病毒^[7]。本实验室前期研究发现, G II. 2 型诺如病毒是导致成都市 2016—2017 年冬季诺如病毒聚集性疫情大幅度增加的重要原因,本研究对这种 G II. 2 型诺如病毒的 ORF1 与 ORF2 连接区进行测序,显示其为 G II. P16-G II. 2 型。截止到 2018 年 8 月 G II. P16-G II. 2 型诺如病毒仍为成都地区主要的流行株。同源性分析显示,本次检出的 G II. P16-G II. 2 型病毒变异不明显,与日本、德国、美国、俄罗斯以及我国其他地区流行的毒株同源性较高。该病毒自报道以来,仅 6 年就造成了全球大范围流行,其流行强度高,流行时间长,为疾病防控带来了极大的负担。同时,曾在亚洲许多国家和地区流行的 G II. P17-G II. 17 型诺如病毒又开始在成都地区出现。2014 年日本和中国台湾的研究人员在病例中检出了一种新的 G II. 17 型诺如病毒突变株,该病毒的 RDRP 基因型被确定为 G II. P17 型。此 G II. P17-G II. 17 型诺如病毒成为了日本 2014—2015 年冬季流行的主要毒株^[3]。在意大利、美国等地均有少量 G II. P17-G II. 17 型诺如病毒检出^[8-9]。同期,我国也发生了大范围的暴发流行,长沙、北京、广州等地都有相关报道^[10-15]。2014—2015 年,成都地区也以 G II. 17 型诺如病毒为主,但 2016—2017 年均未检出。2018 年, G II. 17 型诺如病毒又开始增多,成为仅次于 G II. P16-G II. 2 型的流行株。其 RdRp 和 VP1 区的测序结果显示,该病毒为 G II. P17-G II. 17 型,与 2014 年在亚洲地区流行的病毒具有较高的同源性。这种病毒是否会导致新一轮的大流行,需高度重视。

综上所述,2016 年成都地区诺如病毒聚集性疫情大幅度增长以后, G II. P16-G II. 2 型诺如病毒便持续在本地区流行,2017 年全年均以 G II. P16-G II. 2 型为主。2018 年,诺如病毒聚集性疫情继续呈现高发态势, G II. P16-G II. 2 型仍为主要流行株,与 2016—2017 年全球流行的毒株同源性较高。但 G II. P17-G II. 17 型诺如病毒重新开始在成都地区流行,该毒株与 2014 年在亚洲大范围流行的毒株具有较高的同源性。同时, G II. P7-G II. 6 型, G II. P8-G II. 8 型, G II. P12-G II. 3 型和 G II. P15-G II. 15 型的出现,使病毒基因型构成更加复杂,这也可能是诺如病毒聚集性疫情增加的危险因素之一。另外,近年来流行的诺

如病毒均以 G II 群为主,人群对 G I 群的免疫力普遍较 G II 群低,但 2018 年以来, G I 群诺如病毒引起的聚集性疫情不断增加,也对疫情防控带来挑战。这一系列基因型流行情况的变化是否会导致本地区诺如病毒聚集性疫情持续增长,还需持续关注,以便更好地开展预防控制措施,减少疾病暴发带来的社会影响。

参考文献

- [1] 方肇寅, 温乐英, 晋圣谨, 等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染[J]. 病毒学报, 1995, 11(3): 215-219.
- [2] Chan MCW, Hu Y, Chen H, et al. Global spread of norovirus G II. 17 Kawasaki 308, 2014—2016[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(8): 1350-1354.
- [3] Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, et al. Genetic analyses of G II. 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 reG I on[J]. Euro Surveill, 2015, 20(26): pii:21173.
- [4] Ao Y, Wang J, Ling H, et al. Norovirus G II. P16/G II. 2-associated gastroenteritis, China, 2016[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(7): 1172-1175.
- [5] Iritani N, Kaida A, Abe N, et al. Increase of G II. 2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan[J]. J Med Virol, 2012, 84(3): 517-525.
- [6] Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, et al. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain G II. P16-G II. 2, Germany, winter 2016[J]. Euro Surveill, 2017, 22(4): pii:30447.
- [7] 陈喜凯, 廖虹瑜, 叶倩, 等. 成都地区婴幼儿腹泻诺如病毒感染研究[J]. 现代预防医学, 2012, 39(23): 6123-6125, 6129.
- [8] Medici MC, Tummolo F, Calderaro A, et al. Identification of the novel Kawasaki 2014 G II. 17 human norovirus strain in Italy, 2015[J]. Euro Surveill, 2015, 20(35): 30010.
- [9] Parra GI, Green KY. Genome of emerging norovirus G II. 17, United States, 2014[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(8): 1477-1479.
- [10] 姚栋, 陈静芳, 叶文, 等. 一起诺如病毒 G II. 17 型引起的急性胃肠炎病原学诊断及基因特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(7): 641-643, 650.
- [11] 陆翌禹, 秦萌, 董晓根, 等. 一起诺如病毒 G II. 17 引起的成人腹泻病原学基因诊断研究[J]. 环境与健康杂志, 2016, 33(7): 614-616.
- [12] 汪慧, 王大虎, 陈纯, 等. 广州市腹泻监测病例诺如病毒分子流行病学特征[J]. 疾病监测, 2016, 31(10): 838-842.
- [13] Chan MC, Lee N, Hung TN, et al. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus G II. 17 variant in late 2014[J]. Nat Commun, 2015, 6: 10061.
- [14] 夏光辉, 潘弘弘, 谢响. 江西省某农村集中式供水污染引起的诺如病毒感染暴发疫情分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(10): 1234-1236.
- [15] 刘丹, 王远萍, 陈谦, 等. 一起小学诺如病毒胃肠炎暴发流行调查[J]. 中国热带医学, 2019, 19(5): 494-497.