

2013—2017 年中山市 20 起诺如病毒暴发疫情的分子流行病学特征分析

师舞阳, 杨淑欢, 谢颖, 林金思, 吴衍恒

中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528400

摘要: **目的** 分析 2013—2017 年间中山市诺如病毒暴发疫情的分子流行病学特征, 为中山市诺如病毒感染疫情防控提供分子生物学实验依据。 **方法** 收集 2013—2017 年间中山市 20 起诺如病毒引起的感染性腹泻暴发疫情病例标本, 采用 RT-PCR 方法测定诺如病毒 VP1 基因全序列, 并对序列进行系统发育分析。 **结果** 20 起诺如病毒引起的感染性腹泻暴发主要发生在幼儿园及小学, 占疫情总数的 80.0% (16/20)。获得了 77 株病毒的 VP1 基因全序列, 20 起疫情分别由 GII.4 Sydney_2012 (25.0%, 5/20), GII.3 (25.0%, 5/20), GII.17 (25.0%, 5/20), GII.2 (15.0%, 3/20), GII.21 (5.0%, 1/20), 及 GII.6 (5.0%, 1/20) 亚型引起, 5 起暴发中 GII.4 Sydney_2012 分为两个不同分支。 **结论** GII.17 型为中山市新发现流行毒株, 2016 年底发现的两起 GII.4 Sydney_2012 区别于以往出现 GII.4 Sydney_2012, 可能为新亚型的重组毒株 (GII.P16-GII.4 Sydney_2012)。VP1 基因序列分析可作为有效的诺如病毒分型工具, RdRp 基因分析应作为重要补充以确定毒株的重组变异情况。

关键词: 诺如病毒; 暴发; 基因分型; 感染性腹泻; GII.17

中图分类号: R512.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2020)12-1464-05 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.12.015

Molecular epidemiological characteristics of 20 epidemic outbreaks of norovirus in Zhongshan, 2013–2017

SHI Wu-yang, YANG Shu-huan, XIE Ying, LIN Jin-si, WU Yan-heng

Zhongshan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhongshan, Guangdong 528400, China

Abstract: **Objective** To analyze the molecular epidemiological characteristics of 20 epidemic outbreaks of norovirus (NoVs) in Zhongshan from 2013 to 2017, and to provide experimental evidence regarding molecular biology for prevention and control of NoVs epidemic. **Methods** Samples of infectious diarrhea cases were collected from 20 epidemic outbreaks caused by NoVs in Zhongshan from 2013 to 2017. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify the VP1 gene of NoVs. Phylogenetic analysis was performed to determine NoVs genotypes and analyze genetic characteristics of NoVs strains.

Results The 20 infectious diarrhea outbreaks induced by NoVs mainly occurred in kindergartens and primary schools, accounted for 80% (16/20). The entire VP1 gene sequences of 77 NoV strains were obtained. The 20 outbreaks were caused by GII.4 Sydney_2012 (25.0%, 5/20), GII.3 (25.0%, 5/20), GII.17 (25.0%, 5/20), GII.2 (15.0%, 3/20), GII.21 (5.0%, 1/20) and GII.6 (5%, 1/20), respectively. In 5 outbreaks, GII.4 Sydney_2012 was divided into two different sub-branches.

Conclusions GII.17 was a newly-found epidemic strain in Zhongshan. Two outbreaks caused by GII.4 sydney_2012 found at the end of 2016 were different from those found before, which might be a recombinant strain of new subtype (GII.P16-GII.4 Sydney_2012). VP1 gene sequence analysis can be used as an effective tool for norovirus typing, and RdRp gene analysis should be considered as an important supplement to determine the recombinant variation of virus strain.

Keywords: norovirus; outbreak; genotype; infectious diarrhea; GII.17

诺如病毒 (norovirus, NoV) 是引起感染性腹泻暴发的主要病原^[1]。美国、欧洲及日本等发达国家及地区, 诺如病毒引起的感染性腹泻暴发分别约占 50%、70% 及 85%^[2-5]。我国感染性腹泻病暴发也多以

诺如病毒暴发疫情为主, 尤其是 2014 年冬季以来, 诺如病毒引起的暴发疫情大幅增加, 显著高于历年水平^[6]。诺如病毒属杯状病毒科 (Caliciviridae) 诺如病毒属, 无包膜, 单正链 RNA 病毒, 全长约为 7.6 Kb, 可分为 3 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 分别为 ORF-1、ORF-2 及 ORF-3, 编码 8 个病毒蛋白, 其中 VP1 蛋白位于 ORF-2。目前诺如病毒尚不能体外培

基金项目: 中山市社会发展公关计划 (医疗) (2016B1058)

作者简介: 师舞阳 (1981-), 男, 硕士研究生, 主管技师, 主要从事病原微生物研究工作。

养,同时也无法进行血清型鉴定,可靠的分析方法主要基于序列分析。2007 年 Zheng 等^[7]建立了基于 VP1 基因全序列的分类方法可将诺如病毒分为 6 个基因群(genogroup I–VI, GI–GVI),感染人类的主要包括 GI、GII 及 GIV 三个基因群。2014 年冬季以来,我国及广东省诺如病毒暴发疫情大幅增加,中山市诺如病毒疫情报告数也有所增加。因此,本研究拟对 2013—2017 年间,发生于中山市的 20 起诺如病毒暴发疫情的毒株进行 VP1 基因全长测序,系统发育分析及分型,以期获得中山市诺如病毒暴发疫情的分子流行病学特征,同时分析中山市流行株基因变异与诺如病毒暴发疫情之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验样品 本研究所使用实验样品,分别收集中山市 2013—2017 年间,20 起诺如病毒引起的感染性腹泻暴发疫情病例标本,均为肛拭子。选取原则:实验室 Real-time PCR 诊断为阳性且 Ct 值小于 30 的病例标本,每起选取 2~5 份,置于-70 ℃低温保存,共获取 77 份样品。取所选肛拭子标本室温溶解,涡旋振荡混匀,3 000 rpm 离心 5 min,取上清置于 4 ℃待用。

1.2 病毒 RNA 核酸提取 标本 RNA 提取,使用 Maxwell(Promega, USA)自动核酸提取系统进行。取上述样品上清液 200 μl,按照 Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit(Promga,货号:AS1150)提供的说明书提取样品 RNA,置于-20 ℃待用。

1.3 VP1 基因扩增及序列测定 参考 Tu 等^[8]使用的 ORF-2 区引物,上游引物采用 NV2of2b:5'-GGA GGG CGA TCG CAA TC-3',下游引物采用 GV132b:5'-CCR GCR AAG AAA GCT CCA GCC AT-3';上下游引物分别位于参考毒株 Lordsdale (GenBank 登录号:X86557)的 5 050~5 066 bp 及 6 726~6 704 bp处,扩增片段长度为 1 676 bp,包含 VP1 基因全序列。上述引物委托广州艾基生物技术有限公司合成。采用一步法 RT-PCR 的方法对目的片段进行扩增:反应体系按照 One Step RNA PCR Kit(AMV)(Takara, DALIAN,货号:DRR024A)操作说明配比;反应条件为:50 ℃, 30 min;94 ℃, 2 min;94 ℃, 30 sec;55 ℃, 30 sec;72 ℃, 3 min;30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。反应产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳验证有目标条带后,送广州艾基生物技术有限公司进行序列测定。

1.4 序列分析 样品测序列后,去除引物及 VP1 基因外围序列获得样品的 VP1 基因全序列,序列提交至 GenBanK。使用 <http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/>

norovirus/提供的 NoV 分型工具^[9],对获得的病毒序列进行分型,并获得相应型别的代表毒株序列。使用 NCBI 中 BLAST 程序对获得的 NoV VP1 进行比对,获得 GenBank 中相似度较高的毒株序列。应用 MEGA 软件中的 clustalW 子程序对序列进行多序列比对,采用 Neighbor – joining (1 000 Bootstrap replicates, p-distance)构建系统进化树并进行同源性分析。此外,应用 BioEdit 软件分别对每种亚型做了相似性分析。

2 结果

2.1 暴发疫情基本情况 本研究对发生于中山市, 2013—2017 年间,20 起由诺如病毒引起的感染性腹泻暴发疫情进行分析。疫情发生时间主要发生于每年的 9 月到次年的 4 月,其中 9 月份 1 起,10 月 5 起,11 月 2 起,1 月 5 起,2 月 1 起,3 月 3 起,4 月 3 起。疫情发生地点分布于中山市的 13 个镇区,其中东区发生 4 起,坦洲镇 3 起,民众镇及横栏镇各 2 起,其余 9 个镇区均为 1 起。疫情的暴发场地主要为幼儿园、小学、工厂及家庭,其中 12 起为幼儿园及托幼机构,4 起为小学,3 起为工厂,1 起为家庭聚集。其中发生于托幼机构,幼儿园及小学疫情占总数的 80.0%(16/20)。疫情的发病人数≤10 人的有 6 起,占 30.0%(6/20), 11~20 人的 7 起,占 35.0%(7/20),21~30 人的 3 起,占 15.0%(3/20),大于 30 人的为 4 起,占 20.0%(4/20),见表 1。

表 1 2013—2017 年间中山市 20 起诺如病毒引起的感染性腹泻暴发疫情流行病学特征

疫情编号	发生时间(年.月)	发生区域	机构性质	发病人数
01	2013. 04	港口镇	工厂	35
02	2013. 11	小榄镇	小学	47
03	2015. 01	三角镇	幼儿园	18
04	2015. 01	民众镇	工厂	21
05	2015. 03	三乡镇	早教中心	6
06	2015. 10	东区	家庭聚集	10
07	2015. 10	西区	幼儿园	11
08	2016. 01	开发区	幼儿园	16
09	2016. 02	东凤镇	小学	52
10	2016. 03	横栏镇	幼儿园	14
11	2016. 03	东区	幼儿园	4
12	2016. 04	大涌镇	小学	14
13	2016. 04	民众镇	工厂	85
14	2016. 09	东区	幼儿园	6
15	2016. 10	东区	幼儿园	8
16	2016. 10	坦洲镇	幼儿园	19
17	2016. 10	坦洲镇	幼儿园	8
18	2016. 11	沙溪镇	幼儿园	13
19	2017. 01	坦洲镇	小学	27
20	2017. 01	横栏镇	幼儿园	27

2.2 基因测序及序列分析 对 77 份分别来自 20 起诺如病毒疫情的标本测序后,去除 VP1 上下游外围序

列,每个样品均获得完整的 VP1 基因。由于诺如病毒不同型别存在差异,获得的毒株 VP1 序列全长有四种长度,分别为 1 623、1 629、1 644 bp 及 1 647 bp。将获得的 VP1 全长序列分别登录至 GenBank,毒株名及登录号,见表 2。经序列比对分析,来自同一起暴发疫情的序列高度相似。序列通过 <http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/> 比对后,20 起诺如病毒疫情分别由诺如病毒 GII 型的 7 个亚型引起,其中 GII. 3、GII. 17 及 GII. 4 Sydney_2012 分别引起 5 起,GII. 2 引起 3 起,GII. 6 及 GII. 21 分别引起 1 起。

表 2 77 株诺如病毒 VP1 序列信息及登录号

疫情编号	序列长度	型别	测序成功株数	毒株编号及对应 GenBank 登录号
01	1 623 bp	GII. 4 Sydney_2012	5	013E01~013E05;KY407167~ KY407171
02	1 647 bp	GII. 3	4	013F01~013F04;KY407172~ KY407175
03	1 647 bp	GII. 3	5	015C01~ 015C05;KY407176~ KY407180
04	1 623 bp	GII. 17	2	015K01~015K02;KY407181~ KY407182
05	1 623 bp	GII. 17	4	015H01~015H04;KY407183~ KY407186
06	1 623 bp	GII. 4 Sydney_2012	3	015I01~015I03;KY407187~ KY407189
07	1 647 bp	GII. 3	5	015J01~015J05;KY407190~ KY407194
08	1 647 bp	GII. 3	4	016A01~016A04;KY407195~ KY407198
09	1 647 bp	GII. 3	5	016B01~016B05;KX98946~ KX989468
10	1 623 bp	GII. 21	4	016L01~016L04;KY407199~ KY407202
11	1 623 bp	GII. 17	2	016M01~016M02;KY407203~ KY407204
12	1 623 bp	GII. 17	2	016N01~016N02;KY407205~ KY407206
13	1 623 bp	GII. 17	5	016D01~016D05;KX989474~ KX989478
14	1 623 bp	GII. 4 Sydney_2012	5	016C01~016C05;KX989469~ KX989473
15	1 623 bp	GII. 4 Sydney_2012	3	016G01~016G03;KY407207~ KY407209
16	1 623 bp	GII. 4 Sydney_2012	3	016P01~016P03;KY407210~ KY407212
17	1 644 bp	GII. 6	4	016Q01~016Q04;KY407213~ KY407216
18	1 629 bp	GII. 2	5	016R01~016R05;KY407217~ KY407221
19	1 629 bp	GII. 2	4	016S01~016S04;KY457580~ KY457583
20	1 629 bp	GII. 2	3	016T01~016T03;KY457584~ KY457586

对 77 条测定的 VP1 序列与 <http://www.rivm.nl/mpf/typingtool/norovirus/> 提供的模式毒株序列,采用 MEGA 软件中的 Neighbor-joining (1 000 Bootstrap replicates, p-distance) 模型构建系统进化树,结果见图 1。VP1 全序列系统发育结果表明,中山市流行的 GII. 4 Sydney_2012 亚型,可分在两个不同簇中,分别为 Group I (疫情 01,06,14) 和 Group II (疫情 15,16)。发生于 2016 年 10 月的疫情 15 及 16 相关毒株的序列与 GII. P16-GII. 4 Sydney_2012(LC325217. 1) 重组株,相似度高并落到同一簇 Group II 中,该分支内部的相似度 $\geq 98\%$ 。疫情 15 及疫情 16 的毒株序列与 Group I 中的疫情毒株序列的相似度明显较低。15 条 GII. 17 亚型诺如病毒 VP1 序列及 GenBank 中的序列进行系统发育分析与相似性分析,结果表明 15 株不同暴发来

源的毒株均聚在同一簇中,显示了较高的序列相似度,各序列间的相似度均 $\geq 99.5\%$ 。

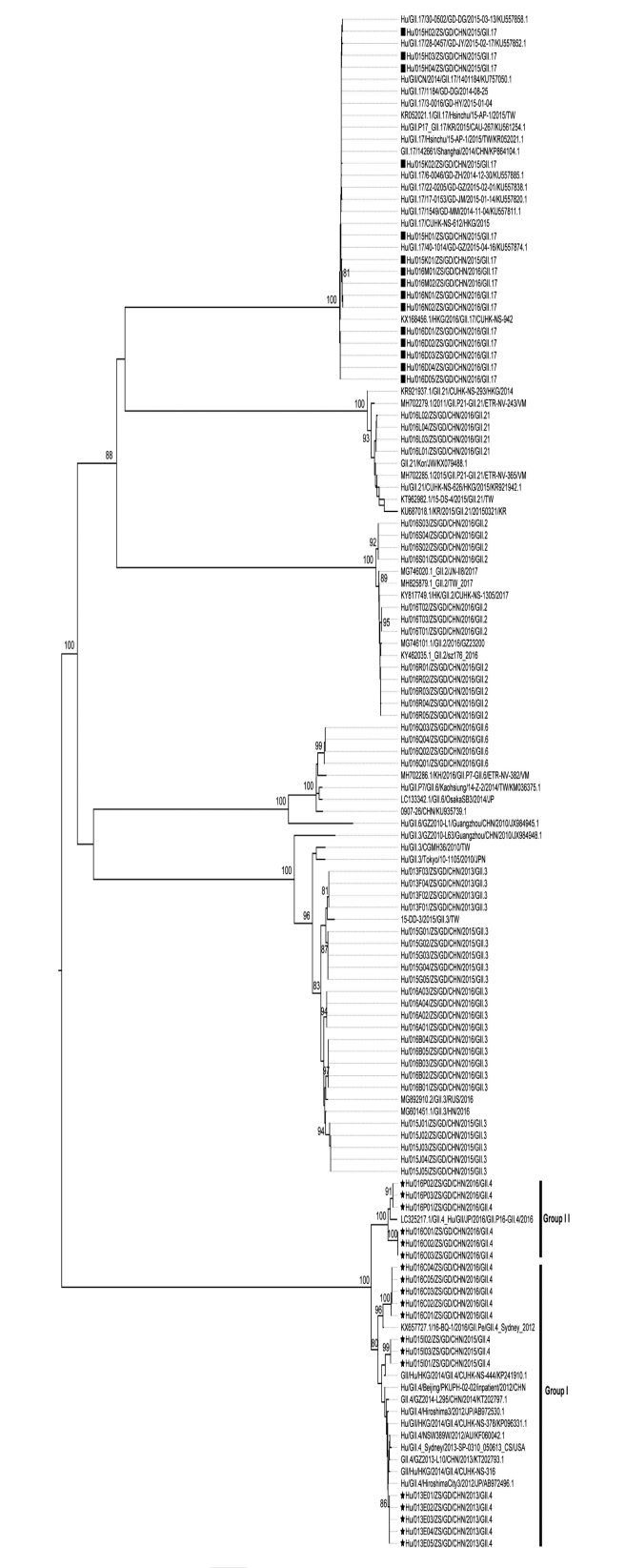


图 1 2013—2017 年间中山市 20 起诺如病毒暴发 VP1 全序列系统发育分析

3 讨论

诺如病毒感染在广东省具有普遍性,流行期较长,呈季节性高发,且聚集性暴发感染对象多为低龄儿童。本研究结果显示冬春季为中山市诺如病毒暴发的高发季节,从 9 月持续至次年的 4 月,感染对象主要为低龄儿童 80.0% (16/20),与我国北京、广东等地区的报道一致^[10-12]。因此,需从每年秋季起加强诺如病毒暴发疫情监测,同时落实防控措施,做到早发现,早隔离,早治疗,避免疫情扩大化。诺如病毒疫情暴发主要发生于小学及托幼机构,可能与低年龄段儿童尚未养成良好卫生及生活习惯,手卫生管理较差造成的暴露机会多及本身免疫力低下等因素有关。因此,应进一步加强针对低龄儿童的诺如病毒感染的防控知识宣教工作,重点宣教手卫生知识,同时加强督导学校开展定期消杀工作。

2014 年前 20 年,全球范围内诺如病毒暴发的毒株多数为 GII.4 型,近年来主要流行亚型为 GII.4 Sydney_2012^[13]。2012 年 10 月上海首次报道国内第一起 GII.4 Sydney_2012 亚型暴发^[14]。2013 年广东省也发现该亚型病毒,该亚型当年在广东地区引起 40% 以上的诺如病毒暴发疫情^[15]。本研究结果表明该型别毒株在中山市最早出现于在 2013 年 4 月,分别于 2013、2015 及 2016 年引起了 5 起 (25.0%) 诺如病毒暴发,成为中山市的主要流行株之一。诺如病毒的基因特征之一就是基因多样性,导致诺如病毒出现基因多样性的机制主要包括点突变和重组,重组位点多发生于 ORF1/ORF2 重叠区。本研究的结果表明疫情 15 及疫情 16 的毒株序列 (Group II) 与疫情 01、06、14 (Group I) 中的疫情毒株序列的相似度明显较低,提示疫情 15 及疫情 16 的毒株明显区别于更早出现的疫情毒株,可能为新形成的毒株。且疫情 15 及疫情 16 的毒株序列 (Group II) 与 GII. P16-GII.4 Sydney_2012 (LC325217.1) 重组株 VP1 基因序列相似度高,提示以上毒株是重组毒株可能性较大。最近的研究^[16-17]认为 GII. P16-GII.4 Sydney_2012 是由 GII.2 型与 GII.4 Sydney_2012 株重组后形成的新的重组株,重组发生在 GII. P16 RdRp 基因。Jing 等^[18]报道该重组毒株在 2016 年 11 月首次在广东省被发现,并迅速成为广东省流行毒株。本研究对毒株的测序工作限于 VP1 基因全序列,未对全基因组进行测序,因此,无法确定疫情 15 及 16 是否为 GII. P16-GII.4 Sydney_2012 重组毒株。接下来的研究可针对疫情 15 及 16 进行全基因组测序,以明确其准确型别。

GI.17 亚型是导致中山市疫情暴发的另一个重

要型别。在我国的 GI.17 亚型诺如病毒,2014 年底首次由广东省报道^[16],其他研究表明该亚型病毒于 2014 冬至 2015 年春在广东省及北京市分别引起了 83.0% (24/29) 及 60.6% (20/33) 的诺如病毒暴发疫情^[19-21]。GI.17 亚型诺如病毒在中山市引起的疫情暴发持续到 2016 年春。根据 Lu 及 Gao 等^[15,21]的研究,广东省流行的 GI.17 亚型诺如病毒与 2011 年前全球其他地区流行的菌株存在明显差异,属于新发现的毒株暴发。本研究中 15 株不同暴发来源的 GI.17 毒株均聚在同一簇中,各序列间的相似度均 $\geq 99.5\%$,进一步分析表明,这 15 株 GI.17 亚型毒株均与 Lu 等^[15]报道的毒株 (KU557885.1,图 1) 具有较高的相似度,同时系统发育表明中山市发现的 GI.17 亚型毒株 VP1 序列与珠三角其他地区 (珠海,广州,东莞) 及香港地区自 2014 年冬开始出现的毒株 VP1 序列高度同源。2014 年冬起,该亚型毒株在广东地区广泛流行,但 2016 年冬起中山市未再监测到,该亚型能否再次在中山市出现并引起持续暴发需要进一步监测。

GI.3 及 GI.2 亚型引起的诺如病毒暴发较为常见。中山市 GI.3 亚型引起的暴发持续时间较长,2013 年冬至 2016 年春均能监测到,共发生了 5 起暴发 (25.0%),是中山市主要流行株之一,超过同时期广东省 GI.3 型暴发的总体水平 6.57%^[11]。自 2016 年 11 月起至 2017 年 1 月,中山市连续发生了 3 起 GI.2 型诺如病毒引起的暴发 (15.0%),代替了先前的 GI.17 和 GI.4 Sydney_2012,成了该时段中山市流行暴发疫情的优势毒株。根据张萌等^[11]的报道,2013—2017 年 GI.2 亚型引起了广东省 37.73% 的诺如病毒暴发疫情,是引起广东省诺如病毒暴发疫情最多的亚型,与中山市结果存在差异。Ao 等^[22]报道了一种以前较少出现的重组诺如病毒 GI. P16/GI.2,并成为我国 2016 年底诺如病毒暴发疫情的主要病原体,中山市 2016 年底至 2017 年初流行的 GI.2 亚型是否为重组株,需进一步进行全序列测定。另外,GI.3 及 GI.2 亚型引起的暴发在中山市与广东省总体水平存在差异,值得关注,需进一步加强监测。

综上所述,诺如病毒是引起中山市感染性腹泻疾病暴发的重要病原,暴发时感染对象多为托幼机构、幼儿园及小学阶段的低龄儿童,因此,需加强对以上高风险机构加强监测。感染高峰多为 10 月至次年 2 月,呈明显季节性,诺如病毒变异较强,每年引起中山市诺如病毒暴发疫情的优势毒株均不相同,需针对诺如病毒进一步完善监测方案。GI.17 型诺如病毒为中山市发现的最新流行株,接下来其是否成为 (下转第 1482 页)