

北京市丰台区首起 GII.8 诺如病毒暴发疫情的实验室鉴定及基因特征分析

余红, 秦萌, 尉秀霞, 陆翌禹, 杨军勇, 武庆锐, 董晓根, 李洁

(北京市丰台区疾病预防控制中心, 北京 100071)

摘要: 目的 对北京市丰台区某小学5月~6月间首起GII.8诺如病毒感染性肠胃炎暴发疫情进行病原体鉴定及基因分型。**方法** 采用实时荧光定量PCR法对12份病例标本进行诺如病毒核酸检测, 阳性标本经RT-PCR扩增RNA多聚酶区部分序列, 使用BioEdit及Mega5.2.2软件对扩增序列进行同源性及进化分析。**结果** 20件疫情标本检出12件诺如病毒核酸阳性, 阳性率60.00%, 序列分析表明为GII.8型。**结论** 此次诺如病毒感染性腹泻暴发疫情可能是由于学生间接接触传播是导致此次疾病传播的主要原因, 是丰台区首次发现由GII.8型诺如病毒引起的急性胃肠炎暴发疫情, 需要加强监测。

关键词: 诺如病毒; 荧光定量PCR; 进化分析; 基因分型

Etiological analysis and genotyping detected in the first outbreak of GII.8 norovirus of gastroenteritis in Beijing Fengtai. YU Hong,

QIN Meng, Wei Xiu-xia, LU Yi-yu, YANG Jun-yong, WU Qing-rui, DONG Xiao-gen, LI Jie.
Fengtai District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071, China .

Corresponding author: LI Jie, Email: lijie7111@sina.com

Abstract: Objectives To identify the first gastroenteritis outbreak of GII.8 norovirus during May to June in Fengtai of Beijing and further analyze the genotypes of the pathogens. **Methods** 20 samples were collected to detected NVs by real-time fluorescent quantitative PCR. The positive samples were amplified by one-step RT-PCR, then the amplification products were sequenced for nucleotide sequence alignments and phylogenetic analysis with BioEdit and MEGA 5.2.2 software. **Results** 12 samples were identified GII NVs positive with a 60.00% positive rate. The alignment and phylogenetic analysis revealed that the outbreak of gastroenteritis were caused by GII.8 NVs. **Conclusions** The outbreak of norovirus induced infectious diarrhea was probably due to the consumption of close contact between students. It is the first time found that the outbreak of gastroenteritis were caused by GII.8 NVs in Fengtai, and need to strengthen the monitoring of NVs .

作者单位: 北京市丰台区疾病预防控制中心, 北京 100071

作者简介: 余红, 女, 河北任丘人, 主管检验师, 研究生, 从事微生物检验工作

通讯作者: 李洁, Email: lijie7111@sina.com

Key words: Norovirus; real-time fluorescent quantitative PCR; Phylogenetic analysis;

Genotyping

诺如病毒(Norovirus, NVs), 属于人类杯状病毒科(*Human Calicivirus*)诺如病毒(*Norovirus*)属。NVs是引起人类急性非细菌性胃肠炎的重要病原体之一, 该病毒具有传染性强、发病率高、致病剂量低和抵抗力强等特点, 常引起恶心、呕吐、发热、腹痛、腹泻等症状, 潜伏期最短12h, 平均24~48h, 传染源可以是病人、健康带毒者和隐形感染者, 可以通过食物、水、生活接触或吸入悬浮在空气中的气溶胶传播, 传播速度极快, 极易在短时间内造成大规模爆发流行^[1]。NVs是一种未被包裹的单股正链RNA病毒, 病毒基因组包括3个开放读码框(Open Reading Frame, ORF)。ORF1含有保守的RNA依赖的RNA聚合酶基因(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)区, ORF2编码大衣壳蛋白(Capsid), 包括N区、P区和S区, ORF3编码小衣壳蛋白^[2]。诺如病毒根据其衣壳基因序列可分为5个基因组, 其中感染人的是GI、GII、GIV组; 依据病毒部分衣壳及RdRP序列的不同, GI又可分为14个基型, GII可分为17个基因型^[3]。

2014年5月28日上午, 丰台区食品药品监督管理局的电话通知丰台区疾病预防控制中心, 称丰台区某小学有多名学生出现呕吐、腹泻等症状, 就诊于某三甲医院, 至6月13日, 累计出现80名病例。分布在六个年级的22个班级。根据疾控中心流行病学调查情况、患病学生临床表现和实验室检测结果核实确定该事件是由诺如病毒引起的暴发疫情。本文对这起诺如病毒感染性肠胃炎暴发疫情进行病原体鉴定及基因分型, 以了解辖区内诺如病毒流行特征及病原学特点, 为今后的防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集

采集现证患者的便标本装入无菌盒内, 4℃保存, 于4小时内运送至区疾病预防控制中心 (Center for Disease Control and Prevention, CDC), -20℃保存待检。

1.2 核酸提取

将采集的便标本制备成10%的悬液, 以8000 rpm离心5min, 取上清液200μl, 使用QIAamp Viral RNA Mini Kit试剂盒进行病毒RNA提取, 提取步骤按试剂盒说明书进行, 洗脱体积60μl, 作为实时荧光定量PCR检测及RT-PCR扩增模板。

1.3 实时荧光定量PCR检测

使用江苏硕世生物科技有限公司的诺如病毒GI/GII荧光PCR检测试剂盒, 取提取的病毒RNA5μl作为模板, 总体积为25μl, 反应条件: 50℃ 30min 逆转录; 95℃ 5min 预变性; 95℃ 10s, 55℃ 40s, 45个循环。反应在ABI 7500 Fast上进行。

1.4 核酸扩增和序列测定

引物序列和扩增条件参见参考文献^[4]，RdRp区部分序列扩增使用引物对P289/ P290，上游引物：P289 5'-TGACGATTTTCATCATCMCCRTA-3'，下游引物：P290 5'-GATTACTCCAGGTGGGAYTCMAC-3'。试剂采用QIAGEN one step RT-PCR kit，反应体系50μl，其中5×buffer为5μl，dNTPs（10 mmol/l）2μl，Enzyme Mix 2μl，RNase inhibitor(40U/μl) 0.25μl，上、下游引物各2μl，反应模板5μl，用DEPC处理水补充至50μl。反应条件为42℃ 1h 逆转录；94℃ 15min 预变性；94℃ 1min，58℃ 1min20s，72℃ 1min 40个循环；72℃ 7min 延长。取8μl扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察和照相，诺如病毒条带大小为319bp。阳性扩增产物外送测序。

1.5 序列进化分析

使用BioEdit软件进行核酸序列编辑、同源性分析；使用分子进化遗传分析（Molecular Evolution Genetics Analysis, MEGA）软件（版本号5.2.2）按照NJ算法构建系统发生树。从基因数据库（GenBank）下载诺如病毒各基因亚型参考株核苷酸序列。

2 结果

2.1 疫情概况

此次疫情首发病例发病时间为2014年5月27日16时~28日8时，末例病例发病时间为6月10日，病例的发病时间主要集中在5月27日和28日两天，两天的病例数占总病例数的52.5%（42/80），共发生80例病例，男女比例为1.58:1，罹患率为6.76%（80/1184），无重症和死亡病例。疫情聚集性明显，多发生在同一班级内或相邻班级内。此次暴发疫情传播模式应为疫情初期同源暴露至后期的人与人之间接触传播模式。

发病学生表现为急性发病，47名就诊者中主要症状为呕吐34例（72.3%），腹痛32例（68.1%），发热24例（51.1%）。一般持续2~3d，个别持续5d以上。除少数患者病情较重需要口服抗生素外，多数患者病情较轻，呈自限性，不需要抗菌素治疗，预后良好。

2.2 荧光PCR检测结果

采集患病学生便标本共计20件，经荧光PCR检测12件为诺如病毒II型（GII）阳性，阳性检出率为60.00%。将GII阳性的这12件标本，使用引物对P289/P290扩增部分RdRp区，均在319bp处出现特异性条带。

2.3 核苷酸同源性分析

测序结果经过剪辑，通过BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）在GenBank上寻找核苷酸同源序列及同源性比较，在RdRp区，此次暴发疫情分离得到的12株的GII毒株之

间同源性高，为98.9%-100%。经BLAST发现，与GII.8型参考株Saitama U25株(GenBank登录号：AB039780)同源性为94%-96%，与我国昆明2004年公布的CHN40182株(GenBank登录号：EU072202)核苷酸同源性为91%-97%。

2.4 系统进化分析

为明确基因分型，此次暴发疫情分离得到的12株的GII.8毒株（X31/Beijing/2014~X42/Beijing/2014）在RdRp区，与GenBank中下载的参考株构建系统发生树，结果见图1。

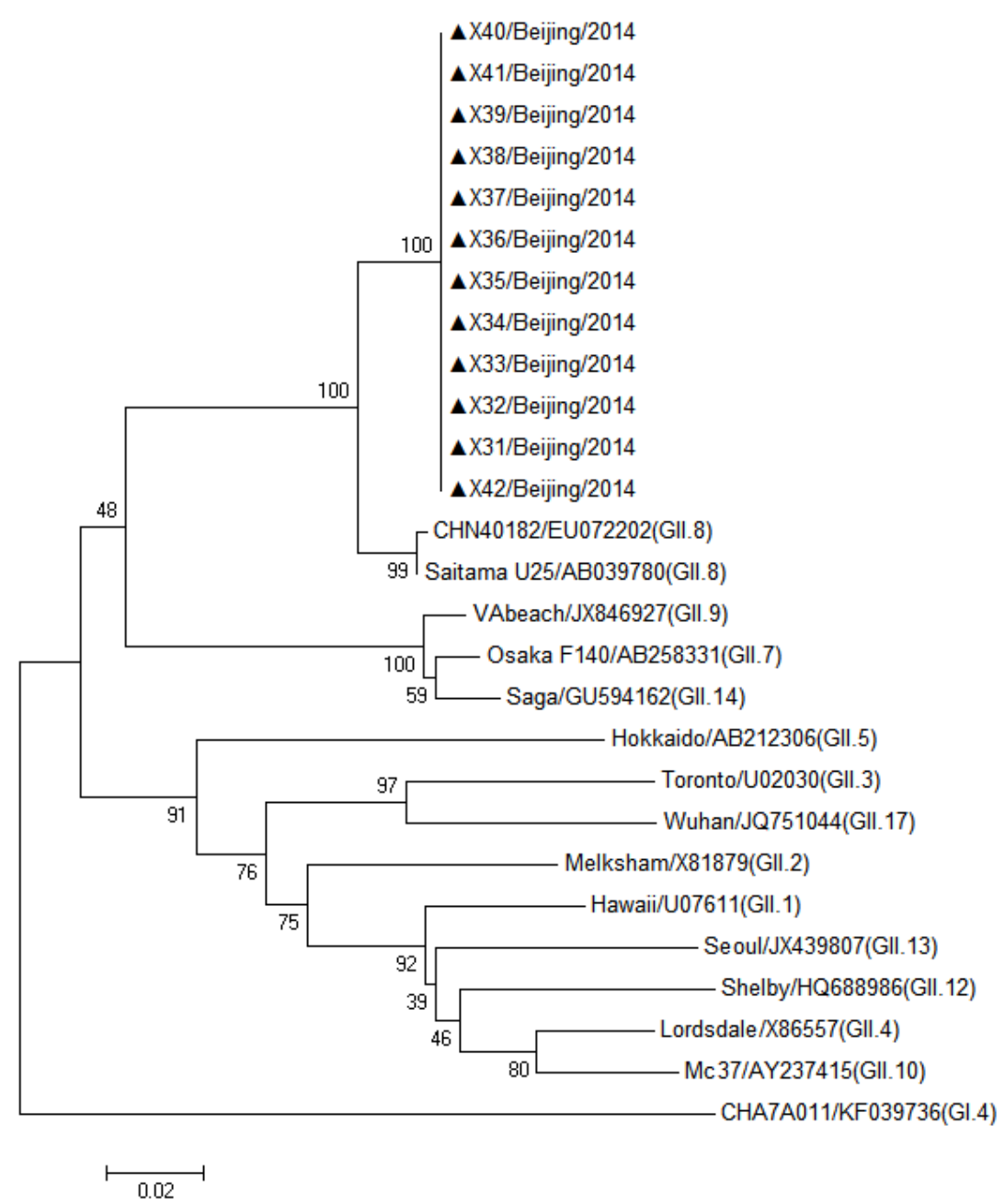


图1 12株诺如病毒暴发株RdRp区（nt4865-4590）核苷酸序列系统发生树
注：▲表示本次分离到的诺如病毒暴发株，参考株表示方法：分离株名称/Genbank ID(基因型别)

由图 1 可见, 3 条代表株的核苷酸序列分属于 1 个进化簇内, 与 GII.8 型参考株 Saitama U25 株、昆明 2004 年公布的 CHN40182 株进化距离较近, 位于同一进化分支。

3 讨论

近些年, 全球的诺如病毒感染发病数不断上升, 在全球连续引起暴发或流行。随着我国诺如病毒检测技术的发展, 尤其是江苏、浙江、北京等地诺如病毒感染所致急性胃肠炎暴发或流行的报告也在增多^[5-9], 特别是青少年或老年人群比较集中的学校或托老机构, 诺如病毒感染已成为危害严重的公共卫生问题之一。

根据疫情的流行病学特征和实验室检测结果, 确认该起疫情为诺如病毒引起的感染性腹泻暴发疫情。部分学生在校出现呕吐、腹泻症状, 排泄物不能及时按正确方法清理和消毒; 同时由于在卫生间内未配备肥皂或洗手液等设施, 学生不能及时做好手部卫生, 上述情况都可能造成学生间的交叉感染。此次疫情综合调查、标本采集及检测情况, 分析学生间接接触传播是导致此次疾病传播的主要原因。

诺如病毒引起的急性胃肠炎散发病例和暴发事件在世界各国屡见不鲜, 研究表明, 我国诺如病毒感染十分普遍, 其流行株为 GII.4 型^[10], 也是暴发疫情的常见型别, 而由 GII.8 引起的暴发疫情国内鲜有报道。本次暴发疫情的基因是 GII.8 型, 这是丰台区首次发现由 GII.8 型诺如病毒引起的急性胃肠炎暴发疫情。根据文献报道, 方肇寅等^[11]报道过北京地区在散发病例中检出一例 GII.8 型诺如病毒。北京地区至今还未见关于 GII.8 型诺如病毒暴发疫情的报道。这提示我们诺如病毒在北京地区存在新的基因型别的流行, 需要加强监测, 弄清来源, 关注其发展。另外, 新的基因型别的存在, 为诺如病毒基因组的重组提供了条件, 今后的监测还应加强对重组株的甄别。

参考文献

- [1] Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, *et al.* Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000[J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(1): 95-102.
- [2] Patel MM, Hall AJ, Vinje J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review[J]. *J Clin Virol*, 2009, 44(1): 1-8.
- [3] Zheng DP, Ando T, Fankhauser L, *et al.* Norovirus classification and proposed strain Nomenclature [J]. *Virology*, 2006, 346(2): 312-323.
- [4] Jiang X, Huang P W, Zhong W M, *et al.* Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR[J]. *J Virol Methods*, 1999, 83(1-2): 145-154.
- [5] 韦志光, 江世平, 张屹. 2007 年某高校诺如病毒引起感染性腹泻暴发疫情分析[J]. *现代预防医学*, 2007, 13(4): 213-215.
- [6] 严寒秋, 窦相峰, 高志勇. 某老年公寓诺如病毒胃肠炎暴发疫情调查[J]. *现代预防医学*, 2009, 36(24):

4670-4671.

[7] 姜世强, 戴传文, 许艳子, 等. 一起高校诺如病毒感染性腹泻暴发疫情调查[J]. 现代预防医学杂志, 2010, 37(12): 2339-2341.

[8] 孙灵英, 张立军, 刘军涛. 一起诺如病毒胃肠炎爆发疫情的调查[J]. 浙江预防医学, 2010, 22(11): 39-40.

[9] 闻栋, 顾朝阳, 祖荣强. 一起诺如病毒致胃肠炎暴发疫情调查[J]. 江苏预防医学, 2012, 23(5): 4-7.

[10] 吴疆, 高志勇, 刘桂荣, 等. 北京地区诺如病毒感染的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(7): 667-670.

[11] 方肇寅, 谢华萍, 吕红霞, 等. 1999-2005 年我国婴幼儿人杯状病毒腹泻研究[J]. 病毒学报, 2007, 23 (1): 9-151.