

# 四川省广元市胃肠炎暴发中诺如病毒的分子病原学特征研究

侯雪芹<sup>1</sup> 任敏<sup>2</sup> 熊丽<sup>1</sup> 朱俊<sup>1</sup> 曹冉冉<sup>2</sup> 马小珍<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 广元市疾病预防控制中心 628000; <sup>2</sup> 四川省疾病预防控制中心, 成都 610041

通信作者: 马小珍, Email: lizzy117127@163.com, 电话: 028-85583341

**【摘要】 目的** 了解四川省广元市急性胃肠炎(acute gastroenteritis, AGE)暴发疫情中诺如病毒(Norovirus, NoV)感染情况,明确病原基因型别,并对其基因特征进行初步研究。**方法** 采集广元市2017年2月至5月4起AGE疫情病例的粪便标本18份,肛拭子标本15份,采用实时荧光RT-PCR检测NoV基因, NoV阳性标本用传统RT-PCR扩增并进一步测序分型。**结果** NoV实时荧光RT-PCR结果显示4起疫情均为NoV感染引起的暴发,检测阳性率为60.6%(20/31)。基因序列比对和进化分析结果显示,4起疫情的病原均为G II.P16/G II.2型NoV,且核苷酸高度同源,其中1起除G II.P16/G II.2型外还检出G II.P7/G II.14型NoV。**结论** 四川省广元市4起AGE暴发疫情主要由G II.P16/G II.2型NoV引起,同时存在G II.P7/G II.14型NoV混合感染。

**【关键词】** 诺如病毒;胃肠炎;暴发;系统进化分析

**基金项目:** 国家科技重大专项(2012ZX10004212-006)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.009

## Molecular etiological characteristics of the gastroenteritis outbreak associated with norovirus infection in Guangyuan city, Sichuan province

Hou Xueqin<sup>1</sup>, Ren Min<sup>2</sup>, Xiong Li<sup>1</sup>, Zhu Jun<sup>2</sup>, Cao Ranran<sup>1</sup>, Ma Xiaozhen<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Guangyuan Center for Disease Control and Prevention, Guangyuan 628000, China; <sup>2</sup> Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Ma Xiaozhen, Email: lizzy117127@163.com, Tel: 0086-28-85583341

**【Abstract】 Objective** To investigate the genotype and genetic characteristics of the pathogens associated with the epidemic outbreak of acute gastroenteritis(AGE) in Guangyuan city, Sichuan province. **Methods** Eighteen stool samples and 15 anal swab samples from 4 AGE outbreaks were collected from Feb 2017 to May 2017. Norovirus (NoV) nucleic acid was detected by Real-time PCR method, and the positive samples were amplified by conventional reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and nucleotide sequencing. **Results** Four AGE outbreaks were all caused by NoV. And 20 (60.6%) samples were positive for NoV G II. Gene sequence comparison and phylogenetic analysis showed that 4 AGE outbreaks were all caused by G II.P16/G II.2 NoV. All the strains of G II.P16/G II.2 NoV shared high homology in nucleotides. One of the outbreaks was caused by G II.P16/G II.2 and G II.P7/G II.14 NoV co-infection. **Conclusions** The 4 outbreaks of AGE in Guangyuan city, Sichuan province were major caused by G II.P16/G II.2 NoV, meanwhile G II.P16/G II.2 and G II.P7/G II.14 NoV co-infection existed.

**【Key words】** Norovirus; Gastroenteritis; Outbreak; Phylogenetic analysis

**Fund programs:** National Science and Technology Major Project of China(2012ZX10004212-006)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.009

诺如病毒(Norovirus, NoV)属于杯状病毒科,是全球范围内引起急性胃肠炎(acute gastroenteritis, AGE)暴发流行的一种重要病原体,据报道,国外的AGE暴发中大约有60%~85%与NoV有关<sup>[1-2]</sup>,甚至在局部地区约90%的非细菌性腹泻由该类病毒

引起<sup>[3]</sup>。NoV传播途径广且感染剂量低,常导致幼儿园、学校、养老机构、医院等人群密集且空间相对封闭的单位发生暴发<sup>[4]</sup>。NoV分为G I~G VII 7个遗传组(genogroup, G),其中G I、G II和G IV可感染人并致病,其中以G II最为常见<sup>[5]</sup>。G II在聚合

酶区分 27 个基因型,在衣壳区分 22 个基因型<sup>[6]</sup>,在众多的基因型中,G II.4 是迄今为止报道的在世界范围内流行最为广泛的基因型<sup>[7]</sup>,G II.17 在 2014—2015 年亚洲地区暴发流行中超越 G II.4 成为优势株<sup>[8]</sup>,而从 2016 年起在全球范围内 G II.P16/G II.2 重组株导致的 NoV 暴发显著增加<sup>[9-10]</sup>。为了解引起近期四川省广元市 AGE 暴发的病原体情况,本研究采集了 2017 年 2 月至 2017 年 5 月 4 起 AGE 暴发疫情标本进行 NoV 检测,并对阳性标本进行了分子特征研究。

## 1 材料与方法

**1.1 疫情概况** 2017 年 2 月至 2017 年 5 月四川省广元市发生 4 起 AGE 疫情,分别发生在 1 所中学、1 所小学、1 所幼儿园及 1 个包含高校和职高等的教育园区。发生在中学、小学和幼儿园的疫情时间相近,于 2 月 27 日出现首发病例,最后 1 例病例出现在 3 月 3 日,共 15 例。教育园区的疫情发生在 5 月,于 5 月 11 日出现首发病例,最后 1 例病例出现在 5 月 17 日,有 18 例。33 例病例中 21 例有腹泻、19 例有恶心、18 例有腹痛、14 例有呕吐、5 例有乏力、3 例有头痛、2 例有发热的临床症状。通过流行病学调查,排除了食品污染和水污染的可能性,也未检出致病菌。

**1.2 标本来源** 采集 2017 年 2 月至 2017 年 5 月四川省广元市 4 起 AGE 病例标本 33 份,其中大便标本 18 份,肛拭子标本 15 份。所有标本冷藏运送至广元市疾病预防控制中心微生物实验室,−20 ℃ 冷藏保存。

**1.3 标本处理** 粪便标本取 100 μl 液体或豌豆大小固体,放入 1.5 ml Eppendorf 离心管内,加入 0.9 ml 标本稀释液,置于漩涡振荡器上混匀,室温静置 10 min,5 000 × g 离心 5 min,吸取上清液备用。肛拭子置商品化病毒采样管内经充分漩涡、振荡混匀,室温静置 10 min,备用。

**1.4 RNA 提取** 采用 Promega Maxwell 16 核酸自动提取仪进行病毒 RNA 提取。按照说明书从 200 μl 的上清液中提取 50 μl 的病毒 RNA,−70 ℃ 冷藏保存。

**1.5 实时荧光 RT-PCR 检测、RT-PCR 扩增和序列测定** 采用 NoV 核酸测定试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司),在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行检测,反应体系和条件参照试剂盒说明书,模

板量为 5 μl RNA。RT-PCR 扩增采用 One-Step RT-PCR kit(德国 Qiagen 公司)进行 PCR 反应,使用引物参照文献[11]。PCR 反应产物在 Qiagen 公司的 QIAxcel 自动核酸电泳仪上鉴定后用 Wizard SV Gel and PCR Cleanup System(美国 Promega 公司)按厂家说明书进行纯化。纯化 PCR 产物用相同引物分别进行双向标记,标记试剂为 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems),反应条件为:变性 96 ℃ 10 s,退火 50 ℃ 5 s,延伸 60 ℃ 4 min,共 25 次循环。标记产物用 BigDye X Terminator Purification Kit(Applied Biosystems)再次纯化后,在 3500 XL Genetic Analyzer(Applied Biosystems)上完成测序。

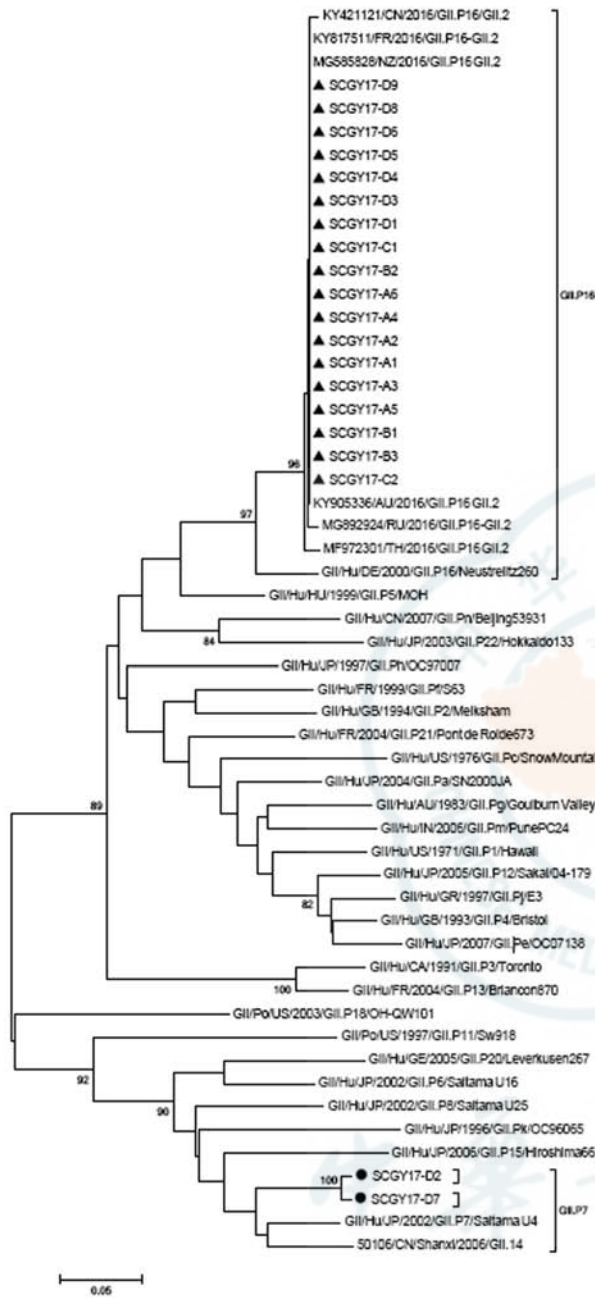
**1.6 序列分析和分子遗传进化分析** 序列用 Sequencher5.0 和 Bioedit7.0.9.0 软件编辑处理,使用 NCBI 中 BLAST 程序比对,分别对聚合酶区和衣壳蛋白区核苷酸及氨基酸进行同源性分析,采用 Mega6.0 软件进行遗传进化分析(Kimura 2 参数模型,邻位-连接法,1 000 次 bootstrap 检验)。

## 2 结果

**2.1 实时荧光 RT-PCR 检测结果** 采用实时荧光 RT-PCR 检测 33 份病例标本,其中 20 份 NoV II 型阳性,阳性率为 60.6%。

**2.2 RT-PCR 扩增和序列测定** 按照暴发时间将 4 起 AGE 疫情中的 20 份阳性标本编号,字母 A~D 分别代表 1 起暴发疫情,数字代表排列序号。用传统 RT-PCR 扩增聚合酶区(polymerase)和衣壳蛋白区(capsid),自动核酸电泳仪上观察到目的条带与预计扩增片段相符。经双向序列测定,全部测序成功,20 条序列已上传到 GenBank,登录号为 LC385985~LC386004。

**2.3 进化树分析** 将 20 条序列与 GenBank 中检索到的 G II 型聚合酶区参考序列和衣壳蛋白区参考序列分别构建亲缘进化树,以此明确本次 NoV 疫情暴发流行株同国内外参考株的亲缘关系,见图 1 和图 2。聚合酶区进化树分析表明,18 条序列与 NoV G II.P16 参考代表株(Neustrelitz 260)聚在同一分支上,属于 G II.P16 型;另 2 条序列与 NoV G II.P7 聚在同一分支,属于 G II.P7 型。衣壳蛋白区进化树分析表明,18 条序列与 NoV G II.2 型参考代表株(Melksham)同属一个独立的进化分支,均属于 NoV G II.2 型;2 条序列与 NoV G II.14 型参考代表株



▲为广元市诺如病毒 GII.P16 型株;●为广元市诺如病毒 GII.P7 型株

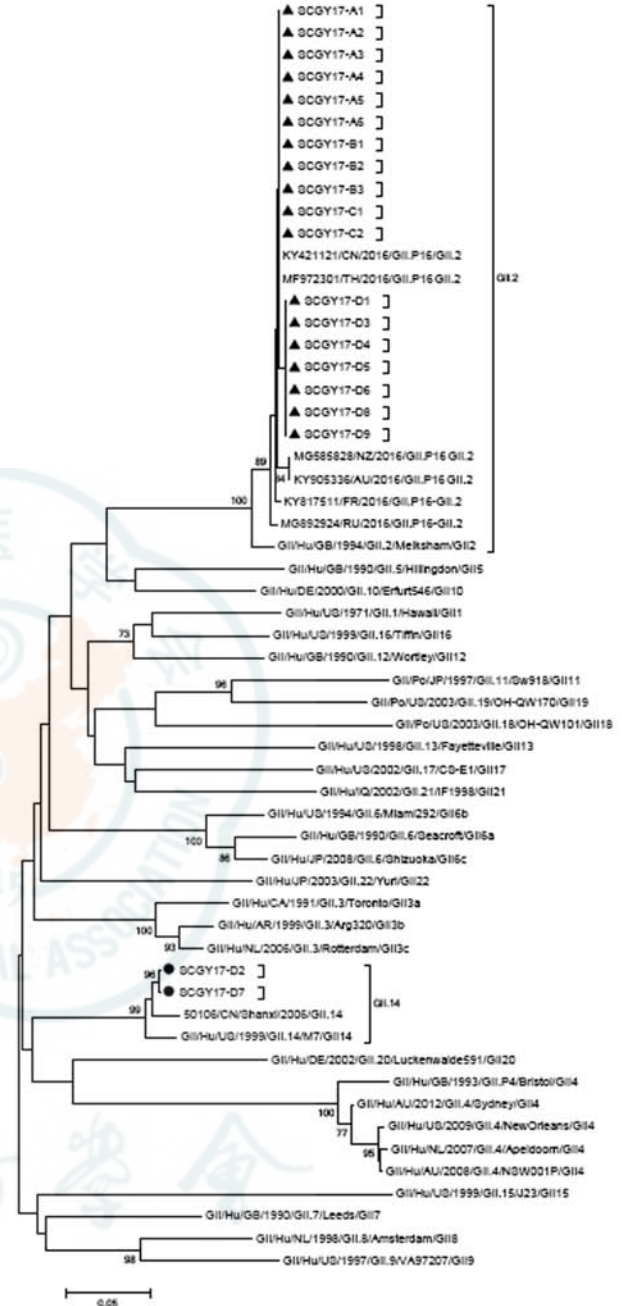
图 1 四川省广元市诺如病毒 GII 型株聚合酶区部分基因序列进化树

▲ represents GII.P16 Norovirus strains in Guangyuan city;  
● represents GII.P7 Norovirus strains in Guangyuan city

Fig.1 Phylogenetic analysis of partial polymerase gene sequence from genotype GII norovirus strains in Guangyuan city, Sichuan province

(M7)聚在同一分支,属于 NoV GII.14 型。

2.4 同源性分析 对本研究中成功测序的 20 株 NoV 聚合酶区之间的核苷酸同源性分析结果显示,



▲为广元市 NoV GII.2 型株;●为广元市 NoV GII.14 型株

图 2 四川省广元市诺如病毒 GII 型株衣壳蛋白区部分基因序列进化树

▲ represents GII.2 Norovirus strains in Guangyuan city;  
● represents GII.14 Norovirus strains in Guangyuan city

Fig.2 Phylogenetic analysis of partial capsid gene sequence from genotype GII norovirus strains in Guangyuan city, Sichuan province

在 18 株 NoVGII.P16 型中有来自 3 起暴发的 11 株序列核苷酸同源性为 100%,另 1 起暴发的 7 株序列核苷酸同源性为 100%,他们之间的核苷酸同源性为 99.6%;与我国 2016 年 GII.P16/GII.2 株



(KY421121) 相比,核苷酸同源率为 99.2%~99.6%,与国外其他 GII.P16/GII.2 株相比,核苷酸同源率为 98.8%~100%,与 GII.P16 型参考株 (Neustrelitz260) 核苷酸同源率为 95%~95.4%。2 株 NoV GII.P7 型间的核苷酸同源率为 98.8%,与 GII.P7 参考株 (Saitama\_U4) 同源率为 92%~92.4%,与我国 2006 年山西株同源率为 91.6%~92%。在氨基酸同源率方面,18 株 GII.P16 型之间的同源率为 98.7%,与我国 KY421121 株同源率为 98.7%~100%,与国外其他株相比,同源率为 96.2%~100%,与参考株 (Neustrelitz260) 同源率为 85.3%~86.5%。2 株 NoV GII.P7 型间的同源率为 96.3%,与参考株 (Saitama\_U4) 同源率为 75.9%~77.1%,与我国 2006 年山西株同源率为 74.6%~75.9%。

20 株 NoV 衣壳蛋白区之间的核苷酸同源率分析结果显示,18 株 GII.2 型序列中有 11 株序列衣壳蛋白区之间的核苷酸同源率为 100%,另 7 株序列衣壳蛋白区之间的核苷酸同源率也为 100%,而他们之间的同源率为 99.6%;与我国 2016 年 GII.P16/GII.2 株 (KY421121) 相比,核苷酸同源率为 99.6%~100%,与国外其他 GII.P16/GII.2 株相比,核苷酸同源率为 88.2%~99.6%,与 GII.2 型参考代表株 (Melksham) 相比,核苷酸同源率为 96.7%~97.1%。2 株 GII.14 型间衣壳蛋白区核苷酸序列同源率为 100%,与我国 2006 年山西株同源率为 97.1%,与 GII.14 型参考代表株 (M7) 相比,核苷酸同源率为 95.3%。而衣壳蛋白区氨基酸同源率分析结果显示,18 株 GII.P16 型之间及与我国 KY421121 株和参考株 (Melksham) 之间同源率为 100%,与国外其他株相比,同源率为 89.2%~100%。2 株 GII.14 型与参考株 (M7) 之间氨基酸同源率为 100%,与我国 2006 年山西株同源率为 97.8%。

### 3 讨论

根据目前文献报道,全球范围内检出最多的是 NoV GII.4 型<sup>[7]</sup>, GII.17 在 2014—2015 年超越 GII.4 成为优势株<sup>[8]</sup>,而从 2016 年起 GII.P16/GII.2 重组株导致的 NoV 暴发在我国、日本及欧洲地区显著增加<sup>[9-10]</sup>。日本早在 2008 年就首次报道大阪地区发现 GII.P16/GII.2 重组株<sup>[12]</sup>,但在此后 GII.P16/GII.2 重组株一直处于低检出水平。在我国,引起 AGE 散发病例和暴发疫情的主要是 NoV GII.3、GII.4、GII.4/2006b、GII.4/Sydney、GII.4/

Sydney-2012、GII.6 和 GII.17 型或其变异株<sup>[13]</sup>, GII.14 型仅在 2006 年于山西省检出 1 例<sup>[14]</sup>, GII.2 自 2016 年夏末起传播迅速<sup>[9]</sup>,广东、福建、江苏、北京等地均有报道。根据四川省 2013—2016 年对 5 岁以下婴幼儿病毒性腹泻的监测数据,在 1 174 例婴幼儿腹泻标本中检出 NoV GII 型 98 例,以 GII.3 和 GII.4/Sydney-2012 比较多, GII.2 型仅检出 4 例, GII.14 型未检出,但 2016 年底乐山市暴发的急性胃肠炎由 GII.2 基因型引起<sup>[15]</sup>。本研究通过对四川省广元市 2017 年 2~5 月份 4 起 AGE 暴发疫情阳性样本序列测定,确定了 4 起暴发疫情中有 3 起为 NoV GII.P16/GII.2 基因型引起,还有 1 起暴发疫情为 NoV GII.P16/GII.2 型和 GII.P7/GII.14 型混合感染引起。这与我国及全球流行形势基本一致。

NoV 聚合酶区和衣壳蛋白区基因进化树和同源率分析结果显示,本研究中 A、B、C、D 4 起暴发中的 GII.P16/GII.2 型核苷酸同源率和氨基酸同源率均很高,其中 A、B、C 这 3 起暴发的 GII.P16/GII.2 型核苷酸同源率为 100%,与 D 起暴发的 GII.P16/GII.2 型核苷酸同源率为 99.6%。由于 A、B、C 这 3 起暴发时间相近,引起暴发的应为同一毒株。而两月后在同一区域暴发的 D 则发生了核苷酸点突变,说明 GII.P16/GII.2 型毒株可能变异较快,并且有可能一直在该区域以散发形式流行。

由于 NoV 存在抗原和遗传多样性,不同型别 NoV 可能发生重组。本研究同时进行了 NoV 聚合酶区和衣壳区序列的测定,为今后我市急性 AGE 暴发处置和 NoV 监测提供了参考,对 AGE 疾病的预防控制具有重要意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 侯雪芹、马小珍:实验操作、论文撰写、论文修改;任敏、熊丽、朱俊、曹冉冉:实验操作、数据整理、统计学分析

### 参考文献

- [1] Fankhauser R, Monroe S, Noel J, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States[J]. J Infect Dis, 2002, 186(1): 1-7. DOI: 10.1086/341085.
- [2] Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, et al. Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: Pediatric cases and outbreak incidents [J]. J Infect Dis, 2000, 181 Suppl 2: S270-S274. DOI: 10.1086/315593.
- [3] Glass R, Parashar U, Estes M. Current concepts-norovirus

- gastroenteritis [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(18): 1776-1785. DOI: 10.1056/NEJMra0804575.
- [ 4 ] Glass R, Noel J, Ando T, et al. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans; a reassessment using new diagnostics [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181 Suppl 2: S254-61. DOI: 10.1086/315588.
- [ 5 ] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, et al. Genotypic and epidemiologic trends of Norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013 [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(1): 147-155. DOI: 10.1128/JCM.02680-13.
- [ 6 ] Kroneman A, Vega E, Vennema H, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(10): 2059-2068. DOI: 10.1007/s00705-013-1708-5.
- [ 7 ] Hoa Tran T, Trainor E, Nakagomi T, et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants [J]. *J Clin Virol*, 2013, 56(3): 185-193. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.11.011.
- [ 8 ] 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]. *Eur Surveill*, 2015, 20(24): 21157.
- [ 9 ] Lu J, Fang L, Sun L, et al. Association of GII.P16-GII.2 recombinant norovirus strain with increased norovirus outbreaks, Guangdong, China, 2016 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(7): 1188-1190. DOI: 10.3201/eid2307.170333.
- [ 10 ] Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, et al. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016 [J]. *Eur Surveill*, 2017, 22(4): 30447. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30447.
- [ 11 ] Cannon J, Barclay L, Collins N, et al. Genetic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States from 2013 to 2016 demonstrated emergence of novel GII.4 recombinant viruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55(7): 2208-2221. DOI: 10.1128/JCM.00455-17.
- [ 12 ] Iritani N, Kaida A, Abe N, et al. Increase of GII.2 norovirus infections during the 2009-2010 season in Osaka City, Japan [J]. *J Med Virol*, 2012, 84(3): 517-525. DOI: 10.1002/jmv.23211.
- [ 13 ] 靳森, 孙军玲, 常昭瑞, 等. 中国 2006—2007 年诺如病毒胃肠炎暴发及其病原学特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(5): 549-552. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.017.
- [ 14 ] Jin M, Xie H, Duan Z, et al. Emergence of the GII4/2006b Variant and Recombinant Noroviruses in China [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(11): 1997-2004. DOI: 10.1002/jmv.21308.
- [ 15 ] 马小珍, 陈霞, 曹冉冉, 等. 四川省乐山市一起诺如病毒胃肠炎暴发的病原学特征分析 [J]. *国际病毒学杂志*, 2017, 24(6): 401-404. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2017.06.010

(收稿日期:2017-08-11)

(本文编辑:吕新军)

## · 文献速览 ·

## 西半球消除犬狂犬病实施的成功策略

Andres Velasco-Villa, Luis E. Escobar, Anthony Sanchez, et al. Successful strategies implemented towards the elimination of canine rabies in the Western Hemisphere [J]. *Antiviral Res*, 2017, 143: 1-12. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.03.023.

几乎所有人狂犬病病例都是由犬咬伤引起的,因此消除犬狂犬病成为全球的优先事项。近几十年来,西半球许多国家开展了大规模的犬的疫苗接种运动,控制流浪犬,并对宠物所有者的责任强制立法明确。本文综述了西半球消除犬狂犬病取得的进展。在简要总结了控制努力的历史并描述了上述方法之后,我们注意到,一些国家的项目受到社会态度和严重经济差距的阻碍,凸显了有必要讨论在整个区域内完成消除犬狂犬病所需的措施。我们还注意到,只要犬维持的狂犬病“热点”仍然存在,流浪犬种群仍然很大,群体免疫力变低,犬衍生的狂犬病 lyssavirus (RABLV) 变种继续在靠近无狂犬病犬群的地方传播,犬维持的狂犬病仍然有再发的危险。只有在永久消除了犬维持的和犬衍生的狂犬病 lyssavirus (RABLV) 谱系和变种的情况下,才能消除犬维持的狂犬病。使犬群的免疫率始终保持在 70% 以上,对犬、家畜和野生动物进行可靠的狂犬病诊断和狂犬病基因分型以促进持续的基于实验室的监测,并继续就狂犬病传播的风险、预防教育人群,教导负责任的宠物饲养,消除犬传播狂犬病是可行的。彻底消除犬狂犬病需要永久性的资金支持以及政府和人民致力于实现这一目标。随附的一篇文章 (Velasco-Villa et al., 2017) 回顾了西半球犬狂犬病的历史和流行病学,从它在欧洲殖民时期的引入开始,并讨论了病毒在犬和各种野生食肉动物之间的溢出将如何影响未来的消除犬狂犬病的工作。

(吕新军 编译)