

# 2014—2017 年泉州地区急性胃肠炎暴发疫情中诺如病毒的病原特征

郑友限 陈志扬 郑丹凤 刘江艺 吴小凤 陈明春

泉州市疾病预防控制中心 362000

通信作者:郑友限, Email: zyx740509@163.com, 电话: 0595-28067856

**【摘要】** **目的** 分析泉州地区 2014—2017 年急性病毒性胃肠炎疫情的病原学特征。**方法** 收集泉州地区 2014—2017 年 15 起急性病毒性胃肠炎暴发疫情期间的患者标本, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测诺如病毒 G I/G II 型、扎如病毒、星状病毒及轮状病毒, 对检测结果进行统计学分析; 诺如病毒检测阳性的标本, 对其多聚酶和衣壳蛋白基因 VP1 区进行 PCR 扩增并测序, 并用 DNASTar 和 MEGA7.0 软件进行序列分析。**结果** 本研究共采集 96 份来源于 15 起急性病毒性胃肠炎暴发疫情的患者临床标本, 共检出诺如病毒 30 份, 阳性率为 31.25%, 其中 G II 型 23 份、G I 型 7 份; 随机选择 10 份阳性标本进行核酸序列分析, 其中 9 份为 G II.P16/ G II.2 亚型, 1 份 G I.6 亚型。系统进化树分析表明该 G II.P16/ G II.2 亚型诺如病毒新重组株与近期国内外暴发流行的 G II.P16/ G II.2 亚型高度同源。**结论** 引起泉州地区 2014—2017 年急性病毒性胃肠炎暴发疫情的主要病原为诺如病毒 G II.P16/ G II.2 亚型和 G I.6 亚型; 其中 G II.P16/ G II.2 亚型在泉州地区首次出现, 为近期优势毒株。

**【关键词】** 诺如病毒; 病毒性胃肠炎; 进化分析; 基因分型

**基金项目:** 福建省泉州市科技计划项目(2016Z041)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.03.009

## Etiologic characteristics of norovirus in outbreaks of acute gastroenteritis in Quanzhou from 2014 to 2017

Zheng Youxian, Chen Zhiyang, Zheng Danfeng, Liu Jiangyi, Wu Xiaofeng, Chen Mingchun

Quanzhou Center for Disease Control and Prevention, Quanzhou 362000, China

Corresponding author: Zheng Youxian, Email: zyx740509@163.com, Tel: 0086-595-28067856

**【Abstract】** **Objective** To understand the etiology, genotype and molecular characteristics of acute viral gastroenteritis in Quanzhou from 2014 to 2017. **Methods** Specimens from 15 outbreaks of acute viral gastroenteritis in Quanzhou area from 2014 to 2017 were collected and real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect norovirus GI and GII, sapovirus, astrovirus and rotavirus, and the result were statistically analyzed. Furthermore, specimens positive for norovirus was further subjected to the amplification and sequencing of polymerase and VP1 genes of norovirus, and sequences were analyzed using DNASTar and MEGA7.0 software. **Results** In this study, 96 specimens from 15 outbreaks of acute viral gastroenteritis were collected, and norovirus was detected in 30 specimens with a positive rate of 31.25%, among which 23 specimens were genotype GII and 7 specimens genotype GI. Meanwhile, 10 specimens were randomly selected for nucleic acid sequence analysis. The result showed that 9 of them were GII.P16/GII.2 and 1 was GI.6. The phylogenetic analysis showed that the new recombinant norovirus subtype GII.P16/GII.2 was highly homologous to the same subtype detected in outbreaks home and abroad recently. **Conclusions** The main pathogens caused the outbreak of acute viral gastroenteritis in Quanzhou from 2014 to 2017 were norovirus belonging to subtype GII.P16/GII.2 and subtype GI.6, and subtype GII.P16/GII.2 was the predominant strain which was found for the first time in Quanzhou.

**【Key words】** Norovirus; Viral gastroenteritis; Phylogenetic analysis; Genotyping

**Fund program:** Quanzhou Science and Technology Project in Fujian Province(2016Z041)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.03.009

诺如病毒 (norovirus, NoV) 是引起急性非细菌性胃肠炎暴发流行的重要病原体,常在家庭、医院、学校、托儿所、军队及其他人群中引起暴发<sup>[1-2]</sup>。本研究采集了泉州地区 2014—2017 年发生的 15 起急性胃肠炎暴发疫情期间的患者标本,通过对患者标本进行核酸检测以及部分阳性标本的核苷酸序列测定分析,了解其病原学特征。并与国内外其他诺如病毒株的相关序列进行分析,以探讨新变异株的分子特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源及采集运送

收集泉州地区 2014—2017 年发生在幼儿园、中小学校等单位的 15 起疑似急性病毒性胃肠炎暴发疫情标本,由疫情暴发地所在的县区疾控中心采集出现恶心、呕吐、腹泻等临床症状典型的患者的肛拭子、粪便、呕吐物标本共 96 份。各县区疫情及采样量如下:鲤城 4 起疫情 23 份样本、丰泽 3 起疫情 24 份样本、泉港 3 起疫情 20 份样本、石狮 1 起疫情 2 份样本、南安 1 起疫情 5 份样本、晋江 1 起疫情 9 份样本、安溪 2 起疫情 13 份样本。标本采集完成后,4 ℃ 条件下保存,24 h 内送至本中心实验室,未能按时送达的置于 -70 ℃ 以下保存。

### 1.2 病毒 RNA 核酸提取

送检标本均用 PBS 溶解稀释,室温 5 000 g 离心 5 min 后取上清液用于核酸的提取。使用苏州天隆生物科技有限公司的病毒 RNA/DNA 提取试剂,在天隆 NP968 核酸提取仪上对采集的标本进行病毒 RNA 提取,具体操作参照试剂盒和仪器使用说明书。洗脱完成后,将最终洗脱液转移至 1.5 ml 的干净无核酸酶离心管中备用。

### 1.3 实时荧光定量逆转录 PCR (Real-Time RT-PCR) 检测

诺如病毒 G I/G II 型、扎如病毒、星状病毒及轮状病毒等腹泻病毒的核酸检测采用深圳生科原生物技术有限公司的相应产品进行,具体操作参照产品说明书。所用仪器为罗氏 480 II 实时荧光定量 PCR 仪。

### 1.4 诺如病毒多聚酶和衣壳蛋白基因 VP1 区序列测定与分析

使用 JV12<sup>[2]</sup>/G2SKR 引物对经 Real-Time RT-PCR 检测为诺如病毒核酸阳性的样本,进行诺如病毒多聚酶区和衣壳蛋白基因 VP1 区序列的扩增和测定。产物片段为 1 100 bp。RT-PCR 反应采用 Qiagen 公司的 One Step RT-PCR Kit 试剂盒,反应在 Bio-Rad 公司的 C1000 梯度 PCR 仪上进行。

扩增产物用 QIAquick Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒回收后送上海生工公司测序。

GenBank 数据库下载诺如病毒各基因亚型参考毒株的核苷酸序列,利用生物软件 Lasergene 对测序产物进行拼接和核苷酸同源性分析,用 MEGA7.0 进行序列比对和进化树构建,并通过在线 BLAST 比对分析综合判断病毒的基因型别。进化树采用邻近归并法 (Neighbor-Joining), Bootstrap 重复值为 1 000。

### 1.5 统计学方法

利用 SPSS16.0 软件对各统计项的率进行卡方检验分析, $P$  值小于 0.05 差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2014—2017 年泉州地区急性病毒性肠胃炎暴发概况

2014—2017 年泉州地区报告 15 起急性病毒性肠胃炎的暴发疫情,这些疫情分别发生在中小学校和幼托机构,发病例数共计 270 例。病例年龄范围为 (4~14 岁)。临床表现以恶心、呕吐为主及不同程度的腹泻和腹痛,部分病例伴有低热等症状,无重症病例,患者经对症治疗后均痊愈,流行集中在每年 11 月份至次年的 4 月份,见图 1。4 年累计送检患者标本 96 份,其中男性标本 53 份 (55.21%), 女性标本 43 份 (44.79%)。其中 2014 年 3 起疫情,送检 22 份标本;2015 年 5 起疫情,送检 30 份;2016 年 2 起疫情,送检 15 份;2017 年 5 起疫情,送检 29 份。



图 1 2014—2017 年泉州地区诺如病毒感染性腹泻患者时间分布  
Fig.1 Time distribution of norovirus infectious diarrhea in Quanzhou from 2014 to 2017

### 2.2 病原学特征分析

所有标本均进行诺如病毒、扎如病毒、星状病毒及轮状病毒等腹泻病毒的核酸检测,检出核酸阳性 30 份,均为诺如病毒,其中 G I 型 7 份 (7.29%), G II 型 23 份 (23.96%)。各年度暴发标本诺如病毒阳性率分别为:2014 年 31.82%

(7/22), 2015 年 20.33% (7/30), 2016 年 33.33% (5/15), 2017 年 37.95% (11/29), 见表 1。

表 1 2014—2017 年泉州地区病毒性胃肠炎暴发疫情诺如病毒检测结果

Tab.1 The detection results of norovirus for viral gastroenteritis outbreaks in Quanzhou from 2014 to 2017

年份	标本数 (份)	阳性数 (份)	阳性率 (%)	基因型(份)	
				G I 型	G II 型
2014	22	7	31.82	0	7
2015	30	7	23.33	4	3
2016	15	5	33.33	3	2
2017	29	11	37.93	0	11
合计	96	30	31.25	7	23

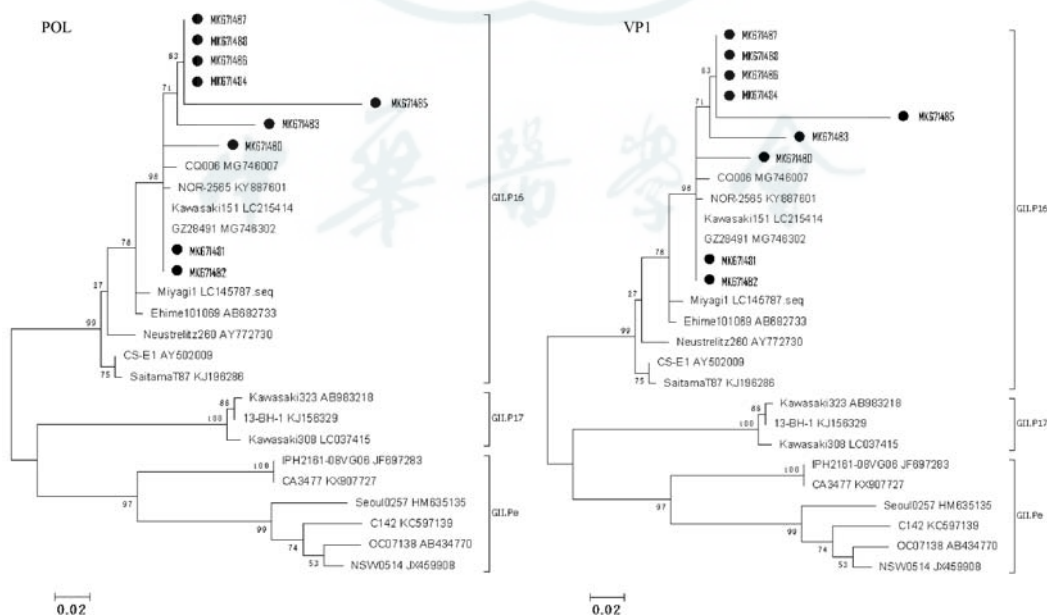
2.3 序列测定和基因分型 通过 PCR 扩增和测序分析,获得了 9 份 G II 型、1 份 G I 阳性标本的多聚酶区和衣壳蛋白基因 VP1 区核苷酸序列,并上传至 GenBank,获得的序列号分别为 MK671480 ~ MK671489。并用诺如病毒在线分型软件 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)<sup>[3]</sup> 进行 BLAST 比对,1 株为 G I .6 基因型,其余 8 株序列高度同源,同源性介于 96.3%~99.8%;其多聚酶区为 G II .P16 基因型,衣壳蛋白区为 G II .2 基因型,提示这 9 个毒株由诺如病毒 G II .P16 和 G II .2 亚型重组而来。该重组株与 2016~2017 年在德国、法国、日

本以及我国部分地区引起暴发的 G II .P16/ G II .2 重组型诺如病毒的同源性在 93.6%~96.8%。

2.4 同源性和进化分析 将 9 株 G II .P16/ G II .2 型重组株 (1704355072~1704355080) 分别对聚合酶区 (POL) 与衣壳区 (VP1) 进行系统进化分析衣壳蛋白区进化分析显示本研究测得的 9 株病毒 2016 检出的 G II .2 同属一个进化分支,见图 2。在聚合酶区与衣壳区分属于 2 个不同的基因亚型。本研究测得的 9 株诺如病毒聚合酶区与 2015~2016 年检出的广东 (KY485145) 和日本 (JX459908) 等地 G II .P16 基因型的毒株分布在同一个进化分支,亲缘关系较近;与 2011—2013 年以及 2014 年检出的 G II .P16 则分属在不同的进化分支上。

### 3 讨论

本研究通过对 2014—2017 年泉州地区 15 起急性病毒性胃肠炎暴发疫情的病原学特点和部分诺如病毒阳性标本的病毒核酸序列特征进行比较分析,结果显示,泉州地区急性病毒性胃肠炎中诺如病毒感染率普遍较高,达 31.25%,近期主要以 G II 型为主,为新重组株 G II .P16/ G II .2 亚型。这些疫情分别发生在幼儿园、小学和中学,持续时间短,病毒感染者起病急,临床症状较轻,患者年龄距离较小(4~14 岁),其中幼童(幼儿园和小学)以呕吐为主要症



注:●诺如病毒泉州分离株

图 2 泉州地区 9 株诺如病毒 VP1、POL 部分片段核苷酸序列进化树

Note:●norovirus strains isolated in Quanzhou

Fig.2 Phylogenetic tree of VP1 and POL nucleic acid sequences of 9 norovirus strains isolated in Quanzhou



状, 年长的小学生和中学生以腹泻为主要症状, 无发热和脱水症状。由于及时采取控制措施, 未造成大范围的扩散。提示 G II.P16/ G II.2 重组株的病毒感染特征和疫情流行特征与以往的诺如病毒基本一致。特别是与 2014—2015 年以来, 在我国各地造成稳定持续流行的优势亚型 G II.17 亚型的感染特征高度一致<sup>[5-6]</sup>。

诺如病毒极易发生变异, 每隔 2~3 年会出现新的变异株, 并且经常可以引起急性胃肠炎的暴发流行<sup>[7]</sup>。2016 年以来年在德国、法国、日本以及我国部分地区出现以 G II.P16/ G II.2 重组株为主要流行型别的诺如病毒感染腹泻聚集性疫情, 并且形成了一个相对独立的进化分支, 该重组株继而取代了 2014 年以来一直为全球主要流行优势型别的 G II.17 变异株, 并成为引发新一轮秋冬季急性病毒性胃肠炎的流行<sup>[8-10]</sup>。以往泉州地区从未在监测或暴发病例中检测到诺如病毒 G II.P16/ G II.2 亚型, 这是泉州地区首次检测到该亚型, 这与本省及国内外其它地区 2016 年以来的监测情况一致<sup>[10-12]</sup>。系统进化分析显示, 9 株 G II.P16/ G II.2 亚型重组株已形成了一个相对独立的进化分支, 并且与近年来在国内外引起暴发流行的 G II.P16/ G II.2 亚型高度同源, 位于同一进化分支上。提示 G II.P16/ G II.2 亚型在强大的免疫压力下, 其多聚酶和衣壳蛋白基因都发生了抗原漂移或基因重组, 从而获得了在人群中广泛流行的能力, 并成功替代 G II.4 和 G II.17 成为优势流行毒株<sup>[13-16]</sup>。新的变异株的出现, 可能会引起大规模急性病毒性胃肠炎的暴发流行, 需要引起高度重视。

综上所述, 诺如病毒是泉州地区 2014—2017 年秋冬季急性病毒性胃肠炎暴发疫情的主要病原, 包括 G II 型和 G I 亚型。此外新的优势基因型 G II.P16/ G II.2 为泉州地区首次检出, 与国内外近期由诺如病毒引起暴发疫情的毒株为同一基因亚型, 因此, 需要加强对诺如病毒感染腹泻疫情的应急检测工作, 开展病原学特征分析, 及时进行风险评估和预警。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 郑友限: 提出研究思路, 设计研究方案, 论文撰写; 陈志扬、郑丹凤、吴小凤: 标本的采集、处理、检测等实验; 刘江艺、陈明春: 数据分析处理

## 参考文献

- [1] Zheng DP, Widdowson MR, Glass RI, et al. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006 [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48 (1): 168-177. DOI: 10.1128/JCM.01622-09.
- [2] Vinje J, Vennema H, Maunula L, et al. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(4): 1423-1433.
- [3] Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses [J]. *J Clin Virol*, 2011, 51(2): 121-125. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.03.006.
- [4] Vinje J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2): 373-381. DOI: 10.1128/JCM.01535-14.
- [5] Jin M, Zhou YK, Xie HP, et al. Characterization of the new GII.17 norovirus variant that emerged recently as the predominant strain in China [J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(10): 2620-2632. DOI: 10.1099/jgv.0.000582.
- [6] Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, et al. Genetic analyses of GII.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 region [J]. *Euro Surveill*, 2015, 20(26): 21173. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21173.
- [7] Lindesmith LC, Donaldson F, Baric RS. Norovirus GI.4 strain antigenic variation [J]. *J Virol*, 2011, 85(1): 231-242. DOI: 10.1128/JVI.01364-10.
- [8] Kwok K, Niendorf S, Lee N, et al. Increased detection of emergent recombinant norovirus GII. P16-GII. 2 strains in young adults, Hong Kong, China, 2016-2017 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(11): 1852-1855. DOI: 10.3201/eid2311.170561.
- [9] Bidalot M, Thery L, Kaplon J, et al. Emergence of new recombinant noroviruses GII. P16-GII.2, France, winter 2016 to 2017 [J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(15): 30508. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.15.30508.
- [10] Ao Y, Wang J, Ling H, et al. Norovirus GII. P16/GII. 2 associated gastroenteritis, China, 2016 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2017, 23(7): 1172-1175. DOI: 10.3201/eid2307.170034.
- [11] 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/eid2307.17033.
- [12] 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]. *Euro Surveill*, 2017, 22(4): 30447. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30447.
- [13] Lu J, Sun L, Fang L, et al. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII. 17, Guangdong province, China, 2014-2015 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(7): 1240-1242. DOI: 10.3201/eid2107.150226.
- [14] Han JK, Ji L, Shen YH, et al. Emergence and predominance of norovirus GII. 17 in Huzhou, China, 2014-2015 [J]. *Virol J*, 2015, 12(1): 139. DOI: 10.1186/s12985-015-0370-9.
- [15] 张爽, 荆红波, 马红梅, 等. 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 [J]. *实用预防医学*, 2017, 24(1): 21-25. DOI: CNKI:SUN:SYYY.0.2017-01-005.
- [16] 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. *中国人兽共患病学报*, 2015, 32(7): 641-643, 650. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.07.010.

(收稿日期: 2018-10-26)

(本文编辑: 唐溯英)