

江苏省近期急性胃肠炎暴发中诺如病毒分子特征分析

付建光 艾静 靳森 刘成 沙丹 姚萍 吴斌 祁贤 鲍昌俊 朱叶飞 汤奋扬

【摘要】 目的 了解江苏省胃肠炎暴发疫情中诺如病毒(NoV)感染状况,并对其病原分子流行病学特征进行初步研究。方法 收集江苏省 2012 年 10 月至 2013 年 3 月 7 起胃肠炎暴发疫情患者肛拭子标本共 67 份,采用实时荧光 RT-PCR 定性检测, NoV 阳性标本用 RT-PCR 扩增其聚合酶区及 VP1 区基因片段进一步测序分型。结果 7 起疫情均为 NoV 感染引起的暴发,检测阳性率为 67.2%(45/67)。全部 45 株阳性毒株序列分析表明 7 起疫情中除一起是由 G II.3 型感染引起外,其余 6 起均由新 G II.4 感染引起,其中 38 株毒株与 2012 年澳大利亚参考株 G II.4/Sydney 株同源性均在 99% 以上。进一步对 6 株新型 Sydney 变异株的衣壳蛋白 VP1 区扩增测序,并与 9 株近年流行株的 VP1 区氨基酸序列比对,发现该 6 株毒株的 VP1 区部分氨基酸已出现突变,而氨基酸位点的突变是与病毒抗原性密切相关。结论 江苏省 7 起疫情暴发聚集且感染毒株型别单一,说明已出现新 NoV 变异株,其原型株 G II.4/Sydney 已在国内外多地引起暴发和流行,提示该毒株将是今后防控监测的重点。

【关键词】 诺如病毒; 暴发; 基因型; G II.4/Sydney 变异株

Molecular characteristics of acute gastroenteritis outbreaks caused by norovirus, in Jiangsu province FU Jian-guang¹, AI Jing¹, JIN Miao², LIU Cheng³, SHA Dan⁴, YAO Ping⁵, WU Bin¹, QI Xian¹, BAO Chang-jun¹, ZHU Ye-fei¹, TANG Fen-yang¹. 1 Key Lab of Enteric Pathogenic Microbiology, Ministry of Health, Jiangsu Provincial Center of Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China; 2 National Institute for Viral Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Suzhou Center of Disease Control and Prevention; 4 Wuxi Center for Disease Control and Prevention; 5 Changzhou Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: TANG Fen-yang, Email: tfyepi@jscdc.cn

This work was supported by grants from the Jiangsu Province Health Development Project with Science and Education (No. ZX201109, No. RC2011084).

【Abstract】 **Objective** To study both the epidemiologic and molecular characteristics of outbreaks caused by norovirus (NoV) with its variants, in Jiangsu. **Methods** 67 specimens from seven gastroenteritis outbreaks were collected from October 2012 to March 2013 in Jiangsu. NoV genogroup was detected by Real-Time RT-PCR. NoV portions of RdRp gene and VP1 gene were amplified under RT-PCR. **Results** Seven gastroenteritis outbreaks were caused by NoV. Among all the fecal specimens, 45 (67.2%) showed positive to NoV G II. Study on the genotype was conducted through analyzing the nucleotide sequence of RdRp gene. Based on the RdRp region, 7 strains appeared to be G II, with 3 and 38 strains belonged to G II.4-Sydney variants. Results from phylogenetic analysis confirmed that 38 variants shared 99% identity with G II.4-Sydney. We also amplified the VP1 genes from 6 variants and comparing with 9 epidemic strains on the sequence amino acid sequence. All the strains showed mutation in amino acid sequence at some key sites which were closely related to the forming of neutralizing epitopes. **Conclusion** The short interval periods between all 7 NoV outbreaks with identical viral strain indicated the emergence of a new NoV variant in Jiangsu province, that had caused a number of epidemics abroad. Results from our study suggested that the development of monitoring programs on this novel G II.4-Sydney variant should be a part of the NoV surveillance in Jiangsu province or even in the country.

【Key words】 Norovirus; Outbreak; Genotype; G II.4-Sydney variant

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.08.013

基金项目:江苏省“十二五”科教兴卫工程(ZX201109);江苏省医学重点人才基金(RC2011084)

作者单位:210009 南京,卫生部肠道病原微生物重点实验室/江苏省疾病预防控制中心(付建光、艾静、吴斌、祁贤、鲍昌俊、朱叶飞、汤奋扬);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(靳森);苏州市疾病预防控制中心(刘成);无锡市疾病预防控制中心(沙丹);常州市疾病预防控制中心(姚萍)

通信作者:汤奋扬, Email: tfyepi@jscdc.cn

诺如病毒(NoV)是引起暴发和散发性非细菌性胃肠炎的重要病原体,全球约有 80%~95%的胃肠炎是由 NoV 引起^[1]。NoV 是单正链无包膜 RNA 病毒,根据其基因组的 RNA 聚合酶及衣壳蛋白核苷酸序列差异, NoV 分为 5 个基因组(G I ~ G V)^[2]。G I 和 G II 组包含了大部分可感染人类的毒株,以 G II 组为主^[3]。NoV 在过去的十几年中引发了多次全球感染暴发和流行,而每一次暴发中 G II.4 均占有重要位置^[4-8],且在散发流行中也有约 60%~70%的病例是由 G II.4 引起^[9]。我国是 1995 年由方肇寅等^[10]首次在小儿急性腹泻中发现 NoV,近些年 NoV G II.4 的流行毒株分别出现过 Hills 株、Hunter 株、Sakai 株、2006b 及 2008 株等^[11-15],其中引起暴发及散发流行最多的是 G II.4-2006b 株,但对于最新出现的 G II.4/Sydney 变异株还鲜有报道。为此本研究对 2012 年 10 月至 2013 年 3 月江苏省胃肠炎暴发疫情中分离的 G II.4/Sydney 变异株进行分析。

材料与方法

1. 标本及核酸提取:收集江苏省 7 起 NoV 暴发疫情的肛拭子标本 67 份, -70 °C 冰冻保存。加入 1 ml 生理盐水至 1.5 ml EP 管中,加入 0.1 g 固体粪便标本或 0.1 ml 液体粪便标本,置于漩涡振荡器混匀,室温静置 10 min,室温下 ≥ 5000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,置 -20 °C 冰箱保存。利用 ABI 自动核酸提取仪提取核酸,试剂采用 ABI 5X MagMAX™-96 Viral Isolation Kit(美国 ABI 公司),提取方法按照试剂盒说明书。

2. 检测方法:

(1) 实时荧光反转录聚合酶链反应(Real time RT-PCR): NoV G I 组和 G II 组定性检测的引物探针及反应条件均按文献报道^[16],试剂盒采用 QuantiTect Probe RT-PCR Kit(德国 QIAGEN 公司)。扩增结束后将扩增曲线平滑且 Ct 值 < 33 的判定为该组 NoV 阳性。

(2) 反转录聚合酶链反应(RT-PCR):将 45 份 NoV 阳性标本的聚合酶区进行普通 RT-PCR 扩增。试剂盒为 Qiagen One Step RT-PCR Kit(德国 QIAGEN 公司)。引物及反应条件按文献报道^[17], -20 °C 保存 PCR 产物。对暴发优势株进行 VP1 区片段的扩增,试剂盒为 Qiagen Long Range 2 Step RT-PCR Kit(德国 QIAGEN 公司)。引物及反应条件按文献报道^[18], -20 °C 保存 PCR 产物。

(3) 序列测定和分析:将 PCR 阳性产物送金斯

瑞(南京)科技有限公司纯化和测序。从 GenBank 的核酸序列数据库中下载国内外多株 NoV 的核酸序列片段,将下载序列同本研究检测到的 NoV 序列利用 DNASTar 公司的 MegAlign 5.1 软件,采用 CLUSTALW 方法进行序列比对,使用 neighbor-joining 法构建进化树。

结 果

1. NoV 检出情况:采用荧光定量 RT-PCR 检测 67 份肛拭子标本检出 NoV 核酸阳性 45 份,检出阳性率为 67.2%,均为 G II 组 NoV。

2. NoV 聚合酶区序列测定及进化分析:按暴发时间将 7 起胃肠炎疫情中的 45 份阳性标本编号,字母 A ~ G 分别代表一起暴发疫情,数字代表排列序号。通过对 NoV 聚合酶区的序列进行分析比对,发现各 NoV 毒株的核苷酸同源性有较大差异,每一基因型内不同毒株核苷酸序列也有一定差异。所有测序序列在基因遗传进化树上所在的位置均在 G II 分支上,毒株间同源性为 63.2%~100%。其中 7 株(A1 ~ A7)与 2008 年武汉株 JQ751020 最为接近,同源性为 98.4%,其次是河北株 EF670649(98.2%)、韩国株 GU980585(97.9%)及 Sakai 株 AB220922(96.8%),与其他参考株同源性为 64.4%~93.6%,7 株间的同源性为 100%;另外的 38 株与 2012 年澳大利亚的 Sydney 株(JX459908)同源性最高,为 99.1%~99.8%,与 2007 年日本的 Osaka 株(AB541319)为 94.3%~95.1%,而与其他参考株同源性较低(64.5%~90.3%),38 株彼此间核苷酸序列同源性为 97.4%~100%。在构建的聚合酶区进化树中,A1 ~ A7 毒株与 G II.3 簇相近,而其余 38 株及 G II.4/Sydney_2012 株则形成了一个独立的分支,该分支在同源性上与 Osaka 2007 簇相近(图 1)。这种毒株分支形成在以往国内报道的暴发及散发中尚未出现过相似型别,表明可能是国内出现的新变异毒株。

3. NoV 蛋白 VP1 区序列测定及进化分析:7 起疫情暴发中有 6 起是由新变异株引发,本研究选取 6 株变异株进行 NoV 蛋白 VP1 区序列测定。发现 6 株毒株仍然与 2012 Sydney 株同源性最高,为 98.8%,其次就是 2008 Apeldoorn 株(AB445395)为 96.2%,与其他 G II.4 型毒株在 86.7%~95.2%间(图 2)。

G II.4 基因型别的多样性与 NoV 的组织血型抗原(histo-blood group antigen, HBGA)相关,每次伴随新 NoV 株胃肠炎周期性暴发的出现,与之相对应

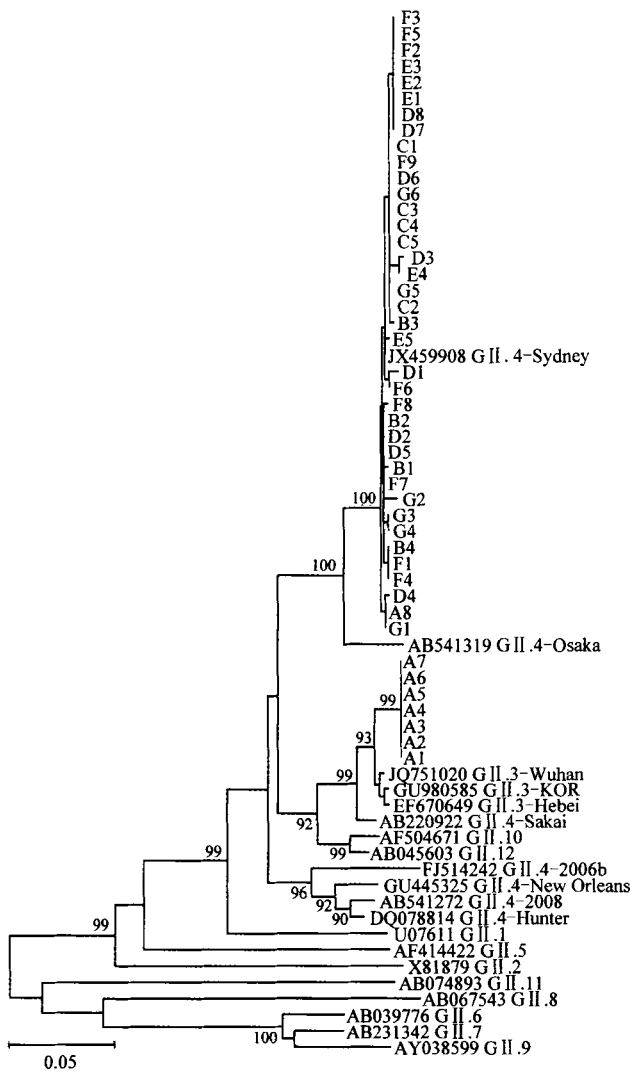


图 1 NoV 的 RdRp 区核苷酸序列进化分析

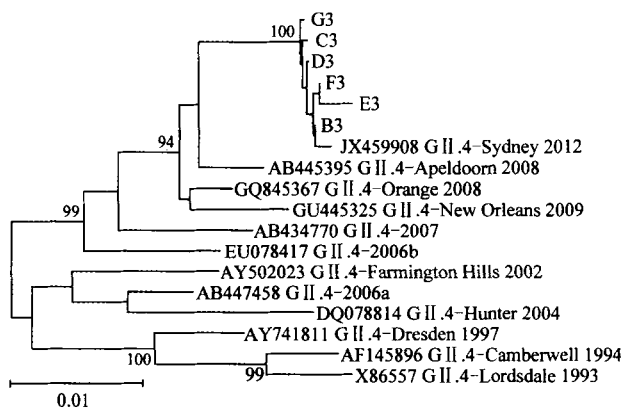


图 2 NoV 的 VP1 区核苷酸序列进化分析

的是其 P2 区至少 2 个关键模序位点的突变^[19]。表 1 为本研究 6 株 Sydney 变异株与 9 株近年流行的 G II.4 毒株的 P2 区进行氨基酸序列的比对。6 株变异株及 Sydney 株在 294 位点 (A→T) 及 368 位点 (N→E) 上出现新的变化。另一个关键位点 393~395 位氨基酸同样影响病毒与 HBGA 的相互作用,6

株变异株在 393 位点由 N 突变为 G,这也使得 2 个常见模序组合 SRN-STT (296-298~393-395) 变为 SRN-GTT。此外,6 株变异株在 S 区的 119 位氨基酸及 P1 区 145 位氨基酸均突变成新的氨基酸 V,在 P2 区的非关键位点 373 位上突变成新的 H,在另一个 P1 区的 414 位上突变成新的 P(数据未显示)。

表 1 15 株 NoV 的 VP1 蛋白 P2 区氨基酸序列差异比较

NoV	氨基酸序列								
	294	296	297	298	368	372	393	394	395
Farmington Hills 2002	A	T	H	N	N	N	N	G	T
Hunter 2004	A	T	Q	N	S	S	S	T	T
2006a	A	T	Q	E	S	S	S	T	T
2006b	A	S	R	N	S	E	S	T	T
Osaka 2007	A	S	R	N	A	D	S	T	T
Apeldoorn 2008	T	S	R	N	A	D	D	T	A
Orange 2008	A	S	R	N	A	D	N	T	A
New Orleans 2009	P	S	R	N	A	D	S	T	T
Sydney 2012	T	S	R	N	E	D	G	T	T
B3	T	S	R	N	E	D	G	T	T
C3	T	S	R	N	E	D	G	T	T
D3	T	S	R	N	E	D	G	T	T
E3	T	S	R	N	E	D	G	T	T
F3	T	S	R	N	E	D	G	T	T
G3	T	S	R	N	E	D	G	T	T

讨论

本研究在 2012 年 10 月至 2013 年 3 月江苏省 7 起胃肠炎暴发疫情收集的 67 份样本中,均检出 NoV 阳性。其中最早发生的一起暴发疫情是由 NoV G II.3 型 (A1~A7) 引起,但同时该起暴发中另一样本 (A8) 并非 G II.3 型,而是最新 G II.4/Sydney_2012 亚型。说明该起暴发可能存在两种型别的 NoV 感染。NoV G II.3 型是引起儿童胃肠炎散发感染的最常见病原体,在 2000 年后大部分检出的 G II.3 型均为重组毒株,其 RdRp 区为非 G II.3 型,最为常见的是 G II.b 型。但在 2003 年后中国、日本和韩国检出的 G II.3 型单独归为一个亚型,其 RdRp 区基因型为 G II.12 型。本文分型结果同样显示检出的 G II.3 型其 RdRp 区与 G II.12 相近^[20]。第二起至最后一一起疫情均由 G II.4 型引发,各毒株间的同源性很高 (97.4%~100%),与 2012 年澳大利亚参考株 G II.4/Sydney 株同源性均 >99%,短时间内多次暴发表明该 G II.4/Sydney 变异株正在江苏省内流行。G II.4-Sydney 株自 2012 年在澳大利亚被分离后,迅速在世界各地引起暴发和流行^[21,22]。

本研究表明,新出现的 Sydney 变异株在 VP1 蛋白 P2 区的 294 位点 (A→T)、368 位点 (N→E)、393 位

点(N→G)均出现突变,致使 2 个常见的模序组合 SRN-STT (296-298 ~ 393-395)变为 SRN-GTT。这些关键位点氨基酸的突变,使毒株的 HBGA 识别模序即中和抗原表位发生了变化,而抗原表位的改变驱动 HBGA 亲和力改变及人群易感性的改变,导致人群现有免疫力对其难以抵抗,因此在短时间内引起爆发性流行^[23-25]。此外, Sydney 变异株 P1-1 区 145 位氨基酸突变成新的氨基酸 V,在另一个 P1-2 区的 414 位上突变成新的 P。有研究发现 G II.4-2002 株及其变异株的 2 个点突变就造成了病毒免疫原性和受体结合功能的变化,而其中一个突变正是位于 P1 区中接近铰链位置 226 位点(P→S),因此 P1 区可能也含有关键抗原表位,并对抗体的特异性有重要影响^[19,24]。

在胃肠炎暴发疫情中首次发现 G II.4/Sydney_2012 变异株,在随后常规的监测中也发现该病毒,说明其不仅可引起暴发,也出现在散发病例中,并有可能迅速成为我国及周边国家的流行株。由于人群普遍对其缺乏免疫力,应作为监测的重点毒株。

参 考 文 献

- [1] Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, et al. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol*, 2009, 44(1): 1-8.
- [2] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 2006, 346(2): 312-323.
- [3] Hall AJ, Vinjé J, Lopman B, et al. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011.
- [4] Belliot G, Kamel A, Estienney M, et al. Evidence of emergence of new ggii. 4 norovirus variants from gastroenteritis outbreak survey in france during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 winter seasons. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(3): 994-998.
- [5] Eden JS, Bull RA, Tu E, et al. Norovirus G II.4 variant 2006b caused epidemics of acute gastroenteritis in australia during 2007 and 2008. *J Clin Virol*, 2010, 49(4): 265-271.
- [6] Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus gii. 4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis*, 2009, 200(5): 802-812.
- [7] Vega E, Barclay L, Gregoricus N, et al. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, united states. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(8): 1389.
- [8] Zheng DP, Widdowson MA, Glass RI, et al. Molecular epidemiology of genogroup ii-genotype 4 noroviruses in the united states between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(1): 168-177.
- [9] Hoa Tran TN, 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 Clin Virol*, 2013, 56(3): 185-193.
- [10] Fang ZY, Wen LY, Jin SJ, et al. Norwalk-like virus infection found in diarrhea patients in China. *Chin J Virol*, 1995, 11(3): 215-219. (in Chinese)
- [11] Cheng WX, Ye XH, Yang XM, et al. Epidemiological study of human calicivirus infection in children with gastroenteritis in Lanzhou from 2001 to 2007. *Arch Virol*, 2010, 155(4): 553-555.
- [12] Gao Y, Jin M, Cong X, et al. Clinical and molecular epidemiologic analyses of norovirus-associated sporadic gastroenteritis in adults from Beijing, China. *J Med Virol*, 2011, 83(6): 1078-1085.
- [13] Zeng M, Xu X, Zhu C, et al. Clinical and molecular epidemiology of norovirus infection in childhood diarrhea in China. *J Med Virol*, 2012, 84(1): 145-151.
- [14] Fang ZY, Xie HP, Lv HX, et al. Investigation of human calicivirus (HuCV) diarrhea among infantile and young children in China, 1999-2005. *Chin J Virol*, 2007, 23(1): 9-15. (in Chinese)
- [15] Wu W, Zhang HB, Zhang HL, et al. The genotype of norovirus in Shenzhen, 2010. *Chin J Virol*, 2012, 28(3): 219-223. (in Chinese)
- [16] Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, et al. Use of taqman real-time reverse transcription-pcr for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(4): 1405-1412.
- [17] Nayak MK, Balasubramanian G, Sahoo GC, et al. Detection of a novel intergenogroup recombinant norovirus from Kolkata, India. *Virology*, 2008, 377(1): 117-123.
- [18] Motomura K, Oka T, Yokoyama M, et al. Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus gii/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol*, 2008, 82(22): 11247-11262.
- [19] Allen DJ, Gray JJ, Gallimore CI, et al. Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the gii-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS One*, 2008, 3(1): e1485.
- [20] Mahar JE, Bok K, Green KY, et al. The importance of intergenic recombination in norovirus gii. 3 evolution. *J Virol*, 2013, 87(7): 3687-3698.
- [21] Center of Disease Control and Prevention. Emergence of new norovirus strain G II.4 sydney—United States, 2012. *MMWR*, 2013, 62(3): 55.
- [22] van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill*, 2013, 18(1): 8-9.
- [23] Debbink K, Donaldson EF, Lindesmith LC, et al. Genetic mapping of a highly variable norovirus gii. 4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. *J Virol*, 2012, 86(2): 1214-1226.
- [24] Lindesmith LC, Donaldson EF, LoBue AD, et al. Mechanisms of gii.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*, 2008, 5(2): e31.
- [25] Zakikhany K, Allen DJ, Brown D, et al. Molecular evolution of gii-4 norovirus strains. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41625.

(收稿日期: 2013-04-08)

(本文编辑: 张林东)