

研究报告

一起疑似食源性诺如病毒胃肠炎事件病原分子生物学特征分析

王坤明,柯明月,施红,林英华

(厦门市思明区疾病预防控制中心,福建 厦门 361009)

摘要:目的 研究厦门市思明区一起聚集性胃肠炎事件的诺如病毒的分子生物学特征。方法 将收集到的11份肛拭子标本及1份生蚝样品,采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测诺如病毒核酸,阳性标本再进行实时荧光定量RT-PCR扩增,扩增产物经过凝胶电泳分析后,进行序列测定,确定基因型,并进行系统发育树分析。结果 11份肛拭子标本中检出5株GI组诺如病毒株,2株测序成功,检出4株GII组病毒株,3株测序成功;1份生蚝样品中检出1株GI组病毒株,测序成功。对测序成功的6株病毒株进行同源性分析,GI.2型病毒株所测序列与2014年上海株KP325648等6株参考株高度同源,GII.17型病毒株所测序列与2015年韩国株KT384078等8株参考株高度同源,证实这是一起由GI.2和GII.17型诺如病毒混合感染引起的聚集性胃肠炎事件,GII.17型病毒株为厦门市首次报道。结论 此次聚集性胃肠炎事件是由诺如病毒引起,且为GI.2与GII.17型病毒株混合感染引起。

关键词:诺如病毒;胃肠炎;生蚝;基因型;系统发育树;厦门;思明区;食源性疾病

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2017)01-0042-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2017.01.009

Pathogenic molecular biological characteristics analysis of a suspected foodborne *Norovirus* gastroenteritis incident

WANG Kun-ming, KE Ming-yue, SHI Hong, LIN Ying-hua

(Siming District Center for Disease Control and Prevention of Xiamen, Fujian Xiamen 361009, China)

Abstract: Objective To analyze the molecular biological characteristics of *Norovirus* from a gastroenteritis incident in Siming District. **Methods** Eleven anal swab specimens and one oyster samples were collected and fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method was applied to detect *Norovirus*. The positive samples were amplified by RT-PCR, and amplified products were used for gel electrophoresis analysis and sequencing to determine the genotype and to make phylogenetic trees analysis. **Results** Two strains of GI *Norovirus* were detected from 11 anal swab specimens, and both were successfully sequenced. Four strains of GII were detected, and 3 strains were successfully sequenced. One strain of GI was detected from the oyster, and was successfully sequenced. Six positive strains successfully sequenced were further homology analyzed. The sequence of the GI.2 strain were highly homologous with the reference strains of KP325648 etc. collected from Shanghai in 2014. The sequence of GII.17 strain were highly homologous with the reference strains of KT384078 etc. collected from South Korea in 2015. GII.17 strain was reported for the first time in Xiamen.

Conclusion The aggregated gastroenteritis incident was caused by mixed infection of GI.2 and GII.17 *Norovirus*.

Key words: *Norovirus*; gastroenteritis; oyster; genotype; phylogenetic tree; Xiamen; Siming District; foodborne diseases

诺如病毒(*Norovirus*, NoV)属于人类杯状病毒科,感染性强,少量(10~100个)的病毒粒子即可引发感染^[1],可通过污染的水或食物经粪-口途径传播,是引起急性非细菌性肠胃炎暴发的重要病原体^[2-3],世界卫生组织(WHO)已将其定为B类病原^[4]。NoV感染

性胃肠炎多发于冬春季节,易呈聚集性。2016年2月,厦门市思明区发生一起杭州赴厦门旅游团疑似食源性聚集性胃肠炎事件,多名游客出现以呕吐、腹泻为主的胃肠炎症状,经流行病学调查和实验室检测,确认由NoV引起,本研究主要对引起本次事件的病原进行分子生物学特征分析。

收稿日期:2016-10-20

作者简介:王坤明 男 主管技师 研究方向为病原微生物检验

E-mail:619352369@qq.com

通信作者:柯明月 女 主任技师 研究方向为卫生检验

E-mail:kmy1973@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例定义

该旅游团共 6 名游客,本次事件将病例定义为“2016 年 2 月 16 ~ 19 日,该旅行团中,出现腹泻(≥ 3 次/d 伴粪便性状改变)或呕吐(≥ 1 次/d),且伴有发热、恶心、腹痛等其他症状之一者”,根据此标准确定 5 名患者。

1.1.2 样本

共采集 5 名患者、1 名同行游客无症状者和 5 名无症状厨师肛拭子,并采集与可疑餐次同货源的生蚝样品 1 份(10 个)。

1.1.3 对照品

阳性对照品为本实验室保存的 NoV GI、GII 型阳性粪便标本,阴性对照品为本实验室保存的 NoV GI、GII 型阴性粪便标本。

1.1.4 主要仪器与试剂

7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI)、旋涡振荡器、匀浆器。

一步法 NoV GI、GII 型核酸荧光 RT-PCR 检测试剂盒(上海之江生物科技有限公司),Roche High Pure Viral RNA Kit 试剂盒(罗氏公司),甘氨酸缓冲液(配方含 0.05 mol/L 甘氨酸,0.15 mol/L 氯化钠,pH = 9.5,批号:212F065),16% 聚乙二醇 6 000 溶液(配方含 0.3 mol/L 氯化钠,16% 聚乙二醇 6 000,批号:1226A033),Rnase/Dnase-free Water(批号:LZ-0518S14014L)。

1.2 方法

1.2.1 样本处理

肛拭子:放入 1 ml 磷酸盐缓冲液中,经旋涡振荡器混匀,标本悬液经 12 000 r/min 高速离心 15 min 后,吸取上清液于 1.5 ml 离心管即为 RNA 粗提液,备用。

生蚝:用手术剪刀开壳,尽量去除外膜及消化腺周围的脂肪组织等,取消化腺约 3 g,置于中速匀浆器匀浆 1 min,将匀浆液放入灭菌的均质袋中,加入 7 倍体积 0.05 mol/L 甘氨酸缓冲液,室温下充分振荡后分装于 50 ml 离心管中,4 ℃ 3 000 × g 离心 30 min。将上清液转移至新的 50 ml 离心管中,调 pH 值至 7.5,加入等体积 16% 聚乙二醇 6 000 溶液,轻微混匀,4 ℃ 沉淀 4 h 后,4 ℃ 3 000 × g 离心 30 min。弃上清,沉淀,用 1.5 ml 0.15 mol/L Na_2HPO_4 溶液重悬,室温下 100 r/min 振荡 20 min 后,分装于 1.5 ml 的无 RNA 酶的离心管中,4 ℃ 10 000 × g 离心 30 min。将上清液移至新的 1.5 ml 无 RNA 酶的离心管中,并调节 pH 值至 7.4 即为 RNA 粗提液,备用。

1.2.2 核酸提取与实时荧光定量 RT-PCR 检测

将 RNA 粗提液用 Roche High Pure Viral RNA

Kit 试剂盒按照说明书吸附柱法提取病毒 RNA。采用实时荧光定量 RT-PCR 法进行检测,使用一步法 NoV GI、GII 核酸荧光 RT-PCR 检测试剂盒。按照试剂盒说明书配制试剂,设置质控对照(包括阳性、阴性、空白对照)。

仪器扩增反应条件:45 ℃ 逆转录 10 min;95 ℃ 变性 15 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 1 min,40 个循环,羧基荧光素(FAM)通道检测荧光。

结果判定:当质控对照正常,样品 C_t 值 < 36 时,判为阳性; C_t 值 > 38 时,判为阴性;36 < C_t 值 < 38 时,判为可疑,需再次检测,若 C_t 值 ≤ 38 ,判为阳性,否则判为阴性。

1.2.3 核酸扩增与测序

根据实时荧光定量 RT-PCR 基因组检测结果,对样本 RNA 提取液进行基因关键区域 ORF2(VP1 衣壳蛋白区)实时荧光定量 RT-PCR 核酸扩增,GI、GII 组引物序列见表 1,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。扩增后进行琼脂糖凝胶电泳分析,阳性扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司测序。

表 1 NoV GI、GII 组扩增引物^[5]

Table 1 NoV GI、GII group amplification primer				
基因组	引物名称	引物序列(5'-3')	引物位置	片段大小/bp
GI	GI-SK-F	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	5342-5361	330
	GI-SK-R	CCA ACC CAR CCA TTR TACA	5671-5653	
GII	CoG2-F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	5003-5028	387
	G2-SK-R	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TACAT	5389-5367	

1.2.4 序列分析

应用 NoV 基因分型工具(<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool#/>)将测序成功的序列进行基因分型,同时将获得的序列应用 BLAST 在 GenBank 寻找相近序列。应用 Mega 5.1 软件 ClustalW 进行序列的比对和分析;并应用 Mega 5.1 软件 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,参考株均来自于 GenBank 数据库。

2 结果

2.1 NoV 检出情况

实时荧光定量 RT-PCR 检测 11 份肛拭子标本,6 份游客肛拭子全部检出 NoV,其中 3 份为 GI 和 GII 组,2 份为 GI 组,1 份为 GII 组;5 份无症状厨师肛拭子均未检出 NoV;1 份牡蛎样品中,检出 GI 组 NoV。

2.2 NoV 基因分型

将检出的 10 株 NoV PCR 产物进行测序,6 株测序成功,将获得的序列用 NoV 基因在线分型工具分型,6 份游客肛拭子检出 2 株 GI.2 型毒株,3 株

GII. 17 型毒株;1 份生蚝样品检出 1 株 GI. 2 型毒株。见表 2。

表 2 样本检测分型结果

Table 2 Sample detection classification results

样本编号	类别	基因组或基因型	样本来源
160218JC01	肛拭子	GII. 17	发病游客 1
160218JC02	肛拭子	GI	发病游客 2
160218JC03	肛拭子	GI. 2	发病游客 3
160218JC04	肛拭子	GI + GII. 17	发病游客 4
160218JC05	肛拭子	GI + GII. 17	发病游客 5
160218JC06	肛拭子	GI. 2 + GII	无症状游客 6
160218JC07	肛拭子	—	无症状厨师 1
160218JC08	肛拭子	—	无症状厨师 2
160218JC09	肛拭子	—	无症状厨师 3
160218JC10	肛拭子	—	无症状厨师 4
160218JC11	肛拭子	—	无症状厨师 5
160218JCSH	食品	GI. 2	生蚝

注:—表示未检出 NoV 核酸

2.3 NoV VP1 基因同源性和系统发育数分析

2.3.1 GI、GII 组毒株序列比对

分别将 GI、GII 组毒株序列进行序列比对,结果显示:游客肛拭子标本 160218JC03、160218JC06 与生蚝 160218JCSH 同源性为 100%,均为 GI. 2 型;游客肛拭子标本 160218JC01、160218JC04、160218JC05 核苷酸序列同源性为 100%,均为 GII. 17 型。将序

列提交到 GenBank 数据库与参考株进行同源性分析,3 株 GI 组株与 2014 年上海株 KP325648、2013 年荆州株 KF306212、2013 年湖州株 KM462611 同源性 100%,与 2015 年韩国株 KT383951、2016 年日本株 LC128710 同源性 99%,与 1996 年英国株 AJ277610 同源性 97%;3 株 GII 组株与 2015 年韩国株 KT384078、2015 年中国香港株 KT780416 同源性 100%,与 2015 年南阳株 KT992789、2015 年广州株 KT970377、2015 年中国台湾彰化株 KR052020、2014 年美国盖瑟斯堡株 KR083017、2015 年韩国株 KU561256、2015 年日本川崎株 LC037415 同源性 99%。

2.3.2 GI、GII 组系统发育树分析

GI、GII 组系统发育树分析结果显示:3 株 GI 组株与上海株 KP325648、荆州株 KF306212、湖州株 KM462611、韩国株 KT383951 及日本株 LC128710 亲缘关系较近,处于同一个进化簇内,同属于一个进化分支,均为 GI. 2 型,见图 1。3 株 GII 组株与韩国株 KT384078、中国香港株 KT780416、南阳株 KT992789、广州株 KT970377、中国台湾株彰化株 KR052020、美国盖瑟斯堡株 KR083017、韩国株 KU561256、日本川崎株 LC037415 处于同一进化簇,同属于一个进化分支,均为 GII. 17 型,见图 2。

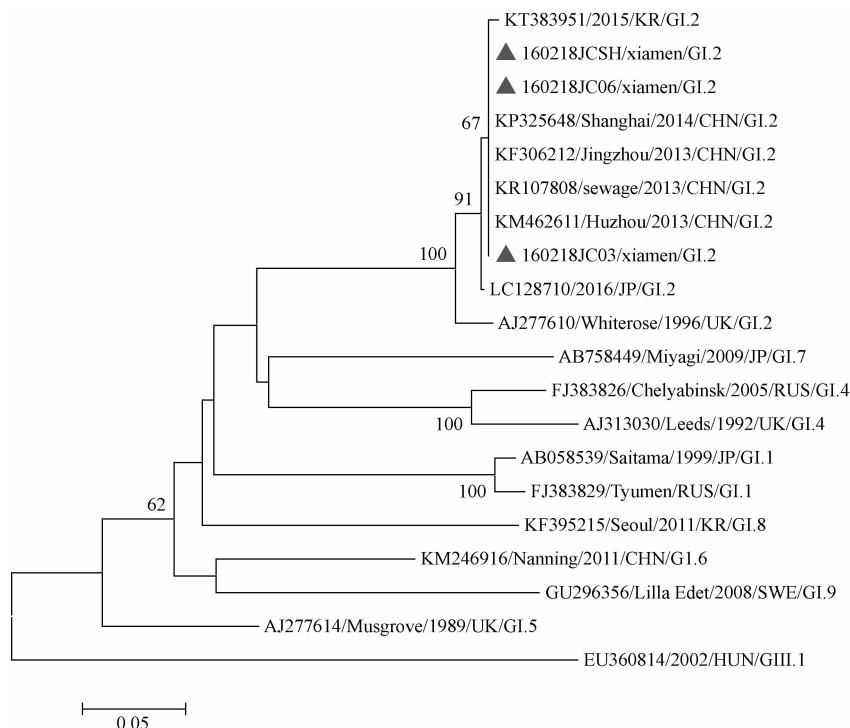


图 1 NoV GI 组 VP1 核苷酸序列系统发育树

Figure 1 NoV GI group VP1 nucleotide sequence phylogenetic tree

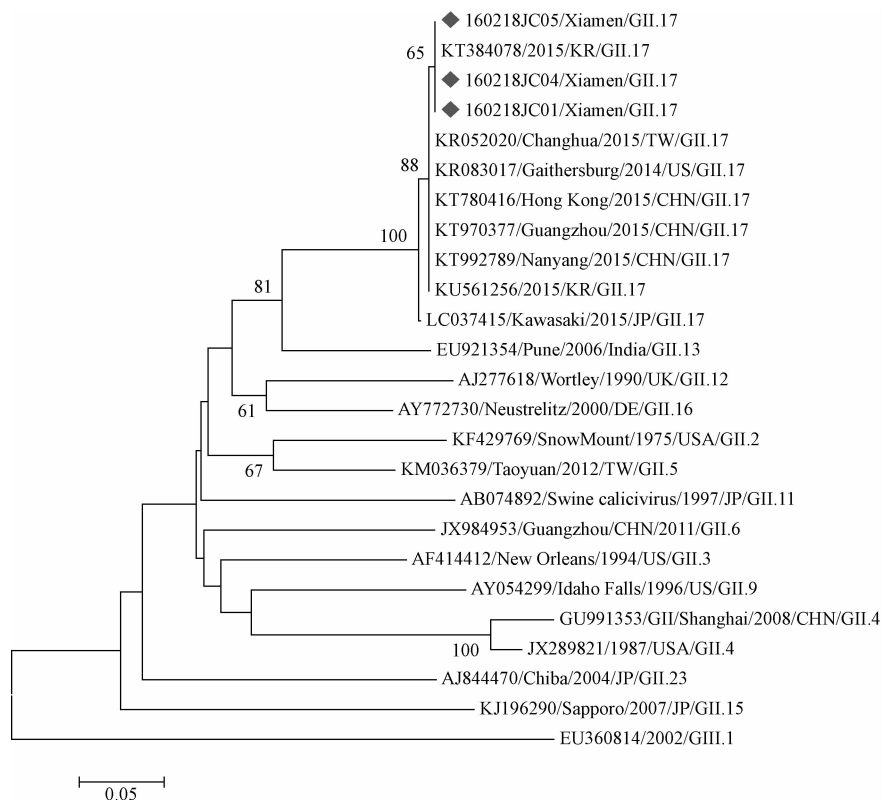


图2 NoV GII 组 VP1 核苷酸序列系统发育树

Figure 2 NoV GII group VP1 nucleotide sequence phylogenetic tree

3 讨论

NoV 基因组包含 3 个开放阅读框 (Open reading frames, ORFs)。ORF1 编码非结构蛋白,包括 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp); ORF2 和 ORF3 分别编码主要 (VP1) 和次要 (VP2) 衣壳蛋白。根据抗原性和核苷酸序列的变异程度可分成 5 个基因组 (genogroup, GI-G V), 其中 GI 组有 8 个基因型, GII 组有 21 个基因型, GI 和 GII 组是感染人类的主要基因组。本研究在涉事游客中检出 2 株 GI. 2 型毒株, 序列比对同源性为 100%; 在涉事游客中检出 3 株 GII. 17 型毒株, 序列比对同源性为 100%。结合流行病学调查、患者的临床表现, 确认这是一起由 GI. 2 和 GII. 17 型 NoV 混合感染引起的胃肠炎事件, 进一步验证了思明区胃肠炎事件存在 GI 和 GII 混合感染的报道^[6]。GII. 4 型一直是国内 NoV 胃肠炎的主要流行株^[4,7-8], 但近年来 GII. 17 型 NoV 引起的胃肠炎报道也日益增多^[9-11], 而 GII. 2^[12]、GII. 3^[13]、GI. 2^[14] 等型也有报道。

本研究在涉事游客中检出 3 株 GII. 17 型毒株, 这是厦门地区首次报道检出 GII. 17 型毒株, 与 2015 年韩国株 KT384078 等 2 株参考株同源性 100%, 与 2015 年南阳株 KT992789 等 6 株参考株同源性 99%, 均属于同一进化分支, 表明该株与上述参考株高度同源, 该株及变异株正在成为我国及周边国家

的优势株, 有进一步流行的可能^[15]。由于厦门地区历史流行优势株为 GII. 4 型^[16], 人群对 GII. 17 型普遍缺乏免疫力, 其有可能在思明区流行并成为优势株, 这些有待今后进一步跟进 NoV 胃肠炎事件调查和病原分子生物学的分析研究。这也提示疾病防控相关部门, 应加大 GII. 17 型 NoV 株的监测, 密切注意其流行动态。

在涉事游客中检出的 2 株 GI. 2 型毒株和在生蚝样品中检出的 1 株 GI. 2 型毒株, 与 2014 年上海株 KP325648 等 3 株参考株同源性 100%, 与 2015 年韩国株 KT383951 等 2 株参考株同源性 99%。该事件 5 名患者发病时间分布情况提示单一同源感染, 根据 NoV 潜伏期, 结合此次事件的发病高峰, 推断感染餐次为食用烤生蚝的当餐, 而在与涉事烤生蚝同一货源的生蚝中检出与涉事游客感染的 NoV 序列比对同源性 100%、基因型一致的病毒株, 可以推断此次事件极有可能是食用被 NoV 污染的烤生蚝引起。生蚝的消化腺能富集外源性致病因子, 包括 NoV 等^[17], 国外已有多起因食用生蚝引起的 NoV 感染事件的报道^[18-19], 但国内尚未有在食源性 NoV 胃肠炎事件的食材中检出 NoV 并进行分型的报道。此次事件从与涉事同一来源的生蚝中检出与患者同源性一致的病毒株, 进一步印证了厦门地区存在食用受污染生蚝引发食源性疾病的风险。

需要指出的是, 在涉事游客中检出 GI. 2 型和

GII.17型,而在生蚝样品中仅检出GI.2型,未检出GII.17型,这可能是由于生蚝样品的均匀性问题,使得所取样品未含有GII.17型,或含量低于本研究所用方法的检出限,导致检测结果阴性。

厦门地区市售生蚝NoV污染较为普遍,污染水平较高,生蚝又是该地区消费量最大的海产品之一,由污染生蚝介导引发食源性疾病的风险较高^[20],有关部门应该引起足够重视,采取必要的预防控制措施。相关执法部门应加强对餐饮业的监督执法,加大卫生宣传力度,加强餐饮从业者食品安全培训,提高食品安全卫生意识,注意食材的加工制作,特别是生蚝等贝类海产品应该彻底煮熟、烤熟,做到生熟分开,防止交叉污染;及时将患病的餐饮从业人员调离岗位,防止污染食品;同时引导消费者养成良好的饮食习惯,不吃生或半生的生蚝等海产品,减小NoV感染风险。

参考文献

- [1] Glass R I, Noel J, Ando T, et al. The epidemiology of enteric *Caliciviruses* from humans; a reassessment using new diagnostics [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(2):254-261.
- [2] 周晓红,李晖,杨杏芬. 食源性及水源性诺如病毒研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(9):1213-1214.
- [3] 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):549-553.
- [4] 吴清平,薛亮,张菊梅. 诺如病毒流行株GII.4型进化研究进展[J]. *微生物学报*, 2012, 52(12):1431-438.
- [5] 廖巧红,冉陆,靳森,等. 诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南(2015版)[J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(1):7-16.
- [6] 王坤明,陈佳璐,柯明月,等. 思明区2013—2015年诺如病毒聚集性胃肠炎基因群分布特征[J]. *海峡预防医学杂志*, 2016, 22(1):28-30.
- [7] 许灵波. 诺如病毒GII.4型流行株基因序列分析和流行病学研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(7):607-612.
- [8] 周永康,靳森,李宇宁,等. GII.4型诺如病毒的进化及疫苗研究进展[J]. *中国科学:生命科学*, 2015, 45(12):1185-1193.
- [9] 陆剑勇,戴传文,邱星元,等. 一起GII.17型诺如病毒感染性胃肠炎暴发疫情流行病学调查[J]. *职业与健康*, 2015, 31(17):2431-2433.
- [10] 荆红波,张爽,邵占涛,等. 一起GII.17型诺如病毒感染疫情的分子流行病学分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015(21):3697-3699.
- [11] 那永东,乙引. 诺如病毒GII.17型在盘锦地区的检出和鉴定[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(22):3861-3862.
- [12] 沈纪川,刘于飞,李巧艳,等. 2008年广州市婴幼儿诺如病毒感染流行特征及基因型研究[J]. *华南预防医学*, 2010, 36(5):1-4.
- [13] 李静,李国明,张婷,等. 2012—2013年湖北省襄阳地区病毒性腹泻的病原学分析[J]. *中国预防医学杂志*, 2015, 16(4):245-251.
- [14] 纪雷,吴晓芳,徐德顺,等. 湖州市非细菌性急性胃肠炎暴发中诺如病毒的分子生物学特点初步研究[J]. *病毒学报*, 2011, 27(5):469-474.
- [15] 荆红波,张爽,邵占涛,等. 一起GII.17型诺如病毒感染疫情的分子流行病学分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(21):3697-3699.
- [16] 陈智浩,黄草玲,陈小丽,等. 厦门地区婴幼儿腹泻诺如病毒的基因分型研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(11):2654-2656.
- [17] Metcalf T G, Melnick J L, Estes M K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology—a trip of over 50 years[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49(2):461-487.
- [18] Shieh Y, Monroe S S, Fankhauser R L, et al. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness[J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(2):360-366.
- [19] Westrell T, Dusch V, Ethelberg S, et al. *Norovirus* outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010[J]. *Euro Surveill*, 2010, 15(12):8-11.
- [20] 柯明月,王坤明,陈佳璐,等. 2014年厦门地区市售牡蛎诺如病毒感染状况调查分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(10):1634-1637.

欢迎投稿《中国食品卫生杂志》网址: www.zgspws.com