

· 现场调查 ·

云南省某中学一起诺如病毒暴发疫情的病原鉴定和基因特征分析

李楠¹ 姜黎黎¹ 周永明¹ 牟建春² 倪刚³ 周晓芳¹ 曹亿会¹

¹云南省疾病预防控制中心急性传染病防制所, 昆明 650022; ²云南省红河州疾病预防控制中心急性传染病防制与突发公共卫生事件应急处置科, 蒙自 661199; ³云南省红河州疾病预防控制中心卫生检验中心, 蒙自 661199

通信作者: 曹亿会, Email: 526505779@qq.com

【摘要】 目的 明确 2022 年云南省某中学一起急性肠胃炎暴发疫情的病原和基因特征。方法 采集这起暴发疫情中的学生和厨工病例的肛拭子, 使用诺如病毒 G I /G II 双通道核酸检测试剂盒定性检测。G I 和 G II 阳性的样本分别采用引物 G1SKF/G1SKR 和 MON431/G2SKR 进行病毒扩增和测序, 通过在线分型工具及系统进化分析确定病毒基因型别。结果 共采集 58 份肛拭子, 实验室检测阳性率为 53.45%(31/58)。其中, G I 阳性样本 22 份, G II 阳性样本 14 份, G I 和 G II 合并感染样本 5 份。31 份阳性样本基因测序获得毒株序列 22 株, 包括诺如病毒 G I 型 15 株, 其中 G I .6[P6]型 9 株、G I 6.[P11]型 6 株; 诺如病毒 G II .4[P16]型 7 株。结论 本起疫情由诺如病毒 G I .6[P6]型、G I .6[P11]型和 G II .4[P16]型混合感染引起, 这是云南省首次在诺如病毒暴发疫情中检出 G I 型。

【关键词】 诺罗病毒; 急性肠胃炎; 暴发; G I 型

基金项目: 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室开放研究基金(2020KF001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220429-00090

Pathogen identification and genetic characteristics of a norovirus outbreak in a middle school in Yunnan Province

Li Nan¹, Jiang Lili¹, Zhou Yongming¹, Mou Jianchun², Ni Gang³, Zhou Xiaofang¹, Cao Yihui¹

¹Institute for Acute Communicable Disease Prevention and Control, Yunnan Center for Disease Control & Prevention, Kunming 650022, China; ²Division for Prevention and Control of Acute Infectious Diseases and Emergency Handling of Public Health Emergencies, Honghe Center for Disease Control and Prevention, Mengzi 661199, China; ³Health Laboratory Center, Honghe Center for Disease Control and Prevention, Mengzi 661199, China

Corresponding author: Cao Yihui, Email: 526505779@qq.com

【Abstract】 Objective To clarify the pathogen and genetic characteristics of an outbreak of acute gastroenteritis in a middle school in Yunnan Province in 2022. **Methods** Rectal swabs collected from students and kitchen workers in this outbreak were detected by norovirus G I /G II nucleic acid detection kit. The aimed part of norovirus from G I /G II -positive samples were amplified and sequenced by primer G1SKF/G1SKR and MON431/G2SKR. The genotypes were preliminarily determined by online typing tools and phylogenetic analysis. **Results** A total of 58 rectal swabs were tested, of which 31 samples were positive with the positive rate of 53.45%(31/58). Among them, 22 samples were positive for G I and 14 samples were positive for G II. There were 5 samples co-infected with G I and G II. A total of 22 sequences were obtained from 31 positive samples. There were 15 G I strains including 9 G I .6[P6] strains and 6 G I .6[P11] strains, and 7 G II .4[P16] strains. **Conclusions** This outbreak is caused by norovirus G I .6[P6], G I .6[P11] and G II .4[P16]. It is the first time that G I genotype is detected in the norovirus outbreak in Yunnan Province.

【Key words】 Norovirus; Acute gastroenteritis; Outbreak; G I genotype

Fund program: Open Research Fund of Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Disease(2020KF001)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20220429-00090

急性胃肠炎是一种以恶心、呕吐、腹痛、腹泻和发热等为主要临床症状的疾病。诺如病毒(又称诺罗病毒, norovirus)是引起人类非细菌性急性肠胃炎和食源性急性肠胃炎暴发的主要原因之一, 可经人、水和食物等多种途径传播, 人群普遍易感, 每年 10 月到次年 3 月为感染暴发高峰期^[1]。诺如病毒基因型别众多, 容易通过突变和同源重组发生变异, 感染后人群的免疫保护力仅能持续 6~24 个月, 同一个体可重复感染相同毒株和不同毒株^[2]。常引起学校、养老院、医疗机构等密闭环境的暴发疫情^[3]。2022 年 1 月, 云南省某中学发生了一起急性肠胃炎疫情, 经实验室核酸检测, 判定为 G I、G II 诺如病毒混合感染所致的暴发疫情。本文对这起疫情中获得的诺如病毒基因序列进行分析比对, 以了解其基因特征。

对象与方法

一、研究对象

收集本次诺如病毒暴发疫情中的疑似病例。本次疫情的疑似病例: 2022 年 1 月 9 日以来, 云南省某中学 24 h 内出现排便 ≥ 3 次且有性状改变(呈稀水样便), 和(或) 24 h 内出现呕吐 ≥ 2 次者。共计 263 例疑似病例纳入研究。采集学生病例肛拭子 35 份、厨工病例肛拭子 23 份, 共计 58 份。采集样本前告知采样对象或监护人采样目的并征得同意。

二、仪器与试剂

仪器包括美国 ABI 公司 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司实时荧光定量 PCR 仪, 江苏硕世生物科技有限公司核酸提取仪。试剂包括江苏硕世生物科技公司的快速病毒核酸提取试剂盒(批号: SDK60104), 中山大学达安基因股份有限公司的诺如病毒 G I/G II 双通道核酸提取试剂盒(批号: 20220315), 德国 QIAGEN 公司 Onestep RT-PCR Kit(批号: 210212)。引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

三、实验室检测

按照《诺如病毒感染暴发调查和预防控制技术指南(2015 版)》^[2]处理样本提取病毒 RNA 检测, 检测条件及结果判读参照试剂盒说明书。

四、病毒基因分型

对检测结果 G I 和 G II 阳性的样本分别采用引物 G1SKF/G1SKR 和 MON431/G2SKR 进行扩增, 引物见文献[4]。目标片段分别为 330 和 570 bp, 反应条件: 42 °C 反转录 30 min; 预变性 95 °C 15 min; 95 °C 变性 30 s、50 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将扩增产物送北京擎科生物科技有限公司双向测序。获得的序列应用 DNA Star 的 SeqMan 软件拼接整理, 使用 BLAST 比对和荷兰在线分析软件(Norovirus Typing Tool Version 2.0)进行基因分型。从 GenBank 下载诺如病毒各基因型代表株序列, 用 Mega5.0 软件进行同源性分析并构建系统进化树。

结 果

一、疫情概况

这起疫情首例病例出现在 2022 年 1 月 9 日, 末例病例出现在 1 月 15 日, 累计报告病例 263 例。病例的主要症状为腹泻 (83.65%, 220/263)、腹痛 (78.33%, 206/263)、恶心 (68.44%, 180/263) 和呕吐 (65.02%, 171/263)。

二、实验室检测结果

58 份肛拭子样本, 实验室检测阳性 31 份, 阳性率 53.45%(31/58)。G I 型阳性病例 22 例, 包括学生 17 例, 厨工 5 例; G II 型阳性病例 14 例, 包括学生 9 例, 厨工 5 例。合并感染 G I 和 G II 的病例共 5 例。

三、诺如病毒基因分型

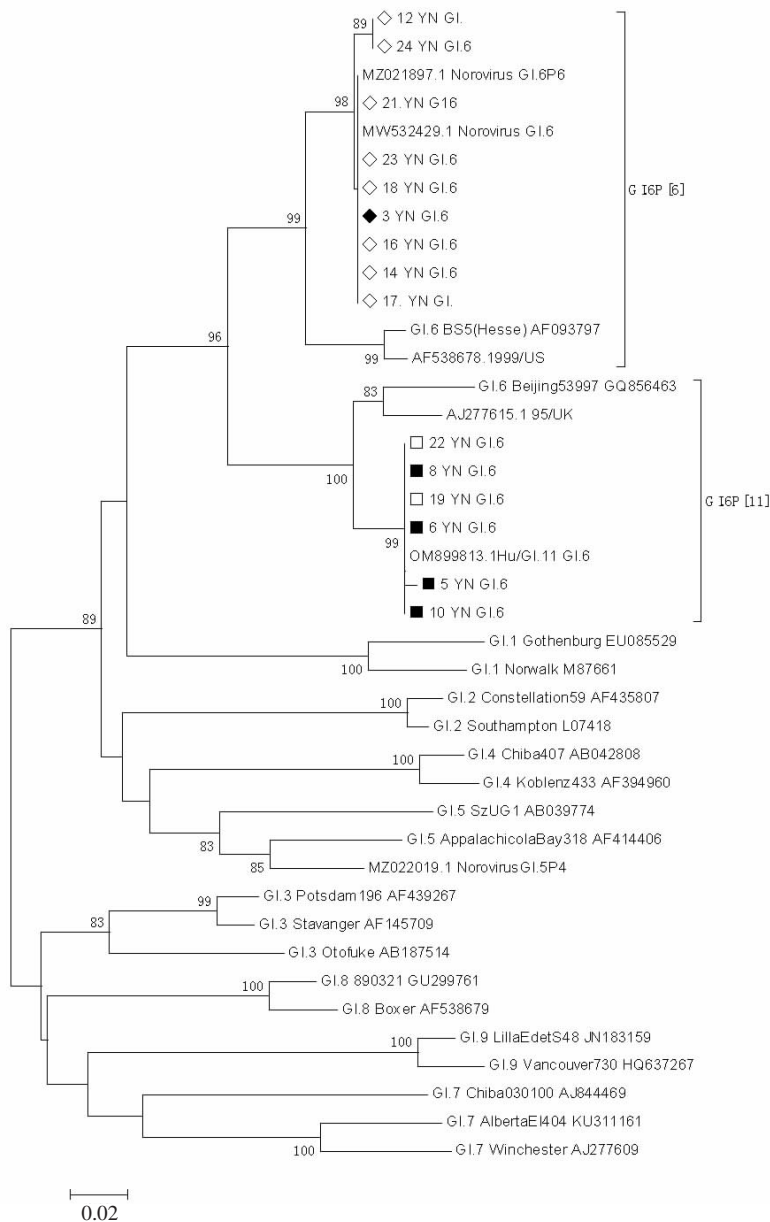
31 份阳性样本通过基因测序获得毒株序列 22 条。诺如病毒 G I 型 15 株, 其中 G I.6[P6]型 9 株、G I.6.[P11]型 6 株; G II 型 7 株, 均为 G II.4[P16]型。将这些序列分别与从 GenBank 下载的参考序列比对分析并构建系统进化树。所有的云南 G I.6[P6]型毒株序列都处在同一进化分支, 又进一步分为两簇, 与 2019 年韩国参考株 MW532429 相比, 样本 14、17、16、3、18、23、21 序列核苷酸和氨基酸 100% 同源, 样本 12 和 24 序列自成一簇, 与参考株相比核苷酸及氨基酸同源性分别为 89.2% 和 98.6%。6 条 G I.6.[P11] 型毒株序列核苷酸同源性 98.6%, 2022

年浙江参考株 OM899813 与样本 6、8、10、19、22 核苷酸和氨基酸同源性均为 100.0%; 与 5 号样本核苷酸同源性 98.6%，氨基酸同源性为 99.6%(图 1)。7 株云南 G II.4[P16]型毒株核苷酸和氨基酸 100%同源, 与参考株 KY887601 遗传距离较近, 样本 1、7、9、11、15、20 与参考株核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.0%、99.4%(图 2)。

讨 论

诺如病毒是杯状病毒科诺如病毒属, 单股正链

RNA 病毒, 无包膜。有 3 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs)。ORF1 编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶区 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp), ORF2 和 ORF3 分别编码主要衣壳蛋白 VP1 和次要衣壳蛋白 VP2^[5]。根据 VP1 区的基因多样性诺如病毒可分为 10 组, 其中引起人急性肠胃炎的两个主要基因组是 G I 和 G II^[6]。基于 VP1 区分型, G I 和 G II 可分为 9 和 27 个基因型; 基于 RdRp 区分型, G I 和 G II 可分为 14 和 37 个基因型^[7]。目前国际上推荐使用 RdRp 区和 VP1 区双区域分型系统^[8]。



注:◇为学生;◆为厨工;□为学生;■为厨工

图 1 G I 型诺如病毒衣壳区系统进化分析

近 20 年来, G II .4 是全球范围内诺如病毒所致急性肠胃炎暴发及散发的主要型别, 在急性肠胃炎暴发疫情中占比高达 60%~80%, 分别于 1995、2002、2004、2006 和 2012 年引起全球大流行^[9]。中国疾病预防控制中心自 2016 年启动了中国诺如病毒暴发监测网络(CaliciNet China), 近 4 年的监测数据显示诺如病毒 G II 型是引发国内的急性肠胃炎暴发疫情的主要原因, 其中以 G II .2[P16]、G II .3[P13]、G II .17[P17]、G II .6[P7]和 G II .4[P31]为主, G I 引起的暴发疫情, 主要是 G I .5[P4]、G I .6[P11]、G I .3 [P13]和 G I .2[P2], 而在不到 1%的暴发中检测到了 G I .1[P1]、G I .5[P12]、G I .6[P6]和 G II .13[P21]、

G II .15[P15]和 G II .4_sydney 2012[P16]等^[10]。

本次疫情存在 3 条传播链, 分别是 G I .6[P6]分支、G I .6[P11]分支和 G II .4[P16]分支。与国内大多数暴发疫情以 G II 型为优势基因型的情况不同^[11-12], 本次疫情以 G I 型为优势流行株, 国内仅浙江、河北、黑龙江和甘肃等地^[13-16]有诺如病毒 G I 型暴发疫情的报道。这也是云南省首次在诺如病毒暴发疫情中检出 G I 型, 以往云南省只在 2014—2015 年的常规监测中检出过 1 例诺如病毒 G I 型散发病例^[17]。

Barret 等^[18]研究发现诺如病毒 G II .4 型传播常与人传人有关, G I .3、G I .6、G II .3 型等常与食源性传播有关。在本起诺如病毒暴发疫情中, 虽未发

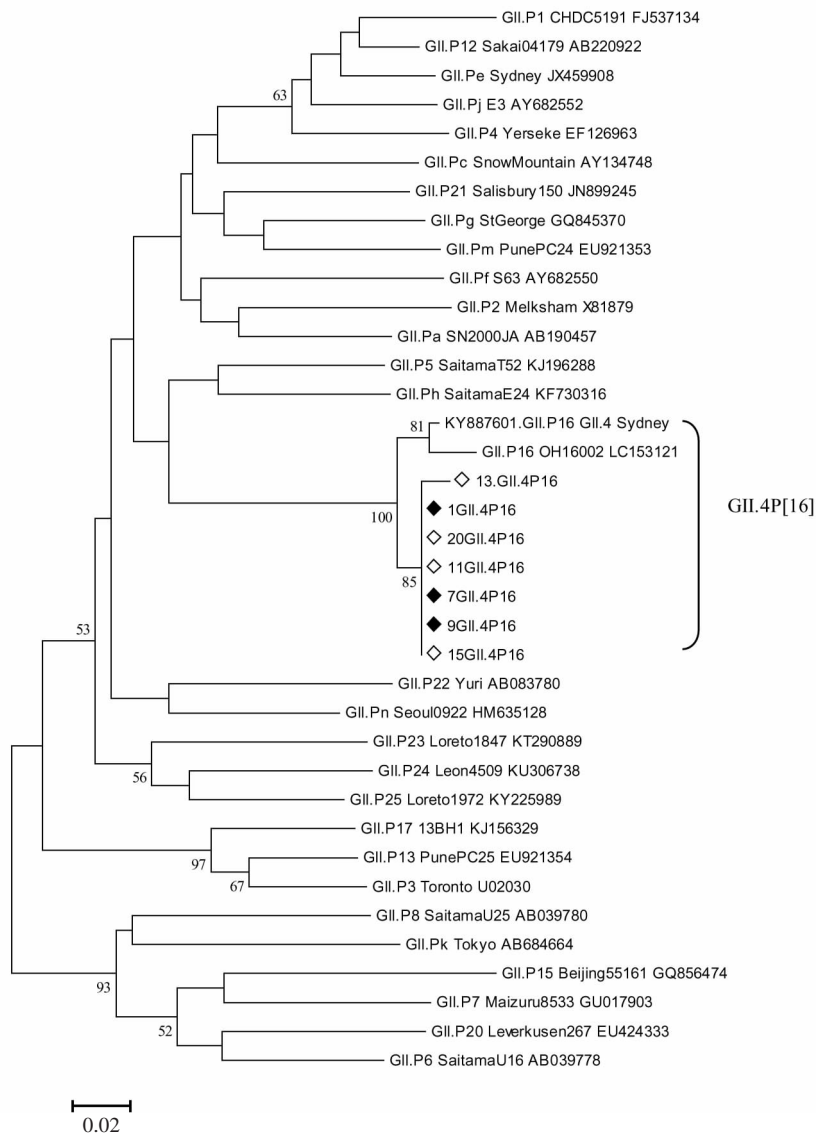


图 2 G II 型诺如病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶区及衣壳区系统进化分析

注: ◆为厨工; ◇为学生

现人传人的直接证据,且未能对涉事食堂的食物开展诺如病毒检测,但疫情调查中发现本起疫情中多名诺如病毒阳性厨工在首例学生病例出现前已有腹泻、呕吐等症状,且在食堂有工作过程中存在不戴口罩,加工食物及为学生取餐时不戴手套等违反卫生操作的行为。结合本起疫情 3 条传播链(G I .6 [P6]分支、G I .6[P11]分支和 G II .4[P16]分支)上均有学生及厨工分布的情况以及 Barret 等^[16]的研究结论,推测本起疫情可能是一起由人传人及食源性传播引起的诺如病毒 G I 型和 G II 型混合感染所致的诺如病毒暴发疫情。因此,建议学校除了继续加强对学生的晨检午检,还应加强对食堂工作人员的健康监测及食品卫生培训和监督。疾控部门除了继续加强诺如病毒疫情监测,开展诺如病毒基因型别研究,还应当后续的工作中,将食物的诺如病毒检测纳入暴发疫情监测工作中,以便更好、更准确地开展疫情溯源,为疫情防控、疫苗研发提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 李楠:研究设计、研究实施、撰写论文;姜黎黎:研究和实施、统计分析;周永明:研究和实施、工作支持;牟建春、倪刚:数据采集和分析;周晓芳、曹亿会:论文审阅、工作支持

参 考 文 献

- [1] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8): 725-730. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70767-4.
- [2] 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, (1): 7-16. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.01.003.
- [3] 宋晓佳, 张静, 施国庆. 2000-2013 年我国诺如病毒感染性胃肠炎暴发流行病学特征分析[J]. *疾病监测*, 2017, 32(2): 127-131. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2017.02.011.
- [4] Cannon JL, Barclay L, Collins NR, 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.
- [5] Inns T, Harris J, Vivancos R, et al. Community-based surveillance of norovirus disease: a systematic review[J]. *BMC Infect Dis*, 2017, 17(1): 657. DOI: 10.1186/s12879-017-2758-1.
- [6] Gao Z, Liu B, Yan H, et al. Norovirus outbreaks in Beijing, China, from 2014 to 2017[J]. *J Infect*, 2019, 79(2): 159-166. DOI: 10.1016/j.jinf.2019.05.019.
- [7] Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *J Gen Virol*, 2019, 100(10): 1393-1406. DOI: 10.1099/jgv.0.001318.
- [8] Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes[J]. *J Gen Virol*, 2019, 100(10): 1393-1406. DOI: 10.1099/jgv.0.001318.
- [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 G II .4 variants[J]. *J Clin Virol*, 2013, 56(3): 185-193. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.11.011.
- [10] 朱曦, 孔翔羽, 章青, 等. 2016-2019 年我国诺如病毒暴发疫情的分子流行病学特征分析[J]. *疾病监测*, 2021, 36(8): 774-779. DOI: 10.3784/jbjc.202106240363.
- [11] 朱敏, 丁春喜, 黄健, 等. 2017—2018 年浙江省嘉善县诺如病毒感染性腹泻疫情分析[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2019, 46(6): 530-533. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4149.2019.06.017.
- [12] 王丹丹, 田敏, 顾琦俊, 等. 嘉兴市一起诺如病毒胃肠炎暴发疫情的调查[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2021, 48(6): 471-474. DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20210523-00111.
- [13] 许军, 石鑫, 舒畅, 等. 黑龙江省 2016 年 4 起胃肠炎暴发中诺如病毒分子特征分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2018, 32(1): 57-61. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2018.01.012.
- [14] 赵文娜, 刘莹莹, 于秋丽, 等. 河北省保定市一起水源性诺如病毒暴发疫情的流行特征及病原学研究[J]. *国际病毒学杂志*, 2021, 28(3): 226-230. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2021.03.012.
- [15] 康倩, 陈建华, 汪鹏, 等. 2018 年甘肃省兰州市诺如病毒 G I 胃肠炎暴发疫情病原学分析[J]. *疾病监测*, 2020, 35(3): 269-273. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2020.03.019.
- [16] 冯微宏, 肖勇. 一起 G II 型诺如病毒混合感染疫情的病原鉴定及分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(11): 1573-1575, 1578.
- [17] 李颖颖, 古文鹏, 张顺先, 等. 昆明 2014-2015 年腹泻儿童杯状病毒分子流行病学研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2015, 29(5): 430-433. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2015.05.011.
- [18] Barret AS, Jourdan-da Silva N, Ambert-Balay K, et al. Surveillance for outbreaks of gastroenteritis in elderly long-term care facilities in France, November 2010 to May 2012[J]. *Euro Surveill*, 2014, 19(29): 20859. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.29.20859.

(收稿日期: 2022-04-29)