

• 论 著 •

诺如病毒 G II. 4 亚型新变异株全基因组序列的研究

周明莉, 蔡爱玲, 王雪峰[△]

(湖北省荆州市第三人民医院 434000)

摘要:目的 分析诺如病毒 G II. 4 亚型新变异株的全基因组序列, 了解其变异特点。方法 从 264 例患者腹泻物中提取 RNA 并进行 cDNA 合成, 对阳性样本进行 PCR 鉴定, 扩增片段进行测序。对测序结果显示为诺如病毒序列的进行全基因组测序并分析。结果 分离到新的悉尼 2012 G II. 4 变异株的类似株(荆州 2013 G II. 4 株), 全基因组序列测定发现新分离株出现了较大的变异, 包括 VP1 基因高变区(P2 区)的突变。结论 悉尼 2012 G II. 4 变异株的类似株已传播到中国, G II. 4 变异株 VP1 进化较快。提醒应密切关注诺如病毒在中国的传播和进化情况, 以助于疫苗的开发和治疗性单抗的制备。

关键词:诺如病毒; 悉尼 2012 G II. 4 变异株; 全基因组序列

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 02. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)02-0231-02

Research on nucleotide sequence of a newly emerged pandemic norovirus G II. 4 genotype

ZHOU Mingli, CAI Ailing, WANG Xuefeng[△]

(The Third People's Hospital of Jingzhou City, Jingzhou, Hubei 434000, China)

Abstract: Objective Analysis of the complete genome sequence about the newly emerged pandemic norovirus G II. 4 genotype, to understand its variation characteristics. **Methods** 264 patients were collected with diarrhea. The RNA was extracted from 264 fecal specimens and cDNA was synthesized. The positive samples were amplified by PCR, the amplified fragments were sequenced. The complete genome sequences of the norovirus was sequenced and analyzed. **Results** A new norovirus variant strain of Jingzhou G II. 4, a pleiston of Sydney G II. 4 was isolated. A large variation was found in the new variant subtype, which was mutated including in the hypervariable P2 domain of the major capsid protein VP1. **Conclusion** The result demonstrates the variant strain of Sydney G II. 4 was spread to China. VP1 of norovirus G II. 4 is evolving rapidly. The spread and evolution situation of the norovirus G II. 4 need to be closely monitored in China for the development of effective vaccines and therapeutic monoclonal antibodies.

Key words: Norovirus; variant strain of Sydney 2012 G II. 4; complete genome sequences

诺如病毒是 1 组杯状病毒属病毒, 其原型株诺瓦克病毒于 1968 年在美国诺瓦克市被首次发现而得名, 由于该组病毒极易变异, 此后在其他地区又相继发现并命名了多种类似病毒, 统称为诺如病毒^[1]。根据病毒的 RNA 聚合酶以及衣壳蛋白的核苷酸序列的差别, 将诺如病毒区分为 5 个遗传组, G I 型和 G II 型为导致非细菌性胃肠炎暴发的主要原因^[2-3]。感染者发病突然, 主要症状为恶心、呕吐、发热、腹痛和腹泻, 儿童以呕吐为主, 成人以腹泻为主。大多数感染者 1~3 d 后好转, 但老人、小孩和免疫力低下者可能导致严重脱水^[4]。主要流行株是 G II. 4 型, 因遗传高度变异, 2~3 年出现新的区域性或者全球流行变异株。其以肠道传播为主, 无论是发达国家还是发展中国家均有流行^[5]。诺如病毒在儿童腹泻中仅次于轮状病毒, 诺如病毒的蔓延已成为全球公共卫生中的大问题^[6]。

1 材料与方 法

1.1 标本收集 2013 年 9 月至 2014 年 12 月留取本院门诊和住院所有腹泻患者的稀水便或水样便 264 例, 并详细记录患者的病史。

1.2 核酸提取 用 0.01 mmol 磷酸缓冲液、pH7.2 重悬将患有急性肠胃炎门诊和住院患者的 264 例粪便样本制成 20% 悬液(W/V), 低速离心后取 140 μL 上清液, 使用 QIAamp Viral RNA mini Kit 进行 RNA 提取, 提取步骤按照说明书进行。使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 对提取的 RNA 进行第一链 cDNA 合成。

1.3 诺如病毒的检测 使用 Takara 公司诺如病毒荧光检测

试剂盒对合成的第一链 cDNA 进行 RT-PCR 扩增, 检测筛查出阳性样本。利用混合简并引物对阳性样本进行 PCR 鉴定。

1.4 核酸序列测定及分析 将 PCR 产物纯化后送往武汉生物制品研究所进行测序。测序结果显示为诺如病毒序列时, 进行同源序列比较, 寻找同源毒株设计引物进行全基因组测序, 并分别与悉尼 2012 原型株和湖州 2013 分离株进行分析比较, 采用 BEAST 软件包分析目前流行的悉尼 2012 变异株的进化情况, 所用参考株序列来源于 Genbank 数据库。

2 结 果

2.1 诺如病毒 RT-PCR 检测结果 使用诺如病毒荧光检测试剂盒对合成的第一链 cDNA 进行检测, 筛查出阳性样本。从 264 例患者腹泻物中检测出 44 例诺如病毒 G I 和 G II 阳性, 其中 G I 阳性 1 例, G II 阳性 43 例, 阳性率 16.7%。阳性患者主要以老人和 5 岁以下儿童为主, 男婴阳性略高于女婴; 6~12 个月婴儿阳性比例最高。6~7 月和 10~12 月发病比例较高。

2.2 核酸序列测定结果 从湖北省荆州市 1 例急性肠胃炎的 2 岁男童患者粪便中分离到新的悉尼 2012 G II. 4 变异株的类似株(荆州 2013 G II. 4 株), 并完成了全基因组序列测定(Genbank 录入号, KF306214)。该分离株基因组全长 7 559 个核苷酸, 外加 1 个多聚 A 尾巴, 3' 端非编码区有 46 个核苷酸。和悉尼 2012 原型株(Genbank 录入号, JX459908.1)相比, 在开放阅读框 1、2、3 中分别有 54、24 和 9 个核苷酸差异, 这些差异分别引起了相应的阅读框中的 10、7 和 4 个氨基酸差异。导致氨基

酸变异的 7 个突变位于编码主衣壳蛋白 VP1 的开放阅读框 2 中,其中 4 个突变位于高变区(P2 区)。P2 区的 4 个变异氨基酸中,残基 373 和 377 直接相邻预测存在的表位 C(由氨基酸残基 296 和 372 组成)以及表位 B(由氨基酸残基 340 和 376 组成)。

2.3 变异株进化情况分析 使用 BEAST 软件包分析了时间跨度达 39 年(1974—2013 年)的 76 个 G II.4 分离株的全基因组序列。根据最保守的分子进化钟模型,G II.4 变异株最近祖先约出现在 40 年前,核苷酸单位点替换率为 4.80×10^{-3} 核苷酸/(位点 × 年) [$(4.33 \sim 5.28) \times 10^{-3}$]。根据上述分析,可推断出最大分支可信树,结果显示目前流行的悉尼 2012 变异株可能来自 20 世纪 80 年代的 CHDC 株。

3 讨论

近年来,国内已报道多起诺如病毒感染事件。诺如病毒感染主要通过粪、口传播,在冬季多隐藏在贝类海鲜等食物中,并可通过患者的排泄物和呕吐物污染环境,进行传播。诺如病毒的基因易发生突变,可引起抗原转变和重组,从而产生新的感染毒株。2012 年 3 月在悉尼发现了新的 G II.4 型变异株,随后该变异株很快传播到北美、美洲、欧洲和其他地区。根据报道,全球诺如病毒胃肠炎疫情大部分由 G II.4 型诺如病毒感染引起^[7-9]。悉尼 G II.4 类似株首先在 2013 年 1 月发现于中国湖州。

本研究中,新的悉尼 2012 G II.4 变异株的类似株(荆州 2013 G II.4 株)和悉尼 2012 原型株相比,发现新分离株已经出现了较大的变异,包括存在于主衣壳蛋白 VP1 基因高变区(P2 区)的突变。其变异可能导致新的变异株和体内相应抗体结合力减弱以及和组织血型抗原结合力出现变化,和湖州 2013 分离株的 VP1 序列相比,存在 14 个核苷酸差异,导致了相应的 2 个氨基酸差异。

目前悉尼 2012 G II.4 流行株类似变异株已传播到中国及世界其他地方,且 G II.4 变异株 VP1 进化较快。诺如病毒的基因易发生突变,可引起抗原转变和重组,从而产生新的感染毒株,机体感染诺如病毒后,各亚型毒株间缺乏完全的交叉保护,人体感染后的免疫力也不持久,可发生反复感染。对全球流行株主衣壳蛋白抗原性变异的认识有助于疫苗开发和治疗性单抗制备。随着我国因诺如病毒而暴发的病毒性胃肠炎报道的增加,诺如病毒的严重性及危害性也受到广泛的重视^[10]。考虑到中国人口众多以及诺如病毒已成为成人腹泻中最常见病原和儿童腹泻中第 2 位病原(仅次于轮状病毒),加强胃肠炎疫情中诺如病毒检测,特别是 G II.4 型诺如病毒基因亚型鉴定对于疫情防控具有重要意义^[11]。通过对腹泻患者流行病学

调查发现,诸如病毒核苷酸片段的检测和序列分析以及发现该病毒的流行状况和血清型分布,同时,构建该病毒的感染性 cDNA,以进一步研究该病毒的分子生物学特性和致病机制,从而控制诸如病毒的变异和流行。因此,需密切关注诸如病毒在中国的传播和进化情况。

参考文献

- [1] 谢雯,冯亮.诺瓦克病毒性腹泻临床研究进展[J].中国医刊,2007,42(4):5-8.
- [2] Mathapati BS, Mishra N, Rajukumar K, et al. Entry of bovine viral diarrhoea virus into ovine cells occurs through clathrin-dependent endocytosis and low pH-dependent fusion[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46(5): 403-407.
- [3] 纪蕾,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析生物学特点初步研究[J].病毒学报,2011,27(5):469-474.
- [4] Hall AJ, Eisenbart VG. Epidemiology of Foodborne Norovirus Outbreaks, United States, 2001-2008[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(10): 1566-1573.
- [5] 孟祥杰,孙亚萍,赵俊,等.诺如病毒 G II 型感染的流行病学研究[J].中华预防医学杂志,2012,46(2):186.
- [6] Green KY, Arlido T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the caliciviruses[J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(Suppl 2): S322-330.
- [7] 王作麟,韩悦,安淑一,等.诺如病毒 RT-PCR 检测及进化树分析[J].中国卫生检验杂志,2008,18(5):783-785.
- [8] Desai R, Hembree CD, Handel A, et al. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: A systematic literature review[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 55(2): 189-193.
- [9] 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.
- [10] 刘远兴,郑志远.病毒性胃肠炎患者中诺如病毒感染情况的检测分析[J].中外医学研究,2014,12(11):53-55.
- [11] 宋灿磊,刘燕.国内诺如病毒胃肠炎疫情分子流行病学分析[J].实用预防医学,2013,20(11):1294-1296.

(收稿日期:2016-09-14 修回日期:2016-11-03)

(上接第 230 页)

response as that administered by a Rotahaler in adult subjects with stable moderate-to-severe COPD[J]. *Respir Med*, 2007, 101(12): 2464-2471.

- [9] 张琴琴,许德凤,刘锦铭,等.和肽素对 AECOPD 患者的病情严重程度及生活质量评估的价值[J].国际呼吸杂志,2015,35(1):25-29.
- [10] 华锋,王斌,崔恩海.和肽素对呼吸机相关性肺炎预后判断的临床意义[J].中华医院感染学杂志,2013,23(4): 743-745.
- [11] 李艳肖,史金英,袁德琴,等.无创正压通气治疗慢性阻塞

性肺疾病急性加重期并重度二氧化碳潴留效果观察[J].临床误诊误治,2013,26(3):75-77.

- [12] 井军虎,李立宇,李建强.慢性阻塞性肺疾病急性加重期血清和肽素水平的变化及临床意义[J].山东医药,2014, 54(37):19-20.
- [13] Sandhu SK, Chu J, Yurkovich M, et al. Variations in the management of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Canadian Respiratory Journal*, 2013, 20(3): 175-179.

(收稿日期:2016-09-01 修回日期:2016-10-20)