

# 2012–2014 年湖南省感染性腹泻哨点医院儿童诺如病毒感染及基因型别分析

陈雨<sup>1,2</sup>, 周帅锋<sup>1</sup>, 孙倩莱<sup>1</sup>, 张帆<sup>1</sup>, 蔡亮<sup>1</sup>, 张红<sup>1</sup>, 高立冬<sup>1</sup>, 黄威<sup>1</sup>, 项荣<sup>2</sup>

1. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005; 2. 中南大学生命科学学院, 湖南 长沙 410013

**摘要:** **目的** 了解湖南省感染性腹泻哨点医院儿童诺如病毒的感染状况及基因型别。**方法** 2012 年 1 月–2014 年 12 月采集湖南省哨点医院腹泻患儿的粪便标本, 应用诺如病毒特异性引物进行扩增, 选择扩增阳性产物进行基因测序和进化分析。**结果** 936 份粪便标本 RT-PCR 检测诺如病毒核酸, 阳性 100 份, 阳性率 10.68%。对 40 份诺如病毒核酸阳性标本进行基因序列测定与分析, 38 份为 G II 型, 其中 31 份为 G II.4 型。在 31 株 G II.4 型中, Sydney 2012 和 GII.4 Den Haag 2006b 各检出 14 株。**结论** 2012–2014 年湖南省哨点医院儿童腹泻病例中诺如病毒的感染率较高, G II.4 是优势株, 其中 G II.4 Sydney 2012 和 Den Haag 2006b 是主要型别。

**关键词:** 腹泻; 诺如病毒; 基因型别; G II 型

**中图分类号:** R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006–3110(2016)07–0773–04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006–3110.2016.07.002

## Infection and genotypes of norovirus among children with acute diarrhea in sentinel hospitals in Hunan Province, 2012 –2014

CHEN Yu\*, ZHOU Shuai-feng, SUN Qian-lai, ZHANG Fan, CAI Liang, ZHANG Hong, GAO Li-dong, HUANG Wei, XIANG Rong

\*Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China;

School of Life Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China

Corresponding author: Xiang Rong, E-mail: 740971763@qq.com; Huang Wei, E-mail: huangweicq@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the infection situation of norovirus and its genotypes among children with acute diarrhea in sentinel hospitals in Hunan Province. **Methods** Fecal specimens were collected from 936 children with acute diarrhea in sentinel hospitals in Hunan Province from January 2012 to December 2014. RT-PCR was used to detect norovirus and obtain positive samples. Phylogenetic analysis and genotyping were performed. **Results** Totally, 100 out of 936 samples were positive for norovirus, with the positive rate of 10.68%. 38 out of 40 sequenced strains were GII, among which 31 isolates were GII.4 variants. GII.4 Sydney 2012 and GII.4 Den Haag 2006b were respectively detected in 14 isolates. **Conclusions** Norovirus has a high detection rate in children with acute diarrhea in sentinel hospitals in Hunan Province, 2012–2014. GII.4 variant is the predominant strain, and GII.4 Sydney 2012 and GII.4 Den Haag 2006b are the predominant genotypes.

**Key Words:** Diarrhea; Norovirus; Genotype; GII

诺如病毒(norovirus)又称诺瓦克样病毒或细小圆结构病毒,已经成为仅次于轮状病毒引起感染性腹泻的第二大病原体<sup>[1]</sup>,主要通过食物或者水源传播,能在全世界范围内引起胃肠炎暴发流行。诺如病毒属杯状病毒科,基因组由 7.6 kb 核苷酸组成,分 3 个 ORFs, ORF1 编码多聚蛋白,在病毒复制过程中被水解成六种非结构蛋白。ORF2 编码 VP1 蛋白的大部分结构,包括 S 区和 P 区, S 区较为保守,形成病毒表

**基金项目:** 国家科技重大专项(2013ZX10004–202)

**作者简介:** 陈雨(1987–),女,技师,主要从事肠道病毒的实验室检测工作。

**通讯作者:** 项荣, E-mail: 740971763@qq.com; 黄威, E-mail: huangweicq@163.com。

面的衣壳, P 区较为活跃,与病毒的复制和变异密切相关。ORF3 编码小结构蛋白,参与病毒的复制。诺如病毒分 5 个基因组,其中 GI 和 G II 是感染人的主要组别<sup>[2]</sup>,依据衣壳蛋白 VP1 基因的 S 区差异, GI 和 G II 还可进一步分为 14 个和 17 个基因型<sup>[3]</sup>。诺如病毒 G II–4 型为引起全世界腹泻暴发的主要型别<sup>[4]</sup>,每隔几年就会引起新的流行。为进一步了解诺如病毒在湖南省的流行状况,本研究对湖南省 2012–2014 年哨点医院监测标本进行了诺如病毒检测,对核酸阳性标本进行了进一步型别鉴定及基因型特征分析。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源 2012 年 1 月–2014 年 12 月期间,在

哨点医院怀化市新晃县人民医院选择有腹泻、呕吐等  
症状的 5 岁及以下的儿童病例,采集其水样便或稀便  
标本 936 份,置于-70 ℃冰箱保存。

1.2 标本处理 腹泻标本用 PBS 制备成 10%的便悬  
液,涡旋振荡器混合均匀,8 000 rpm/min 离心 5 min,  
吸取上清液。

1.3 核酸提取 使用 MagNA Pure LC Total Nucleic  
Acid Isolation Kit (Roche, USA) 提取上清液病毒总  
RNA,具体操作参考试剂盒说明书进行。

1.4 逆转录 以提取的 RNA 为模板,使用 Reverse  
Transcription System (Promaga, USA) 进行逆转录得到  
病毒 cDNA,具体操作参考试剂盒说明书进行。

1.5 PCR 扩增 以逆转录后的 cDNA 为模板,使用  
TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TaKaRa, Japan) 进行  
PCR 扩增,具体扩增引物序列见表 1。反应体系(25  
μl):HS-Taq 0.125 μl、dNTP 2.5 μl、10×buffer 2.5 μl、  
Nuclease-free H<sub>2</sub>O 16.175 μl、GI-SKF (33 μmol/L)  
0.2 μl、GISKR (33 μmol/L) 0.2 μl、CoG2F (33 μmol/  
L) 0.2 μl、G II-SKR (33 μmol/L) 0.2 μl、cDNA 2.5  
μl。反应参数:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,55  
℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 5 min  
延长。

1.6 核酸电泳 PCR 扩增产物通过 QIAxcel 全自  
动 DNA/RNA 分析系统(QIAGEN, German)进行电泳和结  
果分析。

表 1 诺如病毒 GI 和 G II 型的扩增引物

Virus	Primer	Sequence	Product size( bp)
诺如病毒 GI	G1-SKF	CTGCCCGAATTGTAAATGA	330
	G1-SKR	CCAACCCARCCATTATACA	
诺如病毒 G II	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	387
	G2-SKR	CCRCNGCATRHCCRTTATACAT	

1.7 核酸序列测定与分析 对 2012-2014 年诺如病  
毒核酸检测阳性标本中随机选择 40 份进行序列测定,  
测序引物为 PCR 反应引物。将测序获得序列提交至  
诺如病毒在线分型网站(<http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool/>)分析各株同源性,应用 MEGA5.2  
(N-J 法)构建系统发生树,分析湖南地区诺如病毒与  
国内外地区毒株的亲缘关系。系统发生树中所有参考  
株序列均来自源于 GenBank 数据库。

2 结 果

2.1 PCR 检测结果 2012-2014 年在哨点医院采集  
的 936 份粪便标本使用 RT-PCR 法进行诺如病毒核  
酸检测,阳性标本 100 份,阳性率为 10.68% (100/  
936)。其中 2012 年阳性标本数 48 株,阳性率为

16.78% (48/286),2013 年阳性标本 20 株,阳性率为  
5.88% (20/340)。2014 年阳性标本 32 株,阳性率为  
10.32% (32/310)。见图 1。

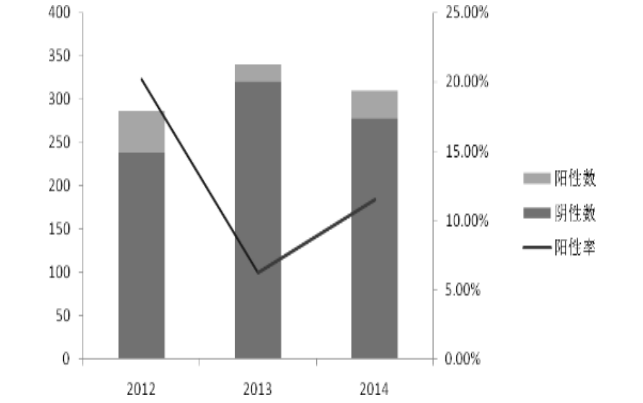


图 1 2012-2014 年诺如病毒 PCR 检测结果

2.2 基因分型 40 株诺如病毒阳性标本提取的 RNA  
经逆转录后,使用 GI 和 G II 型特异性引物进行 PCR  
扩增,有 2 株在 330 bp 出现特异性条带,为 GI 型;38  
株在 387 bp 处出现特异性条带,为 G II 型。分型结果  
显示 GI 型中有 GI.2 和 GI.4 亚型各 1 株,G II 型的优  
势型为 G II.4,共 31 株,占 G II 型的 81.58% (31/38)。  
其次分别为 G II.5 型 2 株,占 5.26% (2/38),G II.6  
型 3 株,占 7.89% (3/38),G II.7 型 1 株,占 2.63%  
(1/38),G II.13 型 1 株,占 2.63% (1/38)。在 31 株 G  
II.4 型的标本中,进一步分出 3 类亚型,其中 Sydney  
2012 株和 Den Haag 2006b 均检测出 14 株,New Orle-  
ans 2009 检测出 3 株。基因分型结果见表 2。Sydney  
2012 株在 2012-2014 年测序的标本中阳性率分别为  
100% (7/7)、25% (4/16) 和 20% (3/15)。Den Haag  
2006b 在 2012-2014 年测序的标本中阳性率分别为  
0% (0/7)、37.50% (6/16),53.33% (8/15)。显示  
Sydney 2012 株的感染率在 2012 年达到高峰后开始下  
降,Den Haag 2006b 株阳性率自 2013 年逐渐增高。见  
表 2。

表 2 2012-2014 年湖南省感染性腹泻  
哨点医院诺如病毒阳性标本基因型

Sample No.	Genotype	Sub-genotype	Sample No.	Genotype	Sub-genotype
2012-GI-1	GI.2		2013-GII-12	GII.4	Den Haag 2006b
2012-GI-2	GI.4		2013-GII-13	GII.4	Den Haag 2006b
2012-GII-1	GII.4	Sydney 2012	2013-GII-14	GII.4	New Orleans 2009
2012-GII-2	GII.4	Sydney 2012	2013-GII-15	GII.13	
2012-GII-3	GII.4	Sydney 2012	2013-GII-16	GII.4	New Orleans 2009
2012-GII-4	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-1	GII.4	Den Haag 2006b
2012-GII-5	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-2	GII.4	Den Haag 2006b
2012-GII-6	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-3	GII.4	Den Haag 2006b
2012-GII-7	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-4	GII.4	Den Haag 2006b

Sample No.	Genotype	Sub-genotype	Sample No.	Genotype	Sub-genotype
2013-GII-1	GII.7		2014-GII-5	GII.6	
2013-GII-2	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-6	GII.4	Sydney 2012
2013-GII-3	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-7	GII.6	
2013-GII-4	GII.5		2014-GII-8	GII.4	Sydney 2012
2013-GII-5	GII.5		2014-GII-9	GII.4	Sydney 2012
2013-GII-6	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-10	GII.6	
2013-GII-7	GII.4	Sydney 2012	2014-GII-11	GII.4	Den Haag 2006b
2013-GII-8	GII.4	Den Haag 2006b	2014-GII-12	GII.4	Den Haag 2006b
2013-GII-9	GII.4	Den Haag 2006b	2014-GII-13	GII.4	Den Haag 2006b
2013-GII-10	GII.4	New Orleans 2009	2014-GII-14	GII.4	Den Haag 2006b
2013-GII-11	GII.4	Den Haag 2006b	2014-GII-15	GII.4	Den Haag 2006b

Phylogenetic tree showing relationships between GIL4 sequences. The tree is rooted on the left and branches to the right. Bootstrap values are indicated at the nodes. The sequences are grouped into several clusters, each labeled with a GIL4 identifier and a year or location.

- GIL4 Sydney 2012** (2012):
  - Hunan 2012-GII-6
  - Hunan 2014-GII-6
  - Hunan 2012-GII-5
  - Hunan 2012-GII-7
  - Hunan 2013-GII-3
  - Hunan 2013-GII-7
  - Hunan 2012-GII-2
  - Hunan 2012-GII-1
  - Hunan 2012-GII-3
  - Hunan 2012-GII-4
  - Hunan 2013-GII-6
  - Hunan 2013-GII-2
  - Hunan 2014-GII-8
  - Hunan 2014-GII-9
  - Sydney 2012/2012/AU/LX45990.8
- GIL4 New Orleans 2009** (2009):
  - Hunan 2013-GII-10
  - Hunan 2013-GII-14
  - Hunan 2013-GII-16
  - New Orleans 2009/U S/2009/GU445325
- GIL4 2006b** (2006b):
  - Hunan 2014-GII-12
  - Hunan 2014-GII-13
  - Hunan 2014-GII-11
  - Hunan 2014-GII-14
  - Hunan 2014-GII-15
  - Hunan 2013-GII-8
  - Hunan 2013-GII-9
  - Hunan 2013-GII-12
  - Hunan 2013-GII-13
  - Hunan 2014-GII-1
  - Hunan 2014-GII-2
  - Hunan 2014-GII-3
  - Hunan 2014-GII-4
  - Hunan 2013-GII-11
  - 2006b/2006/AU/EF684915
- GIL7** (2013):
  - IL7/AF414409
  - Hunan 2013-GII-1
- GIL6** (2010):
  - Hunan 2014-GII-7
  - Hunan 2014-GII-10
  - CH-6/Seacraf 1990/AL277620
  - Hunan 2014-GII-5
- GIL13** (2012):
  - Hunan 2013-GII-15
  - GIL6Berlin 2012/AB078334
- GIL5** (1998):
  - Hunan 2013-GII-4
  - Hunan 2013-GII-5
  - GIL5/HUN 1998/AF397156

Scale bar: 0.05

2.3.1 NV G II 型 14 株 G II 型核苷酸与 Sydney2012 株 (Australia, JX459908) 同源性在 98% ~

Phylogenetic tree showing relationships between various *Gl.2* and *Gl.4* strains. The tree is rooted on the left and branches to the right. A scale bar at the bottom left indicates 0.02 substitutions per site. The *Gl.2* clade includes *Gl.2*/Jingzhou 2013/KF306212, *Gl.2*/CHN2014/KP753275, and 2012Gl-1. The *Gl.4* clade includes *Gl.4*/Beijing 2008/GQ856475, 2012Gl-2, and *Gl.4*/TAW 2009/GQ401129.

G II.4 型诺如病毒的变异株分别在 1995 年 (US95/95 株)、2002 年 (Farmington Hills 株)、2004 年

(Hunter 株)、2006 年(2006a/b 株)、2009 年[2010a/b 株(比利时)]、2012 年(Sydney 2012 株)发现并成为优势株<sup>[12-13]</sup>。G II.4 Sydney 2012 株在 2012 年 3 月澳大利亚被首次报道,随后蔓延到欧洲和新西兰<sup>[14]</sup>,迅速成为全球诺如暴发流行的优势基因型。G II.4 Sydney 2012 株是北京地区 2012-2013 年冬季散发性诺如胃肠炎的优势株<sup>[15]</sup>,在 2012 年 1 月-2013 年 12 月期间中国多地(香港、上海、江苏、湖州、荆州、台湾)G II.4 Sydney 2012 株感染的报道<sup>[16-17]</sup>。G II.4 Den Haag 2006b 株在 2008 年 7 月-2009 年 6 月导致了加拿大 95% 诺如病毒暴发疫情<sup>[11]</sup>。在 2009 年 4 月-2011 年 11 月期间北京地区诺如病毒感染引起的急性腹泻的流行株为 G II.4 2006a 株和 G II.4 2006b 株<sup>[18]</sup>。

本次研究以 5 岁及以下儿童为研究对象,发现 2012-2013 年儿童诺如病毒的感染率为 10.8%(68/626)。通过对于病毒的进化分析发现,湖南省哨点医院中患儿感染的诺如病毒主要为 G II 型,其中 G II.4 型的感染最为普遍,对 38 株 G II 毒株进行基因测序发现有 31 株为 G II.4 型感染,与国内及国外的研究结果基本一致。本次研究中,G II.4 Sydney 2012 株在 2012-2014 年于湖南省感染性腹泻监测哨点医院均有检出,其中 2012 年进行基因测序的 7 株诺如病毒 G II 型阳性标本全部为 G II.4 Sydney 2012 株,G II.4 Sydney 2012 株在 2013 年和 2014 年检出数分别为 4 株和 3 株。G II.4 Den Haag 2006b 株在 2013 年检出 6 株,在 2014 年检出 8 株。G II.4 New Orleans 2009 株在 2013 年检出 3 株。2012 年的检测中优势型别为 G II.4 Sydney 2012 株,而 2013 年 G II.4 Den Haag 2006b 株开始出现并取代 G II.4 Sydney 2012 株成为当地流行的优势毒株。

在 2012 年之前湖南省尚未开展系统的急性胃肠炎病毒的基因型监测,缺乏明确的流行病学资料及参考毒株,本次研究中标本来源和选取的毒株数量有限,还不能全面了解湖南地区流行的诺如病毒基因型组成,也许还存在更多的型别感染,由于诺如病毒易发生变异,人群普遍易感并可迅速传播,因此加强对诺如病毒的病原学监测,及时发现新的变异株,对于控制疾病流行和了解诺如病毒遗传变异及流行规律具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, et al. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Riode Janeiro [J]. J Med Virol, 2008, 80:338-344.
- [2] 吴微,张宏斌,张海龙,等. 2010 年深圳地区诺如病毒的基因分型

- [J]. 病毒学报, 2012, 28(3): 219-223.
- [3] Kageyama T, Shinokara M, Uchida K, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 2988-2995.
- [4] Fankhauser RL, Monroe SS, Noel JS, et al. Epidemiologic and molecular trends of "Norwalk-like viruses" associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States [J]. J Infect Dis, 2002, 186(1): 1-7.
- [5] Webby RJ, Carville KS, Kirk MD, et al. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(8): 1026-1031.
- [6] O'Reilly CE, Bowen AB, Perez NE, et al. A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004 [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(4): 506-512.
- [7] Westhoff TH, Vergoulidou M, Lodenkemper C, et al. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(3): 1051-1053.
- [8] 方肇寅,温乐英,晋圣谨,等. 在我国腹泻患儿中发现诺瓦克样病毒感染 [J]. 病毒学报, 1995, 11(3): 215-219.
- [9] Patel MM, Hall AJ, Vinje J, et al. Norovirus: a comprehensive review [J]. J Clin Virol, 2009, 44(1): 1-8.
- [10] Turcios-Ruiz RM, Axelrod P, St John K, et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis caused by norovirus in a neonatal intensive care unit [J]. J Pediatr, 2008, 153: 339-344.
- [11] Hasing ME, Lee BE, Preiksaitis JK, et al. Emergence of a new norovirus G II.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013 [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2204-2211.
- [12] Tu ET, Bull RA, Greening GE, et al. Epidemics of gastroenteritis during 2006 were associated with the spread of norovirus G II.4 variants 2006a and 2006b [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(3): 413-420.
- [13] Elisabeth M, Sarah D, Leonor P, et al. Novel norovirus recombinants and G II.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium [J]. Virol J, 2011, 18(8): 310-322.
- [14] 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 [J]. Euro Surveill, 2013, 18(1): 8-9.
- [15] 买欢,高燕,潘孝本,等. 中国 7 个地区诺如病毒 G II.4/Sydney 2012 变异株分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(2): 157-162.
- [16] Chan MC, Chan PK. Complete genome sequence of a novel recombinant human norovirus genogroup II genotype 4 strain associated with an epidemic during summer of 2012 in Hong Kong [J]. Genome Announc, 2013, 1(1): e00140-12.
- [17] Hen Z, Qian F, Li Y, et al. Novel norovirus GII.4 variant, Shanghai, China, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(8): 1337-1339.
- [18] J Mai H, Jin M, Guo X, et al. Clinical and epidemiologic characteristics of norovirus G II.4 Sydney during winter 2012-13 in Beijing, China following its global emergence [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71483.

收稿日期: 2015-12-20