

DOI: 10.13344/j.microbiol.china.151037

深圳地区环境水体和人群中诺如病毒监测与分析

韩宁¹ 汪东篱² 张海龙³ 姚相杰³ 舒柏华^{1*} 何雅青^{3*}

(1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院 湖北 武汉 430000)

(2. 深圳市光明新区疾病预防控制中心 广东 深圳 518000)

(3. 深圳市疾病预防控制中心 广东 深圳 518000)

摘要:【目的】检测深圳地区环境水体和人群的诺如病毒(NoVs), 探讨其是否在两者之间循环传播。【方法】2014年3月至2015年2月检测24份深圳茅洲河河水标本和287份腹泻患者粪便标本。河水标本经过混合纤维素酯膜和PEG法二次浓缩后提取核酸, 粪便标本无需浓缩, 稀释离心后直接提取核酸。应用实时荧光逆转录PCR初步分型, RT-PCR扩增ORF2保守区域衣壳蛋白(VP1)基因后测序确定亚型、分析不同来源病毒的同源性; 同时建立基因进化树, 进一步分析不同来源NoVs的亲缘关系。【结果】在河水标本和腹泻患者粪便标本中, NoVs阳性率分别为23.1%和17.4%, 其中上下游河水标本阳性率分别为8.3%和41.7%, 河水中NoVGI型和NoVGII型的阳性率为16.7%和8.3%。扩增阳性样本发现茅洲河水中检出NoV主要是GI.6型, 其次是GII.4 Sydney_2012型, 而从腹泻胃肠炎患者粪便标本中检出NoVs主要是NoVGII.4 Sydney_2012型和少量的GII.3型。同时期水体和人群粪便标本来源的NoVGII.4 Sydney_2012型VP1基因相似性98.2%–100.0%。【结论】NoVGII.4 Sydney_2012型是深圳地区主要的流行株。NoVs在环境水体和人群中在某种程度上存在循环传播。

关键词: 诺如病毒, 环境水体, 人群

Surveillance and analysis of noroviruses in water environment and human population in Shenzhen

HAN Ning¹ WANG Dong-Li² ZHANG Hai-Long³ YAO Xiang-Jie³ SHU Bai-Hua^{1*} HE Ya-Qing^{3*}

(1. School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430000, China)

Foundation item: Shenzhen National Science and Technology Major Project (No. GJHS20120628150935034)

***Corresponding author:** E-mail: SHU Bai-Hua: shubaihua_tongji@163.com; HE Ya-Qing: heyaqing1019@126.com

Received: December 15, 2015; **Accepted:** March 02, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 04, 2016

基金项目: 深圳市国家科技重大专项项目(No. GJHS20120628150935034)

*通讯作者: E-mail: 舒柏华: shubaihua_tongji@163.com; 何雅青: heyaqing1019@126.com

收稿日期: 2015-12-15; 接受日期: 2016-03-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-04

(2. Shenzhen Guangming New District Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

(3. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to monitor noroviruses (NoVs) in the water environment and human population in Shenzhen city, and to explore the relationship for NoVs circulation between the two media. [Methods] Twenty-four water samples from Maozhou River and 287 clinical specimens were collected in Shenzhen city from March 2014 to February 2015. Water samples were firstly concentrated by mixed cellulose ester microporous membrane and PEG, and clinical specimens were directly diluted for RNA extraction. NoVs were firstly detected through real time RT-PCR, and the ORF2 capsid protein gene (VP1) of NoVs were got by RT-PCR and sequenced for genotype analysis. Homology and phylogenetic analyses were performed to investigate the relationship between the NoVs from environment water and those from human population. [Results] The positive rate for the water samples was 23.1%, including 8.3% and 41.7% positive rates for the upstream and downstream samples, respectively; while the positive rate for clinical specimens was 17.4%. The positive rate of genotype NoVG1 and GII was 16.7% and 8.3% in the water samples, respectively. The VP1 partial gene sequence analysis showed that GI.6 was predominant in the water samples, in which GII.4 Sydney_2012 was also detected. Meanwhile, compared with GGII.3, GII.4 Sydney_2012 was more prevalent in human population. The nucleotide homology of partial VP1 gene of GII.4 Sydney_2012 from different samples showed 98.2%–100.0%. [Conclusion] NoVGII.4 Sydney_2012 was the predominant genotype in human population of Shenzhen city. To some extent, NoVs are probably circulating between water environment and human population.

Keywords: Norovirus, Water environment, Human population

诺如病毒(Noroviruses, NoVs)属于杯状病毒科、诺如病毒属的非包膜单正链 RNA (7.5–7.7 kb)病毒,其 RNA 由 3 个开放阅读框(ORFs)组成^[1]。根据由 ORF2 编码的 VP1 氨基酸相似程度,将其分为以下 6 个基因组(Genogroup): GI、GII、GIII、GIV、GV 和 GVI,主要感染人的 GI 和 GII 又分别被分为 9 个和 22 个基因型(Genotype)^[2]。NoVs 是引起急性病毒性腹泻的主要病原之一^[3],也是唯一已知的可以导致急性腹泻全球性大流行的病原^[4]。在发展中国家,诺如病毒每年至少造成 20 万名 5 岁以下儿童的死亡^[5]。NoVs 主要通过粪口途径、污染食物或水源传播,可存在于外环境包括农业、娱乐和饮用水中,其广泛传播对公共健康造成巨大的威胁。但是,由于其在外环境中的浓度较低,需要对环境标本浓缩,现有的浓缩方法包括滑石粉-硅藻土浓缩法、过滤法、膜吸附洗脱法等^[6-7]。本研究主要采取膜吸附洗脱法浓缩河水样本,该方法曾成功检测出由 NoVs 污染饮用水引起工人腹泻的疫情^[8]。由于尚且没有标准的细胞培养方法来检测 NoVs^[9],本研究主要应用实时荧光逆转录 PCR (Real time RT-PCR)进行初筛。并由逆转录 PCR (RT-PCR)扩增 NoVs 的 ORF2 保守区域衣壳蛋白(VP1)基因序列,并确定病毒基因型和进行进化地位分析。本研究为了调查 NoVs 在水环境和人群中循环情况,在 2014 年 3 月至 2015 年 2 月选择深圳市茅洲河上下两个采样点连续每月采样一次,分析比较同时期该地区河水和人群中所检出的 NoVs 的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 标本采集

1.1.1 河水标本：茅洲河是深圳市境内流域面积第二大的河流，流域东北部的光明、公明街道是深圳重要的高新农业和生态旅游，流域内大多数水库是深圳市宝安区各街居民生活用水的主要水资源^[10]。2014年3月至2015年2月在深圳市茅洲河上下游(上游周围为高新农业聚集地，下游为生态旅游聚集地)两个采样点连续每月采样一次，每份1 L，共24份河水标本冷藏运送至实验室。

1.1.2 病例标本：2014年3月至2015年2月在深圳某医院共采集287份急性非细菌性胃肠炎病人的粪便标本，冷藏送至实验室，冻存于-80℃待检测。

1.2 标本前处理

河水标本和粪便标本分别在不同楼层不同实验室进行。

1.2.1 河水标本：水样经纱布过滤，4℃条件下3 000 r/min离心30 min，取500 mL上清液，加入2.50 mmol/L的MgCl₂溶液10 mL，使其终浓度为0.05 mmol/L，加1 mol/L HCl调节pH至3.50^[11]。0.45 μm孔径的混合纤维素酯滤膜进行过滤，滤膜剪碎后移到离心管中开始洗脱，加入30 mL 1.5%牛肉膏-0.05 mol/L甘氨酸洗脱液(pH 9.50)，在摇床上480 r/min振荡洗脱30 min，收集洗脱液加入等体积PEG8000-NaCl进行二次浓缩。充分混匀，于4℃静置过夜；在4℃、10 000 r/min离心30 min后弃上清液，保留沉淀；沉淀加入1 mL Hanks液稀释，取200 μL稀释液待提取病毒RNA，剩余稀释液-80℃保存备用。

1.2.2 粪便标本：粪便加入1 mL DMEM，涡旋振荡2 min，3 000 r/min离心5 min，取200 μL上清液待提取病毒RNA。

1.3 核酸提取

病毒核酸提取试剂盒为Roche High pure viral RNA kit，购于德国Roche公司。

1.4 实时荧光逆转录PCR

试剂为GI诺如病毒RNA荧光PCR检测试剂盒，购于深圳市易瑞生物技术有限公司；GII诺沃克病毒荧光PCR检测试剂盒，购于深圳太太基因工程有限公司；仪器为ABI7500荧光PCR仪，购于美国ABI公司。

1.5 RT-PCR

应用于扩增NoVs的ORF2保守区域序列(衣壳蛋白基因的5'端)VP1基因的引物分别是GI(G1SKF/G1SKR)和GII(GOG2F/G2SKR)[9]，由TaKaRa宝生物(大连)公司合成。扩增的序列片段长度分别是GI(330 bp)和GII(389 bp)。使用一步法试剂盒One step RNA PCR Kit，购于日本TaKaRa公司。PCR反应体系(50 μL)：酶2 μL，上下游引物(20 μmol/L)各1 μL，缓冲液25 μL，去Rnase水11 μL，病毒RNA模板10 μL。反应条件如下：50℃30 min逆转录；94℃2 min；94℃30 s，53℃30 s，72℃30 s，进行45个循环；72℃10 min；4℃保存。用1.5%琼脂糖凝胶110 V电泳35 min观察结果，对于检测到与预期片段长度相符的标本判为阳性。

1.6 核酸测序

阳性样本的RNA扩增产物送至TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司测序。序列上传至GenBank，测序结果应用诺如病毒分型工具<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>进行分型。

1.7 同源性分析和建立系统进化树

利用BioEdit剪切处理序列，比较核酸同源性。利用Mega 5.0建立系统进化树，所有参

考毒株的序列来自于 GenBank。

2 结果与分析

2.1 实时荧光逆转录 PCR 结果

实验通过荧光 RT-PCR 对 24 份河水标本和 287 份腹泻患者粪便标本检测 NoVs，阳性标本共计 56 份。河水标本中 NoVs 的阳性率为 23.1% (6/24)，腹泻患者粪便标本中 NoVs 的阳性率为 17.4% (50/287)。由图 1 可知，河水标本中 NoVs 主要集中在 2014 年 4-7 月份检出，下游河水中诺如病毒的检出率为 41.7% (5/12) 高于上游河水的检出率 8.3% (1/12)，NoVGII 型的检出率为 16.7% (4/24)，高于 NoVGII 型的检出率 8.3% (2/24)。图 2 显示腹泻患者-粪便标本中 NoVs 阳性检出率在 6-9 月份较高，其峰值相较于河水略有延迟。腹泻患者粪便标本中检出的 NoVs 阳性样本均为 NoVGII 型。

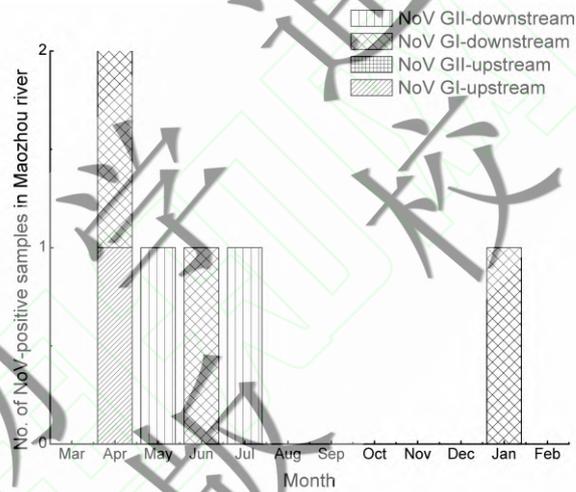


图 1 茅洲河水中诺如病毒的月份分布

Figure 1 The monthly distribution of NoV in Maozhou river

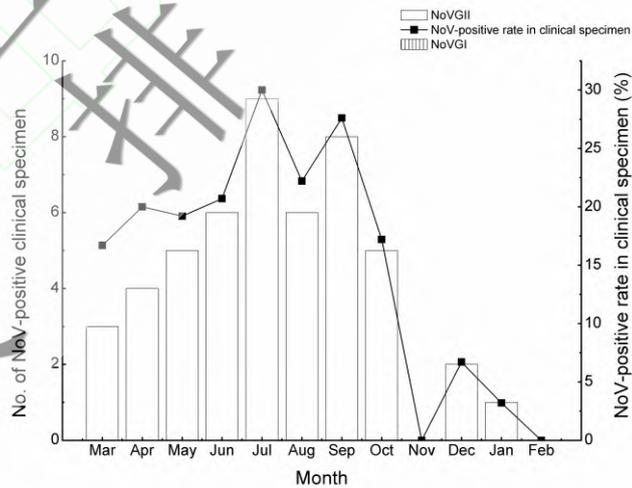


图 2 临床腹泻样本中诺如病毒的检出情况

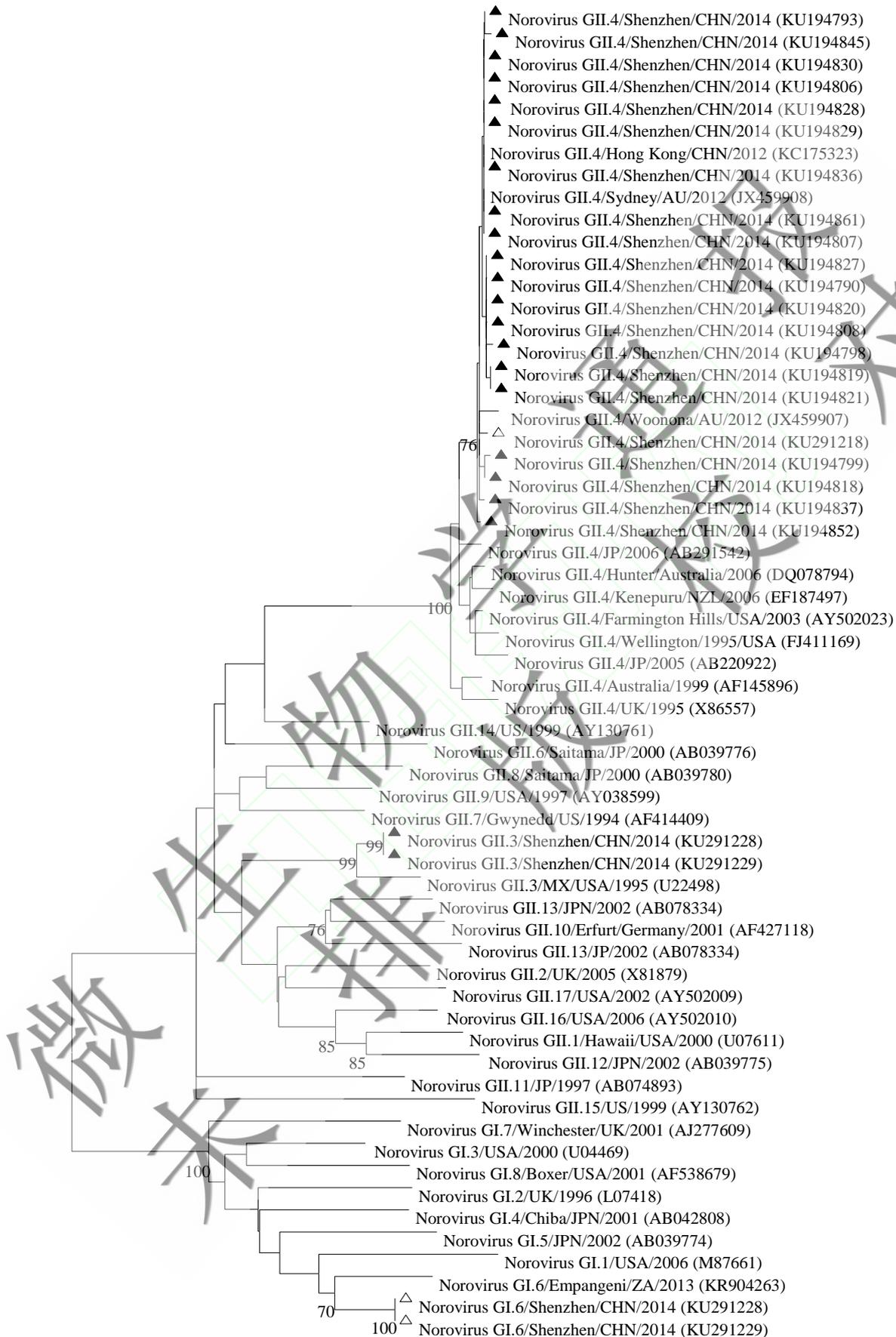
Figure 2 The monthly distribution of NoV in human clinical specimen

2.2 RT-PCR 产物测序结果

RT-PCR 扩增 56 份 NoV 阳性样本，琼脂糖凝胶电泳出现特异性条带的有 30 份，阳性率为 53.6%，其中河水阳性样本 5 份，腹泻病人粪便样品 25 份。将 30 份出现特异性条带的扩增产物送至 TaKaRa 宝生物(大连)公司测序，成功测序样品为 25 份，其中河水样品为 3 份，腹泻病人粪便样品为 22 份。

2.3 NoV 同源性分析

测序结果由诺如病毒分型网站分析，并将序列上传 GenBank。图 3 显示 3 株来自茅洲河河水的诺如病毒分别是：1 株 NoVGII.4 Sydney_2012 型，2 株 NoVGI.6 型，GenBank 编号分别为 KU291218、KU291225、KU291226，其中 KU291225 和 KU291226 基因型为 GI.6 型，同源性分析结果是 100%。在临床腹泻患者的粪便标本提取的 22 株诺如病毒 GenBank 编号分别是 KU194790、KU194793、KU194798、KU194799、KU194806-KU194808、KU194818-KU194821、KU194827-KU194830、KU194836、KU194837、KU194852、KU291228、KU291229、KU194861、KU194864。其中 KU291228、KU291229 是 NoVGII.3 型，相似性为 99.5%。来源于腹泻患者粪便标本和河水中的 NoVGII.4 Sydney_2012 型诺如病毒相似性为 98.2%-100%。



0.05

图 3 诺如病毒进化分析

Figure 3 Phylogenetic tree of norovirus strains

注：临床腹泻病人的粪便标本和河水标本的诺如病毒分别标记为▲和△。分支点上的数字表示构建进化树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比；标尺为进化距离；自举值<70%没有显示出来；所有序列的命名方式为诺如病毒亚型/城市/国家/时间(GenBank 编号)。CHN：中国；AU：澳大利亚；JP 或 JPN：日本；ZA：南非简称。

Note: Norovirus strains from Clinical specimen and river samples were marked as ▲ and △, respectively. The numbers in the branching points are bootstrap values expressed as percentages of 1 000 replications; Scale for evolutionary distance; The bootstrap support values of <70% were not indicated; The sequences are labeled as norovirus subtype/City/Country/Year (GenBank accession No.). CHN: China; AU: Australia; JP/JPN: Japan; ZA: South Africa.

3 讨论

本研究检测来自于河水的环境标本和腹泻病人的粪便标本，通过分析比较不同标本来源中检测的诺如病毒，探讨 NoVs 环境污染在其传播过程中的作用。2014 年 3 月至 2015 年 2 月深圳地区茅洲河水中主要 NoVs 为 NoVGII.6 和 NoVGII.4 Sydney_2012 型，期间从腹泻胃肠炎患者粪便标本中检出的 NoVs 主要基因型也是 NoVGII.4 Sydney_2012 型，且两者同源性很高，提示除了人与人之间的传播，NoVGII.4 Sydney_2012 型在环境水体和人群中存在传播。

NoVGII.4 型变异较快，每隔 2-3 年就有新的亚型出现并且成为新的主要流行株^[4]。2011 年深圳地区 NoVs 在人群中主要流行株 GII.4 2006b 型^[12]，从 2012 年开始，NoVGII.4 Sydney_2012 型为全球性胃肠炎腹泻的主要流行株之一^[13-14]，NoVGII.4 Sydney_2012 型是本研究中人群主要流行的基因型。相关研究表明 GII.4 能够持续感染人群的原因之一，可能是不断出现的新的 GII.4 亚型，使得其成功躲避群体免疫^[15]。值得注意的是，区别之前冬季传染病的固有观念，NoVs 在夏季腹泻患者粪便标本中检出率高于冬季，与香港文献报道类似^[16]，可能是因为夏季水和食物暴露被污染几率较高。

茅洲河流域属于亚热带海洋季风气候，夏长冬短，降雨量主要集中在每年的 4-9 月份^[17]，在热带地区的雨季，NoVs 感染较为常见^[18]。相关研究表明，NoVs 感染人具有剂量依赖性^[19]，即病毒量达到一定程度，需要有腹泻患者或隐性感染者的排泄物释放在外环境中^[20-21]，且 NoVs 对环境具有足够的抵抗力^[22]。深圳环境保护和水务局提供的 2014 年数据显示，茅洲河流域内每天产生约 100 万 t 生活污水。而流域内已建成的污水处理厂日处理能力仅为 60 万 t，是排放量的 60%，实际处理率仅为 53.8%，大量生活污水未充分处理即排放至河水中^[23]。2014 年 4-7 月份(夏季)，茅洲河河水中检测出 NoVs，下游(生态旅游业)监测点检测到的 NoVs 的型别和种类比上游(高新农业)要更多，可能是下游生态旅游业人群密度高于上游，导致河水中 NoVs 负荷较高。GI 型比 GII 型更常见，可能 GI 型比 GII 型对水环境的抵抗力更强。

综上所述，综合检测环境标本和临床标本有助于更好的理解 NoVs 的流行病学特点，并且有助于制定诺如病毒预防和控制措施。

致谢：衷心感谢深圳市腹泻监测点和环境监测点的工作人员协助工作。

参 考 文 献

- [1] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature[J]. *Virology*, 2006, 346(2): 312-323
- [2] Kroneman A, Vega E, Vennema H, et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(10): 2059-2068
- [3] Atmar RL, Estes MK. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection[J]. *Gastroenterology Clinics of North America*, 2006, 35(2): 275-290
- [4] 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]. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, 200(5): 802-812
- [5] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(8): 1224-1231
- [6] Victoria M, Guimarães F, Fumian T, et al. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters[J]. *Journal of Virological Methods*, 2009, 156(1/2): 73-76
- [7] Kou XX, Wu QP, Yao L, et al. Methods of viruses concentration and conditions optimization in water[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(1): 25-30 (in Chinese)
- 寇晓霞, 吴清平, 姚琳, 等. 水体中病毒浓缩方法及其条件优化[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(1): 25-30
- [8] He YQ, Han WM, Xiang JY, et al. Norovirus gastroenteritis outbreak is associated with contaminated drinking water in South China[J]. *Food and Environmental Virology*, 2010, 2(4): 207-210
- [9] Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, et al. Laboratory efforts to cultivate noroviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85(1): 79-87
- [10] Cui XX, Guo R. Hydrological characteristics of Maozhou River[J]. *China Rural Water and Hydropower*, 2006(9): 57-58, 60 (in Chinese)
- 崔小新, 郭睿. 茅洲河流域水文特性[J]. *中国农村水利水电*, 2006(9): 57-58, 60
- [11] Kou XX, Wu QP, Xue L. Detection of waterborne norovirus[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(4): 536-543 (in Chinese)
- 寇晓霞, 吴清平, 薛亮. 水源性诺如病毒[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(4): 536-543
- [12] Wu W, Yang H, Zhang HL, et al. Surveillance of pathogens causing gastroenteritis and characterization of norovirus and sapovirus strains in Shenzhen, China, during 2011[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(8): 1995-2002
- [13] Fonager J, Hindbæk LS, Fischer TK. Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012[J]. *Euro Surveillance*, 2013, 18(9): 20413
- [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 Surveillance*, 2013, 18(1): 8-9
- [15] Debbink K, Lindesmith LC, Donaldson EF, et al. Norovirus immunity and the great escape[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(10): e1002921
- [16] Ho ECM, Cheng PKC, Lau AWL, et al. Atypical norovirus epidemic in hong kong during summer of 2006 caused by a new genogroup II/4 variant[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(7): 2205-2211
- [17] Xu P, Sun KP, Zhang YJ, et al. Study of pollution load estimation of urban runoff located in guangming new district of Shenzhen City[J]. *Environmental Protection Science*, 2014, 40(5): 19-23 (in Chinese)
- 许萍, 孙昆鹏, 张雅君, 等. 深圳市光明新区城区径流污染负荷估算研究[J]. *环境保护科学*, 2014, 40(5): 19-23
- [18] Ayukekbong JA, Andersson ME, Vansarla G, et al. Monitoring of seasonality of norovirus and other enteric viruses in Cameroon by real-time PCR: an exploratory study[J]. *Epidemiology & Infection*, 2014, 142(7): 1393-1402
- [19] Teunis PFM, Moe CL, Liu PB, et al. Norwalk virus: how infectious is it?[J]. *Journal of Medical Virology*, 2008, 80(8): 1468-1476
- [20] Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(10): 1553-1557

- [21] Graham DY, Jiang X, Tanaka T, et al. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays[J]. The Journal of Infectious Diseases, 1994, 170(1): 34-43
- [22] Rzeżutka A, Cook N. Survival of human enteric viruses in the environment and food[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(4): 441-453
- [23] People's Daily Online. The Maozhou River has been a "scar" on the face of Shenzhen city that 100 million per kilometre yuan spent on governance has no effect[N]. The People's Daily, 2014-05-28 (in Chinese)
- 人民网. 茅洲河成“深圳脸上的一道疤”1公里花1亿元仍治理不好[N]. 人民日报, 2014-05-28

微生物学报