

# 南宁市朝阳溪污水中诺如病毒污染状况分析

邓丽丽, 刘巍, 谭冬梅, 马宇燕, 班华国, 韦一知, 钟革, 卓家同

广西壮族自治区疾病预防控制中心

**摘要:**目的 了解南宁市朝阳溪污水中诺如病毒污染状况。方法 2011年1~12月采集72份南宁市朝阳溪污水,用混合纤维素膜吸附法吸附病毒和聚乙二醇(PEG)沉淀法浓缩病毒后,经实时荧光逆转录-聚合酶链(Realtime RT-PCR)方法进行NV核糖核酸(RNA)检测。结果 全年采集72份污水中,诺如病毒核酸阳性率为100%,其中基因I组阳性数为51份,阳性率为70.83%,基因II组阳性数为72份,阳性率为100%。基因I组冬春季检出率高于其他季节,基因II组检出率无季节差异。结论 南宁市朝阳溪污水中存在基因I组和II组诺如病毒污染,检出率高的季节与相关NV引起的腹泻高发季节报道相一致,污水中诺如病毒的监测是人群监测手段的重要补充。

**关键词:**污水; 诺如病毒; 荧光定量 RT-PCR; 污染

## Detection of norovirus from sewage of Chaoyang Stream in Nanning

Deng Lili, Liu Wei, Tan Dongmei, et al.

Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Nanning  
530028, China.

**Abstract:****Objective** To know the contamination situation of noroviruses (NVs) in the sewage of Chaoyang Stream in Nanning. **Methods** Seventy-four sewage specimens were collected in 2011. Viruses were concentrated by absorption to mixed cellulose membranes and polyethylene glycol (PEG) precipitation, and subsequently detected for the presence of NV ribonucleic acid (RNA) using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (Realtime RT-PCR). **Results** All specimens were detected positive for NV RNA. The positive rate of NV genogroup I and genogroup II was 70.83% (51/72) and 100.00% (72/72), respectively. The positive rate of NV genogroup I was higher in spring and winter, while no seasonal difference was detected in the positive rate of genogroup II. **Conclusion** This suggests that NV contamination always exist in the sewage of Chaoyang Stream in Nanning. The seasonal trend of NV detection in sewage is consistent with that of diarrhea due to NVs. Therefore, monitoring for NV contamination in sewage is an important complementary part of NV surveillance in humans.

**Key words:** Sewage; Norovirus; Realtime RT-PCR; Contamination

诺如病毒(Norovirus, NV)属于杯状病毒科单股正链RNA病毒,是世界范围内引起急性胃肠炎爆发和散发的最重要病原体。根据病毒RNA聚合酶和衣壳蛋白编码区的核苷酸序列差异可将NV分为5个基因组,其中基因I组和基因II组是感染人类的2个最常见的基因组。大多数NV引起的水源性暴发疫情是由于饮用水或生活用水被污染所致<sup>[1,2]</sup>。通过对污水的监测可以推测NV在人群中流行状况,也可能发现隐性感染的存在;目前国内少有对污水中的NV进行检测分析的报道。为了解南宁市污水中NV污染状况,本研究于2011年1~12月采集南宁市朝阳溪污水进行NV检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 污水样本

采集2011年1~12月南宁市朝阳溪污水出水口的污水,每月三次,每次分上午和下午两个时间段采集,每次采集量约1000ml,全年采集72份污水。

**基金:**广西壮族自治区卫生厅科学研究课题(合同号:Z2011274、S201310-05)

**作者简介:**邓丽丽(1983-),女,汉,广西壮族自治区南宁市人,广西壮族自治区疾病预防控制中心主管技师,硕士,从事病原微生物检验工作。

1.2 污水样本处理

将采集到的每份污水 4℃、3000r/min 离心 30min，取上清液；再采用混合纤维素膜吸附法吸附病毒<sup>[3]</sup>和聚乙二醇(PEG)沉淀法浓缩病毒<sup>[4]</sup>。在上清液中加入 2.5M MgCl<sub>2</sub> 溶液至终浓度 0.05M，并用浓 HCl 调整 pH 值到 3.5；使用正压力泵，将混合液滤过 0.45μm 混合纤维素膜；将滤过后的硝酸纤维素膜剪碎并随后放入 10ml 3%的牛肉膏浸（pH=9.0）液中，剧烈振荡洗脱。在洗脱液中加入 PEG 6000 使其终浓度为 8%，振荡混匀后调整 pH 值到 7.0，4℃静置 2~3 小时；4℃、9000r/min 离心 30min，弃上清。加 0.2M 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（pH9.3）重悬沉淀，-80℃保存待检。

1.3 病毒RNA的提取

按QIAGEN公司的RNA提纯试剂盒（QiaAmp Viral RNA Mini kit）使用说明书进行RNA提取。

1.4 荧光定量 RT-PCR 检测

参照 Kirsti<sup>[5]</sup> 的方法，选择针对基因 I 组和基因 II 组 NV 基因开放读码框（Open Reading Frame, ORF）1 和 ORF2 连接区域设计的引物和探针(详见表 1)。采用 Invitrogen 公司的 SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit，反应体系组成：RNA 模板 5μl，2×PCR Master Mix 12.5μl，20 微摩尔/升（μmol/L）上游引物 0.5μl，20μmol/L 下游引物 0.5μl，10μmol/L 探针 0.5μl，SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix 0.5μl，用 H<sub>2</sub>O 补足至 25μl。在 BioRad 公司 IQ5 荧光定量 PCR 仪上反应。循环条件为 50℃ 30min，95℃ 2min；然后进入 40 个循环，95℃15s、55℃ 30s 并采集荧光信号为一个反应循环。

表 1 荧光定量 RT-PCR 使用的引物和探针<sup>[5]</sup>  
Table 1 Primers and Probes Used for Real-time RT-PCR

基因组	引物/探针	序列（5'→3'）
基因 I 组	JJV1F (上游引物)	GCC ATG TTC CGI TGG ATG
	JJV1R (下游引物)	TCC TTA GAC GCC ATC ATC AT
	JJV1P (探针)	FAM-TGT GGA CAG GAG ATC GCA ATC TC-BHQ
基因 II 组	JJV2F (上游引物)	CAA GAG TCA ATG TTT AGG TGG ATG AG
	COG2R (下游引物)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA
	RING2 (探针)	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-BHQ

2 结果

2.1 荧光定量 RT-PCR 检测结果

2011年1-12月采集南宁市朝阳溪污水72份，NV核酸检出率为100%，其中基因 I 组阳性数为51份，阳性率为70.83%；基因 II 组阳性数为72份，阳性率为100%；基因 I 组和基因 II 组同时检出的污水有51份，阳性率为70.83%。基因 II 组阳性率显著高于基因 I 组。

2.2 不同月份污水中 NV 的检出情况

经荧光定量 RT-PCR 检测，72 份污水中，基因 I 组 NV 在各月的检出情况不相同，在 1、3、5、7 月检测率最高(6/6)，11 月检出率最低(1/6)。基因 II 组各月检出率都相同(6/6)。各月 NV 检出情况如图 1。

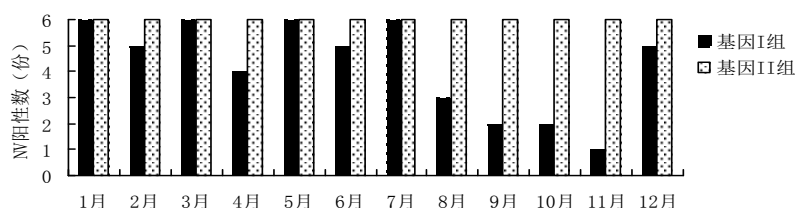


图1 2011年1~12月南宁市朝阳溪污水中NV检出情况

### 2.3 不同季节污水中 NV 检出情况

按季节统计，基因 I 组冬春季检出率高于其他季度，秋季检出率最低；基因 II 组各季节检测率均为 100%。各季节 NV 检出情况如表 3。

表 3 不同季节污水中 NV 检出情况

季节	污水份数	基因 I 组		基因 II 组	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
春季（3-5月）	18	16	88.89	18	100.00
夏季（6-8月）	18	14	77.78	18	100.00
秋季（9-11月）	18	5	27.78	18	100.00
冬季（12-2月）	18	16	88.89	18	100.00
总计	72	51	70.83	72	100.00

## 3 讨论

NV通过粪口途径感染，常见的传播途径为食用被污染的食品和水以及生活接触。由于NV在水中比较稳定，对消毒剂的耐力比一般的细菌要强，它可以通过污水在外环境中循环，亦可污染水源，易引起病毒性胃肠炎的爆发和流行<sup>[2,6]</sup>，但水中病毒的浓度很低，且NV目前还没有敏感细胞可以进行培养增殖，因此富集和浓缩病毒是决定检测成败的关键因素。本研究采用经典的混合纤维素膜吸附法吸附病毒<sup>[3]</sup>，将污水中病毒富集到膜上后，用碱性的牛肉浸膏缓冲液将病毒从膜上洗脱下来，再借鉴笔者前期建立的富集浓缩牡蛎中NV的方法<sup>[4]</sup>，将其中的聚乙二醇(PEG)沉淀法用于浓缩含有病毒颗粒的牛肉浸膏缓冲液，将污水样本从最初的1000ml浓缩至250~300μl，极大地提高了检出率。

NV感染腹泻病人排泄物是水体的主要污染源，虽然病毒在污水中不能增殖但在相当长的一段时间内可以存活并具有感染性<sup>[6]</sup>，所以城市污水存在水源性传播的风险。水体被含有NV的粪便污染后，海水中的滤食微生物与浮游藻类通过生物富集作用富集NV，人类因食用这些被NV污染的海产品而导致感染；或者人类接触含有NV的粪便污染水体而感染<sup>[7]</sup>。污水中NV的污染状况在国内外都有报道，NV检出率差异很大。曾爱华<sup>[8]</sup>等在广州地区119份生活污水中检测到基因 I 组、基因 II 组NV阳性率分别为2.52%和7.56%。南非的一项同类研究结果显示，污水中基因 I 组NV检出率为29%，基因 II 组检出率为63%<sup>[9]</sup>。本研究在2011年1~12月南宁市朝阳溪污水中检测到NV，总检出率为100%，提示南宁市朝阳溪污水全年存在NV污染，有潜在的传播风险。污水样品中基因 I 组NV的阳性率为70.83%，而基因 II 组NV的阳性率达100%，从侧面反映了基因 II 组NV是引起人群腹泻的NV优势病毒。值得注意的是，NV引起的散发性急性胃肠炎腹泻病例中，基因 I 组NV所占比例很低<sup>[10,11]</sup>，而在水源性暴发疫情中占重要地位。Maria<sup>[12]</sup>等报道的13起与水源相关的NV胃肠炎暴发疫情中有12起是由基因 I 组所致，其认为这是由于基因 I 组比基因 II 组NV更能稳定存活在水体，加上人群长期以来只对优势流行的基因 II 组NV有免疫力，而对不常见的基因 I 组NV更易感。本研究从污水样本中检出的基因 I 组NV的阳性率也相当高，推测在人群中存在基因 I 组NV隐性感染。

南宁NV散发性腹泻全年均有发生,高发季节是冬春季,流行特征与国内外大部分研究结果一致<sup>[10]</sup>。亦有文献报道称,有些地区NV感染在夏天亦会出现高峰,可能与夏季的食物和水被NV污染机会增加有关<sup>[11,13]</sup>。本研究结果显示,南宁市朝阳溪污水中全年均能检测出NV,其中基因II组NV检出率无季节性差异;而基因I组除秋季检测率较低外,其它季节无较大差异,检出率高的季节与NV引起的腹泻高发季节相一致。

通过对南宁市朝阳溪污水的监测,反映了该地区污水中NV的污染状况,将污水监测与临床病例结合起来,可使病毒感染与胃肠炎之间的关系更为清晰,为NV感染的流行病学监测和溯源调查提供了数据支持,对防控NV具有较重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff CH. Norovirus outbreaks from drinking water[J]. 2005, *Emerg Infect Dis*, 11(11):1716-1721.
- [2] 周小涛,李苑,许振辉,等.深圳市某村一起水源性诺如病毒感染性胃肠炎暴发的调查[J]. *实用预防医学*, 2011, 18(2):236-238.
- [3] Matsuura K, Hasegawa S, Nakayama T, et al. Viral pollution of the rivers in Toyama City[J]. *Microbiol Immunol*, 1984, 28(5):575-588.
- [4] 邓丽丽,刘巍,谭冬梅,等. 应用荧光定量RT-PCR法检测牡蛎中诺如病毒[J]. *中国热带医学*, 2011, 11(2):133-135.
- [5] Kirsti V, Mette M. Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Norway during 2000 to 2005 and comparison of four norovirus real-time reverse transcriptase PCR assays[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(10):3695-3702.
- [6] Verheyen J, Timmen WM, Laudien R, et al. Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(9):2798-2801.
- [7] 罗兰,吴新伟,刘于飞,等. 2009-2011年广州环境与临床标本中诺如病毒的分子流行病学特征[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(1):40-43.
- [8] 曾爱华,金小宝,朱家勇,等. 广州水体中人类杯状病毒污染状况检测分析[J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(12):1641-1643.
- [9] Murray TY, Mans J, Taylor MB. Human calicivirus diversity in wastewater in South Africa[J]. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(6):1843-1853.
- [10] 谭冬梅,刘巍,邓丽丽,等. 南宁市散发性腹泻诺如病毒分子流行病学分析[J]. *中国公共卫生杂志*, 2011, 27(11):1372-1375.
- [11] 方肇寅,谢华萍,吕红霞,等. 1999-2005年我国婴幼儿人杯状病毒腹泻研究[J]. *病毒学报*, 2007, 23(1):9-14.
- [12] Maria L, Margareta T, Maria B, et al. Genetic diversity among foodborne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(8):2411-2418.
- [13] Ho EC, Cheng PK, Lau AW, et al. Atypical norovirus epidemic in Hong Kong during summer of 2006 caused by a new genogroup II/4 variant[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(7):2205-2211.