

诺如病毒胃肠炎暴发后环境中病毒检测 情况分析

周晓红 李晖 杨杏芬 柯昌文 钟豪杰 孙立梅 郭汝宁

【摘要】 目的 了解诺如病毒胃肠炎暴发后,病例临床症状消失、末例病例发病日期经过最长潜伏期(72 h)且无续发病例的情况下,病例家庭环境及外环境水标本中病毒存在情况。方法 在末例病例发病日期经过最长潜伏期(72 h)后,采集病例肛拭标本、家庭环境标本、外环境水标本,采用RT-PCR方法检测病毒,阳性标本测序分析。结果 9份病例肛拭标本中3份呈阳性;46份家庭环境拭子中2份呈阳性,分别是来自两户已无现症病例的家庭厕所马桶表面;5份外环境水标本中1份呈阳性,即村民粪便直接排入的河涌。病例肛拭、家庭环境拭子及河涌水三者检出的病毒株核苷酸序列一致,提示病毒同源。结论 诺如病毒胃肠炎暴发后期,病例肛拭、病例家庭环境及外环境水标本中仍能检出病毒,因此有必要加强病例的粪便管理及疫情后期的环境消毒,以防粪便污染引起二代病例。

【关键词】 诺如病毒; 胃肠炎; 环境

An epidemiological study on the norovirus detected in the field environment after an outbreak of norovirus gastroenteritis ZHOU Xiao-hong¹, LI Hui², YANG Xing-fen², KE Chang-wen², ZHONG Hao-jie², SUN Li-mei², GUO Ru-ning². 1 The Epidemiology Department of the Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632 China; 2 Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention. Corresponding author: YANG Xing-fen, Email: yangxingfen@cdcp.org.cn; LI Hui, Email: gz_lihui@tom.com

This work was supported by a grant from the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No.2007A0300007-7) and The Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province (No. A2007065)

【Abstract】 **Objective** To study the status of norovirus in environment of the patient's residence and water samples after a norovirus gastroenteritis outbreak, to provide evidences for the development of strategies for prevention and control of the disease. **Methods** After a norovirus gastroenteritis outbreak, anus swabs from the patient, swabs from the household environment and the water samples were collected to detect the norovirus by RT-PCR methods. Sequencing analysis was conducted on those positive specimens. **Results** Three specimens of the anus swabs from 9 patients and 2 samples of the 46 house environment swabs were positive to the virus. The latter were from the surface of water-closets of two families that the illness were asymptomatic. Among 5 water samples, only one was positive, which was the rivulet water that the feces of the villagers evacuated directly. Results showed that the sequences of the virus detected from the anus swabs of the patients, the swabs from the household environment and the samples of the rivulet water belonged to the same species. **Conclusion** It is necessary to strengthen activities as supervision and disinfection of the feces of the patients, especially on monitoring the feces that might have contaminated the water during the norovirus gastroenteritis outbreak.

【Key words】 Norovirus; Gastroenteritis; Environment

诺如病毒(NoV)是世界范围内急性胃肠炎暴发

的重要病原之一。近年在我国由该病毒引起急性胃肠炎暴发的报道增多^[1-6]。鉴于病例感染该病毒后排毒期长,且病毒在外界存活能力强的特点^[7,8],本研究通过广州市一起NoV胃肠炎暴发后期,采集病例肛拭、家庭环境标本、外环境水标本进行病原学检测分析,并结合该疫情流行病学资料,探讨疫情暴发后期病毒污染外环境的情况。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.011

基金项目:广东省科技计划(2007A0300007-7);广东省医学科学技术研究基金(A2007065)

作者单位:510632 广州,暨南大学医学院流行病学教研室(周晓红);广东省疾病预防控制中心(李晖、杨杏芬、柯昌文、钟豪杰、孙立梅、郭汝宁)

第一作者现工作单位:510300 广州,广东省疾病预防控制中心
通信作者:杨杏芬,Email: yangxingfen@cdcp.org.cn; 李晖,Email: gz_lihui@tom.com

对象与方法

1. 一般资料:疫点村为独立村落,全村 75 户 295 人。饮用水为市政自来水,村中户与户之间紧密排列,卫生条件一般。厕所均为村民自建,粪便未经处理就经村中明渠或暗渠直接排放到附近河涌。农田灌溉用水一部分来自河涌水,村民日常食用蔬菜均为自种。大部分村民以务农为主,疫情发生前该村无聚餐史、聚会活动。

2. 疫情流行病学特征:首发病例女性,48 岁,于 2009 年 11 月 21 日出现头晕、呕吐,伴有恶心、腹胀、乏力和寒战。该病例日常以家务为主,无外出就餐及活动史。12 月 1 日此次疫情出现最后一例病例,发病高峰在 11 月 27—28 日。全村共 37 例村民发病,罹患率为 12.5%。病例分布在全村 20 户,占总户数的 26.7%。其中年龄最小 6 月龄,最大 92 岁,主要集中在 0~10 岁和 >45 岁年龄组,分别占 24.3%、45.9%;男性发病 16 例,女性发病 21 例,男女发病比例 0.8:1。患者以腹泻(67.6%)、呕吐(54.1%)、恶心(56.8%)、腹痛(54.1%)等胃肠道症状为主,部分病例伴低热(13.5%)、头晕(21.6%)、乏力(27.1%)等。大部分病例症状较轻,且有自限性,病程通常为 1~2 d,最长 3 d。

3. 标本采集:在所有病例临床症状均消失、末例病例发病日期经过最长潜伏期(72 h)且无续发病例的情况下,分别采集病例肛拭标本、家庭环境标本、外环境水标本。

(1) 病例标本:按照参考文献[9]对疑似病例的定义,采集 9 例疑似病例肛拭(分别来自第 11、43、44、45、55、61、63、67 号家庭,其中第 43 号家庭采集 2 份);冷藏运送至实验室。

(2) 家庭环境标本:用棉签沾适量 MEM 液,采集病例家庭(第 3、38、39、63、67 号家庭)环境(厕所马桶表面、厕所门把手、厕所水龙头、厨房门把手、厨房用具、冰箱把手、呕吐物地面、卧室门把手等)标本,共 46 份,冷藏运送至实验室。

(3) 外环境中水标本:采集该村池塘水、河涌水、农田灌溉水、病例家庭蓄水池饮用水(水源均为市政自来水),共 5 份标本,各标本采集量为 2.5 L,冷藏运送至实验室。

4. 标本检测:

(1) 标本前处理:①肛拭及家庭环境标本:含拭子试管涡流振荡 2 min 后,弃拭子,剩余 MEM 液 3000 r/min 离心 3 min,取上清提取病毒 RNA。由于

环境标本中病毒含量低,为防止实验室污染,病例肛拭标本、家庭环境标本及水标本分别在不同楼层的实验室进行前处理。②水标本:采用普通混合纤维素酯微孔滤膜法富集病毒^[10]。1 L 水样中加入 20 ml 2.5 mol/L 的 MgCl₂, 终浓度达到 0.05 mol/L;用 1 mol/L 的盐酸调节水样使 pH=3.0;0.45 μm 混合纤维素酯微孔滤膜(ADVANTEC CAT.NO:A045A142C)真空抽滤,然后用 3%牛肉膏-0.05 mol/L 甘氨酸洗脱液(pH=9.5)洗脱滤膜(20~30 min),收集洗脱液用 PEG-NaCl 法进行二次浓缩。向含病毒洗脱液中加入 40%的 PEG6000,终浓度为 10%;加入 5 mol/L 的 NaCl 溶液,使终浓度为 0.3 mol/L;充分混匀,于 4 ℃ 下静置过夜;在 4 ℃ 10 000 r/min 离心 30 min 后弃上清液,保留沉淀待提取病毒 RNA。

(2) 病毒 RNA 提取:按 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit(CAT.NO:52906)试剂盒提取。用经过高压的 DEPC 水作为阴性对照,与待检标本同时提取 RNA 及 RT-PCR 检测反应。

(3) RT-PCR 方法:合成引物 JV131/JV12Y^[11],采用日本 TaKaRa 公司的 One Step RNA PCR Kit 进行 RT-PCR,总反应体积为 25 μl[DEPC 处理 H₂O 11 μl、10×buffer 2.5 μl、dNTPs 2.5 μl(10 mmol/L)、MgCl₂ 0.5 μl(25 mmol/L)、JV131(10 nmol/L)0.5 μl、JV12Y(10 nmol/L)0.5 μl、AMV-RT 0.4 μl(5 U/μl)、Taq polymerase 0.4 μl(5 U/μl)、Rasine 0.4 μl、RNA 2 μl]。反应参数:50 ℃ 45 min;94 ℃ 2 min;94 ℃ 1 min→50 ℃ 80 s→72 ℃ 1 min(6 个循环);94 ℃ 30 s→52 ℃ 30 s→72 ℃ 30 s(30 个循环);72 ℃ 7 min。目的片段长度为 327 bp,用 1.5%琼脂糖凝胶 110 V 电泳 15 min 观察结果,对于检测到与预期大小相符的标本判为阳性。

(4) 核酸测序:选取 PCR 阳性的标本,用 Qiagen 公司胶回收试剂盒纯化后,用 PCR 引物进行测序反应,产物纯化后直接在 ABI PRISM® 3130 测序仪上进行双向测序。测序结果应用 MEGA 4.0 软件进行核苷酸序列同源比较和种系进化分析,所用参考毒株序列来源于 GenBank 数据库。

结 果

1. RT-PCR 检测:RT-PCR 检测阴性对照结果均为阴性,证实检测过程中不存在实验室污染。9 份病例肛拭标本中 3 份阳性,分别来自第 44 号、第 61 号、第 67 号村民家庭。46 份家庭环境拭子中 2 份阳性,分别是第 3 号和第 67 号村民家庭厕所马桶表

面。5 份外环境水标本中 1 份阳性,为村民粪便直接排入的河涌水阳性(图 1)。



注:图中数字表示村民家庭编号;●病例肛拭阳性;★家庭环境检出病毒;★外环境水标本中检出病毒

图 1 NoV 急性胃肠炎暴发村病例、家庭环境及外环境水标本检出情况分析

2. 测序分析:6 份阳性标本中,有 3 份标本 RT-PCR 产物量偏低不适合测序,只测序 3 份标本(病例肛拭、家庭环境拭子、河涌水各 1 份)。病毒序列做核苷酸相似性分析,三者核酸相似性 100%,提示三者同源(图 2)。

上述 3 份标本病毒测序后,将测序结果于 GenBank 进行 BLAST 比较,证实 3 株病毒均为 NoV。将引物序列去除后,与参考株进行比较,并绘制进化树(图 3),表明本次疫情的病毒株与参考株 Camberwell Virus 同源性最高,属于 G II-4 群。

讨论

G II-4 是近年国内外引起 NoV 胃肠炎暴发的重要基因型^[2,12]。本研究通过对病例临床表现、流行病学调查及病原学检测,确认本次疫情是一起由 NoV G II-4 型引起的胃肠炎暴发。NoV 主要通过粪-口途径感染,常见的传播途径为食用被污染的食品及水、生活接触。人群感染暴发最初通常由食用被污

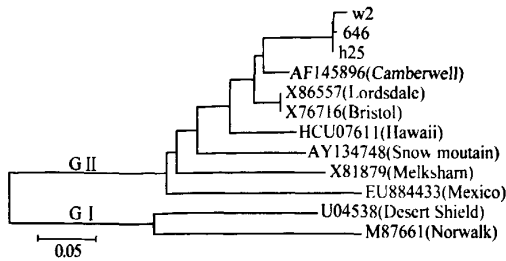
染的食品及水引起,然后通过人间接传播^[13]。本次疫情暴发主要传播途径为密切接触。

在调查疫情暴发,居住环境拭子的检测对暴发原因及传播途径的确定有重要作用,疫情后期,也能指示环境受病毒污染的程度。Whitney 等^[14]对美国北卡罗来纳州幼儿园暴发的急性胃肠炎调查显示,外环境拭子的阳性率为 59%,其中 45% 的外环境拭子与患者粪便标本检出相同的病毒。本研究共采集检测 46 份环境拭子,其中 2 份(第 3 号、第 67 号家庭厕所马桶表面)阳性。这两户已无现症病例家庭的厕所马桶表面检测出病毒株与病例肛拭检出的病毒株核苷酸序列高度一致,提示病毒同源。提示两种可能:①病例通过粪便排病毒通常发生在暴露后 15 h,以暴露后 25~72 h 传染性最强,可持续到症状消失后 2 周以上^[7]。本研究采样时病例已无临床症状,但存在隐匿排病毒通过粪便污染马桶表面的可能性。②NoV 在外界抵抗力很强^[15],且在外环境中能长时间存活,容器表面的病毒 7 d 后仍有较高浓度的检出值^[8]。因此本研究在家庭厕所马桶表面检出的病毒是否由病例发病期间排出,在外界长时间存活至采样当日,还有待深入研究。上述两种可能性都提示,疫情暴发后需要注意病例粪便的管理及厕所的消毒。

NoV 是重要的食源性及水源性病毒^[16],水源污染是重要的疫情暴发原因^[17-20]。由于该村家庭粪便未经处理就直接排放到该河涌(在河涌水中检测出与病例肛拭、家庭厕所马桶表面核苷酸序列一致的病毒株),提示河涌水已经受到粪便的污染。该村村民饮用水为市政自来水,且村民的蓄水池水中未检出病毒,因此排除经该河涌的水直接引起暴发的可能。疫情发生期间,当地卫生防疫部门已经对河涌进行消毒,但在所有病例临床症状消失,末例病例发病时间经过最长潜伏期(72 h)且该村无续发病例的

病例肛拭	GTGCTGGCAGCTGCTCTAGAAATCATGGITAAATTCCTCAGAACACATTTGGCTCAGGTAGTAGCAG
环境拭子
小河涌水
病例肛拭	AAGACCTTCTTTCTCCTAGCGTGGTGGATGTGGGTGACTTCACAATATCAATCAAACGAGGGTCTTCCCTC
环境拭子
小河涌水
病例肛拭	TGGGGTGCCTGACCTCCCAATGGAACTCCATCGCCCACTGGCTTCTCACTCTCTGTGCACTCTCCGAA
环境拭子
小河涌水
病例肛拭	GTTACAAATTTGTCCCAAGACATCATACGGCTAATTCCTCTCTCTCTCTATGGTATGATGAA
环境拭子
小河涌水

图 2 病例肛拭、家庭环境拭子及河涌水中检出 NoV RNA 依赖的 RNA 聚合酶区部分核苷酸序列分析



注: 646为病例肛拭;w2为水标本;h25为家庭环境拭子

图3 NoV RNA 依赖的RNA 聚合酶部分核苷酸序列进化树

情况下,从无现症的病例家庭环境及外环境水标本中仍能检出NoV。而在此情况下,易被认为“疫情结束”而放松后续处理工作。此结果提示:①病例临床症状消失且无续发病例,还不能判断为疫情解除或疫情扑灭,必须考虑到病例排毒期长,病毒在外界存活能力强,残留在外环境的病毒有引发二代感染的可能性;②NoV 胃肠炎疫情暴发后要加强病例粪便的管理及有效消毒,尤其要注意粪便对水源污染的监控。

(广州市南沙区疾病预防控制中心在调查采样过程中给予支持协助,谨此感谢)

参 考 文 献

[1] Jia LP, Qian Y, Zhang Y, et al. Norovirus associated outbreaks of acute gastroenteritis in hospitals in Beijing in late 2006. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(3): 213-217. (in Chinese)
贾立平, 钱渊, 张义, 等. 北京市某些医院内腹泻暴发与诺如病毒的相关性研究. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(3): 213-217.

[2] Li H, Fang L, Zou LR, et al. Molecular epidemiological characteristic of norovirus gastroenteritis outbreaks in Guangdong. *Chin J Microbiol Immunol*, 2007, 27(1): 5-8. (in Chinese)
李晖, 方苓, 邹丽容, 等. 广东省暴发性胃肠炎中诺如病毒的分子流行病学特点分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(1): 5-8.

[3] Guo RN, Zheng HZ. Epidemiological analysis on norovirus gastroenteritis in Guangdong province, 2006-2007. *Chin J Prev Med*, 2008, 42(8): 607-608. (in Chinese)
郭汝宁, 郑慧贞. 2006-2007年广东省诺如病毒胃肠炎暴发的流行病学分析. *中华预防医学杂志*, 2008, 42(8): 607-608.

[4] Li H, Mo ZJ, Yang JY, et al. Epidemiological characteristics of norovirus diarrhea outbreak in Guangxi, 2006-2007. *South China J Prev Med*, 2008, 34(5): 6-13. (in Chinese)
李海, 莫兆军, 杨进业, 等. 广西壮族自治区2006-2007年诺如病毒腹泻暴发疫情特征分析. *华南预防医学*, 2008, 34(5): 6-13.

[5] Liu W, Long WJ, Shi LL, et al. Genotyping of norovirus strains detected in the first outbreak of gastroenteritis in Guangxi. *Appl Prev Med*, 2007, 13(2): 69-73. (in Chinese)
刘巍, 隆文杰, 石玲玲, 等. 广西首起诺如病毒感染性腹泻病原基因测序分析. *应用预防医学*, 2007, 13(2): 69-73.

[6] Xie L, Cui WW, Deng J, et al. Epidemiological analysis of norovirus enteritis outbreaks in Hangzhou city. *Chin Prev Med*, 2009, 10(1): 23-25. (in Chinese)
谢立, 崔威武, 邓晶, 等. 杭州市诺如病毒肠炎暴发疫情分析. *中国预防医学杂志*, 2009, 10(1): 23-25.

[7] Xu Q. Epidemic and control strategy on nosocomial outbreak of norovirus gastroenteritis. *Acta Acad Med Sinicae*, 2008, 30(5): 614-617. (in Chinese)
徐潜. 医院诺如病毒胃肠炎的流行与控制. *中国医学科学院学报*, 2008, 30(5): 614-617.

[8] Doris HD, Arine S, Karen W, et al. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int J Food Microbiol*, 2006, 108(1): 84-91.

[9] Guangdong Provincial Health Department. Infection control guidelines of norovirus gastroenteritis, 2008. (in Chinese)
广东省卫生厅. 粤卫[2008]1号诺如病毒感染性腹泻预防控制工作指引, 2008.

[10] Zhang CM, Liu YJ, Wang XC, et al. Comparison of concentration methods for enteroviruses from environmental waters. *Chin Water & Wastewater*, 2007, 23(7): 36-39. (in Chinese)
张崇森, 刘永军, 王晓昌, 等. 环境水体中肠道病毒浓缩方法的比较. *中国给水排水*, 2007, 23(7): 36-39.

[11] Vennema H, Bruin ED, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol*, 2002, 25(2): 233-235.

[12] Siebenga J, Annelies K, Koopmans M. Food-borne viruses in Europanetwork report: the norovirus GII 4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UKV6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill*, 2008, 13(1-3): 1-4.

[13] Thornton AC, Jennings C, Karen S. Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag Response*, 2004, 2(1): 4-9.

[14] Whitney H, Lyman D, Joan F. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. *J Pediatr*, 2009, 154(2): 253-257.

[15] Jin Q. Norwalkvirus//Jin Q. Medical molecular virol. Version 1. Beijing: Science Press, 2001: 565-578. (in Chinese)
金奇. 诺瓦克组病毒//金奇. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001: 565-578.

[16] Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol*, 2004, 90(1): 23-41.

[17] Zhang QL, Zhong XG, Zeng YM, et al. An investigation and analysis on an outbreak of norovirus diarrhea in a community in Dongguan City. *Dis Surveil*, 2007, 22(10): 677-679. (in Chinese)
张巧利, 钟新光, 曾耀明, 等. 东莞市一起社区诺如病毒腹泻暴发调查分析. *疾病监测*, 2007, 22(10): 677-679.

[18] Wei ZG, Jiang SP, Zhang Q, et al. The epidemiological investigation of norovirus gastroenteritis outbreak in one college. *J Appl Prev Med*, 2007, 13(4): 213-214. (in Chinese)
韦志光, 江世平, 张屹, 等. 2007年某高校诺如病毒引起感染性腹泻暴发疫情分析. *应用预防医学*, 2007, 13(4): 213-214.

[19] Tang JY, Xie HP, Hu HK, et al. Epidemiological investigation of an outbreak of acute gastroenteritis caused by human calicivirus in Lulong Country. *Chin J Exp Clin Virol*, 2007, 21(3): 232-234. (in Chinese)
唐景裕, 谢华萍, 胡海宽, 等. 卢龙县一起人杯状病毒引起急性胃肠炎暴发的流行病学调查. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2007, 21(3): 232-234.

[20] Kong ZF, Cao PY, Huang ML, et al. The epidemiological investigation of norwalkvirus gastroenteritis outbreak. *Dis Surveil*, 2007, 27(6): 422-423. (in Chinese)
孔志芳, 曹品元, 黄美林, 等. 一起诺瓦克病毒引起感染性腹泻暴发疫情调查分析. *疾病监测*, 2007, 22(6): 422-423.

(收稿日期: 2009-06-08)

(本文编辑: 张林东)