

2014—2016 年烟台市环境污水中 A 组轮状病毒的型别和分子特征

徐明怡^{1,2} 周楠² 林小娟³ 王素婷³ 纪峰³ 徐爱强^{2,3} 宋艳艳² 陶泽新^{2,3}

¹山东省职业卫生与职业病防治研究院, 济南 250062; ²山东大学公共卫生学院 济南 250012; ³山东省疾病预防控制中心 山东省传染病预防控制重点实验室, 济南 250014

通信作者: 通信作者: 陶泽新, Email: zexin.tao@163.com, 电话: 0531-82679698; 宋艳艳, Email: yysong@sdu.edu.cn, 电话: 0531-88382625

【摘要】 **目的** 了解环境污水中 A 组轮状病毒 (group A rotavirus, RVA) 基因型分布和分子流行病学特征, 探索环境污水监测在研究 RVA 区域性流行中的作用。 **方法** 2014 年 1 月至 2016 年 12 月期间, 在山东省烟台市每月采集生活污水标本, 浓缩处理后提取 RNA, 进行逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增 RVA VP7 和 VP4 基因片段, 经纯化、TA 克隆和 Sanger 测序后, 根据获得的序列进行基因定型和系统发生学分析。 **结果** 监测时间内共采集 36 份污水标本, 31 份水样 (检出率 86.1%) RVA 检出 VP7 和 VP4 阳性。共获得 205 条 G 基因型序列和 239 条 P 基因型序列, 分别属于 4 个 G 基因型和 6 个 P 基因型, 其中 G9 95.6% (196/205)、P[8] 58.6% (140/239) 和 P[4] 28.0% (67/239) 检出数量最多。对 G9、P[8] 和 P[4] 进行的系统发生学分析表明, 3 种型别在当地均有多个传播链的共循环。 **结论** 本研究描述了烟台市环境污水中 RVA 的基因型分布和序列特征, 表明环境污水监测是探索一个地区 RVA 分子流行病学特征的有效途径。

【关键词】 A 组轮状病毒; 急性胃肠炎; 分子流行病学; 环境监测

基金项目: 泰山学者工程专项 (ts.201511105); 国家自然科学基金 (81573209)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.05.006

Genotypes and molecular characterization of group A rotavirus in domestic sewage in Yantai, 2014-2016

Xu Mingyi^{1,2}, Zhou Nan², Lin Xiaojuan³, Wang Suting³, Ji Feng³, Xu Aiqiang^{2,3}, Song Yanyan², Tao Zexin^{2,3}

¹ Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Jinan 250062, China; ² School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012; ³ Shandong Center for Disease Control and Prevention, Shandong Provincial Key Laboratory of Infectious Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China
Corresponding author: Tao Zexin, Email: zexin.tao@163.com, Tel: 0086-531-82679698; Song Yanyan, Email: yysong@sdu.edu.cn, Tel: 0086-531-88382625

【Abstract】 **Objective** To understand the genotype distribution and molecular epidemiological characteristics of the group A rotavirus (RVA) in domestic sewage, and further explore the importance of environmental surveillance in investigating RVA regional circulation. **Methods** Sewage samples were collected monthly in the city of Yantai from January 2014 to December 2016. After concentration, total RNA was extracted, and RVA VP7 and VP4 coding regions were amplified via RT-PCR. PCR products were purified, cloned and Sanger sequenced. Genotyping and phylogenetic analysis was conducted based on the sequences. **Results** Thirty-six sewage samples were collected and 86.1% was positive with VP7 and VP4 sequences. A total of 205 VP7 and 239 VP4 nucleotide sequences were obtained, belonging to 4 G genotypes and 6 P genotypes. Among these, G9 (95.6%, 196/205), P[8] (58.6%, 140/239) and P[4] (28.0%, 67/239) were the most common genotypes. Phylogenetic analysis for G9, P[8] and P[4] sequences revealed co-circulation of multiple transmission chains in local population. **Conclusions** This study describes the genotype distribution and sequence characteristics of local RVA in Shandong province, and the result demonstrate that surveillance on environmental sewage is an effective way in investigating RVA molecular epidemiology.

[Key words] Rotavirus A; Acute gastroenteritis; Molecular epidemiology; Environmental surveillance

Fund programs: Taishan Scholar Program of Shandong Province (ts. 201511105); National Natural

Science Foundation of China (81573209)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.05.006

A 组轮状病毒 (group A rotavirus, RVA) 是全球范围内 5 岁以下儿童急性胃肠炎的主要病原, 每年导致 45 万例病人死亡^[1]。RVA 属于呼肠孤病毒科, 其基因型的划分基于 VP7 和 VP4 衣壳蛋白的编码序列, 分别为 G 基因型和 P 基因型。目前 RVA 已有至少 36 个 G 基因型和 51 个 P 基因型被发现^[2]。RVA 基因型的监测对于掌握人群 RVA 流行变异和重排、有针对性地开发疫苗以及评估疫苗有效性都有着重要的作用。

人肠道中复制的病毒颗粒可随粪便排出体外、进入城市污水管网、进而汇入污水处理厂。采集污水处理厂汇集的污水标本进行检测, 可以获取污水管网覆盖地区人群中该病原的感染情况。因此, 环境污水监测是一种经济有效的监测手段, 该方法已经在全球消灭脊髓灰质炎行动中得到了成功的应用^[3]。本文对烟台市 3 年的 RVA 环境污水监测结果进行总结分析。

1 材料与方法

1.1 污水的采集与浓缩 选择烟台市某污水处理厂作为采样点, 在进水口处采集污水标本, 2014 年 1 月至 2016 年 12 月期间每月采集一次, 每次采集 1 L, 低温运输至实验室, 4 000×g 于 4 °C 离心去除沉淀后, 使用阴离子硝酸纤维素酯膜吸附和超声波震荡洗脱的方法对污水上清进行浓缩^[4], 获得 10 ml 污水浓缩液。

1.2 病毒 RNA 的提取 取 140 μl 污水浓缩液, 使用 Qiagen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒, 提取总 RNA 50 μl。所提取的 RNA 经过 94 °C 5 min 热变性后, 迅速置于 4 °C 冷却, 加入 1 μl (40 U) RNasin (Promega, 美国) 冻存。

1.3 一步法逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 使用一步法试剂盒 SuperScript III One-step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen) 对污水 RNA 分别进行 RVA VP7 和 VP4 部分片段的 RT-PCR 扩增。扩增 VP7 片段所用引物为 VP7F.49S (5'-ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC-3') 和 VP7R.932 A (5'-ACT TGC CAC CAT YTY TTC C-3'); 扩增 VP4 基因片段所用引物为 VP4F.142S (5'-TAT GCI CCW

GTI AMT TGG-3') 和 VP4R.805 A (5'-ATT GCA TTT CYT TCC AYA AYG-3')。RT-PCR 反应体系的总体积为 50 μl, 循环参数设置为: 50 °C 30 min、94 °C 2 min; 94 °C 15 s、50 °C 30 s、68 °C 1 min (VP7) 或 68 °C 45 s (VP4), 共 42 个循环; 最后 68 °C 延伸 5 min。

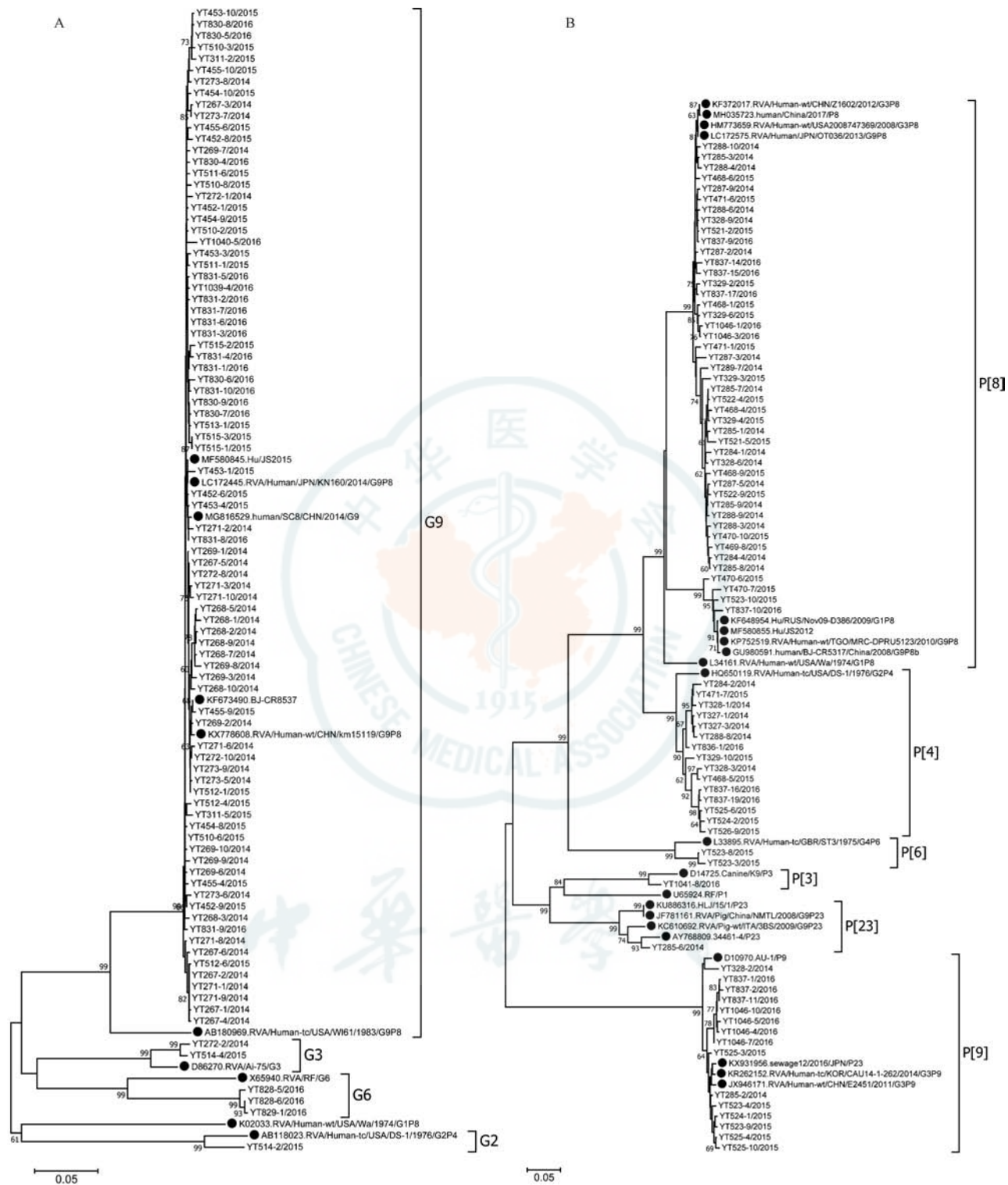
1.4 PCR 产物测序 PCR 反应产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, RVA VP7 和 VP4 扩增目的片段的大小分别应为 884 bp 和 664 bp。阳性扩增片段使用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, 美国) 进行凝胶回收, 回收产物连接入 pGEM-T Easy 载体 (Promega, 美国), 通过热休克法将重组子转化入 CaCl₂ 法制备的感受态大肠杆菌 TG1 中。经过氨苄抗性平板和蓝白斑筛选, 每个重组子挑取 8~12 个白色菌株, 由生工生物工程(上海)股份有限公司使用 T7 引物进行 Sanger 法测序。

1.5 基因型确定和系统进化分析 使用 BioEdit 7.0 对获得的 RVA VP7 和 VP4 核苷酸序列进行同源性分析和分子定型。使用 MEGA 7.0 进行基于邻位法的系统发生树分析, bootstrap 值设定为 1000 次。为去除冗余信息, 核苷酸同源性超过 99.0% 的烟台本地序列被删除。

2 结果

2.1 RVA 检出情况与型别分布 研究期间在烟台市共采集污水标本 36 份, 31 份检测到 RVA G 和 P 基因型, 检出率均为 86.1%。共检出 205 条 G 基因型序列, 属于 G2、G3、G4 和 G9 共 4 个 G 基因型, 其中 G9 占 95.6% (196/205) (表 1)。共获得 239 条 P 基因型序列, 属于 P[3]、P[4]、P[6]、P[8]、P[9] 和 P[23] 6 个 P 基因型, 其中 P[8] (58.6%, 140/239) 和 P[4] (28.0%, 67/239) 检出数量最多 (表 1)。

2.2 系统进化分析 本研究对烟台市 RVA 流行 G 和 P 型别进行了系统发生学分析 (图 1)。在各基因型的发生树上均有多个分支, 提示当地有多个传播链在共循环。通过对 3 年不同年份的序列进行比较发现同一年的序列有一定的聚集性。G9、P[4] 和 P[8] 序列的平均遗传距离分别为 0.010、0.025 和



注:图 A、B 分别为 G、P 基因型发生树;●代表参考株序列

图 1 烟台轮状病毒 G、P 基因型系统进化树

Note: Phylogenetic relationships of G and P are illustrated in panel A and B, respectively; ● indicates reference sequences

Fig.1 Phylogenetic analysis of G and P genotypes

有效手段,但由于环境污水监测无法确定病毒的宿主来源,而 RVA 的宿主动物较多,所以要通过序列

分析对结果进行判断。本研究反映了城市生活污水中 RVA 的广泛存

在,并分析了 RVA 的分子流行病学特征及其多种基因型共循环的特点,说明了基于环境污水监测的分子流行性学分析是监测人群中 RVA 流行的有效途径。在此基础上,将结合人群 RVA 所致急性胃肠炎病例的病原学监测,更加深入地开展相关分子流行病学研究,这对于掌握人群中 RVA 的循环状况及其基因型变迁和加强 RVA 急性胃肠炎的防控工作有着极为重要的实际意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 徐明怡、王素婷:实验操作;周楠、林小娟、纪峰:分析数据;徐明怡:文章撰写;徐爱强:经费支持;宋艳艳、陶泽新:设计实验

参考文献

- [1] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(2):136-141. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70253-5.
- [2] Rotavirus Classification Working Group: RCWG. <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>. 2019. 08. 19.
- [3] Hovi T, Shulman LM, van der Avoort H, et al. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond [J]. *Epidemiol Infect*, 2012, 140: 1-13. DOI:

- 10.1017/s095026881000316x.
- [4] Wang H, Tao Z, Li Y, et al. Environmental surveillance of human enteroviruses in Shandong Province, China, 2008-2012: serotypes, temporal fluctuation and molecular epidemiology [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80 (15): 4683-4691. DOI: 10.1128/AEM.00851-14.
- [5] Altay A, Aydin M, Matsumoto T, et al. Emergence of rotavirus G9 as the dominant genotype in Turkish children with diarrhea [J]. *J Clin Virol*, 2015, 70: S22-S23. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.07.058.
- [6] Kaplon J, Grangier N, Pillet S, et al. Predominance of G9P[8] rotavirus strains throughout France, 2014-2017 [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(6):660-661, +4. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.10.009.
- [7] Ituriza-Gomara M, Dallman T, Banyai K, et al. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network [J]. *Epidemiol Infect*, 2010, 139(6): 895-909. DOI: 10.1017/s0950268810001810.
- [8] Dian Z, Fan M, Wang B, et al. The prevalence and genotype distribution of rotavirus A infection among children with acute gastroenteritis in Kunming, China [J]. *Arch Virol*, 2017, 162(1): 281-285. DOI: 10.1007/s00705-016-3102-6.
- [9] 李丹地, 徐子乾, 谢广成, 等. 确认我国轮状病毒疫苗株 LLR 基因型为 G10P [15] [J]. *病毒学报*, 2015, 31(2): 170-173. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002642.
- [10] 段招军. 人 A 组轮状病毒疫苗研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(10): 1088-1092.

(收稿日期:2019-05-14)

(本文编辑:唐浏英)

· 编委风采 ·

胡孔新, 2004 年中国疾控中心病毒病所博士毕业, 现任中国检验检疫科学研究院研究员、卫生检疫研究所所长、外来传染病防控首席专家、国家质检总局外来传染病防控重点实验室主任。先后主持国家自然科学基金、“863”、重大及重点专项等课题; 主持建立全国口岸输入性传染病哨点监测技术网络; 多次组织登革、流感病毒等全国实验室检测能力验证项目; 应急研制的流感新甲型 H1N1 病毒核酸检测方法获国家联防联控科技组推荐并形成行业标准; 主持研制“病毒气溶胶采集富集仪及病毒检测试剂”项目, 通过液相磁珠富集技术结合高效气液混合设计, 显著提升了环境空气中生物粒子液相富集效果, 该成果荣获“国家重点新产品”证书, 关键技术集成进入“环境气溶胶生化危害在线预警鉴定系统”, 实现了生物气溶胶在线预警与极速核酸检测一体化, 并在北京大兴机场等公共场所部署应用。已发表学术论文 50 余篇, 获发明专利授权 5 项, 先后获国家科技进步一等奖 1 项(参与), 国家质检总局“科技兴检”奖一等奖 3 项(主持 1 项); 享受国务院政府特殊专家津贴, 获“全国质量监督检验检疫‘科技兴检’突出贡献奖”和“全国质量监督检验检疫先进个人”等荣誉。