

文章编号: 1009-6094(2010)03-0085-04

## 西安市景观水体肠道病毒实时 荧光定量 RT-PCR 检测与健康 风险评价\*

张崇森<sup>1,2</sup>, 王晓昌<sup>1,2</sup>, 彭党聪<sup>1</sup>

(1 西安建筑科技大学土木工程博士后科研流动站,  
西北水资源与环境生态教育部重点实验室, 西安  
710055; 2 陕西省污水处理与资源化工程技术研究中心,  
西安 710055)

**摘要:** 根据肠道病毒基因非编码区保守序列的同源性设计肠道病毒通用引物, 建立环境水体中肠道病毒的实时定量 RT-PCR 检测方法, 对西安市的主要景观水体进行 1 a 的连续监测。通过统计分析数据, 对肠道病毒感染的健康风险进行评价。结果表明, 兴庆湖和北湖的肠道病毒检出浓度符合对数正态分布, 浓度随季节变化波动明显, 全年浓度几何平均值分别为 16.05 copy/L 和 5.06 copy/L。肠道病毒与细菌总数、大肠菌群、粪大肠菌群等指标均无显著的相关性。根据景观用水的暴露评价和脊髓灰质炎病毒 1 型、柯萨奇病毒 A21 和 B4 型、埃可病毒 12 型的剂量-反应关系, 计算得出兴庆湖和北湖中的各种肠道病毒感染的年风险分别为  $1.05 \times 10^{-2}$ ,  $1.66 \times 10^{-2}$ ,  $1.47 \times 10^{-2}$ ;  $3.27 \times 10^{-3}$ ,  $5.20 \times 10^{-3}$ ,  $4.59 \times 10^{-3}$ 。结果表明这些景观水体已受到肠道病毒的污染, 进一步加强城市景观水体肠道病毒的监测是十分必要的。

**关键词:** 环境工程学; 肠道病毒; 实时荧光定量 RT-PCR; 景观水体

**中图分类号:** X507

**文献标识码:** A

**DOI:** 10.3969/j.issn.1009-6094.2010.03.022

### 0 引言

随着人居环境要求的提高, 人工湖泊、景观水池、喷泉等城市景观水体越来越多地应用于住宅小区、城市公园和游览区中。人们在游览和娱乐的过程中, 不可避免地会与景观水体接触(皮肤接触、吸入气溶胶等), 水体中含有的病原微生物可能感染人体而致病, 因而景观水体的水质控制对于公众健康具有重要意义。目前微生物方面的水质标准仅对大肠菌群和粪大肠菌群做出规定, 其他病原微生物指标方面的研究还比较欠缺。近年来的研究发现肠道病毒对水处理的抵抗力强<sup>[1]</sup>, 分布广泛, 可导致多种疾病<sup>[2-3]</sup>, 对人类健康危害大。然而, 环境水体中肠道病毒的检测并无标准方法, 细胞培养法检测费时费力, 灵敏度低, 不适合环境水体检测的实际应用<sup>[4]</sup>; 采用传统的指示微生物来指示肠道病毒的存在也受到了很多质疑。因此, 发展新型的肠道病毒检测技术, 正确评价其对人体健康带来的风险已成为研究的热点。

实时荧光定量 RT-PCR 是在传统的 PCR 技术上发展起来的一种新型的 RNA 定量检测技术, 它不仅具有极高的灵敏度和良好的特异性, 而且在 PCR 完成之后不需要进行电泳, 既节省了时间又减少了外源污染的可能性。实时荧光定量 RT-PCR 不仅已成为医学、生物学领域的重要研究工具, 在环境微生物检测方面的应用也越来越多<sup>[5-6]</sup>。

本文利用实时荧光定量 RT-PCR 检测环境水体中肠道病毒的方法, 对西安市景观水体中的肠道病毒进行定量检测, 研究肠道病毒在水体中的浓度与分布, 并对肠道病毒感染的年风险进行评价。

### 1 材料与方法

#### 1.1 水样采集与处理

本文以西安市的主要景观水体兴庆湖和北湖为研究对象。兴庆湖曾受严重污染, 几年前经过水体修复后水质有明显改善。北湖为新建的景观水体, 部分区域有娱乐功能。从 2006 年 7 月至 2007 年 7 月, 从这两处水体中分别采集水样用于肠道病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测和细菌培养检测。使用塑料采样瓶, 在离岸 1 m, 水面以下 0.3 m 处采集水样, 共取得水样 42 份。水样在 4 °C 贮存, 并在 6 h 之内处理完毕。采用改进的膜吸附-洗脱浓缩法浓缩水样中的肠道病毒<sup>[7]</sup>。取 1 000 mL 水样, 调节  $Mg^{2+}$  终浓度为 0.05 mol/L, pH 值为 3.5, 负压抽滤通过 0.22  $\mu m$  孔径的混合纤维素酯微孔滤膜。利用牛肉膏-甘氨酸洗脱剂(pH 值为 9.5)进行洗脱, 在洗脱液中加入 PEG6000 和 NaCl, 搅拌均匀, 4 °C 静置过夜。4 °C, 10 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液, 收集沉淀以备提取 RNA。

#### 1.2 实时荧光定量 RT-PCR 方法建立

##### 1.2.1 通用引物设计及合成

根据肠道病毒 RNA5'非编码区中具有高度同源性的序列来设计出一对外围通用引物 EV1: 5' - CAAGCACTTCT-GTTTCCCGG - 3' 和 EV2: 5' - ACCCATAGTAGTCGGTTCGCG - 3' 以及一对巢式通用引物 EVN1: 5' - ACTTCGAGAAGCC-TAGTACC - 3' 和 EVN2: 5' - TAGGATTAGCCGCATTCAG - 3'。经 GenBank 数据库和 BLAST 比对分析, 结果表明, 所设计的引物涵盖了脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒、肠道病毒 71 型等肠道病毒, 并且没有发现同源性较高的其他微生物(见表 1)。

##### 1.2.2 标准品的制备

肠道病毒属中的脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒等成员的形状、大小, 以及表面结构都极其相似, 这决定了它们在水样浓缩处理过程中的行为几乎相同。肠道病毒属在非编码区的核酸序列上具有高度的保守型, 在使用通用引物 PCR 方法对其检测时, 它们之间是没有差别的。基于以上特点, 本试验中选用脊髓灰质炎病毒来制备标准品, 用于肠道病毒的检测。将脊髓灰质炎病毒接种到 Vero 细胞中, 当细胞病变明显时收集病变细胞, 提取病毒 RNA。以 EV2 为引物, 将 AMV 逆转录酶与脊髓灰质炎病毒 RNA 混合, 按照常规方法进行逆转录。逆转录产物置于 -20 °C 保存。以逆转录产物为模板, EV1 和 EV2 为引物, 进行 PCR 扩增。将所得的目的产物片段回收纯化, 与 pMD18-T 载体(Takara)连接转化至大肠杆菌 XL1-blue 中。用 IPTG/X-gal/Amp 平板筛选出阳性菌落, 在含有 Amp 的 LB 液体培养基中培养, 提取质粒进行序列

\* 收稿日期: 2009-09-11

作者简介: 张崇森, 讲师, 博士, 从事水环境病原体检测与健康风险评估研究, cmzhang@xauat.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(50908185); 国家科技重大专项(2008ZX07317-004); 西安建筑科技大学基础研究基金项目(JC0910); 西安建筑科技大学人才科技基金项目(RC0824)

测定。再用 U-3310 紫外分光光度计(Hitachi)定量, -20 ℃ 保存作为荧光实时定量 PCR 的标准品。

### 1.2.3 实时定量 RT-PCR 检测

利用 Simply P 总 RNA 提取试剂盒(Bioer)提取浓缩样品中的总 RNA。将 RNA 和 EV2 引物混匀,加入 AMV 逆转录酶进行逆转录,逆转录产物置于 -20 ℃ 保存。取 SYBR Green Mix (Bioer)12.5 μL,引物 EVN1 和 EVN<sub>2</sub> 各 5 pmol, Taq 酶 2 U,加入模板 2 μL,用无菌超纯水补足至 25 μL。以水作模板为阴性对照。在 MJ Chromo 4™ 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad)上进行扩增及结果分析。反应条件为:1)94 ℃ 预变性 4 min;2)扩增循环 45 次:94 ℃, 30 s;55 ℃, 30 s;72 ℃, 30 s;3)在 85 ℃ 收集荧光信号。循环结束后进行熔解曲线分析,从 65 ℃ 以 0.2 ℃/s 速率升温至 95 ℃,整个过程中持续检测荧光。检测结果使用 MJ Opticon Monitor™ 软件进行分析。

### 1.3 细菌学指标检测

按照相关的标准方法<sup>[8]</sup>进行细菌学指标的检测。

1)细菌总数:取水样 1 mL 与 15 mL 已融化的营养琼脂培养基混匀,37 ℃ 恒温培养 24 h 后进行菌落计数。

2)大肠菌群:取适量的水样抽滤通过 0.45 μm 孔径的滤膜,将该滤膜贴于品红亚硫酸钠培养基上,37 ℃ 恒温培养 24 h,计数滤膜上出现的紫红色具有金属光泽的菌落。

3)粪大肠菌群:取适量的水样抽滤通过 0.45 μm 孔径的滤膜,将该滤膜贴于 M-FC 培养基上,44.5 ℃ 恒温培养 24 h,计数呈蓝或蓝绿色的菌落。

### 1.4 统计分析和风险计算方法

利用 SPSS v15.0 统计学软件对肠道病毒浓度值的对数进行单样本 K-S 正态分布假设检验,以判定肠道病毒浓度的分布规律。对肠道病毒浓度和细菌总数、大肠菌群、粪大肠菌群值之间进行 Spearman 秩相关分析,以判定是否具有显著相关性。

风险计算建立在美国国家科学院提出的危害鉴别、暴露评价、剂量-反应分析和风险评定的四步法<sup>[10]</sup>的基础上,利用相应的暴露参数和剂量-反应关系的指数模型,按照下列公式对肠道病毒感染的年风险进行计算。

$$p_a = 1 - (1 - p_i)^n = 1 - (1 - e^{-rd})^n \quad (1)$$

式中  $p_a$  为人类个体受感染的年风险; $p_i$  为人类个体一次暴露受感染的风险; $r$  为指数模型中的常数; $d$  为摄入病原体的剂量; $n$  为年暴露次数。

## 2 结果及分析

### 2.1 实时荧光定量 RT-PCR 方法的灵敏度和特异性

以梯度稀释的标准品为模板进行荧光定量 PCR 检测,结果表明,该方法的检测限为 2.31 copy/μL。2.31 ~ 2.31 × 10<sup>9</sup> copy/μL 的模板浓度范围内,模板数的对数值与相应的  $C_t$  值有良好的相关性  $y = -3.6896x + 42.987$  ( $r^2 = 0.997$ )。本方法具有良好的特异性,与伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的核酸没有交叉反应。

### 2.2 肠道病毒浓度在水体中的分布

兴庆湖和北湖的肠道病毒最大检出浓度分别为 531 copy/L 和 574 copy/L(见图 1),全年浓度算术平均值分别为 127 copy/L 和 120 copy/L。两湖的肠道病毒检出浓度呈现明显的季节波动性变化,在秋季的平均检出浓度最高,春季次之,这与肠道病毒感染在夏末秋初高发的实际情况基本相符。冬、夏两季大多数样品的病毒浓度较低,甚至未检出,但高浓度的检出结果也时有出现。

### 2.3 统计学分析

单样本 K-S 正态分布假设检验结果表明两湖的肠道病毒浓度均呈对数正态分布( $p > 0.05$ ),兴庆湖和北湖的肠道病毒检出浓度的几何平均值分别为 16.05 copy/L 和 5.06 copy/L。经 Spearman 秩相关分析,两湖的肠道病毒浓度与粪大肠菌群值等细菌学指标均无显著的相关性( $p > 0.05$ )(见表 2)。这说明肠道病毒和细菌在水体中的存活和分布具有明显的差异,传统细菌学指标并不能反映肠道病毒的存在情况。

### 2.4 风险计算

假设景观娱乐水体的暴露途径为皮肤接触和口服,暴露频率为 40 次/a,每次的暴露剂量为 100 mL<sup>[12]</sup>。脊髓灰质炎病毒 1 型、柯萨奇病毒(A21 和 B4 型)和埃可病毒 12 型都是典型的肠道病毒,它们在指数模型中相应参数见表 3<sup>[11]</sup>。

根据利用实时荧光定量 PCR 所测得的病毒拷贝数与利用细胞培养法所测得的感染性病毒单位之间的关系<sup>[9]</sup>,可以得出兴庆湖和北湖中的感染性肠道病毒浓度几何平均值分别为 0.29 copy/L 和 0.09 copy/L。将所有检测出的肠道病毒都看作是以上 3 种典型肠道病毒中的一种,利用感染性肠道病毒浓度的全年几何平均值计算得出与景观水体接触的个体受到肠道病毒感染的年风险,见表 4。

表 1 通用引物序列及位置

Table 1 Sequences and localizations of universal primers

GenBank 登录号	物种	引物序列对应的位置			
		EV1	EV2	EVN1	EVN <sub>2</sub>
AY956406	脊髓灰质炎病毒 1 型	122 - 142	490 - 510	201 - 220	413 - 431
AM084225	脊髓灰质炎病毒 2 型	162 - 182	531 - 551	241 - 260	454 - 472
L76407	脊髓灰质炎病毒 3 型	165 - 185	533 - 553	244 - 263	456 - 474
AB126201	柯萨奇病毒 A5 型	92 - 112	462 - 482	175 - 194	385 - 403
AF329686	柯萨奇病毒 A11 型	1 - 21	371 - 391	80 - 99	294 - 312
AF499641	柯萨奇病毒 A19 型	165 - 185	533 - 553	244 - 263	456 - 474
DQ480420	柯萨奇病毒 B4 型	167 - 187	536 - 556	249 - 268	459 - 477
DQ534205	埃可病毒 30 型	168 - 188	537 - 557	250 - 269	460 - 478
AM396584	肠道病毒 71 型	165 - 185	534 - 554	247 - 266	457 - 475

### 3 讨论

由于肠道病毒检测困难,目前的水质标准中仅以大肠菌群和粪大肠菌群作为替代标准。以假设粪大肠菌群和病毒数量之间存在一定的比例关系<sup>[13]</sup>为前提条件对水体中的肠道病毒感染的健康风险进行分析。然而,无论从形态还是特性上,肠道病毒都与细菌相差甚远。越来越多的研究表明,大肠菌群和粪大肠菌群并不适合作为肠道病毒的指示物,采用粪大肠菌群等指示物进行肠道病毒的健康风险评估是不可靠的。虽然寻找合适的指示微生物的研究仍在不断继续,但大多数学者更倾向于采用新型的技术来直接检测肠道病毒。本文建立的实时荧光定量 RT-PCR 方法就是一种直接对环境水体中肠道病毒进行检测的方法,从根本上克服了利用指示物检测存在

的缺陷,能够为健康风险评估提供更为准确的数据。

不同时间所采集的水样成分存在一定的差别,会影响浓缩过程中病毒的回收率,从而造成样品之间可比性的降低。因此,对不同水样具有广泛适用性,回收率稳定的浓缩方法对于水环境病毒的监测是非常重要的。本文采用的改进的膜吸附-洗脱浓缩方法经过了大量的前期试验研究,具有较好的适用性和稳定性,能够有效地降低浓缩效率对检测结果的影响。从景观水体的监测结果上来看,不同月份的病毒浓度差异很大,但还是具有一定的季节性变化规律,这主要是与肠道病毒的存活特性以及相关疾病的流行特点有关。

本文充分考虑包括儿童在内的广泛人群的情况,选取了较高的一次暴露剂量和暴露频率,计算所得出的西安市主要景观水体中肠道病毒感染的年风险在  $10^{-2} \sim 10^{-3}$  范围内,高于美国 EPA 地表水处理规范(SWTR)规定的病原微生物感染可接受年风险  $10^{-4}$ 。由于肠道病毒感染出现的症状多种多样,加之有些是隐性感染,实际上人群受到肠道病毒的感染率远高于  $10^{-4}/a$ ,这在一些发达国家的医学统计中已得到证实<sup>[14]</sup>。本文的结果反映了西安市景观水体已受到肠道病毒的污染,而且水体中肠道病毒的浓度变化显著。因此,城市景观水体肠道病毒的长期监测有必要得到进一步的重视和加强。

表2 肠道病毒和细菌指标的相关性

Table 2 Correlations of enteroviruses and bacteriological parameters

		细菌总数	大肠菌群	粪大肠菌群
兴庆湖	Spearman 秩相关系数	0.004	-0.025	-0.064
	$\rho$ (双尾)	0.987	0.915	0.784
北湖	Spearman 秩相关系数	0.026	0.082	0.214
	$\rho$ (双尾)	0.911	0.725	0.352

表3 肠道病毒剂量-反应关系参数表

Table 3 The Best-fit dose-response parameters of enteroviruses

病原体	脊髓灰质炎病毒 1 型	柯萨奇病毒 (A21 和 B4 型)	埃可病毒 12 型
指数模型( $k = 1/r$ )	109.87	69.1	78.3

表4 兴庆湖和北湖的肠道病毒感染风险 <sup>a-1</sup>

Table 4 Enteroviruses infection risk in Xingqinghu Lake and Beihu Lake

	脊髓灰质炎病毒 1 型	柯萨奇病毒 (A21 和 B4 型)	埃可病毒 12 型
兴庆湖	$1.05 \times 10^{-2}$	$1.66 \times 10^{-2}$	$1.47 \times 10^{-2}$
北湖	$3.27 \times 10^{-3}$	$5.20 \times 10^{-3}$	$4.59 \times 10^{-3}$

### 4 结论

1) 本文建立的实时荧光定量 RT-PCR 肠道病毒检测方法的检测限为 2.31 copy/ $\mu$ L。动力学线性范围在 2.31 ~  $2.31 \times 10^9$  copy/ $\mu$ L,与伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌的核酸没有交叉反应。

2) 兴庆湖和北湖中的肠道病毒浓度季节变化明显,肠道病毒检出浓度呈对数正态分布,几何平均值分别为 16.05 copy/L 和 5.06 copy/L。肠道病毒与细菌总数、大肠菌群和粪大肠菌群均无显著的相关性。

3) 按照脊髓灰质炎病毒 I 型、柯萨奇病毒 A21 和 B4 型,埃可病毒 12 型的剂量-反应指数模型,兴庆湖中的肠道病毒对人体健康的年风险分别为  $1.05 \times 10^{-2}$ ,  $1.66 \times 10^{-2}$ ,  $1.47 \times 10^{-2}$ ;北湖中的肠道病毒所产生的年风险分别为  $3.27 \times 10^{-3}$ ,  $5.20 \times 10^{-3}$ ,  $4.59 \times 10^{-3}$ 。

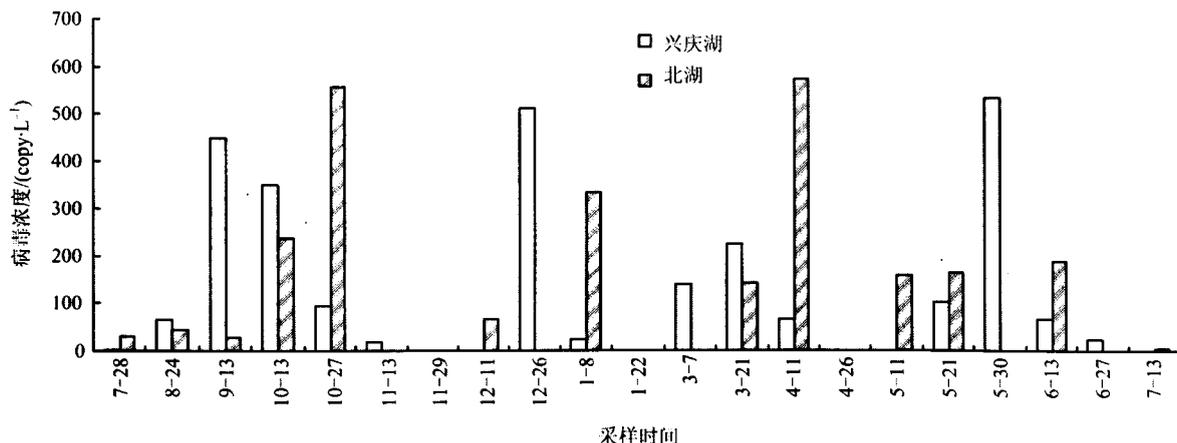


图1 景观水体中肠道病毒的变化

Fig.1 Variation of enteroviruses in landscape waters

## References(参考文献):

- [1] WANG X C, QIU F G, XUE X P, et al. Application of a virological tracer method for the assessment of pathogen removal by physicochemical treatment and chemical disinfection[J]. *Water Science and Technology*, 2005, 52(8): 205 - 212.
- [2] VIVIER J C, EHLERS M M, GRABOW W O K. Detection of enteroviruses in treated drinking water [J]. *Water Research*, 2004, 38(11): 2699 - 2705.
- [3] PAPAVENTSIS D, SIAFAKAS N, MARKOULATOS P, et al. Membrane adsorption with direct cell culture combined with reverse transcription-PCR as a fast method for identifying enteroviruses from sewage[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(1): 72 - 79.
- [4] TOZE S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater [J]. *Water Research*, 1999, 33(17): 3545 - 3556.
- [5] BROOKS H A, GERSBERG R M, DHAR A K. Detection and quantification of hepatitis A virus in seawater via real-time RT-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005, 127(2): 109 - 118.
- [6] NARAYANAN J, CROMEANS T L, ROBERTSON B H, et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 131(1): 65 - 71.
- [7] ZHANG Chongmiao(张崇淼), LIU Yongjun(刘永军), WANG Xiaochang(王晓昌), et al. Study on membrane adsorption-elution method for concentration of enteroviruses from environmental waters [J]. *Environmental Science(环境科学)*, 2007, 28(7): 1543 - 1547.
- [8] American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater* [S]. 20 th ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association / Water Environment Federation, 1998.
- [9] DONALDSON K A, GRIFFIN D W, PAUL J H. Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR [J]. *Water Research*, 2002, 36(10): 2505 - 2514.
- [10] National Academy of Sciences (NAS). *Risk assessment in the federal government: managing the process* [M]. Washington, D C: National Academy Press, 1983.
- [11] World Health Organization. *Water quality guidelines, standards and health: assessment of risk and risk management for water-related infectious disease* [M]. United Kingdom: World Health Organization, 2001.
- [12] ASANO T, LEONG L Y C, RIGBY M G. Evaluation of the California wastewater reclamation criteria using enteric virus monitoring data[J]. *Water Science and Technology*, 1992, 26(8): 1513 - 1524.
- [13] SHUVAL H, LAMPERT Y, FATTAL B. Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture [J]. *Water Science and Technology*, 1997, 35(11/12): 15 - 20.
- [14] WHEELER J G, SETHI D, COWDEN J M, et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance [J]. *British Medical Journal*, 1999, 318(17): 1046 - 1050.

## Real-time RT-PCR detection of the enteroviruses from the landscape waters in Xi'an and health risk assessment

ZHANG Chongmiao<sup>1,2</sup>, WANG Xiaochang<sup>1,2</sup>, PENG Dangcong<sup>1</sup>

(1 Post-doctoral Research Center of Civil Engineering, Key Laboratory of Northwest Water Resource, Ecology and Environment, Ministry of Education, Xi'an University of Architecture and Technology, Xi'an 710055, China; 2 Engineering Research Center for Wastewater Treatment and Reclamation of Shaanxi Province, Xi'an 710055, China)

**Abstract:** This paper is concerned with the presence of enteroviruses in the landscape waters. The universal primers have been designed based on the highly conserved non-coding region (NCR) sequences of enteroviruses genome. Many types of enteroviruses can be simultaneously quantitatively detected by the real-time RT-PCR with the universal primers of enteroviruses. Through one-year trial monitoring in the primary landscape waters in Xi'an city, we have analyzed the correlations between the enteroviruses and the bacteria parameters, and evaluated health risk caused by enteroviruses. The results of our investigation have shown the obvious seasonal fluctuation of the concentration of enteroviruses, which can be characterized by their log-normal distribution. The geometric mean of enteroviruses concentration for the whole year was 16.05 copy/L in Xingqinghu Lake and 5.06 copy/L in Beihu Lake, respectively. However, it was not found that the significant correlations between the concentration of enteroviruses and the bacteria parameters including the total bacterial count, coliforms count and fecal coliforms count. According to the exposure assessment of landscape waters and the dose-response model, of poliovirus type1, coxsackievirus type A21 and B4, and the echovirus type 12, the annual risk of infection was calculated as  $1.05 \times 10^{-2}$ ,  $1.66 \times 10^{-2}$ ,  $1.47 \times 10^{-2}$  in Xingqinghu Lake and  $3.27 \times 10^{-3}$ ,  $5.20 \times 10^{-3}$ ,  $4.59 \times 10^{-3}$  in Beihu Lake, respectively. It can be concluded that these landscape waters were contaminated by enteroviruses and it is necessary to further strengthen the monitoring of enteroviruses in urban landscape waters.

**Key words:** environmental engineering; enteroviruses; real-time RT-PCR; landscape waters

**CLC number:** X507      **Document code:** A

**Article ID:** 1009-6094(2010)03-0085-04