

四种人肠道病毒在大连金石滩浴场中的分布

明红霞^{1,2}, 樊景凤¹, 吴利军^{1,2}, 陈立广^{1,2}, 崔向阳^{1,2}, 朱琳³

(1. 国家海洋环境监测中心, 辽宁大连116023; 2. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁大连116023; 3. 南开大学 环境科学与工程学院, 天津300071)

摘要: 于2007年5~10月, 每月一次采集大连金石滩浴场各站10 L表层海水, 用超滤的方法进行病毒浓缩, 采用PCR方法分析了该浴场表层海水中的四种主要肠道病毒—轮状病毒、星状病毒、脊髓灰质炎病毒和腺病毒。调查结果为: 在所采集的24个样品中轮状病毒检出率为12.5%、星状病毒0.9%、脊髓灰质炎病毒和腺病毒分别达29.2%; 每个月份均有病毒检出, 依据病毒的阳性检出率, 8月份该浴场受到的污染最严重, 10月份和9月份次之。

关键词: 海水浴场; 轮状病毒; 星状病毒; 脊髓灰质炎病毒; 腺病毒

中图分类号: X834 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2008)06-0584-04

Distribution of human enteric viruses in bath beach of Dalian Jinshitan

MING Hong-xia^{1,2}, FAN Jing-feng¹, WU Li-jun^{1,2}, CHEN Li-guang^{1,2}, CUI Xiang-yang^{1,2}, ZHU Lin³

(1. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 2. College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China; 3. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Ten-liter surface seawater samples were collected monthly in the bath water from Dalian Jinshitan between May and Oct. 2007. After viruses were concentrated by ultra-filtration, PCR was used to estimate the occurrence of four different typical enteric viruses, namely, rotavirus, astrovirus, poliovirus and adenovirus. It is found that the occurrences of rotavirus and astrovirus were 12.5% and 0.9% respectively, whereas those for both poliovirus and adenovirus were 29.2%. In addition, the research shows that the viruses induced the pollution in sea water in every month from May to Oct. especially in Aug. (the month of most serious pollution), Oct. and Sep.

Key words: bathing beach; rotavirus; astrovirus; poliovirus; adenovirus

目前,海水受到人类致病性病毒的污染备受人们的关注,通过娱乐用水而传播的病毒性疾病,已成为重要的公众健康问题。据报道,在美国因水传播的疾病中有10%与病毒有关,甚至实际检出率更高^[1],在所暴发的这些疾病中以肠道病毒引起的流行性胃肠炎最为常见。该类病毒在水中能稳定存在,所以这一指标被用作评价水环境中粪便污染最有力的工具,或者与细菌学指标综合评价水质,以期达到更准确的评价水质质量的目的。

轮状病毒(rotavirus, RV)是引起全世界婴幼儿胃肠炎的最主要病原体。世界范围内的表层水都可检测到轮状病毒^[2],每年仅由轮状病毒引起的腹泻在世界范围内就有14亿人之多,全球每年造成约60万5岁以下儿童死

亡。星状病毒(astrovirus, AsV)能引起急性病毒性胃肠炎,是仅次于轮状病毒的主要病原之一。脊髓灰质炎病毒(poliiovirus, PV)能够通过粪口途径传播,在天然水域中普遍存在,抵抗力也较其它肠道病毒强,即使其含量很低也能够通过水和食物造成大面积的疾病暴发。腺病毒(adenovirus, AdV)是肠道病毒中唯一的一种DNA病毒,该病毒同样也被提议作为评价水环境中粪便污染的一种指标,据报道,Ad40和Ad41两种血清型在儿童胃肠炎疾病最常见,在水中比甲肝或者脊髓灰质炎I型更稳定,而且更易发现,数量相对较多,该病毒在娱乐用水中作为潜在的传染源,比其它的肠道病毒更重要^[3]。

迄今为止,国际上有关海水中的肠道病毒没有一个

收稿日期:2008-07-11,修订日期:2008-07-25

基金项目:国家863高技术研究发展计划项目(2006AA09Z162, 2006AA09Z170)

作者简介:明红霞(1981-),女,山东省德州市人,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物。

通讯作者:樊景凤, jffan@nmemc.gov.cn

通用的评价标准。了解和控制近岸环境中病毒污染的关键是应用新的方法来对其进行检测和研究。鉴于肠道病毒的常规检测方法如细胞培养法及免疫学等检测操作复杂,且敏感性较低^[4],所需时间长等缺点,RT-PCR 及其衍生技术的应用解决了上述难题。

本文旨在运用 PCR 方法检测大连金石滩浴场中的 RV,AsV,AdV,PV 四种肠道病毒的发生情况,对其水质做出了病毒学评价,以期达到有效预防肠道病毒导致的情暴发的目的。

1 材料和方法

1.1 样品采集

于2007年5~10月,对大连金石滩浴场每月进行一次表层海水的采集,每次选择天气晴朗高平潮时采样,站位设在往年每天平均游泳和戏水人数最多的地方,以及易受陆源污染的外围点,分别为距岸边30、100、300和1000m,共布设了4个采样点。采样按照 BAGGI^[5]的方法每个站点取样10L,装于无菌采水器中,于4℃条件下24h内运回实验室处理。

1.2 水样浓缩

水样分别经孔径为0.8 μm 和0.2 μm 的滤膜过滤,

再用 Millipore 的病毒浓缩包浓缩到100 mL 左右,最后用 Centricon Plus-70 离心,将水样浓缩到350 μL 左右,冻存备检。

1.3 水样中病毒核酸的提取

用 Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Geneaid) 提取海水样品中的病毒 RNA/DNA。

1.4 引物设计

以轮状病毒的高保守区段 VP7 基因设计各血清型的通用引物 Beg9 和 VP7-1^[6],根据星状病毒开放阅读框1A 区域设计引物 MON340 和 MON348 扩增目的片断^[7]。设计了一对引物 Polio-R 和 Polio-F 扩增脊髓灰质炎病毒的5'端非编码区^[8]。以腺病毒的高度保守区段 hexon 设计 Ad40 和 Ad41 血清型的通用引物 AdR 和 AdF^[9],四种病毒的引物由大连宝生物公司合成,其序列及产物长度等见表1。

1.5 四种病毒的检测

四种病毒的阳性标本均为中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所段招军研究员提供。标准品作为阳性对照,焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的无菌水作为阴性对照。

反转录参照 M-MLV 和 AMV 的说明书进行。

表1 四种病毒的引物序列

Tab.1 Primer sequence of four viruses'

病毒名称	引物	序列/5'-3'	目的片断/bp
Rotavirus	Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCTCTGG	392
	VP7-1	GATCCTGTTGGCCATCC	
Astrovirus	Mon340	CGTCATGTTTGTTCATACT	288
	Mon348	ACATGTGCTGCTGTTACTATG	
Poliovirus	Polio-R	ACGGACACCCAAAGTA	394
	Polio-F	AGCACITCTGTITCCC	
Adenovirus	AdR	GCCGCACTGGTCTTACATGCACATC	300
	AdF	CAGCACGCCGCGG ATGTCAAACCT	

1.5.1 轮状病毒的检测^[6]

以病毒基因组 RNA 为模板,在 M-MLV 逆转录酶 (Promega 公司产品) 和 Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司产品) 作用下进行 RT-PCR 反应。PCR 反应条件为:94℃ 1 min,53℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 7 min。

1.5.2 星状病毒的检测^[7]

以 AMV 逆转录酶 (Promega 公司产品) 进行反转录,PCR 反应条件为:94℃ 预变性 3 min;然后 94℃ 40 s,55℃ 1 min,72℃ 40 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.5.3 脊髓灰质炎病毒的检测^[8]

采用 AMV 逆转录酶反转录,PCR 反应条件为:94℃ 1.5 min;60℃ 1 min,72℃ 1 min 经过 10 个循环之后;94℃ 1 min;60℃ 1 min;72℃ 1 min 每个循环降低 0.25℃,经过 20 个循环后退火温度降至 55℃,再 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min 进行 10 个循环之后 72℃ 延伸 7 min。

1.5.4 腺病毒的检测^[9]

PCR 反应程序为 94℃ 5 min,94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环,72℃ 延伸 7 min。

1.6 PCR 产物检测

用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,拍照并分析。

2 结果

2.1 轮状病毒 RT-PCR 的检测结果

采用 RT-PCR 方法检测轮状病毒,24 个水样中有 3 个样品初步判定为阳性,得到 392 bp 大小的片断,经切胶回收、纯化、测序,将序列与 Genebank 中的已知序列进行比对,与 Human rotavirus A 的同源性达 98%,证明其为轮状病毒。阳性样品分别是 7 月份的 4 号站位和 8 月份的 1 号、2 号站位,该病毒的阳性检出率为 12.5% (表 2)。

表2 四种病毒的检测结果

Tab. 2 Results of four viruses in Jinshitan bath beach

采样时间	5月				6月				7月				8月				9月				10月			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
rotavirus	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
astrovirus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
poliovirus	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
adenovirus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+

“+”表示阳性;“-”表示阴性。

2.2 星状病毒 RT-PCR 的检测结果

24 份样品中有 2 个样品经 RT-PCR 检测,得到 288bp 的片断,将 PCR 产物测序结果进行比对分析,与 Human astrovirus 的同源性达 97%,证明其为星状病毒,阳性样品分别是 8 月份的 1 号和 3 号站位,阳性检出率为 0.9% (见表 2)。

2.3 脊髓灰质炎病毒 RT-PCR 的检测结果

样品中脊髓灰质炎病毒的检测结果为:24 份水样中有 7 份均扩增出 394bp 的片断,将 PCR 产物进行序列分析,与 Human Poliovirus II 的同源性达 97%,证明其为脊髓灰质炎病毒。阳性水样分别是 5 月份的 3 号站位和 6 月份的 4 号站位,7 月份的 2 号站位,8 月份的 2 号站位,9 月份的 2 号站位以及 10 月份的 1 号 3 号站位,阳性检出率为 29.2% (见表 2),与 PIANETTI 等^[10] 调查的里德利海海岸近岸海水中检出 32% 肠病毒的阳性率接近。

2.4 肠道腺病毒的 PCR 检测结果

腺病毒属于 DNA 病毒,经 PCR 检测后,24 份水样中有 7 份得到 300bp 的片断,PCR 产物序列与 Human adenovirus 的同源性达 97%,证明为腺病毒。阳性样品分别是 8 月份的 1 号和 3 号站位,9 月份的 3 号和 4 号站位,以及 10 月份的 2、3、4 号站位,阳性检出率亦为 29.2% (见表 2)。

3 讨论

有关水环境中肠道病毒的研究,主要集中在饮用水、地表水、地下水、娱乐用水、河水、污水处理厂流出的水以及沉积物中^[11]。国内关于这方面的研究起步较晚,仅见程莉等^[12]人对北方某城区污水、地表水和饮用水进行了调查研究,樊景凤等人^[13]对辽东湾沿海水中的甲肝病毒进行了调查。娱乐用水中肠道病毒的存在风险尚未见评估。

自然水体中人类致病性病毒的含量很低,为评价肠道病毒在娱乐用水中对人造成的健康危害,建立一种高效、快速的浓缩方法是非常必要的。目前,常用的病毒浓缩方法有:超滤、反渗透、脱水透析法、絮凝沉淀法、免疫捕获法、吸附法等。本试验采用高效的 Millipore 装置进行病毒浓缩,而后进行 Centricon Plus-70 离心过滤,改浓缩装置回收率高,与 EPA 的标准过滤洗涤方法相比,避免了复杂的操作过程、病毒失活和反应抑制的影响。

8 月份除轮状病毒之外其余三种病毒均有检出,因为

8 月份正值游泳度假高峰期,或是由被感染但无明显症状的患者伤口感染引起;研究表明,有污水流入的海区肠道病毒检出率要比正常的水体高,所以该现象的另一解释是意外倾倒入类污染的未处理过的废水废物(如洪水,家畜的粪便等)。10 月份的腺病毒和脊髓灰质炎的检出率也相当高,说明 10 月份的卫生状况也较差,可能是由于秋季黄金周近岸人类活动比较频繁,从而造成污染相对比较严重。该结果与樊景凤等人^[13]调查研究的甲肝病毒的分布情况相似。

在缺乏病原流行病学数据的前提条件下,风险评估模型能评价健康风险,在一项对夏威夷海水环境质量全面调查中,6% 的样本中被检测到肠道病毒,风险评价模型对此的最大风险估计是游泳者中受感染的几率是 1.3%^[14]。本次调查中脊髓灰质炎病毒和腺病毒的检出率均为 29.2%,受感染的几率将显著增加。流行病学研究发现,如果人暴露在被污染的娱乐用水中,患病的几率会大大增加,存在一定的健康风险。据调查,仅西班牙巴塞罗那的都市海滩每年就有 700~800 万人进行海上娱乐活动^[15]。据估计,香港海岸游泳人群比非游泳人群患胃肠炎的概率要高出 5 倍,Victor J. Cabell^[16]等人通过对两个截然不同的海滩游泳者的调查也证明了这一观点。在英国 Ramsgate 的一个海水浴场中,1883 年有 24% 的人在游泳或冲浪后至少出现一次疾病症状^[17]。经 WHO 调查,肠道病毒在游泳水中存在的风险已经超过了我们所能估测允许的范围^[15]。

大连金石滩浴场为大连市重要的旅游、度假、避暑圣地,其卫生状况与游人的健康息息相关,因此,为减少这几种病毒在娱乐用水中存在的风险,建议有关部门应该制定出相应的管理和预防措施。

4 结论

(1)2007 年 5~10 月期间,四种病毒的阳性检出率分别为:轮状病毒 12.5%、星状病毒 0.9%、脊髓灰质炎病毒和腺病毒分别达 29.2%。

(2)每个月均有不同程度的病毒检出,且 8 月份除轮状病毒之外其余三种病毒均有检出,10 月份腺病毒和脊髓灰质炎两种病毒污染比较严重。肠道病毒在水中能存活数周,加上病毒的感染剂量又很低,这些病毒的存在可能通过游泳者或者参加一些其它与水相关的活动而使人感染,从而引发这几种病毒的流行暴发或潜在危险。

致谢:感谢中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所段招军研究员为本研究提供病毒阳性样本。

参考文献:

- [1] FOUT G S, MARTINSON BC, MOYER M W N, et al. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(6):3158-3164.
- [2] GERBA CP, ROSE JB, HAAS CN. Sensitive populations: who is at the greatest risk? [J]. *Int J Food Microbiol*, 1996, 30:113-123.
- [3] CRUZ J R, C&CERES P, CANO F, et al. Adenovirus types 40 and 41 and rotaviruses associated with diarrhea in children from Guatemala [J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(8):1780-1784.
- [4] FONG T T, LIPP E K. Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: Health risks detection, and potential water quality assessment tools [J]. *Microbiol and Molecular biology reviews*, 2005, 69(2):357-371.
- [5] BAGGI F, PEDUZZI R. Genotyping of Rotaviruses in environmental water and stool samples in Southern Switzerland by nucleotide sequence analysis of 189 base pairs at the 5' end of the VP7 gene [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(10):3681-3685.
- [6] DUBOIS E, GUYADER F L, HAUGARREAU L, et al. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(5):1794-1800.
- [7] BELLLOT G, LAVERAN H, MOMROE S. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: Phylogenetic grouping varies by coding region [J]. *Arch Virol*, 1997, 142(7):1323-1334.
- [8] ROBERT LT, THEODORE GM, FREDERICK HN, et al. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(2):631-635.
- [9] JIANG S, NOBLE R. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(1):179-184.
- [10] PIANETTI A, BAFFONE W, CITTERIO B, et al. Presence of enteroviruses and reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea [J]. *Epidemiology and Infection*, 2000, 125:455-462.
- [11] SARAH EH, THOMAS W, PAUL A, et al. Marine swimming related illness: Implications for monitoring and environmental policy [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(7):645-650.
- [12] 程莉, 何晓青, 李伟, 等. 北方某市城区水环境中轮状病毒的初步检测 [J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(2):202-207.
- [13] 樊景凤, 宋立超, 张喜昌, 等. 辽东湾沿岸海水及贝类中甲肝病毒分布的研究 [J]. *海洋科学*, 2007, 31(2):52-54.
- [14] GRIFFIN D W, DONALDSON K A, PAUL J H, et al. Pathogenic human viruses in coastal waters [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16(1):129-143.
- [15] MOCE-LLIVINA L, LUCENA F, JOFRE J. Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11):6838-6844.
- [16] CABELLI V J, DUFOUR A P, LEVIN M A, et al. Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches [J]. *American Journal of Public Health*, 1979, 69(7):690-696.
- [17] BALARAJAN R, SONI VR, YUEN P, et al. Health risks associated with bathing in sea water [J]. *BMJ*, 1991, 303(6815):1444-1445.