

应用聚合酶链反应检测环境污水脊髓灰质炎病毒的研究

Detection of Poliovirus in Wastewater by Polymerase Chain Reaction

刘明团 王树声 方肇寅 杨春义
Liu Mingtuan Wang Shusheng Fang Zhaoyin Yang Chunyi

(广西区卫生防疫站 南宁市桃源路 80号 530021)

(Guangxi Health and Anti-epidemic Center, 80 Taoyuanlu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要 用聚合酶链反应 (PCR) 技术检测 5 个市县 15 份环境污水中肠道病毒, 其中 11 份阳性, 与细胞中和试验鉴定阳性结果符合率 90.90% ~ 100%。该法不仅简单、敏感、特异分型, 而且可作型内鉴别, 使细胞中和试验分型和 T 特征型内鉴别所需 14 d 缩短到 2 d, 为环境样品中脊髓灰质炎病毒污染提供了检测手段。

关键词 脊髓灰质炎病毒 污水 聚合酶链反应 (PCR)

中图法分类号 R 512.4

Abstract RT-PCR was used to detect the poliovirus in wastewater from 15 samples (3 samples each spot) of five cities or counties in Guangxi. The 11 out of 15 samples were positive. The result-comparison between PCR and NT showed a coincidence rate at 90.90% to 100%. It suggests that RT-PCR is a simple, sensitive, with good identification of type, and could be used for intra-typical differentiation of poliovirus strain. The test time decreased to 2 d from 14d compared to the cell neutralization test and the intra-typical differentiation of T-character. It is a measure for detecting poliovirus in the environment.

Key words poliovirus, wastewater, polymerase chain reaction (PCR)

脊髓灰质炎病毒 (简称脊灰病毒) 是一种严重急性瘫痪性的病毒性疾病。该病在广西仍有散发的麻痹病例, 1997年~ 1998年, 每年有近 248例 AFP (急性弛缓性麻痹) 病例报告, 并从病人粪便标本分离出脊灰病毒和非脊灰肠道病毒。脊灰病毒主要通过粪-口途径传染, 并在环境中造成广泛传播。如果脊灰野病毒一旦从境外 (如越南) 输入, 无疑污染水源, 在人群中造成潜在流行危险。为了达到消灭脊灰的目的, 需要用特异性强, 敏感性高, 简单、快速的检测方法, 对污水中病毒做出快速的检测和型内 (脊灰野病毒株和疫苗株区别) 鉴别, 及时采取防治措施, 提高人群免疫抗体水平, 处理水源, 切断传染源, 控制和消灭脊灰。广西卫生防疫站脊灰实验室近年来开展了 PCR 扩增污水中肠道病毒, 经凝胶电泳检测取得满意结果, 现将结果报告如下:

1 材料与方 法

1.1 标准脊髓灰质炎病毒株

Sabin 疫苗株 3 个型均由中国预防医学院病毒研

究所提供。

1.2 引物

由中国预防医学科学院病毒研究所方肇寅教授提供, 型特异性引物均选自 VP1 区, 各型的引物序列和扩增产物如下: SabinI (-) (2584- 2601) 5'- TC-CACTGGCTTCAGTGTT3'; SabinI (+) (2505- 2523) 5'- AGGTCAGATGCTTGAAAGC- 3', 该引物对仅扩增 SabinI 型病毒, 产生 97bp 的特异性核酸片段。SabinII (-) (2580- 2594) 5'- CGGCTTGT-GTCCAGGC- 3'; SabinII (+) (2525- 2544) 5'- CCGTTGAAGGATTACTAAA- 3'; 该引物对仅扩增 Sabin2 型, 产生 71bp 的特异性核酸片段。SabinIII (-) (2548- 2566) 5'- AGTATCAGGTAAGCTA TCC- 3'; SabinIII (+) (2514- 2530) (5'- AGGGCG CCCTAACTTTG- 3'); 该引物对仅扩增 Sabin3 型, 产生 53bp 的特异性核酸片段。EV (+) (452- 476) 5'- TCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC - 31; EV (-) (539- 565) 5'- TGTGCCTGTGGTTTCATCA GCCAAGG- 31; 该引物对设计脊灰肠道病毒 5' 端的非编码区, 用于区分脊髓灰质炎病毒和其他的肠道病毒。

1.3 水样的采集

分别采集南宁市邕江河堤和邕宁、贵港、马山、灵川排水道污水。每个监测点取 3 份污水，每份 10 L，在水样中加入 3 mL 漂白粉，充分混匀，静置 10 min，弃漂白粉，再加入 10 mL 的硫代硫酸钠，10 min 后，弃硫代硫酸钠。

1.4 水病毒的浓缩和回收

采集的水样在压力容器内加 AIC13 到 0.5 mol 后，加 HCl 调 pH 值至 3.5，正压通过直径为 142 mm 盘状滤器的双层滤膜孔径 3.0 μ，然后用 100 mL 洗脱液 pH 值 9.0~9.5，分 2 次洗脱，每次 30 min，洗脱出的病毒液调 pH 值 7.0 左右后，放 4℃ 过夜以去除洗脱形成的泡沫，次日用 HCl 调 pH 值至 3.5 使沉淀 15 min，以冷却低速离心机 1000 r/min 离心 10 min 后弃上清，沉淀的病毒悬于 5 mL~10 mL 0.1 mol Na₂HPO₄ 2 000 r/min 离心 5 min 后取上清液为浓缩水样或立即进行病毒检定或 -60℃ 冰存储备用。

1.5 水病毒的分离和细胞中和鉴定

浓缩水样经除菌处理后，接种 BGM 细胞培养管，36℃ 静置培养 7 d，每天观察细胞病变 (CPE)，连续传 3 代，出现 CPE 者为阳性，无 CPE 者为分离阴性。将阳性标本用维持液稀释成 10⁻³、10⁻⁴，分别与三型组合脊髓灰质炎免疫血清 (20 个中和单位) 等混合于聚乙烯微孔板上进行鉴定，检验中如有型免疫血清与病毒混合后无产生细胞病变，则表示病毒被该血清中和，新分离的病毒即属该型。

1.6 标本中 RNA 提取

每份标本各取 0.5 mL 悬液放入 1.5 mL 离心管中，充分混匀后置 60℃ 水浴 5 min，12 000 r/min 离心 5 min，取水相，加入等体积的氯仿-异戊醇试剂 (24:1)，混匀 12 000 r/min 离心 5 min，取水相 0.4 mL，加入 2 mol/L NaAC 10 μL 冷乙醇 750 μL，置 -70℃ 60 min 后离心，于无菌罩吹风干燥，加双蒸水 10 μL 溶解，置 -20℃ 备用。

1.7 逆转录合成 DNA

取 2 μL 病毒 RNA 溶液 4 μL 5× RT 缓冲液，RNasin 40 μ (华美公司)，5 mmol/l dNTP 3 μL 引物 EV (-)，SabinI (-)，SabinII (-)，SabinIII (-) 各加 3 μL (10 pmol/μL)，加双蒸水至 20 μL，混匀后覆盖液体石蜡 50 μL，置 42℃ 水浴 30 min。

1.8 PCR 法扩增

在上述逆转录反应液中加入 EV (+)，SabinI (+)，SabinII (+)，SabinIII (+) 引物各 2 μL，10× PCR 缓冲液 10 μL；6 μL 的 25 mmol/L MgCl₂，2 μL Taq 酶 (华美公司)，然后双蒸水补至 100 μL，混匀

后在 94℃ 水浴变性 3 min，开始扩增，循环参数为 94℃ 45 s，57℃ 60 s，72℃ 60 s，共循环 25 周，最后一周时 72℃ 反应时为 7 min。

1.9 扩增产物的检测

10 μL 反应产物在 1% 琼脂糖 (低熔点琼脂糖) 中电泳，并以溴化乙锭染色法在 UV1 型紫外分析仪下观察扩增结果。

2 结果

2.1 15 份标本检测结果

PCR 检测结果，肠道病毒 21 株 (1 份标本中同时检出 2 种以上肠道病毒)，其中 I 型脊灰病毒 9 株，II 型 2 株，III 型 1 株，均为 Sabin 疫苗相关株；非脊灰肠道 9 株。水污染脊灰病毒 I 型最多的地方是灵川，其次贵港、马山、南宁市，结果见表 1。PCR 检测结果与细胞病毒，中和试验鉴定阳性结果符合率 90.90%~100% (11/11)。

2.2 脊灰病毒分型、型内和其他肠道病毒区别

用 4 对引物 EV (-)，(+)，SabinI (-)，(+); SabinII (-)，(+); SabinIII (-)，(+); SabinIII (-)，(+); 分别反转录并扩增 SabinI、II、III 型病毒和 15 份标本中病毒 RNA 经电泳后分别出 97bP、71bP、53bP 大小的型特异性条带和 121bP EV 的电泳带，结果见图 1。

表 1 RT-PCR 对广西 5 个监测点废水中脊灰野病毒监测结果

Table 1 Determination of poliovirus in wastewater by RT-PCR in five spots of Guangxi

采样点 Sampling spot	阳性 Positive	病毒类型 Typing by virus			分离结果 Isolation	
		I	II	III	W or V	NP
南宁市 Nanning	2	1			V	1
邕宁县 Yongning	4	2	1		V	1
贵港市 Guigang	5	2			V	3
马山 Mashan	2					2
灵川 Lingchuan	8	4	1	1	V	2
合计 Total	21	9	2	1	V	9

V—疫苗相关株 Vaccine strains NP—非脊灰病毒 Non-poliovirus;
W—野毒株 Wild poliovirus strain.

3 讨论

生活污水由于受粪便污染，含有大量病毒。据国外报道^[1]，含量最高时可达 100 万 Pfu/L。在这次研究中，从生活用水排水道污水中分离病毒和用 PCR 检测的阳性率为 72.6% (11/15)，表明，在未经处理的污水中，病毒是经常地存在的。这些污水如不经过处理，直接排入环境中，将造成很大污染。事实上，

已有通过水源传播甲型肝炎和急性病毒性胃肠炎的报道^[2]。

这次从污水中分离到的病毒,以 polio 病毒为主 (12 株脊灰病毒),均为疫苗相关株,这主要是与目前大规模普服脊灰减毒活疫苗有关。结果提示,一旦脊灰野病毒输入或疫点流行,污染在水内的病毒将能随水流传送到很远的距离,而造成很大地区环境污染。因此,用 PCR 监测水源中脊灰病毒,了解传染源途径和范围,指导环境污水的处理和易感人群疫苗接种,阻断传播,消灭脊灰,确保社会的稳定和居民健康具有十分重要作用。

此外,这次研究还表明 PCR 的应用可解决一些标本难于培养而不产生明显细胞病变的病毒;解决中和试验鉴定分离物中病毒突破现象和脊灰病毒和非脊灰肠道病毒混合感染型别的不易判断;解决常规病毒型别和型内 T 特征鉴别操作繁琐,耗时 14 d,比常规缩短到 2 d。该法特异性强,敏感性高,快速地检出病毒,定型和型内鉴别,为临床诊断和流行病学

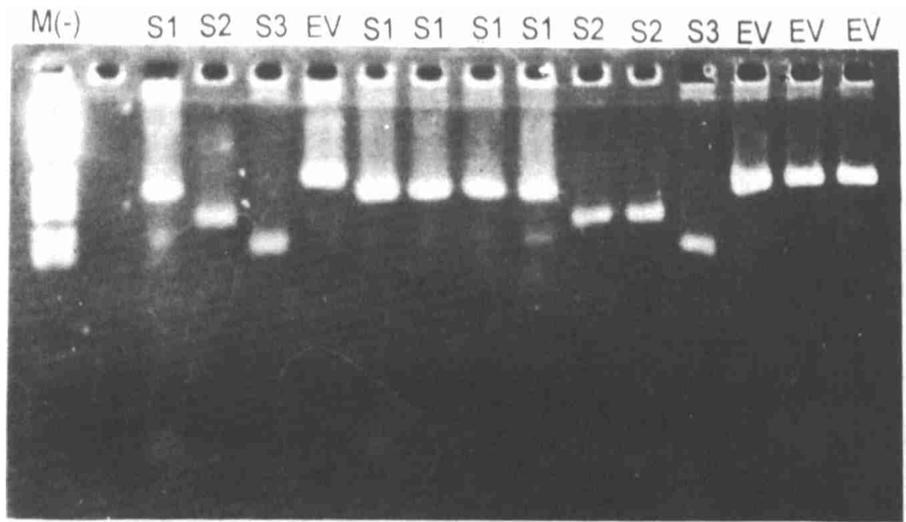


图 1 用 4 对引物扩增肠道病毒分离株的结果

Fig. 1 Amplification products of enteroviruses using 4 PCR primer pairs
M: 分子量大小 Molecular size marker (PBR322/HadII); S₁~ S₃: Sabin 疫苗株 1-3 型 Type 1-3 vaccine-related poliovirus; EV: 肠道病毒 Enterovirus.

现场监测提供辅助手段。

参考文献

- 1 Slade J S. Viruses in water. In: GBerg. American Public Health Association. Inc. Washington D C. 1976.
- 2 Martin Goldfied et al. Virus in water. In: GBerg. American Public Health Association. Inc. Washington D C. 1976.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 207 页 Continue from page 207)
点,而且起效较快。镇痛作用持续时间方面,α-cobrotoxin 低分子水解物镇痛作用的痛阈升高水平可持续 24 h 以上,注射后 72 h 痛阈仍比对照组高。连续注射 α-cobrotoxin 低分子水解物可维持与刚使用时相似的镇痛效果,而不产生耐受现象,也不出现竖尾、活动增加等吗啡类药物的表现。其镇痛性质可能与吗啡类药物不同。

从转杆实验可以观察到 α-cobrotoxin 低分子水解物在 0.047 mg/kg~ 0.125 mg/kg 剂量范围内,并未发现小鼠落杆现象,说明在此剂量范围内,α-cobrotoxin 低分子水解物对小鼠肌肉松弛和协调性均无影响。而在较大剂量组中出现小鼠落杆现象,可能与 α-cobrotoxin 低分子水解物与突触后膜的 nAChR 结合而阻滞神经冲动的传导有关。实验结果表明,经胃液处理 α-cobrotoxin 得到低分子量水解物,具有明显的镇痛作用,并有剂量-效应关系。NTF 毒性比 NT 明显降低,NTF 的镇痛显效时间比 NT 提前,维持时间长,无耐受现象。是否适用于临床,尚需作进一步的

临床观察研究。

参考文献

- 1 郝文学,陈远聪主编. 蛇毒的生化、毒理和应用. 北京: 科学出版社, 1980. 109~ 115.
- 2 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 695, 696, 786.
- 3 Wong P T H, Tan S F, Lee H S. Pharmacological profiles of 5-phenylemethylehydantoin and its methoxy substituted derivatives. Jpn J Pharmac, 1989, 49: 309~ 315.
- 4 Habemehl G G. Venomous animal and their toxins. Berlin Springer, 1981. 184~ 185.
- 5 陈汝筑,吴秀荣. 眼镜蛇神经毒素的镇痛作用. 中国药理学通报, 1988, 4 (2): 113~ 117.
- 6 Pu X C, Wong P T H, Gopalakishnakone P. A novel analgesic toxin (hannalgisin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hamah*). Toxicon, 1995, 33 (11): 1425~ 1431.
- 7 Giorgi R, Bernardi M M, Cury Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon, 1993, 31 (10): 1257~ 1265.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)