

辽东湾沿岸海水及贝类中甲肝病毒分布的研究

樊景凤, 宋立超, 张喜昌, 梁玉波, 关道明

(国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023)

摘要:用 RT-PCR 方法检测辽东湾几个重点沿岸海域表层海水和几种经济贝类样品中甲肝病毒的分布。结果表明, 6 个重点沿岸海域表层海水中均检出甲肝病毒 (Hepatitis A virus, HAV), 6 种经济贝类样品中有 4 个样品检出甲肝病毒。检测结果显示, 辽东湾某些重点沿岸海域受陆源生活污水影响严重, 有关部门应加强海洋环境和海产贝类卫生安全监测和管理, 以避免引发甲型肝炎暴发流行。

关键词: 辽东湾; 表层海水; 经济贝类; 甲肝病毒 (Hepatitis A virus, HAV)

中图分类号: R123.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007) 02-0052-03

甲肝病毒 (Hepatitis A virus, HAV) 属于小核糖核酸病毒科甲肝病毒属, 主要通过粪-口途径传播, 能够随着生活污水不断进入近岸海洋环境, 并且能够在海水中存活长达数周之久。贝类是滤食性动物, 能够将周围水环境中的甲肝病毒富集在其体内, 甲肝病毒虽然不能在贝类体内繁殖, 引起贝类本身发生疾病, 但是可以在消化腺中积累, 此腺体有吸附和浓缩病毒的作用, 此外, 甲肝病毒在贝类体内存活时间不少于 15 d^[1]。辽东湾沿岸分布着许多海水浴场和增殖区, 进行浴场海水和增殖区贝类体内甲肝病毒的监测, 了解辽东湾受陆源生活污水污染程度, 为有效管理近岸海洋生态提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 站位布设

如图 1 所示, 本研究在辽东湾沿岸海域共设置 7 个检测站位, 即黄金海岸浴场、南戴河浴场、北戴河浴场、葫芦岛浴场、锦州大有农场、二界沟沿岸、鲅鱼圈浴场。

1.2 贝类样品采集

2002 年 8 月、10 月分别采集各站位的表层海水和贝类样品。贝类样品在现场首先用海水冲洗干净, 装入双层塑料袋中。海水样品用无菌采样器采取。样品采集后及时装入便携式冷藏箱中, 在冷藏条件下 24 h 内送回实验室进行分析。

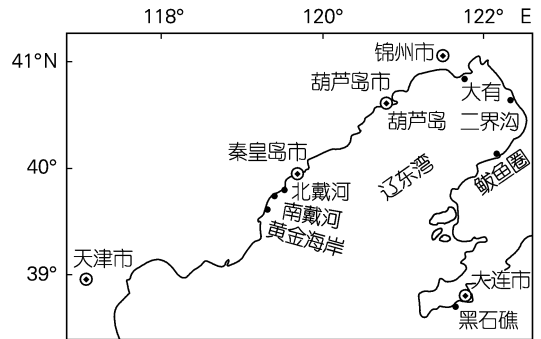


图 1 调查海区及采样点

Fig. 1 Area of survey and sampling sites

1.3 检测方法

1.3.1 样品处理

海水中的甲肝病毒采用吸附-洗脱法浓缩。即用 1 mol/L HCl 将 10 L 海水样品的 pH 调至 3.5, 加入终浓度为 0.000 5 mol/L 的 AlCl₃, 混匀, 静置 30 min 后, 用净水过滤器抽滤, 海水全部滤过后用 pH 为 10.4 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液洗脱, 洗脱液置于透析袋中用 PEG-6000 透析, 在 4 °C 条件下, 将洗脱液浓缩至 2mL 左右, -20 °C 冻存备检。

收稿日期: 2004-06-13; 修回日期: 2004-09-13

作者简介: 樊景凤 (1972-), 女, 黑龙江省明水县人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事海洋微生物和水产养殖病害学研究, 电话: 0411-84782602, E-mail: jifan@nmemc.gov.cn

贝类体内的甲肝病毒采用 PEG 浓缩、氯仿去除脂蛋白的方法进行浓缩。将贝类组织研磨匀浆,按其 10% 浓度加 pH7.4, 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液,离心收取上清液,按上清液量的 10% 浓度加 PEG-6000,按终浓度 0.4 mol/L 加 NaCl,4 过夜;次日,离心取沉淀,向沉淀中加入 pH7.4, 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 10 mL,充分溶解后加等量氯仿,室温振荡 30min,离心取上层水相, -20℃ 冻存待检。

1.3.2 核酸提取

取浓缩的病毒样 100μL,加入 300μL 酚/氯仿核酸提取液,混匀后在室温下放置 5 min,然后加 100μL 氯仿,混匀,再放置 5 min。4℃、12 000 r/min 离心 15 min,将上清液移入离心管,加入 200μL 异丙醇,旋涡振荡 5s,室温下沉淀 10 min;4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 500μL 预冷的 75% 乙醇洗涤;而后 4℃、10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀物室温干燥 10~20 min,立即使用或 -70℃ 保存。

1.3.3 RT-PCR 检测

参照 Mullendore 等^[2]的资料设计合成引物:上游引物为:5'-CTCCA GAA TCA TCTCAAC-3';下游引物为:5'-CAGCACA TCA GAAAGGTGAG-3'。将逆转录酶、引物、dNTP 及反应缓冲液混匀,每管 20μL,加入处理后的沉淀物中,石蜡油封顶,将反应管置于 PCR 仪(PE-9700)上,42℃ 保温 30 min,再按照 93℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 60 s,循环 30 次,最后 72℃ 延伸 5 min。将 Taq DNA 聚合酶、引物、dNTP 及反应缓冲液混匀,每管 18μL,石蜡油封顶,将第一次扩增产物 2μL 加入对应的分装反应管中,同时设阳性和阴性对照。按 93℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 60 s,循环 35 次,最后 72℃ 延伸 5 min。每次均设阳性对照与阴性对照,阳性对照为甲肝病毒核酸提取液,阴性对照为灭菌蒸馏水。

1.3.4 PCR 扩增产物检测

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色法进行扩增产物的检测,若在 189bp 处出现条带(与阳性对照处于同一位置),则为甲肝病毒阳性,每个样品重复检测 3 次,3 次检测结果均为阳性方可确认为阳性。

2 结果与讨论

2.1 海水中的甲肝病毒

2002 年 8 月份和 10 月份海水中的甲肝病毒检测结果见图 2 和图 3。进行海水中甲肝病毒的检测,首先要进行海水中甲肝病毒的浓缩,由于海水中甲肝病毒的含量很低,需要采用灵敏、高效的方法进行大量水样中甲肝病毒的有效浓缩。目前,常用的病毒

浓缩方法有:超滤、反渗透和脱水透析法;絮凝沉淀法;免疫捕获法;吸附法。其中吸附法适合于处理大量水样,并且具有较高的回收率^[3]。

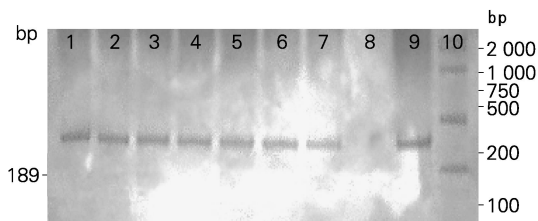


图 2 2002 年 8 月海水样品中甲肝病毒的检出结果

Fig.2 Result of hepatitis A virus in seawater in August 2002

1. 大连市黑石礁沿岸海水;2. 北戴河浴场海水;3. 南戴河浴场海水;4. 黄金海岸浴场海水;5. 二界沟沿岸水;6. 鲅鱼圈海海水;
7. 葫芦岛浴场海水;8. 阴性对照;9. 阳性对照;10. 标准分子量

1. Seawater of Dalian Heishijiao coast;2. Seawater of Beidaihe coast;3. Seawater of Nandaihe coast;4. Seawater of Gold coast;5. Seawater of Erjiegou coast;6. Seawater of Bayuquan port;7. Seawater of Huludao coast;

8. Negative control;9. Positive control;10. Marker DL-2000

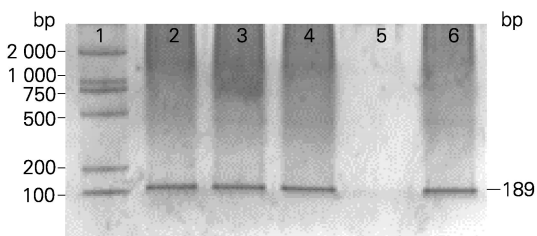


图 3 2002 年 10 月海水样品中甲肝病毒的检出结果

Fig.3 Result of hepatitis A virus in seawater in October 2002

1. 标准分子量;2. 北戴河浴场海水;3. 南戴河浴场海水;4. 黄金海岸浴场海水;5. 阴性对照;6. 阳性对照

1. Marker DL-2000;2. Seawater of Beidaihe coast;
3. Seawater of Nandaihe coast;4. Seawater of Gold coast;
5. Negative control;6. Positive control

从图 2 和图 3 可以看出,被检测的表层海水样品中甲肝病毒的阳性率为 100%。结果表明辽东湾沿岸海域受陆源生活污水影响严重,这可能与 8 月份样品采集时正值大雨过后有关,即受陆源污水大量入海的影响,而 10 月份的卫生状况也较差,可能是由于秋季近岸人类活动比较频繁,故污染也相对比较严重。

辽东湾呈半封闭状且海水循环交换能力差,周围有大型城市环绕,每天有大量的生活污水排放入海,加上现有的水处理条件和方法不能将水中的病毒有效清除,因此甲肝病毒随着生活污水不断进入到海洋环境中。海水中的甲肝病毒能够存活长达数周,并且能够通过游泳者和海上作业人员的直接接触或污染海产品等途径而使人感染,进而引发甲型肝炎的暴发流行,因此有必要进行辽东湾近岸海域海水中甲肝病毒的检测,进行近岸海域的有效管理。

2.2 贝类样品中的甲肝病毒

2002年8月份和10月份贝类中的甲肝病毒检测结果见图4和图5。从图中可以看出,8月份和10月份贝类样品中甲肝病毒阳性检出率均为67%。由此可见,辽东湾沿岸海域内的贝类卫生质量受到质疑,为了安全起见,建议在食用贝类之前应充分煮熟后食用。

甲肝病毒耐氯仿,因此本试验采用PEG浓缩、氯仿去除脂蛋白的方法进行贝类体内甲肝病毒的浓缩。甲肝病毒传统的检测方法是细胞培养的方法,与其相比,RT-PCR方法具有特异性强、灵敏度高、检测快速、成本低等特点。贝类体内甲肝病毒核酸的含量较低,因此采用比琼脂糖凝胶电泳灵敏度高的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行PCR扩增产物的检测。

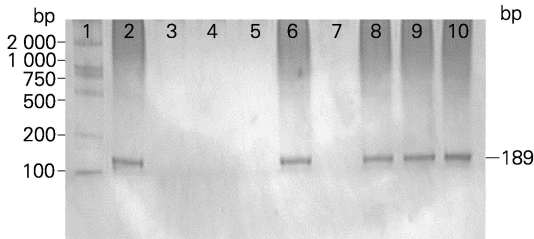


图4 2002年8月贝类样品中甲肝病毒的检出结果
Fig. 4 Result of hepatitis A virus in shellfish in August 2002

1. 标准分子量; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照; 4. 二界沟文蛤;
5. 大连黑石礁杂色蛤; 6. 鲑鱼圈杂色蛤; 7. 锦州四角蛤蜊;
8. 葫芦岛四角蛤蜊; 9. 葫芦岛杂色蛤; 10. 二界沟四角蛤蜊
1. Marker DL-2000; 2. Positive control; 3. Negative control;
4. *Meretrix meretrix* of Erjieyou; 5. *Ruditapes philippinarum* of Dalian Heishijiao; 6. *Ruditapes philippinarum* of Bayuquan;
7. *Veneriformis reeve* of Jinzhou; 8. *Veneriformis reeve* of Huludao; 9. *Ruditapes philippinarum* of Huludao; 10. *Veneriformis reeve* of Erjieyou

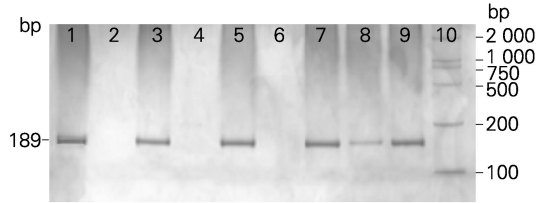


图5 2002年10月贝类样品中甲肝病毒的检出结果
Fig. 5 Result of hepatitis A virus in shellfish in October 2002

1. 鲑鱼圈杂色蛤; 2. 二界沟文蛤; 3. 葫芦岛四角蛤蜊; 4. 锦州四角蛤蜊; 5. 葫芦岛杂色蛤; 6. 阴性对照; 7. 二界沟四角蛤蜊;
8. 病人阳性血清; 9. 阳性对照; 10. 标准分子量
1. *Ruditapes philippinarum* of Bayuquan; 2. *Meretrix meretrix* of Erjieyou; 3. *Veneriformis reeve* of Huludao; 4. *Veneriformis reeve* of Jinzhou; 5. *Ruditapes philippinarum* of Huludao; 6. Negative control; 7. *Veneriformis reeve* of Erjieyou; 8. HAV positive serum; 9. Positive control; 10. Marker DL-2000

人类认识贝类作为中间宿主能够引发甲型肝炎暴发已有70余年历史。1953~1971年欧洲各国因生食牡蛎、蛤蜊等贝类水产品,有11起甲型肝炎暴发流行^[4]。1978年初在澳大利亚发现41例与食用贻贝有关的甲肝^[5]。1988年上海因生食毛蚶引起甲型肝炎的暴发流行^[6]。根据以往甲型肝炎暴发事例分析,贝类在甲型肝炎的传播中占有特殊地位,在沿海地区尤其不可低估,而且可造成远距离传播。因此,上市之前进行贝类体内甲肝病毒的检测,对于保证公众健康具有重要意义。

参考文献:

- [1] 伯格 G. 环境中的病毒污染[Z]. 方肇寅, 吴联熙, 译. 北京: 科学出版社, 1991.
- [2] Mullendore J L, Sobsey M D, Shieh Y S C. Improved methods for the recovery of hepatitis A virus from oysters[J]. *J Virol Meth*, 2001, 94: 25-35.
- [3] 袁长清, 李君文, 李平. 水中病毒浓缩与回收的研究进展[J]. *中国公共卫生*, 1998, 14(1): 61-62.
- [4] Caul E O, Caudrelier Y, Cordevant C, et al. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part 2. The epidemiological perspective[J]. *J Clin Pathol*, 1996, 49: 959-964.
- [5] Graham H F, Paul H, Iona R, et al. Foodborne viral illness-ststus in Australia[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 59: 127-136.
- [6] 汪健翔, 俞永富, 徐志一, 等. 毛蚶传播甲型肝炎的病原学证据——核酸分子杂交和免疫电镜初步结果[J]. *上海医科大学学报*, 1988, 15(5): 384-386.

(下转第76页)

Study on the distribution of hepatitis A virus in sea water and shellfish in the coastal area of Liaodong Bay

FAN Jing-feng ,SONG Li-chao , ZHANG Xi-chang ,LIANG Yu-bo ,GUAN Dao-ming
(National Marine Environmental Monitoring Center ,Dalian 116023 ,China)

Received : Jun. ,13 ,2004

Key words : Liaodong Bay ; seacoast seawater ; economic shellfish ; hepatitis A virus

Abstract : The results of hepatitis A virus (HAV) detected by RT-PCR in the surface layer seawater and economic shellfish samples collected from several emphasis seacoast areas in Liaodong Bay were reported. The research showed that there exists HAV in all the seawater samples and four economic shellfish samples. It is obvious that life sewage seriously affects the main seacoast area of Liaodong bay , so related departments must reinforce sanitation manage in order to avoid prevalence of HVA caused by seawater and edible marine product.

(本文编辑 :张培新)