

## 由海洋贝类传播的 人肠道病毒检测方法评述

罗文新 林元烧

(厦门大学海洋学系、亚热带海洋研究所, 厦门 361005)

**摘 要** 由海洋贝类传播的人肠道病毒会引起人类甲肝和胃肠炎疾病。海洋贝类传播的人肠道病毒主要有HAV, Norwalk Virus (NV)、Snow Mountain agent、SRAVs、Cockle agent、Parvovirus、Astrovirus、和Calicivirus。除了HAV以外, 上述其它病毒与胃肠炎的患病有关。从人类健康和水产品食用安全方面考虑, 发展一种有效的病毒检测方法显得十分重要。本文对过去40年有关海洋贝类病毒检测方法, 包括细胞学、免疫学和分子生物学方法做一比较和评述。

**关键词** 病毒检测 胃肠炎 肝炎 海洋贝类

海洋生物污染物 (marine biological pollutants) 指的是由人类活动引起、排入海洋而引起人或生物致病的病毒、细菌和寄生虫等。人类肠道病毒能抵御不良环境条件, 这些病毒不断被排放到生活污水中, 如果污水没有经过适当的处理, 病毒就会扩散到环境中去。双壳贝类通过滤食而将病毒浓缩于体内, 虽然在贝类中并未发现病毒复制及引起疾病, 但是, 这对喜食海鲜贝类的人们存在严重的健康危害。食用生的或未煮熟海产品是生物污染物尤其是病毒和细菌进入人体的主要途径。

迄今为止发现的人肠道病毒有100多种, 而由贝类传播的主要有: HAV (甲型肝炎病毒)、Norwalk Virus (NV)、Snow Mountain agent、SRSVs (小球状病毒)、Cockle agent、Parvovirus (细小病毒)、Astrovirus (星状病毒)、及Calicivirus (杯状病毒)。除了HAV外, 其它病毒都与人群胃肠炎的暴发有关。在美国本土、夏威夷、英国、澳大利亚、德国等国家和地区, 都相继发生过因食用贝类引起的大规模暴发性流行肝炎和胃肠炎<sup>[1-2]</sup>。1978年, 澳大利亚暴发由贝类传播的NV引起的胃肠炎, 约有7000人得病。1988年, 我国上海等地区暴发了食用毛蚶引起的我国历史上最严重的甲肝流行病, 患者人数超过30万人。季节性暴发由贝类传播的病毒性疾病, 不但引起公众健康问题, 而且导致海洋食品工业的经济损失, 因而迫切需要发展有效的贝类中肠道病毒检测方法。

贝类中肠道病毒的研究已经进行了近40年, 内容主要涉及: (1) 检测病毒的组织分布及排放速率; (2) 直接监测贝类富集环境中的肠道病毒; (3) 改善病毒的提取纯化方法从而提高了病毒回收效率, 这些研究作为贝类中肠道病毒的检测打下了良好的

收稿日期: 1999-08-26

基础。

细胞培养法是检测从贝类提取病毒的首要技术,这一技术也包含了由病毒引起的细胞病理观察和测定。这一方法通常应用空斑测定或50%组织培养感染剂量终点测定(TCID<sub>50</sub>)进行量化,敏感程度高。但是,运用活细胞培养,过程缓慢,其结果常会出现多样性变化。不同的细胞系甚至同一系而不同代的细胞,对病毒会有不同的敏感性;不同的培养和检测条件也会影响细胞对病毒的敏感性。因此最好采用多个细胞系来减少单一细胞系的低敏感性问题。此外,样品中存在的毒性成分使培养细胞过早衰亡,是细胞培养法测定中经常遇到的一个特殊问题。这种细胞单层的受损,要早于空斑发展,将妨碍检测数据的准确性。毒性因素不仅与贝的种类、采集地点和时间有关,而且与贝类病毒提取方法、培养的细胞对毒性物质的敏感程度、病毒浓缩过程中伴随着的毒性成分变化等等因素有关。

研究者们还发展了贝类中病毒检测的其它技术,其中大多数是以免疫和基因为基础,依赖于病毒抗原或核酸序列的检测。这些技术对在细胞培养中复制缓慢的HAV及无敏感细胞培养的NV、其它SRSVs的快速检测尤为重要。

Loh, P. C等(1985)<sup>[2]</sup>报道用改进的酶免疫吸附法(NC-EIA, nictro-cellulose-enzyme immunosorbent assay)来检测poliovirus IT和coxsackievirus B-5。以硝酸纤维膜作为固相抗原捕获物,在接种了病毒的贝类组织匀浆液中,能检测到7ng的poliovirus和0.8ng的coxsackievirus,相当于 $5 \times 10^8$ 个poliovirus病毒粒子和 $6 \times 10^7$ 个coxsackievirus病毒粒子,敏感度比传统EIA方法提高了10至100倍。这一方法对贝类提取物中病毒的直接检测并非很有用,然而能被成功地用于贝类病毒暴发调查时的样品检测。免疫学方法的一个重要问题是产生非特异性反应。Jehl-Pietri, C.等(1990)<sup>[3]</sup>在用放射免疫测定(RIA)检测贝类中HAV的研究中,这一问题更为突出。他们最初在被检测的16份样品中发现有15份表现为阳性结果,但经HAV特异性检测后,只有4份仍为阳性。显然,免疫学方法因其特异性的特点致使在应用上有一定的局限性。

此外,Millard, J.等(1987)<sup>[4]</sup>把常规的细胞培养和免疫学相结合,成功地应用RIFA(radioimmunofocus assay)检测及定量牡蛎和扇贝中的HAV病毒,即检测细胞培养中HAV感染的细胞病灶的免疫放射自显影。这一方法也有缺陷,虽然与终点滴定相比其所需时间短,但需2周时间的细胞培养以产生HAV抗原,接下来的放射自显影,记录放射免疫病灶的分布,需1—6天。不同HAV在复制及细胞之间扩散中表现不同,且病灶大小也有差别,用放射自显影进行病毒鉴定及定量时需仔细检测。

免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色技术也被应用于细胞培养,即用与荧光染料偶联的抗体直接或间接检测感染细胞培养中的病毒抗原。因为应用了细胞培养,这些方法都有高度的敏感性。但是也存在前所述及的细胞培养多样性及毒性物质问题。而且要求仔细的显微检测来鉴定及量化荧光灶。单克隆抗体的使用大大增进了免疫学方法的检测敏感性。Nasser, A.M.等(1987)<sup>[5]</sup>使用抗HAV单抗与生物素-抗生蛋白链菌素指示系统相偶联的A-ELISA(amplified-ELISA),使水样中的HAV的检测极限下降到 $2 \times 10^5$ 个HAV粒子/ml,其敏感度是标准ELISA的5倍及SPRIA(solid-phase radioimmunoassay)的2倍。单抗的一个极大的优越性是它们可以大量生产。一旦产生及被充分鉴定,单抗就可以作

为多个方法的试剂,它们的应用将大大减少从人或动物获取抗体的量和质量问题。单抗能从组织悬液中捕获特异病毒,应用于贝类分析将特别有利。

由贝类传播的人肠道病毒病原体,如HAV和NV因子的核酸基因组,已被克隆到微生物的质粒,并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)宿主中得以扩增。这些病毒和poliovirus的克隆导致发展了dsDNA及ssRNA探针这一极为敏感的检测方法。Le Guyader等(1993)<sup>[6]</sup>分别用cDNA、ssRNA探针来检测贝类中HAV和enterovirus的RNA,发现在人工感染的贝类中,有63%含有enterovirus的RNA、67%含有HAV的RNA。在发展高度敏感和有效的基因方法中,涉及到探针的特异性问题,杂交探针可被设计成具种或属特异性。

假阳性的发生有可能是受到污染的微生物的DNA所致,可通过暖和Dnase处理样品或标记含病毒核酸的质粒片段为探针来解决这一问题。但Jiang等(1986)<sup>[7]</sup>发现用后一方法,以<sup>32</sup>P标记探针,检测水样中HAV的最大敏感度仅为 $4 \times 10^4$ 个病毒粒子。

ssRNA探针的应用可完全避免由微生物DNA引起的假阳性问题。相对于dsDNA探针而言,ssRNA探针杂交更快、更敏感、特异性更高,而且能进行非特异性反应的内部对照。内部对照是指,比较一个互补ssRNA病毒探针和一个含有同样病毒序列的非互补ssRNA探针的杂交量,用后者得到的杂交量为非特异性反应。Zhou等(1991)<sup>[8]</sup>用斑点杂交法来检测牡蛎和文蛤组织中的HAV和rotavirus SALL。在20克牡蛎或文蛤肉中,提取病毒RNA核酸,然后去除多糖可减少杂交信号的背景干扰、增加检测敏感性,结果ssRNA探针能检测到 $10^3$ 个HAV感染病毒粒子及 $10^4$ PFU的rotavirus SALL。但是用基因探针直接检测贝类匀浆液中病毒的敏感度为检测已纯化病毒的千分之一倍。在病毒提取纯化过程中病毒核酸会有一定程度的损失,因此影响到斑点杂交检测的有效性。

探针杂交方法虽然在环境严重污染的贝类中可检测到病毒,但对贝类中的低浓度病毒缺乏足够的敏感性。一种新的生物技术PCR,被应用到NV、Rotavirus、HAV、enterovirus、SRSVs的检测<sup>[9-12]</sup>。PCR用于扩增特异核酸序列,可以克服探针杂交法的有限性,能提供多种类型环境样品日常监测所需的敏感度。对于poliovirus、HAV、rotavirus而言,PCR的检测敏感度接近感染单位水平。应用PCR检测贝类中的病毒无疑增强了检测的能力。非特异性扩增片段的产生是PCR方法的一个缺陷,最简单的提高检测特异性的方法是使用探针杂交。探针即为标记的病毒特异的寡核苷酸,与病毒基因组中的扩增区域同源。

几个研究者<sup>[13-14]</sup>使用RT-PCR方法来检测贝类中的enterovirus、HAV及SRSVs。RT-PCR增进了理论上检测一个病毒基因组的水平,但这一有极高检测灵敏度的方法的发展受到贝类组织中存在的RT-PJR阻遏物的抑制,从而出现假阴性反应。为了解决这一问题,研究者们不断改善贝类组织中病毒的纯化方法以去除阻遏物,再进一步提取病毒核酸,然后进行RT-PCR检测,其敏感度低于或等于每5—15克贝类的10PFU的poliovirus和每克贝类的2000个HAV病毒粒子。Le Guyader等<sup>[14]</sup>用RT-seminested PCR法从每克贝类中检测到1200个HAV、2000个enterovirus及5000个rotavirus病毒粒子。Romalde等<sup>[15]</sup>报道了直接检测文蛤和牡蛎中HAV的RNA的IST (in situ trancription)方法,即通过原位反转录形成放射标记的cDNA,检测其放射自显影图,结果在胃及胰腺腺组织中检测到HAV病毒。

当PCR与免疫学方法相联时,检测的特异性和敏感性增加,一些研究者<sup>[16]</sup>证实可检测到6至60个HAV病毒粒子。其中抗体捕获技术与PCR相偶联,即AC-PCR (antigen-capture

PCR), 用以检测HAV, 其特异性高于传统的PCR, 样品的处理也比较简单。贝类样品中的HAV病毒粒子被固相化的特异抗体所捕获, 然后用于PCR扩增, 用探针杂交、琼脂糖凝胶电泳及放射自显影进行产物的分析。这一方法的检测极限达到4个HAV病毒粒子。目前已有HAV、NV的高滴度、高特异性的免疫血清, 但没有其它病毒的这种免疫血清, 因而AC-PCR并不很实用。MIPA (magnetic immunoseparation PCR assay), 用于检测牡蛎中的HAV。包裹着生物素化人抗HAV IgG的抗生蛋白链菌素磁珠, 能捕获病毒及去除RT-PCR阻遏复合物, 溶解分离的HAV, 去掉磁珠, 含有病毒RNA的上清液用于RT-PCR。MIPA在人工感染的美洲牡蛎中成功地检测到HAV的高灵敏度为10PFU。

然而, 病毒抗原或病毒核酸的直接检测并不意味着这些成分实际上来源于完整的感染病毒粒子。因此, 细胞培养仍是检测方法的一个重要部分。

综上所述, 在贝类的病毒检测中, 在提高有效性方面已作出了重要贡献。近40年来, 国外已有大量的方法和改进见诸于文献报道, 然而普遍缺少实验室间的相互验证, 相应地, 也就缺少一种用于常规实验室分析的特异的标准方法。作为一个能被普遍接受的标准方法, 必须拥有一些利于广泛使用的特点。这种方法将能简单地检测出不同种贝类中的一些范围的人类肠道病毒。随着新技术的应用和方法的进一步发展, 将会出现标准的检测方法。

#### 参 考 文 献

- [1]Melnick,JL. J.Infect.Dis. 1995,171: 1497—1503.
- [2]Loh,PC et al. J.Virol.Methods. 1985, 12: 225—234.
- [3]Jehl-Pietri, C et al. Lett.Appl.Microbiol. 1990, 11: 126—129.
- [4]Millard,J et al. Epidemiol. Infect. 1987, 98: 397—414.
- [5]Nasser, A M et al. Environ.Microbiol. 1987, 53: 1192—1195.
- [6]Le Guyader et al. Appl.Environ. Microbiol. 1993, 59: 3963—3968.
- [7]Jiang,X at al. Appl.Environ.Microbiol. 1986, 52: 711—717.
- [8]Zhou,YJ et al. Appl.Environ.Microbiol. 1991, 57: 2963—2968.
- [9]Atmar,RL et al. Appl.Environ. Microbiol. 1996, 62 (1) : 254—258.
- [10]Atmar,RL et al. Appl.Environ.Microbiol. 1995, 61 (8) : 3014—3018.
- [11]Chung,HM et al. Appl.Environ.Microbiol. 1996, 62 (10) : 3772—3778.
- [12]Leguyader,F et al. Appl.Environ.Microbiol. 1996, 62 (11) : 4268—4272.
- [13]Less,DN et al. Appl.Environ.Microbiol. 1994, 60: 2999—3005.
- [14]Le Guyader et al. Appl.Environ.Microbiol. 1994, 60 (10) : 3665—3671.
- [15]Romalde,JL et al. Appl.Environ.Microbiol. 1994, 60: 1921—1926.
- [16]Deng,MY et al. Appl.Environ.Microbiol. 1994, 60: 1927—1933.