

2015 年凭祥市边境贸易点污水中的脊髓灰质炎病原学监测结果分析

蓝翊文¹, 何成伟¹, 何明园¹, 赵梦露¹, 马宇燕², 秦月², 韦一知²

1. 凭祥出入境检验检疫局, 广西 凭祥 532600; 2. 广西壮族自治区疾病预防控制中心

摘要: **目的** 了解中越边境污水中脊髓灰质炎病毒的检出及型别分布, 为防止脊灰输入提供防控参考策略。 **方法** 2015 年选取凭祥市浦寨边贸点和弄怀边贸点两个监测点, 采集 48 份污水, 使用阴离子膜吸附法对污水中的病毒进行过滤浓缩, 参照 WHO《脊髓灰质炎实验室手册》操作程序对污水标本进行病毒分离, 对分离到的 PV 阳性株进行型内鉴定及 VP1 编码区序列测定及种系进化分析。 **结果** 48 份污水中有 15 份污水分离出 PV, 阳性分离率 31.25%。其中 7 株 I 型 PV, 11 株 II 型 PV, 48 株 III 型 PV, 3 株混合型 PV (I 型+III 型), 共计分离出 69 株 PV; 经 VP1 区的核酸序列测定分析, 均为疫苗相似株, 未发现野生型脊灰病毒 (WPV) 和疫苗衍生脊灰病毒 (VDPV)。 **结论** 2015 年凭祥市边境贸易点外环境污水监测中未发现野生型脊灰病毒和疫苗衍生脊灰病毒。

关键词: 脊髓灰质炎病毒; 污水; 边境贸易点

中图分类号: R123.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2017)09-1132-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.09.030

脊髓灰质炎 (简称脊灰) 病毒 (polio virus, PV) 属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属, 最主要的传播途径是粪-口传播。PV 感染人体后, 无论是极个别显性感染、还是大量的隐性感染者, 都会通过粪便排毒, 且排毒时间长达数周^[1], 病毒在 4℃ 下能存活数周, 常温下能存活数天。在 2000 年中国通过 WHO 认证成为“无脊灰”状态后, 已连续 16 年未发现本土脊灰野病毒 (WPV) 感染病例, 但是中国周边某些东亚国家仍有零星 WPV 病例报告, 南亚国家保持“无脊灰”状态又不了解。因此, 有必要在我国的一些边境口岸开展脊灰病毒监测, 以了解边境地区的维持“无脊灰”状态, 并评估接壤国家输入 WPV 或脊灰疫苗衍生病毒 (VDPV) 的风险。传统的 PV 监测是通过急性迟缓性麻痹病例 (AFP) 来开展的, 但将这种小概率的症候群病例监测用于常住人口少、流动人口多的边境口岸不具有敏感性, 通过监测口岸出入境人群排泄粪便的污水, 能较大范围地监测到可能出现的 WPV 或 VDPV。本研究 2015 年选取了广西壮族自治区凭祥市的两个中越边贸点开展了污水中 PV 的监测, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 监测点选择与污水采集 选取位于广西壮族自治区凭祥市 (隶属崇左市) 中越边境最大的边境贸易

点浦寨和弄怀作为监测点, 每个监测点各选取一个污水采集点, 采集点为当地的最主要和最浑浊的生活污水汇集点。每个点每月分别在 5 日和 25 日各采样 1 次, 全年共采集 48 份污水。每次采样量约 1 000 ml, 分四次采集, 每次采集约 250 ml, 每次间隔 2 min, 4 次采集的污水混合后, 在冷藏条件下立即运实验室检测。

1.2 污水的处理及浓缩 实验室收到样本后采用阴离子膜吸附和振荡法对污水样本进行处理^[2]: 1 000 ml 污水, 4℃ 条件下, 3 000 rpm/min, 离心 30 min; 收集上清液, 加入 2.5 M MgCl₂ 至终浓度为 0.05 M, 用浓 HCl 调整 pH 值到 3.5; 使用正压力泵, 将混合液滤过 0.45 μm 硝酸纤维素膜 (ADVANT EC, A045A142C, Tokyo, Japan); 滤过后的硝酸纤维素膜剪碎放入 10 ml 的 3% 牛肉膏浸出液, 振荡洗脱 2 次; 以 0.22 μm 无菌滤膜过滤并收集滤液, 接种敏感细胞。

1.3 病毒分离及病毒型别鉴定 病毒分离和鉴定操作程序按照世界卫生组织 (WHO) 第 4 版《脊灰实验室手册》的标准操作规程进行^[3]。使用人横纹肌肉瘤细胞系 (human rhabdomyosarcoma, RD) 和转人脊灰病毒受体的小鼠肺细胞系 (mouse cell line expressing the gene for the human cellular receptor for poliovirus, L20B) 作为敏感细胞分离病毒, 两种细胞均来自中国疾病预防控制中心国家脊灰实验室。每管细胞接种 200 μl 污水浓缩液, 对 L20B 阳性分离物应用实时荧光逆转录-聚合酶链反应 (real time RT-PCR) 进行 PV 的型内鉴定, 其中 ITD 型内鉴定试剂盒由美国 CDC 提供 (批

基金项目: 广西检验检疫局立项课题项目 (2012GXCIQ03)

作者简介: 蓝翊文 (1969-), 女, 广西三江人, 侗族, 研究生, 主要从事病原微生物检验工作。

号:12-0048),VDPV 筛查试剂盒由美国 CDC 提供(批号:11-0140),以鉴定是否属于 PV 及具体血清型,是否属于 WPV 或 VDPV。

1.4 VP1 编码区基因核苷酸序列测定 使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)试剂盒提取病毒核酸,然后进行逆转录-聚合酶链反应,上游引物 UG1(5'-TTT GTG TCA GCG TGT AAT GA-3')、下游引物 UC11(5'-AAG AGG TCT CTA TTC CAC AT-3');逆转录条件:42 ℃ 45 min;扩增条件:94 ℃ 30 s,50 ℃ 35 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环,之后 72 ℃ 延伸 10 min。获得的 PCR 产物经毛细管电泳检测,阳性产物送国家脊灰实验室进行序列测定。

1.5 序列分析及系统进化树构建 核苷酸序列比对采用 BioEdit Sequence Alignment Editor(Tom Hall, North Carolina State University, Version 5.09, Carolina, USA)软件进行。应用 MEGA 软件(6.0 版本)中 Neighbor-Joining 法将部分 PV 株和 GenBank 的代表株以及野毒株 VP1 序列构建系统进化树。

2 结 果

2.1 污水检测情况 两个采样点采集的 48 份污水中均检出了肠道病毒(enterovirus, EV),总 EV 检出率为 100.00%。其中 15 份污水样本检出了 PV,包括浦寨边贸点 11 份样本和弄怀边贸点 4 份样本,总 PV 检出率 31.25%(15/48)。48 份污水中共分离鉴定出非脊髓灰质炎肠道病毒(non-polio enterovirus, NPEV)188 株,其中浦寨边贸点 116 株,弄怀边贸点 72 株。在 PV 阳性的 15 份污水中共分离鉴定出 69 株 PV,其中浦寨边贸点 43 株,弄怀边贸点 26 株。2015 年各月份的 PV 及 NPEV 检出分离情况,见图 1。

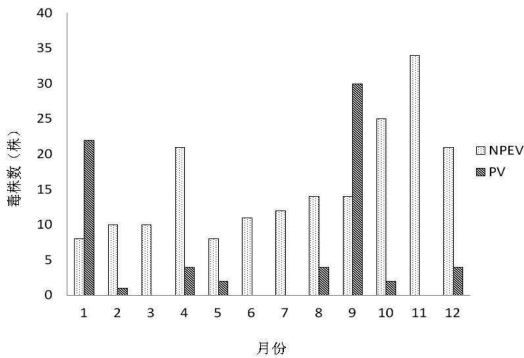


图 1 2015 年中越边境污水中肠道病毒分离情况

2.2 PV 分子分型 对 69 株 PV 进行分子分型,分离到 7 株 I 型 PV,11 株 II 型 PV,48 株 III 型 PV,3 株混合型 PV(为 I 型+III 型),I 型、II 型、III 型和混合型 PV 在 69 株 PV 中的构成比分别为 10.14%、15.94%、

69.57%和 4.35%,单型 PV 病毒株共计 72 株。

2.3 不同月份 PV 检出 按月份分布看,9 月份分离到的 PV 总株数最多(30 株),其次是 1 月份(24 株);这两个月分离到的 PV 株数在全年 69 株 PV 中的构成比分别为 43.48%和 34.78%。其中 3、6、7 和 11 月份的 8 次采样均未能分离到病毒。见表 1。

表 1 2015 年不同月份 PV 检出情况

月份	标本数 (份)	脊灰病毒分离数(株)				合计 (株)
		I	II	III	混合型	
1	4	2	1	19	2	24
2	4	1	0	0	0	1
3	4	0	0	0	0	0
4	4	0	2	2	0	4
5	4	2	0	0	0	2
6	4	0	0	0	0	0
7	4	0	0	0	0	0
8	4	2	0	2	0	4
9	4	0	7	22	1	30
10	4	2	2	0	0	2
11	4	1	0	0	0	0
12	4	6	0	4	0	4
合计	48	7	11	48	3	69

2.4 PV 的型内鉴定 使用 WHO 推荐的、美国 CDC 研制的 Real time RT-PCR 方法对 69 株 PV 进行快速型内鉴定,结果均为疫苗相关病毒,未检出 WPV 或 VDPV。

2.5 PV 的序列分析

2.5.1 VP1 编码区核苷酸变异情况 69 株 PV 里有 66 株为单血清型病毒,有 3 株为含有两个血清型的混合病毒。再将混合型别分离,共获得 72 株单型 PV。将分离到的 72 株 PV 单型病毒分别做 VP1 区核酸序列测定。10 株 I 型、11 株 II 型、51 株 III 型与对应的 Sabin 疫苗株病毒进行同源性比较,结果显示:无核苷酸变异的 6 株,占 8.33%(6/72);高变异(≥5 个核苷酸差异)1 株,为 III 型 PV,占 1.39%(1/72);低变异(1~4 个核苷酸差异)有 65 株,占 90.28%(65/72)。见表 2。

表 2 2015 年中越边境污水中脊髓灰质炎病毒 VP1 编码区核苷酸变异情况

各血清型 毒株数	与 Sabin 株相比核苷酸变异个数						合计
	0	1	2	3	4	5	
I	4	6	0	0	0	0	10
II	2	3	1	4	1	0	11
III	0	0	18	25	7	1	51
合计	6	9	19	29	8	1	72

2.5.2 PV 遗传进化分析 应用 MEGA6.0 软件中 Neighbor-Joining 法将部分 PV 株和 GenBank 的代表株

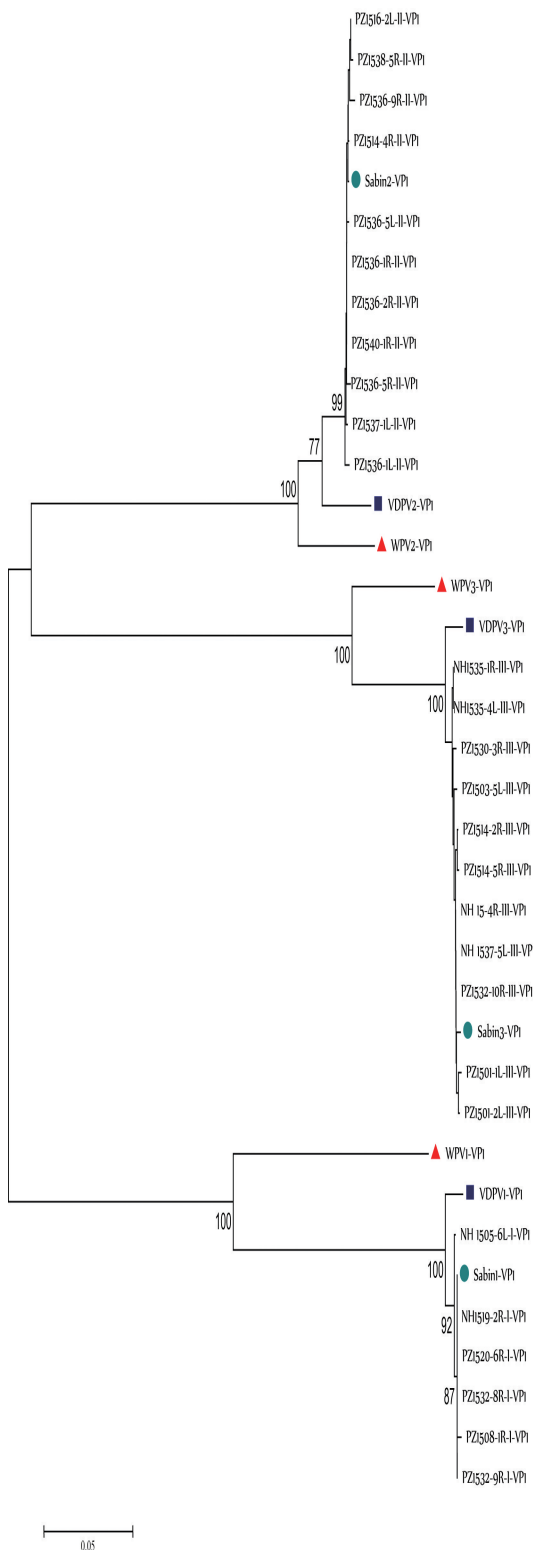
3 讨 论

本研究应用水中病毒富集方法和病毒分离及鉴定技术,成功地在边境口岸的污水中监测到 PV 循环,且是两个边贸点都有分离到 PV,在全年 9 个月份里都有分离到 PV,且 PV 的三个血清型都能分离到。提示该方法是可行、适用的,可以作为边境地区评价脊灰输入风险的重要手段。目前国内尚未见有在边境口岸开展污水中 PV 监测的报道。

在这两个边境口岸为期 1 年监测中,共从 15 份污水中分离到 PV,污水 PV 阳性分离率为 31.25%;在这 15 份污水中共培养分离到 69 株 PV,这些 PV 经核酸序列测定及进化树分析,均为疫苗相似株,没有发现 WPV 或 VDPV。这既为广西的凭祥边境地区维持“无脊灰”状态提供了实验证据,也提示这两个口岸近期输入 WPV 或 VDPV 的风险较小。

马宇燕等^[5]在 2011 年对广西的南宁市污水监测中,全年采集的 72 份污水中,有 67 份污水分离到 PV,污水阳性分离率为 93.06%,阳性分离率远高本次研究的 31.25%。本次研究所用试验方法和条件与马宇燕等采用的完全相同,且二者对污水中的 EV 分离阳性率均为 100.00%情况下,为什么本研究的 PV 阳性分离率比前者低了近三倍,推测可能的原因是除所选采样点的人粪便污染程度较小外,另一个重要的影响因素就是边贸点的活动人群绝大多数为成人,而这类成人均未在近期接种过 PV 减毒活疫苗或很少接触感染 PV 疫苗病毒,因此排入污水的粪便 PV 带毒率也很低。

世界卫生组织在 2015 年宣布已经在全球范围内消灭 II 型 WPV,我国政府宣布于 2016 年 5 月 1 日起全面停用含有 II 型 PV 的脊髓灰质炎减毒活疫苗,之后在外环境中的 II 型 PV 将快速减少,乃至消失。今后一段时间内,对 II 型 PV 的监测也将是维持“无脊



注:PZ表示分离自浦寨的PV,NH表示分离自弄怀的PV。

图2 广西中越边贸点2015年污水中部分PV的VP1区核苷酸序列同源性系统进化树

降钙素原和 C 反应蛋白在鉴别新生儿血流感染菌种中的价值

莫丽亚, 邓永超, 黄彩芝

湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 探讨血清降钙素原(procalcitonin,PCT)和 C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP)水平对鉴别新生儿血流感染菌种类型的临床应用价值。 **方法** 回顾性分析 2015 年 7 月-2016 年 6 月于湖南省儿童医院新生儿科病房住院的血培养结果为单一细菌且同时检测血清 PCT、CRP 水平的病例 168 例,选择同期因外科疾病住院的非感染性疾病新生儿 42 例为对照组。比较 PCT、CRP 水平在真菌、革兰阳性(G^+)菌、革兰阴性(G^-)菌血流感染新生儿及对照组之间的差异,同时根据受试者工作曲线(ROC)判断 PCT 的诊断性能。 **结果** 168 例新生儿血流感染患者中真菌 32 例、 G^+ 菌 76 例、 G^- 菌 60 例及对照组 42 例,四组 PCT 水平中位数分别为 0.57、0.21、3.69 和 0.11 ng/ml,两两比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);四组 CRP 水平中位数分别为 17.66、0.99、18.23 和 0.62 mg/L,两两比较发现真菌组与 G^- 菌组、 G^+ 菌组与对照组比较差异无统计学意义外,余差异均有统计学意义($P < 0.05$)。根据 ROC 曲线,当 PCT 界值定为 0.275 ng/ml 时,PCT 鉴别细菌感染性疾病与非感染性疾病的灵敏度、特异性分别为 71.6%、83.3%;当界值定为 0.505 ng/ml 时,PCT 鉴别真菌与 G^+ 菌的灵敏度、特异性分别为 75.0%、70.1%;当界值定为 0.615 ng/ml 时,PCT 鉴别 G^- 菌与 G^+ 菌的灵敏度、特异性分别为 82.0%、75.8%;当界值定为 1.665 ng/ml 时,PCT 鉴别 G^- 菌与真菌的灵敏度、特异性分别为 70.0%、81.2%。 **结论** CRP 作为鉴别新生儿血流感染的病原体菌种的应用价值有限;血清 PCT 水平对鉴别真菌与 G^+ 菌、 G^- 菌与 G^+ 菌及 G^- 菌与真菌所致的新生儿血流感染有一定的临床应用价值。

关键词: 降钙素原; 新生儿; 血流感染; 细菌种类

中图分类号: R722.13 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2017)09-1135-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2017.09.031

新生儿血流感染所致的败血症是导致新生儿死亡的重要原因之一,虽然病原微生物培养可提供可靠的诊断依据,但因其方法的局限性难以及时为临床提

作者简介:莫丽亚,女,本科学历,主任检验师,主要从事医学检验工作。

供诊疗信息,降钙素原(PCT)、C 反应蛋白(CRP)常常作为辅助诊断血流感染的炎症指标,但对新生儿血流感染时鉴别菌种中的临床价值研究报道较少。本研究回顾性分析了 168 例血流感染患儿的血清 PCT、CRP 水平,以评价其在鉴别不同病原体引起新生儿血流感

灰”行动的重要任务;如果在人粪便中或外环境发现 II 型 PV,将是一个重要的公共卫生事件。在 2015 年的中越边贸点污水监测中,从 69 株 PV 分离株中检出了 11 株 II 型 PV,这是中越边境消灭 II 型 PV 的一个有意义时间参考点,也是为今后评估边境地区停用含二价 PV 减毒活疫苗的效果提供了背景资料。

随着我国对外交流与贸易的扩大,防止境外传染病通过口岸输入我国已成为检验检疫部门一项重要工作。由于边贸口岸的人员出入境数量巨大,而边境检验检疫条件受限,加上 PV 携带者绝大多数是隐性感染,要在边境口岸发现并拦截 WPV 或 VDPV 携带者是非常困难的。但是能通过对边境口岸污水的监测,来评估境外输入 WPV 或 VDPV 的风险,并对可能发生的输入事件做出提早的预警及采取提早的防控措施。

参考文献

- [1] Ogonuki H. Evaluation of Sabin live poliovirus vaccine in Japan. IV. Marker tests on poliovirus us strains recovered from vaccines and their contacts [J]. Jpn J Med Sci Biol,1967,20(2):167-173.
- [2] Iwai M,Hasegawa S,Obara M,et al. Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama,Japan (2006 to 2008) [J]. Appl Environ Microbiol,2009,75(5):1264-1270.
- [3] 中华人民共和国卫生部. WS 294-2008 脊髓灰质炎诊断标准[S]. 北京:人民卫生出版社,2008:3-5.
- [4] Kew OM,Sutter RW,Nottay BK,et al. Prolonged replication of a type I vaccine-derived poliovirus in an immunodeficiency patient [J]. J Clin Microbiol, 1998,36(10):2893-2899.
- [5] 马宇燕,韦一知,韦敬航,等. 2010-2014 年广西脊髓灰质炎病原学监测结果分析[J]. 应用预防医学,2016,22(2):131-134.

收稿日期:2017-03-21