

文章编号: 1009-6094(2007)03-0017-05

水环境中轮状病毒分子生物学检测技术*

李丹, 何苗, 胡秀华, 施汉昌
(清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 轮状病毒是重要的水介传播病原体, 其感染性强, 稳定性高, 是水环境中危害严重的病原微生物, 快速、准确地检测水环境中的轮状病毒对于控制疾病爆发和保障水质公共卫生安全极为重要。本文系统介绍了水环境中病毒浓集方法、核酸提取方法以及分子生物学检测方法, 综述了水中轮状病毒浓集和分子生物学检测方法的研究进展, 并探讨了分子生物学方法在检测水环境中轮状病毒存在的问题及发展趋势。

关键词: 环境工程; 轮状病毒; 快速检测; 分子生物学; 水环境
中图分类号: X830 **文献标识码:** A

0 引言

通过水传播的病原微生物是危害人类健康和生态安全的重大隐患, 全世界约有1/4的疾病是由水中病原微生物直接或间接引起的^[1]。轮状病毒是水环境中广泛存在的病原微生物之一, 主要来自人和动物的排泄物^[2]。在全球范围内, 轮状病毒是引起腹泻最主要的原因, 每年因水传播轮状病毒造成腹泻人数约为1.11亿, 死亡人数高达44万^[3]。我国秋冬季节50%~60%的婴幼儿腹泻都是由轮状病毒引起的^[4]。同时, 轮状病毒还可以感染动物, 是动物病毒性腹泻的主要原因^[5]。这些轮状病毒进入水环境中后, 在相当长的时间里仍保持较高的传染性和致病性, 常规的水处理和消毒工艺不能完全将其去除和灭活^[6]。已有众多研究者在污水^[7]、地表水^[8]、地下水^[9]以及饮用水^[10]中检测出轮状病毒。因此, 快速准确检测水环境中的轮状病毒, 对于降低轮状病毒感染风险, 预防、控制轮状病毒疾病爆发流行, 保障水质安全具有十分重要的意义。

水环境中轮状病毒检测的传统方法是细胞培养法。这种方法操作复杂, 所需时间长, 特异性不强, 而且还需要专门的实验室和技术人员, 限制了其在水质管理中的广泛应用。近年来, 分子生物学技术的迅速发展为及时诊断与分析水中种类多样化的病原微生物提供了有效手段, 呈现灵敏、特异、快速等特点, 成为水环境中病原微生物检测的研究热点。本文将综述目前国内外利用分子生物学方法检测水环境中轮状病毒的研究进展, 并探讨其存在的问题及发展趋势。

1 轮状病毒分子生物学特征

轮状病毒(Rotavirus, RV)隶属于呼肠孤病毒科(Reoviri-

dae)轮状病毒属。成熟完整的RV粒子在电镜下呈球型, 车轮状, 为20面立体对称形, 直径60~80 nm, 无包膜, 具有3层蛋白质衣壳结构(包括核心、内衣壳和外衣壳)。内衣壳的壳粒沿病毒边缘呈放射状排列, 形同车轮辐条; 外衣壳薄而光滑, 包绕内衣壳, 类似车轱。同时具备内外双层衣壳的RV才具有感染性, 这是因为双层衣壳中含有聚合酶和其他一些能产生mRNA的酶^[11]。

RV为双链RNA病毒, 含有11个分阶段的基因片断。每个RNA片段各编码1种蛋白, 包括6种结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7)和5种非结构蛋白(NSP1、NSP2、NSP3、NSP4、NSP5), 其中VP4经胰蛋白酶裂解后可产生具有增强病毒感染性的VP5和VP8, 随后通过细胞膜进入胞浆中复制。VP4和VP7二者均为糖蛋白, 是主要的致病基因。根据VP4和VP7基因和抗原性的差异, 将RV分为不同的血清型, 分别为P和G血清型^[12,13]。我国一项调查显示G1~3为常见的血清型^[11]。根据轮状病毒VP6抗原性的差异, 将RV分为A~G 7个组。感染人类的RV主要有A、B、C, 其中A组RV是秋冬季婴幼儿腹泻最重要病原体; B组RV由我国学者洪涛等发现, 主要感染青壮年, 1980—1982年在我国曾造成大规模暴发性腹泻流行, 造成100多万人感染, 数万人死亡; C组RV主要感染青少年, 主要引起散发流行^[14]。

2 水中轮状病毒检测的前处理技术

水中病毒浓度较低, 需要经过浓缩富集等前处理后方可检出。目前, 研究较多, 应用较广泛的前处理方法有以下几种。

2.1 滤膜吸附法

常用的滤膜有表面带正电荷和负电荷的两种。在使用尼龙膜、硝酸纤维素膜等负电荷滤膜时需多价阳离子(如 Al^{3+} 、 Mg^{2+})和低pH值条件(通常为3.5), 使滤膜表面带正电荷, 从而吸附带负电荷的病毒; 而在使用正电荷滤膜时则可直接从水中吸附病毒, 再用洗脱液洗脱病毒。常用的洗脱液根据作用方式不同有两类: 一类是改变吸附特性的物质, 如甘氨酸、三氯醋酸及EDTA等; 另一类是和病毒竞争吸附位点的蛋白质类物质, 如牛肉提取液(BE)等。在使用这两类洗脱液时, 都需要将水样调节到较高的pH值, 以减少病毒和吸附剂之间的静电作用^[15,16]。Ohgaki等^[17-19]利用正电荷滤膜法富集地表水、饮用水及海水中的各种肠道病毒, 回收效果较好, 效果较为稳定。Mehnert等^[20]使用滤膜吸附-牛肉提取液洗脱法浓集污水和河水中的轮状病毒, 然后用MA-104细胞培养法检测, 测得其回收率为68%~88%。

基于滤膜吸附洗脱法发展起来的阳电荷多褶滤筒, 具有操作简单, 病毒回收率高等特点, 美国环保局推荐它作为暂定的标准方法; 但是这种方法价格昂贵, 而且处理浊度较大的水样时易堵塞。

2.2 固体颗粒吸附法

将荷电树脂、玻璃粉、羟磷灰石、磁性氧化铁和硅藻土等固体颗粒装柱, 水样流动过柱, 再用小体积洗脱液洗脱被吸附的病毒, 洗脱后得到浓缩样品。Li等^[21]利用自主研发的新型阳电荷粒状滤材, 浓缩水中病毒指示微生物f2噬菌体, 平均回收率达85%; 从体积较小的饮用水样品(0.2~1.5 L)和体积较大的饮用水样品(30~100 L)中浓集脊髓灰质炎病毒, 回

* 收稿日期: 2006-12-29

作者简介: 李丹, 硕士研究生, 从事环境病原微生物检测技术研究; 何苗, 副教授, 从事环境污染物的现代生物监测技术研究。

基金项目: 国家高技术发展计划(863)项目(2002AA649160)

收率分别为 96 % 和 88.7 %。此方法的优点是水样的体积、pH、温度、浊度和有机物对回收率影响不明显,而且不需要对水样进行酸化和加入多价的阳离子盐,亦不需要昂贵的仪器,回收率较高,是从体积较大和浊度较高的水样中浓集病毒的有效方法。

2.3 免疫捕获法

免疫捕获法是利用抗体和抗原特异性结合的原理,将高特异性的纯化抗体交联于层析材料上,装填成柱,或将抗体包被于磁珠表面,形成免疫磁珠。被测水样流过柱或与免疫磁珠搅拌后,用洗脱液洗脱,即可得到纯度很高的被检测病毒^[22-24]。该方法能有效去除各种干扰物质,灵敏度极高,操作相对简单,而且具有良好的兼容性,可以很容易与各种检测方法相结合。Casas 等^[24]利用聚乙二醇沉淀法(PEG)初次富集,利用免疫捕获法二次富集污水中的轮状病毒和脊髓灰质炎病毒等,然后利用 RT-PCR 方法检测。结果表明,这种富集方法可以有效消除污水中的 PCR 检测抑制剂。有研究者把免疫磁珠分离技术(Immunomagnetic Bead-based Separation, IMS)与 PCR 技术结合在一起,发展了 IMS-PCR 技术,提高了 PCR 检测的效率和准确性。Thompson 等^[25]利用 IMS 与 PCR 及 Real-time PCR 结合,检测水环境中的病原微生物。结果表明,这些检测方法的敏感程度比常规 PCR 检测增加约 8~2 000 倍。免疫捕获技术的难点是制备高性能的固相载体和病原微生物的特异性抗体,如制备均一球形超顺磁性且易于结合蛋白的磁珠。在国外多为专利产品且价格昂贵,国内对免疫磁珠技术的研究刚刚起步。

3 轮状病毒的分子生物学检测技术

在利用分子生物学方法检测水环境中病毒时,首先要提取其核酸,再对其核酸进行基于不同原理和技术的分子生物学检测及分析。

3.1 轮状病毒 RNA 的提取

轮状病毒是双链 RNA 病毒,提取 RNA 是检测水中轮状病毒非常关键的一步。获得较为完整的 RNA 应避免提纯过程中内源及外源性的核糖核酸酶(RNase)对 RNA 降解。RNase 广泛存在于自然环境中且不易变性失活,因此,提取纯度和完整性都满足分子生物学操作的 RNA 分子是其难点。采取强烈抑制 RNase 是防止 RNA 降解的有效方法。硫氰酸胍是已知作用最强的蛋白变性剂,它在裂解细胞释放 RNA 的同时能迅速使 RNase 失活,避免 RNA 和蛋白质被降解。但是对于水环境样品,在水样浓缩的同时,水中存在的各种可能抑制酶催化反应的物质也被浓缩,因此,还需要对提取的 RNA 进行纯化。

近年来发展了很多商品化的试剂或试剂盒,操作简单,提取效果较好,但是价格相对昂贵,主要有 3 种: 1) Trizol 法,其主要成分是酚和异硫氰酸胍的混合液,用于组织和细胞总 RNA 的提取时能保持 RNA 的完整性; 2) 柱层析纯化法,采用 Sephadex、CC41 纤维素等层析材料,在特定的离子浓度下,可以吸附或洗脱核酸,快速去除杂质,纯化浓缩核酸样品; 3) 抗原捕获法,采取交联或包被于固相上的特异抗体与病毒抗原结合,经洗涤,更换缓冲液,直接加热裂解病毒,获得纯度很高的核酸^[26]。

3.2 基于 PCR 技术检测水中轮状病毒

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是一种在体外迅速扩增特异 DNA 或 RNA 片断的方法。该技术具有灵敏、快速、特异等优点,其扩增产物可用于克隆、测序等基因研究,为快速检测 RV 这样难于培养的病毒提供了一个强有力的手段^[27,28]。由于 RV 是双链 RNA 病毒,其检测的经典 PCR 技术是逆转录 PCR(RT-PCR),即先将检测样品的 RNA 逆转录为 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,通过检测 PCR 特异性的扩增产物来检测 RV。RT-PCR 一般为定性检测。Brassard 等^[29]利用带正电荷的膜浓集泉水中的病毒,利用 RT-PCR 方法检测其中的 RV 等病毒,最低可检测 10^{-3} TCID₅₀/mL 的 RV。

为了提高检测的灵敏性和特异性,发展了 RT-巢式-PCR(RT-nested-PCR)。该方法通过两次连续扩增放大,显著提高了检测的灵敏度和特异性。RT-巢式-PCR 比 RT-PCR 检测的灵敏度至少提高 10^3 倍。Kittigula 等^[30]在 RV 的 VP7 上设计引物,利用 RT-nest-PCR 方法检测河流、生活污水中的 RV,最低可检测到 1.67 PFU,进而对 RT-nest-PCR 的扩增产物进行序列分析,所有的结果都符合 VP7 的基因序列。与 ELISA 方法对比检测这些水样,阳性水样检出率大大提高。

为实现多种病毒(或同种病毒不同血清型)的同时检测,又发展了 RT-多重-PCR(RT-multiple-PCR)。该方法可同时扩增多个目的基因,即可同时检测多组或不同血清型的 RV,具有节省时间,降低成本,提高检测效率等优点,而且减少了操作步骤,降低了出现假阳性结果的机会。但与 RT-PCR 相比,该技术涉及多对引物,增加了错配扩增产物的机会,从而会导致扩增效率降低,扩增体系中存在着竞争等问题。RT-多重-巢式-PCR(RT-multiple-nested-PCR)同时具有 RT-多重-PCR 和 RT-巢式-PCR 的优点,具有较高的灵敏性和多效性。Gajardo 等^[31]利用基因片断 9(VP7)上血清型特异的引物,可以检测污水中 A 组 1、2 和 3 血清型的 RV。

1996 年美国 Applied Biosystems 公司推出实时定量 PCR(Real-time PCR)技术。该方法实现了 PCR 从定性到定量质的飞跃,且具有引物和探针的双重特异性,在全封闭的状态下实现扩增及产物分析,结果相当稳定,可重复性好,同时还有效减少了污染及对人体的危害,在大批量标本检测中能有效地减少劳动量,成为分子生物学和分子诊断的重要技术平台,广泛应用于环境样品中病原微生物的检测及研究中。Pang 等^[32]利用 Real-time RT-PCR、RT-nested-PCR 和电子显微镜(electron microscopy)这 3 种技术检测腹泻儿童粪便中的 RV。结果表明 RT-real-time PCR 方法比传统 RT-PCR 及 RT-巢式-PCR 提高了 $10^2 \sim 10^4$ 倍,而且检测时间缩短了 1 倍。

3.3 基于基因探针技术检测水中轮状病毒

基因探针技术是通过特异寡核苷酸探针与待测基因序列互补结合,利用探针上的标记物,产生放射性、发光、显色等杂交结果以检测待测样品,具有很高的灵敏度和特异性。1987 年, Lin 等^[33]首次应用分别针对 RV 的 11 个基因片段的 cDNA 探针进行斑点杂交,发现针对基因 7、8、10、11 的探针对于鉴定 RV 毒株最为可靠,而针对编码组特异性抗原 VP6(基因 6)和型特异性抗原 VP7(基因 9)的探针,可鉴定病毒株的亚组、亚型。Broor 等^[34]也以 cDNA 作为探针进行斑点杂交。与 ELISA、PAGE 方法相比, cDNA 探针杂交更为灵敏。

但是以 cDNA 作为探针进行检测需要检测较高浓度的 RV。由于水环境中 RV 浓度很低,单纯利用基因探针技术并不适于检测水中 RV。目前,基因探针技术主要与 PCR 等技术联用,用于对水中 RV 进行定性、定量检测及分型研究。Alfieri 等^[35]使用生物素 272dATP 等非放射性标记物标记探针。该方法不仅具有很高的灵敏度和特异性,而且操作简单、快速,无放射性污染,可能成为常规实验室检测方法。同时,还利用多重的 RT-PCR 和地高辛标记的寡核苷酸探针培养的人、猪和牛的 C 组轮状病毒进行分型。这种方法对于研究感染人和动物的轮状病毒有十分重要的意义。

3.4 基于核酸序列扩增技术检测水中轮状病毒

基于核酸序列扩增 (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA) 技术是一项以 RNA 为模板的快速等温扩增技术^[36],特别适用于 RNA 分子检测。其特点是整个扩增过程在恒温条件(41 °C左右)下进行,不需要特殊(如 PCR 仪)控温装置,大大避免了 PCR 扩增过程中复杂的温度变化。该技术扩增体系包括逆转录酶、RNA 酶 H 和 T7RNA 聚合酶,以及 2 条特别设计的寡核苷酸引物。相对于 RT-PCR 变性、复性、延伸 3 阶段不同温度循环扩增,NASBA 扩增温度始终恒定在 41 °C左右,污染的双链 DNA 不能解链,从而不存在 DNA 污染问题,具有更高的特异性。另外,NASBA 不仅省时,而且由于 RNA 以 10 的指数形式扩增,远高于以 2ⁿ扩增的 DNA PCR,从而具有更高的灵敏度^[37,38]。

Tai 等^[39]用 NASBA 方法扩增 RV 的 RNA,用电化学发光法和脂质体条检测法检测扩增产物,并与 RT-PCR 方法检测的结果进行比较,结果显示 NASBA 方法的检测结果较好。Jean 等^[40]利用多重 NASBA 检测 HAV 和 RV,扩增后的产物经琼脂糖电泳分析,并与微量滴定杂交检测系统和 RNA 印迹试验比较。结果发现,优化的 NASBA 至少可检测样本中 40 PFU/mL 的 RV 和 400 PFU/mL 的 HAV。Jean 等^[41]还设计使用了 NASBA-ELISA 检测系统,用于 RV 快速检测。根据型特异性抗原 VP7 基因序列设计引物,NASBA 技术扩增病毒 RNA,扩增产物与固定在微量滴定板上的特异性寡核苷酸探针杂交,DNA-RNA 杂交经过氧化物酶显色底物检测,可在 6 h 内检测去离子水中 0.2 PFU (4 × 10¹ PFU/mL) 和污水中 15 PFU (3 × 10³ PFU/mL) 的 RV。同时,该研究发现,NASBA-ELISA 系统中非靶 RNA 或 DNA 的存在,不会产生非特异性信号,进一步证实该系统快速、简便,具有高度的特异性和灵敏度。

3.5 基于基因芯片技术检测水中轮状病毒

基因芯片又叫做 DNA 芯片、DNA 微阵列 (DNA microarray),是指采用原位合成或合成后点样等方法,将大量基因探针以大规模阵列的形式有序地固定于面积很小的固体介质(玻片、硅片、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙或硝化纤维膜等)表面,通过与标记后被检测基因的碱基序列杂交,再通过扫描系统(如激光共焦扫描成像检测系统或电荷耦联摄影像机等)检测探针分子杂交信号,实现核酸序列分子识别。其原理来源于 Southern 提出的核酸杂交理论,传统的印迹杂交可以看做是基因芯片的雏形。

基因芯片技术把 PCR 技术的高度敏感性和核酸杂交的高度选择性结合起来,具特异性好,通量高,平行性好和简便快速等优点,在进行大批量筛选环境样品和对其进行分型研究中有广泛应用。Chizhikov 等^[42]用巢式 PCR 和基因芯片技

术对 5 种不同基因型的人轮状病毒 (G1~G4, G9) 进行分型,根据 VP7 编码基因序列分别设计了 9 条或 10 条寡核苷酸探针制备基因芯片,根据扩增产物同基因芯片杂交后产生信号的有无和强弱对 RV 进行分型。结果表明,该方法与传统的分型方法检测结果一致;但是与传统的 PCR 分型方法相比,又有很大进步。这是因为每种基因型选用多条探针,每株毒株的血清型不是靠 1 种特异性探针决定的,而是将阳性的杂交信号数与均值相比较得到的。黄海燕等^[43,44]以表面带正电荷的尼龙膜为基片,以地高辛标记上游引物,采用半巢式 PCR 方法扩增 A、B 和 C 组 RV RNA 保守区,通过膜芯片上探针杂交和免疫显色反应,实现对 RV 检测。结果表明,可检测到 RV RNA 的最低质量浓度为 10⁻⁹~10⁻¹² μg/mL。

3.6 免疫技术与 PCR 相结合检测水中轮状病毒

1992 年,Sano^[45]建立了一种检测微量抗原的高灵敏免疫 PCR 技术 (Immuno Polymerase Chain Reaction, IP-PCR)。该技术把抗原抗体反应的高特异性和 PCR 反应的高敏感性结合起来,旨在通过联级放大提高检测灵敏度,降低检测体系内抑制剂的干扰,是迄今最敏感的病原微生物检测方法。目前国内外报道该方法的敏感性一般比现行的 ELISA 法高 10²~10⁴ 倍。Adler 等^[46]利用 IP-PCR 方法,检测粪便中的轮状病毒,最低可以检测到 100 个病毒粒子/mL,比直接用 ELISA 检测灵敏度提高了 1 000 倍。此技术在保证检测特异性和敏感性的同时,简化了实验操作步骤和外源性污染,缩短了检测周期,在饮用水应急及预警检测中具有广泛的应用前景。但与 Real-time PCR 等技术相比,Real-time Immuno-PCR 仍处于发展阶段,需进一步探索最佳反应条件,简化操作步骤,降低费用,并实现标准化。

3.7 细胞培养与实时定量 RT-PCR 相结合 (ICC real-time RT-PCR) 检测水中轮状病毒

近年来,发展了一种细胞培养与 PCR 相结合的方法 (Integrated Cell Culture-RT-PCR, ICC-PCR),来快速检测水环境中具有感染性的微量病毒。其原理是利用 PCR 方法快速检测病毒在宿主细胞内复制时产生的 mRNA,来检测具有感染性的病毒。这种方法不仅比单纯的细胞培养法和 RT-PCR 方法都要灵敏^[47],同时还提供了水中病原微生物潜在感染效应等信息,这对于评估水中病原微生物的健康风险极为重要。Gwangpyo 等^[48]建立了水中感染性腺病毒的细胞培养法与 Real-time RT-PCR 结合的定量检测方法,培养 3 d 后检测,最低可以检测到 5 IU (infectious units) 的腺病毒,而且通过检测氯消毒和紫外消毒后水样中的腺病毒,证明这种方法只能检测到具有感染性的腺病毒。该研究表明,利用 Real-time RT-PCR 检测病毒在细胞培养过程中产生的 mRNA 是检测水环境和其他环境样品中感染性病毒的快速、特异、敏感的方法。

ICC real-time RT-PCR 结合了细胞培养法和 Real-time RT-PCR 方法的优点,对于检测和评价水环境中的病毒的水质安全具有重要的意义。目前,已经有研究采用该方法来检测水环境中的肠道病毒^[49~51]、腺病毒^[49~52]和呼肠孤病毒^[53]等。

4 结 论

水环境中轮状病毒检测技术朝着灵敏快速,操作简单,成本低廉等方向发展。现代分子生物学技术以其灵敏度高,特异性好,操作简单,能满足大量样品快速检测等优点,在水环

境 RV 快速检测中应用越来越广泛。其中荧光实时定量 PCR (Real-time PCR) 融合了 PCR 技术核酸高效扩增, 探针技术的高特异性以及光谱技术的高敏感性和高精确定量的优点, 使其在分子诊断领域应用越来越普遍; 基因芯片技术则是为水环境中病毒的诊断和检测提供了一个更为快速、高通量以及高度自动化的技术平台, 不仅可以同时检测大批量的样品, 还可以同时检测多种病原微生物, 目前, 在环境中的应用尚处于研究阶段, 其广泛应用将会推动检测技术飞跃发展。另外, 免疫技术与 Real-time PCR 相结合, 在保证检测特异性和敏感性的同时, 简化了实验操作步骤和外源性污染, 缩短了检测周期, 在饮用水应急及预警检测中具有广泛的应用前景; 细胞培养与 Real-time PCR 相结合, 不仅提高了检测的灵敏度, 同时还提供了水中病原微生物潜在的感染效应等信息, 对于评估饮用水中病原微生物公共健康风险是十分重要的。

References(参考文献):

- [1] GERBA C P. Pathogens in the environment[M]// PEPPER I L, GERBA C P, BRUSSEAU M L. *Pollution science*. New York: Academic Press, 1996:279 ~ 299.
- [2] ABBASZADEGAN M, STEWART P, LECHEVALLIER M, et al. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2):444 ~ 449.
- [3] PARASHAR U D, HUMMELMAN E G, BRESEE J S, et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children[J]. *Emerging Infections Diseases*, 2003, 9(5): 565 ~ 572.
- [4] CHANG Ruxu(常汝虚), HE Cuijuan(何翠娟). Comparative detection on rotavirus in diarrhea deject[J]. *Chin J Pediatr (中华儿科杂志)*, 2000, 38(11):703 ~ 704.
- [5] SCHWARZ B, BANGE R, VAHLENKAMP T, et al. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002(105):277 ~ 285.
- [6] HAMBIDGE A. Reviewing efficacy of alternative water treatment techniques [J]. *Health Estate*, 2001, 55(6): 23 ~ 25.
- [7] 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): 3681 ~ 3685.
- [8] GILGEN M, GERMANN D, LÜTHY J, et al. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples [J]. *Int J Food Microbiol*, 1997(37): 189 ~ 199.
- [9] GERBA C P, ROSE J B, HAAS C N, et al. Waterborne rotavirus: a risk assessment [J]. *Wat Res*, 1996, 30(12):2929 ~ 2940.
- [10] GRATACAP-CAVALLIER B, GENOULAZ O, BRENGEL-PESCE K, et al. Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000(66): 2690 ~ 2692.
- [11] PRASAD B, ROTHNAGEL R, ZENG C Q-Y, et al. Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus[J]. *Nature*, 1996, 382:471 ~ 473.
- [12] HAFFEJEE I E. The epidemiology of rotavirus infections: a global perspective [J]. *Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995, 20(3):275 ~ 286.
- [13] CAO X R, AKIHARA S, FANG Z Y, et al. Genetic variation in the VP4 and NSP4 genes of human rotavirus serotype 3 (G3 type) isolated in China and Japan [J]. *Microbiol Immunol*, 1999, 43(2):171 ~ 175.
- [14] HONG Tao(洪涛), CHEN Guangmu(陈广牧), FANG Zhaoyin(方肇寅). *Adult diarrhea rotavirus infection (成人腹泻轮状病毒感染)* [M]. Beijing: Science Press, 1990:633 ~ 654.
- [15] GILGEN M, WEGMULLER M, BUKHALTER P, et al. RT-PCR to detect enteroviruses in surface water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995(61):1226 ~ 1231.
- [16] WOMMACK K E, HILL R T, COLWELL R R. A simple method for the concentration of viruses from natural samples [J]. *J Microbiol Methods*, 1995(22): 57 ~ 67.
- [17] HARAMOTO E, KATAYAMA H, OGUMA K, et al. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and Torque Teno viruses in the Tamagawa River in Japan [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005(71): 2403 ~ 2411.
- [18] HARAMOTO E, KATAYAMA H, OHGAKI S, et al. Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004(70):2154 ~ 2160.
- [19] KATAYAMA H, SHIMASAKI A, OHGAKI S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002(68):1033 ~ 1039.
- [20] MEHNERT D U, STEWIEN K E, HÁRSI C M, et al. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration [J]. *Method Mem Inst Oswaldo Cruz, Riode Janeiro*, 1997, 92(1): 97 ~ 100.
- [21] LI J W, WANG X W, Qi Yi Rui, et al. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water [J]. *Journal of Virological Methods*, 1998(74):99 ~ 108.
- [22] GILPATRICK S G, SCHWAB K J, ESTERS M K, et al. Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2000, 90(1): 69 ~ 78.
- [23] DHUNGYEL O P, WHITTINGTON R J, EGERTON J R. Serogroup specific single and multiplex PCR with pre-enrichment culture and immunomagnetic bead capture for identifying strains of D. nodosus in sheep with foot rot prior to vaccination [J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(4):285 ~ 296.
- [24] CASAS N, SUNEN E. Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription PCR assay [J]. *Microbiol Res*, 2002, 157(3):169 ~ 175.
- [25] THOMPSON D E, RAJAL V B. Detection of Salmonella spp. in water using magnetic capture hybridization combined with PCR or real-time PCR [J]. *Journal of Water and Health*, 2006(4):67 ~ 75.
- [26] MYRMEL M, RIMSTAD E, WASTESON Y, et al. Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (group I) in artificially contaminated environmental water samples [J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 62(1 ~ 2):17 ~ 26.
- [27] GREEN D H, LEWIS G. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture [J]. *Wat Res*, 1999(33):1195 ~ 1200.
- [28] GUNSON R N, MILLER J, LEONARD A, et al. Importance of PCR in the diagnosis and understanding of rotavirus illness in the community [J]. *Commun Dis Public Health*, 2003(6):63 ~ 65.
- [29] BRASSARD J, SEYER K, HOUE D A, et al. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in spring water samples by reverse transcription-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005(123):163 ~ 169.
- [30] KITTIQL L, EKCHALOEMKIET S, UTRARACHKI F, et al. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005(124):117 ~ 122.
- [31] GAJARDO R, BOUCHRIYI N, PINTO R M, et al. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(9):3460 ~ 3462.
- [32] PANG X L, LEE B, BOROUHAND N, et al. Detection of rotavirus

- using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea [J]. *Journal of Medical Virology*, 2004(72):496-501.
- [33] LIN M, IMAI M, IKEGAMI N, et al. cDNA probes of individual genes of human rotavirus distinguish viral subgroups and serotypes [J]. *Journal of Virological Methods*, 1987, 15(4):285-289.
- [34] BROOR S, HUSAIN M, CHATTERJEE B, et al. Direct detection and characterization of rotavirus into subgroups by dot blot hybridization and correlation with "long" and "short" electropherotypes [J]. *Clin Diagn Virol*, 1995, 3(1):29-38.
- [35] ALFIERI A, LEITE J, ALFIERI A, et al. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes [J]. *Journal of Virological Methods*, 1999(83):35-43.
- [36] COMPTON J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 1991, 350:91-92.
- [37] COOK N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples [J]. *J Microbiol Methods*, 2003(53):165-174.
- [38] LANDRY M L, GARNER R, FERGUSON D. Comparison of the nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and the argene biosoft enterovirus consensus reverse transcription-PCR assays for rapid detection of enterovirus RNA in clinical specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(11):5006-5010.
- [39] TAI J H, EWERT M S, BELLIO T G, et al. Development of a rapid method using nucleic acid and sequence-based amplification for the detection of astrovirus [J]. *Journal of Virological Methods*, 2003, 110(2):119-127.
- [40] JEAN J, BLAIS B, DARVEAU A, et al. Simultaneous detection and identification of hepatitis A virus and rotavirus by multiplex nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and microtiter plate hybridization system [J]. *Journal of Virological Methods*, 2002(105):123-132.
- [41] JEAN J, BLAIS B, DARVEAU A, et al. Rapid detection of human rotavirus using colorimetric nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)-enzyme-linked immunosorbent assay in sewage treatment effluent [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002(210):143-147.
- [42] CHIZHIKOV V, WAGNER M, HOSHINO Y, et al. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(7):2398-2407.
- [43] HUANG Haiyan(黄海燕), HAN Jinxiang(韩金祥), WANG Jianwei(王健伟). Study on membrane chip for detecting group A rotavirus [J]. *Letters in Biotechnology(生物技术通讯)*, 2005(16):138-140.
- [44] HUANG Haiyan(黄海燕), HAN Jinxiang(韩金祥), WANG Jianwei(王健伟). Study on membrane chip for detecting group B and C rotavirus [J]. *Shandong Medical(山东医药)*, 2005(20):1-3.
- [45] SANO T, SMITH CL, CANTOR CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody DNA conjugate [J]. *Science*, 1992, 258(5079):120-122.
- [46] ADLER M, SCHULZ S, FISCHER R, et al. Detection of rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005(333):1289-1294.
- [47] LEE S-H, LEE C, LEE K W, et al. The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005(98):1020-1029.
- [48] KO G, JOTHIKUMAR N, VINCENT R, et al. Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR [J]. *Journal of Virological Methods*, 2005(127):148-153.
- [49] CHAPRON C D, BALLESTER N A, FONTAINE J H, et al. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus type 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the Information Collection Rule and an integrated cell culture nested PCR procedure [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000(66):2520-2525.
- [50] LEE S-H, KIM S-J. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea [J]. *Water Research*, 2002(36):248-256.
- [51] SANCHEZ-FAUQUIER A, ROMAN E, COLOMINA J, et al. Rapid PCR-based monitoring of infectious enteroviruses in drinking water [J]. *Water Science and Technology*, 1997(35):423-427.
- [52] KO G, CROMEANS TL, SOBSEYM D. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12):7377-7384.
- [53] SPINNER M L, DI GIOVANNI C D. Detection and identification of mammalian reoviruses in surface water by combined cell culture and reverse transcription-PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001(67):3016-3020.

Research advances on the molecular detection technologies of rotavirus in water environment

LI Dan, HE Miao, HU Xiuhua, SHI Hanchang

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Based on the introduction of recent research advances on the rotavirus concentration method, extraction of nucleic acid and molecular detection methods, this paper aims to introduce the authors' review and synthesis on the research advances in this field. It has also analyzed the development trends of the various effective biological detection technologies and the principles as well as the applications concerned. Due to its high sensitivity and specificity, PCR is the most commonly employed molecular tool. With the development of molecular technology, real-time PCR systems have enabled scientists and technologists to monitor PCR products continuously during the exponential phase of quantification. Moreover, real-time PCR systems are considerably less time-consuming than the previously developed methods. In addition, microarrays represent an important advance in molecular detection technologies, thus making it possible to do simultaneous detection of specifically labeled DNAs from various pathogenic organisms on a small glass slide with thousands of surface immobilized DNA probes. ICG-PCR, with the technique of cell culture and PCR combined into one, is believed to be able to overcome the limitations of cell culture and molecular technology. This method has not only combined the speed and sensitivity of PCR with cultural viability as say to form a molecular detection method capable of isolating low levels of infectious virus, but also tells the information of viruses' infectivity, which is predominant for health risk assessment. In conclusion, this paper also suggests that the molecular detection technologies of rotavirus should be developed into a better comprehensive technology with simple operation and easy going procedure, as well as less time-consuming and more economic with higher sensitivity, so that it can provide information on the infectivity, and so forth.

Key words: environmental engineering; rotavirus; rapid detection; molecular technology; water environment

CLC number: X830 **Document code:** A

Article ID: 1009-6094(2007)03-0017-05