

郑晓雨, 鲁玺龙, 闻武, 等. 污水中新型冠状病毒富集方法研究进展[J]. 净水技术, 2023, 42(12):44-51, 127.

ZHENG X Y, LU X L, WEN W, et al. Research progress on concentration methods of SARS-CoV-2 in wastewater [J]. Water Purification Technology, 2023, 42(12):44-51, 127.

污水中新型冠状病毒富集方法研究进展

郑晓雨^{1,2}, 鲁玺龙², 闻武^{1,2}, 杨帆², 赵兴春^{2,*}

(1. 公安部禁毒情报技术中心, 北京 100193; 2. 公安部物证鉴定中心, 北京 100038)

摘要 新冠疫情暴发以来, 通过检测污水中新冠病毒含量实现动态监测疫情发展、提供疫情预警信号和辅助评估疫情干预等越来越被世界各国所重视。但由于污水中新冠病毒载量较低且极具传染性, 快速有效的富集方法就成为精确检测新冠病毒的关键。文章梳理了现有污水中新冠病毒的富集方法, 结合回收率、耗时、成本和通量重要评价指标进行对比分析。相对而言, 膜吸附脱附法和絮凝沉淀法成本低、耗时长, 适用于大体积样品初级富集; 超速离心法和超滤法成本高、耗时短, 适用于小体积样品次级富集。优化过滤膜种类尺寸、絮凝剂、离心速度和截留分子量等可提高回收率等富集效果, 通过寻求理想的替代病毒、降低样品基质等不确定度影响、优化 RNA 提取方法等, 并建立规范性富集方法将是未来有关研究的重点方向。

关键词 新冠肺炎病毒 污水流行病学 富集 疫情 环境样品

中图分类号: X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-0177(2023)12-0044-09

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2023.12.006

Research Progress on Concentration Methods of SARS-CoV-2 in Wastewater

ZHENG Xiaoyu^{1,2}, LU Xilong², WEN Wu^{1,2}, YANG Fan², ZHAO Xingchun^{2,*}

(1. Drug Intelligence and Forensic Center of Ministry of Public Security, Beijing 100193, China;

2. Institute of Forensic Science of China, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Abstract Since the outbreak of COVID-19, SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) presence in wastewater which has been increasingly reported by more and more countries plays an important role in dynamically surveilling the pandemic development trend, providing an early warning and estimating the prevalence of epidemic interventions. Due to the extremely high infectivity of SARS-CoV-2 and the relatively low copy number in wastewater, it is vital to develop applicable concentration methods for accurate qualitative monitoring and quantitative analysis. This paper reviews and evaluates the concentration methods of SARS-CoV-2 in wastewater from the perspective of important factors such as recovery, time consumption, cost and throughput. Virus adsorption-elution and flocculation precipitation methods are relatively low cost and time-consuming which are suitable for primary enrichment of samples with large volume, while ultracentrifugation and ultrafiltration methods commonly used as secondary concentration are high cost and time-saving. Optimizing the pore size of membrane filter, flocculant, centrifugation speed and nominal molecular weight limit can improve the concentration efficiency such as recovery rate and so on. What's more, future research needs including choosing appropriate alternative viruses, reducing the uncertainty of sample matrix, optimizing RNA extraction methods, and establishing a normative method are delineated for details to improve the reliability and comparability of the results.

Keywords SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology concentration epidemic environmental sample

新冠疫情暴发以来, 全球公共健康受到严重威胁^[1]。新冠病毒传染能力极强, 除飞沫传播和接触

传播外, 还可能通过感染患者的粪便排出体外, 随着医院废水或市政污水等排放后, 经城市污水管网/道进入污水处理厂, 长期存活于污水体系中^[2-3]。2020年, 荷兰首次报道污水中检测到新冠病毒, 比首例确诊病例早3周时间^[4]。法国、美国等的学者^[1,5-8]研究表明, 采样时段内污水中新冠病毒含量与相应区域内确诊人数变化趋势呈良好的正相关

[收稿日期] 2022-09-28

[作者简介] 郑晓雨(1988—), 男, 研究方向为水环境污染研究, E-mail:xyzhengcn@cifs.gov.cn。

[通信作者] 赵兴春(1974—), 男, 研究方向为法医遗传学研究及科研规划管理, E-mail:zhaoxchun@sina.com。

性,美国和澳大利亚的学者^[1,9]还根据污水中新冠病毒 RNA 检测量估算相应区域感染人数。这些研究^[10]充分证明,污水流行病学可在提供疫情预警信号、动态监测疫情发展和辅助评估疫情干预方面发挥重要作用。根据文献报道,大多数污水处理厂的污水中新冠病毒载量仅为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ copies/L,提高目标物的检测灵敏度成为发挥作用的基础。同时,虽然温度、日光以及其他拮抗微生物等都会影响新冠病毒的存活,但由于其极强的传染性,仍然存在病毒暴露引发操作人员感染、处理不当造成受纳水体污染等风险。因此,快速有效的富集方法成为精确监测新冠病毒的关键制约因素^[11]。

污水流行病学用于监测病毒等在人群中的传播已经得到广泛研究和应用,但大多为针对非包膜病毒。由于新冠病毒为包膜病毒,其与非包膜病毒的富集方法存在不同。由于研究时间、传播特性等原因,针对新冠病毒富集方法的研究成果还不够系统、成熟。因此,本文旨在系统梳理现有相关研究文献,通过比较不同富集方法的优缺点,指出当前和未来研究的重点方向,为制定标准化方案提供有益参考。

1 常见富集方法

根据原理不同,富集方法可分为物理化学方法和物理方法^[11]。物理化学方法是在使用聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 与 NaCl、MgCl₂、葡萄糖或明矾等化学试剂产生聚合絮沉和两相分离的基础上进行物理分离提取和富集,如膜吸附-洗脱法、絮凝沉淀法等。物理方法主要应用离心和过滤或超速离心和再悬浮的组合,如超速离心法、超滤法、常规过滤法等。其中,PEG 絮凝沉淀和超滤被世界卫生组织推荐用于脊髓灰质炎病毒循环的环境监测,膜吸附脱附被美国环保局作为检测水中隐孢子虫和贾第鞭毛虫的标准方法。2022年,国家卫健委将 PEG 絮凝沉淀、铝盐絮凝沉淀、离心超滤作为污水中新冠病毒富集的行业标准发布实施。本文将重点介绍几种当前最为常用的富集方法(表1)。

1.1 膜吸附-洗脱法

膜吸附-脱附法基本过程是将含有病毒的水体通过吸附性过滤器,利用过滤器与病毒之间的静电作用使病毒吸附在带电滤膜上,再用磷酸缓冲盐等从滤膜上洗脱病毒^[12]。滤膜可分为负电膜(如硝酸纤维素膜)和正电膜(如 nanoceram 膜、1MDS),根据

病毒的带电荷状态选择合适的滤膜。一般来说,大多数肠道病毒在接近中性 pH 的环境水中具有净负电荷,因此,使用负电膜富集前需添加阳离子盐(如 MgCl₂、AlCl₃ 或 NaCl)促进带负电的病毒通过阳离子盐桥与膜结合,最后需要用酸将吸附的阳离子洗脱以提高病毒回收率。例如,通过加入低浓度的 NaCl 和 MgCl₂ 实现利用硝酸纤维素微孔膜对病毒进行富集。另外,由于污水中的悬浮物会引起堵塞和基质效应,一般应进行预过滤或预离心。使用正电膜富集则无需加盐或酸化,加盐或酸化有可能会在带负电的病毒颗粒周围形成正双电层,从而降低正电膜过滤效率。从目前研究来看,相对于负电膜而言,正电膜的成本较高。

通过对比不同负电膜法对腺病毒和小鼠肝炎病毒(MHV)的富集效率发现,对于非包膜病毒腺病毒,水样预酸化处理后的样品未见实时荧光定量(qPCR)抑制,且回收率是添加 MgCl₂ 方法的 10 倍^[13],而对于与新冠病毒具有相似基因结构和包膜蛋白的 MHV^[14],添加 MgCl₂ 的回收率最高达到 65.7%^[15],这可能是由于预酸化过程破坏了病毒结构^[16]。该课题组还对比了负电膜法与超滤法对污水中新冠病毒的富集效率,发现两种方法均未出现 qPCR 抑制,但对两个样品检测出现相反结果,其含量均低于定量限^[1]。一项针对新冠病毒的 8 种富集方法对比结果表明,添加 MgCl₂ 的膜吸附脱附具有最低的回收率^[17]。

1.2 絮凝沉淀法

絮凝沉淀法是通过向样本中加入絮凝剂使病毒与絮凝体结合,然后通过物理方法收集和洗脱实现富集的方法^[12]。PEG 絮凝沉淀法是分析水样中新冠病毒载量的常用方法之一,比一般化学絮沉效果更好^[18]。

利用絮凝沉淀可回收污水中水相和固体悬浮物中的新冠病毒^[19],但回收率并不高^[15],可能是因为存在逆转录抑制^[15]或 qPCR 抑制剂共沉淀^[5]。Bar-Or 等^[20]分别采用 PEG 和明矾絮凝沉淀法富集新冠病毒,qPCR 测定阳性样本循环参数分别为 33 和 33.6。La 等^[21]通过改进世界卫生组织关于脊髓灰质炎病毒传播环境监测指南,在采用 PEG 沉淀法时略去其中氯仿处理步骤,保证了病毒结构的完整性,从而提高新冠病毒的回收率。《污水中新型冠状病毒

毒富集浓缩和核酸检测方法标准》(WS/T 799—2022)中 PEG 沉淀法包括预离心、次级离心和浓缩富集三步,其中次级离心需在 12 000 *g* 下离心 2 h,铝盐混凝沉淀法包括预离心、絮凝处理、离心分离和络合溶解四步,最大离心力为 2 500 *g*,且离心时间更短,该标准方法的检出限为 10 copies/mL。

1.3 超速离心法

超速离心法是在预离心去除较大颗粒的基础上,利用超速离心机强大的离心力使物理特征不同的物质分离。一般而言,1 000~3 000 *g* 离心 15 min 足以沉淀全细胞细菌,高速离心(高于 5 000 *g*)可沉淀线粒体等大细胞器,而沉淀病毒则需要提供 100 000 *g* 离心力的超速离心机。通过调控离心转速和时间,还可对样品中不同成分进行分离。

Wurtzer 等^[22]将 11 mL 摇匀后的样品置于离心机中,在 4 °C 下 200 000 *g* 离心 1 h,随后加入到 400 μ L 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中,取 200 μ L 进行检测,新冠病毒 RNA 为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ copies/L,但未提供回收率数据。Ahmed 等^[15]利用超速离心法对 MHV 的平均回收率为 33.5%,而 Ye 等^[19]在 4 °C 下 100 000 *g* 离心 15 min 后平均回收率仅为 5%左右,鉴于只检测活性病毒,推测低回收率与过高离心力造成病毒失活有关,同时部分被吸附在悬浮颗粒上

的病毒在除去上清液时损失。

1.4 超滤法

超滤法是利用在一定压力下,分子大小与滤膜孔径的关系实现病毒富集的目的。为避免较大杂质颗粒堵塞^[12],往往需要在超滤之前进行预离心^[19]。尽管超滤过程中病毒的富集不是通过静电相互作用发生的,但是病毒仍然可以通过范德华力、疏水作用等被吸附到超滤膜上。病毒在超滤膜上的回收需要用甘氨酸溶液、牛肉提取物、0.1 mol/L HNO₃ 和 0.1 mol/L NaOH 交替溶液或多磷酸钠等进行反冲洗^[23]。

Medema 等^[4]将样品以 4 654 *g* 离心 30 min,取 100~200 mL 上清液通过截留分子量为 100 kDa 的离心超滤器实现富集,对 F-特异性 RNA 噬菌体回收率达 73% \pm 50%。超滤法的回收率较高,但同时不确定度较高,其中超滤筒截留分子量、富集倍数以及超滤筒是否再生均会对新冠病毒回收率产生影响^[17],此外在预过滤步骤病毒也会通过范德华力或疏水键被吸附到离心过滤器,损失可高达 30%^[13]。研究^[10]表明,采用双重超滤法对新冠病毒富集效果更佳。《污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法标准》(WS/T 799—2022)中给出一次性超滤杯的截留分子量为 30 kDa,方法检出限为 100 copies/mL。

表 1 污水中 SARS-CoV-2 的代表性富集方法

Tab. 1 Details of Reported Concentration Methods of SARS-CoV-2 in Wastewater

序号	方法	步骤	回收率	阳性检出率 ^a	参考文献
1	膜吸附脱附	调 pH 值至 3.5~4, 0.45 μ m 电负性膜过滤, 8 000 r/min 搅拌 1.5 min	NG	11% (1/9)	[1]
2	膜吸附脱附	室温下 3 000 <i>g</i> 离心 10 min, 0.45 μ m 负电膜过滤	NG	43% (6/14)	[24]
3	膜吸附脱附	加入 AlCl ₃ , 0.45 μ m 电负性膜过滤, 磷酸盐缓冲液洗脱, 4 °C 20 000 <i>g</i> 离心 2 min	1.6%~17.1%	100%(16/16)	[17]
4	膜吸附脱附	加入 MgCl ₂ , 0.45 μ m 电负性膜过滤, 磷酸盐缓冲液洗脱, 4 °C 20 000 <i>g</i> 离心 2 min	0.7%~8.5%	100%(16/16)	[17]
5	絮凝沉淀+超速离心	0.2 μ m 膜过滤, PEG 8000 和 NaCl 室温振荡 15 min, 12 000 <i>g</i> 离心 2 h, 重分散	NG	71% (10/14)	[9]
6	絮凝沉淀+离心	加入 Al(OH) ₃ 溶液, 调 pH 值至 6, 室温下搅拌 15 min, 1 700 <i>g</i> 离心 20 min, 充分分散至牛肉提取物, 150 r/min 振荡 10 min, 1 900 <i>g</i> 离心 30 min, 重新分散	2.56%~18.78%	80% (12/15)	[25]
7	絮凝沉淀+离心	离心, PEG、葡萄糖 4 °C 下静置过夜, 提取 20 min, 2 000 <i>g</i> 离心 1 min	NG	50% (6/12)	[21]
8	絮凝沉淀+离心	加入 AlCl ₃ , 调节 pH 值至 6, 室温 150 r/min 振荡 15 min, 1 700 <i>g</i> 离心 20 min, 重分散于牛肉提取物, 150 r/min 振荡 10 min, 1 900 <i>g</i> 离心 30 min, 重分散	NG	100% (NG)	[2]

(续表1)

序号	方法	步骤	回收率	阳性检出率 ^a	参考文献
9	絮凝沉淀+离心	离心,4℃与PEG 6000和NaCl以100 r/min搅拌12 h,4℃下4 500~14 000 g离心45 min,重分散到磷酸盐缓冲液,0.22 μm膜过滤	NG	38% (10/26)	[20]
10	絮凝沉淀	4℃2 500 g离心30 min,加入PEG和NaCl混合15 min,4℃12 000 g离心120 min,4℃12 000 g离心5 min	NG	NG	[26]
11	絮凝沉淀	4℃2 500 g离心30 min,加入AlCl ₃ ,调节pH值至6,室温下150 r/min振荡15 min,4℃1 900 g离心5 min,加入乙二胺四乙酸二钠,60℃水浴10 min	NG	NG	[26]
12	絮凝沉淀	加入AlCl ₃ ,150 r/min搅拌30 min,2 000 g离心30 min	4.9%~14.8%	100%(16/16)	[17]
13	絮凝沉淀	加入PEG和NaCl,150 r/min搅拌30 min,2 000 g离心30 min	5.8%~23.6%	100%(16/16)	[17]
14	絮凝沉淀	加入MgCl ₂ ,150 r/min搅拌30 min,2 000 g离心30 min	6.1%~23.8%	100%(16/16)	[17]
15	超速离心	4℃下200 000 g离心1 h,重分散,过滤	NG	100%(23/23)	[22]
16	超速离心	4℃下150 000 g离心1 h,重分散	20.5%~33.4%	100%(16/16)	[17]
17	超速离心	加入蔗糖、Tris-HCl、NaCl和乙二胺四乙酸混合液,4℃150 000 g离心45 min	12%	70% (46/66)	[23]
18	超滤	0.45 μm膜过滤,100 kDa离心超滤	NG	100%(17/17)	[8]
19	超滤	4℃4 500 g离心15 min,10 kDa过滤	6.5%~17.5%	100(16/16)	[17]
20	超滤	4℃4 500 g离心15 min,30 kDa过滤	3.5%~13.0%	100%(16/16)	[17]
21	离心+超滤	4 654 g离心30 min,100 kDa过滤,1 500 g离心15 min	30.4%±22.3%	58% (14/24)	[4]
22	离心+超滤	4 750 g离心30 min,3 500 g离心过滤15 min(10 kDa),1 000 g离心2 min	NG	11% (1/9)	[1]

注:a 括号内数值为对应文献中给出的阳性样品量/样品总量,即阳性率计算来源;NG为对应数据未给出。

2 讨论与分析

由于新冠病毒极强的传染性等原因,针对其富集方法的研究还较为有限。但在过去几十年里,根据污水中不同病毒的分析需求,科学家们对富集方法进行了大量研究。通过对比分析和梳理总结,有望对研究新冠病毒提供有益参考。如表2所示,着重从回收率、耗时、准确性和成本等角度比较了不同富集方法的优缺点。值得说明的是,由于试验中污水样品(包括污水体积、基质、新冠病毒的浓度)、替代病毒的选择、仪器设备参数(如负电膜种类、尺寸、洗脱剂,沉淀剂种类、沉淀时间,离心速度、时间及截留分子量)等的区别,不同研究文献对各富集方法的评价存在一定差异。

2.1 回收率

不同富集方法回收率的差异主要来自于处理过程中目标物的损失以及检测时基质等成分对目标物响应的干扰等。大量研究^[27]表明,新冠病毒容易被

吸附到污水中悬浮颗粒物上,因此,预离心或预过滤步骤有可能导致病毒损失。膜吸附脱附法和超滤法的回收率较高^[27-28],但病毒与膜或设备之间的静电力、范德华力或疏水键等会引起病毒损失,使用惰性材料或优化洗脱剂会提高回收率^[29],不同病毒的生物性差异造成不同洗脱剂洗脱效率的差异^[30]。例如,被广泛应用于回收病毒的甘氨酸在其最佳碱性洗脱pH下会造成病毒失活,牛肉提取物能够在更温和的pH下洗脱,但其蛋白质成分会引起基质效应,造成整体回收率下降。在针对新冠病毒的研究中,大多数采用磷酸盐缓冲液洗脱,特别要注意氯仿等有机物可能会造成新冠病毒包膜的破坏^[31]。超速离心法无需引入牛肉提取物等干扰物^[32],还可以通过离心程序设置等去除样品中的一些干扰物^[33],但预离心步骤仍可能引起病毒损失。

絮凝沉淀法和超滤法对目标物缺乏特异性选择使得富集产物的基质较为复杂^[34]。Ikner等^[29]认

为,絮凝共沉淀物中的有毒物质可能导致细胞培养物中毒,且 PEG 存在反渗析和污染样品等情况。Barril 等^[27]采用类似于新冠病毒的猫杯状病毒(feline calicivirus, FCV)作为替代病毒,对比了包括絮凝沉淀、膜吸附脱附等在内的 11 种富集方法。结果表明,PEG 沉淀的平均回收率较高,而膜吸附脱附法对 FCV 病毒无效。这与 Ahmed 等^[15]以 MHV 为替代病毒的研究结果不一致。Barril 等^[27]认为除样品体积、污水杂质对滤孔堵塞以及基质效应外,病毒结构不同是造成回收率差异的主要原因。Zheng 等^[17]采用单因素方差分析法系统比对 8 种不同富集方法的 Ct 值平均值和回收率。其中超速离心法的回收率(25.4%±5.9%)明显高于其他方法,因此,适于快速灵敏地监测污水中新冠病毒。之后依次是絮凝沉淀法、超滤法和膜吸附脱附法。其中,絮凝沉淀法中不同沉淀剂(AlCl₃、MgCl₂和 PEG)的平均回收率也有显著差异,AlCl₃的可变性最低。因此,尽管回收率较低(11.0%±4.36%),但考虑到所需特殊设备较少,认为 AlCl₃沉淀为最优富集方法。

2.2 耗时

不同富集方法的机理决定其耗时存在显著差异,一般来说,超滤法和超速离心法的耗时明显短于膜吸附脱附法,特别是许多新型超滤的平均耗时仅有 10~15 min^[29],絮凝沉淀法耗时最长。但必须说明的是,同一方法也存在巨大差异,这不仅与资源配置或样品等存在密切关系,而且有时直接影响了回收率和灵敏度等。超滤法和超速离心法不需要洗脱或次级富集,还可以不调整 pH 或者添加阳离子^[29],大大减少了处理步骤,但不同设备最大离心速度差异对耗时和离心效果具有显著影响。在膜吸附脱附法和超滤法中,由于样品基质和进样体积的

不同、滤孔堵塞等问题,不可避免地影响方法耗时。为保证絮凝剂充分反应,絮凝沉淀法往往需要在加入絮凝剂后低速搅拌过夜,耗时长(长达 15 h 以上^[11])。Laturner 等^[12]认为沉淀时间缩短至 4 h 不降低回收率,甚至可进一步缩短沉淀时间,但对牛冠状病毒(BCoV)仅有 0.09%的回收率,确实低于其他一些报道。

2.3 成本

本文的成本主要考虑富集方法所需要的设备耗材等,而不包括与耗时相关的人力成本等。昂贵的离心机是富集成本的重要组成部分,膜吸附脱附法是唯一可不需要离心步骤的方法,但在过滤之前通过离心去除固体杂质可大大提高方法通量,且对定量结果无明显影响^[35],因此,也被多个课题组采用。就单个样品的耗材成本而言,目前最昂贵的方法是超滤,主要在于其过滤器价格昂贵且不可重复使用^[12,29]。出于类似的原因,PEG 絮凝沉淀法的成本也相对较高。将 0.22 μm 过滤器用于过滤装置有可能降低成本,但代价是潜在的装置污染风险或增加耗时以彻底清洗。采用膜吸附脱附法时,不同的滤膜价格成本也存在较大差异。报道称,正电膜 Virosorb 1MDS 和 NanoCeram 的售价分别为 250 美元和 50 美元,而负电膜则相对便宜得多^[29]。尽管超速离心设备较为昂贵,但由于容器可以重复使用,每个样品的材料成本较低^[29]。

2.4 通量

污水中病毒并非均匀分布,因此,样品体积会影响到富集方法的灵敏度、重复性和可变性。比如,随着污水样品体积的增加,所得浓缩物中病毒 RNA 的浓度液也会增加。通常来说,受仪器设备体积的限制,超速离心法和超滤法只能处理少量样品,更多应

表 2 富集方法对比

Tab. 2 Comparison of Concentration Methods

方法	优点	缺点	改进措施
膜吸附脱附 ^[1,29,34]	成本较低;膜孔径可调;通量大;可采样现场操作;膜便于存储、运输;常用于初级富集	回收率较低;负电膜需要预处理;共洗脱液基质复杂;洗脱剂对回收率影响大	复杂基质可预过滤;适当调节滤膜孔径;添加阳离子盐
絮凝沉淀 ^[2,20-21,29]	成本低;通量大;常用于初级富集	耗时长;共沉淀基质复杂	选择合适的絮凝剂
超速离心 ^[22,29,36]	回收率较高;可浓缩至小体积;容器可重复使用;无需预处理;常用于次级富集	耗时较长;设备昂贵;病毒易失活;通量小	提高离心速度
超滤 ^[4,8,29,37]	耗时短;可浓缩至小体积;常用于次级富集	设备昂贵;一般更适用于无机成分;目标物易被污泥吸附;不适用于取样现场	采用大截留分子量超滤筒避免堵塞

用于次级富集。相对而言,膜吸附脱附法和絮凝沉淀法可处理大体积的样品,因此,更适合于初级富集。但处理更大体积的样品也存在弊端,比如耗时相应增加。此外,以膜吸附脱附法为例,处理过程中滤膜的孔可能会被堵塞,或者吸附活性位点被占据,从而导致吸附效率降低,因此,样品体积也存在极限和最佳平衡值。事实上,滤孔被堵塞的问题也存在于超滤法中,使其通量同样受到限制。在 PEG 絮凝沉淀法中,增加样品体积则意味着需要更大体积容量和更效率的离心机,从而增加方法成本。

3 存在的主要问题

污水中新冠病毒富集方法的选择,需要从回收率、资源配置、成本、耗时以及试验目的等方面统筹考虑。当前有关研究报道缺乏可比性,尚不能形成完全令人信服的理论性指导方法,在富集方法的比较分析与选择以及实践应用上还存在不少问题。

3.1 替代病毒的选择

由于新冠病毒的高传染性,科学研究中经常采用替代病毒。目前,研究中常用的替代病毒种类繁多不利于梳理比较,且由于病毒之间结构差异等原因,各项评价结果并不能真实反映对新冠病毒的富集效率。比如辣椒轻斑驳病毒(PMMoV)和MHV被广泛作为新冠病毒的替代病毒,其回收率经常被用于评估污水富集效率,但其与新冠病毒RNA衰减率不同。这表明其作为新冠病毒在环境中存活率的替代标记物作用有限,而不同病毒的富集效率直接影响分析结果。Tanimoto等^[38]对污水的原液、固体和PEG沉淀样品中PMMoV和新冠病毒分别进行分析。就PMMoV的RNA拷贝数和回收率而言,PEG沉淀部分明显高于固体部分,但固体部分的新冠病毒RNA阳性率却明显高于PEG沉淀部分,许多最新研究也都证明了固相沉淀物对病毒,特别是对包膜病毒的吸附作用。高达26%的鼠肝炎病毒等包膜病毒存在于固相部分,而6%的MS2等未包膜病毒存在于废水样品中^[19]。Kitamura等^[28]发现在富集脊髓灰质炎病毒中有效的负电膜滤法、PEG沉淀法和超滤法,回收样品都来自于上清液,因此,对新冠病毒富集效率差强人意。用新冠病毒直接掺入更能代表新型冠状病毒污水监测中病毒富集方法的性能。然而,用于评价的加标灭活病毒同样不能完全反映新冠病毒在污水样品中的实际行为,这可能影

响病毒富集方法在实际应用中的性能。

3.2 污水样品的多变性

关于新冠病毒在污水中的存活时间、增殖和消亡规律等问题,相关研究还不够深入。事实上,温度、pH和拮抗微生物等环境因子不仅影响新冠病毒的存活,也会影响新冠病毒的检测^[39]。研究发现,新冠病毒在污水中的衰减具有较强温度依赖性,其结构完整性差且衰减较快^[40],长期储存在4℃或冷冻下平均含量可下降60%^[28]。当pH值>6时,RNA更容易发生碱性水解^[41]。Kitamura等^[28]认为负电膜滤法中酸性环境可能会破坏包膜病毒的完整性,从而降低回收率。污水中存在环境PCR抑制剂,在富集、检测过程中有可能导致抑制剂的共纯化和富集,从而影响qPCR检测。也有研究^[17]表明,增加样品体积并不能显著提高检测灵敏度,这可能是污水基质干扰了病毒RNA的提取与检测。目前许多研究并未考虑富集操作过程中污水基质、污水体积、污水中目标物浓度、富集环境条件等对富集效率的影响。事实上,不同污水样品的富集效率在同样富集方法下也存在较大变动,因此,需要不同采样点的污水在选择合适富集方法时需要重新考虑和评估。需要注意的是,由于污泥固体等对新冠病毒的吸附作用^[28,32,42],在采用污水进行疫情监测时,要特别注意污泥中病毒的检测,但污泥中的蛋白质、重金属等各种有机物和无机物,可能造成病毒失活或者对病毒检测造成基质干扰,而且新冠病毒在污泥中的稳定性尚未开展足够的研究^[18]。

3.3 RNA提取方法选择

回收率是对富集效率评价的一项重要指标,而这与新冠病毒RNA提取方法和基因靶的选择有着直接关联,如检出率和Ct值的差异可能来自于不同试剂盒的提取效率。Zheng等^[17]发现,尤其是在处理相对无颗粒的样品时,研究中所用的两种试剂盒病毒提取有着显著差异。

3.4 硬件设备

一方面,新冠病毒极强的传染性要求富集过程必须充分考虑安全性。一般地,直接处理新冠病毒样本至少需要在生物安全二级实验室环境下进行,同时采用不低于生物安全三级实验室的个人防护。另一方面,污水中的低载量使得对其分析检测限要求很高。一般而言,100 mL的污水足够大多数肠道病毒检测,但对于检测新冠病毒往往需要200 mL以

上,对于病例少的地区需要的污水量则更多。当富集污水量不够时,会导致样品低于分析检测限^[43],这在一定程度上限制了超滤法和超离心法等方法的应用。

4 结论与展望

目前,研究者已开发了多种方法应用于污水中新冠病毒的富集。相对而言,膜吸附脱附法和絮凝沉淀法成本低、耗时长,适用于大体积样品初级富集;超速离心法和超滤法成本高、耗时短,适用于小体积样品次级富集。通过优化过滤膜种类尺寸、阳离子、絮凝剂、离心速度和截留分子量等可进一步提高回收率等富集效果。

由于前期关于污水中新冠病毒富集的研究缺乏统一的实践规范,存在不同富集方法处理后检测结果不一致以及不同研究对富集方法效率的评价和解释矛盾等情况。为此,应组织有关权威部门和研究机构,建立统一的富集操作规范。例如,为解决基于污水分析的毒品滥用监测技术中不同方法所得结果无法系统比较的问题,经过近二十年发展,我国及欧盟等均建立了统一的操作规范,从而使该技术真正推向实战应用。目前,国家卫健委发布了《污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法标准》(WS/T 799—2022),有望首先将絮凝沉淀法与超滤法在污水中新冠病毒富集工作中推向实用。

不同的富集方法各有优缺点,在实际工作中,要结合各实验室和污水样品的具体情况进行选择。另外,可将多种方法同时应用于富集过程,充分发挥各富集方法的优点,从而保证试验更加高效、准确。例如,将通过膜吸附脱附法进行初级富集的污水样品,用较大体积洗脱剂进行洗脱后,再利用超速离心法进行次级富集,可有效提高回收率,同时解决超速离心不适用于大体积污水样品分析的问题。

除进一步优化富集方法之外,采用同位素内标、被动采样器、无需试剂盒的RNA提取方法、无需预处理的超快检测方法、生物传感器等也可以有效提高污水中新冠病毒的分析水平。

参考文献

[1] AHMED W, ANGEL N, EDSON J, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community [J]. *Science of the Total Environment*, 2020,

728: 138764. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138764.
[2] RANDAZZO W, TRUCHADO P, CUEVAS-FERRANDO E, et al. SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area [J]. *Water Research*, 2020, 181: 115942. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115942.
[3] LIU Y, NING Z, CHEN Y, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals [J]. *Nature*, 2020, 582 (7813): 557-560. DOI: 10.1038/s41586-020-2271-3.
[4] MEDEMA G, HEIJNEN L, ELSINGA G, et al. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in sewage and correlation with reported COVID-19 prevalence in the early stage of the epidemic in The Netherlands [J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2020, 7 (7): 511-516.
[5] KOCAMEMI B A, KURT H, HACIOGLU S, et al. First data-set on SARS-CoV-2 detection for Istanbul wastewaters in Turkey [J]. 2020; 20089417. DOI: 10.1101/2020.05.03.20089417.
[6] HATA A, HONDA R, HARA-YAMAMURA H, et al. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan by multiple molecular assays-implication for wastewater-based epidemiology (WBE) [J]. *MedRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.06.09.20126417.
[7] HOLSHUE M L, DEBOLT C, LINDQUIST S, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States [J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382 (10): 929-936.
[8] NEMUDRYI A, NEMUDRAIA A, WIEGAND T, et al. Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater [J]. *Cell Reports Medicine*, 2020, 1 (6): 100098. DOI: 10.1016/j.xcrm.2020.100098.
[9] WU F Q, XIAO A, ZHANG J, et al. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases [J]. *MedRxiv*, 2020, 5 (4). DOI: 10.1101/2020.06.15.20117747.
[10] KABDASLI I, TUNAY O. Concentration techniques tailored for the detection of SARS-CoV-2 genetic material in domestic wastewater and treatment plant sludge: A review [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, 9 (5): 106296. DOI: 10.1016/j.jece.2021.106296.
[11] CERVANTES-AVILES P, MORENO-ANDRADE I, CARRILLO-REYES J. Approaches applied to detect SARS-CoV-2 in wastewater and perspectives post-COVID-19 [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40: 101947. DOI: 10.1016/j.jwpe.2021.101947.
[12] LATURNER Z W, ZONG D M, KALVAPALLE P, et al. Evaluating recovery, cost, and throughput of different concentration methods for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology [J]. *Water Research*, 2021, 197: 117043. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117043.
[13] CALABRIA D A J, GAVAZZA S, LEAO T L, et al. SARS-CoV-2 sewage surveillance in low-income countries: Potential and challenges [J]. *Journal of Water and Health*, 2021, 19(1): 1-19.

- [14] GORBALENYA A E, BAKER S C, BARIC R S, et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 [J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(4): 536–544.
- [15] AHMED W, BERTSCH P M, BIVINS A, et al. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 739: 139960. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139960.
- [16] ALYGIZAKIS N, MARKOU A N, ROUSIS N I, et al. Analytical methodologies for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater: Protocols and future perspectives [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 134: 116125. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116125.
- [17] ZHENG X W, DENG Y, XU X Q, et al. Comparison of virus concentration methods and RNA extraction methods for SARS-CoV-2 wastewater surveillance [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 824: 153687. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153687.
- [18] GHOLIPOUR S, GHALHARI M R, NIKAEEN M, et al. Occurrence of viruses in sewage sludge: A systematic review [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 824: 153886. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153886.
- [19] YE Y, ELLENBERG R M, GRAHAM K E, et al. Survivability, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(10): 5077–5085.
- [20] BAR-OR I, YANIV K, SHAGAN M, et al. Regressing SARS-CoV-2 sewage measurements onto COVID-19 burden in the population: A proof-of-concept for quantitative environmental surveillance [J]. *Front Public Health*, 2021, 9: 5617. DOI: 10.3389/fpubh.2021.561710.
- [21] LA R G, IACONELLI M, MANCINI P, et al. First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 736: 139652. DOI: 10.1101/2020.04.25.20079830.
- [22] WURTZER S, MARECHAL V, MOUCHEL J M, et al. Evaluation of lockdown effect on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in waste water, greater Paris, France, 5 March to 23 April 2020 [J]. *Euro Surveillance*, 2020, 25(50). DOI: 10.2807/1560-7917. Es. 2020. 25. 2000776.
- [23] GREEN H, WILDER M, MIDDLETON F A, et al. Quantification of SARS-CoV-2 and cross-assembly phage (crAssphage) from wastewater to monitor coronavirus transmission within communities [J]. *MedRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.05.21.20109181.
- [24] THONGPRADIT S, PRASONGTANAKIJ S, SRISALA S, et al. A simple method to detect SARS-CoV-2 in wastewater at low virus concentration [J]. *Journal of Environmental and Public Health*, 2022: 4867626. DOI: 10.1155/2022/4867626.
- [25] RANDAZZO W, CUEVAS-FERRANDO E, SANJUÁN R, et al. Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 epidemiological surveillance [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2020, 230: 113621. DOI: 10.1016/j.ijheh.2020.113621.
- [26] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 污水中新型冠状病毒富集浓缩和核酸检测方法标准: WS/T 799—2022 [S]. 北京: 中国质量标准出版传媒有限公司, 2022. National Health Commission of the People's Republic of China. Method for enrichment and nucleic acid detection of SARS-CoV-2 in sewage: WS/T 799—2022 [S]. Beijing: China Quality and Standards Publishing & Media Co., Ltd., 2022.
- [27] BARRIL P A, PIANCIOLA L A, MAZZEO M, et al. Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 756: 144105. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144105.
- [28] KITAMURA K, SADAMASU K, MURAMATSU M, et al. Efficient detection of SARS-CoV-2 RNA in the solid fraction of wastewater [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 763: 144587. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144587.
- [29] IKNER L A, GERBA C P, BRIGHT K R. Concentration and recovery of viruses from water: A comprehensive review [J]. *Food and Environmental Virology*, 2012, 4(2): 41–67.
- [30] FARKAS K, PELLETT C, ALEX-SANDERS N, et al. Comparative assessment of filtration- and precipitation-based methods for the concentration of SARS-CoV-2 and other viruses from wastewater [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e01102–22. DOI: 10.1128/spectrum.01102–22.
- [31] SANGKHAM S. A review on detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in light of the current knowledge of treatment process for removal of viral fragments [J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 299: 113563. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113563.
- [32] PALMER E J, MAESTRE J P, JARMA D, et al. Development of a reproducible method for monitoring SARS-CoV-2 in wastewater [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 799: 149405. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149405.
- [33] PRADO T, FUMIAN T M, MANNARINO C F, et al. Preliminary results of SARS-CoV-2 detection in sewerage system in Niteroi municipality, Rio de Janeiro, Brazil [J]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2020, 115: e200196. DOI: 10.1590/0074-02760200196.
- [34] HARAMOTO E, MALLA B, THAKALI O, et al. First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan [J]. *MedRxiv*, 2020, 737: 140405. DOI: 10.1101/2020.06.04.20122747.

(下转第 127 页)

- LIAO Y, DU L, SONG S J, et al. Study on application of three-stage flow activated coke process in the upgrading of wastewater plant[J]. *Zhejiang Chemical Industry*, 2019, 50(9): 24–28.
- [23] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- Editorial Board of *Water and Wastewater Monitoring and Analysis Methods*, State Environmental Protection Administration. *Water and wastewater monitoring and analysis method* [M]. 4th ed. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [24] 国家市场监督管理总局. 煤质颗粒活性炭试验方法 第7部分: 碘吸附值的测定: GB/T 7702. 7—2023[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.
- State Administration for Market Regulation. *Test method for granular activated carbon from coal - Part 7: Determination of iodine number: GB/T 7702. 7—2023* [S]. Beijing: Standard Press of China, 2023.
- [25] 陆艳, 罗中秋, 周新涛, 等. 铜渣铁基类沸石地质聚合物吸附 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 性能及机理[J/OL]. *精细化工*, 1–15. [2023–11–16]. <https://doi.org/10.13550/j.jxhg.20230104>.
- LU Y, LUO Z Q, ZHOU X T, et al. Adsorption properties and mechanism of Pb^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} by iron base zeolite-like geopolymer derived from copper slag[J/OL]. *Fine Chemicals*, 1–15. [2023–11–16]. <https://doi.org/10.13550/j.jxhg.20230104>.
- [26] TIE J X, FANG X H, WANG X L, et al. Adsorptive removal of a reactive azo dye using polyaniline-intercalated bentonite[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2017, 26(3): 1259–1268.

(上接第 51 页)

- [35] PECSON B M, DARBY E, HAAS C N, et al. Reproducibility and sensitivity of 36 methods to quantify the SARS-CoV-2 genetic signal in raw wastewater: Findings from an interlaboratory methods evaluation in the U. S. [J]. *Environmental Science*, 2021, 7: 504–520. DOI: 10.1039/DOEW00946F.
- [36] PRATA C, RIBEIRO A, CUNHA Â, et al. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters; Virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(1): 64–70.
- [37] IKNER L A, SOTO-BELTRAN M, BRIGHT K R. New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for concentration of viruses from tap water [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2011, 77(10): 3500–3506.
- [38] TANIMOTO Y, ITO E, MIYAMOTO S, et al. SARS-CoV-2 RNA in wastewater was highly correlated with the number of COVID-19 cases during the fourth and fifth pandemic wave in Kobe City, Japan [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 892447. DOI: 10.3389/fmicb.2022.892447.
- [39] MANDAL P, GUPTA A K, DUBEY B K. A review on presence, survival, disinfection/removal methods of coronavirus in wastewater and progress of wastewater-based epidemiology [J]. *Journal Environmental Chemical Engineering*, 2020, 8(5): 104317. DOI: 10.1016/j.jece.2020.104317.
- [40] YANG S, DONG Q, LI S, et al. Persistence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater after the end of the COVID-19 epidemics [J]. *Journal of Hazardous materials*, 2022, 429: 128358. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.128358.
- [41] WOZNAK A, CERDA A, IBARRA-HENRÍQUEZ C, et al. A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 16608. DOI: 10.1038/s41598-020-73616-w.
- [42] PECCIA J, ZULLI A, BRACKNEY D E, et al. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(10): 1164–1167.
- [43] CUEVAS-FERRANDO E, PÉREZ-CATALUÑA A, ALLENDE A, et al. Recovering coronavirus from large volumes of water [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 762: 143101. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143101.