

# 两种水源性诺如病毒富集方法的比较

冯微宏<sup>1,2</sup>, 肖勇<sup>2</sup>, 钱燕华<sup>2</sup>, 许秋瑾<sup>1,3\*</sup>

1.南京医科大学公共卫生学院全球健康中心, 江苏 南京 211166  
2.无锡市疾病预防控制中心, 江苏 无锡 214023  
3.中国环境科学研究院, 环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012

**摘要:** 评估阳离子膜吸附-洗脱法和阴离子膜吸附-洗脱法在富集水源性诺如病毒(NV)过程中的病毒回收效果、消耗时间及使用成本, 可以获得更适用于水源性诺如病毒实际监测工作的较优富集方法. 以无锡市疾病预防控制中心保存的诺如病毒阳性标准质粒为模板, 采用荧光定量 RT-PCR(反转录酶-聚合酶链反应)方法绘制病毒定量标准曲线, 并应用于病毒的绝对定量. 将含诺如病毒的粪便悬液先稀释成3个不同浓度, 并加入灭菌水中, 分别经过阴离子膜(硝酸纤维素滤膜)或阳离子膜(Nanoceram膜)吸附洗脱, 最终相同体积洗脱液提取核酸后用荧光定量 RT-PCR方法进行绝对定量, 并进一步计算最终病毒回收率. 结果表明: ①样本病毒浓度为 $8 \times 10^1 \sim 8 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ 时, 病毒拷贝数的lg对数值与 $C_t$ (荧光定量PCR中达到设定阈值所经过的循环数)呈线性关系. ②随着样本病毒浓度的增加, 阴离子膜法和阳离子膜法的病毒回收率都相应增加. ③当检测样本中病毒浓度分别为 $8 \times 10^1$ 、 $4 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 时, 阴离子膜法回收率分别为 $22.2\% \pm 4.1\%$ 和 $36.8\% \pm 6.2\%$ , 阳离子膜法回收率分别为 $17.4\% \pm 1.5\%$ 和 $28.8\% \pm 6.1\%$ , 说明阴离子膜吸附-洗脱法对病毒的富集回收率显著高于阳离子膜吸附-洗脱法( $P < 0.05$ ). 研究显示, 综合富集效果、耗费时间和成本等因素, 阴离子膜吸附-洗脱法比阳离子膜吸附-洗脱法更适用于日常水源性诺如病毒的富集工作.

**关键词:** 诺如病毒; 阴离子膜; 阳离子膜; 病毒富集

中图分类号: X52; R123

文章编号: 1001-6929(2020)06-1549-06

文献标志码: A

DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2020.05.04

## Comparison of Two Concentration Methods for Norovirus in Water

FENG Weihong<sup>1,2</sup>, XIAO Yong<sup>2</sup>, QIAN Yanhua<sup>2</sup>, XU Qiujin<sup>1,3\*</sup>

1.Center for Global Health, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China  
2.Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214023, China  
3.State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

**Abstract:** In order to obtain a more suitable enrichment method for practical work, the recovery rate, consumption time and use-cost of norovirus concentration methods using electropositive membrane and electronegative membrane were compared. Using the norovirus-positive standard plasmid in Wuxi City Center for Disease Control and Prevention as a template, a standard curve of virus quantification was drawn by RT-PCR. Feces suspensions with three different diluted concentrations were added into sterilized water, and then filtered through a electronegative membrane (nitrocellulose membrane) or a electropositive membrane (Nanoceram membrane). After enrichment, RNA was extracted from the concentrates with the same volume and subjected to fluorescent quantitative RT-PCR. The standard curve of NV was generated by RT-PCR, and the virus recovery rates were calculated according to the standard curve and compared statistically. The results showed that when the sample virus concentration was  $8 \times 10^1 \sim 8 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ , the log value of the virus copy number was linearly related to the  $C_t$  (the  $C_t$  is defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold). With the increase of sample virus concentration, the virus recovery rate of the concentration methods using electronegative membrane or electropositive membrane increased correspondingly. When the virus concentration was  $8 \times 10^1$  and  $4 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ , the recovery rates of concentration methods using electronegative membrane were  $22.2\% \pm 4.1\%$  and  $36.8\% \pm 6.2\%$ , respectively, which were statistically higher than the recovery rates when electropositive membrane was applied ( $17.4\% \pm 1.5\%$  and  $28.8\% \pm 6.1\%$ ) ( $P < 0.05$ ). In this study, considering the recovery rate, consumption time and use-cost, the electronegative membrane adsorption elution method is more suitable for daily enrichment of

收稿日期: 2019-12-25 修订日期: 2020-04-11

作者简介: 冯微宏(1973-),男,江苏无锡人,副研究员,博士,主要从事腹泻病毒病原生物学研究, peter\_great@163.com.

\* 责任作者, 许秋瑾(1970-),女,江苏无锡人,研究员,博士,主要从事湖泊生态学、环境毒理与风险评估研究, xujq@craes.org.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.41673122)

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.41673122)

water-borne norovirus than the electropositive membrane adsorption elution method.

**Keywords:** norovirus; electropositive membrane; electronegative membrane; virus concentration

诺如病毒是一种重要的水传播病毒,被认为是最常见的急性胃肠炎的病原学病毒<sup>[1-3]</sup>. 诺如病毒是无包裹的单股正链 RNA 病毒,其基因组可以分成 3 个开放阅读框(ORF). 基于其衣壳蛋白核酸序列的不同,诺如病毒可以分为 5 个不同的基因型(G I~G V),其中 G I 型和 G II 型通常感染人类,而且这两型可进一步细分为至少 31 个不同的基因亚型<sup>[4]</sup>. 诺如病毒主要通过食物、水和人传人 3 种途径传播<sup>[5-6]</sup>,人传人可以借由直接接触患者或吸入患者呕吐物的气溶胶两种途径而感染<sup>[7]</sup>.

自 1992 年诺如病毒全基因组序列被解析以来,虽然诺如病毒的分子检测方法已经改进了很多,但水中诺如病毒的检测始终是个难点,成为诺如病毒暴发疫情溯源的瓶颈. 自然水体中诺如病毒检测困难,主要原因是:①目前,诺如病毒还不能进行体外培养. ②原始水样中病毒含量很低,低于常规荧光定量 RT-PCR (反转录酶-聚合酶链反应)方法的检测下限. ③水中存在一些抑制 RT-PCR 的物质<sup>[8-9]</sup>. 目前最广泛使用的水体中诺如病毒的富集方法是病毒吸附-洗脱(VIRADEL)法,其可以分为阴离子膜吸附-洗脱法和阳离子膜吸附-洗脱法<sup>[10-11]</sup>. 这两种方法针对不同病毒的回收效果及使用成本等方面有差异,为找到一个各方面更适用于日常水体中诺如病毒富集的吸附-洗脱方法,该研究模拟比较了这两种方法对水体中诺如病毒的回收效果、富集消耗时间、适用场景及使用成本的差异,旨在优选水源性诺如病毒富集方法,为水源水、饮用水以及自然景观水体(如湖滨浴场)中诺如病毒的常规监测贮备检测技术和方法.

## 1 材料与方 法

### 1.1 G II 型诺如病毒标本液的制备

取 1 mL 由无锡疾病预防控制中心微生物检验部实验室检出的 G II 型诺如病毒阳性的粪便标本,加到 10 mL 灭菌水中,充分振荡混匀后,以 4 000×g 离心 5 min,取上清液通过 0.45 μm 针头式过滤器过滤,再用 PBS (磷酸缓冲盐溶液)稀释后,分装成每管 1.0 mL,作为原始病毒标本液,并于 -80 °C 下保存备用.

### 1.2 试剂与仪器

One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 购自宝日生物科技(北京)有限公司(货号:RR064a);RNA 提取试剂盒 Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司(货号:52906);含有 G II 型诺如病毒

特征性片段的质粒由无锡疾病预防控制中心微生物检验部构建,构建步骤参考文献[12];UNIQ-200 柱式质粒 DNA 中量抽提试剂盒购自上海生工生物技术有限公司(货号:B511241);DH5α 感受态细菌购自上海生工生物技术有限公司(货号:B528413);ABI 7500 Fast 型实时荧光 PCR 仪购自美国 ABI 公司;0.45 μm 硝酸纤维素滤膜(直径 14.2 cm)购自美国 Millipore 公司(货号:HAWP14250);0.45 μm 针头式过滤器购自上海生工生物有限公司(货号:F513143-0001);HE120 型水平式核酸电泳仪购自上海天能科技有限公司;Centrifuge 5417R 高速冷冻离心机(货号:5407000368)和 Eppendorf Bio Photometer Plus 核酸蛋白测定仪(货号:10021)购自德国 Eppendorf 公司;Gel Doc XR+ 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司(货号:5838);WT600-2J 型精密蠕动泵及配套硅胶软管购自保定兰格恒流泵有限公司;PurLVs™ 真空抽滤系统购自北京卓诚惠生生物技术有限公司;NanoCeram 滤器购自美国 Argonide 公司;Centricon Plus-70 超滤管购自美国 Millipore 公司(货号:C3043).

### 1.3 引物探针

根据 Trujillo 等<sup>[13]</sup>的研究,合成引物探针,用于荧光定量 PCR 检测 G II 型诺如病毒和含有 G II 型诺如病毒特异性片段的标准质粒. 引物探针由上海生工生物科技公司合成. 荧光定量 RT-PCR 所用引物和探针序列见表 1.

表 1 荧光定量 RT-PCR 所用引物及探针序列

Table 1 Primers and probe sequences used in fluorescence RT-PCR

引物及探针名称	引物及探针序列(5'-3')
Cog 2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG
Cog 2R	TGC ACG CCA TCT TCA TTC ACA
Ring 2	JOE-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-BHQ**

注: \*\* 表示 G II TaqMan® 探针;5'端用 JOE 荧光素标记,3'端用 BHQ 淬灭基团标记.

### 1.4 RNA 提取及荧光定量 PCR 检测

RNA 提取按照 Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒操作说明书进行. RNA 提取完成后进行荧光定量 RT-PCR 检测. 荧光定量 RT-PCR 检测通过 ABI 7500Fast 型实时荧光 PCR 仪完成. 反应体系: 2×Quantitech probe RT-PCR Master Mix 12.5 μL、Cog 2F (10 μmol/L) 1 μL、Cog2R (10 μmol/L) 1 μL、

Ring 2 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、Quantitech RT Mix 0.25  $\mu\text{L}$ 、Rnase-free  $\text{H}_2\text{O}$  7.25  $\mu\text{L}$  和模板 RNA 2.5  $\mu\text{L}$ . 反应参数: 50  $^\circ\text{C}$  30 min, 95  $^\circ\text{C}$  15 min, 94  $^\circ\text{C}$  15 s, 60  $^\circ\text{C}$  60 s, 共 40 个循环, 60  $^\circ\text{C}$  收集荧光信号.

### 1.5 病毒浓度及 $C_i$ 值计算

将含 G II 型诺如病毒特异性扩增片段的质粒转化到 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 经培养扩增后, 使用 UNIQ-200 柱式质粒 DNA 中量抽提试剂盒抽提质粒, 采用 Eppendorf Bio Photometer Plus 核酸蛋白测定仪测定浓度, 质粒拷贝数根据质粒分子量及阿伏伽德罗常数 ( $N_A$ ) 进行计算, 计算公式:

$$C_{\text{dsDNA}} = 50 \times \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Dr} \quad (1)$$

$$\text{CN}_{\text{plasmid}} = C_{\text{dsDNA}} / \text{Mr}_{\text{plasmid}} \times N_A \quad (2)$$

式中:  $C_{\text{dsDNA}}$  为双链 DNA (dsDNA) 的浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  为 dsDNA 在 260 nm 紫外波长下的吸光度 (1 个吸光度值相当于 50  $\mu\text{g/mL}$  的双链 DNA); Dr 为 dsDNA 的稀释倍数;  $\text{CN}_{\text{plasmid}}$  为质粒 (plasmid) 的拷贝数浓度, copies/L;  $\text{Mr}_{\text{plasmid}}$  为质粒的相对分子质量, g/mol;  $N_A$  为阿伏伽德罗常数, 取值为  $6.02 \times 10^{23}$  copies/mol.

将原始质粒浓度 [通过式 (1) (2) 计算得到] 稀释至  $8 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ , 再将其进行 10 倍逐级稀释为 9 个浓度 (分别为  $8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^7$ 、 $8 \times 10^6$ 、 $8 \times 10^5$ 、 $8 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^3$ 、 $8 \times 10^2$ 、 $8 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ); 用荧光定量 PCR 分别测得不同浓度下的  $C_i$  (荧光定量 PCR 中达到设定阈值所经过的循环数), 并重复 3 次. 取荧光扩增曲线  $C_i$  平均值和对应拷贝数的 lg 对数平均值绘制标准曲线, 用荧光定量 RT-PCR 检测保存的诺如病毒悬液, 根据标准曲线算出所含诺如病毒的拷贝数.

### 1.6 阴离子膜吸附-洗脱法

取 0.1、1、5 mL 病毒原液, 加入到 1 L 灭菌水中, 加入 50 mL 2 mol/L 的  $\text{MgCl}_2$  溶液, 使  $\text{Mg}^{2+}$  最终浓度为 0.1 mol/L, 充分搅拌混合均匀; 采用真空抽滤使水样以 0.1 L/min 的速率通过孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  的硝酸纤维素滤膜; 将膜浸入 pH 为 3.5 的盐酸溶液中, 5 min 后取 1/4 大小的膜剪碎 (最后病毒量换算时再乘以 4), 用 1 mL Tr alk 洗脱液 (0.05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 mol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 9.2) 4  $^\circ\text{C}$  浸泡过夜洗脱, 取 200  $\mu\text{L}$  洗脱液提取 RNA, 用荧光定量 PCR 进行检测. 试验重复 3 次, 阴性对照使用 1 L 无病毒的无菌水, 在核酸提取中加入阳性质粒作为阳性对照.

### 1.7 阳离子膜吸附-洗脱法

取 0.1、1、5 mL 病毒原液, 加入到 1 L 灭菌水中, 加入 50 mL 浓度为 2 mol/L 的  $\text{MgCl}_2$  溶液, 使  $\text{Mg}^{2+}$  最终浓度为 0.1 mol/L, 充分搅拌混合均匀; 以 0.1 L/min 的速率通过 Nanoceram 滤器, 过滤完成后将 Nanoceram 滤膜浸泡于 200 mL TGBE 洗脱液 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.05 mol/L 甘氨酸, 3% beef extract, pH 为 9.5) 中, 4  $^\circ\text{C}$  浸泡过夜洗脱, 洗脱液接着用 Centricon plus-70 超滤管以 3 000 $\times g$  离心 30 min 浓缩至 1 mL, 取 200  $\mu\text{L}$  洗脱液提取 RNA, 用荧光定量 PCR 进行检测. 试验重复 3 次, 阴性对照使用 1 L 无病毒的无菌水, 在核酸提取中加入阳性质粒作为阳性对照.

### 1.8 病毒回收率计算

病毒回收率计算公式:

$$\text{Recovery} = \text{CN}_{\text{recovered sample}} / \text{CN}_{\text{unseeded sample}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: Recovery 为病毒回收率, %;  $\text{CN}_{\text{recovered sample}}$  为富集后病毒浓缩液中的病毒拷贝数浓度, copies/L;  $\text{CN}_{\text{unseeded sample}}$  为富集前病毒原液中的病毒拷贝数浓度, copies/L.

### 1.9 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件对数据进行整理和统计学分析. 病毒回收率和病毒浓度符合正态分布, 采用平均值 $\pm$ 标准差表示. 以病毒拷贝数的 lg 对数值为横坐标, 以  $C_i$  为纵坐标, 建立标准曲线, 并计算  $R^2$ . 使用方差分析比较阴离子膜吸附-洗脱法和阳离子膜吸附-洗脱法两种方法所得回收率的差异, 如  $P < 0.05$  认为有统计学意义.

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒拷贝数对数值与 $C_i$ 呈线性关系

10 倍梯度稀释后的 G II 型诺如病毒质粒标准品在 PCR 扩增时呈现典型 S 型曲线, 通过计算分析可得, 在  $8 \times 10^1 \sim 8 \times 10^{10}$  copies/ $\mu\text{L}$  时, 标准曲线图见图 1. 病毒拷贝数对数值 lg ( $x$ ) 与  $C_i$  ( $y$ ) 关系为  $y = -3.5678x + 47.638$  ( $R^2 = 0.9976$ ,  $P < 0.001$ ), 其可用于诺如病毒拷贝数的绝对定量. 病毒标本液提取核

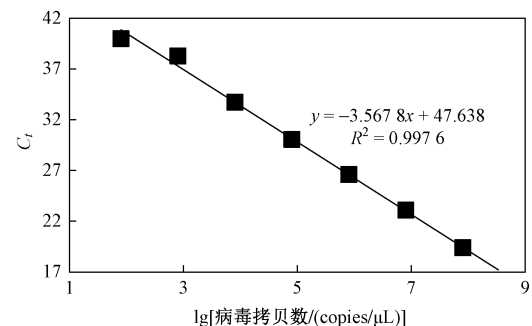


图 1 病毒绝对定量标准曲线

Fig.1 Standard curve of absolute virus quantification



酸后用荧光定量 PCR 检测获得其  $C_i$ , 并通过上述标准曲线计算出病毒拷贝数浓度为  $7.1 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ , 为便于计算, 用灭菌蒸馏水稀释至  $8 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ , 作为试验中病毒原液使用。

## 2.2 两种不同方法的回收率

随着模拟水样中病毒浓度的降低, 两种方法的回收率都相应降低。当原始模拟水样中病毒浓度为 8 copies/ $\mu\text{L}$  时, 无论使用阴离子膜吸附-洗脱法还是阳离子膜吸附-洗脱法, 3 次重复试验都没有检测到病毒, 而当原始模拟水样中病毒浓度为 80、400 copies/ $\mu\text{L}$  时, 阴离子膜吸附-洗脱法回收率分别为  $22.2\% \pm 4.1\%$  和  $36.8\% \pm 6.2\%$ ; 阳离子膜吸附-洗脱法回收率为  $17.4\% \pm 1.47\%$  和  $28.8\% \pm 6.1\%$  (见表 2)。综上所述, 阴离子膜吸附-洗脱法病毒回收率高于阳离子膜吸附-洗脱法 ( $P < 0.05$ )。

表 2 两种水源性诺如病毒富集方法的回收率比较

Table 2 Comparison of recovery effects of two norovirus enrichment methods

富集方法	富集前 病毒浓度/ (copies/ $\mu\text{L}$ )	$C_i$	富集后 病毒浓度/ (copies/ $\mu\text{L}$ )	病毒回 收率/%
阴离子 膜法	8	>45.0	—	—
	80	$21.8 \pm 3.5$	$17.8 \pm 3.3$	$22.2 \pm 4.1$
	400	$18.5 \pm 3.0$	$147.2 \pm 24.8$	$36.8 \pm 6.2$
阳离子 膜法	8	>45.0	—	—
	80	$22.1 \pm 2.0$	$13.9 \pm 1.2$	$17.4 \pm 1.5$
	400	$18.9 \pm 2.1$	$115.2 \pm 21.4$	$28.8 \pm 6.1$

## 3 讨论

诺如病毒以高浓度存在于隐形感染者, 即无典型症状感染者的粪便中, 并主要通过粪口途径污染食物和水<sup>[14]</sup>。水体中诺如病毒的检测已成为水源性诺如病毒暴发疫情的关键溯源手段<sup>[15]</sup>。迄今为止, 已有许多研究关注于各种类型水环境, 如未经处理的废水、地表水、地下水、海水、甚至饮用水中诺如病毒的检测<sup>[10, 16-17]</sup>。由于在水体中诺如病毒浓度极低, 所以在荧光定量 PCR 检测之前水体的富集浓缩成为必不可少的步骤。之前很多研究使用了两级, 即初级浓缩和次级浓缩的病毒富集法, 其中 VIRADEL 法是初级浓缩中常用的方法, 而超滤法和聚乙二醇 (PEG) 絮凝法是次级浓缩中常用的方法<sup>[10, 18]</sup>。VIRADEL 法基本过程是先使含有病毒的水体通过吸附性滤器, 使病毒吸附在多孔滤膜上, 再使用缓冲液从滤膜上洗脱病毒。VIRADEL 法中最常使用两种滤膜, 即阴离子膜和

阳离子膜, 因而 VIRADEL 法又可分为阴离子膜吸附-洗脱法和阳离子膜吸附-洗脱法。阴离子膜最常用的是硝酸纤维素膜, 阳离子膜常用的包括 1MDS 膜<sup>[19]</sup>和 Nanoceram 膜<sup>[20]</sup>。1MDS 阳离子膜是美国环境保护局 (US EPA) 推荐用于富集水中肠道病毒的滤膜<sup>[21]</sup>, 但是 1MDS 价格非常昂贵<sup>[22-23]</sup>, 而美国 Argonide 公司生产的由纳米氧化铝纤维组成的 NanoCeram 膜比 1MDS 膜便宜很多, 而且在与 1MDS 膜的比较研究中发现其对自来水和河水中的肠道病毒的回收率高于 1MDS 膜<sup>[20, 24]</sup>。而硝酸纤维素膜的价格更为便宜, 其只相当于 Nanoceram 膜价格的 1/8, 从使用成本上看阴离子膜吸附-洗脱法要比阳离子膜吸附-洗脱法便宜很多。

从洗脱过程来比较, 对于阴离子膜吸附-洗脱法而言, 在浓缩之前, 需要添加阳离子盐 (如  $\text{MgCl}_2$  或  $\text{AlCl}_3$ ) 来促进带负电的病毒与膜的结合<sup>[25]</sup>, 在洗脱之前需要再用酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  或  $\text{HCl}$ ) 洗去膜上吸附的阳离子 ( $\text{Mg}^{2+}$  或  $\text{Al}^{3+}$ ) 以提高病毒回收率<sup>[26]</sup>, 该研究中加入的阳离子选用  $\text{MgCl}_2$  而不选用  $\text{AlCl}_3$  的理由, 在于有研究<sup>[27]</sup>发现随着水样体积的增加, 添加  $\text{AlCl}_3$  后水中病毒的回收率急剧下降, 而添加  $\text{MgCl}_2$  后病毒的回收率仍然保持稳定。对阳离子膜吸附-洗脱法而言, 在浓缩过程中无需加盐或酸化, 但阴离子膜吸附-洗脱法在初级浓缩后, 洗脱液体积可以小至 1 mL, 无需再进行次级浓缩而可以直接抽提核酸, 相反阳离子膜吸附-洗脱法在初级浓缩后, 洗脱体积仍为 200~300 mL, 为达到 1 mL 最终体积 (保证两种方法最终洗脱液体积相同), 仍需要进行次级浓缩, PEG 沉淀和超滤都是可选的方案<sup>[17, 28-29]</sup>, 但使用超滤法更合适, 因为 PEG 沉淀需要 4 °C 搅拌过夜再离心取沉淀溶解, 而超滤只需离心 30 min 即可完成使得最终洗脱液体积在 1 mL 之内<sup>[30-32]</sup>, 另外 PEG 中存在一些会抑制 RT-PCR 的物质<sup>[33]</sup>。总体而言, 阳离子膜吸附-洗脱法比阴离子膜吸附-洗脱法消耗时间更长, 另外在次级浓缩中阳离子膜吸附-洗脱法需要用到超滤管和低速离心机, 这无形增加了很多使用成本。

洗脱液的选择方面, De-Keuckelaere 等<sup>[34]</sup>研究发现, Tr alk 洗脱液 (磷酸盐洗脱液) 用来洗脱阴离子膜所得的病毒回收率较高, 而 TGBE 用于洗脱阳离子膜所得的病毒回收率较高。该研究结果显示, 阴离子膜吸附-洗脱法的回收率总体稍高于阳离子膜吸附-洗脱法, 与 De-Keuckelaere 等<sup>[34]</sup>研究结果一致。De-Keuckelaere 等<sup>[34]</sup>研究发现, 使用阴离子膜吸附-洗脱法的鼠诺如病毒 (MNV-1) 的回收率 (平均为

21.87%)要远高于阳离子膜吸附-洗脱法(1MDS膜),其回收率平均仅为1.63%,而该研究显示阳离子膜吸附-洗脱法的病毒回收率要远高于De-Keuckelaere等<sup>[34]</sup>的研究,原因可能是:①鼠诺如病毒和人诺如病毒的带电特性差异较大;②Nanoceram膜的病毒回收率要高于1MDS膜<sup>[24]</sup>。

从使用场景来比较,对阴离子膜吸附-洗脱法而言,需要事先在水体中加入阳离子( $Mg^{2+}$ ),很难进行现场处理,而阳离子膜吸附-洗脱法无需对水体进行任何处理,可适用于现场采样处理,但阳离子膜吸附-洗脱法相比阴离子膜吸附-洗脱法要多一个次级浓缩的步骤,这一过程在采样现场无法完成,所以总体而言二者都更适用于实验室操作。综合富集效果、操作步骤和检测成本方面的考量,阴离子膜更适用于实际检测工作中水体的人诺如病毒富集。此次方法学研究的结果,将在自然环境水体中诺如病毒的监测和研究中开展进一步的验证和不断改进。

#### 4 结论

a) 从富集效果来比较,阴离子膜吸附-洗脱法回收率分别为 $22.2\% \pm 4.1\%$ 和 $36.8\% \pm 6.2\%$ ,阳离子膜吸附-洗脱法回收率分别为 $17.4\% \pm 1.5\%$ 和 $28.8\% \pm 6.1\%$ ,说明前者对病毒的富集回收率显著高于后者( $P < 0.05$ )。

b) 从操作步骤来比较,阴离子膜吸附-洗脱法比阳离子膜吸附-洗脱法更简便,耗时更短。

c) 从成本来比较,阴离子膜吸附-洗脱法总体比阳离子膜吸附-洗脱法低很多。

d) 综合富集效果、耗费时间和成本等因素,阴离子膜吸附-洗脱法比阳离子膜吸附-洗脱法更适用于常规水体监测中水源性诺如病毒的富集。

#### 参考文献(References):

- [ 1 ] HEDBERG C. Food-related illness and death in the United States [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5(6): 840-842.
- [ 2 ] KIM S H, CHEON D S, KIM J H, *et al.* Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(9): 4836-4839.
- [ 3 ] GODOY P, NUIN C, ALSEDA M, *et al.* Waterborne outbreak of gastroenteritis caused by Norovirus transmitted through drinking water [J]. *Revista Clinica Espanola*, 2006, 206(9): 435-437.
- [ 4 ] HILL V R, POLACZYK A L, HAHN D, *et al.* Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6878-6884.
- [ 5 ] WEBBY R J, CARVILLE K S, KIRK M D, *et al.* Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44(8): 1026-1031.
- [ 6 ] O'REILLY C E, BOWEN A B, PEREZ N E, *et al.* A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004 [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44(4): 506-512.
- [ 7 ] MARKS P J, VIPOND I B, REGAN F M, *et al.* A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission [J]. *Epidemiology and Infection*, 2003, 131(1): 727-736.
- [ 8 ] LEE H, KIM M, PAIK S Y, *et al.* Evaluation of electropositive filtration for recovering norovirus in water [J]. *Journal of Water and Health*, 2011, 9(1): 27-36.
- [ 9 ] KIM M, KO G. Quantitative characterization of the inhibitory effects of salt, humic acid, and heavy metals on the recovery of waterborne norovirus by electropositive filters [J]. *Journal of Water and Health*, 2013, 11(4): 613-622.
- [ 10 ] 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.
- [ 11 ] DELGADO-GARDEA M C E, TAMEZ-GUERRA P, GOMEZ-FLORES R, *et al.* Prevalence of rotavirus genogroup A and norovirus genogroup II in bassaseachic falls national park surface waters in Chihuahua, Mexico [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(5): 1342-1352.
- [ 12 ] 冯微宏,肖勇. 水体中诺如病毒富集技术的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(20): 3419-3422.
- [ 13 ] TRUJILLO A A, MCCAUSTLAND K A, ZHENG D P, *et al.* Use of Taq Man real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(4): 1405-1412.
- [ 14 ] WYN-JONES A P, SELLWOOD J. Enteric viruses in the aquatic environment [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 91(6): 945-962.
- [ 15 ] RODRIGUEZ R A, GUNDY P M, RIJAL G K, *et al.* The impact of combined sewage overflows on the viral contamination of receiving waters [J]. *Food and Environmental Virology*, 2012, 4(1): 34-40.
- [ 16 ] HARAMOTO E, KITAJIMA M, HATA A, *et al.* A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water [J]. *Water Research*, 2018, 135(3): 168-186.
- [ 17 ] 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(3): 1033-1039.
- [ 18 ] CASHDOLLAR J L, WYMER L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(1): 1-11.
- [ 19 ] CASHDOLLAR J L, BRINKMAN N E, GRIFFIN S M, *et al.* Development and evaluation of EPA method 1615 for detection of enterovirus and norovirus in water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(1): 215-223.

- [20] KARIM M R, RHODES E R, BRINKMAN N, *et al.* New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(8): 2393-2399.
- [21] POLACZYK A L, ROBERTS J M, HILL V R. Evaluation of 1MDS electropositive microfilters for simultaneous recovery of multiple microbe classes from tap water [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 68(2): 260-266.
- [22] FRANCY D S, STELZER E A, BRADY A M, *et al.* Comparison of filters for concentrating microbial indicators and pathogens in lake water samples [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(4): 1342-1352.
- [23] CASHDOLLAR J L, DAHLING D R. Evaluation of a method to re-use electropositive cartridge filters for concentrating viruses from tap and river water [J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 132(1/2): 13-17.
- [24] BENNETT H B, O'DELL H D, NORTON G, *et al.* Evaluation of a novel electropositive filter for the concentration of viruses from diverse water matrices [J]. *Water Science and Technology*, 2010, 61(2): 317-322.
- [25] WALLIS C, MELNICK J L. Concentration of enteroviruses on membrane filters [J]. *Journal of Virology*, 1967, 1(3): 472-477.
- [26] 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(3): 1033-1039.
- [27] HATA A, MATSUMORI K, KITAJIMA M, *et al.* Concentration of enteric viruses in large volumes of water using a cartridge-type mixed cellulose ester membrane [J]. *Food and Environmental Virology*, 2015, 7(1): 7-13.
- [28] 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 Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3500-3506.
- [29] EL-SENOUSY W M, COSTAFREDA M I, PINTO R M, *et al.* Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 167(1): 74-79.
- [30] GRONDAHL-ROSADO R C, YAROVITSYNA E, TRETENES E, *et al.* A one year study on the concentrations of norovirus and enteric adenoviruses in wastewater and a surface drinking water source in Norway [J]. *Food and Environmental Virology*, 2014, 6(4): 232-245.
- [31] BAERT L, UYTENDAELE M, DEBEVERE J. Evaluation of two viral extraction methods for the detection of human noroviruses in shellfish with conventional and real-time reverse transcriptase PCR [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44(1): 106-111.
- [32] YUAN T, ZHAO C, WANG Z, *et al.* A consecutive centrifugal method for concentration of human enteric viruses in water samples [J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(12): 3323-3330.
- [33] ABBASZADEGAN M, HUBER M S, GERBA C P, *et al.* Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(5): 1318-1324.
- [34] DE-KEUCKELAERE A, BAERT L, DUARTE A, *et al.* Evaluation of viral concentration methods from irrigation and processing water [J]. *Journal of Virological Methods*, 2013, 187(2): 294-303.

(责任编辑:张蕊)