文章编号: 1001-0580(2009)11-1287-03　中图分类号: R 123　文献标志码: A　【专题报道之一】

水体中病毒富集方法研究进展*

王四全,吴俊,曹玉广

关键词: 水体;病毒;富集方法

近年来,由于水污染的加剧,在多种水体中均发现了致病病毒。水传播病毒导致人体感染的病例时有报道,已经引起了人们的广泛关注[1-2]。对水体中的病毒进行快速有效的检测,是阻断病原体传播,减少疾病流行的首要条件。水体中的病毒含量较少,浓度较低,一般很难直接检测,常需要预先富集才能检测。病毒的富集方法多种多样,主要包括絮凝沉淀法、吸附洗脱法、免疫学方法、超滤法等。病毒富集方法的选择和待测水样体积的确定与水中病毒的密度、水样类型以及水中干扰物质的影响有关。合适的病毒富集方法不仅可以提高病毒的回收率,而且对提高后续病毒检测的灵敏度大有帮助。现对不同的水体病毒富集方法综述如下。

1　絮凝沉淀法

1.1　絮凝沉淀法种类　通过调节 pH值并向水中加入化学物质,形成絮凝沉淀,病毒通过与絮凝沉淀结合而浓缩。絮凝沉淀法按照絮凝剂组成、性质的不同,一般可将其分为无机絮凝剂絮凝沉淀法、有机絮凝剂絮凝沉淀法以及生物絮凝剂絮凝沉淀法等。

常用的无机絮凝剂有聚合氯化铝、氢氧化铝、磷酸钙等。铝离子絮凝沉淀法[3]主要是在水中加入中溶性铝盐和碱性物质以形成 $Al(OH)_3$ 沉淀或直接加入 $Al(OH)_3$ 沉淀,使得带正电荷的铝离子和带负电荷的病毒颗粒充分结合,然后离心收集氢氧化铝沉淀,用乙二胺四乙酸 (EDTA)和碱液洗脱病毒。钙离子絮凝沉淀法[4]是由 Junyi Liu等开发的一种新的、快速简便的病毒富集法。先向水样中加入一定量的 Na_2HPO_4,然后再加入适量的 $CaCl_2$,充分振摇以形成絮凝状物,用合适的滤膜对形成絮凝状物的水样进行过滤,过滤后用少量柠檬酸盐缓冲液冲洗滤膜,以溶解絮凝状物,冲洗后所得的少量淋洗液用微量浓缩器进行二次浓缩。

有机絮凝剂包括聚乙二醇、鱼精蛋白的硫酸盐、牛肉膏及酪蛋白等。这些物质在酸性条件下对高分子量阴电荷大分子(如病毒)有较好的沉淀效果。将这些物质加入到水中充分混匀,放置一段时间后低温高速离心即可得所需沉淀。

生物絮凝剂[5]是近年来发展起来的一类由微生物产生的有絮凝活性的代谢产物,主要包括蛋白质、黏多糖、纤维素、核糖等。目前,主要应用于工业废水以及生活污水等的处理,可考虑将其应用到水体病毒富集中来。

1.2　絮凝沉淀法的特点　絮凝剂絮凝沉淀法有诸多优点:(1)病毒被絮凝状物质吸附包围,这种絮凝物对病毒的吸附作用比常规的滤膜对病毒的吸附更为有效。(2)用碱液或柠檬酸盐缓冲液可充分、快速的将病毒从絮凝状物上洗脱下来。该方法被认为是一种快速、简单、有效的病毒富集方法,成本低。但是,该法不能保证一次离心就把水体中的病毒充分浓缩到沉淀中。水样体积如果过大,需多批次离心,操作复杂且耗时。

1.3　絮凝沉淀法的应用　该法是浓缩小体积污水中病毒非常有效的方法,不适合浓集大体积水样中的病毒,一般仅用于吸附法的洗脱液中病毒的再浓缩。实验表明,钙离子絮凝沉淀法能有效浓缩 f2噬菌体和脊髓灰质炎病毒,平均回收率分别达到 96%和 100%,明显高于阳电膜吸附法的 30%和 57%[6],用柠檬酸盐缓冲液作为洗脱剂,可边溶解絮凝沉淀边洗脱,大大缩短了浓缩时间,一般整个过程仅需 3 min,因此,该方法还可用于现场快速富集病毒。

2　吸附洗脱法

2.1　膜吸附洗脱法　膜吸附洗脱是利用带电滤膜的吸附性浓缩病毒,近年来广泛应用于低污染水体的肠道病毒检测。对于饮用水、瓶装水可直接进行膜吸附。对于含悬浮颗粒物较多的水样,可先用纱布或者玻璃纤维滤纸 AP20, AP15 (直径 142 mm)预过滤,然后再进行膜吸附。

2.1.1　滤膜种类　该法所采用的滤膜有阳离子滤膜、阴离子滤膜两种,主要包括聚氯乙烯纤维、尼龙膜、硝酸纤维膜、聚氯乙烯、石棉、阳离子滤膜[7]等。传统的滤膜吸附操作简单,但效果不佳。如用阳离子滤膜对不同质量水体病毒进行浓缩,不加入阳离子直接吸附,平均回收率为 31.62% ～ 50.12%[8],且该种滤膜需要进口,成本较高。采用阴离子滤膜,需事先向水样中加入一定量的多价阳离子,吸附效果虽好于阳离子滤膜,但效果也不理想[9]。

2.1.2　洗脱剂种类　洗脱剂是吸附洗脱浓缩效能的重要部分。洗脱剂一般分为 2类:一类是蛋白质,蛋白质与病毒竞争吸附位点置换病毒,达到洗脱作用,如牛肉提取液。另一类是改变多价阳离子吸附特性的物质,如甘氨酸、精氨酸、三氯乙酸、洗涤剂和乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) (作为金属阳离子的螯合剂)等。2种洗脱剂都需在较高的 pH值条件下进行洗脱,以减少多价阳离子对病毒的吸附作用[4]。传统的膜吸附洗脱方法采用牛肉浸膏洗脱液来洗脱被膜吸附的病毒,这种方法存在一定的局限。首先,用牛肉浸膏洗脱液对膜进行洗脱,可将膜上吸附的干扰物同时洗脱下来,被洗脱的干扰物以及牛肉膏洗脱液中的部分有机物对病毒 PCR检测过程的 cDNA合成和 PCR扩增有一定抑制作用,影响病毒检测的灵敏度。其次,牛肉膏洗脱液不能完全把滤膜上吸附的病毒洗脱下来,降低病毒颗粒的回收率。

Haramoto E等采用无机碱溶液作为洗脱液来洗脱病毒,这种洗脱方法适用于对阴离子滤膜的洗脱。洗脱前先用酸溶液淋洗滤膜,可使病毒回收率达到 99% (81% ～114%)[10]。

2.1.3　膜吸附洗脱法的作用　膜吸附 - 洗脱法还在不断改

*基金项目: 国家"十一五"科技支撑计划基金 (2006BAI19B02
作者单位: 华中科技大学同济医学院公共卫生学院,武汉 430030
作者简介: 王四全 (1985 -),男,湖北枣阳人,硕士在读,研究方向:环境流行病学。

进,Bing-Mu Hsu等将不同的滤膜吸附(硝酸纤维滤膜、阳电荷滤膜、阴离子滤膜)与不同的洗脱剂洗脱(H_2SO_4/NaOH、甘氨酸/牛肉浸膏)进行序贯试验,得出一个最佳组合方案即硝酸纤维滤膜吸附,H_2SO_4/NaOH洗脱[11]。但是这种方法对含有较多杂质的环境水体浓缩仍有很大困难,水样中的悬浮物易阻塞滤器,限制了检水量并可能干扰洗脱过程。水中的有机物,特别是地表水中有机物含量高时,因与病毒竞争性吸附,可干扰病毒的有效吸附和洗脱。另外,该方法操作时间长,减少膜使用寿命,膜对病毒的吸附能力也会下降。因此,开发简单方便、成本低、适应范围广、浓缩效率高的方法意义重大。

2.2 固体颗粒吸附法 根据膜吸附洗脱法的原理,通过改变吸附剂的成分,开发出了煤床吸附洗脱法、滑石粉-硅藻土吸附洗脱法、活性炭吸附洗脱法等[12-13]。这些吸附剂表面均带有一定的电荷,而病毒又具有不同的等电点,通过调节pH值或向水样中加入多价盐离子可改变病毒表现所带的电荷量,从而改变吸附剂与病毒的吸附强度。另外,预先向水样中加入一定量的钠化蒙脱石吸附病毒以提高病毒的沉降性能,然后用聚合氯化铝絮凝水体中的悬浮物浓缩水体病毒也能取得不错的效果,应用该方法对自然水体、生活污水、自来水中的脊髓灰质炎病毒以及大肠埃希菌噬菌体进行浓缩,回收率均高于84.3%[14]。

3 超滤法

超滤法可有效富集水体中所有的病毒颗粒,是近年来发展起来的一种病毒富集方法,适用于饮用水等其他较为洁净的水样中病毒颗粒的富集[15-17]。超滤法不需要调节水样的pH值,也不需要向水样中加入阳离子物质。过滤不依赖病毒或滤纸的特性,仅仅与病毒颗粒的大小以及滤膜孔径的大小有关,分离机制主要是靠物理的筛分作用[18]。目前多采用中空纤维超滤器,过滤时一般选用切线流过滤,即水样沿与膜水平的方向流动,水样可循环过滤若干次。这种过滤方法可降低病毒颗粒以及水体中其他大分子物质与滤膜表面的吸附,使得滤膜堵塞的可能性降到最低。过滤前,用高蛋白溶液或是分散剂对滤膜进行预处理,可明显提高病毒的回收率。高蛋白物质和分散剂如胎牛血清、多聚磷酸盐(NaPP)等可降低病毒和滤膜表面的静电吸附。向水样中加入表面活性剂如Tween 80则可降低滤膜与病毒间的疏水作用,提高病毒与滤膜的吸附。另外,对盒式超滤器进行反冲洗可提高病毒的回收率,向反冲洗液中加入表面活性剂,回收率更高。Hill VR等[16]向水样中添加一定量的NaPP,并用含有0.5% Tween 80,0.01% NaPP,0.001%消泡剂反冲洗液对滤膜进行冲洗,乙型肝炎病毒株(MS2)的回收率可由34%提高到91%。该法是一种理想的自来水中病毒富集方法,一次可处理100L左右的自来水[17]。自来水经过处理杂质水,超滤前不需对水样进行预处理,超滤时可将膜通量调至最高以减少操作。处理含有有机物或其他杂质的环境水体时,易堵塞超滤膜,需对水样进行预过滤。

4 免疫法

主要是利用抗原抗体反应的特异性来收集捕获病毒。由于病毒本身可作为抗原,根据免疫学反应原理可设计出病毒抗体,通过抗原抗体的特异性结合来达到富集病毒的目的。把水样通过结合有高特异性纯化抗体的多糖凝胶柱,抗体选择性地和病毒抗原结合[19],或用交联了特异性抗体的磁珠捕获和分离病毒[20]。这种结合过程是可逆的,改变反应条件,可把结合到柱或珠上的病毒分离下来。该技术可以几十倍或上百倍的浓缩病毒,其特异性减少了样品中聚合酶联反应的抑制物,提高了病毒检测的灵敏度。但抗原抗体反应的高特异性使抗体的制备耗时、成本高、技术难度大、操作复杂,广泛应用受到限制。

5 小 结

以上是几种常用的水体病毒富集方法,其他如超速离心、电泳、电渗析法等不仅需要一定的设备,而且处理水量有限,多作为辅助手段用于病毒再浓缩,此处不做讨论。虽然可供选择的病毒富集方法多种多样,但效果均不太理想。理想的病毒富集方法应该简便、快速、成本低,可处理大量水样,能浓缩不同种类的病毒,不受水体中干扰物质的影响,具有较高的回收率。目前,絮凝沉淀法和膜吸附洗脱法是病毒浓缩较常用的方法,两者各有优劣。絮凝沉淀可避免水体质量对浓缩效果的影响,用时该法操作简单,不需要特殊试剂和设备,适于基层实验室使用。该法的缺陷在于处理水样体积较小,病毒从沉淀物中回收不完全,其他被絮凝物吸附的杂质可随病毒一起被洗脱下来,干扰病毒的检测。膜吸附洗脱法虽可处理较大体积质量较好的水样,但是在处理质量较差的水体时滤膜易堵塞,且水体中杂质同样会对病毒检测结果造成影响。因此,需要进一步研究,开发理想的病毒浓缩方法,有效去除水体中的有机物和其他杂质的干扰以提高病毒富集效果。

参考文献

[1] Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, et al. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2): 1172-1180.

[2] Kim SH, Cheon DS, Kim JH, et al. Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus[J]. J Clinical Microbiology, 2005, 43(9): 4836-4839.

[3] 丁昌慧,邵荣标,刁连东. 水中脊髓灰质炎病毒浓集方法研究的新进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(4): 509-510.

[4] Liu JY, Wu QP, Kou XX. Development of a virus concentration method and its application for the detection of noroviruses in drinking water in China[J]. Microbiology, 2007, 45(1): 48-52.

[5] 陈军. 水处理絮凝剂的研究进展[J]. 辽宁化工, 2007, 36(3): 184-186.

[6] 刘军义,吴清平,盘宝进,等. 水体病毒钙离子絮凝浓缩新方法研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1202-1204.

[7] Ma JF, Gerba CP, Pepper L. Increased sensitivity of polovirus detection in tap water concentration by reverse transcriptase polymerase chain reaction[J]. Virological Methods, 1995, 55(3): 295-302.

[8] 赵淑敏,田勇琴,孟昭英,等. 三种浓缩方法在水体病毒分离中的比较研究[J]. 环境与健康杂志, 1996, 13(3): 120-122.

[9] Lukasik J, Scott TM, Andryshak D, et al. Influence of salt on viruses adsorption to microporous filters[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2914-2920.

[10] Haramoto E, Katayama H, Ohgak S. Detection of noroviruses in tap water in Japan by mesans of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 2154-2160.

[11] Hsu BM, Chen CH, Kung CM, et al. Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures[J]. Chemosphere, 2007, 66: 964-969.

[12] Lakhe SB, Paunikar WN, Parhad NM. Use of bituminous coal for concentration of enteroviruses from sewage and effluent[J]. Water Research, 2002, 36(13): 3298-3306.

[13] 胡宏雁. 饮用水源水中肠道病毒的检测方法[J]. 环境科学与

技术, 2002, 89(2): 27 - 29.
〔14〕 郑耀通, 林奇英, 谢联辉. 水体病毒浓缩条件优化 [J]. 中国病毒学, 2004, 19(1): 62 - 66.
〔15〕 Morales-Morales HA, Vidal AG, Olszewski J, et al. Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa and viruses from water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4098 - 4102.
〔16〕 Hill VR, Polaczyk AL, 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(1): 6878 - 6884.
〔17〕 Polaczyk AL, Narayanan J, Cromeans TL. et al. Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe chasses from 100-L tap water samples[J]. J Microbiological Methods, 2008, 73: 92 - 99.
〔18〕 陈军红, 周志军, 张林, 等. 空气和水环境中病毒的富集与检测研究进展 [J]. 中国公共卫生, 2005, 21(4): 502 - 504.
〔19〕 Schwab KJ, Deleon R, Sobsey MD. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 2086 - 2094.
〔20〕 Gilpatrick SG, Schwab KJ, Estes MK, et al. Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus[J]. Virological Methods, 2000, 90: 69 - 78.

收稿日期: 2009-02-06　(宋艳萍编辑　郭长胜校对)

文章编号: 1001-0580(2009)11-1289-02　**中图分类号**: R 978.1　**文献标志码**: A

【实验研究】

环丙沙星对小鼠免疫毒性及肌肉品质影响*

李喜仙[1], 刘开永[2], 侯玉泽[2]

摘　要: **目的**　研究环丙沙星对小鼠免疫毒性和肌肉品质的影响。**方法**　将小鼠分为对照组和环丙沙星高、中、低剂量组 (44, 11, 5.5 mg/kg); 每组 10只动物, 连续 7 d腹腔注射给药, 每日 1次; 通过计算小鼠胸腺和脾脏指数, 观察脾淋巴细胞形态变化来探讨该药的免疫毒性; 通过检测肌肉蛋白质含量、肌肉 pH值, 观察其对小鼠肌肉品质的影响。**结果**　对照组胸腺和脾脏系数分别为 (9.1 ±2.3), (6.3 ±1.1) mg/g, 高剂量组胸腺和脾脏系数分别为 (6.5 ±1.6), (3.4 ±0.5) mg/g, 与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$或 $P<0.01$); 而中、低剂量组的脾脏指数与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 环丙沙星各剂量组与对照组比较, 肌肉 pH值变化不明显; 环丙沙星高、中、低剂量肌肉蛋白质含量分别为 (24.68 ±0.55), (22.48 ±0.54), (21.22 ±1.25) g/100 g, 与对照组 (31.83 ±2.36) g/100 g比较明显下降 ($P<0.05$); 与对照组比较, 高剂量组脾淋巴细胞形态异常。**结论**　环丙沙星对小鼠具有一定的免疫毒性, 明显减少了肌肉蛋白质含量。

关键词: 免疫毒性; 肌肉品质; 脏器系数; 环丙沙星

Effect of ciprofloxacin on immunotoxicity and muscle quality in rats

LI Xi-xian, LIU Kai-yong, HOU Yu-ze. Health and Antiepidemic Station of Weibin District, Xinxiang city, Henan province (Xinxiang 453000, China)

Abstract: **Objective**　To study effect of ciprofloxacin on immunotoxicity and muscle quality in rats. **Methods**　All rats in high, middle, low dose group (44, 11, 5.5 mg/kg) were administered with intraperitoneal injection of ciprofloxacin once a day, for 7 days continuously. The thymus and spleen coefficients were calculated and morphologic change of splenic lymphocyte was observed. The changes of muscle protein content and pH values were observed. **Results**　Thymus and spleen coefficients (mg/g) in high and low dosage group were 9.1 ±2.3, 6.3 ±1.1, respectively, and those of in the controll were 6.5 ±1.6, 3.4 ±0.5. The contents of muscle protein (g/100 g) in high, medium, and low dose groups were 24.68 ±0.55, 22.48 ±0.54, 21.22 ±1.25, respectively, lower than that of the control (31.83 ±2.36, $P<0.05$). Paramorphia of lymphocyte in high dose ciprofloxacin treated group was observed. **Conclusion**　Ciprofloxacin has immunotoxicity and could reduce muscle protein significantly in rats.

Key words: immunotoxicity; muscle quality; organ coefficient; ciprofloxacin

环丙沙星具有抗菌谱广、杀菌力强、起效快、不易产生耐药性、价格低廉等特点, 广泛应用禽畜治疗。但是其也存在副作用, 有关不良反应屡见报道[1-4]。目前国内外对该药的残留检测较多, 但对其免疫毒性研究较少。近年来, 随着生活水平的逐步提高, 消费者对肉品的卫生和质量有了更高的要求[5-7]。本研究通过检测兽药蓄积残留对动物可食性组织品质的影响, 旨在为兽药残留的控制提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　**实验动物**　40只健康的 ICR成年小鼠 (河南科技大学动物科技学院), 雌雄各半, 体重 (18 ±2) g。

1.1.2　**主要仪器与试剂**　pH 211酸度计 (上海雷磁仪器厂); FA604A电子天平 (上海精华仪器公司); ATN-300凯氏定氮仪 (上海精科仪器公司); FS-RA-2型小鼠净化笼具 (苏州净化仪器公司); CKX31-A12PHP倒置显微镜 (日本 OLYMPUS公司)等。无水硫酸铜、硫酸钾、98%浓硫酸、硼酸溶液 (20 g/L)、氢氧化钠溶液 (20 g/L)、混合指示液 (1 g/L甲基红乙醇溶液与 1 g/L溴甲酚绿乙醇溶液按 1∶5体积混合)。以上试剂皆为国产分析纯。

1.1.3　**药液**　2.2 mg/mL环丙沙星 (含量为 99%的可溶性

*基金项目: 国家"十一五"科技支撑计划重大项目 (2006BAK02A21)
作者单位: 1. 河南省新乡市卫滨区卫生防疫站, 453000; 2. 河南科技大学食品与生物工程学院
作者简介: 李喜仙 (1966 -), 女, 河南辉县人, 副主任技师, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全。