

优化 EPA 1623 法检测生活饮用水中隐孢子虫和贾第鞭毛虫

叶秀玲, 李传礼, 李 浙, 张永鑫, 杨 平, 温莉婷, 刘 芳, 杨国武*

(深圳市计量质量检测研究院, 深圳 518131)

摘要: **目的** 建立提高生活饮用水中隐孢子虫和贾第鞭毛虫(两虫)检出率的方法。**方法** 用 1.2 μm 微孔滤膜通过真空抽滤的方式过滤两虫加标样品, 后将滤膜置于磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中进行超声洗脱, 收集洗脱液离心富集卵囊和孢囊; 按照 GB/T 5750.12-2006《生活饮用水卫生标准检验方法》洗脱液离心富集卵囊和孢囊。将 2 种试验方法离心收集到的卵囊和孢囊分别进行免疫磁分离和荧光抗体染色, 计算 2 种方法的回收率。**结果** 优化方法对隐孢子虫和贾第鞭毛虫的加标回收率分别为 60%和 56%, 标准方法 GB/T 5750.12-2006 的加标回收率分别为 22%和 20%。**结论** 优化方法对于提高生活饮用水中两虫检出率是有效的, 且可以达到降低检测成本的目的。

关键词: 隐孢子虫; 贾第鞭毛虫; 优化方法; 检出率

Optimization of EPA 1623 detection method of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water

YE Xiu-Ling, LI Chuan-Li, LI Xi, ZHANG Yong-Xin, YANG Ping, WEN Li-Ting,
LIU Fang, YANG Guo-Wu*

(Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, Shenzhen 518131, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the method for improvement of *Cryptosporidium* and *Giardia* detection rate in drinking water. **Methods** Standard samples were filtered with 1.2 μm microporous membrane by vacuum filtration, and then the membranes were put in phosphate buffer saline (PBS) for ultrasonic elution. The oocysts and cysts were enriched by the eluent. At the same time, the oocysts and cysts were enriched according to GB/T 5750.12-2006 "Standard examination methods for drinking water-Microbiological parameters". The magnetic separation and fluorescent antibody staining were respectively used for the oocysts and cysts collected by the two methods, and the recovery rates of the two methods were calculated. **Results** The recoveries of *Cryptosporidium* and *Giardia* were 60% and 56% by optimized method, while the results were 22% and 20% according to GB/T 5750.12-2006. **Conclusion** The optimized method is effective to improve the detection rates of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water, and can achieve the purpose of reducing test cost.

KEY WORDS: *Cryptosporidium*; *Giardia*; optimized method; detection rate

*通讯作者: 杨国武, 博士, 教授, 主要研究方向为食品检测。E-mail: yangguowu@smq.com.cn

*Corresponding author: YANG Guo-Wu, Professor, Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, No.114, Minkang Road north, Minzhi Street, Longhua New District, Shenzhen 518131, China. E-mail: yangguowu@smq.com.cn

1 引言

隐孢子虫(*Cryptosporidium*)和贾第鞭毛虫(*Giardia*) (以下简称两虫)是 2 种严重危害水质安全的致病性单细胞原生动植物^[1,2]。它们主要通过水和食物传播疾病,人和动物感染两虫所引起的疾病分别称为隐孢子虫病和贾第鞭毛虫病,其临床主要表现为腹痛、腹泻、腹胀、呕吐、发热和厌食等^[3]。该病目前尚无安全有效的治疗措施,免疫能力正常的患者一般能在 1 周至 4 周内自行痊愈;但免疫能力缺陷者和儿童感染该病可能因长期腹泻而导致营养不良、脱水,甚至危及生命^[4];艾滋病患者若接触“两虫”将引发多种并发症,死亡率几乎达 100%^[5]。我国 14 个省(市、区)的腹泻儿童,“两虫”疾病平均感染率为 2.41%,各地感染率为 0.9%至 9.7%^[6]。

近年来,随着国内外对饮用水水质要求的不断提高,饮用水中隐孢子虫和贾第鞭毛虫的研究也变得越来越重要^[7,8]。长期以来,国内外有很多研究两虫检测方法的试验及成果。张彤等^[9]考察了硝酸纤维素膜、醋酸纤维素膜和混合纤维素膜在不同使用条件下的溶解特性,表明颗粒物的附着影响了膜溶解的过程。Shepherd 等^[10]研究发现当离心力从 1500 g 提高到 5000 g 的过程中,隐孢子虫回收率从 33.8%上升到 53.7%;而贾第鞭毛虫的回收率从 59.7%增加到 60.8%,变化很小。张冬青等^[11]比较了氯化铯、蔗糖和 Percoll-Sucrose 3 种纯化方法,发现 Percoll-Sucrose 回收率最高。Jex 等^[12]利用包被抗原的磁珠对隐孢子虫卵囊进行反转录-聚合酶链式反应,在待测水样中筛选出具有活性的隐孢子虫卵囊。各种检测方法呈现了百家争鸣的研究形势,但是实际应用的并不多。

EPA 1623 法是美国国家环保局现行使用的用于测定水中两虫的标准方法^[13]。袁园等^[14]针对该检测方法中过滤浓缩、免疫磁分离和荧光免疫镜检这 3 个主要步骤进行了分段回收率的研究,结果显示过滤浓缩为导致两虫回收率损失的关键步骤。因此本研究对过滤浓缩中的过滤和淘洗进行了相应的改进和替代。用 1.2 μm 微孔滤膜通过真空抽滤的方式过滤两虫加标样品,后将滤膜置于磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中进行超声洗脱,收集洗脱液离心富集卵囊和孢囊,代替 GB/T 5750.12-2006《生活饮用水卫生标准检验方法》^[15]中 Filta-Max Xpress 滤芯快速过滤和淘洗,以建立简单、快速、低成本的两虫检测方法。

2 材料与方 法

2.1 仪器与设备

Millipore(Reference) 超纯水系统(法国默克密理博); 90-1 磁力搅拌器(上海驰久泵业有限公司); Y-600-1J 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司); 98-08677-00 滤芯、

89-17395-00 滤囊振荡器(美国爱德士公司); COMPACT 106 空气压缩机(意大利 FIAC 公司); FM-3800 离心机(四川蜀科仪器有限公司); PALL.66394 1.2μm 微孔滤膜(美国颇尔公司); SK2510HP 超声清洗机(上海科导公司); Dynabeads 免疫磁分离样品混合器(美国 Invitrogen 公司); MS3BS25 涡旋混合器(德国 IKA 公司); Axio Scope A1 荧光显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2.2 材料与试剂

ESCG100 Easy Seed G/C 质控标样(美国爱德士公司); 98-14286-00 免疫磁分离试剂盒(其中包含隐孢子虫卵囊分离磁珠、贾第鞭毛虫孢囊分离磁珠和浓缩缓冲液)(美国 Dynal 公司); 98-0005946-00 荧光染色试剂盒(澳大利亚 Easy Stain)。

CAS[67-56-1]甲醇(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司); P4417-100TAB 磷酸盐溶液(分析纯,美国 Sigma 公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 优化方法

分别采用 0.45 μm 和 1.2 μm 微孔滤膜对实验室的 20 L 去离子水加标样(即向 20 L 去离子水中加入 1 支 Easy Seed G/C 质控标样混匀)进行过滤,并对过滤过程计时。

将过滤后的滤膜放入 100 mL PBS 溶液中,调节超声清洗机频率为 50 kHz,洗脱 15 min。更换 PBS 溶液,振荡清洗 3 次。

将上述超声和振荡洗脱液全部收集至 500 mL 锥形离心管中,设置离心力 2000 g,离心 15 min,吸去上清液,收集 10 mL 的浓缩液。

2.3.2 标准方法

按照 GB/T 5750.12-2006^[15]方法中用 Filta-Max Xpress 滤芯快速过滤两虫加标样品和淘洗滤芯,将淘洗液离心富集卵囊和孢囊。

2.3.3 试剂盒检验

使用免疫磁分离试剂盒,在磁珠捕获卵囊/孢囊后使用磁极将其与水中的其他杂质分离开来,再加入 0.1 mol/L HCL 50 μL 使磁珠与卵囊或孢囊分离,获得纯的卵囊和孢囊。

按照荧光染色试剂盒说明书上的步骤对提纯后的卵囊及孢囊进行荧光染色和 DAPI 染色。

2.3.4 镜检与计数

借助荧光显微镜对染色后的玻片进行镜检,分别计数隐孢子虫卵囊和贾第鞭毛虫孢囊。

3 结果与分析

3.1 孔径滤膜选择

隐孢子虫的卵囊在显微镜下接近圆形,直径为 2~6

μm ; 贾第鞭毛虫的孢囊是椭圆形的, 长度为 8~14 μm , 宽度为 7~10 μm 。采用孔径小于 2 μm 的滤膜过滤即可以达到截留所有卵囊/孢囊的目的。而且试验采用 1.2 μm 孔径的滤膜过滤 20 L 加标去离子水, 耗时约 20 min; 采用 0.45 μm 孔径的滤膜过滤 20 L 加标去离子水, 耗时是前者的 9 倍。由此可见, 孔径的大小对去离子水过滤的速度影响较大。为了缩短检测时间, 本研究采用 1.2 μm 孔径的滤膜过滤水样。

3.2 检测成本核算

GB/T 5750.12-2006《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》标准方法用到的快速过滤/淘洗设备整套价格为 80 万元, 较优化方法要昂贵得多。另外, 在耗材方面, 标准方法中用到的一次性滤芯平均每个 1200 元; 而优化方法中同样作为耗材的滤膜的价格是每片 5 元。优化方法可以达到降低检测成本的目的。

3.3 加标回收率

如表 1 所示, 本研究优化方法加标回收率较标准方法 GB/T 5750.12-2006 要高 36%~38%, 且优化方法远高于国家标准 GB/T 5750.12-2006《生活饮用水标准检验方法 微生物指标》中对回收率的最低要求 10%。

表 1 加标回收的试验结果($n=10$)
Table 1 Results of recovery rate ($n=10$)

种类	加标回收率(%)	平均值(%)
A _(第一组)	60±3	60
B _(第一组)	56±4	56
A _(第二组)	22±2	22
B _(第二组)	20±2	20

注: A 代表隐孢子虫卵囊, B 代表贾第鞭毛虫孢囊, 第一组为优化方法, 第二组为国标方法。

4 结论与讨论

优化方法较标准方法主要不同之处体现在两个方面: (1)用滤膜过滤替代 Filta-Max Xpress 滤芯快速过滤; (2)用超声洗脱滤膜替代空气压缩机快速淘洗滤芯。

优化方法达到的效果: (1)对隐孢子虫和贾第鞭毛虫的加标回收率平均值分别为 60%和 56%, 高于按照国家标准 GB/T 5750.12-2006 检测的加标回收率 22%和 20%。优化方法对于提高生活饮用水中两虫检出率是有效的。(2)GB/T 5750.12-2006 标准方法在设备、耗材方面耗资较大。因此, 从检测成本来看, 优化方法可以达到降低检测成本的目的, 适用于国内自来水厂和小型检测实验室的常规两虫检测。

本研究与实际的检测需要相适应, 检测成果有效, 可用于快速、简单方便检测生活饮用水中的两虫。

参考文献

- [1] 宗祖胜, 刘路, 陶涛, 等. 水中贾第鞭毛虫和隐孢子虫的免疫荧光分析[J]. 中国给水排水, 2003, 19(6): 99-101.
Zong ZS, Liu L, Tao T, et al. Immunofluorescence analysis of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water [J]. China Water Wastewater, 2003, 19(6): 99-101.
- [2] 宗祖胜, 胡洪营, 卢益新, 等. 某市贾第鞭毛虫和隐孢子虫污染现状[J]. 中国给水排水, 2005, 21(5): 44-46.
Zong ZS, Hu HY, Lu YX, et al. Pollution status of *Giardia* and *Cryptosporidium* in some city [J]. China Water Wastewater, 2005, 21(5): 44-46.
- [3] Lobo ML, Xiao L, Antunes F, et al. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal [J]. Lett Appl Microbiol, 2009, 48(6): 732-737.
- [4] Feng YY, Xiao LH. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and *Giardiasis* [J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(1): 110-140.
- [5] Oconnor RM, Shaffie R, Kang G, et al. *Cryptosporidiosis* in patients with HIV/AIDS [J]. AIDS, 2011, 25(5): 549-560.
- [6] 蔡炯. 介水蓝氏贾第鞭毛虫和隐孢子虫感染的流行现状及控制[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(11): 1401-1402.
Cai J. Epidemic situation and control of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* infection [J]. Chin J Health Lab Technol, 2005, 15(11): 1401-1402.
- [7] 王宇, 江山, 吴宁. 两虫加标回收率的影响因素分析[J]. 产业与科技论坛, 2015, 14(4): 47-48.
Wang Y, Jiang S, Wu N. Influence factor analysis for recovery rate of *Cryptosporidium* and *Giardia* [J]. Ind Sci Tribune, 2015, 14(4): 47-48.
- [8] Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt [J]. J Water Health, 2007, 5(1): 1-38.
- [9] 张彤, 胡洪营, 宗祖胜. 再生水中隐孢子虫和贾第鞭毛虫的检测方法研究[J]. 中国给水排水, 2006, (05): 19-23, 29.
Zhang T, Hu HY, Zong ZS. Study on method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in reclaimed water [J]. China Water Wastewater, 2006, (05): 19-23, 29.
- [10] Shepherd KM, Wynjones AP. An evaluation of method for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water [J]. Appl Environ Microbiol. 1996, 62(4): 1317-1322.
- [11] 张冬青, 李红岩, 李栋, 等. 密度梯度分离纯化/免疫荧光技术检测饮用水中“两虫”[J]. 中国给水排水, 2009, 25(2): 78-80.
Zhang DQ, Li HY, Li D, et al. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in drinking water using immunofluorescence assay and density gradient separation [J]. China Water Wastewater, 2009, 25(2): 78-80.
- [12] Jex AR, Smith HV, Monis P T, et al. *Cryptosporidium*—biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation [J]. Biotechnol Adv, 2008, 26(4): 304-317.
- [13] Mccuin RN, Clancy JL. Modifications to United States environmental protection agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water [J]. Appl Environ

Microbiol. 2003, 69(1): 267–274.

- [14] 袁园, 何义亮, 周云, 等. 提高过滤浓缩阶段对两虫回收率的试验研究 [J]. 中国给水排水, 2010, 26(3): 7–10.

Yuan Y, He YL, Zhou Y, *et al.* Improvement of *Cryptosporidium* and *Giardia* recovery in filtration and concentration stages [J]. China Water Wastewater, 2010, 26(3): 7–10.

- [15] GB/T 5750.12-2006 生活饮用水标准检验方法 微生物指标[S].

GB/T 5750.12-2006 Standard examination methods for drinking water-Microbiological parameters [S].

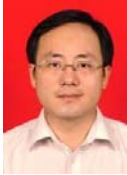
(责任编辑: 姜姗)

作者简介



叶秀玲, 检验工程师, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: redgreenye@163.com



杨国武, 博士, 教授级高工, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: yangguowu@smq.com.cn