

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2021.14.006

污水流行病学用于新冠肺炎预警研究进展

刘然彬, 郝晓地, Mark van Loosdrecht, 江 瀚
(北京建筑大学 中-荷未来污水处理技术研发中心, 北京 100044)

摘 要: 突发新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 已蔓延至全球几乎所有国家, 累计确诊病例已超过 1 亿例。这一全球大流行病尽管现阶段在我国多点散发, 但已得到基本控制, 由于不容乐观的全球疫情扩散, 依然存在疫情反弹之巨大风险。在新冠疫苗实现大规模接种之前, COVID-19 暴发有效预警机制依然是最需要的技术手段。鉴于感染者粪便/尿液中存在病毒粒子或遗传物质核糖核酸 (RNA), 荷兰学者提出了基于污水流行病学 (WBE) 监控 SARS-CoV-2 (诱发 COVID-19 的病毒) 出现并传播的设想。目前, 污水中 SARS-CoV-2 有限 RNA 检测研究结果已经证明了这一技术作为疫情预警的可行性, 亦可能根据 WBE 检测结果表征病毒传播动态与趋势、估算感染群体比例, 甚至在一定范围内进行感染群体追踪。在总结 WBE 技术在我国发展应用的基础上, 对已有污水中 SARS-CoV-2 的核酸检测研究结果、应用价值和指导意义进行综合分析, 总结 WBE 研究标准化方案, 辨析亟需深入研究的方向领域。这对我国下一阶段疫情防控具有相当启发与参考价值。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 污水流行病学; 疫情预警; 病毒检测; 核糖核酸

中图分类号: TU992.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2021)14-0037-09

Research Progress of Wastewater-based Epidemiology as an Early Warning System for COVID-19 Pandemic

LIU Ran-bin, HAO Xiao-di, Mark van Loosdrecht, JIANG Han
(Sino-Dutch R & D Centre for Future Wastewater Treatment Technologies, Beijing University of Civil Engineering and Architecture, Beijing 100044, China)

Abstract: The New Corona Virus Disease (COVID-19) has spread to almost all countries in the world with the cumulative number of confirmed cases reaching 100 million cases. Although the virus spread has been under control in China with occasional cases reported at this stage, there is still a huge risk of the epidemic rebound due to the external unfavorable situation. Before the virus vaccination covers a large group of people, an effective early warning system of COVID-19 outbreak is still the most needed technical means. In view of the presence of virus particles or genetic material (RNA) in the feces/urine of infected cases, Dutch researcher firstly proposed the idea of monitoring SARS-CoV-2 via wastewater-based epidemiology (WBE). So far, the preliminary studies have proved the feasibility of this technology on SARS-CoV-2 surveillance as an early warning. WBE may also characterize the virus transmission dynamics and trends, estimate the prevalence of infected cases, and even locate the infected

基金项目: 北京“未来城市设计高精尖中心”项目 (2020)
通信作者: 郝晓地 E-mail: haoxiaodi@bcuea.edu.cn

cases. The present review firstly summarized the development and application of WBE technology in China. Then, a comprehensive analysis was conducted regarding so far what we know about WBE and what WBE can do for us in terms of SARS-CoV-2 surveillance. Finally, a standard protocol for WBE implementation and the areas for further research were presented. Overall, this work is expected to convey timely information and be a reference for the further epidemic control in China.

Key words: COVID-19; water-based epidemiology; early warning of epidemic disease; virus detection; RNA

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)已被世界卫生组织(WHO)界定为全球大流行病。截至2021年1月底,全球被感染人数已累计超过1亿例,且确诊人数增加趋势仍在持续。核糖核酸(RNA)与抗体联合检测、相互配合可以有效甄别 SARS-CoV-2 感染者以及无症状感染者,从而化解病毒再次传播的风险^[1]。但是,核酸和抗体检测作为典型的“干预式”“点对点”筛查手段,不仅耗时费力,还会因被检测个体所处不同感染阶段而导致错检或漏检^[2],并不具有提前研判疫情的能力,这就导致对病毒传播预警机制的热切期盼。

目前,越来越多的证据表明,肠道系统组织细胞很可能也易遭 SARS-CoV-2 侵入^[3-4];而腹泻等肠道系统不适也已被认定为 COVID-19 的典型症状之一^[5]。这就是在病毒感染者粪便/尿液中已多次检出 SARS-CoV-2 遗传物质(RNA)存在的原因^[6-7];病毒因此有可能通过排水管道系统进入水环境^[8-9],继而引发人们对粪口传播病毒的担忧。除个别研究在病毒感染者粪便/尿液中通过培养检出具有活性的病毒^[10-11]外,其他研究并没有对采集的粪便、尿液进行病毒活性培养检验。但是,至今仍未有病毒粪口传播发生的报告,因此,SARS-CoV-2 病毒通过污水传播的可能性较小。

从污水中检测到病毒或其遗传物质 RNA 也为病毒传播预警或疫情暴发判断提供了一种新的思路:可以通过检测污水中的 SARS-CoV-2 遗传物质 RNA 来研判 COVID-19 感染者存在与数量多寡,可以基于污水流行病学(WBE)或环境检测(ES)疾病建立可行的病毒预警机制^[12-13]。实际上,WBE 早已被用于监控水传播疾病在人群中的传播情况,在日本和以色列已体现出其在预警脊髓灰质炎病毒方面的价值^[12]。目前,虽然有限但很有价值的相关研究已经证明 WBE 技术在预测 SARS-CoV-2 病毒传播方面的可行性^[8,14],甚至这项技术

可以早于医学临床检测并预警病毒存在及扩散的风险。WBE 作为一种“非干预式”“点对面”的检测手段,能够弥补核酸或抗体检测的弊端,为预警疫情再次暴发及时提供信息。

国内虽已有在粪便以及污水中检测到 SARS-CoV-2 病毒的较早报道,但尚无基于 WBE 的类似研究,所以,笔者试图综述、总结目前已公开发表的与 COVID-19 相关的 WBE 研究进展。首先,介绍 WBE 技术原理及在我国的应用情况;其次,分类讨论现有 SARS-CoV-2 病毒检测 WBE 的研究成果,同时分析其应用价值与指导意义;最后,对可用于 WBE 研究的标准化方法与亟待深入研究的方向进行把脉。这对我国下一阶段疫情防控具有启发与参考价值。

1 WBE 原理与应用进展

1.1 原理与应用

WBE 是通过量化分析污水中目标化学或生物标记物来定性或定量推演污水收集区域居民活动与健康情况的一种调查监控方法,其过程方法如图 1 所示。

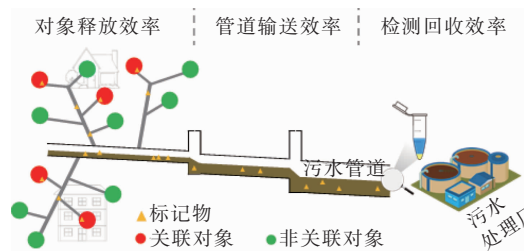


图 1 WBE 调查方法示意

Fig. 1 Schematic diagram of WBE technology

这一思路首先由美国环保局(US EPA)研究员在 2001 年提出,随后在一些国家获得应用。2005 年,意大利研究人员对 4 座污水处理厂进水中可卡因代谢物含量进行了检测,揭示了该区域人群可卡因使用趋势,证明这种方法的可操作性。从此,

WBE 方法逐渐获得研究者与管理者的青睐;被检测的标记物种类也越来越为广泛,包括非法药物、处方药、代谢物、PPCPs、抗生素等^[12]。2010 年,欧洲毒品和毒瘾检测中心(EMCDDA)成立了 SCORE (Sewage analysis CORE group -Europe) 小组,旨在通过标准化污水取样、保存和检测等方法在欧洲建立非法药品使用 WBE 监测网络。2017 年,澳大利亚刑事情报委员会(ACIC)实施了“国家基于污水药品使用监测”(NWDM)计划,用于监测甲基苯丙胺使用情况,已覆盖 54% 澳大利亚人口。

水传播病毒是污水中广泛存在的一类微生物群体,也是人类很多疾病的主要传染、扩散方式。为此,国外一些研究人员提出将 WBE 用于水传播疾病的检控,例如,对脊髓灰质炎病毒、肝炎病毒和诺如病毒等的检测,并已在日本和以色列获得实际应用^[15-16]。此外,在污水中也常会检测到一些动物传染病毒,例如禽流感和 SARS 病毒,它们完全符合应用于 WBE 研究的原理,这也是目前一些研究学者提出应用 WBE 预警 SARS-CoV-2 病毒的理论基础^[17]。

图 1 显示,WBE 基本工作原理可分为三个阶段:标记物释放、标记物输送与标记物回收检测。通过在污水收集干管泵站或污水处理厂进水口采样检测选定标记物,可定性对某种化学物或病原体在人群中的使用或存在情况进行分析判断^[16]。对 COVID-19 疫情来说,标记物便是 SARS-CoV-2 病毒遗传物质 RNA^[8]。因病毒不能在寄主细胞外进行复制,所以,可基于三阶段效率参数,由函数式(1)反推估算病毒在人群中的传播情况、感染者数量或在人群中的占比^[18]。显然,标记物释放量确定、标记物在管道中输送动态变化以及标记物取样和检测方法(PCR)都可能给函数[式(1)]计算带来不确定性,这也就成为新冠病毒 WBE 研究的主攻方向。有关 WBE 技术优缺点、具体实施流程等详细信息可参考已有文献^[12,16,19]。

$$N=f(M,Q,\eta,q,m,P) \quad (1)$$

式中: N 为关联对象人数/标记物所占比例; M 为标记物浓度; Q 为取样处污水总量; η 为标记物在管道中输送效率; q 为对象个体污水产生量; m 为对象个体标记物产生量; P 为区域人口总量。

1.2 国内应用

WBE 技术取决于污水收集系统等基础设施的

发展与完善,所以,它在我国的研究、应用起步较晚。2013 年,济南市疾病预防控制中心报道了在山东某地完成的一起疫苗衍生脊髓灰质炎病毒流行病学调查与处置情况^[20],成为国内首先应用 WBE 技术指导疾病防控的案例。

到目前为止,文献检索可获得有关“污水流行病学”为主题的中文论文共 30 篇,有关 WBE 研究主要集中于对毒品滥用检测分析^[21],其他标记物包括城市烟草以及诺如病毒等^[22-23]。研究人员在辽宁和吉林的 15 个城市选取 17 座市政污水处理厂,对甲基苯丙胺用量进行了 WBE 研究分析;对甲基苯丙胺在该地区用量进行反推估算获得了有价值的 WBE 定量分析结果^[21]。然而,我国目前其他 WBE 研究取样范围大多局限于一两座污水处理厂,而且有关图 1 所示三阶段效率的研究基本空白,同时也没有标准化 WBE 应用方案,整体上仍处于方法验证水平^[19]。

2 WBE 应用于 COVID-19 预警

2.1 研究案例概述

2020 年 3 月 24 日,荷兰国家水研究中心(KWR)首次报道了污水中检测到 SARS-CoV-2 遗传物质 RNA 研究成果。研究人员在荷兰 6 座城市与阿姆斯特丹史基辅机场附近展开 3 批次污水采样监测(2020 年 2 月 5 日—3 月 16 日)^[8],其研究时间比荷兰临床确诊 COVID-19 首例病例(2 月 27 日)还早 3 周时间。检测结果显示,在 2 月 6 日所取污水样中,SARS-CoV-2 病毒 RNA 结果检测均为阴性;但在 3 月 5 日大部分污水样中 RNA 检测结果已呈阳性;至 3 月 15 日,几乎在所有污水样品中均检测到了 SARS-CoV-2 病毒 RNA。

这一初步研究结果无疑为 COVID-19 疫情防控提供了一种“非干预式”可行替代方案。在此之后,不同国家研究人员陆续开展了相关研究,均在污水中检测到了 SARS-CoV-2 遗传物质 RNA^[18,24],并试图从结果中挖掘更多有价值信息,以评价 WBE 在指导疫情防控中的作用和意义。表 1 总结了目前已公开发表的针对 SARS-CoV-2 病毒的 WBE 研究结果,可以直观分析 WBE 在控制 SARS-CoV-2 病毒传播方面的指导作用。表 1 所列全部研究均遵循图 1 所示的研究流程,标记物为 SARS-CoV-2 中的 RNA,检测方法则为临床病毒检测广泛使用的 RT-PCR 法。

表 1 不同国家针对 SARS-CoV-2 病毒 WBE 研究结果

Tab. 1 Research results of WBE on SARS-CoV-2 in different countries

| 国家 | 地区 | 样品 | 标记物检测回收效率 | | | | 结果用途 |
|----------------------|---------|---------|--------------------|-----------------|--------------------------------------|------------|------|
| | | | 浓缩方法 | 检测靶点 | 病毒含量/(拷贝·L ⁻¹) | 阳性检出率/% | |
| 荷兰 ^[8] | 阿姆斯特丹等 | 未处理污水 | 离心超滤 | N 基因和 E 基因 | na | 58 | a/b |
| 美国 ^[25] | 马萨诸塞州 | 未处理污水 | PEG 絮凝沉淀 | N 基因 | $1 \times 10^4 \sim 2.4 \times 10^5$ | 71 | b/c |
| 澳大利亚 ^[18] | 昆士兰 | 未处理污水 | 电负性膜离心超滤 | N 基因 | 19 ~ 120 | 22 | c |
| 法国 ^[26] | 巴黎 | 未处理污水 | 离心超滤 | E 基因 | $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ | 100 | b |
| | | 二级出水 | 离心超滤 | E 基因 | $0 \sim 1 \times 10^5$ | 75 | — |
| 美国 ^[27] | 蒙大拿州 | 未处理污水 | 超滤 | N 基因 | 100 ~ 1 800 | 100 | b/e |
| 西班牙 ^[14] | 穆尔西亚自治区 | 未处理污水 | 铝盐絮凝沉淀 + 离心 | N 基因 | $0 \sim 1 \times 10^5$ | 85.7 | a/b |
| | | 二级/三级出水 | 铝盐絮凝沉淀 + 离心 | N 基因 | 0 | 0 | — |
| 意大利 ^[28] | 罗马、米兰 | 未处理污水 | PEG 絮凝沉淀 | ORF1ab 基因和 S 基因 | na | 50 | a/e |
| 西班牙 ^[29] | 瓦伦西亚 | 未处理污水 | 铝盐絮凝沉淀 + 离心 | N 基因 | $10^{5.3} \sim 10^{5.8}$ | 100(首例确诊后) | a/b |
| | | 出水 | 铝盐絮凝沉淀 + 离心 | N 基因 | 0 | 0 | — |
| 以色列 ^[24] | 海法等多个地区 | 未处理污水 | PEG 絮凝沉淀 铝盐絮凝沉淀 | E 基因 | na | 38 | a/b |

注: WBE 结果指导用途中 a 指提供预警;b 指变化趋势;c 指流行情况/感染数量或比例;d 指感染者追踪;e 指病毒溯源;f 指传染风险评价。na 指无数据。

2.2 病毒传播预警机制

最新发表的一篇论文提及^[30], SARS-CoV-2 虽然与 2003 年 SARS-CoV 病毒同属一个家族,但它却表现出对人体宿主细胞更好的适应性和更强的传染性,这也是 COVID-19 疫情影响如此广泛的原因,更引起学者对未来传染性疾病预防预警机制的思考。SARS-CoV-2 目前已知而不同于以往 SARS-CoV 的特点包括:①感染者初期存在无症状现象;②无症状阶段实际已具有传染性;③潜伏期较长、难于及早发现。这就给 COVID-19 疫情及时甄别、隔离、控制带来了困难和挑战。医学上的困惑或许可以借助 WBE 方法检测出 SARS-CoV-2 作为 COVID-19 感染的预警信号。因此,WBE 研究作用和意义重大^[8]。

荷兰进行污水 RNA 检测结果显示,2020 年 3 月 5 日 Amersfoort 地区污水 RNA 检测结果呈阳性,但彼时该地区尚未有 COVID-19 临床确诊病例,这就证明 WBE 作为病毒预警信号的可行性^[8]。鉴于

荷兰政府于 3 月 16 日才宣布实施居家隔离措施并开始对疑似病例检测 RNA,所以 WBE 检测结果说明该地区其实早已存在 SARS-CoV-2 输入病例,只是医学还未确诊而已。

同样,西班牙污水检测结果也支持 WBE 作为疫情暴发预警判断的方法^[14]。在西班牙进行的污水病毒 RNA 检测中,研究人员发现,在有临床确诊病例之前已经可以在污水中检测到 SARS-CoV-2 遗传物质 RNA。在洛尔卡、谢萨等地区,污水中检测到 SARS-CoV-2 遗传物质 RNA 时间(3 月 16 日)甚至比首例感染者(3 月 20 日—27 日)临床确诊时间提前了十几天。鉴于西班牙政府于 3 月 13 日已宣布居家隔离措施,所以,污水中检测到病毒 RNA 应该就是源于本地确诊病例。

尽管 WBE 作为本次疫情暴发预警信号的意义已被错失,但很多学者均表达了对疫情再次暴发或今后其他病毒来袭的担忧,甚至有模型预测指出 COVID-19 疫情可能持续至 2022 年^[31]。可见,

WBE 用于病毒传播预警方法具有很好的实用价值。

2.3 疾病传播动态监测

及时准确地确定 COVID-19 感染者数量变化趋势与 SARS-CoV-2 传播流行情况能够为疫情防控措施制定或医疗资源布局提供信息并及时作出相应部署调整。目前,研究人员通常采用传播指数(R_t)来描述 SARS-CoV-2 传播动态变化情况^[32],以研判所采取防控措施的有效性。然而, R_t 准确获得仍依赖于大量 RNA 检测和流行病学调查。如果检测速度落后于病毒传播速度,不仅不能采取相应强度的阻断措施,还可能会导致疫情扩散恶化。因此,基于 WBE 方法的污水 RNA 检测能否有效表征疫情动态变化也是研究人员所期望的研究方向。

根据文献中数据^[14,26](准确数据参考原文),绘制了2020年法国和西班牙污水中 SARS-CoV-2 的 RNA 含量与临床确诊感染人数变化趋势,结果见图2。

在法国污水 RNA 检测研究中,研究人员在巴黎地区进行了4次间隔相对均匀的时序采样(3月5日—4月7日),并将 RNA 浓度变化与临床确诊人数进行了对比分析^[26]。结果显示,在采样时段内,污水中 SARS-CoV-2 的 RNA 含量上升趋势,与污水处理厂服务区域临床确诊人数变化趋势存在良好的正相关性[见图2(a)]。这就为 WBE 用于表征新冠病毒传播动态变化趋势提供了有力证据支撑。

然而,来自西班牙的 RNA 检测结果似乎并不能支撑法国上述结论^[14],如图2(b)所示。在同样为期1个月监测时段内,污水中检出的 SARS-CoV-2 的 RNA 含量变化并不明显,并没有反映出该地区临床确诊人数的上升趋势。综合分析来看,原因可能来自以下几个方面:①在西班牙的检测区域范围内,整体临床确诊人数较少,而污水流量则很大,不确定的稀释比例可能会给核酸样品采集和检测准确性带来不可预估的偏移,难以反映真实的病毒载量;②西班牙的取样时段处于该地区疫情暴发的早期阶段,而粪便中检出病毒 RNA 存在滞后的可能^[33],继而导致确诊病例的增加并不能通过粪便核酸含量变化体现;③COVID-19 感染者的粪便并不会100%检出病毒核酸,假设两个地区粪便不会出现病毒的感染者数量相同,在确诊病例样本较小的情况下,也会导致污水中核酸含量变化不明显。由此可知,在感染群体较小的区域,可能存在污水检出核酸含量变化

趋势不明显的情况,此时,应慎重依赖于 WBE 表征疫情变化趋势这一指导作用,但仍可用作预警信号(只与核酸有无相关而不考虑其含量)。

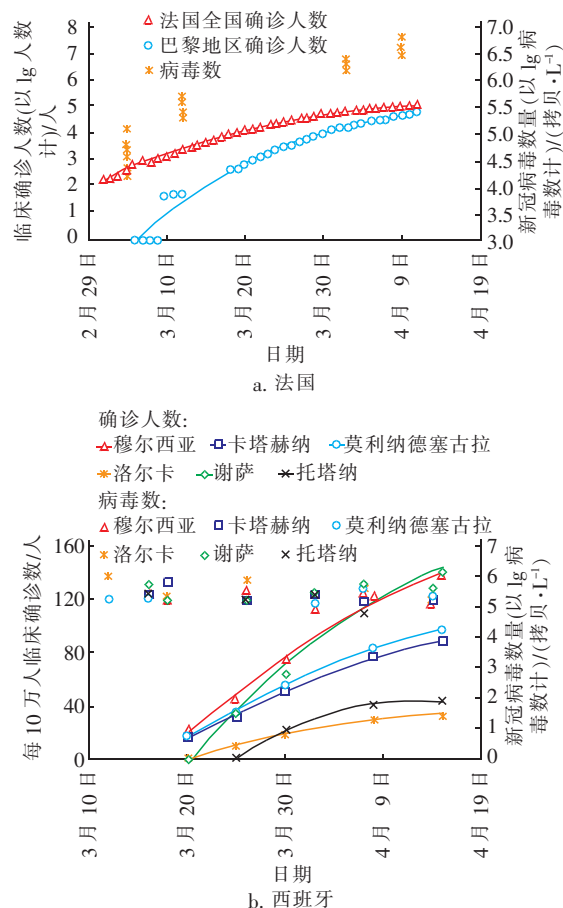


图2 法国和西班牙污水中新冠病毒数与临床确诊感染人数变化趋势

Fig. 2 Trends of the abundance of RNA (scatter points) in wastewater in comparison with the clinical confirmed cases (line points) in France and Spain

此外,美国蒙大拿州 RNA 检测结果表明,WBE 检测对于疫情缓解也具有较好的指示性表征^[27]。研究人员在蒙大拿波兹曼地区进行了为期9d的污水 RNA 检测,虽然取样周期较短,但取样频率很高(间隔2~3d)。结果显示,污水中病毒 RNA 含量呈现下降趋势,这与该地区临床确诊数病例呈逐渐下降趋势有着很好的一致性。然而,WBE 这一指导作用仍需大量试验来验证。多项研究表明,COVID-19 感染者在痊愈后,即使咽拭子 RNA 结果呈阴性,其粪便 RNA 检测结果仍会呈现阳性,这无疑会给 WBE 表征疫情下降趋势造成影响^[33]。从应用角度来看,如果通过构建合理方案确保 WBE

能够稳定反映病毒传播下降趋势,相比于检测病毒传播增长肯定更具实际意义。这一信息不仅能够帮助社区对所采取的防控手段进行研判,还能为解除居家隔离以及复工复产提供判断信息。

2.4 社区感染人数预测

在 COVID-19 暴发初期,往往存在感染人数增长迅速与医疗资源不足的矛盾,会导致大量医务人员感染或疫情持续恶化现象。造成这种状况的原因之一就是初期不能及时掌握感染者存量到底多少,从而导致不能及时对有限医疗资源进行合理调配或事先扩大医疗设施。显然,核酸“点对点”检测并不具备这样的能力。而根据上述内容以及式(1)函数,WBE“点对面”检测或许可以在疫情暴发初期进行感染总量推演估算。这便是 WBE 方法备受青睐的又一指导疫情防控的意义。

根据表1结果,美国和澳大利亚研究人员分别尝试了以污水 RNA 检测量、通过式(1)来估算相应区域感染人数或所占群体之比例。在美国马萨诸塞州^[25]污水 RNA 检测估算中,研究人员做出如下假设:①服务区人口为230万人,污水总量为 $136 \times 10^4 \text{ m}^3/\text{d}$;②每人每天排便一次,每次200g;③SARS-CoV-2 遗传物质 RNA 在管道中输送效率为100%。假如感染者粪便中病毒平均含量为 6×10^5 个/g^[34],则根据污水中病毒含量估算的感染者占总人口的5%;当粪便中病毒含量取值为 3×10^7 个/g时^[35],感染者在人群中的比例则降至0.1%,但仍远远大于同期临床确诊的感染比例(0.026%)。由于该估算基于大量数据假设,结果存在很大不确定性。研究表明,感染者在出现症状后的第一周内,粪便中病毒含量约为 1×10^7 个/g,但到第三周时病毒含量便下降到 1×10^3 个/g^[35]。此外,不同感染者粪便中检出病毒 RNA 的持续时间也存在很大差异,部分感染者粪便 RNA 阳性结果持续2~5d,而个别感染者持续时间却高达30多天^[33]。这些动态变化均给式(1)应用带来了困难和不确定性。

在澳大利亚研究中,研究人员采用相同方法,依据污水中 SARS-CoV-2 的 RNA 含量估算了人群中感染者比例,结果约为0.096%^[18]。遗憾的是,因该地区临床确诊数据无法获得而导致无法进行横向比较。但研究人员用蒙特卡罗法检验了各项假设参数对结果不确定性的影响程度。结果表明,感染者粪便中病毒含量对估算结果影响最大,其他参数影

响大小依次为污水中病毒检出数、个体每天粪便量以及人均污水产量。这也就很好地解释了美国马萨诸塞州在不同粪便病毒含量下估算结果出现的差异性。

从表1数据可以看出,不同地区污水中检测到的 SARS-CoV-2 核酸含量波动非常大,部分地区甚至相差1000倍之多。而这些检测数据还未考虑检测回收效率,即污水样品预处理、浓缩以及可能存在的抑制物质对结果带来的影响。因此,根据目前已有研究结果和信息,WBE用于估算 COVID-19 感染数量或比例仍有很大困难和不确定性,需要进一步系统性研究,特别是影响图1描述的核酸释放效率、管道输送效率和检测回收效率等各个因素。

2.5 其他潜在指导作用

WBE 研究除具有上述经常提及的指导作用外,污水中病毒 RNA 检测还可以为污水处理厂工作人员提供风险评价和作业指导。根据目前已有的数据,污水基本上不大可能成为 COVID-19 传播媒介,污水厂工作人员做好基本防护即可^[28,36]。另外,由于 RNA 的不稳定导致病毒的高变异性,如果污水病毒 RNA 检测配合基因测序,通过系统发生树进行病毒溯源,可以寻找防控措施可能存在的薄弱环节。例如,在美国蒙大拿州污水 RNA 检测^[27]中发现,对回收病毒 RNA 逆转录扩增并测序的结果显示核酸序列与法国报道序列高度相似,表明该地区疫情很可能从法国输入,这与美国疾控中心(CDC)发布的周报告显示病毒源来源于欧洲结果一致,说明前期防范输入型病例防控措施不足。

此外,部分学者也提出将 WBE 用于感染病例追踪的设想。但从 WBE 的“点对面”性质可知,因为目前采取的是污水管网末端采样方式,实现病例的精准追踪似乎很困难。但是,这也给 WBE 研究作为预警信号提供了启示,在实际污水监测中,可以通过增加管网中取样点和控制点,以便更好地完成污水分流并缩小病毒来源追踪范围,用于判断特定区域病毒传播程度或病毒来源(如养殖场或屠宰场等)。这无疑对学校、写字楼等人员较为密集场所进行疫情防控提供了可选方案。但需要注意的是,扩大污水监控点可能会引发对个人隐私泄露的担忧。因此,监控点的选取应综合考虑各种因素。

2.6 WBE 应用于 COVID-19 预警标准化

从上述 WBE 工作原理及在疫情防控中潜在指导作用可知,如何提高污水中 SARS-CoV-2 遗传

物质 RNA 检出敏感性是发挥其预警指导作用的基础,即,图 1 所示的病毒检测回收效率;而对病毒释放效率和管道输送效率进一步完善研究则能够为 WBE 预测提供更多定量信息。如前所述,WBE 用于监测病毒在人群中的传播已经得到了较为广泛的研究和部分应用,但大多限于水传播病毒,如脊髓灰质炎病毒和肝炎病毒(非包膜病毒)。但是,SARS-CoV-2 属于包膜病毒^[17],已有 RNA 浓缩回收方法是否仍然适用,还需大量试验予以确定。水传播病毒浓缩回收方法及与 SARS-CoV-2 不同之处已有相应参考文献^[28,36]。

2020 年 4 月 30 日,美国水研究基金会(WRF)举办了一场关于 WBE 在线研讨会,对目前已有 WBE 监测 SARS-CoV-2 案例和研究结果进行梳理和总结,并针对污水取样、病毒 RNA 浓缩提取及检测方法提出了建议,以期通过方案标准化强化信

息共享,充分发挥 WBE 在 COVID-19 联防联控中的作用。有关这次研讨会主要内容总结于表 2,以期为相关研究提供参考。专家达成共识的建议内容较为全面,涉及污水取样点选取、保存,以及样品处理、检测、空白对照组设置等信息。而在具体实施中如何选择适当方法则取决于 WBE 研究的目的,即应用于病毒传播预警、趋势变化、感染人数还是感染追踪。例如,在 WBE 用于病毒出现或传播预警、指示感染者数量和疫情变化趋势时,所采取的方法应更注重检测技术在病毒 RNA 浓度较低时的检出敏感性,而不需要 RNA 定量数据。相形之下,如果 WBE 用于确定感染者群体数量或比例,则应采取更加注重污水中 RNA 检测的量化数据,此时应采用流量变化的复合样品,以降低结果的不确定性。其他考虑因素可根据 WBE 研究目标参考如表 2 所示的方案建议。

表 2 WBE 研究中 SARS-CoV-2 检测建议标准化方案

Tab. 2 Recommended standard protocol for implementation of WBE for SARS-CoV-2

| 项 目 | | 内 容 | 指导作用应考虑因素 | | | |
|---------|------|---|-----------|-----------|-------------|-------------|
| | | | 预警 | 趋势 | 数量 | 追踪 |
| 污 水 取 样 | 方式 | ①定时随机取样;②基于时间复合采样;③基于流量复合采样 | ① | ② | ③ | ①/② |
| | 地点 | ①水厂前端;②干管泵站;③干管支管连接检查井;④学校等人员密集处 | ①/② | ①/② | ①/② | ①/②/ ③/④ |
| | 时间 | 每一采样点 1 次/周 | | | | |
| | 体积 | 1 L;250 mL 用于回收控制试验;2×250 mL 用于试验检测;250 mL 留存备检 | | | | |
| | 保存 | 聚碳酸酯取样瓶;-80℃,避免多次冷冻 | | | | |
| | 其他 | 做好标记,记录取样点、时间及管网、天气等信息 | | | | |
| 样 品 检 测 | 浓缩 | 需进一步研究确定 | | | | |
| | 空白设置 | 在浓缩、检测等阶段均应设置空白对照(阳性空白、阴性空白和抑制空白);小鼠肝炎病毒或假单胞菌噬菌体可作为标准样 ^[36] | | | | |
| | 检测 | RT-PCR | | | | |
| | 其他 | 多点结果相互验证;与健康部门或其他专业信息共享 | | | | |
| 安全提示 | | 接近用户的取样点应做好防护 | | | | |
| 待研究方向 | | ①病毒 RNA 在管道运输中的丢失量;②待调查区域人口数量的动态变化;③不同感染个体间及个体时间的粪便病毒含量动态变化;④病毒在污水中液相和固相的分布 | ④ | ①/③/ ④ | ①/②/ ③/④ | ①/④ |

3 WBE 对我国疫情防控的启示

综上所述,尽管目前应用 WBE 应对 COVID-19 疫情的研究还十分有限,但已有研究结果足够有效证明 WBE 在 SARS-CoV-2 出现、传播以及监测方面的作用和价值。传统“点对点”式 RNA 或其抗体检测固有弊端也促使学者、管理者对现有疫情防控体系重新思考;同时,对具有“点对面”性质的 WBE 方案逐渐重视。基于目前 WBE 在 SARS-

CoV-2 监测方面的研究结果,美国 CDC 已经开始考虑和企业、污水公司等开展 WBE 项目合作,用于指导疫情防控或者为可能再次暴发病毒提供预警信息。

虽然国内疫情得到有效控制,但境外疫情仍在肆虐,我国外防输入、内防反弹的压力依然很大。随着我国对水环境保护的重视和城市管网的不断优化,城市污水收集覆盖率已达 95%,这就为我国应

用 WBE 作为病毒出现和传播预警机制提供了研究基础。况且,当下我国排水系统管理正向智能化方向发展,这也为 WBE 研究和应用提供了可能和契机。

参考文献:

- [1] LONG Q X, LIU B Z, DENG H J, *et al.* Antibody responses to SARS - CoV - 2 in patients with COVID - 19[J]. *Nature Medicine*, 2020, 26: 845 - 848.
- [2] MALLAPATY S. Will antibody tests for the coronavirus really change everything? [J]. *Nature*, 2020, 580 (7805): 571 - 572.
- [3] LAMERS M M, BEUMER J, VAN DER VAART J, *et al.* SARS - CoV - 2 productively infects human gut enterocytes[J]. *Science*, 2020, 369 (6499): 50 - 54.
- [4] XIAO F, TANG M W, ZHENG X B, *et al.* Evidence for gastrointestinal infection of SARS - CoV - 2 [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158 (6): 1831 - 1833.
- [5] DOCHERTY A B, HARRISON E M, GREEN C A, *et al.* Features of 20 133 UK patients in hospital with COVID - 19 using the ISARIC WHO clinical characterisation protocol: prospective observational cohort study[J]. *British Medical Journal*, 2020, 369: m1985.
- [6] WANG D W, HU B, HU C, *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China[J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2020, 323 (11): 1061 - 1069.
- [7] CHEUNG K S, HUNG I F N, CHAN P P Y, *et al.* Gastrointestinal manifestations of SARS - CoV - 2 infection and virus load in fecal samples from the Hong Kong Cohort: systematic review and meta-analysis[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159 (1): 81 - 95.
- [8] 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 Letter*, 2020, 7 (7): 511 - 516.
- [9] ZHANG D Y, LING H B, HUANG X, *et al.* Potential spreading risks and disinfection challenges of medical wastewater by the presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS - CoV - 2) viral RNA in septic tanks of Fangcang Hospital[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 741: 140445.
- [10] WANG W L, XU Y L, GAO R Q, *et al.* Detection of SARS - CoV - 2 in different types of clinical specimens [J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2020, 323 (18): 1843 - 1844.
- [11] SUN J, ZHU A R, LI H Y, *et al.* Isolation of infectious SARS - CoV - 2 from urine of a COVID - 19 patient [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9 (1): 991 - 993.
- [12] LORENZO M, PICO Y. Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects [J]. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 2019, 9: 77 - 84.
- [13] KROISS S J, AHMADZAI M, AHMED J, *et al.* Assessing the sensitivity of the polio environmental surveillance system [J]. *PloS One*, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0208336.
- [14] RANDAZZO W, CUEVAS-FERRANDO E, SANJUÁN R A, *et al.* Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 epidemiological surveillance[J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2020, 230: 113621.
- [15] CHOI P M, TSCHARKE B J, DONNER E, *et al.* Wastewater-based epidemiology biomarkers: past, present and future[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 105: 453 - 469.
- [16] XAGORAKI I, O' BRIEN E. Wastewater-based epidemiology for early detection of viral outbreaks [M] // O' BANNON D J. *Women in Water Quality*. Switzerland AG: Springer Nature, 2020: 75 - 79.
- [17] BAR-ON Y M, FLAMHOLZ A, PHILLIPS R, *et al.* SARS - CoV - 2 (COVID - 19) by the numbers [J]. *eLife*, 2020. DOI: 10.7554/eLife.57309.
- [18] 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.
- [19] 郑晓雨, 袁明俊, 王德高, 等. 基于污水流行病学的毒情研判技术研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2020, 15 (4): 79 - 87.
ZHENG Xiaoyu, YUAN Mingjun, WANG Degao, *et al.* Sewage epidemiology for drug situation assessment [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15 (4): 79 - 87 (in Chinese).
- [20] 张学化, 宋凯军, 宋晓雁, 等. 济南市污水中监测到 II 型疫苗高变异脊髓灰质炎病毒/疫苗衍生脊髓灰质

- 炎病毒后的流行病学调查和处置[J]. 中国疫苗和免疫, 2013, 19(6): 526-528.
- ZHANG Xuehua, SONG Kaijun, SONG Xiaoyan, *et al.* Epidemiological investigation and emergency measure of type 2 vaccine hypervariable poliovirus/vaccine-derived poliovirus which monitored from sewage in Jinan City [J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2013, 19(6): 526-528 (in Chinese).
- [21] 刘春叶, 王喆, 冯佳铭, 等. 污水流行病学调查辽宁和吉林省甲基苯丙胺用量和流行率[J]. 环境化学, 2018, 37(8): 1763-1769.
- LIU Chunye, WANG Zhe, FENG Jiaming, *et al.* Methamphetamine consumption and prevalence in Liaoning and Jilin Provinces investigated by sewage epidemiology [J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(8): 1763-1769 (in Chinese).
- [22] 李成. 基于污水流行病学方法调查吉林省主要城市烟草消费研究[D]. 大连: 大连海事大学, 2016.
- LI Cheng. Investigation of Tobacco Consumption in Jilin Province Based on Sewage Epidemiology [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2016 (in Chinese).
- [23] 曾丽连, 陆靖, 郑焕英, 等. 2014—2017 广州市环境污水中轮状病毒和诺如病毒的检测[J]. 现代预防医学, 2019, 46(1): 37-39, 61.
- ZENG Lilian, LU Jing, ZHENG Huanying, *et al.* Classification and dynamic changes of diarrhea-associated viruses in domestic sewage, Guangzhou, 2014-2017 [J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(1): 37-39, 61 (in Chinese).
- [24] 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]. medRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.04.26.20073569.
- [25] WU F Q, XIAO A, ZHANG J B, *et al.* SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases [J]. mSystems, 2020, 5(4): e00614-20.
- [26] WURTZER S, MARECHAL V, MOUCHEL J M, *et al.* Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewater correlates with COVID-19 confirmed cases [J]. medRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.04.12.20062679.
- [27] NEMUDRYI A, NEMUDRAIA A, SURYA K, *et al.* Temporal detection and phylogenetic assessment of SARS-CoV-2 in municipal wastewater [J]. Cell Reports Medicine, 2020, 1(6): 100098.
- [28] LA ROSA 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.
- [29] RANDAZZO W, TRUCHADO P, CUEVAS-FERRANDO E, *et al.* SARS-CoV-2 RNA titers in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area [J]. Water Research, 2020, 181: 115942.
- [30] ZHAN S H, DEVERMAN B E, CHAN Y A. SARS-CoV-2 is well adapted for humans. What does this mean for re-emergence? [J]. bioRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.05.01.073262.
- [31] KISSLER S M, TEDIJANTO C, GOLDSTEIN E, *et al.* Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period [J]. Science, 2020, 368(6493): 860-868.
- [32] WANG C L, LIU L, HAO X J, *et al.* Evolving epidemiology and impact of non-pharmaceutical interventions on the outbreak of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China [J]. The Journal of the American Medical Association, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.6130.
- [33] WU Y, GUO C, TANG L. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples [J]. The Lancet Gastroenterology & Hepatology, 2020, 5: 434-435.
- [34] ZHANG N, GONG Y H, MENG F P, *et al.* Virus shedding patterns in nasopharyngeal and fecal specimens of COVID-19 patients [J]. Science China Life Sciences, 2020. DOI: 10.1007/s11427-020-1783-9.
- [35] WÖLFEL R, CORMAN V M, GUGGEMOS W, *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 [J]. Nature, 2020, 581: 465-469.
- [36] KITAJIMA M, AHMED W, BIBBY K, *et al.* SARS-CoV-2 in wastewater: state of the knowledge and research needs [J]. Science of the Total Environment, 2020, 739: 139076.

作者简介: 刘然彬 (1988-), 男, 山东济南人, 博士, 副教授, 从事污水生物处理工艺优化和资源回收研究工作。

E-mail: liuranbin@126.com

收稿日期: 2020-05-06

修回日期: 2021-01-26

(编辑: 丁彩娟)