

自来水病毒污染的初步研究

张楚瑜 李丕芬 王祖卿

(武汉大学病毒学系)

目前国内外城镇居民生活用水,多数是经砂滤和消毒等方法处理过的自来水,符合生活饮用水卫生标准,对人是安全的。但近一、二十年,美国,苏联,英国等从经过常规处理的自来水中检出了病毒^[1]。我国尚未见这方面的报道。微量病毒能感染易感宿主(人和动物),因此自来水中含有病毒引起了人们的深切关注。我们对某市水厂自来水中是否存在病毒进行了研究。

一、水样的采集和处理

1982年4—12月,用5000—10000毫升磨口玻璃瓶取以某湖为水源的某水厂的自来水水样7次,每次1000毫升。采样前容器经灭菌处理,水龙头经常规消毒,开龙头放水5分钟后取样,按1%的比例迅速加入0.4%的硫代硫酸钠脱氯,再以1%的比例将Earle's平衡盐溶液加入样品中,充分混匀,用1NHCl调pH为4.5。

二、水样的浓缩

(一) 制备吸附层 将直径125毫米的圆形滤纸平铺于赛氏滤器网板上,用无菌水浸湿,用经高压灭菌的滑石粉-硅藻土混悬液(滑石粉1.2克,硅藻土0.4克)在滤纸上涂成均匀的薄膜层,再用一张同样规格的滤纸覆盖其表面^[2]。

(二) 浓缩水样 将处理过的水样加到吸附层上加压过滤,待水样全部通过吸附层后,用10毫升pH9.0的洗脱液(含10%的小牛血清生理盐水)洗脱吸附层上的病毒,得到病毒液用0.3微米的微孔滤膜除菌,最后得病毒浓缩液8—10毫升。

三、细胞培养

分离病毒用Hela, Vero和A₅₄₉细胞,中和试验用Hela细胞。生长液为60% 1640, 28% 水解乳蛋白, 10% 的小牛血清,及适量的NaHCO₃和青、链霉素的混合液,细胞传代和培养按常规进行。

四、病毒分离

取待检病毒液分别接种8—10管Hela, Vero和A₅₄₉细胞,每管0.1毫升。设细胞对照2—3管,培养7—10天,逐日观察细胞病变,连续传三代,阳性者,病毒分离为阳性。

五、病毒鉴定

根据Hela, Vero和A₅₄₉细胞对病毒的敏感范围及细胞病变和代谢的主要特点^[3,4],初步判定所分离出的病毒为肠道病毒和腺病毒或是两者的混合。

(一) 肠道病毒的鉴定

1. 肠道病毒的纯化 病毒分离物与等量1M MgCl₂溶液混合,置50℃水浴中保温一小时,肠道病毒在MgCl₂的保护下不被灭活,其他病毒被灭活。将未被灭活的肠道病毒经Hela细胞活化后,重复MgCl₂保护试验。

2. 肠道病毒的鉴定 根据Hela细胞只对肠道病毒中的柯萨奇病毒B组和脊髓灰质炎病毒敏感,而对其他肠道病毒不敏感,所以纯化得到的肠道病毒只有柯萨奇病毒B组或脊髓灰质炎病毒或是它们的混合体。因此必须除去其中的一种才能鉴定^[5]。去除方法如下:

(1) 取0.25毫升病毒液2分(0.1毫升中含100 TCD₅₀病毒量),分别与等量的脊髓

灰质炎病毒 I—III 型的混合免疫血清和柯萨奇病毒 B₁—B₆ 型的混合免疫血清(每型含 40 个中和单位)混合,置 37°C 水浴中作用 1 小时。

(2) 每份免疫血清-病毒混合液接种两管 HeLa 细胞,每管 0.2 毫升,维持液 0.8 毫升,并设细胞对照和病毒对照。置 37°C 下培养,逐日观察细胞病变,5—7 天判定结果。

(3) 若细胞病毒被三个型的脊髓灰质炎病毒免疫血清抑制,而不被柯萨奇病毒 B₁—B₆ 型的免疫血清抑制,病毒对照阳性,细胞对照阴性,则该病毒是脊髓灰质炎病毒。若病变结果与上相反,对照与上相同,则该病毒是柯萨奇 B 组病毒。若细胞病变不被上述两组免疫血清抑制,则该病毒是脊髓灰质炎病毒和柯萨奇 B 组病毒的混合物。

3. 肠道病毒的定型 用中和试验确定分型^[4],方法同上。

(二) 腺病毒的鉴定

1. 腺病毒的纯化 将病毒液与脊髓灰质炎 I—III 型和柯萨奇病毒 B₁—B₆ 型的免疫血清混合,做中和试验去除其中的肠道病毒,得到腺病毒。

2. 腺病毒的鉴定 纯化得到的腺病毒毒株与标准腺病毒免疫血清作补体结合试验鉴定^[4]。

3. 腺病毒定型 用 3, 4, 7 型腺病毒免疫血清做中和试验,确定待定型毒株是否属于常见的 3, 4, 7 型。

(三) 鉴定出的肠道病毒各个单型毒株和腺病毒的单型毒株分别与相对应的单价血清作中和试验复核。

六、实验结果

(一) 病毒分离 病毒分离结果见表 1。

7 次水样全部检出病毒,三种细胞对柯萨奇 B 组病毒和腺病毒都敏感,但 A₅₄₉ 细胞病变不及 HeLa 细胞和 Vero 细胞的病变典型。

(二) 病毒鉴定 对 7 个水样病毒分离

表 1 细胞培养分离病毒的结果

水样编号	病毒分离结果		
	HeLa 细胞	Vero 细胞	A ₅₄₉ 细胞
0420	+	/*	/*
1023	+	+	/
1028	+	+	+
1104	+	+	+
1117	+	+	+
1201	+	+	+
1222	+	+	+

* 未做

表 2 病毒鉴定分型的结果

水样编号	病毒的种类及型别	
	柯萨奇 B 组病毒	腺病毒
0420	B ₃	腺病毒(未定型)
1028	B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₄ , B ₆	3,7
1104	B ₁ , B ₂ , B ₃	腺病毒(未定型)
1201	B ₁ , B ₃	3,7
1222	/*	腺病毒(未定型)

* 未检出

物中的 5 个进行了鉴定,结果见表 2。

表中 5 个病毒分离物中都含有腺病毒,而柯萨奇 B 组病毒存在于 4 个病毒分离物中,这说明这两种病毒对氯消毒有很强的耐受性。上述检出的病毒只限于组织培养易于生长的病毒,其他病毒未能检出。

自来水中病毒存在的主要原因是水源受到病毒的污染,其次目前的净水工艺不能完全去除和灭活病毒,为确保用水的安全,必须改进现有的净水工艺和建立病毒学标准。

参 考 文 献

[1] Report of a WHO Scientific Group, *Technical Report Series* No. 639, pp. 1—50. World Health Organization, Geneva, 1979.

[2] Sattar, S. A. et al., *Water Research*, 13(7), 637—643 (1979).

[3] Hsiung, G. D., *Diagnostic Virology*, 2nd Ed., pp. 11—71, Yale University Press, 1973

[4] 中国医学科学院流行病学防治研究所, 常见病毒实验技术, 第 233—285 页, 科学出版社, 1978.

[5] 上海卫生防疫站, 病毒检验, 第 69—78 页, 上海人民出版社, 1977.