

水厂原水和出厂自来水中病毒的检测

蒋慧惠 严惠琴 李洁 洪陶

(上海医科大学公共卫生系, 上海)

岳舜琳 糜晔新

(上海自来水公司, 上海)

提 要

本文报道用改良 Farrah 法对自来水厂原水和出厂水中病毒进行检测的结果。从不同季节原水中, 均检测到病毒, 含量在4—50pfu/10升, 病毒种类以肠道病毒为主, 其中尤以脊髓灰质炎病毒为多, 温度敏感试验提示主要为非强毒株, 有三株可能为强毒株。出厂水40升中未找到病毒, 基本符合1971年世界卫生组织所定的饮用水的病毒学标准, 10升水中无病毒。

世界卫生组织 1971 年出版的饮用水国际标准中提到, “每个国家或地区至少应有一个实验室能进行病毒学检验, 且对这个题目可进一步研究。”^[1] 国内这方面报道尚少, 本文目的在于检测自来水厂原水和出厂自来水中之病毒。

材料与方 法

一、水样采取和浓集

(一) 原 水: 于不同月份, 自甲、乙二个自来水厂分别取原水水样10升进行检测。

(二) 自来水: 取自来水厂管网末端水样40升, 分二次进行检测。

水中病毒之浓集, 采用改良 Farrah 氏方法^[2]、用滤膜和氯化铝及低pH絮凝法进行两次浓集。浓缩4000~1000倍。

二、病毒检测及其含量之测定

采用常规接种法及空斑试验法^[3]。每一浓集标本取 1.0 毫升分10份测定空斑含量, 从而计算出10升水中病毒含量。

本稿1986年4月15日收到。

致谢: 感谢 Melnick, 张师鲁, 沈鼎鸿, 张照寰, 郭仁, 董德详, 施耦笙等教授在工作中给予支持和帮助。

三、病毒种类的鉴定

分别挑取各个空斑,置于0.5毫升营养液中,摇匀,取上清液在BGM细胞中连续传代,盲传三代而不出病变者,不再传代。

分离出的病毒,先用三个型的单价脊髓灰质炎病毒标准血清作中和试验进行鉴定,如非脊髓灰质炎病毒,再用柯萨奇 B(CoxB₁-B₆)单价标准血清分别鉴定,若又非CoxB组病毒,则用LBM组合血清进行鉴定。以上血清分别由上海市卫生防疫站,昆明中国医学院医学生物研究所及国外供应。

鉴定用的中和试验参照卫生防疫检验病毒学常规,和中国医学科学院医学生物研究所之常规方法,在微量塑料板上进行。病毒和血清混合液接种量为0.1毫升,细胞悬液0.1毫升。(15—20万细胞/毫升),培养液为4%牛血清,观察5—7天。

四、脊髓灰质炎病毒的温度敏感试验:

鉴定为脊髓灰质炎病毒的毒株,参照中国医学科学院医学生物研究所常规,进行温度敏感试验。病毒稀释成 10^{-1} — 10^{-8} ,各取0.1毫升接种于0.1毫升BGM细胞悬液(15万细胞/毫升)每一稀释度种四个孔,一式二份,一份置37°C培养,一份置39.5—40°C培养,观察5—7天,按Karber法计算在二种温度下的TCID₅₀。对照组为有毒株脊髓灰质炎病毒I型 Mahoney 株和各型减毒株。二种温度下病毒滴度差 < 2 时,判定为可能属强毒株。

结 果

一、原水中病毒之检测

(一)原水中病毒含量:

在甲乙二个取水点的原水中,均能找到病毒,含量在4—50pfu/10升,统计学检查二厂原水中病毒含量无明显差别。见表1。当地气候,以12、1、2三个月为最低,7,8,9三个月为最高,5月和10月介于二者之间。

表1 两厂原水中病毒含量(pfu/10升)
Table 1. Virus contents in the original water
of the two plants (pfu/10L)

| 采样月份 | 甲厂原水 | 乙厂原水 |
|------|------|------|
| 5 | 50 | 5 |
| 7 | 21 | 35 |
| 10 | 18 | 9 |
| 12 | 4 | 25 |

(二) 原水中病毒种类

30个空斑, 分别在BGM细胞进行传代, 其中16个能用常规方法传出病毒。所致病变, 除一株外, 均显示肠道病毒的特点。鉴定结果, 其中八株为脊髓灰质炎I型病毒, 一株为脊髓灰质炎III型, 一株为CoxB₅, 一株为CoxB₆, 另二株未能鉴定。其中CoxB均出现在甲厂原水中, 脊髓灰质炎I型出现于每次样品中, 见表2。

表2 两厂原水中找到的病毒种类
Table 2. Virus kinds found in the original water of the two plants

| 采样月份 | 甲厂原水 | 乙厂原水 |
|------|---------------------------------|---|
| 5 | Polio I, CoxB ₆ , 未定 | Polio I, polio I |
| 7 | Polio I, CoxB ₅ | Polio I, polio I (t ⁺), Polio III |
| 10 | Polio I, Polio I | Polio I |
| 12 | Polio I (t ⁺) | Polio I (t ⁺), 未定 |

(三) 脊髓灰质炎病毒的温度特征:

温度敏感试验结果说明12株脊髓灰质炎病毒中, 有三株可能为强毒株, 均为脊髓灰质炎病毒I型。其中二株在冬季找到, 分别见于二个厂的原水中, 三株强毒株的温度特征见表3。

表3 三株脊髓灰质炎I型病毒强毒株温度特征
Table 3. Temperature features of 3 wild viral strains of polio type I

| 毒株号 | 37° | 39.5~40°C | 滴度差 |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|------|
| | -LogTCID ₅₀ /0.1ml | -LogTCID ₅₀ /0.1ml | |
| 甲 ₁₅ | 6.5 | 6.0 | 0.5 |
| 乙 ₂ | 6.5 | 6.5 | 0 |
| 乙 ₁₁ | 6.5 | 5.5 | 1 |
| Mahoney (对照有毒株) | 7.5 | 7.5 | 0 |
| LSc2ab (对照减毒株) | 7.5 | 1.1 | 76.0 |

二、自来水中病毒检测结果

自来水20升经浓缩4000倍后, 按常规法接种细胞未分离到病毒, 用空斑法亦未得阳性结果。重复浓缩和检测20升自来水, 仍未得阳性结果。

表4 出厂自来水中病毒之检测
Table 4. Detection of the virus in tap water

| 试验号 | 水样量 | 浓缩倍数 | 常规培养结果 | 空斑检测结果 |
|-----|-----|------|--------|--------|
| 1 | 20升 | 4000 | (-) | (-) |
| 2 | 20升 | 4000 | (-) | (-) |

讨 论

自然水由于受污染, 往往可含有病毒, 国外水病毒专家张师鲁教授曾提到该二水厂原水中可能含有病毒, 估计从1升水中即可找到病毒。我们取10升水样检查, 发现病毒含量在4—50pfu/10升之间。比英国泰晤士河含量低5—10倍。我们所用方法全系目前最常用的, 但水中病毒实际数字当在此数之上, 因操作过程中, 水样经高、低pH处理, 抵抗力较弱之病毒, 必然已被消灭, 而我们所用细胞, 也仅为EGM细胞株, 该细胞株对肠道病毒特别敏感, 而对Peo病毒则不很敏感^[4]。我们也没有进行动物接种, 因此如CoxA组大部分不易在细胞培养中分离到的病毒等就不能检测到。

Bitton报道空斑中传出的病毒, 仅占20%左右^[5], 分析其原因, 可能是某些病毒可以致细胞代谢改变, 但不能在其中很好增殖。各种细胞对病毒的敏感性不全一致, 因此为提高病毒分离率, 有人主张在做空斑试验时就采用多个细胞系同时进行接种。我们从30个空斑中, 传出16株病毒, 达50%以上, 较Bitton^[5]所说的高。这个结果和我们在污水厂进行病毒学研究的结果相一致。

水中可能出现的病毒, 主要为肠道病毒^[6], 我们的结果也是如此, 其中主要为脊髓灰质炎病毒, 尤以脊髓灰质炎I型病毒为多见, 次之为CoxB组病毒。这个结果和我们从污水厂所得的结果亦一致。国外Wellings等人报告的情况也相似^[7]。分析脊髓灰质炎I型病毒的毒力, 主要为弱毒株, 符合以往关于服用减毒株活疫苗后, I型排毒率较高的观察, 国外已提到, 在活疫苗使用以前所分离到的脊髓灰质炎I型和II型病毒, 没有类似疫苗株的, 因此, 此类病毒可以认为来源于疫苗株, 而脊髓灰质炎III型病毒则不一定。分离到的毒株中, 有三株可能为脊髓灰质炎I型病毒强毒株, 和近年来脊髓灰质炎患者以I型较多的情况相符。Melnick氏早在40年代就证实了美国纽约河水污染脊髓灰质炎病毒和当时的脊髓灰质炎流行有关^[8], 可见原水不经处理, 具有一定传播脊髓灰质炎的可能性。饮水传播甲型肝炎和急性非细菌性胃肠炎的报道, 国内外均有, 但病毒培养方法更不容易, 通常用的水病毒检测方法不能测出。甲型肝炎病毒的理化性状和脊髓灰质炎I型病毒十分相似, 已归类为肠道病毒第72型, 其抵抗力至少不比脊髓灰质炎病毒为弱, 因此原水如不经处理, 具有传播疾病的可能性, 不宜作为饮用水。

自来水在处理过程中, 需经加混凝剂, 沉淀、过滤、和二至三次加氯处理步骤, 可以除去病毒, 保证饮用水的质量。但由于某些病毒, 特别是肠道病毒的抵抗力较强, 有时可以耐受处理而仍然在水中存活。原水中各种有机物的含量, pH和浊度等是不断改变着的, 这些因素均可直接影响加氯处理杀灭病毒的效果。因此, 从处理后细菌学标准合格的水中, 找到肠道病毒或其他病毒的报道已很多^[9]。1971年世界卫生组织所定“饮用水的病毒学标准”为10升水中无病毒存在, 我们检查了40升自来水未检测到病毒, 可以认为是符合这一个标准的。但1979年世界卫生组织曾建议尽可能检测100~1000升水样, 以保证质量, 因此较理想的是建立能直接检测大量水样的方法。

参 考 文 献

- [1] WHO, 1971, International standards for drinking water, WHO, 3rd ed.
- [2] Farrah S R et al., 1978, Concentration of polio virus from tap water onto membrane filters with aluminium chloride at ambient pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:624.
- [3] 蒋慧惠等, 1983, 自来水常规硫酸铝处理去除脊髓灰质炎病毒的效果, *上海第一医学院学报*, 10(4): 301-304.
- [4] Grabow WOK et al., 1980, Comparison of primary kidney cells with the EGM cell line for the enumeration of enteric viruses in water by means of a tube dilution technique, in "Viruses and Water Treatment" (Goddard M and Bultler M ed.) Pergamon Press, p.253-256.
- [5] Bitton G., 1980, Virus detection in water and waste water, in "Introduction to environmental virology" (Bitton G ed.) John Wiley and sons N.Y.E. p.153.
- [6] Melnick JL., 1978, Viruses in water, *Bull WHO*, 56:499.
- [7] Wellings FM et al., 1976, Demonstration of solids associated virus in waste water and sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:354.
- [8] Melnick JL., 1947, Poliomyelitis virus in urban sewage in epidemic and nonepidemic times. *Am. J. Hyg.* 45:240.
- [9] Rao, V.S., 1982, Introduction to environmental virology, in "Methods in Environmental Virology," (Gerba C and Goyal S M ed.) Marcel Dekker Inc. New York and Basel, p.1-9.

DETECTION OF VIRUSES IN RAW WATER OF WATER PLANT AND TAP WATER

Jiang Hui-hui, Yan Hui-qin, Li Jie, Hong Tao
(Dept. of Microbiol, School of Public Health, Shanghai
Medical University, Shanghai)

Yae Shuen-lin, Mi Ye-xin
(Shanghai Waterworks Company, Shanghai)

This paper reports the results of detecting viruses in the raw water at the inlet of water plant and in the output tap water by modified Farrha's Method. The amount of viruses in the raw water reaches 4-50 pfu/10L in different seasons. Most of the viruses are enteroviruses, mainly polio viruses. Test of rct/40 shows that 3 strains might be of wild type, whereas the others are not.

Since no virus has been found in 40L of tap water, the virus standard in drinking water (no virus in 10L of samples), designed by WHO in 1971 has been met.