

水标本中脊髓灰质炎病毒三种浓缩方法的比较及改进方法的建立

尤凤兴 刘秉辉 张玲妹 丁茂金

(无锡市卫生防疫站 无锡 214002)

提 要

本文用三种浓缩方法对人工污染标本进行了病毒回收率的比较试验, 三种方法结果基本相同(47—49%)。在被检脊髓灰质炎 I 型病毒蒸馏水标本中加 1% NaCl 可提高滤膜法对水中病毒的回收率; 在含脊髓灰质炎病毒的河水、污水标本中加 1% NaCl 及 AlCl₃ (河水为 0.0005 mol/L、污水为 0.001 mol/L), 离心沉淀过程中, 我们惊奇地发现病毒全在沉渣中, 结果表明用该方法病毒回收率竟提高了一倍(92—99%)。

关键词: 水病毒检测 水中病毒浓缩 脊髓灰质炎病毒

水病毒检测的步骤包括取样、浓缩集毒、培养、鉴定, 其中关键是水病毒浓缩, 目前报道的方法很多, 本实验在比较滤膜法、皂土吸附-洗脱法(皂土法)、Al(OH)₃ 沉淀法回收水中脊髓灰质炎病毒的基础上, 对不同浓度 NaCl (0%、0.87%、1% 和 3%) 影响滤膜法回收率的情况进行了探讨。建立了含已知病毒河水、污水标本中加 1% NaCl 及 AlCl₃ (河水 0.0005 mol/L, 污水 0.001 mol/L) 直接取离心沉渣洗脱液的回收方法。迄今尚未见报道这种浓缩方法。现将结果报告如下:

材 料 和 方 法

一、材料:

1. 病毒: 脊髓灰质炎 I 型病毒 Brunhilde 株。
2. 细胞: Hep-2 细胞株, 上海市防疫站惠赠。
3. 已知病毒标本: 取蒸馏水、河水、污水各 1000 ml, 加 2×10^5 或 1×10^6 TCD₅₀ 脊髓灰质炎病毒 I 型。
4. 皂土 (Bentonite): CP, 上海试剂四厂产品, 批号: 82726。
5. 滤膜: 上海医药工业研究所产品, 硝酸纤维微孔滤膜, 孔径 0.3~0.45 μ, 直径 47 mm, 批号: 870508。

本文于 1990 年 8 月 13 日收到

1990 年 11 月 18 日修回

二、方法

(一) 水中病毒浓缩方法:

1. 滤膜法、皂土法、 $Al(OH)_3$ 沉淀法按常规操作^[1,2]。

2. 含脊髓灰质炎病毒蒸馏水标本分别加 0%、0.87%、1%、3% NaCl 经滤膜法浓缩; 含脊髓灰质炎病毒河水、污水标本加 1% NaCl 及 $AlCl_3$ (河水 0.0005mol/L; 污水 0.001mol/L), 室温静置 1 小时或 4℃ 冰箱过夜, 5000r/m 15 分钟, 取沉淀用 8ml 0.01mol/L EDTA-0.1mol/L 甘氨酸缓冲液 (EDTA 0.37g、甘氨酸 0.75g 溶于 100ml 蒸馏水中, 用 1N NaOH 调 pH 至 10.5, 加 15% 小牛血清, 过滤后 4℃ 备用) 洗脱 5 分钟, 1500r/m 10 分钟, 取上清, 调 pH 至 7.2 左右, 加抗菌素及小牛血清各 1ml, 置 -20℃ 冰箱待检。

(二) 病毒培养及滴定: 用 Hep-2 细胞培养病毒, 微量细胞 CPE 滴定法测病毒滴度^[3]。

(三) 实验结果统计学处理方法:

1. 蒸馏水中病毒回收率

$$= \frac{\text{浓缩物病毒滴度} \times \text{浓缩物体积}}{\text{投入病毒量}} \times 100\% [4]$$

2. 河水、污水中病毒回收率

$$= \frac{\text{加病毒标本浓缩物病毒滴度} \times \text{浓缩物体积} - \text{未加病毒标本浓缩物病毒滴度} \times \text{浓缩物体积}}{\text{投入病毒量}} \times 100\%。$$

结 果

一、三种浓缩方法的比较:

用滤膜法、皂土法、 $Al(OH)_3$ 沉淀法对含脊髓灰质炎病毒蒸馏水标本进行 100 倍浓缩, 比较各方法的回收率, 结果见表 1。

表 1 三种浓缩方法回收率比较

Table 1. Comparison of virus recovery rate among 3 concentration methods

浓缩方法	实验次数	测得病毒平均滴度	平均回收率(%)	标准差
病毒对照标本	3	2520	100	±0.3978
滤膜法	3	1230	48.85	±0.035
皂土法	3	1249	49.57	±0.3978
$Al(OH)_3$ 沉淀法	2	1230	48.85	

其中 $Al(OH)_3$ 沉淀法浓缩液对细胞有很大毒性。

二、不同浓度 NaCl 对滤膜法回收率的影响:

在已知病毒蒸馏水标本中加入不同浓度 NaCl 对滤膜法回收率有显著影响, 且差异很大 (见表 2)。

三、1% NaCl 加 $AlCl_3$ 浓缩河水、污水标本中脊髓灰质炎病毒回收方法的建立:

在河水、污水已知脊髓灰质炎病毒标本中加 1% NaCl 及 0.0005mol/L (河水) 或 0.001mol/L (污水) $AlCl_3$, 分别取未处理水样, 沉渣洗脱液和上清滤膜浓缩液三种标

表2 不同浓度 NaCl 对滤膜法回收率之影响
Table 2. Effect of different concentrations of NaCl on the recovery rate before filtration with millipore membrane

NaCl 浓度	实 验 数	平均病毒滴度	平均回收率(%)
病毒对照标本	2	2524.5	100
0	2	1230	48.72
0.87	1	1259	49.87
1	2	2516	99.66
3*	1	1288	51.02

*以浓度接种孔中细胞变大变圆,为高渗透性CPE

本接种细胞,测定各自的病毒滴度。同时做各标本未加病毒的平行对照,结果见表3。

表3 NaCl-AlCl₃浓缩河水、污水中脊髓灰质炎 I 型病毒回收率
Table 3. Concentration of virus in river water and sewage water samples by NaCl-AlCl₃ precipitation

标 本	实 验 数	平均病毒滴度	回收率(%)
病毒对照标准	1	+ 12020	100
Polio V ₁ 蒸馏水标本滤膜浓缩液	1	11480	95.55
Polio V ₁ 河水标本浓缩前液	2	0	0
Polio V ₁ 河水上清滤膜浓缩液	2	0	0
Polio V ₁ 河水沉淀洗脱液	2	11350	94.44
Polio V ₁ 污水标本浓缩前液	2	0	0
Polio V ₁ 污水标本上清滤膜浓缩液	2	0	0
Polio V ₁ 污水标本沉淀洗脱液	2	11090	92.23

平行对照标本各液中均无CPE

四、标本浓缩液对细胞毒性的处理:

河水、污水标本中杂质对细胞常有毒性,我们将标本接种12小时后进行单层细胞换液,毒性反应均在24小时内消失,其结果不影响病毒的CPE。

讨 论

1. 三种浓缩方法对人工加脊髓灰质炎病毒标本的回收率基本相同,与目前国内外报道的情况近似^[4,5]。滤膜法水样量虽大,但受水中杂质增多而出现阻孔现象,皂土法回收率略高,但因受容器及操作的限制水样量较小,Al(OH)₃沉淀法之浓缩液对细胞有毒性。

2. 在蒸馏水标本中加1%NaCl可将滤膜法的回收率提高到90%以上,病毒吸附时pH3.5~4.5最好,洗脱时pH以11~11.5为好,用1%NaCl加AlCl₃浓缩河水、污水中病毒时,标本不需调pH,回收率在90%以上,重复性好、不受水质影响,水样量可大可小,操作简便,价格低廉。目前国内外文献中尚未见类似报道。

3. 我们对河水、污水标本加脊髓灰质炎病毒前未经高压灭菌处理,其理由在于考

虑加热处理后与自然情况可能有较大的差异。用加病毒和不加病毒二种标本进行平行对照,更能说明某些浓缩方法对自然界水标本中病毒浓缩的情况。

4. 1% NaCl 加 AlCl₃ 浓缩方法检测河水、污水中病毒的工作进行了人工标本试验,现场标本试验结果有待研究计划完成后另行报道。

参 考 文 献

- (1) 吴皎如, 1984, 流行病学续编, 人民卫生出版社, 第100~111页。
- (2) Moore et al., 1974, Virus Survival in Water and waste Water Systems, Univ. Texas, Maline & Sagik eds, pp3.
- (3) 刘秉辉等, 1985, 江苏医药, 11(3): 封3。
- (4) 吴联熙等, 1988, 卫生研究, 15(5): 23~27。
- (5) Sobsey MD et al., 1980, Appl Environ Microbiol 40(2): 201~210.

Comparison of 3 Methods of Concentration of Poliovirus in Water Samples and Establishment of an Improved Method

You Feng-xing et al

(Public Health and Preventative Station, Wuxi, Jiangsu Province 214002)

This paper described the quantitative comparison of 3 methods concentrating poliovirus type 1 artificially added into the water samples. The preliminary results showed that the recovery rate of the virus in the water samples was similar (47—49%) among the 3 methods. It was discovered that the addition of 1% NaCl into virus contaminated distilled water sample increased significantly the virus-recovery rate with milliporous membrane filtrating method and we established an improved process of virus concentration of river water and sewage water samples artificially contaminated by poliovirus, that is, the addition of 1% NaCl and AlCl₃ (0.0005mol/L for river water, 0.001mol/L for sewage water) before centrifugation. It was surprising to find that in all artificially samples virus recovery rate increased doubly (92—99%) with this improved concentration method.

Key words: Detection of water virus Concentration of water
Poliovirus type 1