维普资讯 http://www.cqvip.com

102-104

臭氧水对水泡性口炎病毒灭活效果的检测

张文福 袁庆霞 王 芳 张丽颖

(军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100071)

R781.53
R187

提要 经检测，在20～26℃室温下，浓度为5.0±1 mg／L的臭氧水溶液，作用30 s，可灭活悬液中水泡性口炎病毒；用其冲洗，作用1 min，可灭活干燥于玻璃片上的水泡性口炎病毒。

关键词 灭活病毒作用 臭氧 水泡性口炎病毒

近年来，有关臭氧消毒的报导虽多，但对病毒的灭活作用尚未见报道。我们选可使人和动物患病，并在动物发病症状上与口蹄疫病毒较为相似的水泡性口炎病毒（RNA类病毒，Vesicular Stomatitis Virus，简称VSV）作为指示病毒，利用深圳唐锋电器实业有限公司生产的臭氧水发生器（产生臭氧浓度为5.0±1 mg／L），观察了臭氧水对VSV的灭活效果。结果报告如下。

1 方法

1.1 细胞培养

Hep-2细胞(ATCC CCL23)即男性白人咽癌组织上皮样细胞。采用DMEM培养液(美国GIBCO-BRL公司产）进行培养。培养箱中二氧化碳浓度为5%。正常细胞经0.25%胰蛋白酶（EMK公司进口分装）。消化后接种传代。48 h后可形成单层细胞。细胞形态用倒置显微镜，放大100倍观察。

1.2 VSV的增殖与滴度测定

将印第安那血清型（Indiana serotype）VSV原液（与Hep-2细胞均由中国预防医学科学院病毒研究所提供）用DMEM培养液作10倍稀释。取其1 ml加入长满单层Hep-2细胞的40 cm^2空斑瓶内，摇匀。在37℃下吸附2 h后弃上清液，再加入8 ml DMEM培养液，按常规条件作细胞培养。当细胞病变达到75%时，收集细胞悬液，放入冰浴的无菌容器内。用功率250 W的超声仪破碎细胞，于4℃离心（5000 r／min）15 min，弃沉淀。将上清液用3 μm硝酸纤维素膜过滤后，装入半透膜透析袋中（8000～10000 MW）。在4℃条件下，用50%聚乙二醇浓缩至原体积的1／10，分装、-70℃存放。

病毒滴度测定采用组织培养半数感染量法(tissue culture infection dose，$TCID_{50}$)。用96孔聚苯乙烯板做细胞培养，待细胞长满单层后弃培养液，用D-Hank液洗涤细胞。然后，每孔加入0.1 ml用DMEM液稀释的不同稀释度的VSV。每个稀释度平行接种4孔。常规条件下吸附4～5 h后弃上清，再加入DMEM继续培养，并观察细胞病变。根据Reed-Muench方法计算VSV的$TCID_{50}$。

试验在室温下（20～26℃）进行。

1.3 稀释中和法去除残留消毒剂试验

根据文献报告和细菌消毒试验，有机物可中和低浓度臭氧的残留作用。本试验采用10%小牛血清作为中和剂，并采用稀释中和法来验证其效果。试验用悬液法进行，分5组：①消毒液4.5 ml+0.5 ml病毒→D-Hank液10倍系列稀释，测定病毒滴度；②消毒液4.5 ml + 0.5 ml病毒→含10%新生牛血清（超级无支原体，杭州四季青生物工程材料研究所产）的DMEM培养液（稀释中和液）10倍系列稀释，测定

维普资讯 http://www.cqvip.com

病毒滴度；③（消毒液 0.45 ml + 4.05 ml 含血清 DMEM 培养液）+ 0.5 ml 病毒→测定病毒滴度；④含血清 DMEM 培养液 4.5 ml + 0.5 ml 病毒→测定病毒滴度；⑤含血清 DMEM 培养液 4.5 ml + 0.5 ml 消毒液→测定对细胞的影响。加病毒后均作用 15 s。判定标准与细菌消毒中和试验相似，第⑤组要求对细胞生长无不良影响。

1.4 悬液法消毒试验

将保存的 VSV 悬液用 D-Hank 液稀释 100 倍至 $TCID_{50}$ 为 10^7/ml 待用。试验时，向每支试管加臭氧发生器即刻产生的臭氧水溶液 4.5 ml，立即加 0.5 ml 待用病毒悬液，电动振摇混匀。作用至规定时间，取 0.5 ml 加入含 10%小牛血清的 DMEM 培养液中。混合后接种长满单层的 96 孔细胞培养板中，必要时作 10 倍系列稀释后接种，每稀释度接种 4 孔，每孔 0.1 ml。在 37℃条件下吸附 4～5 h。去除上清液，换 DMEM 培养液，继续培养至 48 h 观察细胞病变。阴性结果继续培养观察至 7 d。同时用 D-Hank 液代替消毒液作为对照。最终按各处理组残留病毒的 $TCID_{50}$ 计算灭活率。

1.5 载体冲洗法消毒试验

试验载体为 1.0 cm×1.0 cm 玻璃片。滴染病毒悬液后，于 37℃干燥 20 min。试验时，将样片放入无菌平皿中，直接放在臭氧水发生器出水处，连续用臭氧水冲洗消毒，作用至规定时间，再将样片移入 5 ml 含血清 DMEM 培养液中，作用 10 min 以上。取样液 0.1 ml 接种长满单层的 96 孔细胞培养板中，必要时作 10 倍系列稀释后接种，每稀释度接种 4 孔，每孔 0.1 ml。在 37℃条件下，吸附 4～5 h，去除上清液，换 DMEM 培养液，继续培养至 48 h 观察细胞病变。阴性结果继续培养观察至 7 d。同时用 D-Hank 液代替消毒液作为对照。最终按各处理组残留病毒的 $TCID_{50}$ 计算灭活率。

2 结果

2.1 去除残留消毒剂试验结果

试验证明，用含 10%新生牛血清的 DMEM 培养液进行 10 倍稀释，即可去除试验中残留臭氧的抑制病毒作用，且对 Hep-2 细胞的生长无影响（表 1）。

表 1 去除试验中残留臭氧抑制病毒作用试验结果

组别	$TCID_{50}$/ml (lg)
1	1.50
2	2.50
3	6.50
4	6.25

注：试验温度为 20～26℃，结果为 3 次试验平均值，臭氧水浓度为 5 mg/L，作用时间为 15 s，消毒液经含 10%牛血清 DMEM 培养液稀释后，直接接种细胞，对其生长无影响。

2.2 对悬液中 VSV 的灭活作用

试验证明，臭氧水原液作用 0.5 min，对 VSV 的灭活率即可达 100%（表 2）。

表 2 臭氧水原液对悬液中 VSV 的灭活效果

作用时间 (min)	$TCID_{50}$/ml (lg)	灭活率 (%)
0.0（对照）	5.75	…
0.5	0.00	100.00
1.0	0.00	100.00
2.0	0.00	100.00
5.0	0.00	100.00

注：试验温度为 20～26℃，试验重复 5 次。

2.3 对玻片上 VSV 的灭活作用

试验证明，对干燥于玻璃片上的 VSV 病毒，连续用臭氧水冲洗 1 min，灭活率可达 100%(表 3)。

表 3 臭氧水原液冲洗对玻片上 VSV 的灭活效果

作用时间 (min)	$TCID_{50}$/片 (lg)	灭活率 (%)
0.0（对照）	6.25	…
0.5	1.25	99.99
1.0	0.00	100.00
2.0	0.00	100.00
5.0	0.00	100.00

注：试验温度为 20～26℃，结果为 8 次试验平均值。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 结语

试验结果，该臭氧水发生器直接与自来水连接，通电 3 min 后，可连续产生高浓度臭氧水（水温为 18～22℃，臭氧含量为 5±1 mg／L）。在 20～26 ℃室温条件下，该浓度臭氧水作用 30 s，可灭活悬液中水泡性口炎病毒；用臭氧水直接冲洗 1 min，可将干燥于玻璃片上的水泡性口炎病毒全部灭活。

（1997-12-16 收稿 1998-02-27 修回）

TEST FOR EFFICACY OF OZONE SOLUTION IN ACTIVATING VESICULAR STOMATITIS VIRUS 〔Zhang Wenfu, et al. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071〕

Abstract Under the experimental conditions (18～22℃), the vesicular stomatitis virus (VSV) in suspension could be inactivated by 5.0±1 mg／L ozone solution in 30 sec. VSV dried on glass slide could also be inactivated in 1 min by washing with the ozone solution at same concentration.

Key words *virus inactivation* *ozone* *vesicular stomatitis virus*

104-106 (10)

高氧化还原电位酸性水杀灭微生物效果及其稳定性的试验观察

易建云 陈柏铭 麦景璇 刘瑞卿 魏小平

（广州医学院第一附属医院，广州 510120）

R187

提要 高氧化还原电位酸性水的氧化还原电位 > 1100 mV，pH 值 < 2.7。经检测，该水对无有机物保护的细菌繁殖体与白色念珠菌作用 1～5 min，对枯草杆菌黑色变种芽胞作用 20 min，杀灭率均为 100%。用于擦拭工作台面或浸泡阴道窥器 1～2 min，对自然菌的灭除率分别为 87.92%与 74.80%～80.49%。放置室温下 3 d，该水氧化还原电位明显下降，但 pH 值无明显变化。

关键词 高氧化还原电位酸性水 杀灭微生物作用 稳定性

杀灭试验

高氧化还原电位酸性水（下简称高电位酸性水），是用强电解水生成装置电解含 0.05%食盐（氯化钠纯度 > 99%）的自来水或纯水而成。用带有分离隔膜的 Safe lyzer SL-2500 型强电解水生成装置（日本东亚医用电子株式会社产），经白金钛合金电极电解上述水液，在阳极可产生氧化还原电位（ORP）> 1100 mV 的酸性（pH < 2.7）水，在阴极则产生氧化还原电位较低的碱性水。我们对该设备所产生的高电位酸性水杀灭微生物的效果与稳定性进行了实验观察。现将结果报告如下。

1 方法

1.1 定量杀菌试验

试验菌为金黄色葡萄球菌（ATCC 25923）、铜绿假单胞菌（ATCC 27853）、大肠杆菌（ATCC 25922）、白色念珠菌（临床参考株）与枯草杆菌黑色变种（ATCC 9372）芽胞。试验时，将 0.5 ml 菌