

高原地区流感病毒培养的条件优化*

胡澜怀, 周霞 (攀枝花市疾病预防控制中心, 四川攀枝花 617000)

摘要:目的 探索高原地区流感病毒在犬肾细胞(MDCK)上的最佳培养条件,提高流感病毒的分离效果。方法 将原始标本分别接种于MDCK细胞,通过比较CO₂百分浓度(5%,4.8%,4.6%,4.4%,4.2%),TPCK-胰酶浓度(1,2,3,4,5,6,8,10 μg/ml),接种量(100,200,300,400,500 μl),培养时间(48,72,96,120,144 h),接种方法(吸附接种,直接接种),培养容器(细胞瓶,6孔板)对流感病毒的影响,确定最佳培养条件,对分离的各型病毒用红细胞凝集(HA)检测病毒滴度。结果 通过病毒血凝素滴度结果比较,4.4% CO₂与4.6% CO₂,2 μg/ml TPCK-胰酶,300 μl与400 μl的接种量、吸附接种、72 h~96 h的培养时间、6孔板收获的病毒血凝素滴度高。结论 在高原地区实验室建立了MDCK细胞培养流感病毒的最优条件。

关键词:流感病毒;犬肾细胞;培养条件

中图分类号:R373.13;R446.5 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)03-131-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.037

Exploration of the Most Suitable Condition for Culturing Influenza Virus on Plateau Region

HU Lan-huai, ZHOU Xia

(Panzhihua Center for Disease Control and Prevention, Sichuan Panzhihua 617000, China)

Abstract: Objective To explore the most suitable condition of influenza virus which was culturing on plateau region, and improve the effect of the separation of influenza virus. Methods The original specimens were respective inoculated in MDCK cells, by comparing CO₂ percent concentration (5%, 4.8%, 4.6%, 4.4%, 4.2%), TPCK-pancreatic enzyme dosage (1, 2, 3, 4, 5 μg/ml and 6, 8, 10 μg/ml), inoculation amount (100, 200, 300, 400, 500 μl), incubation time (48, 72, 96, 120, 144 h), inoculation methods (adsorption, direct inoculated), and culture vessel (cells, 6 orifice) that were influenced on influenza virus, the best culture conditions was determined. Hemagglutination (HA) method was used to detect the virus titers. Results Through the comparison, the HA titer of virus was in the highest titer with 6 orifice plate culture vessel, 4.4% CO₂ and 4.6% CO₂, 2 μg/ml TPCK-pancreatic enzyme, 300 μl and 400 μl inoculation amount, 72h~96h of incubation time. Conclusion

The optimal condition of the influenza virus cultured with the MDCK cell has been established in the laboratory on plateau region.

Keywords: influenza; MDCK cells; culture condition

流行性感(简称流感)是世界卫生组织(WHO)第1个实行全球监测的传染病,用犬肾细胞(MDCK)分离的流感病毒,抗原性和基因特性比较稳定,比用鸡胚分离的病毒更接近自然流行株^[1],而连续细胞系MDCK已被用于生产流感疫苗^[2,3],国内各地市级疾控流感实验室也将MDCK分离流感病毒作为第一选择。该中心于2005年成为国家流感监测网络实验室,即用MDCK分离流感病毒,按照《流行性感(病毒)诊断标准WS285-2008》标准^[4]与《国家流感中心标准操作规程》(修订版)^[5]进行操作,在工作中发现该地区海拔为1320米,用MDCK分离培养流感病毒与平原地区(<1000米)存在某些条件差异,通过对用MDCK接种流感标本的培养条件进行优化,为高原地区(海拔>1000米)分离流感病毒提供参考。

1 材料与方

1.1 研究对象 流感病毒为本实验室分离保存、经国家流感中心复核鉴定的各型流感病毒;MDCK为实验室冻存使用的32-57代细胞;流感阳性标本为该实验室2014年收集保存的原始标本。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM,0.75 ml/dl BSA(V),HEPES,0.25 g/dl EDTA-胰酶,青链霉素等由北京友康生物生产;胎牛血清与TPCK胰酶由Gibco公司提供,豚鼠血细胞自配,二氧化碳孵箱,6孔细胞板,T25细胞瓶。

1.3 方法

1.3.1 不同百分含量CO₂分离的病毒血凝素滴度比较:细胞长满90%±的6孔板用DMEM液洗涤2次,每孔加阳性标本300 μl,轻轻转动数次,37℃吸附80 min,弃标本液,加6 ml维持液,置于4.2%,4.4%,4.6%,4.8%,5%的CO₂孵箱内34℃培养72~144 h,细胞病变≥80%收毒,-70℃

* 作者简介:胡澜怀(1962-),男,副主任技师,研究方向:微生物检验与质量控制。

通讯作者:周霞,E-mail:pzhcdczx@163.com。

冻融1次,检测病毒血凝素滴度。

1.3.2 不同 TPCK 胰酶浓度分离的流感病毒血凝素滴度比较:每份阳性标本接种8孔,维持液中的 TPCK 胰酶浓度为1,2,3,4,5,6,8,10 $\mu\text{g/ml}$,4.4%的 CO_2 孵箱,其余操作步骤同1.3.1。

1.3.3 不同接种量分离的流感病毒血凝素滴度结果比较:每份阳性标本分别按100,200,300,400,500 μl 接种,接种量 $<300 \mu\text{l}$ 的先孔内补加维持液,使孔内液体 $\geq 400 \mu\text{l}$;其余操作步骤同1.3.1。

1.3.4 不同培养时间分离的流感病毒血凝素滴度结果比较:每份阳性标本接种5孔,分别培养48,72,96,120,144 h 后收获病毒,其它操作步骤同1.3.1。

1.3.5 不同接种方式分离流感病毒血凝素滴度比较。

1.3.5.1 吸附接种:阳性标本与病毒液的操作步骤同1.3.1。

1.3.5.2 直接接种:每孔加入6 ml 维持液,再将300 μl 阳性标本或病毒液直接加入,轻轻转动数次,其它操作步骤同1.3.1。

1.3.6 不同器皿分离的流感病毒血凝素滴度比较:将34株不同亚型的病毒稀释至血凝素滴度为1:2; T_{25} 瓶8 ml 维持液加病毒液500 μl ,6板孔6 ml 维持液加病毒液300 μl ,其他操作步骤同1.3.1。

1.4 统计学分析 病毒分离率差异用卡方检验,病毒血凝素滴度差异用秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同百分浓度 CO_2 分离的病毒血凝素滴度结果 见表1。病毒血凝素滴度随着 CO_2 百分浓度的升高出现先升高再下降的趋势,染毒培养72 h,在5.0%的 CO_2 孵箱内病毒维持液多为浅黄色($\text{pH}\leq 6.7$)及少数黄色($\text{pH}<6.4$),在4.8%的 CO_2 孵箱内病毒维持液多为浅黄色($\text{pH}\leq 6.7$),在4.2%的 CO_2 孵箱内病毒维持液多为紫红($\text{pH}\geq 7.8$);染毒培养144 h,在4.6%的 CO_2 孵箱内病毒维持液有2个样为浅黄,在4.4%的 CO_2 孵箱内病毒维持液无颜色改变。流感病毒血凝素滴度峰值出现在4.4% CO_2 和4.6% CO_2 。

2.2 不同 TPCK 胰酶浓度分离的病毒血凝素滴度结果 见表2。病毒血凝素滴度随着 TPCK 胰酶浓度的升高出现先升高再下降的趋势,各亚型病毒的平均血凝素滴度峰值出现在 TPCK 胰酶浓度为2 $\mu\text{g/ml}$ 时。TPCK 胰酶浓度不同分离的病毒血凝素滴度差异有统计学意义($\chi^2=10.31, P<0.01$);TPCK 胰酶浓度为2 $\mu\text{g/ml}$,与1,6,8,10

$\mu\text{g/ml}$ 分离的病毒血凝素滴度差异有统计学意义。

表1 不同百分含量 CO_2 分离的流感病毒 HA 滴度结果

CO_2 (%)	HA 滴度				
	季 H ₁ N ₁ *	甲型 H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	Bv*	By
4.2	8	8	32	16	64
4.4	16	16	64	32	128
4.6	16	16	64	32	128
4.8	16	8	32	32	64
5.0	16	8	32	32	64

注:* 病毒液。

表2 不同 TPCK 胰酶浓度分离流感病毒 HA 滴度结果

TPCK 胰酶 ($\mu\text{g/ml}$)	平均 HA 滴度		
	甲型 H ₁ N ₁ *	H ₃ N ₂	By
1	13	10	64
2	19	28	94
3	19	12	45
4	16	12	38
5	13	11	32
6	10	8	27
8	8	5	27
10	4	5	19

2.3 不同接种量分离的病毒血凝素滴度结果 见表3。随着标本接种量的增加病毒血凝素滴度出现先升高再下降的趋势;300 μl 接种量为甲型流感病毒血凝素滴度峰值,400 μl 接种量为 By 病毒血凝素滴度峰值。不同接种量分离的流感病毒血凝素滴度差异有统计学意义($\chi^2=4.36, P<0.01$),100 μl 接种与200 μl ~500 μl 接种分离的病毒血凝素滴度的差异有统计意义。

表3 不同接种量分离的流感病毒 HA 滴度结果

接种量 (μl)	平均 HA 滴度			分离及 HA 结果		
	甲型 H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	By	HA $\geq 1:8$	HA $< 1:8$	阴性
100	16	5	5	9	2	5
200	22	17	8	12	3	1
300	22	23	9	14	2	0
400	22	19	16	16	0	0
500	22	15	14	16	0	0

2.4 不同培养时间分离的病毒血凝素滴度结果 见表4。病毒血凝素滴度随着培养时间的增加出现先增高后降低的趋势;H₃N₂ 有2个标本的血凝素滴度最高点在120 h,其余样本标本的血凝素滴度最高点为72~96 h。不同培养时间分离的病毒血凝素滴度差异有统计学意义($\chi^2=4.86, P<0.01$)。

表4 不同培养时间分离的病毒 HA 滴度结果

培养时间 (h)	标本平均 HA 滴度			分离及 HA 结果		
	甲型 H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	Bv	HA \geq 1:8	HA<1:8	阴性
48	2	3	7	6	4	5
72	10	8	32	11	3	1
96	16	8	45	14	1	0
120	13	9	29	14	1	0
144	8	9	29	13	2	0

表5

不同接种方式分离的病毒 HA 滴度结果

接种 方式	病毒液 HA 滴度				标本平均 HA 滴度			标本分离 HA 滴度结果		
	甲型 H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	Bv	By	甲型 H ₁ N ₁	H ₃ N ₂	By	HA \geq 1:8	HA<1:8	阴性
直接	16	32	16	64	1	3	12	7	4	3
吸附	16	32	16	64	4	12	27	10	4	0

2.6 不同器皿分离的流感病毒结果及 HA 滴度比较 见表6。6孔板分离的34株病毒血凝素滴度在1:8~1:128之间;T₂₅细胞瓶分离的29株病毒血凝素滴度在1:2~1:128之间,有5株病毒1代为阴性;6孔板与T₂₅细胞瓶分离病毒的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=2.12, P>0.1$);6孔板与T₂₅瓶分离的病毒血凝素滴度差异有统计学意义($\chi^2=5.4, P<0.05$)。

表6 不同器皿分离的流感病毒结果及 HA 滴度比较

器皿 种类	分离结果			HA 滴度		
	阳性	阴性	分离率(%)	平均 HA 滴度	HA \geq 1:8	HA<1:8
细胞板	34	0	100	31	33	1
细胞瓶	29	5	85.29	11	23	5

3 讨论 CO₂ 既是细胞代谢产物,亦是细胞所需成分,主要是维持培养液的 pH 值;病毒培养过程中,监测方案中 CO₂ 孵箱中气体环境是 95%(v/v)的空气和 5%(v/v)的 CO₂,为平原地区培养流感病毒 CO₂ 的百分浓度设置。在高原地区,因气压低,气体密度小,空气中氧含量较平原地区低,氮含量较平原地区高;该实验室地处高原地区(海拔 1320 米),工作中发现按监测方案要求将 CO₂ 设为 5%(v/v)培养 48~96 h,细胞板内的病毒维持液多呈酸性的黄色(pH<6.4),将 CO₂ 设置为 4.4%(v/v)培养 144 h 细胞板内的病毒维持液颜色未变(pH 为 6.8~7.6);动物细胞以在微碱性环境(pH 在 7.2~7.4)生长为佳,以 pH 不超出 6.8~7.6 为宜,郭琦等^[6]报道用 Vero 细胞培养 H₃N₂ 流感病毒 pH 值为 7.15~7.64 时病毒血凝素滴度最高。当病毒维持液 pH<6.7 时,不仅影响细胞生长致细胞过早脱落,还会降低胰酶的活性,使病毒再次感染力降低,影响病毒血凝素滴度;CO₂ 为 4.2%(v/v)培养 72 h 有的病毒维持液 pH>7.8,因此将 4.4%(v/v)的 CO₂ 定为该实验室培养流感病毒的最优条件之一。

2.5 不同接种方式分离的病毒血凝素结果 见表5。病毒液直接接种与吸附接种分离的病毒血凝素滴度差异无统计学意义($\chi^2=0.000, P=1$)。样本直接接种与吸附接种分离的病毒血凝素滴度差异有统计学意义($\chi^2=4.67, P<0.05$),样本直接接种与吸附接种分离的病毒阳性率差异无统计学意义($\chi^2=3.36, P>0.05$)。

胰酶可使病毒在复制过程中不具有感染性的非裂解型血凝素变为具有感染性的血凝素^[7],感染性的血凝素与细胞表面含唾液酸的受体结合,使病毒颗粒吸附到细胞表面,通过胞饮进入细胞,并介导病毒颗粒的包膜与细胞内小体膜融合进入细胞质进行繁殖^[8]。MCDK 细胞不含此类酶,加入少量的胰酶可增加感染性血凝素的裂解量,有助于流感病毒的增殖^[9]。加入的胰酶过低会减少感染性血凝素的裂解量,使病毒染毒力降低;加入的胰酶过高会导致细胞过早脱落死亡,影响病毒复制;加入的胰酶适量,病毒感染力强,能收获较高血凝素滴度的病毒。该实验结果显示,当 TPCK 胰酶浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$ 时病毒血凝素滴度最高,与国家流感中心标准操作规程^[5]及赵晓辉等^[10]研究中的浓度一致,与赵斌秀等^[11]报道的最佳浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$ 有差异。

该实验室 6 孔板标本接种量为 300~400 μl (31~41 $\mu\text{l/cm}^2$) 时收获的病毒血凝素滴度最高,与赵晓辉等^[10]的甲型流感病毒为 75~100 $\mu\text{l/cm}^2$ 、周大宇等^[12]报道的甲型流感病毒 90 $\mu\text{l/cm}^2$ 和乙型流感病毒 120 $\mu\text{l/cm}^2$ 的接种量有差异;培养时间为 72~96 h 病毒血凝素滴度最高,这和赵斌秀等^[11,13,14]报道的用病毒液接种培养 72~96 h 病毒血凝素滴度最高一致。病毒接种过多,会产生干扰缺损病毒,抑制子代病毒复制及血凝素滴度增长;接种病毒过少,病毒要经过多次循环复制,血凝素滴度峰值出现时间会延后,在工作中有的标本培养 144 h 后收获的病毒血凝素滴度才达 1:1。不同地区的标本采集有一定的质量差异,可根据当地采样质量来确定标本的最佳接种量。病毒液吸附接种与直接接种分离病毒结果无差异,与陈润莉等^[15]的报道相同,这是因为病毒液的组分与维持液相同,直接接种不会影响细胞生长和病毒复制,病毒血凝素滴度不受抑制;标本液吸附接种优于直

接接种,与陈润莉等的建议不同,原因是标本液中含较高量的抗生素(1 000 u/ml),对细胞有一定毒性,标本液与维持液的组成成分不同,对细胞生长不利,影响病毒血凝素滴度;盲传第Ⅱ代时选择直接接种可简化操作,节省时间,减少污染。细胞板培养病毒血凝素滴度高于细胞瓶,且操作省力省时,所需细胞量及试剂较少,建议有CO₂孵箱的基层实验室用细胞板培养病毒,但在操作时各环节都要特别注意操作动作轻微,避免动作过大孔内液体溅出或荡出引起相邻孔的交叉污染。

流感日常监测工作中,流感病毒的检测及毒株的送检均有时间限制(收样品到检测≤48 h,收到样品到国家流感中心收到病毒≤30天),而基层实验室的检测人员通常会承担多项检测工作,能找出一个节约人力、物力、时间,又能保证较高分离效果的病毒培养方法就显得尤为重要。综合以上试验结果得出海拔1 320米的流感实验室培养流感病毒的最优条件为:用6孔板吸附接种标本液300~400 μl(病毒血凝素滴度<1:8者将之稀释为1:2直接接种),37℃吸附80 min,2 μg/ml TPCK胰酶维持液6 ml,4.4%(v/v)CO₂孵箱,34℃培养3~6天,细胞病变≥80%收毒,-80℃冻融1次,血凝素测血凝滴度,HI鉴定型别。

流感病毒的MDCK细胞培养法是目前各基层流感实验室的常用技术,细胞培养法影响环节多,操作繁琐,培养过程中的各个细节处理不好将会直接影响病毒分离效果,该比对试验为高原地区流感网络实验室流感病毒分离培养提供了最优的条件选择。

参考文献:

- [1] Bock A, Schulze-Horsel J, Schwarzer J, et al. High-density microcarrier cell cultures for influenza virus production[J]. *Biotechnology Progress*, 2011, 27(1): 241-250.
 - [2] Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines[J]. *Expert Rev Vaccine*, 2009, 8(12): 1681-1692.
 - [3] Sun B, Yu X, Kong W, et al. Production of influenza H1N1 vaccine from MDCK cells using a novel disposable packed-bed bioreactor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(3): 1063-1070.
 - [4] 中华人民共和国卫生部. 流行性感冒病毒诊断标准WS285-2008[S]. 北京:人民卫生出版社,2008.
 - [5] 中国疾病预防控制中心,病毒病预防与控制所. 国家流感中心标准操作规程(修订版)[S]. 北京:国家流感中心,2007:37-39.
 - [6] 郭琦,耿兴良,龙云凤,等. H₃N₂流感病毒冷适应株的无血清培养[J]. *医学研究杂志*, 2015, 44(7): 26-29.
 - [7] Booth JC, O'Grady J, Neuberger J. Clinical guideline on the management of hepatitis[J]. *Gul*, 2001, 49(suppl 1): 11-21.
 - [8] 李颖,马红梅,焦丽辉,等. 两种流感病毒检测方法敏感性研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(11): 2487-2488, 2497.
 - [9] 陈敬贤. 诊断病毒学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:116.
 - [10] 赵晓辉,周大宇. 甲型流感病毒在MDCK细胞上培养条件的优化[J]. *卫生研究*, 2014, 43(2): 210-212, 218.
 - [11] 赵斌秀,李炎,何维英,等. 流感病毒对两种细胞敏感性的比较[J]. *中国消毒学杂志*, 2008, 25(5): 463-465.
 - [12] 周大宇,李春,赵晓辉,等. 流感病毒在MDCK细胞上培养条件的优化[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(18): 3368-3370, 3383.
 - [13] 戚凤春,汪春义,张雪梅,等. 两种细胞培养流感病毒的滴度比较[J]. *中国生物制品学杂志*, 2006, 19(3): 291-292, 318.
 - [14] 张建伟,史爱华,沈佳,等. 不同培养基对H9亚型禽流感病毒在MDCK细胞上的增殖效果研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(8): 4609-4611.
 - [15] 陈润莉,周海涛,侯红斌,等. 流感病毒在MDCK细胞上的培养条件优化[J]. *实用预防医学*, 2011, 18(7): 1203-1205.
- Chen RL, Zhou HT, Hou HB, et al. Optimization of MDCK cell culturing condition for the cultivation of influenza virus[J]. *Practical Preventive Medicine*, 2011, 18(7): 1203-1205.
- Guo Q, Geng XL, Long YF, et al. Cultivation of cold-adapted influenza virus strain H3N2 with serum-free medium[J]. *J Med Res*, 2015, 44(7): 26-29.