

血清对Ⅱ型脊髓灰质炎病毒感染性滴度检测结果的影响

张 名 伍胤杰 沈武玲 周 健 寸怡娜 平 玲 彭 佳 孙明波

摘 要 **目的** 比较 6 种不同血清对Ⅱ型脊髓灰质炎病毒感染性滴度(CCID₅₀)检测结果的影响。**方法** 分别采用 6 种未处理血清和 6 种预处理血清组(免疫吸附法)进行Ⅱ型脊髓灰质炎病毒感染性滴度检测(微细胞病变法),检测了不同组血清中Ⅱ型脊髓灰质炎病毒中和抗体滴度,并使用处理血清组进行促细胞生长试验。最后分析不同血清对感染性滴度的影响。**结果** 6 种未处理血清组病毒感染性滴度检测结果差异有统计学意义($P < 0.01$),6 种处理血清组病毒感染性滴度差异无统计学意义($P > 0.05$)。未处理组 2 号血清的中和抗体滴度为 1:4,6 号血清的中和抗体滴度为 1:8,其余各组血清的中和抗体滴度均 $< 1:4$ 。6 种处理血清组的中和抗体滴度均为 1:2。血清促细胞生长试验显示 6 种处理组血清细胞生长趋势正常。**结论** Ⅱ型脊髓灰质炎病毒感染性滴度检测前使用免疫吸附对血清进行预处理,可降低血清中存在的中和抗体对检测的影响,为比较不同实验室数据提供可能。

关键词 脊髓灰质炎病毒 滴度 中和抗体 血清

中图分类号 R4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.011

Influence on Type II Poliovirus of Infectious Titers of Serum. Zhang Ming, Wu Yinjie, Shen Wuling, et al. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract **Objective** To compare 6 different serum's influence on type II poliovirus tissue culture median infective dose (CCID₅₀). **Methods** We detected the neutral antibody titer of type II poliovirus using 6 original serum and 6 predisposed serum (immunoadsorption method). At the same time, we also performed cell growth experiment using predisposed serum. In addition, we analyzed the data to find out different serum's influence on type II poliovirus CCID₅₀. **Results** There is a significant difference among the type II poliovirus CCID₅₀ results of the 6 original serum groups. However, an opposite result had been shown in those predisposed serum groups. In addition, we noticed that the neutral antibody titer of type II poliovirus in original serum groups is 1:2 except No.2 group with 1:4. The No.6 predisposed serum group had a 1:8 neutral antibody titer but the other 5 predisposed serum groups share a 1:2 neutral antibody titer. Furthermore, these cells had a normal growth tendency in the 6 predisposed serum groups. **Conclusion** The neutralizing antibody's influence on type II poliovirus CCID₅₀ test can be reduced by predisposing serum through immunoadsorption method, which provides the possibility for different laboratories' data comparison.

Key words Poliovirus; Titer; Neutral antibody; Serum

脊髓灰质炎是由脊髓灰质炎病毒引起,主要通过粪-口途径传播的急性传染病,俗称小儿麻痹症。属小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(Enteroviruse)。病毒直径 24~30nm、二十面球形,无包膜的颗粒^[1]。目前尚无有效抗病毒药物,疫苗是预防该疾病的有效手段。我国一直使用脊髓灰质炎减

毒活疫苗(OPV)预防脊髓灰质炎,并且取得了十分显著的成绩,但是 OPV 存在潜在的疫苗安全性问题,由其引发的疫苗衍生脊髓灰质炎病毒(vaccine-derived poliovirus, VDPV)和疫苗相关麻痹性脊髓灰质炎病例(vaccine associated paralytic poliomyelitis, VAPP)已超过了由野生型病毒引起脊髓灰质炎发生率。为配合 WHO 彻底消灭脊髓灰质炎病毒,减少因接种 OPV 引起的疫苗相关病例和衍生病例,研制脊髓灰质炎灭活疫苗(IPV)势在必行^[2]。目前,中国、日本、和荷兰都在研制生产 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗(Sabin IPV),中国医学科学院医学生物学研究所自主研发的 Sabin IPV 于 2015 年 1 月 14 日获得国家食品药品

基金项目:云南省重大科技专项基金资助项目(2016ZF003);中国医学科学院重大协同创新项目(2016-12M-1-019)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所、云南省重大传染病疫苗研发重点实验室(注:张名和伍胤杰为共同第一作者)

通讯作者:孙明波,电子邮箱:smb@imbecams.com.cn

监管总局批准,成为全球首个 Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗(单苗),并于 2015 年 6 月成功上市。在消灭脊灰的“后 OPV 时代”,为了避免 VAPP 和 VDPA 引起的病例,彻底根除脊髓灰质炎,中国政府决定逐渐用 IPV 替代 OPV,建议第 1、2 剂次先使用 IPV,其余剂次用 OPV,并按 OPV 的免疫程序完成全程免疫^[1,3]。脊髓灰质炎灭活疫苗的使用,可实现世界卫生组织在《消灭脊髓灰质炎最后阶段战略计划(2013~2018 年)》中提出的消灭脊髓灰质炎野病毒和消灭脊髓灰质炎疫苗衍生病毒两个平行目标。因此利用 IPV 将成为全球消灭脊髓灰质炎的必由之举。世界卫生组织也于近期致函我国相关部门,提出将我国生产的 Sabin IPV 引入全球根除脊髓灰质炎行动计划中。

疫苗的免疫效果与病毒含量密切相关,所以准确测定其含量是疫苗有效性的保证^[4]。感染性滴度是重要的活性指标,因此在疫苗生产过程中,为了确保疫苗免疫效果,对疫苗滴度的检测是其质控必不可少的环节^[5]。其间需使用细胞作病毒滴度测定基质,细胞培养过程中使用的血清试剂对脊髓灰质炎病毒感染性滴度的检测结果可能存在的影响是不容忽视的^[6]。且市面上血清试剂的种类繁多,在质量上存在批间差异,增加了疫苗生产检定的不稳定性,和疫苗质量控制的难度^[7]。本研究主要比较了不同血清试剂对 II 型脊髓灰质炎病毒感染性滴度检测的影响,并探寻如何保证 II 型脊髓灰质炎病毒感染性滴度检测结果的有效性和不同实验室间数据的可比性。

材料与方法

1. 细胞株:Hep-2 细胞,由中国医学科学院医学生物研究所提供。sP2/0 细胞,由中国医学科学院医学生物研究所提供。

2. 毒种:II 型 Sabin 株脊髓灰质炎病毒 SO₄₃,由中国医学科学院医学生物研究所提供,保存于-70℃冰箱。II 型脊髓灰质炎病毒灭活单价原液由中国医学科学院医学生物研究所提供。

3. 试剂:血清试剂:1 号(胎牛血清,美国 Gibco 公司 FBS,批号:133067),2 号(新生牛血清,美国 Gibco 公司 NBS,批号:1431092),3 号(新生牛血清,北京民海生物科技有限公司,批号:20130131),4 号(新生牛血清,北京民海生物科技有限公司,批号:20130701),5 号(新生牛血清,美国 Gibco 公司,批号:111214),6 号(小牛血清,美国 Sigma 公司,批号:

14E010),MEM 细胞培养基(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)。

4. 血清免疫吸附预处理:不同血清以 10:1 比例与 II 型脊髓灰质炎病毒灭活单价原液混合,4℃ 过夜,12000r/min 离心,20min 弃沉淀备用。

5. 病毒感染性滴度测定:采用微量滴定法测定 II 型脊髓灰质炎病毒感染性滴度,病毒做 10 倍系列稀释(10^{-1} 到 10^{-8}),将不同稀释度加至微量细胞板中,每个稀释度 8 孔,每孔 100μl,另设 8 孔只加病毒稀释液作为阴性对照。然后每孔加入 100μl 制备好的 2×10^5 /ml Hep-2 细胞悬液,细胞悬液已分别加入不同血清试剂。置 35℃、5% CO₂ 培养箱培养。7 天结果判定,Kaber 公式计算病毒滴度。

6. 血清中和抗体滴度的测定:采用微量细胞病变抑制法测定血清中 II 型脊髓灰质炎病毒中和抗体滴度。将待测血清置于 56℃ 灭活 30min,1:2 开始在 96 孔板内开始 2 倍系列稀释,每孔 50μl,每个稀释度 2 个复孔。每孔加入 50μl 2000 CCID₅₀/ml II 型脊髓灰质炎病毒稀释液,36℃、5% CO₂ 培养箱中和 3h。然后每孔加入 100μl 密度为 2×10^5 /ml 的 Hep-2 细胞悬液,35℃、5% CO₂ 培养 5 天,观察细胞病变(CPE)。将能抑 50% CPE 的最高稀释度判定为抗体的中和滴度,以抗原稀释度的倒数来表示抗原的中和抑制滴度。以中和抗体滴度 $\geq 1:4$ 表示有中和抑制细胞病变效应(CPE)的作用。

7. 不同处理组血清促细胞生长试验:按照 2015 年版《中国药典》三部通则 114 进行支持细胞增殖检查。sP2/0 细胞用处理组血清适应培养 3 代后,将长成单层的 sP2/0 细胞用不同血清的细胞维持液悬浮,调整细胞浓度为 1×10^5 个/毫升,分别接种于 24 孔培养板中,每孔 1ml,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每天于显微镜下观察细胞形态,每隔 24h 随机取 3 孔进行活细胞计数,每孔计数 3 次,取平均值,绘制细胞生长曲线并计算倍增时间。

8. 统计学方法:用 SPSS 23.0 统计学软件进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 未处理血清组和预处理血清组检测的脊髓灰质炎病毒滴定结果:滴定结果在第 7 天后出现病变的孔数量不再增加,将此时间作为微量板法滴定脊髓灰质炎的终判时间,本实验中所有最低稀释度实验孔全部病变,最高稀释度病变不完全。使用 Kaber 公式计算病毒滴度 LogCCID₅₀/ml,各血清组所测脊髓灰质炎

病毒滴度不同。做方差分析,未处理组差异有统计学意义($P<0.01$)。两两比较后,1、3、4、5 号血清组在同一子集,差异无统计学意义($P>0.05$),2、6 号血清组在同一子集,差异无统计学意义($P>0.05$)。1、3、4、5 号血清组与 2、6 号血清组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。其中 2 号与 1、3、4、5、6 号血清组差异有统计学意义($P<0.01$),6 号与 1、4 号血清组差异极有统计学意义($P<0.01$),6 号与 3、5 号血清组差异有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。而 6 种预处理血清组,差异无统计学意义($P>0.05$,表 3)。未处理 2 号血清组和预处理组 2T 号血清组做两两比较,差异有统计学意义($P<0.05$),6 号未处理组和 6T 号处理组做两两比较,差异有统计学意义($P<0.01$),其余 4 组差异无统计学意义($P>0.05$,图 1)。

表 1 未处理的 6 个血清组检测的脊髓灰质炎病毒滴定结果		
未处理血清组别	次数	Ⅱ型脊髓灰质炎病毒滴度
1 号血清组	5	$8.10 \pm 0.22^*$
2 号血清组	5	7.23 ± 0.27
3 号血清组	5	$7.80 \pm 0.26^*$
4 号血清组	5	$7.90 \pm 0.24^*$
5 号血清组	5	$7.83 \pm 0.26^*$
6 号血清组	5	7.40 ± 0.21

与 2 号和 6 号血清组比较,* $P<0.05$

表 2 未处理组间差异显著性比较	
组别	<i>P</i>
2 号与 1、4 号血清组	0.000
2 号与 3 号血清组	0.001
2 号与 5 号血清组	0.001
6 号与 1 号血清组	0.000
6 号与 4 号血清组	0.004
6 号与 3 号血清组	0.016
6 号与 5 号血清组	0.011

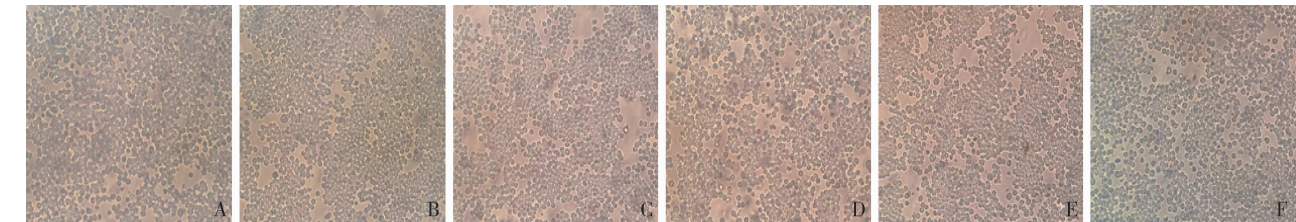


图 2 预处理血清组培养的 sP2/0 细胞形态
A. 1T 号血清;B. 2T 号血清;C. 3T 号血清;D. 4T 号血清;E. 5T 号血清;F. 6T 号血清

讨 论
本研究以Ⅱ型脊髓灰质炎病毒为例通过微滴

表 3 预处理 6 个血清组检测的脊髓灰质炎病毒滴定结果 ($\bar{x} \pm s$)		
预处理血清组别	次数	Ⅱ型脊髓灰质炎病毒滴度
1T 号血清组	5	7.93 ± 0.21
2T 号血清组	5	7.73 ± 0.21
3T 号血清组	5	7.90 ± 0.22
4T 号血清组	5	7.95 ± 0.11
5T 号血清组	5	7.93 ± 0.19
6T 号血清组	5	7.93 ± 0.26

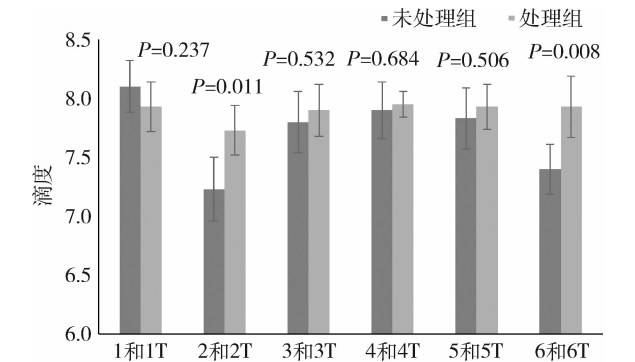


图 1 未处理组和处理组滴度分析
2. 未处理血清组和预处理血清组检测的脊髓灰质炎病毒中和抗体的滴度测定结果:未处理组 2 号的中和抗体血清的滴度为 1:4,6 号的中和抗体血清的滴度为 1:8。其余 4 组中和抗体血清滴度 $<1:4$ 。6 种预处理血清组中和抗体的滴度均为 1:2。

3. 不同预处理组血清促细胞生长实验结果:(1) 预处理血清组培养的 sP2/0 细胞的形态:显微镜下观察可见,不同血清培养的 sP2/0 细胞,细胞正常生长,细胞浑圆,透亮,贴壁多,悬浮少(图 2)。(2) 预处理血清组培养的 sP2/0 细胞的生长曲线:6 种预处理血清组培养的 sP2/0 细胞均经历潜伏期、对数生长期、稳定(平台)期和衰亡期 4 个生长阶段,生长曲线呈标准的 S 型(图 3)。

法^[8]比较发现,6 种不同血清对Ⅱ型脊髓灰质炎病毒感染性滴度检测差异有统计学意义,随后对 6 种血清

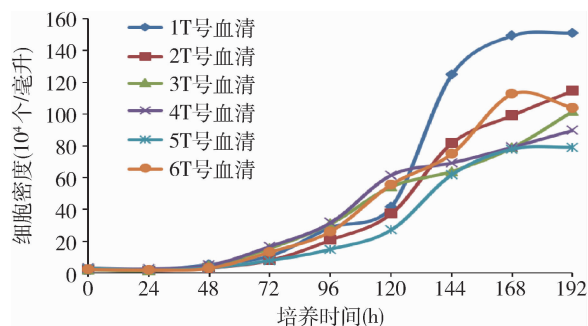


图3 SP2/0 细胞在不同预处理血清培养条件下的生长曲线

进行免疫吸附处理后发现滴度检测差异无统计学意义。本研究从血清试剂的影响进行分析,并采用免疫吸附预处理的方法后减少检测差异,提供了不同实验室间使用不同血清检测数据的比较方法。同时可作为Ⅰ、Ⅲ型脊髓灰质炎病毒滴定的及其他病毒滴定的参考方法。

本实验结果显示不同血清组所测的脊髓灰质炎病毒滴度比较差异有统计学意义,未处理组的1、3、4、5号血清与2、6号血清差异有统计学意义,表明在脊髓灰质炎病毒感染性滴度检测时,使用不同来源不同厂家血清试剂间存在明显差异,增加了滴度检测的不确定性。本研究结果与张金菊等^[9]文献结果有一致也有不同,张金菊等文献中仅得出滴度结果检测有差异,而本实验中未处理组的1、3、4、5号血清组与2、6号血清组滴度检测差异有统计学意义,中和实验结果显示未处理组2号的脊灰血清中和抗体滴度为1:4,6号的血清脊灰中和抗体滴度为1:8,其余4组血清中和抗体滴度<1:4,推测血清中存在的脊灰中和抗体对病毒滴定产生影响^[10]。本实验中处理组血清预处理实验方法根据免疫吸附原理,血清经过脊灰抗原免疫吸附处理后,6种不同血清处理组滴度检测差异无统计学意义,6种不同血清处理组中和抗体的滴度均为1:2,表明血清中存在的中和抗体与Ⅱ型脊髓灰质炎病毒灭活单价原液抗原发生结合,消除了引起中和抑制细胞病变效应(CPE)的作用。同时6种预处理组血清促细胞生长实验表明,细胞正常生长,表明处理后血清都能够满足细胞生长的需求^[11]。

综上所述,本研究通过Ⅱ型脊髓灰质炎病毒滴度检测,发现不同来源和不同厂家的血清试剂对病毒滴度检测实验结果有影响,这就提示针对脊髓灰质炎病毒滴度检测可以从以下3点考虑:①在进行滴度检测前对可能产生影响的因素做到分析排查,对种类繁多

的血清在实验操作前应该进行预处理,如使用病毒抗原免疫吸附处理,该方法简单,易操作,减少因血清试剂的来源和厂牌间质量差异引起的检测差异,提高实验的重复性,从而保证不同实验室间使用不同血清进行日常检测结果的可比性^[12];②将使用前的中和实验作为检测筛选血清试剂的1个标准,减少因血清差异引起检测差异。在检测前对不同的血清试剂,采用微量细胞病变抑制法测定血清中脊髓灰质炎病毒中和抗体滴度,结果判定以中和抗体滴度 $\geq 1:4$ 为阳性。若测定结果为阳性的血清,不建议用于脊髓灰质炎病毒滴度检测;③可以考虑使用无血清培养基进行检测。但因商业化的无血清培养基配方因细胞特性的不同而异,针对性强,通用性差^[7]。在预实验中使用无血清培养基对Hep-2细胞贴壁效果差,需进一步挑选针对性强的培养基配方,为后续无血清检测方法提供实验依据。

参考文献

- 1 王军志. 疫苗的质量控制与评价[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013:673-699
- 2 赵玉秀,李爱灵,梁宏阳,等. Sabin株脊髓灰质炎灭活疫苗在动物体内的免疫原性及安全性评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2015,28(7):665-669
- 3 Andreassen LV, Hansen LB, Andersen P, et al. Aluminium hydroxide potentiates a protective Th1 biased immune response against polio virus that allows for dose sparing? in mice and rats[J]. Vaccine, 2015, 33:1873-1879
- 4 谢忠平,宋霞,崔萍芳,等. OPV疫苗病毒感染性滴度检测的影响因素分析[J]. 中国公共卫生, 2005,21(7):818-819
- 5 宋冬梅,张中洋,鲁卫卫,等. Sabin株脊髓灰质炎灭活疫苗免疫原性研究[J]. 中国新药杂志, 2015,24(8):878-883
- 6 王芳,张名,谢炳峰,等. 铝佐剂和免疫程序对SabinIPV免疫原性研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013,27(2):102-104
- 7 张香玲. Vero细胞无血清培养基的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2015,43(2):67-72
- 8 戴永祥,李克坚,王明秀,等. 用烛斑法和微滴法测定脊髓灰质炎病毒的比较[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1994,8(3):268
- 9 张金菊,张合润,何莹. 血清试剂对脊髓灰质炎病毒滴度影响的比较研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007,17(9):1647-1648
- 10 孙招金,陈炳彪,王玲,等. 不同新生牛血清对体外培养BHK-21细胞的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2012,25(7):862-864
- 11 刘萍,马全英,宋玉霞,等. 不同牛血清促悬浮培养BHK21细胞生长的作用[J]. 安徽农业科学, 2016,44(2):177-178,199
- 12 Walker AT, Williams AJ, Gary HE Jr, et al. Effect of time at temperature on wild poliovirus titers in stool specimens[J]. Virology, 2015, 428:28-31

(收稿日期:2017-08-24)

(修回日期:2017-09-07)