

文章编号:1001-0580(2002)03-0335-02

【广东公共卫生】

用鸡胚和 MDCK 细胞分离流感病毒的实验研究

深圳市卫生防疫站(518020) 刘建军 程小雯 贺连华

摘要:目的 通过两种分离流感病毒方法的比较,提高流感病毒分离率和流感监测效果。方法 对 500 份咽拭子标本同时采用 MDCK 细胞培养法和鸡胚双腔培养法分离。结果 细胞培养法分离流感病毒 35 株,分离率为 7%;鸡胚双腔培养法分离流感病毒 12 株,分离率为 2.4%。共 35 株病毒株,其中 A₃ 型 15 株,S 型 20 株。结论 流感病毒分离中,细胞培养法比鸡胚培养法敏感,同时用两种方法培养,可明显提高流感病毒分病率。

关键词:流感病毒分离 细胞培养 鸡胚接种

中图分类号:R511.7 **文献标识码:**A

Experimental Study on Isolating Influenza Viruses with Chick-embryo and MDCK Cell LIU Jian-jun, CHENG Xiaowen, HE Lian-hua. Department of Microbiolog Test, Shenzhen Municipal Hygiene and Anti-epidemic Station (Shenzhen 518020, China)

Abstract: Objective To improve the isolating rate of influenza viruses and influenza surveillance effect, two methods for isolating influenza viruses were compared. **Methods** Five hundred throat swab samples from patients suffering cold were inoculated on cell culture, and into chick-embryo allantoic and amniotic cavity in the same time. **Results** Thirty five influenza virus strains were obtained by the method of cell culture (7%), 12 strains by the chick-embryo technics (2.4%). Of all the influenza virus strains, 15 strains were type A₃ and 20 strains type B. **Conclusion** The MDCK cell culture is more sensitive than the chick-embryo technics in isolating influenza viruses. By using the two methods of culture in the same time, the isolating rate of influenza viruses can be obviously raised.

Key words: influenza virus isolation; cell culture; chick-embryo inoculation

流感是至今尚无法完全加以控制的一种非常重要的病毒性急性呼吸道传染病,同时也是国际上第一个实现全球监测的传染病。我国被公认为是流感的多发地,中国的流感动态正受到世界各国的关注^[1]。深圳市卫生防疫站是国家流感和 WHO 流感监测协作点之一,为了使我市流感监测走向更系统,更全面和更科学化,我们于 1999 年 5~10 月,对监测标本同时接种 MDCK 细胞和鸡胚双腔,另外,将接种鸡胚阴性而细胞培养 HA 阳性的细胞培养液再转种鸡胚,并对影响其分离率的实验因素作了一些深入探讨。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本的采集和处理 1999 年 5~10 月,每周分别从深圳市两家定点监测医院采集类流感患者咽拭子标本,共计 500 份。标本于当天置冰壶送实验室后,按常规加双抗和先锋,振荡使粘液充分分散后,用干净消毒过的毛细吸管吸到消毒过的样品管中,置 -70℃ 保存待用。

1.2 鸡胚 9~10 日龄鸡胚购自深圳某养鸡场。

1.3 细胞 MDCK 细胞由 CDC 提供,复苏传代制成单层细胞,细胞生长液组成为: Eagle's 营养液 81.5%、谷氨酰胺 1%、小牛血清 12%、HEPES 2.5%、双抗 2%、先锋(1000 单位/ml 头孢曲松钠) 1%、用饱和 NaHCO₃ 溶液调 pH 至 7.2~7.4。细胞维持液组成为: Eagle's 营养液 90%、谷氨酰胺 1%、HEPES 2.5%、0.025% 的胰酶 1%、双抗 2%、先锋 1%、50000 μg/ml 万古霉素 0.1%、500000 μg/ml 多粘菌素 B 0.1%、7.5% 的牛血清白蛋白 2.5%、用饱和 NaHCO₃ 溶液调 pH 至 7.2~7.4。

1.4 1% 人“O”型红细胞 由本站门诊部提供,所有红细胞用 PBS 洗 3 遍,配成 1% 悬液,置 4℃ 保存待用。

1.5 鸡胚接种 按常规双腔法,2 胚蛋/标本,置 35℃ 孵育

72h 后,置 -20℃,1~2h,按常规分别收获尿囊液和羊水,并分别检查 HA 活性。

1.6 细胞接种 常规法,接种量 0.3ml/瓶,2 瓶/标本,置 35℃ 孵育,每天观察 CPE,当 CPE 出现 3~4 个加号时,按常规量法检查维持液中 HA 活性。

1.7 分离物鉴定 采用常量半加敏血凝抑制试验(HI)鉴定(鉴定血清和 RDE 液由国家流感中心提供),并送国家流感和广东省流行病学研究所确证。

1.8 细胞液转种鸡胚再行鉴定 将接种鸡胚阴性而细胞培养 HA 阳性的细胞培养液按常规双腔法转种 9~10 日龄鸡胚,病毒鉴定同“分离物鉴定”。

2 结果

2.1 病毒分离结果(表 1) 所有接种鸡胚阴性而细胞培养 HA 阳性的细胞培养液转种鸡胚后,其 HA 滴度 1/16 的全部在鸡胚中出现阳性,HA 滴度 < 1/16 的在鸡胚中不能传出阳性。接种鸡胚第一代均为阴性的标本盲传一代,其结果都为阴性。

表 1 流感病毒分离结果

方法	接种标本份数	分离病毒株	分离率(%)
细胞培养	500	35	7
鸡胚培养	500	12	2.4

注: $\chi^2 = 11.81, P < 0.01$ 两者具有显著性意义

2.2 分离物鉴定结果 将所有 HA 滴度 1/16 的阳性株用 HI 试验进行鉴定,其结果见表 2 对 HA 滴度 1/8 的阳性株再传代。同一份标本采用鸡胚分离出的病毒株与采用细胞分离出的病毒株均为同型流感病毒。

3 讨论

从表 1 我们可以看到,采用 MDCK 细胞培养法分离流感

病毒比鸡胚培养法敏感,另外,接种鸡胚为阴性而细胞培养 HA 阳性的细胞培养液转种鸡胚,其 HA 滴度必须达到 1:16 才能在鸡胚中传出阳性,由此也说明,细胞培养法比鸡胚培养法敏感。以往只用鸡胚法分离流感病毒则有病毒株漏掉的可

表 2 流感病毒鉴定结果

时间	病毒株数		
	H ₃ N ₂	B	小计
1999.5	2	0	2
1999.6	2	1	3
1999.7	10	2	12
1999.8	1	4	5
1999.9	0	12	12
1999.10	0	1	1

能。两种方法相比,MDCK 细胞培养法有许多优点:病毒分离阳性率高,应急性强,比较经济、方便,可消除其它外界因素的影响,可减少宿主蛋白成分^[2],具有广阔的应用前景。该研究表明,采用鸡胚培养法分离出阳性毒株的原始标本同时接种 MDCK 细胞,90%第一代就出现 HA 滴度 1:32 的阳性株。由此可见,同一标本同时用两种方法培养,这样可提高病毒分离率,有利于及时发现有意义的变异株。

从表 2 可以看到深圳地区 1999 年 5~10 月没有甲 1 型病毒株流行,5~7 月优势流行株是甲 3 型;8~10 月优势流行株是 B 型。

为了提高在实验中的病毒分离率,我们有以下几点体会:(1)在细胞培养法中,由于它的维持液中不存在蛋白水解酶,无法将病毒粒非裂解型的 HA₀ 变成裂解型的 HA₁ + HA₂,故须在维持液中加入适量的胰酶,才能提高流感病毒在细胞中的复制能力^[2]。我们也发现维持液中胰酶的加入与浓度对细

胞接种分离病毒至关重要。Bnlmback 等^[3]用细胞分离流感病毒时,要加入 TDCK-胰酶。我们用普通胰酶代替 TDCK-胰酶,也得到了满意的结果。(2)无论是鸡胚还是细胞培养阳性收获液传代前需经无菌处理,否则易造成污染。(3)为了防止细胞代谢产物使细胞培养液易变酸,加入 HEPES 可起到很好的缓冲作用。(4)细胞液收获之前将细胞冻融 1~2 次,可提高收获标本的病毒滴度。(5)由于流感病毒引起受感染的细胞病变无特殊的指征,故借助显微镜观察 CPE 来判断阳性是不可靠的,需全面进行 HA 试验来判定阳性。

Oxford 等^[4]和 Robertson 等^[5]曾报道,同一份临床标本,用鸡胚和 MDCK 细胞两种方法分离出同型流感病毒或用 MDCK 细胞分离的流感病毒再转种鸡胚,其病毒的有关血清学反应性不同,血凝素氨基酸序列也有不同,以上报道与本文遇到的问题有何关系,有待进一步探讨。

作者简介:刘建军(1964-),女,湖南人,副主任技师,硕士研究生,从事微生物检验工作。

参 考 文 献

- [1] 祁俊林. 国外医学病毒学分册,1998,5(2):41-45.
- [2] 郭元吉,程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京:中国三峡出版社,1997:94.
- [3] Brumback B G, Wade C D. Simultaneous rapid culture for four respiratory viruses in the same cell monolayer using a differential multicolored fluorescent confirmatory stain[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(4):798-801.
- [4] Oxford J S, Corcoran T, Knott R, et al. Serological studies with influenza A (H1N1) viruses cultivated in eggs or in a canine kidney cell line (MDCK) [J]. Bulletin of the world health organization, 1987, 65(2):181-187.
- [5] Robertson J S, Naeve C W, Webster R G, et al. Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs[J]. Virology, 1985, 143(1):166-174.

(2000-12-19 收稿 2001-04-28 修回 宋艳萍编辑 刘铁校对)

文章编号:1001-0580(2002)03-0336-02

【广东公共卫生】

微波萃取气相色谱法测定果蔬中农药残留的研究

广东省疾病预防控制中心(广州 510300) 罗建波 黄伟雄

中图分类号:O657.71

文献标识码:A

污染物分析是卫生检验工作的重点之一。污染物中种类最多、结构最复杂的当数有机污染物,如农药类。如何简便、快捷、有效地从样品中分离待测组分,去除干扰组分,是有机污染物分析的关键环节。传统的 Soxhlet 提取法和超声波提取法耗时(约需 6 小时),溶剂消耗量大(约 100ml)。本文应用微波萃取技术(MAE)提取果蔬样品中的有机氯、有机磷残留量,仅需 20 分钟的提取时间,消耗有机溶剂 15ml,用气相色谱法检测,方法的准确度、灵敏度和回收率都优于其他方法,能满足分析检验工作的要求。报道如下。

1 基本原理

微波是一种非电离的电磁辐射,分子的磁场中运动和偶极转动,而分子结构并不发生任何改变。常用的微波频率为 2450MHz。微波加热是能量直接作用于被加热物质,利用被

加热物质的极性分子,在微波电磁场中快速转向及定向排列,从而产生撕裂和相互摩擦而发热。由于空气及容器对微波基本上不吸收和不反射,从根本上保证了能量传导的快速及能量的充分利用。当样品与有机溶剂混合加入到密闭容器中,置于微波辐射时,溶剂在短时间内被加热至沸点,而且溶剂内外层都达到这一温度,促使样品中的有机污染物组分在较短时间内被提取进入有机溶剂相中,从而提高了方法的提取效率。

2 实验部分

2.1 试剂 石油醚(60~90)分析纯,重蒸;三氯甲烷,分析纯,重蒸;二氯甲烷,分析纯。

2.2 仪器 微波炉 MDS-1 型,中山市华灵电器厂,功率:100-700W,编程可调。消化罐:PTFE 材料,自动卸压装置,可