

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.20.005

2013—2019 年重庆市脊髓灰质炎实验室细胞系质量控制情况分析*

彭靖尧,黄 为,谢武娟,凌 华,张 敏,赵 华[△]

重庆市疾病预防控制中心,重庆 400042

摘 要:**目的** 评价该中心脊髓灰质炎(简称脊灰)实验室所用细胞系的质量控制情况,保障该市脊灰实验室的脊灰病毒病原学检测质量。**方法** 采用聚合酶链反应对 L20B 细胞系和 RD 细胞系培养液进行支原体检测,确定细胞系是否被支原体污染。使用微量 96 孔细胞培养板对 RD 细胞系和 L20B 细胞系进行细胞敏感性实验。**结果** 在 2013—2019 年,该市脊灰实验室使用的细胞系支原体检测结果均为阴性,3 个型别的脊灰病毒在 RD 细胞系和 L20B 细胞系上的细胞敏感性实验结果都在正常范围内波动。**结论** 该市脊灰实验室使用的细胞系质量稳定,能满足脊灰病毒检测敏感性的要求。脊灰实验室的细胞系质量控制具有重要意义,在细胞系质量控制中发现问题必须及时解决,以保证脊灰病毒分离工作高质量地运行。

关键词:脊髓灰质炎; 实验室; 质量控制; 细胞敏感性实验

中图法分类号:R512.4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)20-2929-04

Analysis on cell line quality control situation in poliomyelitis

laboratory of Chongqing city during 2013—2019*

PENG Jingyao, HUANG Wei, XIE Wujuan, LING Hua, ZHANG Min, ZHAO Hua[△]

Chongqing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China

Abstract:**Objective** To evaluate the quality control situation of the cell lines used in the poliomyelitis laboratory of this center for ensuring the quality level of pathogenic detection of poliovirus in Chongqing poliomyelitis laboratory. **Methods** The polymerase chain reaction (PCR) method was used to conduct the mycoplasma detection in culture medium of L20B cell line and RD cell line to determine whether the cell lines were contaminated by mycoplasma. The RD cell and L20B cell lines conducted the cellular sensitivity test by using microcells 96-well culture plates. **Results** From 2013 to 2019, all the cell lines mycoplasma detection results were negative. The cellular sensitivity results of the three serotypes of poliovirus on RD and L20B cell lines fluctuated within the normal range. **Conclusion** The quality of the cell lines used in the Chongqing poliomyelitis laboratory is stable, which can meet the sensitivity of poliovirus detection. The quality control of cell lines in the poliomyelitis laboratory is of great significance. The problems found in quality control of cell lines must be resolved in time to ensure the high quality operation of poliovirus isolation work.

Key words: poliomyelitis; laboratory; quality control; cell sensitivity test

脊髓灰质炎(简称脊灰)是由脊髓灰质炎病毒(PV)急性传染引起,在儿童中发生,以肌肉麻痹为主要症状。PV 在全球曾广泛传播。1988 年世界根除脊灰行动开始后,随着灭活疫苗(IPV)、减毒活疫苗(OPV)在全球范围内的广泛使用,迄今为止,全球范围内脊灰病例已经减少了 99%,世界上绝大多数地区已经消除了脊灰^[1]。从 2000 年开始,中国进入“无脊灰”状态,即没有脊灰野病毒引起的脊灰病例^[2]。但截至目前,我国仍然在广泛使用 OPV,OPV 可能导致

疫苗衍生脊灰病毒(VDPV)的出现,这是在即将消灭脊灰的现阶段工作中所面临的重要问题^[3]。在现阶段,检测 PV 的金标准仍然是细胞分离,我国脊灰网络实验室使用人横纹肌肉瘤细胞(RD 细胞)系和转人脊灰受体的小鼠肺细胞(L20B 细胞)系这两种细胞系对 PV 进行细胞分离。因此,保证 RD 和 L20B 细胞系对 PV 的高度敏感性,对所用细胞系进行有效的质量控制,才能及时分离出标本中低水平的 PV,以确保不漏检脊灰野病毒及 VDPV^[4]。本研究对重庆市疾病预

* 基金项目:重庆市科学技术委员会和重庆市卫生健康委员会合医学科科研项目(2018MSXM077)。

作者简介:彭靖尧,男,主管技师,主要从事脊髓灰质炎病毒分离、鉴定等工作。△ 通信作者,E-mail:zhaohua02@126.com。

防控制中心脊灰实验室 2013—2019 年 PV 分离所用细胞系的质量控制情况进行分析,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 本研究使用的 RD 细胞系和 L20B 细胞系均来自中国疾病预防控制中心脊灰实验室,将所获得的 RD 细胞系和 L20B 细胞系进行传代,建立细胞库冻存于液氮罐中,定期复苏细胞传代备用。

1.1.2 标准毒株 本研究中使用的毒株有细胞敏感性实验参考株(CSTR)和重庆市实验室质控株(LQC)。其中 CSTR 来自中国疾病预防控制中心脊灰实验室,LQC 由重庆市脊灰实验室按照世界卫生组织(WHO)推荐的标准操作规程进行制备^[5]。经历 3 次独立实验后确定平均滴度值(期望值),LQC 确定滴度后分装于冻存管(每管 0.1 mL),超低温冰箱-80℃保存,同时将 LQC 滴度上报 WHO,经反馈认可后用于日常细胞敏感性实验。

1.2 方法

1.2.1 支原体检测 采用聚合酶链反应(PCR)法检测 L20B 和 RD 细胞系有无支原体污染。PCR 试剂使用宝生生物(Takara Bio)的 Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver. 2,使用引物如下,F1:5'-ACA CCA TGG GAG CTG GTA AT-3';R1:5'-CTT CAT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT-3'。引物来自中国疾病预防控制中心脊灰实验室。PCR 反应条件:94℃ 3 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 80 s,32 个循环;72℃ 10 min。阳性扩增产物大小约为 450 bp。

1.2.2 细胞敏感性实验 分别用已知型别和滴度的 LQC 进行检测,具体实验步骤参照 WHO 推荐方法,要求每次细胞敏感性实验中检测的病毒滴度值在 WHO 认可的 LQC 滴度值±0.5 以内。病毒滴度采用 Karber 公式计算。Karber 公式: $\log CCID_{50} = L - d \times (S - 0.5)$,L 为最低稀释度 log 值,d 为稀释梯度 log 值,S 为各个稀释度中细胞病变孔数所占比例的总和。细胞敏感性实验中,96 孔板每孔通常加入 0.1 mL 的病毒悬液用于检测,故细胞敏感性实验结果常用 $\log CCID_{50}/0.1\text{ mL}$ 表示,释义为每 0.1 mL 病毒稀释液对应的半数细胞病变数的对数值。

1.3 统计学处理 数据录入、整理和图表制作使用 Excel2010 软件。

2 结 果

2.1 重庆市脊灰实验室 LQC 滴度 2013 年 1 月至 2019 年 3 月重庆市脊灰实验室细胞敏感性实验中使用的 3 个型别的 LQC(Sabin I、Sabin II、Sabin III)为

本实验室 2007 年制备,标记为 LQC2007。2019 年 4 月细胞敏感性实验使用新制备的 LQC,标记为 LCQ2019(2016 起 Sabin II 型细胞敏感性实验停止,因此未制备 LCQ2019Sabin II)。LQC2007、LCQ2019 各型别在 RD 细胞系和 L20B 细胞系上经 WHO 认可的平均滴度值见表 1。

2.2 支原体检测实验 重庆市脊灰实验室于 2015 年起按中国疾病预防控制中心要求,在每次细胞敏感性实验前均对 L20B 和 RD 细胞系进行支原体检测。2015 年 1 月至 2019 年 12 月,累计进行 19 次支原体检测实验,结果均为阴性。

表 1 重庆市脊灰实验室各型别 LQC 期望滴度值及可接受波动范围(logCCID₅₀/0.1 mL)

标准株名称及 型别	L20B 细胞系上的 期望滴度值	RD 细胞系上的 期望滴度值	可接受波动范围
LQC2007			
Sabin I	8.28	8.15	±0.5
Sabin II	7.87	7.95	±0.5
Sabin III	7.77	8.23	±0.5
LCQ2019			
Sabin I	7.70	8.06	±0.5
Sabin III	7.10	7.83	±0.5

2.3 细胞敏感性实验 2013—2019 年重庆市脊灰实验室按照 WHO 推荐标准实验方法进行了 27 次细胞敏感性实验,自 2016 年起,在全球范围内三价 OPV(含 Sabin I、Sabin II、Sabin III)被二价 OPV(Sabin I、Sabin III)代替,WHO 宣布消灭二型 PV,Sabin II 标准株的细胞敏感性实验停止。2013 年 1 月至 2019 年 3 月,使用 LQC2007 进行细胞敏感性实验,在 L20B 细胞系上,敏感性实验滴度分别如下:Sabin I 为(8.28±0.43)logCCID₅₀/0.1 mL,Sabin II 为(7.87±0.27)logCCID₅₀/0.1 mL,Sabin III 为(7.77±0.47)logCCID₅₀/0.1 mL。RD 细胞系上,敏感性实验滴度 Sabin I、Sabin II、Sabin III 分别为(8.15±0.48)、(7.95±0.50)、(8.23±0.43)logCCID₅₀/0.1 mL。2019 年 3 月后,使用 LQC2019 进行实验,在 L20B 细胞系上,敏感性实验滴度 Sabin I、Sabin III 分别为(7.70±0.04)、(7.10±0.30)logCCID₅₀/0.1 mL,RD 细胞系上,敏感性实验滴度 Sabin I、Sabin III 分别为(8.06±0.39)、(7.83±0.13)logCCID₅₀/0.1 mL。L20B 细胞系上各型别的 LQC2007 滴度波动情况见图 1,RD 细胞系上各型别的 LQC2007 滴度波动情况见图 2。由于仅使用 LQC2019 进行了 3 次细胞敏感性实验,故对其结果未进行作图分析。

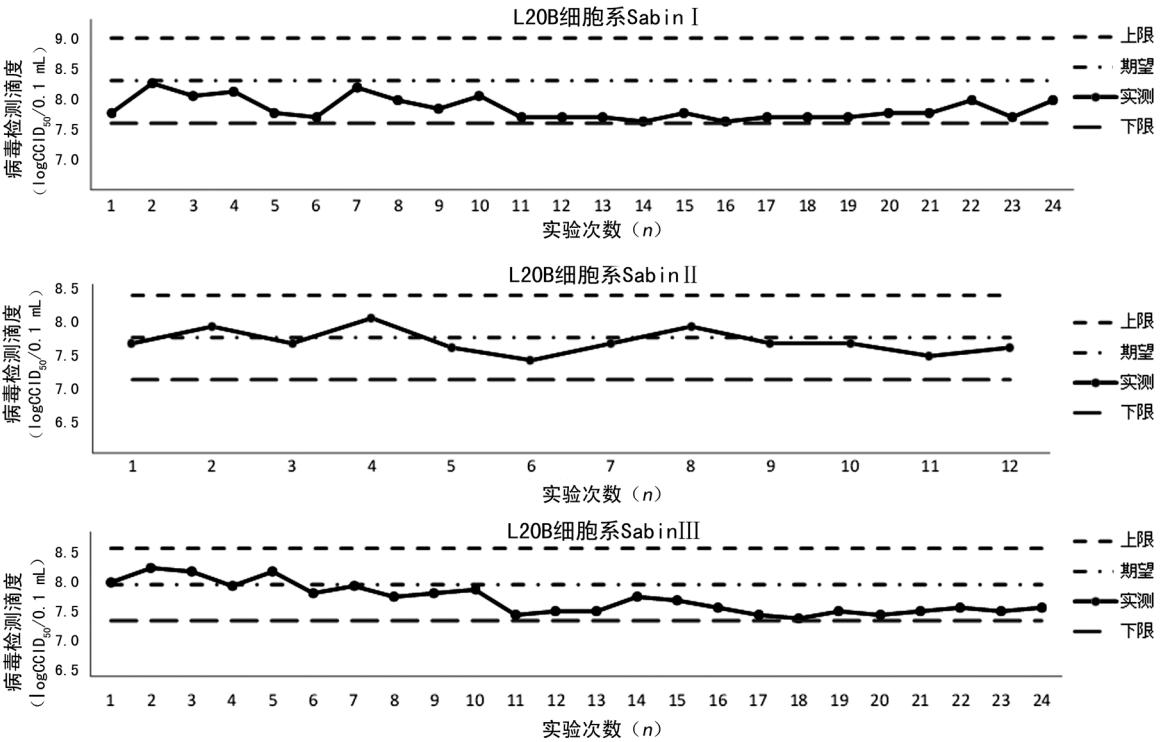


图 1 多次实验各型别 LQC2007 在 L20B 细胞系上的滴度波动情况

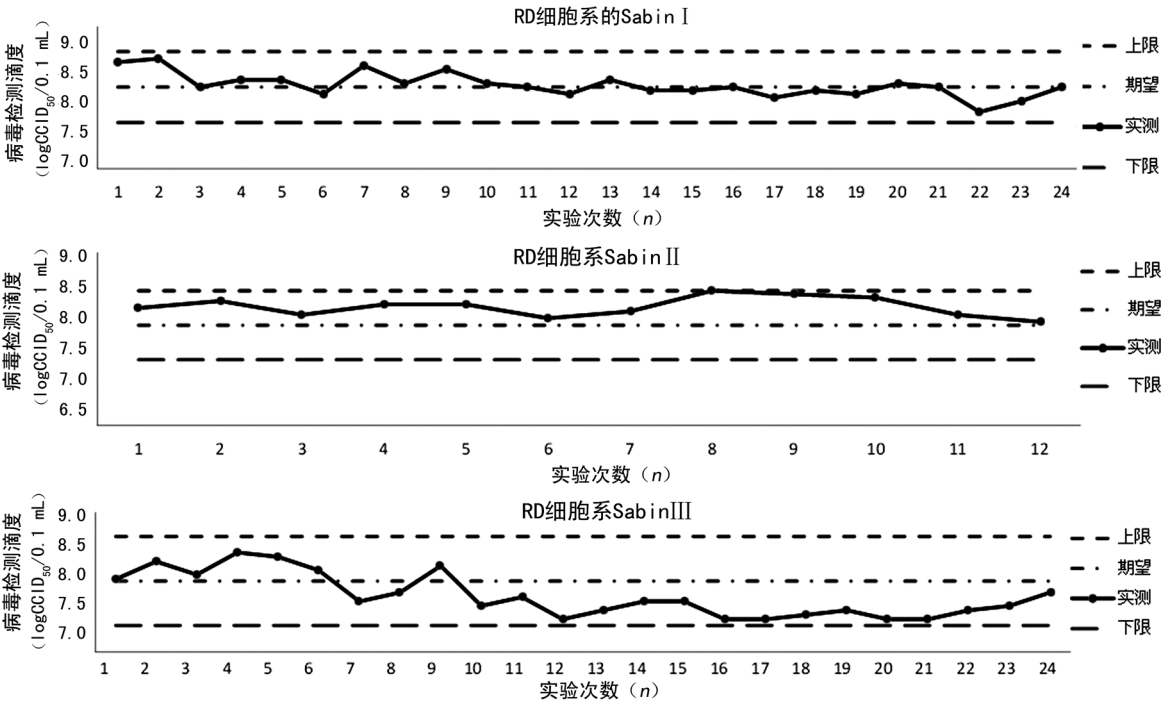


图 2 多次实验各型别 LQC2007 在 RD 细胞系上的滴度波动情况

3 讨 论

病毒的细胞分离培养是实验室检测的“金标准”，经细胞分离培养得到的高水平和高纯度的病毒毒株，可以为后续一系列的病毒鉴定和深入研究打下基础。相关研究指出，使用 L20B 细胞系和 RD 细胞系进行 PV 分离有较高的灵敏度，其灵敏度不亚于分子生物学方法^[6]。WHO 从 2015 年开始，在全球 PV 检测实验室推行了最新版的 PV 分离流程^[7]，这样又进一步

提高了 PV 的分离效率。因此，对 PV 的细胞分离工作实施质量控制，有着重要意义。

PV 分离工作质量控制的核心是保证分离病毒所用细胞系的质量，这是 PV 监测工作准确性的前提，也是 PV 诊断工作的基础。影响细胞系生长的因素众多，包括培养细胞所需的原材料质量（胎牛血清、培养液、缓冲液等）、细胞生长条件（培养温度、二氧化碳浓度）、培养液污染（细菌、支原体等）。WHO 推荐脊灰

实验室中细胞系质量控制的有效方法是支原体检测和细胞敏感性实验^[8]。支原体广泛分布于自然界,其最佳生长温度是 37℃^[9]。实验室细胞系极易被支原体污染,被支原体污染的细胞通常不会有细胞病变,或仅引起细微的变化不易被察觉,使用 PCR 法可以快速、准确地检测细胞系中的支原体,以确定细胞系是否被支原体污染。PV 细胞敏感性实验结果可直接反映出细胞系对特定型别 PV 的敏感程度,以此确定细胞系生长状态是否正常,从而达到对细胞系的质量控制。

2013—2019 年重庆市脊灰实验室累计对细胞培养液进行了 19 次支原体检测(2015 年开始,按照中国疾病预防控制中心脊灰实验室要求进行支原体检测),检测结果均为阴性,表明这期间细胞系没有被支原体污染。支原体感染细胞培养液后,会黏附于细胞表面,进而影响细胞运输机制和细胞膜受体。有研究指出,L20B 细胞系被支原体污染后,其细胞膜上的 PV 受体 CD155 会被支原体干扰,从而降低对 PV 的敏感性^[4]。当支原体检测为阳性时,必须追溯整个细胞培养的全过程,如更换细胞系来源、对实验器具消毒处理、重新配置实验试剂等,重新检测支原体阴性后才可以进行细胞敏感性实验。

从重庆市脊灰实验室 2013—2019 年的细胞敏感性实验结果来看,27 次细胞敏感性实验中,L20B 细胞系和 RD 细胞系上各型别 LQC 的检测滴度均在期望值 $\pm 0.5\log\text{CCID}_{50}/0.1\text{ mL}$ 内,表明这期间重庆市脊灰实验室所用细胞系对 PV 有着较高的敏感性,24 次 LQC2007 的细胞敏感性实验表现出在 RD 细胞系上各型别 LQC 的滴度均高于 L20B 细胞系上的滴度,此结果与黑龙江省的相关研究一致^[10]。通过细胞敏感性滴度曲线图可以看出,截至 2019 年 3 月 21 日(第 24 次实验),L20B 细胞系上的 Sabin I 型 LQC 滴度均在期望值以下,并且随时间延长呈现下降趋势;Sabin III 型 LQC 在 RD 细胞系和 L20B 细胞系上均表现出滴度下降趋势。理想的细胞敏感性实验结果应该是在期望值上下波动,笔者认为上述现象可能由以下因素导致:(1)2007 年制备的 LQC 在确定其期望滴度值时,所用细胞系传代代数较低,其后进行细胞敏感性实验所用细胞系已经过多次传代,细胞系随传代代数增加,对 LQC 的敏感性可能出现衰退^[8]。(2)LQC 经过长时间的冻存,其病毒活性可能下降。针对这个

问题,重庆市脊灰实验室于 2019 年 4 月重新制备了 LQC,使用新的 LQC 进行的 3 次细胞敏感性实验结果均正常,新的 LQC 可用于代替 2007 年制备的 LQC,用于细胞系质量控制。

综上所述,重庆市脊灰实验室所用细胞系对 PV 保持了较高的敏感性,但仍然存在一些问题,应加强细胞系的质量控制工作。在消灭脊灰的最后阶段,脊灰实验室细胞系的质量控制必不可少,在实际工作中应结合支原体检测和细胞敏感性实验两种方法对细胞系进行质量控制,及时发现存在的问题,保证 PV 监测系统的敏感性,确保及时、准确地发现与鉴别 PV。

参考文献

- [1] SHAH S Z, SAAD M, RAHMAN K H, et al. Why we could not eradicate polio from Pakistan and how can we [J]. J Ayub Med Coll Abbottabad, 2016, 28(2): 423-425.
- [2] 牛香莲, 张光明, 吴晋元, 等. 灭活轮状病毒疫苗与灭活脊髓灰质炎病毒疫苗联合使用免疫效果评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(3): 217-222.
- [3] PONS-SALORT M, BURNS C C, LYONS H, et al. Preventing vaccine-derived poliovirus emergence during the polio endgame[J]. PLoS Pathog, 2016, 12(7): e1005728.
- [4] 王东艳, 张勇, 安洪秋, 等. 中国脊髓灰质炎实验室网络 2007—2015 年细胞敏感性监测与评价[J]. 中国疫苗和免疫, 2016, 22(2): 138-142.
- [5] 刘晓庆, 刘师文, 肖芳, 等. 2013 年至 2015 年江西省脊髓灰质炎实验室细胞敏感性监测分析[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(3): 308-311.
- [6] 龚成, 罗明, 张铁钢. 脊髓灰质炎病毒三类检测方法的灵敏度比较[J]. 国际病毒学杂志, 2011, 18(4): 116-121.
- [7] 彭靖尧, 赵华, 黄为, 等. 2013—2018 年重庆市急性弛缓性麻痹病例监测分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2019, 30(5): 25-28.
- [8] 王东艳, 祝双利, 张勇, 等. 中国脊髓灰质炎实验室网络开展细胞系支原体检测及现状分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2017, 23(1): 8-12.
- [9] BITNUN A, FORD-JONES E, BLASER S, et al. Mycoplasma pneumoniae cephalitis[J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2003, 14(2): 96-107.
- [10] 宋婧, 马玉杰, 王晓宇, 等. 黑龙江省 2014—2018 年脊髓灰质炎病毒实验室细胞系质量监测分析[J]. 中国公共卫生管理, 2019, 35(3): 335-338.