

四种动物病毒的细胞培养及血凝检测的比较研究

李天宪 赵林 罗怡珊 冯锋

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

关键词 细小病毒, 细胞培养, 细胞病变, 血凝试验

云豹肠炎病毒(LPV)、水貂肠炎病毒(MEV)、犬肠炎病毒(CPV)和猫泛白细胞减少症病毒(FPLV)等四种细小病毒,其理化和生物学特性十分相似。均能凝集猪红细胞,但文献记载其血凝(HA)条件各不相同。本文建立了统一的、适用于4种病毒的HA技术,并系统观察了它们在FK₈₁细胞上的培养特性,比较了其细胞培养物的HA活性,为疫苗的生产 and 检测提供了技术和科学依据。

细胞培养按常规方法进行,当培养至细胞生长达80%左右时,分别接种4种细小病毒,吸附1小时后,加入维持液,33℃继续培养4—5天,当出现细胞病变(CPE)达50—75%(++—+++)时,收获病毒液。血凝效价检测采用微量滴定法,在96孔“V”型板上进行。采用两种稀释液。A液为含0.5%灭能兔血清的pH6.0、0.015mol/L PBS;B液为含0.1%牛血清白蛋白的pH6.4、0.015mol/L PBS。病毒细胞培养物作倍比稀释,加0.5%猪红细胞,置4℃作用2小时,观察HA效价。

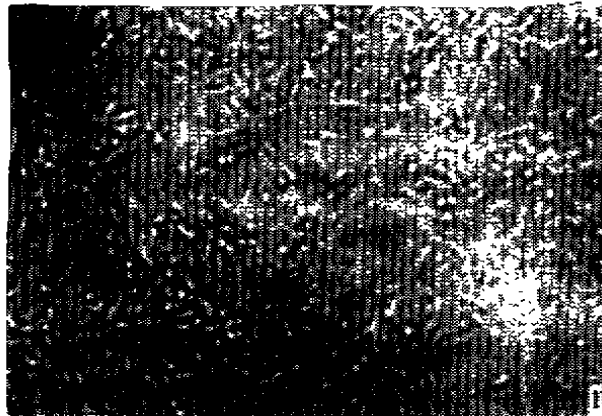


图1 FK₈₁细胞培养第四天
Fig. 1 FK₈₁ cell cultured for four days

• 本文于1993年6月17日收到,9月14日修回

在 FK₈₁ 细胞上培养 4 种细小病毒均在接毒后 4—5 天出现明显细胞病变,其特征是病变细胞增大变圆,细胞间出现网状空隙,尤以 MEV 和 CPV 较明显(图 3、4);FPLV 和 LPV 病变细胞变大呈多角形,病变细胞较为密集(图 2、5);对照 FK₈₁ 细胞呈梭形,细胞间隙均一(图 1),与接毒后的细胞有明显区别。

4 种细小病毒的细胞培养病变(CPE)和两种血凝方法的比较见下表。

表 1 四种细小病毒细胞培养 CPE 和两种血凝方法的结果
Tab. 1 CPE of FK₈₁ Cells infected with four parvoviruses and the result of two HA methods

毒株 Virus strains	试验组别 No. of group	CPE/天数 CPE/days	血凝试验效价	
			HA	
			A 液 method (A)	B 液 method (B)
FPLV	1	+++/4	1:128	1:1024
	2	+++/5	—☆	1:1024
	3	++/4	1:16	1:512
	4	+++/4	1:128	1:2048
MEV	1	++/5	1:128	1:512
	2	+++/5	1:128	1:2048
	3	+++/4	1:512	1:2048
	4	+++/4	1:128	1:4096
CPV	1	+++/4	1:512	1:1024
	2	+++/4	1:128	1:1024
	3	++/5	—	1:512
	4	+++/5	—	1:1024
LPV	1	+++/5	—	1:512
	2	++/4	1:64	1:256
	3	+++/5	1:16	1:1024
	4	+++/5	1:128	1:1024

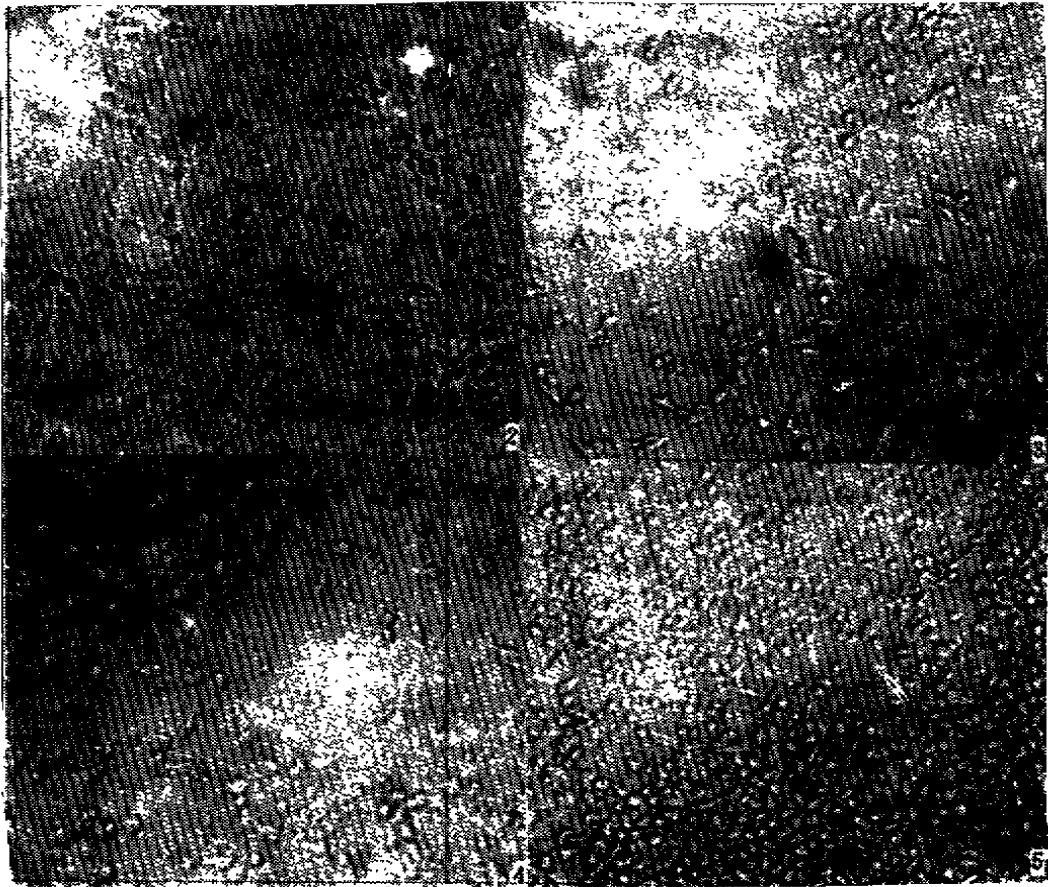
注:☆表示自凝现象

Note:☆ Autoagglutination

结果表明,2 种稀释液比较,B 液显著优于 A 液,除 LPV 中 1 例为 HA 价 1:256 外,其余均 ≥ 512 ,HA 效价在 1024 以上者占 11/16(69%),最高达 4096。HA 价稳定,批间差异不大;4 种病毒之间差异也不显著。而用 A 液检测的 HA 价均在 ≤ 256 ,其中有 4/16(25%)未测出 HA,效价不稳定。

4 种细小病毒均能适应在 FK₈₁ 细胞上增殖,虽 CPE 略有不同,但出现 CPE 时间则基本一致。CPE 的程度与 HA 值似有一定正相关性,在应用 B 液的试验中,CPE 为 ++ 者 HA 值均低。

鉴于以上结果,我们建议在生产 LPV、MEV、CPV 和 FPLV 细胞培养单苗或联苗时,可采用同一操作规程和检测(HA)技术,以 $HA \geq 512(2^9)$ 为标准。在 CPE 达 ++ 时,如 $HA \geq 512$,即可以第一次收获。然后加入营养液继续培养至第 7 天进行第二次收获,这样可望提高收毒量,降低育苗成本。

图 2 猫泛白细胞减少症病毒, CPE_{III}/4 天图 4 犬肠炎病毒, CPE_{III}/5 天Fig. 2 FPLV, CPE_{III}/four daysFig. 4 CPV, CPE_{III}/five days图 3 水貂肠炎病毒, CPE_{III}/5 天图 5 云豹肠炎病毒, CPE_{III}/5 天Fig. 3 MEV, CPE_{III}/five daysFig. 5 LPV, CPE_{III}/five days

参 考 文 献

- 1 张振兴. 经济动物细小病毒研究进展. 南京农学院内部资料. 1988; 65~70
- 2 张存, 张振兴. 猫瘟热诊断及免疫的研究. 中国畜禽传染病, 1990; 2: 47~48
- 3 林逢生. 猫、水貂及犬细小病毒的比较. 中国畜禽传染病, 1988; 6: 57~59
- 4 廖延雄主译. 病毒的分类与命名(国际病毒分类委员会第四次报告). 北京: 科学出版社, 1987; 113~115
- 5 I. Vaček, K. F. Lawson. Cana Vet J, 1976; 12: 301~308
- 6 James, L. B. Infections of wild Mammals, The State University press. 1980: 29: 97~101

Comparison of Tissue Culture and Hemagglutination between Four Animal Viruses

Li Tianxian Zhao Lin Lou Yuson Fong Fong

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071*)

All of the Leopard Parvovirus (LPV), Mink Enteritis Virus (MEV), Caine Parvovirus (CPV) and Feline Panleukopenia Virus (FPLV) can be bred on FK_{81} cell. At the meantime, two different Hemagglutinations are taken and compared. Through experiments, we have found one HA method which is simple, accurate and stable.

Key words Parvovirus, Tissue culture, Hemagglutination (HA), Cytopathogenic effect (CPE)