

狂犬病毒蚀斑方法在病毒研究和 疫苗研制中的应用

李宏玲 李河民 俞永新 严子林

(中国药品生物制品检定所, 北京100050)

提 要

本文采用狂犬病毒CTN-1和4aC株, 经Vero细胞传代适应后, 以Vero细胞为培养基质, 建立了狂犬病毒蚀斑试验和蚀斑减少试验的方法。目前已将此方法应用于病毒鉴定、病毒克隆、病毒滴定以及抗狂犬血清的检测, 并取得了较好的结果。

关键词: 狂犬病毒 蚀斑方法

目前对于狂犬病毒及其抗体的检测, 国内外已经建立了多种体内外试验, 包括小鼠法、免疫荧光法^[1], 酶联免疫吸附法(ELISA)^[2], 放射免疫测定^[3]。上述方法中, 有的特异性强而敏感性差, 有的特异性差而敏感性高。在我国目前的狂犬病毒的科研及生产中, 仍沿用传统的小鼠法。为了寻找一个特异敏感而又简便可靠的方法, 本实验首次采用Vero细胞作为狂犬病毒蚀斑的培养基质, 以及新的狂犬病毒Vero细胞适应株C₄₂-V_{8+x}、C₁₀₃-V_{9+x}、4aG-V_{9+x}株(x表示代次), 建立了狂犬病毒蚀斑方法。并使该技术应用于病毒鉴定、病毒克隆、病毒滴定以及抗狂犬血清的检测上, 也进一步证实了该技术的实用性。

材料与 方法

一、病毒株

1. 经Vero细胞传代适应的狂犬病毒株, 即C₄₂-V_{8+x}, C₁₀₃-V_{9+x}, 4aG-V_{9+x} (x表示代次)。原株CTN-1-38株、CTN-1-102株由本室严子林同志提供。4aG株购于武汉生物制品研究所。
2. CVS株为国际标准狂犬病毒株, 由本室严子林同志提供。
3. HD₃₇-BHK株由肖泽帅同志提供。

二、免疫血清

1. 85RS为我国第一批抗狂犬病参考血清, 是用狂犬病毒40G株免疫的家兔血清。血清效价26.53 IU/ml。由本室严子林同志提供。
2. 自制的抗狂犬病兔血清。
3. 人抗狂犬病血清系唐山地区确证为疯狗咬伤的患者经0、3、7、14、21、30六针狂犬病疫苗注射后, 于咬伤后第39天采血取血清所得。

本文于1988年12月31日收到。

4. 正常家兔血清由本所动物标准化室李雪东同志提供。

三、细胞株

1. Vero细胞145代由上海生物制品研究所惠赠。

2. BHK-21细胞由本室敖坚同志提供。

四、抗原片

1. 抗原片CTN-2狂犬病毒株由本室曲小肃同志提供。

2. 抗原片4aG及CTN-1株均为自制。

五、动物

1. 小白鼠昆明种，三周龄，体重10—14g，本所动物室提供。

2. 乳鼠，昆明种，1~3日龄，由本所动物室提供。

六、方法

1. 半微量蚀斑试验和蚀斑减少试验，见文献^[4]。

2. 间接荧光抗体试验，取制备好的抗原涂片。用pH7.4的PBS漂洗3次，3~5分/次，吹干后加对倍稀释的血清0.5ml/孔，37℃水浴1小时，漂洗吹干后加荧光抗体（伊文氏兰1:10000稀释），37℃水浴1小时，漂洗吹干，加盖玻片，荧光显微镜检测，荧光强度判定参见文献^[5]。

结 果

一、病毒鉴定

本实验采用我们建立的狂犬病毒蚀斑法，对狂犬病毒4aG株、CTN-1-42株适应Vero细胞前后的变化情况进行了研究鉴定，见表1及图1。

表1 狂犬病毒对Vero细胞适应前后的蚀斑性质的改变
Table 1 Change of virus properties before and after adaptation in Vero cells

Virus/Passage	Titer (pfu/ml)
4aG/Original	0
4aG/V14	3×10^6
C 39/Original	5×10^4
C 42/V14	3.15×10^6

Note, V 14, 14 passages of rabies virus in Vero cells

(V14表示两株狂犬病毒在Vero细胞上传了14代)

结果表明，狂犬病毒4aG株在Vero细胞上适应前以及早期传代时，无蚀斑形成。而在晚期传代中，出斑大小不一，直径为0.5~1.5mm，其中多为大斑，即1.0~1.5mm，CTN-1-42株在适应前也出斑，但均为小斑，0.5~0.8mm，适应后的蚀斑多为大斑。由此可见，两株狂犬病毒在对Vero细胞适应前后，在蚀斑的有无及大小特性上发生了明显的变化。用此蚀斑法可加以鉴别。与此同时，本实验也做了CVS株及HD₃₇-BHK株狂犬病毒的蚀斑试验，证明未经细胞适应只经脑组织传代的病毒株不能出斑如CVS、4aG株，而经过细胞传代适应的病毒多能出斑，如HD₃₇-BHK、C₁₂-V₁₁、4aG-V₁₄、C₁₀₃V₁₂等。

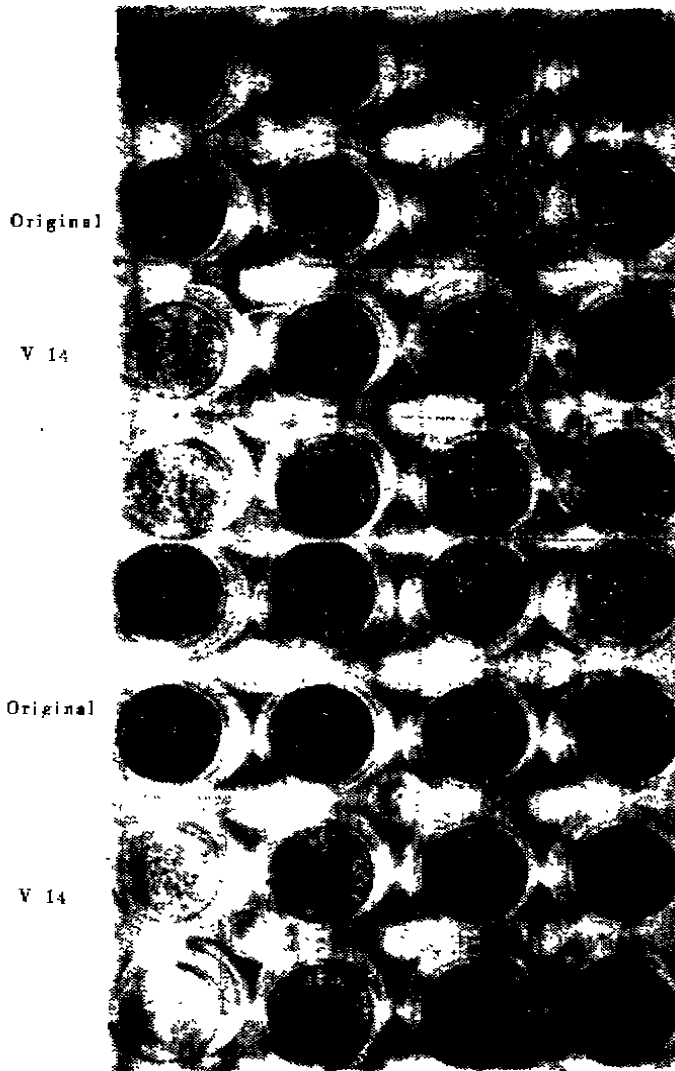


图1.1.狂犬病毒4aG株在Vero
细胞上适应前后的性质变化
Fig1.1.Change of 4aG strain
property before and after
adaptation in Vero cells

图1.2.狂犬病毒CTN-1株在Vero
细胞上适应前后的性质变化
Fig1.2.Change of CTN-1 strain
in property before and after
adaptation in Vero cells

二、病毒克隆

采用蚀斑法将 $C_{12}-V_{16}$ 、 $C_{103}-V_{16}$ 、 $4aG-V_{15}$ 三株狂犬病毒两次蚀斑纯化,各挑选出两株蚀斑。其中, $C_{12}-V_{16}$ 克隆的两株皆为大斑,其直径 $1.0\sim 1.5\text{mm}$ 。 $C_{103}-V_{16}-1$ 株为大斑, $C_{103}-V_{16}-2$ 株为小斑(直径 $0.5\sim 0.8\text{mm}$), $4aG$ 株, $V_{15}-1$ 株以大斑为主,混有个别小斑,纯化得不够。 $4aG-V_{15}-2$ 株为大斑。将6株克隆的病毒分别扩增并用蚀斑法和小鼠法进行滴定,测其致病力的变化,结果见表2。

从表2可见,病毒滴定以 $C_{12}-V_{15}-1$ 株为高,且为大斑,毒力强。以 $C_{103}-V_{16}-2$ 株的病毒滴度为低,且为小斑。但后者蚀斑法的滴度较小鼠法高一个数量级,在这一克隆株中可能存在着对小白鼠致病力减弱的弱毒颗粒。

三、病毒滴定

1、病毒剂量与蚀斑数的关系

表 2 用小鼠法和蚀斑法进行狂犬病毒克隆株的滴定的比较
Table 2 Comparison of virus titer by mice and plaque methods after cloning

Virus	Virus clone	
	1	2
C 42—V 15	7.18/5×10 ^{7*}	6.5/1×10 ⁷
C 103—V 16	6.0/5×10 ⁶	5.5/5×10 ⁶
4aG—V 15	6.75/1×10 ⁷	6.5/8×10 ⁶

* Titer (Log LD 50/ml)/Plaque (pfu/ml)

表 3 病毒剂量与蚀斑数的关系
Table 3 Relation between virus dose and number of plaque

Virus	Dilution of virus					Titer (pfu/ml)
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
C 42—V 8	C	C	49	5	0	5×10 ⁶
C 103—V 9	C	C	65	4	0	4×10 ⁶
C 42—V13	C	C	11	1	0	1×10 ⁶
C 103—V16	NT	NT	C	47	5	5×10 ⁷
C 42—V16	NT	NT	C	38	2	2×10 ⁷

Note: NT, No test; C, confluence

采用蚀斑法观察表 3 所示的 5 株病毒的病毒剂量与蚀斑数的关系。结果表明, 随着病毒稀释度的增高, 蚀斑数呈规律性地减少。同时也表明, 以蚀斑数反应的病毒滴度不仅敏感, 而且准确。

2. 四种方法滴定病毒的比较

本实验采用同批连续 10 倍稀释的病毒以成鼠法、乳鼠法、蚀斑法、CPE 法同时进行滴定, 结果如表 4 所示。

表 4 四种方法进行病毒滴定的比较
Table 4 Comparison of assay virus by different methods

Virus	Titer of virus			
	AM(LD50/ml)	SM(LD50/ml)	Plaque(PFU/ml)	CPE(TCD50/ml)
C 42—V 15	10 ⁶	3.2×10 ⁶	2.5×10 ⁷	10 ^{6.7}
C 103—V 16	10 ⁶	5.0×10 ⁶	1.5×10 ⁷	10 ^{6.5}
4aG—V 15	3.2×10 ⁶	2.5×10 ⁶	1.4×10 ⁷	10 ^{6.4}

Note, AM, Adult mice; SM, Suckling mice

以四种方法的数据比较, 看其敏感性: 蚀斑法 > CPE = 乳鼠法 > 成鼠法。究其蚀斑法更为敏感的原因, 可能是由于三株病毒中存有弱毒颗粒所致。

四、抗狂犬血清的检测

1. 中和用病毒悬液的蚀斑测定

用冻存于-70℃的相同稀释度的病毒液经37℃水浴1小时后,定量接种不同日期,不同批号的Vero细胞各4孔,其蚀斑的平均数在三次试验中各为22个/孔、24个/孔、27个/孔,说明每次用于中和试验的活毒数量相近。

2. 蚀斑数与血清稀释度的关系

本实验用85RS抗狂犬病毒(aG株)参考血清、自制的免疫兔血清及免疫人血清分别以1:160、1:40、1:4开始作对倍稀释,稀释度见表5注释。以48PFU/0.1ml的病毒液加入等量的不同稀释度的血清中,37℃水浴中和1小时,同时做病毒对照,至少4孔,其平均蚀斑数为24PFU/0.1ml。以蚀斑减少一半时的血清稀释度作为终点稀释度,并设正常血清对照。根据Reed-Muench法计算结果,见表5及图2。

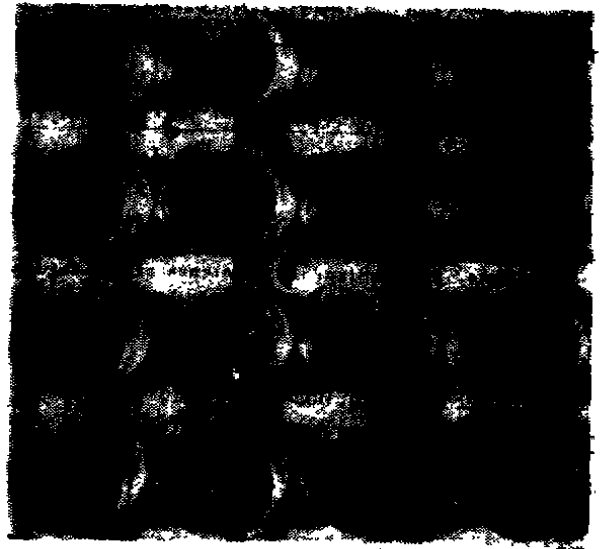


图2 抗狂犬病血清稀释度与蚀斑数的关系
Fig 2 Relationship between antirabies serum dilution and number of plaque

表5 血清稀释度和蚀斑数的关系
Table 5 Relation between antirabies serum dilution and number of plaque

Serum	No. of serum dilution								Titer	
	1	2	3	4	5	6	7	8	reciprocal(IU/ml)	
85RS	0	0	0	0	4	9	18	24	2560	49.4
1RS	0	0	0	0	2	5	8	14	1280	10.02
1HS	0	0	0	0	0	0	4	8	512	6.66

Note: 85RS, Standard reference rabbit serum 标准抗狂犬兔血清
 IRS, Immunized rabbit serum 免疫兔血清
 IHS, Immunized human serum 免疫人血清
 No. of serum dilution: 1~8

	1	2	3	4	5	6	7	8
85RS ₁	1:160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
1HS ₁	1:40	80	160	320	640	1280	2560	5120
1HS ₂	1:4	8	16	32	64	128	256	512

从表5可见,在蚀斑减少试验中,血清稀释度与蚀斑呈直线正相关。随着血清稀释度的增加,蚀斑数也增加。

3. 三种方法检测抗血清滴度的敏感性比较

本实验采用小鼠法、蚀斑法、间接免疫荧光法检测三批抗狂犬血清,其稀释度同表5注释。比较三种方法的敏感性,结果见表6。

从以上三种方法可见,蚀斑法最为敏感,小鼠法与间接免疫荧光法相近。从上表可见,在小鼠法和蚀斑法的血清滴度的国际单位之间存在着相关性。根据统计学相关与

表 6 三种方法检测抗狂犬血清效价的比较
Table 6 Comparison of serum antibody titer by three methods

Antirabies serum	Plaque		Mice(i,c)		IF	
	Ab titer	Ab(IU/ml)	Ab titer	Ab(IU/ml)	Ab titer	Ab(IU/ml)
85RS	2560	49.4	2560	26.53	2560	33.39
1RS	1280	10.02	640	7.74	640	7.41
1HS	512	5.66	256	3.75	256	2.64

Note, 85RS, Standard reference rabbit serum
1RS, Immunised rabbit serum
1HS, Immunised human serum

回归关系公式得出 $0.05 > p > 0.01$, 相关系数 r 有显著性, 即认为小鼠法与蚀斑法在检测抗狂犬血清滴度时存在着相关性, 并计算出回归系数为 0.503, 即当蚀斑法增减 1 IU/ml 时, 小鼠法增减 0.503 IU/ml。

讨 论

尽管国内外关于狂犬病毒蚀斑的报道已有很多^[1-9], 但由于其应用上的有限性以及方法尚不够稳定^[8,10,11], 故在实践中未能广泛应用。

本实验采用经WHO认可用于生产狂犬病疫苗的我国自己建立的 CTN-1 株。在 Vero 细胞上传代适应后, 建立了快速蚀斑法, 并应用于实验中。用蚀斑法进行狂犬病毒鉴定的结果表明, 经细胞传代适应的狂犬病毒株能在 Vero 细胞上产生蚀斑, 而只经动物脑组织传代未经细胞适应的狂犬病毒株一般不产生蚀斑, 如我国目前使用的人用狂犬病疫苗的毒株 aG 株以及 CVS 株则不能在细胞上产生蚀斑。而 CTN-1、HD₃₇-BHK、C₄₂-V₁₅、4aG-V₁₅ 则能够产生蚀斑, 给疫苗的研制及检测工作带来很大的方便。

采用蚀斑方法进行病毒克隆, 可以为病毒的纯化, 毒力不同、滴度各异的毒株的挑选, 特别是为弱毒株的挑选以及狂犬病活疫苗的研制提供了方法。

在病毒滴定中, 可以看到蚀斑法比乳鼠法、小鼠法更加敏感的特性, 这可能是由于个别的病毒发生毒力变异形成弱毒颗粒所致。这种弱毒颗粒对小白鼠已变为无致病作用。成年小鼠脑内接种病毒后可见, 在高稀释度组中, 个别小白鼠发病潜伏期延长, 有的从发病到死亡的时间延长, 最长者达 20 天, 有的小鼠发病后又恢复了健康, 这些都证明了病毒在传代过程中毒力可减弱, 也说明了蚀斑法在滴定病毒上足够敏感。

有文献报道^[12,13], 狂犬病毒的蚀斑减少中和试验与经典的小鼠法中和试验检测狂犬病毒中和抗体同样敏感, 前者可以代替后者。但本文的实验结果证实蚀斑法比小鼠法、间接免疫荧光法更为敏感, 且比小鼠法快出结果, 比间接免疫荧光法的结果切实可靠。

在病毒研究及狂犬病疫苗研制的检测工作中, 该方法可将小鼠法的检测周期 14 天以及以往蚀斑法的 7—10 天提前到 4 天判定结果。可见该方法不但具有特异敏感的特点, 也具有简便快速的特点, 大大缩短了狂犬病毒及其抗体的检测周期, 为开展 Vero 细胞狂犬病疫苗的研制提供了一个新的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Schneider L et al., 1973, *Lab Tech in Rabies*, Third edition, P336.
- [2] Van der Marel, P et al., *Dev Biol Stand* 50: 167.
- [3] Wiktor T, J et al., 1973, *Lab Tech in Rabies*, 3rd edition, P182.
- [4] 李宏玲等, 1990, 中华微生物学及免疫学杂志(待发表).
- [5] 严玉成等, 1982, 中国医学科学报4(2): 67.
- [6] Wiktor T, J et al., 1973, *Ann Microbiol* 124A, 271.
- [7] Barth R et al., 1981, *J Biol Stand* 9: 81.
- [8] Schneider L et al., 1973, *Lab Tech in Rabies*, 3rd ed., P339.
- [9] Russerfgu F et al., 1982, *J Virol Methods* 4: 277.
- [10] 肖泽帅等, 1987, 实验临床病毒学杂志1(1): 16.
- [11] 严子林等, 1988, 病毒学杂志2: 142.
- [12] WHO., 1981, Expert Committee on Rabies 7th Report, Pg.
- [13] Sekes R.K et al., 1971, *Bull WHO* 45: 1.

Application of Plaque Assay Method for Rabies Virus in the Study of Virus and Vaccine

Li Hong-ling Li He-min Yu Yong-xin Yan Zi-lin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

We explored rabies virus adapted to Vero cells making plaque formation promptly. The plaque could be all exposed and easily seen under microscope on 4th day. It was shown that plaque method was more sensitive than mice (i.c.) method on the titer of virus and assay neutralizing antibody. Up to now, the plaque formation has been applied to virus cloning, virus identify, virus titration, evaluation of serum-antibody content by the virus neutralization technique, providing an important assay method for the study and preparation for Purified Vero Rabies Vaccine (PVRV).

Key Words, Rabies virus Plaque method