

狂犬病固定毒 Vero 细胞适应株的建立

曾蓉芳 陈阿根 张 瑛 黄海武

(卫生部上海生物制品研究所 病毒研究室, 上海 200062)

提 要

本文报道狂犬病毒 Vero 细胞适应株建株经过以及对适应株的抗原和免疫原性分析的情况, 并推荐“RFD”和“HS₂”适应株作为狂犬疫苗微载体培养系统的候选毒株。

关键词: 狂犬固定毒 Vero 细胞 适应传代

最近数年来, WHO 已批准使用 Vero 细胞进行大规模的疫苗制备。法国和荷兰已正式采用此种传代细胞进行狂犬病疫苗的工业化生产^[1-3]。此生产系统用微载体培养 Vero 细胞, 产量大, 质量高, 比人二倍体疫苗价格低^[5]。因此, 比较容易被第三世界人民所接受^[4]。我国近数年来农村养狗成风, 已达二亿只之多, 每年被狗等动物咬伤的人数高达 500 万, 而国内生产的组织培养疫苗系用手工业式的工艺和以原代地鼠肾为原料, 故其产量和质量远远不能满足实际的疫情需求。为了克服这种被动局面, 我们决定以 Vero 细胞微载体系统进行狂犬病疫苗的工业化生产。本文旨在培植能适应于 Vero 细胞的疫苗生产毒种。现将新适应株的培植和鉴定情况报道如下:

材 料 与 方 法

1. Vero 细胞株: 自加拿大法比埃研究所引进的疫苗生产用细胞株。

2. 试验用的狂犬病固定毒: “aG”株——国内现行狂犬病组织培养疫苗的生产毒种。“LEP”株——引进的狂犬病毒鸡胚适应株。此二毒种作为亲本株用于 Vero 细胞适应传代。“CVS”株为国际通用的标准攻击毒, 用于检定。

3. 适应株的培植: 以“aG”和“LEP”毒种分别感染 Vero 细胞, 置 37℃ 静止培养, 定期检测病毒繁殖动态。取其高峰期培养液连续在 Vero 细胞上传代, 或以终末稀释法克隆出较纯的子代, 待病毒滴度达 10^6 /ml 以上时 (即达到国外同型原苗的病毒滴度要求), 便可将毒种冻干保存及做一系列检定。

4. 检测方法:

①用双抗体夹心^[6]和反向间接 ELISA 法^[7]测病毒抗原和抗体。

②小鼠脑内毒力测定法 (MT-LD₅₀), 中和试验 (MNT), 效力试验等均按 WHO 出版的狂犬病检测法进行^[8, 11]。

③疫苗对动物诱生抗体测定法参考 Rossnoff 等法进行^[9-10]。

本文于 1980 年 12 月 11 日收到。

感谢: 向建之、卢孝曾、熊永真等教授对本工作给予大力支持和帮助, 张汉荆同志曾参加部分早期工作, 在此一并致谢。

结 果

一、适应株的培植: Vero细胞单层感染“aG”和“LEP”毒株后,每隔4天检测上清病毒含量,在开始1—3代传代的培养液中,病毒滴度很低($<10^{-3}/\text{ml}$),其后,病毒滴度逐渐上升,到20代左右已达 $10^{-6.5}/\text{ml}$ 左右(MT法)。以ELISA法测其抗原量,结果类同。病毒在细胞上的潜伏期也由12天逐渐缩短到6—7天,并保持相对稳定(见表1)。由“aG”和“LEP”株传出的其他适应株为“HS₃”、“EM₃”和“L”株,经20代左右适应传代之后,其滴度也与“RF”株不相上下(表2)。

表1 适应株“RFD”在Vero细胞上的滴度
Table 1 Virus Titres of “RFD” Strain Passaged on Vero Cell (MT, ELISA)

Virus Strain	Passage	LD ₅₀ (MT) (anti-log)	Antigen Value (ELISA)	Harvesting time of the supernatants (days)
RF	1—7	3—5.5/ml	1:10—30	7—12
	8—15	±6.0/ml	±1:80	7—8
	16—22	6—6.75/ml	1:80—160	6—7
	23—27	±6.0/ml	1:40—160	6—7
RFD*	D ₁₋₅	6—6.5/ml	nd	6—7
	D ₈₋₁₁	6.5—6.75/ml	nd	6—7

注:“RF”株系狂犬病固定毒(Rabies Fixed Virus)“aG”株适应于Vero细胞而得,将“RF-12”代次毒种以终末稀释法克隆出“D”子代,称为“RFD”株。

* Since the passage-12 of RF strain, virus was cloned by the terminal dilution method. The clone “D” was selected and named “RFD” strain.

表2 比较五个适应株的病毒滴度
Table 2 Comparison between the five virus titres of various adapted strains

Virus strain	Derived from parent fixed virus strain	No. of passage	Virus titres (Anti-Log)	
RF	3aG—2	27	6—6.5/ml	
RFD	3aG—2	15	6.25—6.75/ml	be cloned from “RF ₁₂ ”
HS ₃	3aG—2	25	6—6.5/ml	
EM ₃	3aG—2	15	6—6.5/ml	be cloned from “HS ₃ -7”
L	LEP	19	6—6.25/ml	

“RFD”和“EM₃”适应株系以终末稀释法自“RF”和“HS₃”株克隆出来的子代。在Vero细胞上传15代之后,病毒滴度略为上升或变化不大,说明这些毒株的毒力基本上稳定在 $10^{-6.5}/\text{ml}$ 的水平。将其冻存于 -80°C ,经一年滴度下降不明显。冻干的毒种,复苏后2代,也可保持 10^{-6} — $10^{-6.5}/\text{ml}$ 的滴度。将含毒的培养液以 β -丙内脂(1:4000 β PL)灭活后进行抗原和免疫原性测定。

二、适应株的抗原性分析:

1. 交叉中和试验: 将“RFD”、“HS₁”等适应株, “aG”株和“CVS”标准攻击毒的鼠免疫血清与“aG”和“CVS”毒株进行交叉中和试验(MNT法), 观察适应株与亲本株或CVS株之间的抗原性关系。结果表明, 四株适应株(RFD、EM₁、HS₁和L株)与其亲本株“aG”或CVS株间的抗原关系密切, 各组中和指数均>1:1000, 彼此之间有较好的相互中和能力, 差异不显著(见表3)。

表3 适应株对“CVS”和“aG”株的抗原关系(中和指数)
Table 3 The Neutralization Index of Anti-adapted Strains Sera against CVS and aG Fixed Virus(MNT)

Virus strain	Anti-serum				
	CVS	aG	RFD	EM ₁	HS ₁
CVS	17800	10000	56300	17800	10000
aG	1000	10000	10000	>17800	2800

2. 以抗体阻断法(ELISA)检测“RFD”适应株与“aG”和“CVS”株间的抗原关系。表4指出, “RFD”的抗原性更接近于亲本株“aG”, 但与“CVS”株也保持良好的抗原关系。

表4 抗“RFD”鼠血清对三株狂犬病毒的免疫阻断试验
Table 4 Three Virus Strains Neutralized with Anti-RFD Serum by Immuno-blocking Test (ELISA)

Anti-serum	Virus strain		
	CVS	aG	RFD
Anti-RFD Mice Serum (1:50)	1:640	1:320	1:160
Normal Mice Serum (1:50)	1:3840	1:3840	1:1920
Immuno-blocking Efficiency	6×	12×	12×

3. 以免疫印迹法(Western Blot)检查“RFD”和“HS₁”适应株免疫鼠血清与“CVS”毒株抗原组分的反应。在含有“CVS”抗原组分的硝酸纤维膜条上, 可见有此两株免疫血清与抗原形成的清晰条带, 即抗“G”蛋白和抗“N”蛋白的特异性条带。

三、适应株的免疫原性分析:

1. 小白鼠保护力试验(NIH法): 此试验目的在于了解适应株能否保护动物抵抗狂犬病毒的攻击。先将3个适应株的培养液上清以βPL灭活, 做成原制粗疫苗。分别以加或不加Al(OH)₃佐剂制备的粗疫苗免疫小鼠, 同时以参考苗(国家标准品)为对照, 求出疫苗的效价。结果表明三株适应株制出的粗疫苗, 其效价可达3.76—8.6 IU/dose。地鼠肾狂犬疫苗(成品)一般的效价在1.3—3IU之间。若以“CVS”和“aG”株分别攻击各批适应株免疫的小鼠, 其效价(ED₅₀)的均值相仿, 即在1:125—1:179之间, 而商品地鼠肾疫苗(HK苗)则较低(表5)。

表 5 五倍狂犬疫苗的效价

Table 5 The Potency of 5 Rabies Vaccines Challenging with CVS and sG Fixed Virus (ED_{50} Value)

Challenging virus	No. of vaccine				Primary Hamster Kidney Cell Rabies Vaccine (#8807)(2.6IU)
	RFD	HS ₁	EM ₁	L	
CVS(10LD ₅₀)	1:158	>1:168	1:168	1:222	nd
sG(10 LD ₅₀)	1:179	1:166	1:126	1:83	1:51

2. 适应株对实验动物(包括小白鼠、家兔和狗)诱生中和抗体的能力测定:

(1) 适应株 RFD、EM₁ 和 HS₁ 灭活疫苗免疫小鼠后 14 天, 抗体均阳转 (>0.5 IU/ml) (见表 6)。家兔免疫后 10 天, 抗体也阳转。21 天中和抗体可达 1:100 以上 (ED_{50}), 与地鼠肾成品疫苗的抗体滴度相仿或略高(见表 7), 另以 ELISA 法任意抽检上述鼠和兔免疫血清, 结果与小鼠法(MNT)类同。

表 6 Vero 细胞适应株对小白鼠诱生中和抗体的情况 (AIT 法, ED_{50} 均值)Table 6 The Neutralizing Antibodies in Mice Derived from Vero Cell Adapted Strains (AIT, Average Values in ED_{50})

Vaccine and Doses	Serum Samples	No. of Vaccine		
		RFD ₁	HS ₁ -25M	EM ₁
10 ⁻⁴ Vaccine 2 doses (0, 7 days)	Before injection	<1:5	<1:5	<1:5
	7 days after injection	<1:5	1:7	<1:5
	14 days after injection	1:135	1:136	1:80
	28 days after injection	1:87	1:167	1:91
10 ⁻¹ Vaccine 2 doses (0, 7 days)	Before injection	<1:5	<1:5	nd
	14 days after injection	1:97 (1.3IU/ml)	1:55 (0.75IU/ml)	nd
	28 days after injection	1:97 (1.3IU/ml)	1:71 (0.98IU/ml)	nd

表 7 适应株对家兔诱生中和抗体的情况 (AIT: ED_{50} 均值)Table 7 The Neutralizing Antibodies in Rabbits Derived from Vero Cell Adapted Strains (AIT, Average Values in ED_{50})

Serum Samples	No. of Vaccine			Primary Hamster Kidney Cell Vaccine (#8809)(2.95IU)
	RFD-3	RFD-5	HS ₁ -25M	
Before injection	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5
10 days After injection	1:112	1:40	>1:45	1:23
21 days After injection	1:323	1:113	1:118	1:102
31 days After injection	>1:405	1:580	nd	1:481

(2) 适应株“RFD”和“HS₁”灭活疫苗和地鼠肾疫苗免疫狗(0, 21天各注射一次, 1ml/次)之后, 同样可看到, 在第一针免疫后10天, 三组狗的抗体均阳转。图1表明, “HS₁”疫苗免疫的狗, 其抗体高峰滴度可达6—18IU/ml。地鼠肾疫苗免疫的狗, 在免疫后45天抗体也可达12IU/ml。说明二者的诱生中和抗体的能力相仿, 但后者抗体上升的时间略迟于前者。

适应株“RFD”和“HS₁”按传代细胞的常规做外源因子检查, 结果二者均阴性。

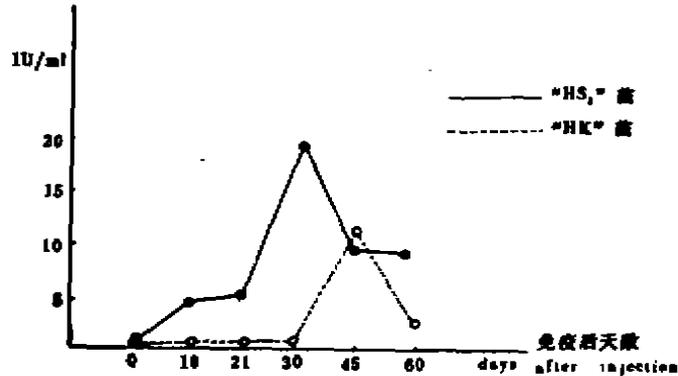


图1 “HS₁”和“HK”苗对狗诱生抗体的结果 (IU/ml)

Fig 1 The neutralising antibodies in dogs derived from “HS₁” and “HK” vaccine (Average value in IU/ml)

“aG”株狂犬固定毒作为国内狂犬病疫苗生产毒株, 经十年来数十万例临床考核, 证明具有较好的抗原和免疫原性^{[5][12]}。“RFD”和“HS₁”适应株能在Vero细胞上生长良好, 其培养液病毒滴度达 $10^{6.6}$ /ml左右, 其抗原和免疫原性与亲本株“aG”很相似。对“CVS”标准攻击毒又有较好的交叉中和和保护能力。对实验动物能诱生较高的中和抗体。因此, 我们认为这两株Vero细胞适应株可推荐作为Vero细胞微载体培养疫苗的候选毒种。

参 考 文 献

- [1] Kuwert E, Merieux C, et al Eds, 1985, Rabies in the Tropics, P144—152.
- [2] Orlando, Florida., 1984, Applied Virology, 241: 96.
- [3] Rifky M, EL-Karamany., 1987, Acta Virol, 31: 321.
- [4] M. Roumiantzeff et al., 1988, Reviews of Infect. Dis 10(S4): 751.
- [5] D.A. Warrell et al., 1988, Reviews of Infect. Dis 10(S4): 728.
- [6] P. Perrin et al., 1986, J. Biol. Stand. 14: 217.
- [7] L. Kavaklova et al., 1984, Acta. Virol. 28: 422.
- [8] MK, Kaplan and Koprowsky H., 1973, Laboratory Techniques in Rabies, 3rd Edition, WHO, Geneva.
- [9] E.A Fitzgerald et al., 1978, J. Biol. Stand. 6: 101.
- [10] Rosenoff E. I., 1979, J. Biol. Stand. 7: 1.
- [11] R. Barth, et al., 1984, J. Biol. Stand. 12: 29.
- [12] Lin F-T. et al., 1986, Improvements in Rabies Post-exposure Treatment, Eds, Vodapija et al, Zagreb Institute of Public Health, 37—45.

The Adaptation of Rabies Virus Strains in Vero Cell

Zeng Rong-fung et al

(Research Laboratory of Virology, Shanghai Institute of Biological
Products, Ministry of Public Health, Shanghai 200062)

Rabies is one of the serious infective diseases in China. More than 5 million people per year are wounded by animals. The yield of hamster kidney rabies vaccine produced in China every year is not enough to meet the practical need. So we attempt to develop a Vero cell rabies vaccine with micro-carrier system for large scale production. In this paper, the 'aG' virus strain, a Chinese rabies fixed virus used for preparing primary hamster kidney cell vaccine in China since 1980, was adapted in Vero cell. 2 adapted strains "RFD" and "HS₃" grew well in Vero cell and the virus titre of the supernatants was about $10^{6.5}$ /ml(LD₅₀). The antigenicity and immunogenicity of 'RFD' and 'HS₃' did not show significant variation from their parent virus "aG" strain and have good cross-reaction with "CVS" fixed virus. Both of them could induce the laboratory animal such as mice, rabbits and dogs to develop neutralizing antibodies. It is suggested that these adapted strains could be used for promising candidates of virus seed for Vero cell rabies vaccine production.

Key words: Rabies fixed virus Vero cell line Adaptive passage