

70-173

应用快速 HEPES 蚀斑法检测狂犬病毒

邵益斌 顾勤 曾蓉芳

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200052)

R446.5

关键词 HEPES 蚀斑法, MC 蚀斑法, 小鼠脑内毒力滴定, 狂犬病毒

蚀斑法作为滴定活性病毒效价常用的比较精确的方法早被广泛应用。国内外学者已经建立并应用狂犬病毒蚀斑法对狂犬病毒及其抗体进行检测^[1-5]。但这些方法操作严格,需时较长(7—10天)^[3-5]。近来有报道,HEPES对狂犬病毒致细胞病变作用具有增强效应^[6]。据说可利用这一特性应用到狂犬病毒快速蚀斑测定上^[7]。基于此目的,我们开展了以下试验,力图将此快速蚀斑法应用于狂犬Vero细胞RFD适应株的检测中,以缩短检测时间,加快纯化狂疫苗的研制工作。

本试验应用材料为Vero细胞株(来源ATCC);狂犬病毒RFD株(系Vero细胞适应株^[8],由本实验室提供);HEPES(为Merck公司产品)。

本试验将快速HEPES蚀斑法(RHPFT)与半微量甲基纤维素蚀斑法(MCPFT)及小鼠脑内毒力滴定(常规MT法)作比较。HEPES蚀斑法^[7],取24孔细胞培养板,将Vero细胞消化分散加入孔内,并立即加入不同稀释度病毒悬液,置含5%CO₂,37℃培养箱培养过夜后,换入甲基纤维素覆盖物^[9],37℃继续培养2—3天后,直接滴加100mmol/L HEPES,37℃培养24小时后吸去覆盖物,加结晶紫染色液^[9],置室温15—20分钟,自来水漂洗晾干后即可肉眼计数蚀斑数;MC蚀斑法,操作基本同于HEPES蚀斑法,不用HEPES处理,培养9—11天后染色计数;蚀斑减少中和试验,采用病毒稀释,血清固定法。

用狂犬病毒RFD株感染Vero细胞,经37℃培养3—4天用100mmol/L HEPES处理,2小时后即可产生明显的细胞病变,细胞融合形成网状结构,24小时后病变更为明显。用结晶紫染色后,肉眼可见十分清晰的园形蚀斑形成。而此时未用HEPES处理的则既无细胞病变产生,也无蚀斑形成,经培养7天左右,方可查出细胞病变,9天后染色肉眼才能看见较清晰的园形蚀斑形成。从病毒滴度看,蚀斑数随病毒稀释度的增高呈规律性递减,用HEPES处理与否,差异不明显(见表1)。经HEPES处理者,病毒滴度在感染后3天即可达到高峰,未处理者则在9天(见图)。由此可见,HEPES对狂犬病毒RFD株在Vero细胞的蚀斑形成有明显的促进作用。

用HEPES蚀斑法和未用HEPES处理的MC蚀斑法,以及常规MT法同时滴定5批RFD毒种,结果如表2所示。同时用3种检测方法对批号为920528的RFD毒种进行连续5次的测定,结果如表3所示。3种检测法有着相近的敏感性和可重复性,HEPES处理对病毒滴度影响不大,且具有缩短检测时间的优点。

• 本文于1993年1月5日收到,4月24日修回

表 1 不同感染天数用 HEPES 处理对蚀斑形成的影响

Table 1 Effect of the plaques formation treated with HEPES on different days after infection

天数 Days	组别 Groups	各病毒稀释度的蚀斑数 Number of plaques in virus dilution					滴度 PFU/ml
		10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	
3	A	C	72	16	2	0	2.0×10^7
	B	0	0	0	0	0	0
4	A	C	C	17	2	0	2.0×10^7
	B	0	0	0	0	0	0
9	A	ND	>40	13	1	0	1.0×10^7
	B	C					

A: 处理组 B: 未处理组 C: 融合

A: Treated with HEPES B: Treated without HEPES C: Confluence

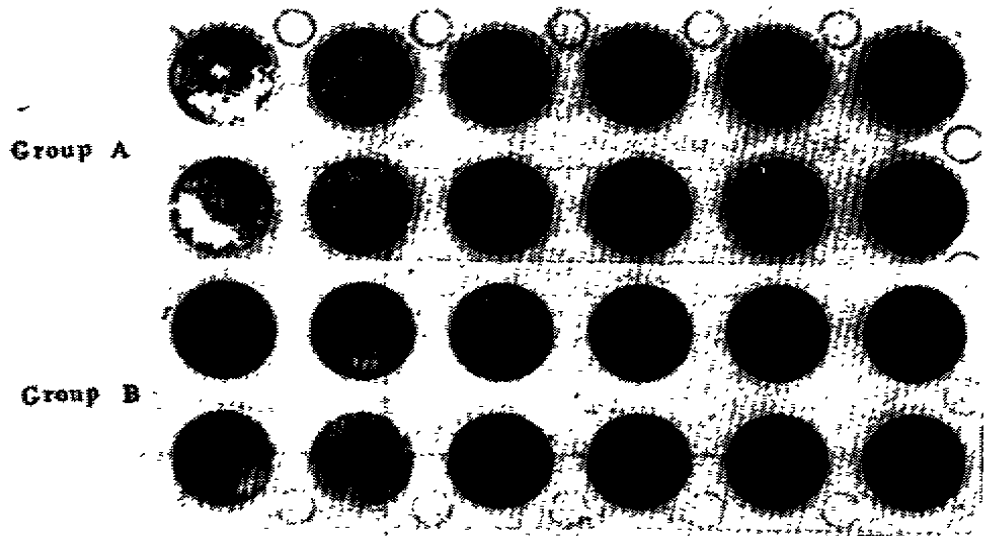


图 1 A 组: 感染 3 天后用 HEPES 处理的蚀斑形态

B 组: 感染 9 天后用 HEPES 处理的蚀斑形态

Fig. 1 Group A: The plaque morphology treated with HEPES on the 3rd day after infection

Group B: The plaque morphology treated without HEPES on the 9th day after infection

用精制的狂犬抗血清对狂犬 RFD 株感染滴度进行中和抑制, 结果表明 HEPES 诱导的蚀斑形成能被抗血清抑制, 中和指数为 ≥ 25000 (见表 4), 与小鼠法 (MNT) 中和指数密切相关。采用 HEPES 蚀斑减少中和试验 (HEPES-PRNT), 不仅可缩短检测时间, 而且可以避免用小鼠法时小鼠间的个体差异, 其结果更为可靠。

RFD 株感染 Vero 细胞, 经 37°C 培养 3 天, 分别加入 6 个不同浓度的 HEPES, 观察 24 小时后染色。结果表明: 浓度为 10mmol/L 、 25mmol/L 的 HEPES 未能促使清晰的蚀斑形成。浓度为 50mmol/L 、 100mmol/L 、 150mmol/L 、 200mmol/L 的 HEPES 所促进产生的蚀斑数分别为 $2.5 \times$

10^7 、 3.5×10^7 、 3.0×10^7 、 3.5×10^7 , 不存在显著的差别。但 $150-200 \text{mmol/L}$ HEPES 对 Vero 细胞似具有毒性作用: 未感染病毒的正常 Vero 细胞经上述浓度 HEPES 处理后 24 小时, 虽未见拉网或融合, 但形态有所改变, 肿胀透明度增高。用 $50-100 \text{mmol/L}$ 浓度 HEPES 处理细胞未见细胞变形或其它类似毒性反应的现象, 且蚀斑的形态最清晰。另外, 高浓度 ($150-200 \text{mmol/L}$) 的 HEPES 有进一步加速蚀斑形成的趋势 (4—5 小时), 有待进一步研究。

表 2 三种检测法测定 5 批 RFD 毒株的比较

Table 2 Comparison of infective titers of 5 lots rabies RFD strain measured by 3 different methods

病毒批号 No. 1 of virus	病毒感染滴度 Virus infective titers		
	快速蚀斑法 RHPFT (PFU/ml)	蚀斑法 MCPFT (PUF/ml)	小鼠法 MT (LD ₅₀ /ml)
	920525	3.5×10^6	ND
920523	3.75×10^7	2.0×10^7	$10^{-5.02}$
920528	1.75×10^7	2.75×10^7	$10^{-7.17}$
920516	1.75×10^7	1.0×10^7	$10^{-7.25}$
921008	1.0×10^7	ND	$10^{-7.0}$

表 3 对同批 RFD 株 5 次检测的比较

Table 3 Comparison of infective titers of the same RFD strain measured in 5 times

次数 Times	病毒感染滴度 Virus infective titers		
	快速蚀斑法 RHPFT (PFU/ml)	蚀斑法 MCPFT (PFU/ml)	小鼠法 MT (LD ₅₀ /ml)
	1	3.5×10^7	2.0×10^7
2	1.75×10^7	2.75×10^7	$10^{-7.17}$
3	3.0×10^7	3.25×10^7	$10^{-7.17}$
4	2.0×10^7	1.0×10^7	$10^{-4.02}$
5	3.5×10^7	3.0×10^7	$10^{-7.00}$

表 4 特异抗血清对 RFD 株的中和抑制作用

Table 4 Neutralization test of RFD strain by anti-rabies sera

检测法 Detecting methods	病毒感染滴度 Virus infective titers		中和指数 Neutralization index
	中和组 Neutralizing group	对照组 Control group	
	快速蚀斑减少法 HEPES-PRNT	$\leq 1.0 \times 10^2$	
小鼠中和法 MNT	$10^{-2.73}$	$10^{-4.73}$	10000

参 考 文 献

- 1 Smith A L, Tignor G H, Mifune K, et al. Isolation and assay rabies serogroup viruses in CER cells. *Intervirology*, 1977; 8(2), 92~99
- 2 Barth R, GroB-Albenhausen E, Jaeger O, et al. The anti-body-binding-test, a useful method for quantitative determination of inactivated rabies virus antigen. *J Biol Stand*, 1981; 9(1), 81~89
- 3 肖泽帅, 贾丽丽. 狂犬病毒甲基纤维素半微量蚀斑及蚀斑减少中和试验的建立. *实验和临床病毒学杂志*, 1987; 1(1), 16~19
- 4 严子林, 李正平, 王途. 狂犬病毒蚀斑方法的建立. *病毒学杂志*, 1988; 3(2), 142~147
- 5 李宏玲, 李河民, 俞永新, 等. 用细胞病变及蚀斑形成测定狂犬病毒方法的建立. *中华微生物和免疫学杂志*, 1990; 10(3), 191~194
- 6 聂子林, 俞永新, 王竟梅, 等. HEPES 对狂犬病毒致细胞病变作用的增强效应. *病毒学报*, 1991; 7(4), 375~377
- 7 聂子林, 曲晓清, 俞永新, 等. 狂犬病毒快速 HEPES 蚀斑方法的建立. *中华微生物和免疫学杂志*, 1993; 13(4), 268~270
- 8 曾蓉芳, 陈阿根, 张瑛等. 狂犬固定毒 Vero 细胞适应株的建立. *病毒学杂志*, 1990; 5(3), 285~290
- 9 张国铭, 郑铮, 俞永新. 流行性乙型脑炎病毒血清抗体半微量空斑抑制法的改进. *病毒学报*, 1987; 3(4), 385~387

The Application of Rapid HEPES-plaques-forming Test(RHPFT) to Rabies Virus Titration

Shao Yibing Gu Qin Zeng Rongfang

(Shanghai Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Shanghai 200052)

According to the phenomenon that HEPES could enhance CPE in rabies virus infected cell and accelerate the plaques formation, the virulence of rabies virus(RFD strain) was detected with 3 different methods including RHPFT, MC-plaques test and mouse i. c. test. The results showed that the sensibility of 3 detecting methods was similar but RHPFT was more rapid and simple than the latter two. The result of RHPFT method could be obtained earlier about 6—7 days than MC-plaques test which ever used as a routine assay in rabies virus titration. RHPFT could also be used for rabies neutralizing antibody assay.

Key words HEPES-plaques-forming test, MC-plaques-forming test, Mouse i. c. test, Rabies virus