

• 论 著 •

BHK-21 和 BSR 细胞用于 RFFIT 检测的一致性研究^{*}

李云云^{1,2}, 于鹏程², 申辛欣², 余 春³, 吕新军², 裴秋玲¹, 唐 青^{2△}

(1. 山西医科大学公共卫生学院, 太原 030001; 2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206;
3. 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004)

摘 要:目的 比较 BSR 和 BHK-21 两种细胞分别引入快速荧光灶抑制试验(RFFIT)检测体系后其检测结果的差异。方法 将 BSR、BHK-21 两种细胞分别引入 RFFIT 体系后, 检测 106 份人血清样品中狂犬病毒中和抗体, 并分析结果的相关性和一致性。结果 两种方法结果之间有较好的直线相关关系($r=0.859$), 并有正向回归关系, 直线回归方程: $Y=2.261+0.737X$ ($P<0.01$); 经同一份样品的重复检验, 两种方法检测的稳定性较好。结论 BHK-21 细胞系可以用于国内 RFFIT 检测体系。

关键词: 研究; BHK-21; BSR; 相关性; 稳定性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)08-0827-02

Consistency study of BHK-21 and BSR cells in RFFIT detection^{*}

Li Yunyun^{1,2}, Yu Pengcheng², Shen Xinxin², Yu Chun³, Lv Xinjun², Pei Qiuling¹, Tang Qing^{2△}

(1. Public Health Academy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 3. Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China)

Abstract: **Objective** To compare the detection results after BSR and BHK-21 cells being introduced to the RFFIT detection system. **Methods** 106 serum samples from human were detected for hydrophobic virus neutralizing antibody by RFFIT using BHK-21 and BSR cells, and the correlation and consistency of the two kinds of method were analyzed. **Results** There was fine linear correlation ($r=0.859$) between the detection results of the two methods, with positive regression relationship $Y=2.261+0.737X$ ($P<0.01$). Both the two methods had fine constancy, when utilized for the repeated detection of same samples. **Conclusion** BHK-21 cells could be used in domestic RFFIT detection system.

Key words: research; BHK-21; BSR; correlation; stability

荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)由 Smith 等^[1]建立, 是世界卫生组织(WHO)推荐的狂犬病毒中和抗体检测标准方法之一^[2-3]。其原理是将待测血清与攻击病毒经中和反应后接种体外培养细胞, 采用荧光抗体试验(fluorescent antibody test, FAT)检测剩余病毒从而计算中和抗体效价。目前, 国内仅少数狂犬病专业研究实验室可以进行该检测^[4-5]。国内 RFFIT 技术体系均来自法国巴斯德研究所, 使用 BSR 细胞系和 CVS-11 狂犬病毒固定毒株^[6]。BHK-21 是 RFFIT 检测中常用的细胞系, 但国内尚未将其用于 RFFIT 检测^[7-8]。本研究将国内实验室普遍使用的 BHK-21 细胞应用于 RFFIT 检测, 并与应用 BSR 细胞系进行的检测平行比较, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和待测样品 BSR 细胞系来自世界卫生组织狂犬病参比实验室法国巴斯德研究所狂犬病研究室, 按照标准传代方法进行细胞传代。BHK-21 细胞系、狂犬病毒攻击株 CVS-11 由本实验室保存。106 份待测人血清样品由贵州省疾病预防控制中心提供。样品置 4℃冰箱冷藏, 室温下平衡 30 min 后 56℃水浴灭活 30 min, 室温下平衡 30 min 后进行检测^[9-10]。

1.1.2 主要试剂和仪器 人狂犬病免疫球蛋白国家标准品(标示效价 21.4 IU/mL)购自中国药品生物制品检定所。

FITC 标记抗狂犬病病毒核蛋白抗体购自 Millipore 公司。DMEM、MEM 培养液购自 Gibco 公司。普通倒置光学显微镜为 Olympus CX 41 型, 倒置荧光显微镜为 Olympus IX 51 型。

1.2 RFFIT 检测法操作程序 按方案选择一部分细胞板为稀释板, 在相应孔内加入 100 μL DMEM, 取待测标准血清 50 μL 分别加入相应孔内, 混匀; 另取培养板作为检测板, 相应孔内加入 100 μL 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM, 从稀释板内取出 50 μL 待测血清稀释液, 在检测板上进行后续 1:3 倍比稀释; 设置对照系列, 除细胞和病毒对照以外的各孔均加入稀释至 80%~95% 感染量的 CVS-11 毒种 50 μL, 37℃感作 1 h; 每孔加入 1×10^6 /mL BSR(BHK-21 需要 10% FBS 的 MEM 培养)细胞悬液 50 μL, 37℃5% CO₂ 感作 24 h; 弃培养液, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 1 次, 弃掉 PBS 后每孔加 50 μL 80% 冷丙酮, -20℃固定 30 min; 弃丙酮, 室温干燥 5 min, 每孔加 50 μL 稀释的荧光标记抗狂犬病毒核蛋白抗体^[9], 37℃孵育 30 min; 弃液后用 PBS 洗涤, 加甘油铺满孔底; 倒置荧光显微镜下详细观察记录, 求得各样品中和抗体效价值, 单位为 IU/mL^[9-10]。

1.3 统计学处理 采用统一的 Excel 表记录样品检测信息, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 采用 BSR 和 BHK-21 细胞进行快速荧光灶抑制试验

^{*} 基金项目: 十一科技重大专项——传染病检测技术研究、传染病病原体诊断和组合检测技术资助项目(2008ZX10004-002); 公益性行业(农业)科研专项基金资助项目(200803014)。△ 通讯作者, E-mail: qtang04@sina.com。

(RFFIT)检测的差异分析 106 份样品采用 BSR 和 BHK-21 细胞进行 RFFIT 检测,经 t 检验, $P=0.378$,可以认为 BHK-21 和 BSR 进行 RFFIT 检测等效。

2.2 采用 BSR 和 BHK-21 细胞进行 RFFIT 检测的相关性分析 对 106 份样品分别采用两种细胞的检测结果进行相关性分析,两者差异有统计学意义($r=0.859, P<0.01$),并且直线相关关系良好($r^2=0.71$)。经进一步分析,两结果之间存在正回归关系,直线回归方程: $Y=2.261+0.737X(P<0.01)$,见图 1。

2.3 采用 BSR 和 BHK-21 细胞进行 RFFIT 检测的重复性比较 采用 BSR 和 BHK-21 细胞对同一样品分别进行 10 次 RFFIT 检测,前者样品检测值在 0.89~1.32 IU/mL 之间,最大差值 0.43 IU/mL, $\bar{x}=1.05$ IU/mL, $s=0.15$, $CV=0.15$;而后者检测值在 0.86~1.39 IU/mL 之间,最大差值 0.53 IU/mL, $\bar{x}=1.16$ IU/mL, $s=0.19$, $CV=0.16$,显示采用 BSR 和 BHK-21 细胞进行 RFFIT 检测均具有良好的稳定性,见图 2。

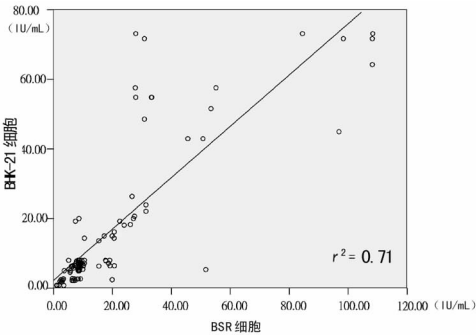


图 1 采用 BSR 和 BHK-21 细胞进行 RFFIT 检测的相关性分析

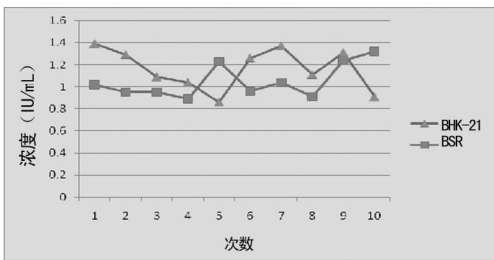


图 2 采用 BSR 和 BHK-21 细胞进行 RFFIT 检测的重复性比较

3 讨 论

当前,中国狂犬病流行态势十分严峻。出于加强狂犬病暴露后预防处置效果监测的目的,本室建立了狂犬病病毒中和抗体检测的 RFFIT 技术体系,并逐步向各省级疾病预防控制中心推广。鉴于国内引入的 RFFIT 检测体系中 BSR 细胞系起源、代次等背景资料不明,尝试用国内实验室普遍使用背景信息明确的 BHK-21 细胞进行 RFFIT 检测,以便对该技术进行有效的推广。本研究采用两种细胞对同一批血清样品进行检测,结果表明两者之间差异无统计学意义,且有良好的相关性和直线回归关系;分别采用两种方法对同一样品进行 10 次重复 RFFIT 检测,表明两者均具有较好的稳定性。因此,BHK-21 用于 RFFIT 检测效果良好,是 RFFIT 推广时适宜使用的细胞系。

BHK-21 对包括狂犬病病毒在内的多种病毒敏感^[11],培养条件简单,在狂犬病研究中广泛使用。MNA 细胞是国际上 RFFIT 检测中应用更加广泛的另一种细胞系,但在国内应用较少^[12],本研究拟进一步摸索使用 MNA 细胞,完善国内 RFFIT 检测体系。

近年来,发现用于狂犬病病毒中和抗体替代检测的 ELISA 检测试剂盒效能差异大^[13],而且与 RFFIT 检测结果一致性较差^[14]。因此仍不能用于指导免疫程序及免疫措施的制定^[15]。推广 RFFIT 检测体系是科学防治狂犬病的一个重要技术环节,采用国内易于获得的资源开展 RFFIT 对该技术体系在国内的完善和发展有益,同时也极大方便了在国家疾病预防控制体系内该技术的广泛应用。

参考文献

[1] Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody[J]. Bull WHO, 1973, 48: 535-541.

[2] World Health Organization. WHO expert consultation on rabies: first report of WHO technical report series[R]. Geneva: WHO, 2004: 1-121.

[3] Kramer B, Schildger H, Behrendorf-Nicol HA, et al. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines[J]. Biologicals, 2009, 37(2): 119-126.

[4] 吴小红, 李加, 唐建蓉, 等. 抗狂犬病病毒中和抗体效价快速荧光灶抑制试验(RFFIT)的建立及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(11): 1145-1148.

[5] 于鹏程, 吕新军, 申辛欣, 等. 狂犬病病毒中和抗体检测快速荧光灶抑制试验的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 439-440.

[6] 严家新, 李承平, 朱家鸿, 等. 检测狂犬病病毒中和抗体的快速荧光灶抑制试验方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 1998, 11(2): 93-96.

[7] 孙怡, 李秀锦, 吴炳元, 等. 3 种传代细胞系对狂犬病病毒 CTN-1V 株敏感性的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(10): 880-883.

[8] 徐葛林. 国内外狂犬病毒实验室检测与诊断技术的研究及进展[J]. 中国计划免疫, 2005, 11(2): 147-150.

[9] 扈荣良. 狂犬病理论技术与防治[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 227-229.

[10] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 93-110.

[11] 王继麟, 朱家鸿. 狂犬病毒在不同细胞培养中持续感染的特性研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(3): 30-32.

[12] 魏敬双, 程立均, 赵伟, 等. 重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体的质控方法及质量标准的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(8): 861-865.

[13] 袁红, 毛旖, 黄文芳. ELISA 试验加样误差对试验结果的影响分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 835-837.

[14] 刘华章, 黄桂花, 曹庆, 等. ELISA 法与 RFFIT 法检测狂犬病疫苗免疫后血清抗体的比较[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(5): 497-499.

[15] 王洪彪, 王余俊. 人狂犬病病毒 IgG 抗体定量测定试剂盒(酶联免疫法)的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1142-1143.