

## · 论 著 ·

# 改良抗体结合试验的建立和在灭活狂犬病疫苗效价检测中的应用\*

李云云<sup>1,2</sup>, 徐文超<sup>1</sup>, 李 勇<sup>1</sup>, 裴秋玲<sup>1△</sup>, 吕新军<sup>2</sup>

(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)

**摘要:**目的 对抗体结合试验(ABT)进行改进并将其用于灭活狂犬病疫苗效力的测定。方法 将快速荧光灶抑制试验(RFFIT)与 ABT 方案融合, 在疫苗样品稀释、剩余中和抗体检测、结果计算方面进行改进, 形成改良抗体结合试验(M-ABT); 应用 M-ABT 对 10 种灭活狂犬病疫苗随库存时间增加疫苗效力改变的情况进行检测。结果 M-ABT 可以在 28 h 内完成, 比 ABT 节省 2 d, 检测结果与人用狂犬病疫苗效价测定法(NIH)基本等效; 10 种疫苗随着库存时间增加疫苗效力下降。结论 M-ABT 法能够成功建立, 并用于灭活狂犬病疫苗效力检测效果较满意。

**关键词:**狂犬病疫苗; 抗体结合试验; 快速荧光灶抑制试验; 疫苗效力

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)09-0923-02

## Establishment of modified antibody binding test and application in the efficacy test of inactivated rabies vaccines\*

Li Yunyun<sup>1,2</sup>, Xu Wenchao<sup>1</sup>, Li Yong<sup>1</sup>, Pei Qiuling<sup>1△</sup>, Lv Xinjun<sup>2</sup>

(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)

**Abstract: Objective** To establish modified antibody binding test (ABT) and investigate its application in the efficacy test of inactivated rabies vaccines. **Methods** Modified ABT (M-ABT) was established by the combination of RFFIT and ABT, and refining the dilution of vaccine samples, detection of residual rabies virus neutralizing antibody (RVNA) and calculation of results. The change of the efficacy of ten kinds of inactivated rabies vaccines with different stored periods were detected by M-ABT. **Results** M-ABT could be completed within 28 h, and 2 days were saved compared with ABT. The efficacy detected by M-ABT was equal to NIH method. **Conclusion** M-ABT had been successfully established and could be used for the efficacy test of inactivated rabies vaccines.

**Key words:** rabies vaccines; antibody binding test; rapid fluorescent focus inhibition test; efficacy of vaccine

国内灭活狂犬病疫苗效价检测一直采用人用狂犬病疫苗效价测定法(NIH)<sup>[1]</sup>, 全程至少需要 28 d<sup>[2]</sup>, 由于动物个体差异等因素影响, 实验结果重复性较差<sup>[2-3]</sup>。用 NIH 法进行灭活狂犬病疫苗效价测定经常无法满足实际检测需求, 制约狂犬病疫苗的生产和鉴定过程。因此, 建立快速且与 NIH 法等效的灭活狂犬病疫苗效价测定方法具有重要意义。本研究介绍了借鉴快速荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)技术<sup>[4-5]</sup>, 建立的一种体外测定灭活狂犬病疫苗效价的改良抗体结合试验(modified antibody binding test, M-ABT)及其实际应用, 现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** BSR 细胞系来自法国巴斯德狂犬病研究室, 按照标准方法传代培养; 已知滴度的狂犬病毒标准攻击毒株 CVS-11 由本实验室提供; 狂犬病免疫球蛋白标准品、狂犬病疫苗效力标准品购自中国药品生物制品检定所。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂和仪器** DMEM 培养液购自 Gibco 公司。普通倒置光学显微镜为 Olympus CX41 型, 倒置荧光显微镜为 Olymplus IX51 型。

**1.2.2 待测疫苗样品** 10 种待测狂犬病疫苗分别来自 10 家人用狂犬病疫苗生产企业, 提供 NIH 法标示疫苗效力, 将疫苗

同时存放在冷藏库内, 冷藏库保持正常的进出货开关频率, 每隔 1 个月检测疫苗效力, 连续检测 6 个月, 绘制疫苗效力变化曲线。

**1.2.3 M-ABT 标准操作程序** 取一块 96 孔板, 按照设计方案在各孔中加入 100 μL 10% 胎牛血清(FBS)DMEM 培养液; 将疫苗效力标准品以 1 mL 注射用水溶解, 取 100 μL 加入第 1 孔, 混匀, 做 1:2 倍稀释。每孔加入 100 μL 0.2 IU/mL 狂犬病免疫球蛋白标准品稀释液。待测疫苗样品同样处理, 设置抗体阴性对照, 37 °C 孵育 1 h。每孔取 100 μL 混合液加入另外一块 96 孔细胞培养板, 每孔加入毒种液 50 μL。设置疫苗阴性对照及病毒对照。每孔加入细胞悬液 50 μL, 5% CO<sub>2</sub> 条件下 37 °C 感作 24 h。将培养板取出, 按常规固定、染色、洗板, 加甘油铺满孔底; 倒置荧光显微镜下详细观察并记录、求取各标准品和待测样品效价<sup>[6]</sup>。

**1.3 统计学处理** 采用统一的 Excel 表记录结果, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。

## 2 结 果

**2.1 待测疫苗 NIH 法标示效价与 M-ABT 法检测效价比较** 10 种待测疫苗经 M-ABT 法测定的效价与 NIH 法相近(表 1), 两种检测方法之间有较好的相关关系( $r = 0.927, P < 0.001$ )。进一步分析得出两者亦有较好的回归关系( $r^2 =$

\* 基金项目:十一五科技重大专项——传染病检测技术研究、传染病病原体诊断和组合检测技术(2008ZX10004-002)。 △ 通讯作者, E-mail: pqlpei@263.net。

0.860,  $P < 0.001$ )。回归方程,  $Y = 1.028 - 0.049X$ , 回归曲线见图1。

## 2.2 待测疫苗效价随库存时间的改变情况 10种待测疫苗

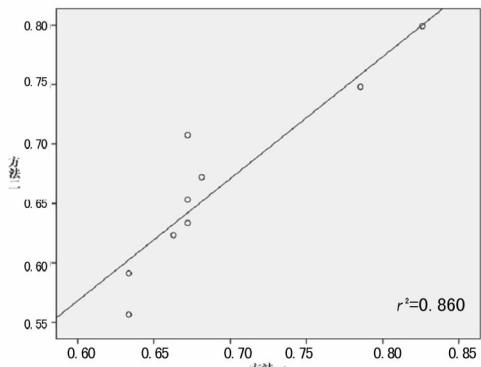
检测结果显示随库存时间增加疫苗效价有不同程度下降,但在6个月内疫苗效价仍保持在国家规定的合格值2.5 IU/mL以上见表2、图2。

表1 待测疫苗 NIH 法标示效价与 M-ABT 法检测效价比较结果(IU/mL)

检测方法	疫苗A	疫苗B	疫苗C	疫苗D	疫苗E	疫苗F	疫苗G	疫苗H	疫苗I	疫苗J
NIH	6.7	6.1	4.6	4.7	4.8	4.3	4.3	4.7	6.1	4.7
M-ABT	6.3	5.6	4.2	4.5	4.7	3.9	3.6	5.1	5.6	4.3

表2 待测疫苗 M-ABT 法测定效价随库存时间的改变情况(IU/mL)

时间	疫苗A	疫苗B	疫苗C	疫苗D	疫苗E	疫苗F	疫苗G	疫苗H	疫苗I	疫苗J
0个月	6.3	5.6	4.2	4.5	4.7	3.9	3.6	5.1	5.6	4.3
1个月	6.0	5.2	4.0	4.3	4.3	3.8	3.3	5.0	5.3	4.0
2个月	6.0	5.0	3.9	4.2	4.3	3.6	3.2	5.0	5.2	3.9
3个月	5.9	5.0	3.6	4.0	4.1	3.6	3.0	4.9	5.2	3.8
4个月	5.5	4.8	3.5	4.0	4.0	3.4	3.0	4.9	5.0	3.8
5个月	5.3	4.8	3.3	3.9	4.0	3.2	2.9	4.8	5.0	3.7
6个月	5.0	4.6	3.3	3.8	4.0	3.2	2.6	4.6	4.8	3.7



方法一: NIH; 方法二: M-ABT。

图1 NIH法与M-ABT法同时检测始终疫苗结果

$$\text{回归曲线 } Y = 1.028 - 0.049x \quad (P < 0.001)$$

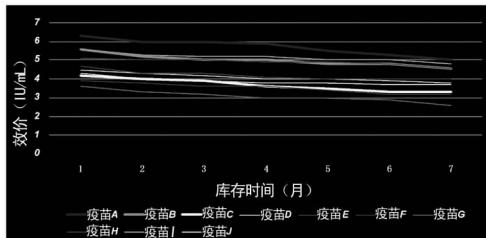


图2 10种狂犬病疫苗随库存时间增加疫苗效价的改变情况

## 3 讨论

体外测定灭活狂犬病疫苗效价的抗体结合试验(antibody binding test, ABT)可常规用于灭活狂犬病疫苗生产过程中不同阶段的抗原含量检验<sup>[3]</sup>。疫苗有效抗原成分含量越高,剩余中和抗体含量越低,经与已知效价疫苗标准品进行比较,即可计算出待测疫苗效价<sup>[3]</sup>。传统ABT需要提前在96孔板上进行细胞培养,检测剩余病毒需要3d时间<sup>[3]</sup>。本研究借鉴RFFIT方法对传统ABT进行改良<sup>[7]</sup>,无需提前在96孔板上进行细胞培养,检测剩余病毒仅需24 h,试验周期缩短<sup>[4,8]</sup>;设计人性化结果计算软件,提高试验效率<sup>[9]</sup>,对狂犬病疫苗生产企业

有较高的实用价值<sup>[10]</sup>。

同经典NIH法相比M-ABT法具有如下优点<sup>[11]</sup>:(1)人道及节约,不需要大量消耗试验动物,仅需要体外培养细胞;(2)耗时较短,仅需28 h;(3)重复性好,结果稳定,变异度较小;(4)检验效力强,M-ABT法检验效力与NIH法相当<sup>[12]</sup>。ABT法已载入WHO 1996年版《狂犬病实验室技术手册》第4版,WHO推荐将此方法用于疫苗生产过程质量控制<sup>[13]</sup>。使用M-ABT法进行灭活狂犬病疫苗抗原含量检测将给这些单位带来极大便利,大幅提高企业生产效率<sup>[14]</sup>。目前M-ABT法在国内应用还极为有限,期待该方法在推广过程中获取更多数据,以进一步校正和完善,更好地适应国内狂犬病疫苗生产企业的需求<sup>[15]</sup>。

## 参考文献

- [1] 刘金花. 狂犬病疫苗有效抗原含量检测方法的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(4): 437-440.
- [2] 龚荣良. 狂犬病理论技术与防治[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 284-299.
- [3] Barth R, Gross-Albenhausen E, Jaeger O. The antibody binding test:a useful method for quantitative determination of inactivated rabies antigen[J]. J Biol Stand, 1981, 9: 81-89.
- [4] 吕新军, 唐青, Bourhy H, 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): 439-441.
- [5] 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.
- [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(RFFIT)方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 1998, 11(2): 93-96.
- [7] Krämer B, Schildger H, Behrensdorf-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.
- [8] 祝玉桃, 严家新, 方志正, 等. 应用改良抗体结合试验(ABT)方法检测狂犬病疫苗效力[J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(2): 116-117.

(下转第926页)

续表 1 HITACHI 7180 与 HITACHI 7020 检测系统

测定结果的比较( $\bar{x} \pm s, n=40$ )

检测项目	HITACHI 7180	HITACHI 7020	P	r
GGT(U/L)	81.0±114.0	83.0±116.0	0.147	0.997
BUN(mmol/L)	6.9±4.2	7.1±4.2	0.026	0.999
Cr(μmol/L)	90.0±74.0	93.0±76.0	0.041	0.994
UA(mmol/L)	317.0±173.0	313.0±180.0	0.200	0.998
TBA(μmol/L)	20.0±49.0	22.0±48.0	0.029	0.989
ChE(U/L)	7 732.0±4 018.0	7 904.0±4 121.0	0.020	0.995
AMY(U/L)	135.0±163.0	131.0±159.0	0.021	0.993
GLU(mmol/L)	7.6±6.8	7.7±6.9	0.072	0.998

**2.2 两个检测系统各项检测指标测定结果的相关性分析** 以 HITACHI 7180 为比对检测系统, HITACHI 7020 检测系统与其进行相关性回归分析。结果显示, 各项目经回归分析后, 均相关性良好( $r \geq 0.989$ ), 见表 1。

### 3 讨 论

检验结果可靠、及时是实验室承诺的质量目标<sup>[3]</sup>, 因此不同检测系统间结果的比对研究不容忽视。在保证快速报告检验结果的基础上还要保证检验结果的可比性。通过建立参比仪器, 用比对实验监控其他仪器能及时避免系统误差的产生, 有效地保证多台仪器在实际工作中交替使用时结果的一致性和准确性<sup>[4]</sup>。

检验结果的量值溯源和不同检测系统检验结果的可比性是医学实验室认可标准 ISO/15199 的重要技术要素, 并强调比对实验是实现准确度溯源和检验结果可比性的重要途径<sup>[5]</sup>。由于实验室标本量多, 一台仪器不能及时完成所有检验, 为了满足临床需要的快速急诊检验, 通常多台仪器交替使用, 因此要进行方法学比对和偏倚分析, 若发现有偏倚, 必须纠正结果间的偏差, 确保结果的准确和稳定<sup>[6]</sup>。本实验采用临床新鲜血液样本, 在 4 h 内完成测定及仪器的比对<sup>[7]</sup>, 有报道生化结果在分离血清后 5 h 内保持恒定不变<sup>[8]</sup>。测定 15 个项目, 有 7 个项目没有差异, 另外 8 个项目(TBIL、DBIL、ALP、BUN、Cr、TBA、ChE、AMY)存在不同程度的正、负偏差, 结果间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )<sup>[9]</sup>。在测定这些有差异的项目时, 需对其进行校正, 否则引起结果偏差<sup>[10]</sup>, 采用计算系数对结果进行校正, 其临床效果较好。实验中两检测系统具有良好的相关性, 相关系数均在 0.989 以上, 说明只通过相关性的比对, 不能发现差异, 通常不够妥当<sup>[11]</sup>。这与张世锟等<sup>[12]</sup>报道一致, 说明仅用相关性比较不能准确衡量各仪器间检测结果的一致性。

(上接第 924 页)

- [9] Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, et al. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 161(2): 58-62.
- [10] 董关木. 狂犬病的防治、疫苗和抗血清的安全性探讨[J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(4): 362-365.
- [11] 严家新, 祝玉桃, 徐葛林, 等. 应采用细胞培养法取代动物试验法检定狂犬病疫苗[J]. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(3): 192-194.
- [12] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 北京: 中国医药科技出版社,

综上所述, 定期对实验室同一项目不同检测系统进行比对, 是保证测定结果准确性的重要手段<sup>[13]</sup>, 也是实验室质量控制的一个良好补充。对于使用者, 评估的目的在于确定两种方法在允许范围内能否得到相同的结果<sup>[14]</sup>, 两台仪器经比对, 部分项目存在偏倚无显著性差异。另外, 存在差异的项目, 经过校正之后也具有较好的相关性, 在实验室实际应用中取得较好的效果。

### 参考文献

- [1] 彭黎明, 邓瑞雪. 血细胞自动分析比对的溯源[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(5): 475-477.
- [2] 董家书. 对不同血细胞分析仪的比对试验[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(1): 92-93.
- [3] 冯仁丰. 临床检验质量管理[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2004: 38-54.
- [4] 李秀兰, 付志祥, 丁慧. 两种血液分析仪检测结果的比对及分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2762-2763.
- [5] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 38-54.
- [6] 秦辛玲, 黄立伟, 石青峰, 等. 罗氏 E170 与 E601 检测系统间甲状腺激素测定结果的偏倚分析及可比性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(4): 109-111.
- [7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 141.
- [8] 孙杰, 王丽平. 测定时间对生化结果影响的探讨[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2739.
- [9] 蔡辉. 总体均数的估计与假设检验//倪宗璇. 卫生统计学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1995: 19-30.
- [10] 彭黎明, 李丽娟. 几种血细胞分析仪结果的比对和质控[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(2): 94-97.
- [11] 胡良平. 检验医学中常见的统计学问题及其对策[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(5): 299-302.
- [12] 张世锟, 万腊根, 吕小林. 应用比对试验评价血细胞分析仪的探讨[J]. 江西医学检验, 2005, 23(3): 200-202.
- [13] England JM, Rowan RM, van Assendelft OW, et al. Protocol for evaluation of automated blood cell counters[J]. Clin Lab Haematol, 1984, 6: 69-84.
- [14] 郭建, 谢洁红, 赵海舰. 方法学比较实验的设计及对两种白蛋白测定法的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(6): 343.

(收稿日期: 2010-12-29)

2009: 93-95.

- [13] Meslin FX, Kaplan MM, Koprowaki H. Laboratory techniques in rabies[J]. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1996: 394-397.
- [14] 苏军英, 陶小润, 孙承梅, 等. 人用狂犬病疫苗免疫抗体检测方法的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 1999, 12(4): 236-237.
- [15] 王洪飚, 王余俊. 人狂犬病毒 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.

(收稿日期: 2010-10-09)