

• 论 著 •

FAVN 与 RFFIT 在动物和人狂犬病中和抗体检测中的比较^{*}

张守峰, 张 菲, 刘 晔, 王 颖, 米立娟, 扈荣良[△]

(军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林省人兽共患病防控重点实验室, 吉林长春 130122)

摘要:目的 比较荧光抗体病毒中和试验(FAVN)和快速荧光灶抑制试验(RFFIT)两项技术用于动物和人血清狂犬病中和抗体检测的差异。方法 以 FAVN 和 RFFIT 两种方法分别对 60 份动物及人血清进行狂犬病中和抗体的平行定量检测, 应用配对定量资料的 *t* 检验对所得数据进行统计学分析。结果 以 0.5 IU/mL 的国际推荐标准, 对同一样品经 FAVN 和 RFFIT 两种方法测定的中和抗体效价进行定性判定, 二者对全部 60 份样品的检测符合率为 96.67%(58/60)。统计学分析显示, 两种检测方法对总体样品及不同动物样品的定量检测结果差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 FAVN 和 RFFIT 可通用于动物和人血清的狂犬病中和抗体检测。

关键词: 狂犬病; 中和抗体; 荧光抗体病毒中和试验; 快速荧光灶抑制试验; 比较

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)09-1161-03

Comparison between FAVN and RFFIT for rabies neutralizing antibody detection of sera from animals and human^{*}

Zhang Shoufeng, Zhang Fei, Liu Ye, Wang Ying, Mi Lijuan, Hu Rongliang[△]

(Research Institute of Military Veterinary, Academe of Military Medical Sciences of PLA, Key Laboratory of Jilin Province for Zoonosis Prevention and Control, Changchun, Jilin 130122, China)

Abstract: Objective To compare the differences of fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) and rapid fluorescence focus inhibition test (RFFIT) in detecting rabies neutralizing antibody of animals and humans. **Methods** The neutralizing antibody titer against rabies virus in 60 animal sera and human sera were performed the parallel and quantitative detection by FAVN and RFFIT respectively. Significance analysis between the paired quantitative data was performed by *t* test. **Results** The coincidence rate between the qualitative results of FAVN and RFFIT was 96.67% (58/60) at the cutoff value of 0.5 IU/mL. The quantitative detection results of the overall samples and different animal samples had no statistically significant difference between FAVN and RFFIT ($P>0.05$). **Conclusion** FAVN and RFFIT could be commonly used in the rabies neutralizing antibody titer detection of animal sera and human sera.

Key words: rabies; neutralizing antibody; fluorescent antibody virus neutralization test; rapid fluorescence focus inhibition test; comparison

狂犬病是世界范围内广泛流行的兽共患传染病, 中国是狂犬病的高发区, 目前每年仍有近千人死于狂犬病。在中国, 犬及个别野生动物(如鼬獾)是绝大多数人狂犬病的传染源^[1]。因此, 动物狂犬病的防控是控制和消除人狂犬病的根本前提。通过接种疫苗进行免疫预防是动物狂犬病控制的重要手段, 北美、西欧等地区的发达国家, 均经历了动物狂犬病严重流行到逐步控制的过程, 并因此实现了基本消除人狂犬病^[2]。

动物或人接种狂犬病疫苗一定时间后的狂犬病中和抗体水平是衡量免疫效果的关键指标。世界动物卫生组织(OIE)推荐以荧光抗体病毒中和试验(FAVN)进行动物狂犬病中和抗体定量检测^[3], 而世界卫生组织(WHO)则推荐以快速荧光灶抑制试验(RFFIT)作为人狂犬病中和抗体定量检测的方法^[3]。与之相对应的, 中国动物疫控及兽药监察系统采用 FAVN 技术进行狂犬病免疫监测及免疫制品的评价, 而中国的卫生疾控及药监系统主要应用 RFFIT 技术对人进行狂犬病暴露后免疫效果跟踪及狂犬病疫苗的药效学评价。FAVN 和 RFFIT 技术的原理均为以梯度稀释血清中和固定量病毒的细

胞水平的病毒中和试验, 只是稀释梯度、操作过程和计算方法分别执行各自的标准^[3], 目前对二者的相互通用程度尚无系统论述。本实验室自 2005 年以来先后采用了 FAVN 和 RFFIT 技术^[4], 并用于动物及人狂犬病中和抗体的检测。本研究选取临床采集的 60 份动物及人血清进行了 FAVN 及 RFFIT 的平行检测对比和分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 待检血清 动物血清 40 份, 为狂犬病疫苗免疫前或免疫后采血的试验样品, 由本实验室保存并提供, 其中犬血清 20 份, 猫血清 6 份, 鼠血清 6 份, 鼬獾血清 4 份, 狐血清 2 份, 貉血清 2 份。人血清 20 份, 为狂犬病疫苗免疫前或免疫后采集的样品, 由本实验室保存并提供。

1.2 仪器与试剂 倒置荧光显微镜为 Olympus 产品, 型号 IX-51。WHO 狂犬病标准阳性血清(30 IU/mL)由中国疾病预防控制中心提供; OIE 狂犬病标准阳性血清(6.7 IU/mL)由本实验室购买、保存并提供。狂犬病标准攻击毒 CVS-11 株由本实验室制备、保存并提供。乳仓鼠肾细胞系 BHK-21, 由本实

^{*} 基金项目: 狂犬病等重大动物源性嗜神经病毒新型疫苗创制项目(863 项目)(2012AA101303)。 作者简介: 张守峰, 男, 主任检验医师, 主要从事临床检验研究。 [△] 通讯作者, E-mail: ronglianghu@hotmail.com。

验室传代、保存并提供。DMEM 培养基为 Invitrogen 产品;新生牛血清为 Gibco 产品;细胞培养板及培养瓶均为 Nunc 产品;8 孔腔室培养玻片为 Lab-Tek® 产品。

1.3 方法

1.3.1 FAVN 参考英国 OIE 狂犬病参考实验室的 FAVN 标准操作程序,主要操作及计算过程包括:(1)在 96 孔细胞培养板内对待测血清进行 3 倍梯度稀释,每个样品使用 4×6 孔区域进行检测。稀释区域各孔内预告加入 100 μL 培养基,灭活后血清加入第 1 列 4 孔内,每孔 50 μL,以多道移液器混匀后,吸取 50 μL 进入第 2 列,同法稀释至第 6 列,混匀后吸弃 50 μL。(2)取 96 孔板作为对照板,在对照板内按上述方式对标准阳性血清(0.5 IU/mL)、标准阴性血清(非免疫犬血清)进行稀释,同时设 4×6 孔病毒重复滴定区,以及各 4×2 孔的病毒对照、细胞对照、培养基对照区。(3)取事先确定滴度的狂犬病病毒 CVS-11 株,以 DMEM 培养基稀释为 100 TCID50/50 μL,除细胞及培养基对照孔外,每孔加入 50 μL,置 37 ℃温箱内中和 60 min。(4)BHK-21 细胞经胰蛋白酶消化、分散、计数,稀释至 4×10⁵ 个/mL。除培养基对照孔外,每孔加入细胞悬液 50 μL。置 37 ℃,5% CO₂ 温箱内培养 48 h。(5)细胞固定与染色过程同 RFFIT 步骤的(8)、(9)、(10)。(6)荧光显微镜下观察每个孔,孔内有荧光细胞即记为感染,无荧光细胞都为完全中和。计算待测血清和标准阳性血清对定量病毒的半数中和稀释倍数,二者相比,再乘以标准血清效价(0.5 IU/mL)即为待测血清狂犬病中和效价。也可使用以下基于 Spearman-Kärber 公式的推导公式计算:中和效价(IU/mL)=0.5×(At/Ac)×3(Bt-Bc)/4。公式中“(Bt-Bc)/4”为 3 的指数;At 为待测血清整列孔均无荧光染色的血清最大稀释倍数;Ac 为阳性标准犬血清整列孔均无荧光染色的血清最大稀释倍数;Bt 为待测血清在 At 稀释度后出现的无荧光染色的孔数;Bc 为标准血清在 Ac 稀释度后出现的无荧光染色的孔数。

1.3.2 RFFIT 参考美国疾病预防控制中心的狂犬病中和抗体 RFFIT 标准操作程序建立。主要操作过程包括:(1)待检血清于 56 ℃灭活 30 min,将 WHO 标准阳性血清稀释为 2 IU/mL。(2)在 8 孔腔室细胞培养玻片(Lab-Tek®)内对待检及标

准血清进行稀释。在第 1 孔内加入 75 μL 含 10%新生牛血清的 DMEM 培养基,其他 7 孔内加入 100 μL 上述 DMEM 培养基。(3)灭活的待测血清 50 μL 加入第 1 孔内,充分混匀后以移液器吸取 25 μL,移入第 2 孔,与 DMEM 培养基混匀后,再取 25 μL 转入第 3 孔,依此类推,直至第 8 孔,弃去多余的 25 μL 液体,获得第 1 孔为 1:2.5,梯度为 5 倍的稀释。(4)从-80 ℃取出 1 份预先滴定的狂犬病病毒 CVS-11 细胞毒悬液,以 DMEM 培养基稀释为 50 FFD50/0.1 mL(FFD50:半数视野荧光灶计数单位),取 100 μL 加入各孔内,混匀,获得 5 倍梯度的系列稀释。对照玻片内如此法稀释 4 孔标准血清(2 IU/mL),加上述等量病毒,同时设不同滴度的病毒对照。(5)加完病毒的细胞培养玻片在 37 ℃、CO₂ 温箱内温育 90 min 进行中和。(6)每孔内加入胰酶消化分散的 BHK 细胞 200 μL(10 万个)。同时设不加血清也不加病毒的细胞对照 1 孔。(7)在 37 ℃ 5% CO₂ 条件下培养约 20~24 h。(8)弃细胞培养上清,加入 80%丙酮溶液固定 30 min,弃去固定液,自然风干 10~20 min,至孔内完全干燥。(9)以 PBS 缓冲液将抗狂犬病核心蛋白荧光抗体稀释至工作浓度,加入 1/500 体积的 1%的伊文思蓝,每孔加入上述染色液 50 μL,37 ℃湿盒或水浴温箱内反应 45~60 min。(10)弃尽荧光抗体染色液,以 PBS 洗板 3 次,每次 3 min,每孔内加入 80%的甘油溶液 1 滴。(11)在倒置荧光显微镜下进行荧光染色检测,每个培养孔内观察 200 倍视野 20 个,计数并记录有荧光灶的视野数,应用 Reed-Meunch 公式计算半数视野中和稀释倍数。待测血清中和效价(IU/mL)=2×(待测血清半数视野中和稀释倍数/标准血清半数视野中和稀释倍数)。

1.4 统计学处理 计算 FAVN 和 RFFIT 两组数据定性判定结果(是否达到 0.5 IU/mL 的保护水平)的符合率;采用方差分析,P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 60 份血清样品的 FAVN 和 RFFIT 检测结果 应用 1.3.1 和 1.3.2 方法分别对 60 份血清进行狂犬病中和抗体检测。结果见表 1。

表 1 60 份血清样品 FAVN 和 RFFIT 检测结果对照(IU/mL)

编号	来源	FAVN	RFFIT	编号	来源	FAVN	RFFIT	编号	来源	FAVN	RFFIT
1	犬	4.5	5.1	21	猫	0.04	0.1	41	人	0.04	0.1
2	犬	1.5	1.4	22	猫	0.04	0.1	42	人	0.04	0.1
3	犬	0.66	0.6	23	猫	0.66	0.7	43	人	0.04	0.1
4	犬	0.29	0.4	24	猫	2.6	2.4	44	人	0.04	0.1
5	犬	0.04	0.1	25	猫	3.42	3.3	45	人	10.26	9.2
6	犬	17.77	19.5	26	猫	1.97	1.7	46	人	10.26	10.8
7	犬	3.42	3.1	27	鼠	0.04	0.1	47	人	17.77	16.8
8	犬	0.38	0.5	28	鼠	0.04	0.1	48	人	17.77	19.5
9	犬	1.97	1.8	29	鼠	5.92	5.5	49	人	4.5	4.1
10	犬	10.26	10	30	鼠	1.5	1.3	50	人	5.92	6.3
11	犬	5.92	5.5	31	鼠	2.6	2.2	51	人	2.6	2.2
12	犬	1.14	1.3	32	鼠	0.5	0.66	52	人	3.42	4.1

续表 1 60 份血清样品 FAVN 和 RFFIT 检测结果对照 (IU/mL)

编号	来源	FAVN	RFFIT	编号	来源	FAVN	RFFIT	编号	来源	FAVN	RFFIT
13	犬	0.22	0.2	33	鼬獾	0.06	0.1	53	人	3.42	3.8
14	犬	0.38	0.4	34	鼬獾	0.04	0.1	54	人	17.77	16.8
15	犬	1.14	1.5	35	鼬獾	1.5	1.8	55	人	10.26	9.2
16	犬	0.29	0.2	36	鼬獾	1.14	1.3	56	人	5.92	4.1
17	犬	0.5	0.4	37	狐	0.66	0.7	57	人	4.5	4.5
18	犬	0.38	0.4	38	狐	0.87	1	58	人	1.14	1.2
19	犬	0.87	1	39	貉	0.06	0.1	59	人	2.6	2.6
20	犬	0.87	1.1	40	貉	0.29	0.5	60	人	2.6	2.7

2.2 两种检测方法获得的定性判定结果的符合率 以 0.5 IU/mL 的国际推荐标准,对同一样品经 FAVN 和 RFFIT 两种方法检测的中和抗体效价进行定性判定,即达到或超过 0.5 IU/mL 者判定为达到保护水平,低于 0.5 IU/mL 者判定为未达到水平。全部 60 份样品中,二者检测的符合率为 96.67% (58/60)。

2.3 两种检测方法获得的定量结果的差异显著性分析 将猫血清、鼠血清、鼬獾血清、狐血清、貉血清归为其他动物血清,采用方差分析对 2.1 所得数据进行统计学分析,统计结果见表 2。

表 2 FAVN 和 RFFIT 检测定量数据统计

血清数	血清来源	相差均数	标准差	t	P
60	总体	0.013	0.530	0.185	>0.5
20	犬	0.100	0.448	0.998	>0.2
20	其他动物	0.010	0.196	0.376	>0.5
20	人	0.129	0.778	1.280	>0.2

3 讨 论

针对狂犬病中和抗体的检测技术较多,本研究涉及的 FAVN 和 RFFIT 均为细胞水平的病毒中和试验,检测的敏感性、特异性和重复性均较好,分别为 OIE 和 WHO 推荐的狂犬病中和抗体检测技术。因该技术使用狂犬病病毒,需在具备生物安全柜等设施的 2 级生物安全实验室内操作,因此其应用范围受到一定限制,很难在基层机构开展。为此,国内外部分机构研制了狂犬病中和抗体或抗体酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒、胶体金层析试纸等产品^[5-7],但此类产品多用于狂犬病中和抗体的定性检测,其检测性能须通过与 FAVN 或 RFFIT 平行检测,进行比对评价。

FAVN 和 RFFIT 法计算抗体效价的公式均为基于 Spearman-Kärber 公式或 Reed-Meunch 公式的指数形式。因此,应用公式计算获得的抗体效价值并不是连续值,而是间断值。同时,受指数函数变化规律的影响,自变量(可看作检测过程观察到的中和孔数或中和视野数)在不同区间的等幅递增并不产生相同的效价递增。以 FAVN 为例,中和孔数超过 20 个时,每增加一个中和孔,中和效价增加值将超过 3 IU/mL;而中和孔数在 6~10 个时,每增加一个中和孔,效价值仅增加 0.2~0.5 不等。相对应的较高中和效价值的误差偏大,而较小中

和效价值的误差较小。本研究中人源血清的中和抗体水平普遍较高,其误差值相对较大即由此导致。鉴于以 0.5 IU/mL 作为是否达到保护的标准,FAVN 和 RFFIT 检测误差对实际应用影响甚微。

RFFIT 在早期建立时通过判定视野内荧光细胞(即带毒细胞)的百分数进行计算^[8],主观性较强,不同检测员根据个人经验可能有不同的判定数值,会对检测结果产生直接的影响。这一判定和计算方式目前在个别实验室仍有采用。

FAVN 和 RFFIT 的定量检测结果是与国际标准血清 (WHO 或 OIE 提供)平行检测,通过比较计算获得的。中国目前还没有商品化的标准血清供应,而上述国际标准品的购买、通关和运输程序繁琐复杂,耗时过久,在一定程度上影响了这两项检测技术的推广应用。期待中国的药品监督和兽药监察机构尽早研制和生产符合国际标准的上述参考血清。

参考文献

[1] Hu R, Tang Q, Tang J, et al. Rabies in China: an update[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2009, 9(1): 1-12.

[2] Jackson AJ, Wunner B, Rabies WH. Rabies. 2nd Ed[M]. London: Academic Press, 2007: 573-624.

[3] Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In F-X Meslin, MM Kaplan and H Koprowski. Laboratory techniques in rabies. [M]. 4th Ed. Geneva: World Health Organization, 1996: 181-191.

[4] 张守峰, 曹亮, 张菲, 等. 狂犬病毒核蛋白单抗和荧光抗体中和试验的建立与应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 554-557.

[5] 冯誉龄, 刘晔, 张守峰, 等. 动物狂犬病中和性抗体竞争 ELISA 检测试剂盒的研制[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(2): 175-178.

[6] 廖园园, 秦伟, 李建, 等. 犬狂犬病病毒 ELISA 抗体检测试剂盒的研制及初步应用[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(8): 1-4.

[7] 廖园园, 钱金宏, 唐利军, 等. 检测犬抗狂犬病毒抗体的胶体金免疫层析法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(9): 705-708.

[8] Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies[Z], 1996: 181-192.