

• 临床研究 •

狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒的效果评价*

于鹏程¹, 闫江泓¹, 吴未辰¹, 由淑贞², 陶晓燕¹, 朱武洋¹, 纪 军^{2△}

(1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206;

2. 北京博雅晟康医学科技有限公司 100872)

摘要:目的 应用快速荧光灶抑制试验(RFFIT)对狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒的检测效果进行评价。方法 用 RFFIT 和狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒分别对 135 份人血清和 164 份动物血清进行狂犬病病毒中和抗体(RVNA)效价检测, 应用 SPSS22.0 分析两种检测方法所得结果的相关性和一致性。结果 两种方法所得结果的阳性检出符合率为 99.33%(297/299);两种方法对动物血清和人血清的检测结果之间有较好的直线相关关系, 相关系数分别为 0.897 和 0.941;同一份标本的重复性检验显示, 试剂盒检测方法具有较好的稳定性。结论 狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒可以用于人和动物血清狂犬病病毒中和抗体的检测。

关键词:狂犬病病毒; 中和抗体; 快速荧光灶抑制试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.23.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)23-3331-02

狂犬病是由狂犬病病毒引起的一种人兽共患传染病, 病死率几乎 100%。中国是狂犬病的高发区, 目前每年仍有近千人死于狂犬病。疫苗免疫接种是预防该病发生的唯一途径, 按世界卫生组织(WHO)及国际兽疫局(OIE)的要求, 人或动物接种狂犬病疫苗后, 需测定其血清内的抗狂犬病病毒中和抗体效价, 不低于 0.5 IU/mL 时, 方可认为达到有效保护, 否则应予以加强免疫, 直至达到保护水平^[1-2]。快速荧光灶抑制试验(RFFIT)是 WHO 推荐的检测狂犬病病毒中和抗体的标准方法, 也是 2015 年版《中华人民共和国药典》第四部规定的检测人免疫球蛋白效价的标准方法。北京博雅晟康医学科技有限公司研制的狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒以 RFFIT 为基础, 以自主制备的 FITC 标记的抗狂犬病病毒核蛋白荧光抗体为亮点, 可应用于人和动物血清狂犬病病毒中和抗体效价的检测。商品化试剂盒可解决 RFFIT 操作中荧光抗体、CVS 毒株及所用 BSR 细胞株的标准化问题, 有利于 RFFIT 的推广使用, 但其检测效能需要进一步评价。鉴于此, 本研究分别以人和动物临床血清标本为检测对象, 运用本科室所建立的标准 RFFIT 对该狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒的检测效果进行评价。

1 资料与方法

1.1 材料来源 动物血清为鼠血清, 共 164 份, 为狂犬病疫苗免疫前或免疫后采集的试验标本, 由本实验室保存并提供。人血清 135 份, 为狂犬病疫苗免疫前或免疫后采集的标本, 由本实验室保存并提供。

1.2 仪器与试剂 RFFIT 所用试剂: DMEM 高糖培养液、胰酶、双抗、胎牛血清均购自 Gibco 公司; 抗狂犬病病毒核蛋白荧光抗体, 购自美国 FDI Fujirebio Diagnostics 公司; 倒置显微镜为日本奥林巴斯 CXX41 型; 荧光显微镜为日本奥林巴斯 IX51 型。狂犬病毒 CVS-11 标准攻击毒株, 由本实验室(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所狂犬病室)保存; BSR 细胞, 为仓鼠肾细胞 BHK-21 的克隆, 由本实验室保存。WHO

标准品效价为 30 IU/mL, 购自英国国立生物制品和控制标准品研究所。狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒由北京博雅晟康医学科技有限公司提供。

1.3 方法 RFFIT 方法操作程序: 将待测血清于 56 °C 灭活 30 min, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 96 孔板做 3 倍系列稀释; 标准血清、强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清用同样方法进行系列稀释; 病毒对照孔做连续的倍比稀释; 除病毒对照孔外, 其他各孔均加入 50 μL 最适攻击量病毒, 于 37 °C 5% CO₂ 孵箱孵育 1 h 进行中和后, 每孔加入 50 μL 浓度为 1 × 10⁶ cells/mL 的细胞悬液; 于 37 °C 5% CO₂ 孵箱孵育 24 h。将 96 孔板从孵箱内取出, 于 P2 实验室安全柜内, 丢弃培养上清液, 磷酸盐缓冲液(PBS)液洗 1 遍; 用 80% 冷丙酮 4 °C 固定 30 min; 将丙酮弃去, 加入 50 μL 抗狂犬病毒核蛋白荧光抗体染色液, 37 °C 孵育 30 min 后用 PBS 液洗 3 遍; 加入 60% 甘油, 在荧光显微镜下进行荧光灶读数。以应用软件 Microsoft Excel 为基础, 根据操作程序中确定的稀释梯度, 结合 Reed & Muench 法公式, 以血清标准品滴度为参照系数, 被测标本 50% 感染孔前后稀释倍数为变量的中和抗体滴度计算公式计算中和抗体滴度。应用狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒进行平行检测时严格遵守试剂盒的操作规程。

1.4 统计学处理 采用统一的 Excel 记录标本的检测信息, 采用 SPSS22.0 软件进行检测结果的统计学分析, 包括两种检测方法所得检测结果的阳性检出符合率的比较、相关性分析以及重复性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阳性检出符合率分析 按照达到或超过 0.5 IU/mL 者为阳性结果, 低于 0.5 IU/mL 者为阴性结果进行统计和计算。全部 299 份标本中, 两种检测方法的阳性检出符合率为

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31500152); 国家科技支撑计划资助项目(2014BAI13B04); 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项资助项目(2014ZX10004-002)。

△ 通讯作者, E-mail: boyask@bj_boyask.com。

99.33%(297/299)。

2.2 检测结果相关性分析 对 164 份动物血清和 135 份人血清分别采用两种检测方法进行检测,并对检测结果进行回归分析。针对动物血清标本,两种方法的检测结果差异有统计学意义($R=0.897, P<0.01$),但二者直线相关关系良好($R^2=0.804$)(图 1)。针对人血清标本,两种方法的检测结果具有更好的直线相关关系($R^2=0.886$)(图 2)。

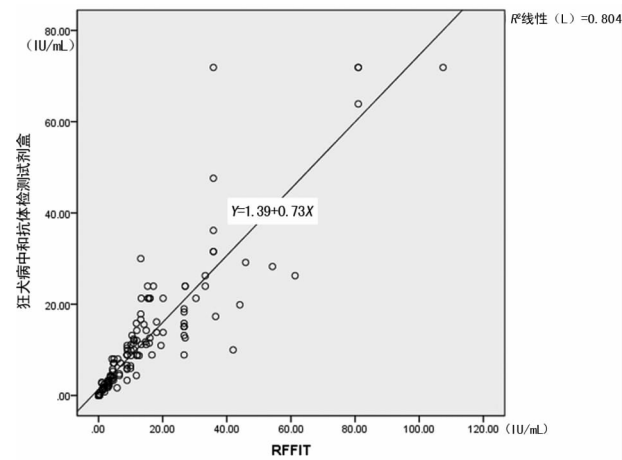


图 1 动物血清检测结果的相关性分析

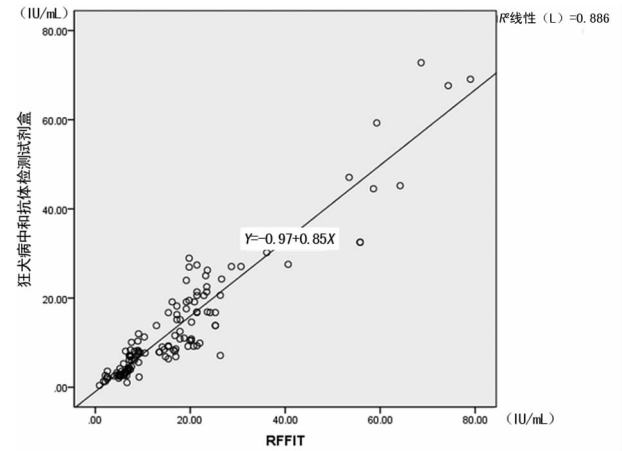


图 2 人血清检测结果相关性分析

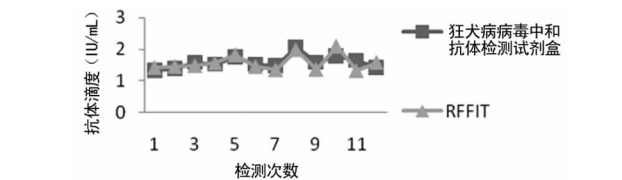


图 3 两种方法检测结果的重复性比较

2.3 检测试剂盒稳定性分析 对同一血清标本分别采用 RFFIT 方法和狂犬病病毒中和抗体检测试剂盒两种方法进行检测 12 次。RFFIT 的检测值在 1.32~2.06 IU/mL,最大差值 0.74 IU/mL,GMT=1.58 IU/mL,SD=0.20;狂犬病中和抗

体检测试剂盒的检测值在 1.32~2.09 IU/mL,最大差值 0.77 IU/mL,GMT=1.57 IU/mL,SD=0.25(图 3)。该结果显示,中和抗体检测试剂盒具有良好的稳定性。

3 讨 论

目前,WHO 和 OIE 推荐的应用于狂犬病病毒中和抗体检测的方法主要有小鼠中和试验(MNT)、RFFIT 和狂犬病病毒荧光抗体中和试验(FAVN);2016 版《狂犬病预防控制技术指南》、2014 版《狂犬病监测方案》及 2009 版《狂犬病暴露预防处置工作规范》明确指出,如需检测狂犬病酶中和抗体水平,应当采取中和实验进行检测,主要包括 RFFIT 及 MNT 两种方法。本实验室于 2009 年建立 RFFIT 方法至今,已检测上万份人或动物血清标本,以往实验结果证明,本实验室的 RFFIT 方法具有良好的稳定性、敏感性及重复性^[3]。但由于 RFFIT 需要使用狂犬病固定毒株 CVS-11,以及价格昂贵的 FITC 标记的抗狂犬病病毒核蛋白荧光抗体,因此即便每年的《狂犬病监测与检测培训班》均会对该方法进行培训与推广,但仅有少数几家省级疾控中心能建成该实验方法并进行应用。为此,国内外部分机构和企业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、胶体金检测试剂盒等^[4-5]。但这些方法所包被的抗原多为狂犬病全病毒、狂犬病病毒糖蛋白、核蛋白或者其他抗原成分,测定的抗体不只是狂犬病中和抗体,因此只能用于中和抗体的定性检测。

狂犬病中和抗体检测试剂盒在 RFFIT 原理上建立,自主制备 FITC 标记的抗狂犬病病毒核蛋白荧光抗体的狂犬病中和抗体检测试剂盒。应用 RFFIT 和狂犬病中和抗体试剂盒同时检测人和动物血清标本 299 份,对检测结果进行统计学分析发现,该试剂盒具有良好的重复性和稳定性,能够用于人和动物血清标本狂犬病中和抗体的检测。

参考文献

[1] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 2 版. 北京:中国医药科技出版社,2009.

[2] WHO. WHO Expert Consultation on Rabies, second report[R]. Geneva:2013.

[3] Yu P, Lv X, Shen X, et al. Establishment and preliminary application of a rapid fluorescent focus inhibition test(RFFIT) for rabies virus[J]. Virol Sin, 2013, 28(4): 223-227.

[4] 吕新军,王伟伟,李云云,等. 采用快速荧光灶抑制试验对一种狂犬病病毒抗体竞争性 ELISA 检测法的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(6): 640-641.

[5] 范晓娟,李刚,邱文英,等. 胶体金免疫层析检测犬、猫抗狂犬病病毒 IgG 抗体的研究[J]. 中国人兽共患学报, 2010, 26(8): 753-757.

(收稿日期:2016-06-13 修回日期:2016-09-03)