

细胞培养法检测和分离狂犬病街毒的可行性研究

汪霞 徐葛林 吴杰 罗静 朱家鸿 周剑军 施南峰 唐青 张永振
唐建蓉 吴泰才 明贺田 沈蕊华 陈焕春

【摘要】 目的 研究MNA细胞培养法检测和分离狂犬病街毒的可行性。方法 用MNA细胞培养法、荧光抗体实验(FAT)和双抗体夹心ELISA方法分别检测33份狂犬病街毒样品、20份狂犬病阴性犬脑样品和4份正常鼠脑样品。结果 MNA细胞培养法检测57份待检样品,培养48 h的实验结果显示,33份狂犬病街毒样品均为阳性,狂犬病阴性犬脑样品和正常鼠脑样品均为阴性,与FAT、双抗体夹心ELISA方法的检测结果完全一致。结论 MNA细胞培养法对样品中狂犬病街毒的检测具有较高的灵敏度和特异性,可用于狂犬病街毒的检测和分离。

【关键词】 狂犬病街毒; 细胞培养法; 检测

Study on the feasibility of a cell-culture inoculation test in the detection and isolation of street rabies virus WANG Xia^{*}, XU Ge-lin, WU Jie, LUO Jing, ZHU Jia-hong, ZHOU Jian-jun, SHI Nan-feng, TANG Qing, ZHANG Yong-zhen, TANG Jian-rong, WU Tai-cai, MING He-tian, SHEN Rui-hua, CHEN Huan-chun.
^{*}Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060, China
Corresponding author: XU Ge-lin, Email: xugelin@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** Feasibility of using MNA cell-culture inoculation test to detect and isolate the street rabies virus. **Methods** Using MNA cell-culture inoculation test, fluorescent antibody test (FAT) and sandwich ELISA with double-antibodies to detect 33 specimens of street rabies virus, 20 specimens of negative canine brains and 4 specimens of healthy mice brains. **Results** 33 specimens of street rabies virus were positive to the cell-culture inoculation test but the others were negative. The concordances of MNA cell-cultured inoculation test with FAT and sandwich ELISA with double-antibodies were both 100%. **Conclusion** MNA cell-culture inoculation test appeared to be both highly sensitive and specific in detecting the street rabies virus, and could be used in detection and isolation of the virus.

【Key words】 Street rabies virus; Cell-culture inoculation test; Detection

狂犬病是由狂犬病毒感染导致的致死性人畜共患传染病,对狂犬病毒快速、准确的检测有助于及时、有效的预防。目前,中国疾病预防控制中心(CDC)推行的狂犬病毒抗原检测方法有荧光抗体实验(FAT)和快速狂犬病ELISA,病毒的分离方法有细胞培养法和乳鼠接种法(MIT)。FAT是狂犬病毒实验室诊断最精确、快速和最可靠的方法^[1];但MIT由于较长的观察期,极易延误临床对狂犬病患者的

预防和治疗。1975年以来采用婴地鼠肾传代细胞(BHK-21)、鸡胚细胞(CER)或小鼠成神经瘤细胞(MNA)鉴定和分离狂犬病毒^[2]。随着细胞培养技术的发展,最终证实MNA细胞培养法在检测和分离狂犬病街毒(野毒株)方面与MIT具有很好的相关性。而且将诊断时间缩短至2天。1982年,法国狂犬病参考中心用MNA细胞培养法取代MIT检测和分离狂犬病毒^[2]。中国CDC也于2008年制定的“全国狂犬病监测方案”中推行用细胞培养法分离狂犬病毒。本研究采用MNA细胞培养法检测分离狂犬病街毒的可行性。

材料与方 法

1. 材料:收集和保存来自安徽、浙江、河南、重庆、江西、吉林、广西、上海、宁夏和湖北等10个省(市)的33株狂犬病街毒株(表1),其中28株分离于

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.06.018

作者单位:430060 武汉生物制品研究所(汪霞、徐葛林、吴杰、罗静、朱家鸿、周剑军);浙江省慈溪市疾病预防控制中心(施南峰);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(唐青),传染病预防控制所(张永振);中国药品生物制品检定所(唐建蓉);广西壮族自治区疾病预防控制中心(吴泰才);安徽省阜阳市疾病预防控制中心(明贺田);上海市疾病预防控制中心(沈蕊华);华中农业大学兽医学院(陈焕春)

通信作者:徐葛林,Email: xugelin@yahoo.com.cn

犬脑、3 株分离于人脑、1 株分离于鹿脑、1 株分离于牛脑。各毒株颅内接种小鼠后,于小鼠发病濒死时无菌取脑样品于-70℃冰箱保存备用。浙江省慈溪市采集的狂犬病毒阴性犬脑样品 20 份和正常鼠脑样品 4 份。

表 1 实验选用的中国狂犬病街毒株分离资料

毒株	分离地	来源	分离年代	GenBank 序列号	参考文献
ZJCs51	浙江	犬	2007	-	
ZJZJ	浙江	犬	2007	-	
ZJHZ	浙江	犬	2007	-	
LuoH	河南	犬	2007	-	
CQH	重庆	人	2007	-	
CQ92	重庆	犬	1992	DQ849072	刘胜牙 ^[3]
JXNC	江西	犬	2004	DQ849064	Meng ^[4]
JLLU	吉林	鹿	1993	-	
GXG-4	广西	犬	1994	DQ849071	刘胜牙 ^[3]
GXG-2	广西	犬	1994	-	Meng ^[4]
YUE1	广西	犬	1997	DQ849070	刘胜牙 ^[3]
YUE2	广西	犬	1997	-	Meng ^[4]
YUE3	广西	犬	1997	-	
GXFengS	广西	犬	1998	-	Meng ^[4]
GXNingM	广西	犬	1997	DQ849069	Meng ^[4]
SBH	上海	人	1992	-	Meng ^[4]
SBD	上海	犬	1992	-	Meng ^[4]
AHHeX	安徽	犬	1989	-	Meng ^[4]
AHWangJ	安徽	犬	1989	-	Meng ^[4]
AHHeF	安徽	犬	1989	-	Meng ^[4]
AH36	安徽	犬	2008	-	
AH38	安徽	犬	2008	-	
AH01	安徽	犬	2008	-	
AHFeiD	安徽	犬	1989	DQ849073	刘胜牙 ^[3]
AHHuai89	安徽	犬	1989	-	Meng ^[4]
AHHuai69	安徽	犬	1969	-	Meng ^[4]
NXJian	宁夏	人	1985	-	Meng ^[4]
HNN	湖北	牛	2007	-	
WHYF	湖北	犬	2007	-	
WHQS	湖北	犬	2007	-	
HBHS	湖北	犬	2008	-	
HN06	湖北	犬	2005	DQ849062	明平刚 ^[5]
WHWD	湖北	犬	2007	-	

注: - : 该序列暂时未向 GenBank 提交

2. 方法: MNA 传代细胞由美国 CDC Esposito 博士惠赠; 狂犬病毒攻击毒标准株 11 (CVS11) 由法国巴斯德研究所 Henry Tsiang 博士惠赠; 均由武汉生物制品研究所基因工程室保存。异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体为武汉生物制品研究所基因工程室制备^[6]。狂犬病毒核衣壳抗原 ELISA 诊断试剂盒为武汉生物制品研究所制备^[8], 批号: 20071226, 有效期内使用。

(1) MNA 细胞培养法: 24 孔细胞培养板接种密度为 5×10^5 个/ml 的 MNA 细胞, 400 μ l/孔。将待检样品用 DMEM 液 (含 2% 小牛血清) 研磨制备成 30% 悬液, 500 $\times g$ 离心 10 min, 取上清分别加入已接种 MNA 细胞的 24 孔细胞培养板中, 50 μ l/孔, 每份样品均做复孔, 并设细胞对照和 CVS11 病毒对照; 37℃ 5% CO₂ 孵箱中分别培养 24 h、48 h 和 72 h 取出, 80% 冷丙酮固定细胞, 加工做浓度 FITC 标记的抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体, 荧光显微镜判读检测结果。

(2) 双抗体夹心 ELISA^[7]: 取待检样品用 pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 研磨制备成 30% 悬液, 500 $\times g$ 离心 10 min, 取上清分别加入狂犬病毒核衣壳抗原 ELISA 诊断试剂盒的板条中, 100 μ l/孔, 每份样品均做复孔, 同时设阳性对照 (CVS11 毒株感染的鼠脑悬液上清)、阴性对照 (正常鼠脑悬液上清) 和空白对照 (样品稀释液); 37℃ 温育 1 h, PBS-吐温 20 (PBST) 洗涤 6 次后加酶标抗体 100 μ l/孔, 37℃ 温育 30 min, PBST 洗涤 8 次后加底物四甲基联苯胺 (TMB) 显色, 酶标仪测定反应板中每孔液体 450 nm 处的吸光度 (A_{450}) 值。

(3) 荧光抗体实验: 取待检脑组织样品适量涂于载玻片上, 每份样品均做复孔, 同时以健康小鼠脑组织样品涂片作阴性对照、CVS11 固定毒株感染的鼠脑组织涂片作阳性对照。将样品涂片放于生物安全柜内吹干, 冷丙酮固定 30 min 后取出, 室温风干, 加工作浓度 FITC 标记的抗狂犬病毒核蛋白单克隆抗体, 37℃ 湿盒内温育 45 min, PBS 漂洗 3 次, 荧光显微镜判读检测结果 (丙酮固定前的所有实验均在 P3 实验室进行操作)。

结 果

1. MNA 细胞培养法检测待检样品培养时间的确定: MNA 细胞培养法检测 7 份狂犬病街毒样品, 培养 24 h、48 h 和 72 h 的实验结果见表 2。实验结果显示, 编号为 ZJZJ 和 CQH 的狂犬病街毒样品培养 24 h 检测结果为阴性, 其余 5 份为阳性; 而 7 份狂犬病街毒样品培养 48 h 和 72 h 的检测结果均为阳性。由此可见培养 48 h 的检测灵敏度与 72 h 的一致, 优于 24 h, 但 48 h 的检测时间比 72 h 的短, 提高了样品的检测速度, 故确定细胞培养法检测狂犬病街毒的培养时间为 48 h。

2. MNA 细胞培养法检测结果: MNA 细胞培养法培养 48 h 的实验结果显示, 33 份狂犬病街毒样品

表 2 不同培养时间细胞培养法检测狂犬病街毒样品结果

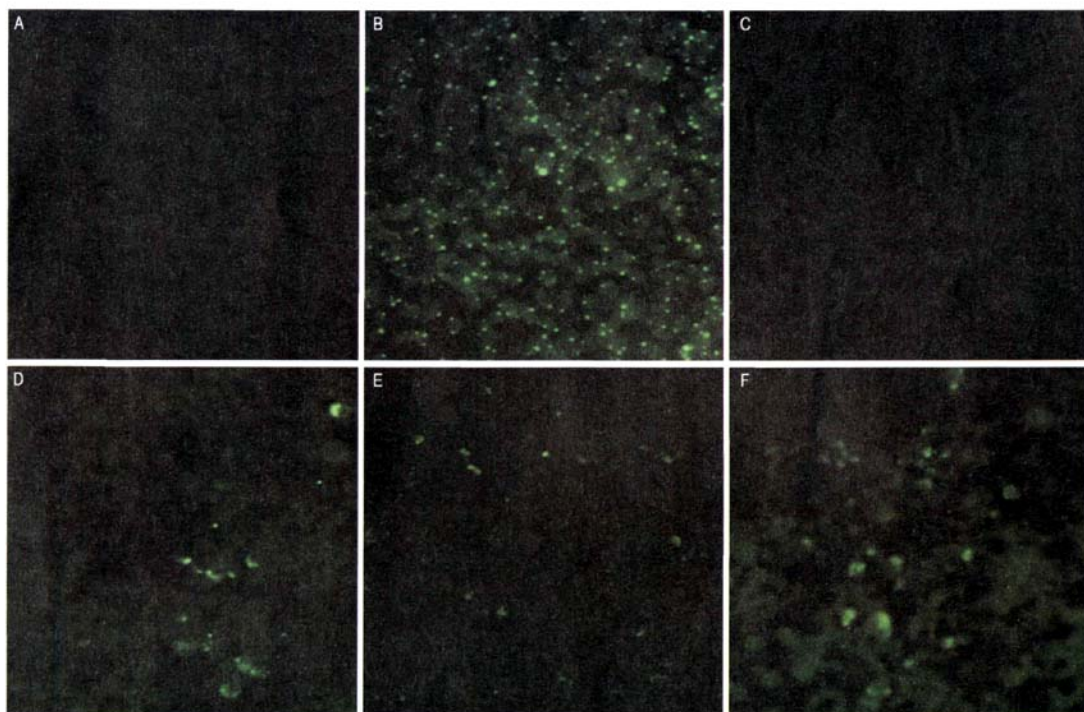
培养时间 (h)	狂犬病街毒样品						
	WHQS	ZJCs51	ZJZJ	WHYF	CQH	JLLU	YUE2
24	+	+	-	+	-	+	+
48	+	+	+	+	+	+	+
72	+	+	+	+	+	+	+

和 CVS11 病毒对照样品均为阳性,狂犬病毒阴性犬脑样品和正常鼠脑样品均为阴性,阳性样品的检出率为 100%。CVS11 病毒接种孔和狂犬病街毒样品接种孔的 MNA 细胞,荧光显微镜下可观察到细胞浆内有明亮的绿色荧光灶存在,而细胞对照孔和接种阴性样品孔的 MNA 细胞均未观察到细胞内存在有绿色荧光灶。图 1 中 A、B、C 图分别为细胞对照孔、CVS11 病毒对照孔和阴性犬脑样品孔的免疫荧光照片,D、E、F 分别为接种编号为 HNN、YUE3、SBH 狂犬病街毒样品孔的免疫荧光照片,与细胞对照孔和阴性样品孔的免疫荧光照片相比,可清晰的看到接种狂犬病街毒样品孔的细胞浆内有亮绿色的荧光灶存在。实验中也发现不同的狂犬病街毒株由于生物学特性和病毒毒力的差异导致其在 MNA 细胞上的感染率(即荧光染色阳性的细胞在全细胞中所占的

比例)有一定的差异,10%~45%不等。图 2 中 A 图为接种狂犬病街毒样品孔的细胞照片,B 图为 MNA 细胞对照孔的细胞照片,接种细胞量均为 2×10^5 个/孔,37℃ 5%CO₂ 孵箱培养 48 h。图 2 清晰显示接种街毒样品孔的 MNA 细胞密度明显低于细胞对照孔的细胞密度。

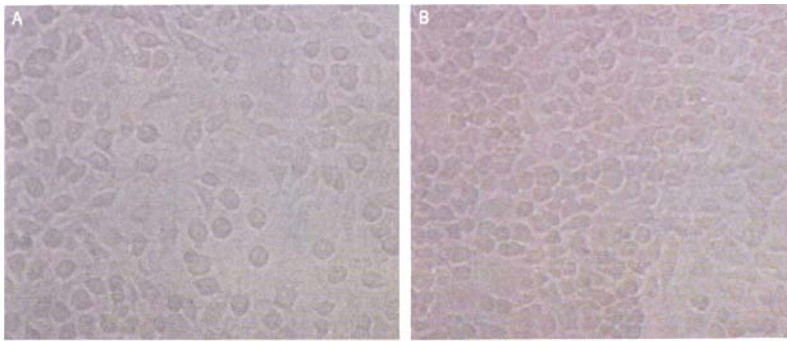
3. 双抗体夹心 ELISA 检测结果: 图 3 显示,试剂盒的 cut off 值为 0.4, 33 份狂犬病街毒株样品 A_{450} 值均 ≥ 1.572 , 即检测结果为阳性; 20 份狂犬病毒阴性犬脑样品和 4 份正常鼠脑样品 A_{450} 值均 ≤ 0.139 , 即检测结果为阴性。阳性样品的检出率为 100%。图 3 显示了 57 份检测样品的 A_{450} 值(2 孔的平均值), 横线上方代表检测样品为阳性结果, 下方代表检测样品为阴性结果。

4. FAT 检测结果: FAT 检测 57 份待检样品, 33 份狂犬病街毒样品均为阳性, 荧光显微镜下可观察到明亮的苹果绿或黄绿色荧光颗粒, 呈不同形状和大小, 较大、圆形或椭圆形的、在其周边有较亮的染色者为内基氏体, 长条形染色者为感染狂犬病毒的神经元轴突片段。图 4 显示的为其中一个阳性样品的荧光检测照片。



注: A: MNA 细胞对照; B: CVS11 病毒阳性对照; C: 阴性犬脑样品; D: HNN 株; E: YUE3 株; F: SBH 株

图 1 MNA 细胞培养法免疫荧光检测结果(100×)



注: A: 接种狂犬病街毒孔的 MNA 细胞; B: 细胞对照孔的 MNA 细胞

图 2 接种狂犬病街毒样品孔的细胞照片

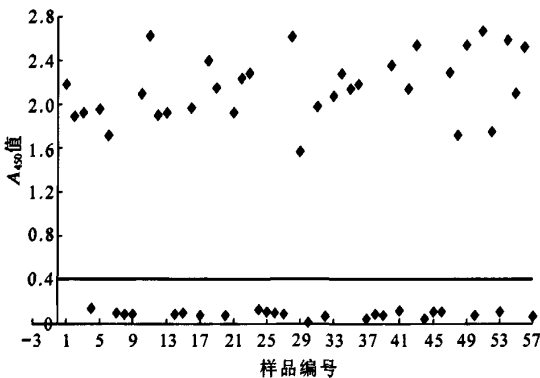


图 3 双抗体夹心 ELISA 检测 57 份待检样品的 A₄₅₀ 值 (cut off=0.4)

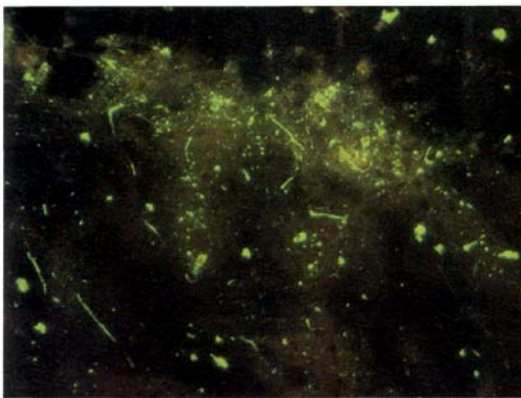


图 4 荧光抗体实验检测街毒 WHYF 脑组织照片 (200×)

讨 论

2006 年卫生部颁布的“人间传染的病原微生物名录”中狂犬病街毒危害程度分类为第二类^[9], 狂犬病街毒检测时的主要传染源为手指被有感染的工具刺伤或割破; 新糜烂的皮肤或黏膜与感染物接触也认为是一种感染途径, 所以进行狂犬病街毒检测时

操作必须十分小心, 除了设施要符合基本设计要求外, 应采取的预防措施还包括个人防护设备 (如服装、护目镜、口罩和手套) 和暴露前接种。

MNA 细胞是一种小鼠成神经瘤细胞, 由于狂犬病毒是嗜神经性病毒, 神经细胞对狂犬病毒更敏感, 因此早在 1978 年就被用做狂犬病毒的分离和研究狂犬病的

发病机制^[10]。大量实验证实 MNA 细胞在检测和分离狂犬病毒方面与 MIT 法具有很好的相关性。FAT 是 WHO 推荐的用于狂犬病毒检测的金标准^[11]。双抗体夹心 ELISA 所用的试剂盒 (WELYSSA) 为本实验室自行研制^[7], 曾与 MIT 及 FAT 比较, 检测 1030 份动物脑组织样品, 结果完全一致。本实验结果显示, MNA 细胞培养法检测的 33 份狂犬病街毒样品均为阳性, 其他样品为阴性, 与 FAT、双抗体夹心 ELISA 的检测结果完全一致, MNA 细胞培养法对狂犬病毒的检测具有较高的灵敏度和特异性。但前二者只能用于狂犬病街毒的检测, 不能用于分离病毒, 而 MNA 细胞培养法即可用于检测病毒, 也可用于分离病毒。

33 份狂犬病街毒样品感染 MNA 细胞后荧光显微镜下观察发现不同狂犬病街毒株对 MNA 细胞的感染率存在一定差异, 有荧光灶的感染细胞在全细胞中所占的比例为 10% ~ 45% 不等。导致此现象的原因, 一方面本实验的检测仅为定性方法, 病毒毒力的差异可能导致感染病毒量的不同, 从而产生不同病毒株对 MNA 细胞感染率的差异; 另一方面, 不同的狂犬病街毒株可能存在生物学特性上的差异从而导致其对 MNA 细胞适应性的差异, 适应性强的街毒株对 MNA 细胞的感染率高, 反之, 对 MNA 细胞的感染率低。

与 MNA 细胞对照孔相比, 接种狂犬病街毒样品孔内的 MNA 细胞的增殖速度均受到不同程度的抑制。由图 2 可以清晰的看出接种狂犬病街毒样品孔的 MNA 细胞密度明显低于细胞对照孔的细胞密度。导致此现象的原因可能是因为检测的样品为 30% 脑悬液离心后的上清, 脑组织样品的一些成分并不能通过离心彻底去除, 某些残留成分的存在影响了细胞的生长, 实验中也发现接种狂犬病毒阴性

样品孔的细胞密度略低于细胞对照孔的细胞密度证明了此原因的存在;另一方面,狂犬病街毒在感染细胞内增殖,干扰了细胞的正常生长。

目前,WHO专家委员会推荐FAT、ELISA、细胞培养感染实验和MIT作为实验室内诊断狂犬病毒标准化的方法^[12],欧美等国家均采用FAT和细胞培养感染实验检测和分离狂犬病毒,而国内仍采用MIT进行狂犬病毒的检测和分离^[13]。MIT对狂犬病毒的检测具有高的检测灵敏度,但较长的观察周期极大的延误了临床上对狂犬病的预防和治疗,而且仅凭动物发病症状不足以确定为狂犬病,需结合免疫荧光法作特异性鉴定。与MIT相比,细胞培养法缩短了检测时间,降低了检测费用。针对国内在细胞培养法检测狂犬病街毒研究领域的空缺,本实验采用MNA细胞培养法检测和分离狂犬病街毒,同时与WHO推荐的狂犬病毒检测的金标准FAT和双抗体夹心ELISA的检测结果进行比较。实验结果表明,MNA细胞培养法对样品中狂犬病街毒的检测具有高的灵敏度和特异性,可用于狂犬病街毒的检测和分离。

参 考 文 献

- [1] 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. 中国计划免疫, 2005, 11(2): 147-150.
- [2] Bourhy H, Rollin PE, Vincent J, et al. Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. J Clin Microbiol, 1989, 27: 519-523.
- [3] 刘胜牙, 严家新, 徐葛林, 等. 我国流行的4株狂犬病街毒株G基因序列及分子流行病学研究. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(3): 129-132.
- [4] Meng SL, Xu GL, Yan JX, et al. Molecular epidemiology and sequencing of the G-L intergenic region of rabies virus isolated in China. Virologica Sinica, 2007, 22(1): 26-33.
- [5] 明平刚, 徐葛林, 严家新, 等. 新分离5株狂犬病街毒株N和G基因的序列分析. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(8): 553-556.
- [6] 徐葛林, 严家新, Larrous F, 等. 荧光标记抗狂犬病街毒核蛋白单克隆抗体在狂犬病街毒检测中的应用. 中华流行病学杂志, 2005, 26(2): 113-115.
- [7] Xu GL, Weber P, Hu QL, et al. A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. Biologicals, 2007, 35(4): 297-302.
- [8] 徐葛林, 吴杰, 吴泰才, 等. 多种方法对广西地区健康犬带狂犬病毒的调查. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(3): 108-109.
- [9] 中华人民共和国卫生部制定. 人间传染的病原微生物名录. 2006-01-10.
- [10] Nogueira YL. Estimate of the validity of a new method for the isolation of rabies virus. Rev Saúde Pública, 2004, 38(2): 315-322.
- [11] Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th edition. Geneva: WHO, 1996: 3-16.
- [12] WHO Expert Committee on Rabies. Technical report series 931. WHO, Geneva, 2005: 20-21.
- [13] 人用狂犬病疫苗. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2005: 89-97.

(收稿日期: 2009-02-16)

(本文编辑: 尹廉)

· 征 订 启 事 ·

本刊2009年征订启事

《中华流行病学杂志》是由中华医学会主办的流行病学及其相关学科的高级专业学术期刊、国内预防医学和基础医学核心期刊、国家科技部中国科技论文统计源期刊, 2004—2006年被中国科学技术信息研究所定为“百种中国杰出学术期刊”, 并被美国国立图书馆医学文献联机数据库和美国化学文摘社收录。读者对象为预防医学、临床医学、基础医学及流行病学科研与教学工作者。征稿内容: 重点或新发传染病现场调查与控制; 慢性非传染病的病因学及流行病学调查(含社区人群调查)、干预与评价; 环境污染与健康; 食品安全与食源性疾病; 流动人口与疾病; 行为心理障碍与疾病; 分子流行病学、基因学与疾病控制; 我国西部地区重点疾病的调查与控制等。本刊设有述评、重点原著、现场调查、疾病监测、实验室研究、临床流行病学、疾病控制、基础理论与方法、国家课题总结、文献综述、问题与探讨等重点栏目。

全年出版12期, 每期定价9元(含邮费), 全年108元, 由全国各地邮局统一订阅, 邮发代号: 2-73。本刊编辑部常年办理邮购。地址: 北京昌平流字五号《中华流行病学杂志》编辑部, 邮编: 102206, 电话(传真): 010-61739449, Email: lxonly@public3.bta.net.cn 欢迎广大读者踊跃投稿, 积极订阅。

本刊编辑部