

# 狂犬病毒中和抗体检测快速荧光灶抑制试验的建立

于鹏程 吕新军 申辛欣 曹蕾 郑新雄 单虎 唐青

**【摘要】** 目的 建立检测狂犬病毒中和抗体的快速荧光灶抑制试验(RFFIT),检测狂犬病毒中和抗体滴度。方法 以狂犬病标准毒株 CVS-11 为标准攻击毒,制备三代病毒,建立 CVS-11 病毒库;以国际标准抗狂犬病血清为对照血清,参考法国巴斯德研究所的 RFFIT 操作标准,建立适用于中国狂犬病毒中和抗体检测的 RFFIT 方法,并验证该方法的特异性、稳定性和重复性。结果 成功建立了检测狂犬病毒中和抗体的 RFFIT 试验,验证该试验方法的特异性为 100%;重复性试验表明,在本实验室和不同实验室的检测结果  $P$  值均  $>0.5$ ,具有很好的重复性。结论 RFFIT 方法的建立进一步完善了中国狂犬病的实验室检测技术,也将提升中国狂犬病的整体监测能力。

**【关键词】** 狂犬病毒;中和抗体;荧光灶抑制试验;滴度

**The establishment of a rapid fluorescent focus inhibition test for testing rabies virus neutralizing antibody** YU Peng-cheng<sup>1,2</sup>, LV Xin-jun<sup>2</sup>, SHEN Xin-xin<sup>2</sup>, CAO Lei<sup>2</sup>, ZHENG Xin-xiong<sup>3</sup>, SHAN Hu<sup>1</sup>, TANG Qing<sup>2</sup>. 1 Animal Science and Technology College, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 2 Institute for Viral Disease Control and Prevention of Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Wuhan Institute of Biologic Products

Corresponding author: TANG Qing, Email: qtang04@sina.com

This work was supported by a grant from the Public Service Sectors (agriculture) Research Special Fund of China (No. 200803014); National Natural Science Foundation of China (No. 306300492); National Infectious Disease Research (NIID) Fund of Japan; Technology Major Project of Prevention and Control of the Infectious Diseases such as AIDS and Viral Hepatitis of China (No. 2008ZX10004-002)

**【Abstract】** **Objective** To establish a rapid fluorescent inhibition test (RFFIT) for testing rabies virus neutralizing antibody and the titer of rabies virus neutralizing antibody. CVS-11 was used as the standard challenge virus, and three generations prepared for the establishment of the virus library. **Methods** International standard for rabies immunoglobulin was used as the reference serum. RFFIT test was established under consulting the protocol of Institute of Pasteur, and its specificity, stability and reproducibility were validated. **Results** We established the RFFIT which showed both good specificity (100%) and reproducibility ( $P>0.5$ ). **Conclusion** The establishment of RFFIT test perfected the rabies laboratory techniques and would enhance the overall ability in detecting rabies in China.

**【Key words】** Rabies virus; Neutralizing antibody; Fluorescent inhibition test; Titer

狂犬病是由狂犬病毒(rabies virus)引起的一种急性人畜共患传染病,患者以中枢神经系统病变为主,病死率几乎 100%。全世界每年约有 5.5 万人死于狂犬病<sup>[1]</sup>,近年来,中国狂犬病发病人数与发病率呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>,仅次于印度位居全球第二。狂

犬病病死率极高,疫苗免疫接种是预防该病发生的惟一途径,按 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毒中和抗体效价,不低于 0.5 IU/ml 时<sup>[3]</sup>,方可认为达到有效保护,否则给予加强免疫,直至达到保护水平。

快速荧光灶抑制试验(RFFIT)是 WHO 和 OIE 推荐的检测狂犬病毒中和抗体的标准方法,其根据中和试验原理,采用一定量的病毒与系列稀释的抗血清相中和,残留的病毒感染力通过接种细胞,用 RFFIT 检测其剩余病毒量,根据中和效价公式计算结果。RFFIT 方法既可用于人的抗狂犬病毒抗体的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.04.018

基金项目:公益性行业(农业)科研专项基金(200803014);国家自然科学基金(306300492);日本国家传染病研究(NIID)基金;艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项(2008ZX10004-002)

作者单位:266109 青岛农业大学动物科技学院(于鹏程、单虎);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒基因工程国家重点实验室(于鹏程、吕新军、申辛欣、曹蕾、唐青);武汉生物制品研究所(郑新雄)

通信作者:唐青, Email: qtang04@sina.com

测定,也可用于动物的抗狂犬病毒抗体测定,对狂犬病的临床诊断、狂犬病疫苗免疫后中和抗体的检测、免疫球蛋白制剂效价的检测、新疫苗免疫效果的评估及免疫程序的制定等方面均有广泛应用。本研究以狂犬病毒CVS-11毒种为标准攻击毒,BSR细胞为其适应细胞,WHO推荐的抗狂犬病毒血清为标准血清,参考WHO标准RFFIT程序和法国巴斯德研究所的微量RFFIT程序,建立了微量RFFIT检测方法,并对其特异性和重复性进行检测,结果显示,RFFIT方法具有良好的特异性和重复性。

### 材料与方 法

1. 试验用病毒、细胞和标准品来源:狂犬病毒CVS-11国际标准攻击毒株,为固定毒,购自中国药品生物制品检定所;BSR细胞,为仓鼠肾细胞BHK-21的克隆;WHO推荐的标准血清为人免疫球蛋白,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。

2. 主要试剂、仪器设备:DMEM高糖培养液,购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;胰酶、双抗、EDTA,由本所配液室配制;胎牛血清,购自杭州四季青生物工程材料有限公司;抗狂犬病毒核蛋白荧光抗体,购自美国Millipore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。

3. 待测血清来源:待检血清共105份,其中,未免疫血清40份、暴露后免疫血清45份(由广州市疾病预防控制中心提供)和已知滴度的血清20份(由辽宁成大生物股份有限公司提供)。

#### 4. 实验方法:

(1)BSR细胞的培养:胰酶消化BSR单层细胞,以含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液吹打细胞,细胞计数板计数后,每瓶接种 $2 \times 10^6$ 个细胞,补加培养液,于37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱孵育。

(2)病毒滴度测定:病毒融化后,在96孔板上选择相邻2行,将病毒用含10%胎牛血清的DMEM培养液进行5倍系列倍比稀释(30 μl病毒加入120 μl DMEM培养液中),每孔加入50 μl浓度为 $1 \times 10^6$  cells/ml的BSR细胞悬液,37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱孵育24 h;丢弃培养上清,PBS液洗1遍;用80%冷丙酮4℃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(荧光抗体用PBS进行1:50倍稀释),37℃孵育30 min后用PBS液洗3遍;加入60%甘油,在荧光显微镜下计数每孔中的荧光灶数,

计算滴度。

(3)病毒的制备:正常制备细胞悬液并进行细胞计数,将CVS-11毒种按MOI=0.1的量加入细胞悬液中,于37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱孵育1 h,其中每隔15 min摇匀一次,将病毒与细胞的混悬液转移至细胞培养瓶,于37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱孵育72 h,收集培养上清后分装至小管,标明批次(此为贮存病毒),于-70℃保存。以同样的方法,大批量制备贮存病毒。

(4)病毒最适攻击量的滴定:对贮存病毒进行最适攻击量的滴定,病毒融化后,在96孔板上选择1行,将病毒用含10%胎牛血清的DMEM培养液进行2倍系列倍比稀释(70 μl病毒加入70 μl DMEM培养液中);将各稀释度的病毒分别取出50 μl加入另一行各孔中(含50 μl DMEM培养液);每孔加入50 μl浓度为 $1 \times 10^6$  cells/ml的细胞悬液,37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱培养24 h;RFFIT检测使80%细胞感染(产生荧光灶)的最高稀释度。

(5)对照系统的设定:本试验对照系统设有标准血清对照、强阳性血清对照、弱阳性血清对照、阴性血清对照和病毒对照。标准血清对照采用WHO推荐的滴度为30 IU/ml的国际标准抗狂犬病毒血清;强阳性血清和弱阳性血清均将国际标准品用DMEM培养液稀释至9 IU/ml和1 IU/ml;阴性血清为未接种过狂犬病疫苗的人血清。

(6)RFFIT方法:将待测血清于56℃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(50 μl待测血清加入100 μl DMEM培养液中);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倍比稀释;病毒对照孔做2倍系列倍比稀释(方法同最适攻击量滴定);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℃5%CO<sub>2</sub>孵箱孵育1 h后,每孔加入50 μl浓度为 $1 \times 10^6$  cells/ml的细胞悬液;于37℃5%CO<sub>2</sub>孵箱孵育24 h;RFFIT判定结果。

(7)中和抗体滴度计算: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,设计以国际标准血清滴度为参照系数,被测样品50%感染孔前后稀释倍数为变量的中和抗体滴度计算公式。

### 结 果

1. 病毒的制备:大批量制备狂犬病CVS-11病毒,冻存于-70℃。分别测定种病毒、贮存CVS-11病毒的滴度,其中滴度分别为 $1.7 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 。

2. 病毒滴度的计算:计数相邻 2 行最后出现荧光灶 2 孔内的荧光灶数,如  $N_1, N_2 (N_1 > N_2); N_1', N_2' (N_1' > N_2')$ , 则病毒滴度为  $X(\text{FFU/ml}) = (\text{最后 4 孔内荧光灶平均数} \times \text{稀释因子} \times 1000) / \text{每孔所加病毒体积}$ ; 最后 4 孔内荧光灶平均数  $N = (N_1 + N_2 \times 5 + N_1' + N_2' \times 5) / 4$ , 其中 5 为稀释倍数, 4 为孔数; 稀释因子为  $N_1$  和  $N_1'$  孔对应的病毒稀释倍数; 病毒滴度用 FFU (荧光灶单位) / ml 表示。

3. 最适攻击量的确定:病毒的最适攻击量为使 80% 的细胞被感染的最高稀释度。在 16 倍稀释时, 细胞 100% 被感染; 在第 32 倍稀释时, 细胞约有 80% 被感染; 在 64 倍稀释时, 细胞约有 35% 被感染, 因此, 选取病毒 32 倍稀释时, 即病毒滴度约为  $6 \times 10^5$  FFU/ml 为最适攻击病毒量 (图 1)。



图 1 CVS-11 感染和 BSR 细胞对照

4. RFFIT 结果的判定:每次试验都设标准血清对照、强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清对照、病毒对照和细胞对照, 这些对照的检测标准是:标准血清的 50% 感染量出现在第 5、6 孔之间, 强阳性血清的 50% 感染量出现在第 4、5 孔之间; 滴度为 9 IU/ml 左右, 弱阳性血清的 50% 感染量出现在第 2、3 孔之间; 滴度为 1 IU/ml 左右, 阴性血清的第一孔有超过 50% 的绿黄色荧光, 滴度  $< 0.5$  IU/ml; 病毒对照为 32 倍稀释度时细胞 80% 被感染, 细胞对照为满视野没有黄绿色荧光颗粒 (图 1)。

5. RFFIT 特异性检验:用 RFFIT 方法检测了 40 份从未免疫狂犬病疫苗的人血清和 45 份暴露后五针法免疫人血清, 前者抗体滴度为 0.01 ~ 0.1 IU/ml, 后者为 0.63 ~ 461.67 IU/ml, 显示 RFFIT 的特异性为 100% (判定的临界值为 0.5 IU/ml,  $> 0.5$  IU/ml 判为阳性,  $< 0.5$  IU/ml 判为阴性)。

6. RFFIT 重复性检测:将 15 份暴露后免疫血清用 RFFIT 方法重复检测 2 次, 检测结果用 Wilcoxon 符号秩和检验法检验 2 次的一致性, 经检验,  $T_+ = 90, P > 0.05$ , 说明 RFFIT 检测方法具有良好的稳定性 (图 2)。

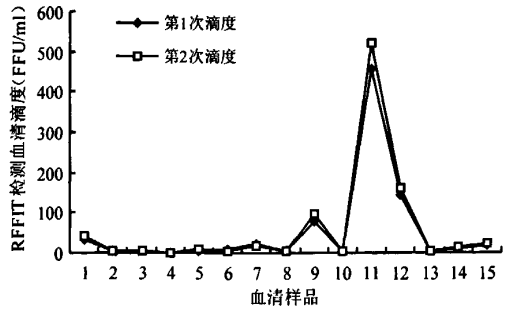


图 2 RFFIT 检测 15 份血清样品 2 次结果比较

7. 不同实验室对 RFFIT 稳定性的比较:将已用 RFFIT 检测 20 份血清样品 (经武汉生物制品研究所基因室检测, 样品由辽宁成大公司馈赠), 于本实验室进行 RFFIT 重复检测 (图 3), 检测结果用 Wilcoxon 法检验其一致性, 经检验,  $T_+ = 143, P > 0.05$ , 两实验室的检测结果显示没有差异。

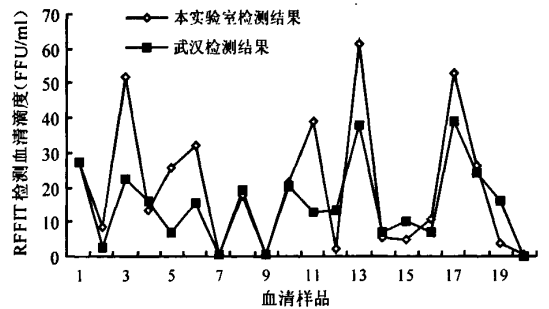


图 3 不同实验室 RFFIT 检测 20 份血清样品结果

### 讨论

本实验室以狂犬病毒 CVS-11 为标准攻击毒, 以 WHO 国际标准抗狂犬病毒血清为对照血清, 成功建立了狂犬病毒 RFFIT, 并对 40 份未免疫血清和 45 份免疫后血清进行检测, 其特异性为 100%; 对 15 份免疫后血清进行重复检测, 其检测结果没有差异, 证明 RFFIT 具有良好的重复性。此外, 我们对已被武汉生物制品研究所基因室用 RFFIT 方法检验过的 20 份血清样品进行重复检验, 结果显示, 两实验室在检查结果上也无差异。可见, RFFIT 方法是比较稳定和准确的。本检测与国内的 RFFIT 方法相比, 每次试验除标准血清外, 均会设强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清和病毒对照, 使得系统的稳定性一目了然; 如果系统对照血清出现偏差, 说明本次试验就不稳定。相对于国际标准 RFFIT 方法, 本试验方法是根据法国巴斯德研究所的微量 RFFIT 方法, 在 96 孔细胞培养板上进行试验, 而不是 8 孔细胞载玻板,

节约了实验成本。

目前,WHO 和 OIE 推荐的应用于狂犬病毒中和抗体检测的方法主要有小鼠中和试验(MNT)、RFFIT 和狂犬病毒荧光抗体中和试验(FAVN)<sup>[4]</sup>。MNT 应用小鼠进行检测,是国际应用于狂犬病毒中和抗体检测的金标准,但 MNT 操作繁琐,所需时间过长,且不利于动物福利。1992 年,WHO 狂犬病专家委员会推荐用 RFFIT 替代 MNT 检测狂犬病毒中和抗体<sup>[5]</sup>。相对于小鼠中和试验,RFFIT 方法具有简便、快捷、重复性好、便于操作且有利于动物福利等优点。根据程满荣等<sup>[6]</sup>的研究,RFFIT 方法的重复性比 MNT 要好得多,且灵敏。国际上曾做过相关研究,WHO 将 6 份样品分发给 8 个实验室用 RFFIT 检测,其结果均较接近,表明用 RFFIT 检测狂犬病毒中和抗体,重复性较好<sup>[7]</sup>。Fitzgerald 等<sup>[8]</sup>也同时在三个实验室对 4 份样品进行检测,每份样品用两种方法检测 4 次,再用统计学方法对每个实验室的两种检测结果进行统计学分析,结果发现这两种方法在不同实验室检测狂犬病毒中和抗体时无显著差异。

近年来,关于 RFFIT 方法的改进也有了进一步的发展,法国 Péharpré 等<sup>[9]</sup>应用荧光显微镜配套的电脑成像技术进行荧光灶记数,使 RFFIT 试验检测结果更加准确,减少了 RFFIT 判读结果时的主观性影响。日本 Khawplod 等<sup>[10]</sup>用表达绿色荧光蛋白的 rHEP-GFP 重组狂犬病毒作为攻击病毒进行 RFFIT 检测,无需进行荧光抗体试验即可直接观察结果。本实验室在 RFFIT 结果观察时采用与荧光显微镜配套的电脑成像系统进行观察,与肉眼观察结果一致,本实验室采用的标准血清效价为 30 IU/ml 的国际标准血清,所得检测结果更加准确。狂犬病毒 RFFIT 的建立,将在狂犬病的临床诊断、狂犬病疫苗免疫后中和抗体的检测、免疫球蛋白制剂效价的检测、新疫苗免疫效果的评估等方面发挥重要作用。

(本工作得到法国巴斯德研究所和武汉生物制品研究所的技术指导,一并志谢)

参 考 文 献

[1] WHO. WHO Expert Consultation on Rabies. WHO technical

report series, No.931. Geneva:WHO,2004.

[2] Song M, Tang Q, Feng ZJ, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of rabies prevalent in China from 1996 to 2006. Chin J Zoonoses, 2008, 24(6):584-586. (in Chinese)

宋森,唐青,冯子健,等. 1996-2006 年中国狂犬病流行特征分析. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(6):584-586.

[3] Coleman PG, Dye C. Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies. Vaccine, 1996, 14(3):185-186.

[4] WHO. WHO Export Committee on Rabies WHO technical report series, No.824. Geneva:WHO,1992.

[5] Yan JX, Li CP, Zhu JH, et al. Establishment of rapid fluoresce focus inhibition test (RFFIT) for detecting neutralization antibody of rabies virus. Chin J Biologicals, 1998, 11(2):93-96. (in Chinese)

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

[6] Cheng MR, Xu GL, Wu J, et al. Comparative study on the detection of neutralizing antibodies against rabies by means of mouse neutralization test and rapid fluorescent focus inhibition test. Chin J Zoonoses, 2009, 25(1):30-33. (in Chinese)

程满荣,徐葛林,吴杰,等. RFFIT 和 MNT 检测抗狂犬病毒中和抗体的比较研究. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(1):30-33.

[7] WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 1988, Thirty—eighth Report; WHO technical report series No. 771. Geneva:WHO,1988.

[8] Fitzgerald EA, Cabasso VJ, Smith JS, et al. A collaborative study on the testing of rabies immune globulin (human) by the mouse neutralization test (MNT) and a rapid fluorescent focus inhibition test(RFFIT). J Biol Stand, 1979, 7(1):67-72.

[9] Péharpré D, Cliquet F, Sagné E, et al. Comparison of visual microscopic and computer-automated fluorescence detection of rabies virus neutralizing antibodies. J Vet Diagn Invest, 1999, 11(4):330-333.

[10] Khawplod P, Inoue K, Shoji Y, et al. A novel rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. J Virol Methods, 2005, 125(1):35-40.

(收稿日期:2009-09-28)

(本文编辑:万玉立)