

• 检验技术与方法 •

双重平行检测批量样品对两个实验室 RFFIT 检测效能的评价*

吕新军¹, 吴小红², 李加², 于鹏程¹, 申辛欣¹, 吴慧¹, 曹守春², 唐建蓉², 董关木^{2△}, 唐青^{1△}

(1. 病毒病预防控制所, 北京 102206; 2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 快速荧光灶抑制试验(RFFIT)是世界卫生组织(World Health Organisation, WHO)推荐的狂犬病病毒中和抗体检测标准方法之一, 国内进行 RFFIT 检测的不同实验室之间互评可促进该方法推广时的标准化。病毒病预防控制所和中国药品生物制品检定所对 200 例人血清进行了双重平行 RFFIT 检测。结果显示双方检测中和抗体效价几何均值(genomic means titration, GMT)为 1.89、1.84 IU/mL, 差别无统计学意义($t = -0.94, P > 0.05$); 血清中和抗体阳性率为 95.00%、93.00%, 差别无统计学意义($\chi^2 = 0.71, P > 0.05$); 双方结果定性一致率为 89.00%, 发生结果定性不一致的 22 例(11.00%)血清双方检测结果均 < 1 IU/mL; 67 例双方检测结果均 < 1 IU/mL 的血清样品中有 22 例(32.84%)发生结果定性不一致。

关键词: 研究; 快速荧光, 灶抑制试验; 几何均值; 一致率; 阳性率

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.022

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0478-02

快速荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)是 WHO 狂犬病专家委员会推荐的狂犬病病毒中和抗体检测标准方法之一, 该方法是以狂犬病病毒标准攻击毒株 CVS-11 为攻击病毒中和待测血清中的狂犬病病毒中和抗体, 而后采用培养细胞检测剩余病毒, 并通过荧光抗体试验检测结果的狂犬病病毒中和抗体检测方法, 血清中狂犬病病毒中和抗体水平 ≥ 0.5 IU/mL 即可认为体内具有保护水平的抗狂犬病病毒中和抗体^[1,2]。RFFIT 在国内尚未普遍建立和应用, 目前仅在少数专业实验室可以进行。国内进行 RFFIT 检测的实验室之间尚未系统地进行过 RFFIT 检测的比较, 对这些实验室 RFFIT 检测体系的效能尚缺乏客观评价。病毒病预防控制所和中国药品生物制品检定所采用双重平行检测批量样品的方式合作开展不同实验室之间 RFFIT 检测效能的评价, 对国内 RFFIT 检测标准化进行了有益探索。

1 材料和方法

1.1 病毒、细胞系和标准品 两实验室应用的狂犬病病毒标准攻击毒株均为 CVS-11 毒株, 并且已经完成了糖蛋白基因序列测定和比对。两实验室使用的 BSR 细胞系均来自法国巴斯德研究所狂犬病研究室, 常规传代。两实验室使用的标准品为第五批抗狂犬病免疫球蛋白, 标示效价 21.4 IU/mL, 由中国药品生物制品检定所提供, 每支用 1 mL 注射用水溶解, 每管 70 μ L 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 试剂和仪器 DMEM 培养液购自 Gibico 公司, 胎牛血清(fetal serum of bovine, FBS)购自四季青生物制品有限公司, 100 U/mL 青霉素和链霉素双抗混液、0.25% 胰酶液、0.02% Versene 液、PBS 液(0.1 mol/L, pH 7.2~7.6)由各实验室自行制备, 1% EVAN's Blue 试剂购自 Bio-RAD 公司, FITC 标记抗狂犬病病毒核蛋白抗体购自 Millipore/Chemicon 公司。普通倒置光学显微镜为 OLYMPUS CX 41 型, 倒置荧光显微镜为 OLYMPUS IX 51 型。

1.3 待测样品 200 例待测人血清由病毒病预防控制所提供, 每份血清分装为 2 管, 分别由病毒病预防控制所和中国药品生物制品检定所进行 RFFIT 检测。待测血清样品置 4 $^{\circ}$ C 冰

箱冷藏, 测定前需在室温下平衡 30 min, 然后 56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 min, 取出后在室温下平衡 30 min, 方可进行 RFFIT 检测。

1.4 RFFIT 检测 每个检测单位内设 2 个检测小组, 每个小组包括 2 名熟练检测人员, 同一样品以 2 小组检测结果的 GMT 值为最终结果, 双方采用相同的标准流程进行 RFFIT 检测。在 96 孔细胞培养板上按照设计方案在相应孔内加入 100 μ L 10% FBS 的 DMEM 培养液, 取得待测血清、标准品、弱阳性对照血清、强阳性对照血清、阴性对照血清各 50 μ L 分别加入相应孔内, 在检测板上进行 1:3 倍比稀释, 最后 1 孔弃去 50 μ L 混合液; 同时设立正常细胞对照和 CVS-11 病毒对照; 检测板上除正常细胞和病毒对照外每孔加入稀释至 80%~95% 细胞感染量的 CVS-11 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 中和作用 1 h; 中和作用结束后每孔加入 1×10^6 /mL 的 BSR 细胞悬液 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱培养 24 h; 弃培养液, 每孔加 200 μ L PBS 液洗 1 次, 弃 PBS 液; 每孔加 50 μ L 80% 冷丙酮, 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min; 弃丙酮, 室温干燥 5 min; 每孔加 50 μ L 以 PBS 液 1:60 稀释的荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白抗体(含 0.1% 的 1% EVAN's Blue), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 弃抗体, 每孔加 200 μ L PBS 液连续洗 3 次; 每孔加 2 滴 80% 甘油, 铺满孔底; 倒置荧光显微镜下观察, 在记录表中详细记录各样品 50% 分界点前后孔内荧光染色细胞百分比, 代入计算公式内求取各样品中和抗体效价值, 单位为 IU/mL。

1.5 结果比较分析 采用 Excel 表录入样品检测信息, 利用 Excel 表函数功能计算样品中和抗体效价 GMT 值, 统计两单位 RFFIT 检测结果的一致率和差异率、中和抗体阳性率、弱阳性血清百分率等。采用 SPSS13.0 进行两样本 GMT 值比较的 t 检验和两样本中和抗体阳性率比较的 χ^2 检验。

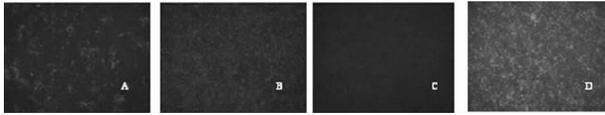
2 结果

2.1 双方 RFFIT 检测关键因素对比 双方所用 CVS-11 毒株糖蛋白基因推导氨基酸序列同源率为 97.44%, 在 3 个关键性中和位点中 I 号位点(226-231 位)和 II 号位点(34-42, 198-200 位)氨基酸序列完全相同, III 号位点(330-338 位)第 335 位氨基酸残基不同, 病毒病预防控制所 CVS-11 毒株该位点为

* 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: qtany04@sina.com。

W, 而中国药品生物制品检定所 CVS-11 毒株该位点为 R, 显示双方所用 CVS-11 毒株糖蛋白氨基酸序列关键中和位点差异极小。

2.2 RFFIT 荧光显微镜观察结果 双方在 RFFIT 检测板上均设立标准品、阴性血清、弱阳性血清、强阳性血清、CVS-11、正常细胞对照。结果判读时细胞对照孔内应无荧光灶, CVS-11 中和用量为 80%~95% 细胞感染量、标准品 50% 细胞感染量分界点稳定体系方成立(图 1)。经过校订双方 RFFIT 检测中标准品 50% 分界点定位均在第 5、6 孔之间, 弱阳性血清 50% 分界点定位在第 2、3 孔之间, 强阳性血清 50% 分界点定位在第 4、5 孔之间。



A: 标准品第 5 孔—25% 细胞感染量; B: 标准品第 6 孔—75% 细胞感染量; C: 正常细胞对照—无荧光灶; D: 病毒对照—80% 细胞感染量。

图 1 RFFIT 检测标准品和细胞对照荧光显微镜观察结果

2.3 RFFIT 测定结果分析 各单位内同时设立 2 个工作组, 对一样品以 2 小组检测结果 GMT 值作为其最终结果。病毒病预防控制所和中国药品生物制品检定所对 200 例血清中和抗体效价测定结果的 GMT 值分别为 1.89 IU/mL、1.84 IU/mL, 经 SPSS 13.0 进行结果比较差异无统计学意义($t = -0.94, P > 0.05$), 即双方检测结果总体水平一致; 病毒病预防控制所和中国药品生物制品检定所检测的血清中和抗体阳性率分别为 95.00% (190/200)、93.00% (186/200), 采用 SPSS 13.0 进行两样本中和抗体阳性率比较的 χ^2 检验显示差别无统计学意义($\chi^2 = 0.71, P > 0.05$), 即双方检测的血清中和抗体阳性率一致; 双方检测结果定性一致率 89.00% (178/200), 差异率 11.00% (22/200), 发生定性差异的 22 例血清样品双方检测结果均 < 1 IU/mL, 并且在 67 例(33.50%) 双方检测结果均 < 1 IU/mL 的血清样品中有 22 例(32.84%) 发生结果定性不一致。

3 讨论

影响 RFFIT 检测的因素主要是标准品的品质、攻击毒株被中和的能力、操作者的熟练程度及荧光显微镜下判读结果的主观差异^[3]。标准品的表现对试验结果有直接影响^[4], 双方统一使用第五批抗狂犬病免疫球蛋白国家标准品, 有利于减少因标准品而引起的误差。不同实验室之间攻击毒株糖蛋白序列差异是导致 RFFIT 测定结果出现差异的主要因素^[5], 此次双方使用的攻击毒株经序列测定分析显示糖蛋白氨基酸序列差异很小, 对 RFFIT 检测不至于产生明显影响。操作者的熟练程度对检测结果的稳定性影响较明显^[6], 此次双方操作人员均为技术熟练者, 提高了检测结果的稳定性。操作者在荧光显微镜下判读结果的主观差异对测定结果的影响是客观存在的^[7], 平行检测有利于克服主观误差提高检测结果可信度^[8], 此次采用的双重平行检测模式有利于克服检测者主观差异对检测结果的影响。

近年来, 国内狂犬病疫情形势持续严峻, 狂犬病免疫制剂用量巨大, 同时国内针对人或动物的狂犬病免疫干预项目在快速增加, 这些都要求加强狂犬病相关的免疫学检测和监测^[9]。

相对狂犬病病毒中和抗体检测的小鼠中和试验(mouse neutralization test, MNT), RFFIT 单流程可在 48 h 内完成, 适合在 96 孔板上进行大批量样品检测, 其重复性和稳定性优于 MNT, 因此 RFFIT 可以替代 MNT 进行狂犬病病毒中和抗体检测^[10]。2010 年版《中国药典》第 3 部已将 RFFIT 与 MNT 共同列为狂犬病病毒中和抗体检测标准方法, 不同实验室应当依据药典规定的标准进行 RFFIT 检测, 检测结果应当互相认可。此次双重平行检测批量样品显示不同实验室进行 RFFIT 检测可以达到效能基本相当, 对 RFFIT 检测在推广过程中的规范化有一定意义。

(吕新军与吴小红对本文具有同等贡献。)

参考文献

- [1] World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies, 2004, First Report; WHO technical report series # 931[M]. Geneva, Switzerland, World Health Organization; 2005.
- [2] Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody[J]. Bull WHO, 1973, 48(10): 535-541.
- [3] Manning SE, Rupprecht CE, Fishbein D, et al. Human rabies prevention—United States, 2008; recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices [J]. MMWR RECOMM REP, 2008, 57(RR-3): 1-28.
- [4] Moura WC, Gallina NM, Fuches RM, et al. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study[J]. J Virol Methods, 2008, 154(1-2): 7-13.
- [5] Briggs DJ, Smith JS, Mueller FL, et al. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas [J]. Biologicals, 1998, 26(4): 347-355.
- [6] Welch RJ, Anderson BL, Litwin CM. An evaluation of two commercially available ELISAs and one in-house reference laboratory ELISA for the determination of human anti-rabies virus antibodies [J]. J Med Microbiol, 2009, 58(6): 806-810.
- [7] Péharpré D, Cliquet F, Sagné E, et al. Comparison of visual microscopic and computer-automated fluorescence detection of rabies virus neutralizing antibodies[J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11(4): 330-333.
- [8] Mahendra BJ, Madhusudana SN, Ashwathnarayana DH, et al. A comparative study on the immunogenicity, safety and tolerance of purified duck embryo vaccine (PDEV) manufactured in India (Vaxirab) and Switzerland (Lyssavac-N): a randomized simulated post-exposure study in healthy volunteers[J]. Vaccine, 2007, 25(50): 8405-8409.
- [9] 俞永新. 中国预防控制狂犬病降低发病率的思考[J]. 中国计划免疫, 2007, 13(4): 391-398.
- [10] Kurz J, Vogel I, Gerstl F, et al. Comparative studies of two potency tests for antirabies serum: neutralization test in mice (MNT) and rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)[J]. Dev Biol Stand, 1986, 64(5): 99-107.