

假病毒中和试验对狂犬病毒中和抗体效价的检测效能分析

吴小红, 赵丹华, 丁如霞, 李玉华, 聂建辉* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的: 组织不同的实验室分析假病毒中和法 (Pseudo Virus-based Neutralization Assay, PBNA) 对不同样品的狂犬病病毒中和抗体水平的检测能力, 并比较其与经典的快速免疫荧光灶抑制试验 (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT) 以及小鼠中和试验法 (Mouse Neutralization Test, MNT) 的相关性。方法: 共9家实验室, 分别采用PBNA、RFFIT以及MNT法对6份样品进行狂犬病病毒中和抗体检测, 每个实验室进行3~5次重复实验。采用配对 t 检验及Pearson相关系数对3种检测方法的结果进行统计学分析。结果: PBNA与RFFIT、PBNA与MNT、RFFIT与MNT Pearson相关系数分别为0.985、0.988和0.974, 抗体几何平均滴度进行 t 检验, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。结论: 3种方法重复检测6份样品的定量结果具有高度的相关性, PBNA法可作为《中华人民共和国药典》方法RFFIT、MNT的一种替代或补充方法, 用于人用狂犬病疫苗临床血清、狂犬病人免疫球蛋白及抗狂犬病血清的狂犬病病毒中和抗体效价检测。

关键词: 假病毒中和试验; 免疫荧光灶抑制试验; 小鼠中和试验法; 狂犬病毒中和抗体; 协作研究

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)02-0210-007

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.02.012

Study on the Pseudo Virus-based Neutralization Assay for Rabies Virus Neutralization Antibody Test

Wu Xiaohong, Zhao Danhua, Ding Ruxia, Li Yuhua, Nie Jianhui* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To analyze the ability of pseudo virus-based neutralization assay (PBNA) to detect rabies virus neutralization antibody levels in different samples in different laboratories, and compare its correlation with classic rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) and mouse neutralization test (MNT). **Methods:** A total of 9 laboratories were used to test rabies virus neutralization antibody in 6 samples by PBNA, RFFIT and MNT methods respectively, and 3 to 5 repeated experiments were carried out in each laboratory. Paired t test and Pearson correlation coefficient were used to analyze the results of the three detection methods. **Results:** The Pearson correlation coefficient between PBNA and RFFIT, PBNA and MNT, RFFIT and MNT were 0.985, 0.988 and 0.974 separately. The geometric mean titer of antibody was tested by t test, and there was no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** The quantitative results of the repeated detection of 6 samples by three methods are highly correlated. PBNA method can be used as a substitute or supplementary method for RFFIT and MNT methods in *Chinese Pharmacopoeia* for the detection of rabies virus neutralization antibody in clinical serum of

human rabies vaccine, rabies human immunoglobulin and anti-rabies serum.

Keywords: pseudo virus-based neutralization assay; rapid fluorescent focus inhibition test; mouse neutralization test; rabies virus neutralization antibody; collaborative study

狂犬病病毒中和抗体是评价狂犬病人免疫球蛋白、抗狂犬病血清以及评价狂犬病疫苗免疫效果的重要指标。目前,快速荧光灶抑制试验(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT)和荧光抗体病毒中和试验(Fluorescent Antibody Virus Neutralization Test, FAVN)分别是世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, OIE)推荐的中和抗体检测“金标准”^[1]。我国2020版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录的中和抗体检测方法是小鼠中和试验(MNT)及快速荧光灶抑制试验(RFFIT)^[2]。

近几年来,我国人用狂犬病疫苗每年的批签发量约为1600~1800万剂,狂犬病人免疫球蛋白签发量逐年增加,近3年年批签发量约为1100~1200万瓶^[3]。同时,人用狂犬病疫苗临床效果评价的需求巨大。因此,建立快速高通量的中和抗体效价检测方法对上述制品的评价和加速该类制品发展具有十分重要的意义。随着无生物安全担忧的假病毒技术的快速发展,假病毒中和试验(PBNA)已经广泛应用于病毒类疫苗免疫效果的评价^[4-8]以及新发突发传染病治疗用免疫球蛋白的质量控制^[9]。中国食品药品检定研究院(简称中检院)通过对假病毒包装系统进行优化,打破了狂犬病病毒假病毒的构建瓶颈,获得了高滴度的狂犬病病毒CVS-11株假病毒,建立了狂犬病病毒中和抗体检测的假病毒中和法(PBNA)并进行了标准化研究。前期的研究结果显示PBNA法对狂犬病人免疫球蛋白效价检测呈现出良好的灵敏度、特异性、重复性及准确性,与经典的RFFIT法有良好的相关性($R^2=0.946$)^[10]。为评价该标准方法用于狂犬病人免疫球蛋白及抗狂犬病血清质量控制的可行性,本研究邀请了共9家有资质的实验室进行协同验证,考察不同实验室间PBNA法的重现性以及和活病毒方法的相关性,为该方法纳入药典标准方法提供科学数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

MNT法狂犬病毒标准攻击毒株(CVS)、

RFFIT法标准中和毒株(CVS-11,为标准攻击毒株CVS的细胞适应株)由中检院提供,各实验室参照《中国药典》传代保存使用;狂犬病病毒CVS-11株假病毒(批号为20190813、病毒滴度为 8.6×10^6 TCID₅₀·mL⁻¹)、RFFIT用BSR细胞、PBNA用293T细胞及国家标准品均由中检院提供。检测用标准品为第六批狂犬病免疫球蛋白国家标准品,批号为250011-201306,标示效价为37.0 IU·mL⁻¹。

1.2 试剂与仪器

相关试验试剂、检测用仪器均由各实验室常规配置。

1.3 协作验证

样品选取6份高、中、低效价及不同来源样品(编码B11~B66),其中B11、B55为人用狂犬病疫苗免疫后人血清,B22、B33、B44为狂犬病人免疫球蛋白,B66为马抗狂犬病血清,由中检院制备分装后按照协作研究方案发放至各实验室,实验室编号为01~09。

1.4 方法

将检测用假病毒株、细胞、国家标准品、协作验证用样品以及3种检测方法的标准操作规程统一发放给参与协作验证的9家实验室,各实验室独立开展3~5次重复实验。RFFIT法和MNT法参与验证实验室均为生物制品生产及检验的有资质实验室,采用本实验室传代保存的标准攻击毒株和中和毒株进行检测,并由长期从事该项检测的实验人员完成。假病毒中和试验参与验证实验室为经过假病毒中和试验能力验证考核的实验室。

1.4.1 小鼠中和试验法(MNT)实验^[2]

参照“《中国药典》2020版三部通则3512第一法”进行。取2倍系列稀释的待检样品及标准品各8个稀释度0.5 mL,等量加入中和用标准攻击毒株病毒悬液0.5 mL,病毒含量为32~320 LD₅₀·0.03 mL⁻¹,同时设立病毒对照。37℃水浴中和1 h,分别进行小鼠脑内注射,每只小鼠注射0.03 mL,每稀释度注射6只小鼠。观察小鼠14 d,记录接种后4 d发病死亡小鼠,按照Reed-Muench法计算LD₅₀,根据标准品效价计算样品结果。

1.4.2 快速免疫荧光灶抑制试验(RFFIT)^[2]

参照“《中国药典》2020版三部通则3512第二法”进行并计算结果。在96孔板上3倍系列稀释待检血清及参考品(50 μL+100 μL);然后每孔加入50 μL适量的病毒(可引起细胞达到80%~95%荧光病变面积的病毒量),同时设立病毒对照及细胞对照。37℃、5%CO₂培养箱中和1 h;取出96孔反应板后,每孔加入50 μL BSR细胞(1×10⁶·mL⁻¹)。37℃、5%CO₂培养箱里培养24 h后弃培养液,用0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH7.2)洗1遍,然后加入-20℃预冷80%丙酮50 μL,4℃固定30 min。弃掉丙酮,待残余丙酮挥发后,每孔加入50 μL工作浓度的FITC标记抗狂犬核蛋白单抗,37℃、5%CO₂培养箱中孵育30 min。0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH7.2)洗3遍,置荧光斑点分析仪扫描观察,记录每孔荧光病变面积的情况。根据标准品及血清样品荧光病变面积在50%上下的2个稀释度,参照《中国药典》公式计算血清中和抗体滴度。

1.4.3 假病毒中和试验(PBNA)测定法

将3倍系列稀释至适宜稀释度的标准品及供试品各100 μL加入至96孔板中,各孔中再加入中和用假病毒,每孔50 μL(含假病毒1600 CCID₅₀·mL⁻¹),同时设正常细胞对照孔及病毒对照孔。混匀后置37℃孵箱中和1 h。取出培养箱中已准备好的293T细胞(汇合率达80%~90%),用0.25%胰蛋白酶消化细胞并制备细胞悬液,再用DMEM完全培养液将细胞稀释至4×10⁵·mL⁻¹,向细胞悬液中加入DEAE-dextran,使其浓度为25 mg·L⁻¹。96孔细胞培养板中每孔加入100 μL细胞,于37℃、5%CO₂孵箱里培养40~52 h。培养结束后,从细胞培养箱中取出96孔板,用多道移液器从每孔中吸弃150 μL上清液,加入100 μL荧光素酶检测试剂,将96孔板室温避光反应2 min。反应结束后,用多道移液器将反应孔中的液体反复吹吸6~8次,使细胞充分裂解,再从每孔中吸出150 μL液体,加于对应96孔化学发光检测板中,置于化学发光检测仪中读取发光值,计算中和抑制率。中和抑制率=[1-(样品组的发光强度均值-空白对照均值)/(病毒对照组的发光强度均值-空白对照值均值)]×100%。按照Reed-Muench法计算ID₅₀,通过标准品与样品ID₅₀比值对样品进行中和抗体滴度

计算。

1.5 统计分析

利用SPSS 23.0和GraphPad Prism(Version 8.0)软件进行分析。采用配对*t*检验对3种方法检测血清抗体几何平均滴度(Geometric Mean Titer, GMT)进行比较,*P*<0.05差异有统计学意义。将抗体滴度结果进行对数(Log)转换后,进行Pearson相关系数(*r*)及线性回归分析。

2 结果

2.1 协作验证数据收集

中检院共收集来自5个实验室的18个RFFIT检测数据、4个实验室的12个PBNA检测数据、2个实验室的5个MNT检测数据,计算各实验室每个样品分别采用3种检测方法的抗体GMT及各实验室内和实验室间变异系数(Coefficient of Variation, CV)。最后取所有实验室相同方法检测抗体结果的GMT作为该方法每份样品检测的最终结果。见表1。

2.2 协作验证结果分析

2.2.1 检测结果变异系数分析

MNT法各实验室内检测结果变异系数为0%~29.8%,实验室间变异系数为13.7%~44.5%;RFFIT法在各实验室内检测结果变异系数为0.8%~35.8%,实验室间变异系数为7.5%~32.5%。均符合验证方案要求。参与假病毒中和试验验证的01实验室因标准品最高稀释度中和抑制率大于50%,无法计算ID₅₀,无抗体滴度结果;03实验室B55样品因实验室内变异系数为189.9%,不符合假病毒中和试验预设100%变异范围^[11],判定为无效数据。统计有效实验数据,假病毒中和试验(PBNA)在各实验室内变异系数为0%~37.0%,实验室间变异系数除去B55为24.0%~49.9%,B55样品实验室间变异系数为79.3%。

2.2.2 对不同检测方法相关性分析

PBNA与RFFIT的Pearson相关系数为0.985,*P*<0.01;PBNA与MNT的相关系数为0.988,*P*<0.01;RFFIT与MNT的相关系数为0.974,*P*<0.05。线性回归分析*R*²分别为0.971、0.976、0.948,如图1、图2、图3。3种方法抗体平均几何滴度进行配对*t*检验,*P*>0.05,差异无统计学意义,见表1、图4。

表1 各实验室不同方法检测结果及实验室内、实验室间变异系数及3种方法结果比较

实验 室代 码	实验 方法	实 验 次 数	抗体滴度 (IU · mL ⁻¹) 及分析												t 检验	P 值
			B11		B22		B33		B44		B55		B66			
			GMT	CV/%	GMT	CV/%	GMT	CV/%	GMT	CV/%	GMT	CV/%	GMT	CV/%		
05	RFFIT	3	0.5	10.6	133.3	13.3	37.4	16.5	130.8	17.5	45.8	9.7	656.9	34.0	/	/
07		4	0.8	6.7	109.2	7.9	54.6	13.7	142.9	12.9	24.1	8.7	903.0	6.9	/	/
08		5	0.9	12.1	101.0	13.3	48.5	21.9	145.9	17.8	41.1	12.2	660.8	17.9	/	/
06		3	0.8	17.8	119.0	0.8	49.2	1.4	128.2	11.1	29.0	5.3	998.9	2.9	/	/
09		3	1.1	12.7	139.5	23.5	56.4	35.8	153.3	20.4	53.5	21.1	523.9	15.0	/	/
	RFFIT汇总	18	0.8	27.3	119.6	13.5	48.7	15.2	139.9	7.5	37.1	32.5	728.5	26.9	t=1.720	P=0.146
	95%CI		0.7~0.9	/	106.2~126.3	/	43.5~54.6	/	129.6~150.6	/	29.8~41.3	/	645.6~825.2	/	/	/
02	PBNA	3	0.5	20.3	153.3	25.5	64.0	48.5	181.4	11.0	41.1	12.2	660.8	17.9	/	/
03		3	0.5	0.0	119.7	15.2	57.4	56.2	184.4	20.7	11.4	189.9*	433.1	27.7	/	/
05		3	0.7	29.4	82.4	50.3	45.9	20.6	123.6	13.8	13.5	9.1	429.4	20.1	/	/
04		3	0.8	45.8	91.9	32.1	45.2	13.9	100.5	29.7	10.4	37.0	299.0	30.7	/	/
	PBNA汇总	12	0.6	24.0	118.2	28.7	54.3	41.5	134.6	29.4	14.1	79.3	449.0	49.9	t=0.991	P=0.367
	95%CI		0.5~0.6	/	96.1~138.3	/	38.8~63.4	/	108.9~160.9	/	11.4~21.0	/	341.5~595.8	/	/	/
06	MNT	3	0.6	23.9	97.3	17.6	47.6	20.1	124.4	1.3	24.1	29.5	161.5	9.8	/	/
08		2	0.6	0.0	153.1	8.4	55.9	3.8	75.6	8.0	12.8	29.8	207.5	3.5	/	/
	MNT汇总	5	0.6	13.7	116.6	28.3	50.8	15.8	101.9	26.4	18.7	44.5	178.5	15.5	t=2.041	P=0.097
	95%CI		0.5~0.7	/	87.7~145.6	/	43.7~57.8	/	78.3~125.5	/	11.4~26.0	/	154.3~202.7	/	/	/

注：“/”代表未统计；a代表PBNA与RFFIT比较，b代表PBNA与MNT比较，c代表RFFIT与MNT比较。

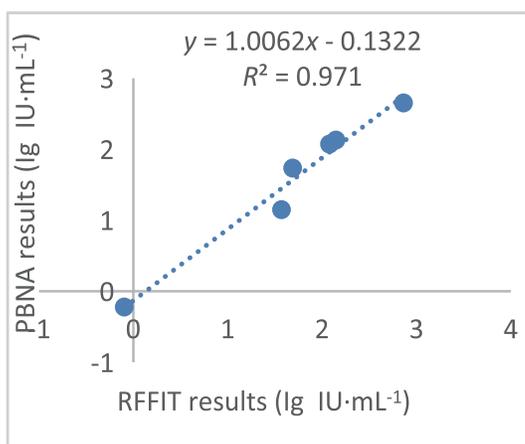


图1 PBNA与RFFIT相关性

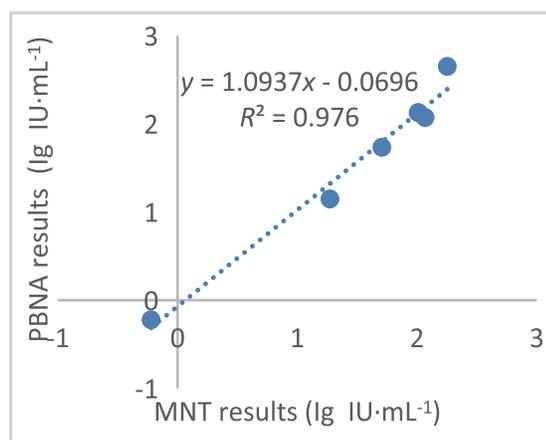


图2 PBNA与MNT相关性

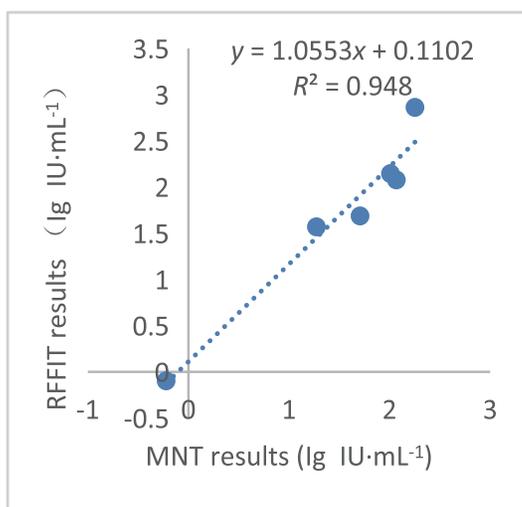


图3 RFFIT与MNT相关性

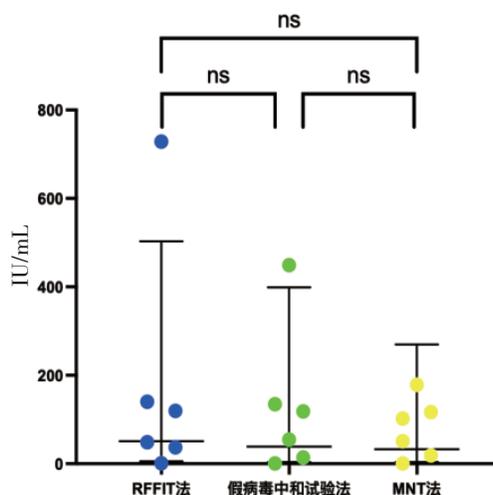


图4 三种方法配对t检验

3 讨论

假病毒中和抗体检测方法(PBNA)因其安全、快速、操作简单、定量客观等优势,正逐步成为替代传统活病毒中和抗体检测的方法,成为经典的中和抗体检测方法之一^[12-13]。尤其在新冠疫情暴发后,新冠病毒(SARS-CoV-2)假病毒中和抗体检测方法的快速建立和标准化^[14-15],使该方法成为新冠疫苗研发中重要的免疫原性评价方法。PBNA的应用需经过严格的标准化控制和充分的性能评价,尤其是对已有标准检验方法、标准检测毒株以及检测标准品的生物制品如流感疫苗、EV71疫苗、狂犬病疫苗、脊髓灰质炎疫苗等质量控制及中和抗体评价,必须与已有标准方法进行充分的方法验证与比较^[16-17]。

狂犬病假病毒中和试验方法鲜有文献报道^[18-20]。

Wright等开发的PBNA方法与FAVN检测符合率为100%,中和抗体滴度检测相关性较好($R^2=0.89$)。本研究构建的狂犬病病毒假病毒糖蛋白序列来源于RFFIT法的标准中和毒CVS-11株,并且病毒滴度可以达到 1×10^7 TCID₅₀ · mL⁻¹,与RFFIT法的检测结果具有更高的相关性($R^2=0.946$)^[10]。

本研究中9家实验室统一用第六批狂犬病免疫球蛋白国家标准品平行检测,对6个样品检测结果以IU · mL⁻¹进行了赋值。采用3种不同方法对6份样品进行了协作验证,狂犬病假病毒中和方法(PBNA)与RFFIT及MNT标准方法定量检测滴度水平高度相关($R^2=0.971$ 和 $R^2=0.976$),与前期实验室的研究结果一致^[10],符合国家相关指南中对于PBNA方法的要求^[15-16]。9家实验室的协同验证结果进一步证实PBNA与RFFIT及MNT检测结果基本

一致, 抗体GMT结果差异无统计学意义。按照统一操作规范, 各实验室采用不同检测方法的检测结果重现性良好。RFFIT法和MNT法实验室内和实验间检测结果变异系数均在50%之内。PBNA法检测除去其中一份样品B55检测结果实验室间变异系数为79.3%, 其余样品检测变异系数在50%之内。B55样品结果变异较大是由03实验室检测偏差较大引起。分析可能原因一是B55由多份人免疫后血清混合后制备, 样品均一性无法充分保证; 二是PBNA检测仪器高灵敏性及人员操作引起的实验结果偏差。由于荧光素酶检测试剂半衰期较短, 室温避光反应时间必须严格控制控制在2 min, 同时实验前检测试剂应平衡至室温, 排除不同温度下荧光素酶酶促反应值差别较大引起的实验偏差。后续可通过加强人员培训和加大协作验证样品量来进一步进行确认。

PBNA法使用化学发光仪自动检测, 排除了人员在RFFIT结果判定中的主观因素影响, 且能快速读取数据, 提高了检测效率, 更重要的优势是不使用活病毒, 避免了生物安全的风险, 也无需使用动物, 符合国际倡导的3R原则。因此, PBNA法对于人用狂犬病疫苗大量临床血清的免疫效果评价和狂犬病人免疫球蛋白及抗狂犬病血清的质量控制更加有效和适用, 可作为传统的狂犬病病毒中和试验方法的替代方法或补充方法进行推广使用, 并将为我国狂犬病防控发挥重要作用。

【致谢: 感谢军事医学科学院医学工程研究所、军事医学科学院微生物流行病学研究所、四川大学华西医学院重点实验室、成都生物制品研究所、武汉生物制品研究所、成都蓉生药业有限责任公司、北京生物制品研究所、河北大安制药有限公司参与实验室协作验证工作。】

参考文献:

- [1] World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies: Third Report. World Health Organization[EB/OL]. (2018-06) [2023-02-21]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272364>.
- [2] 中华人民共和国药典: 三部[S]. 2020: 585-586.
- [3] 中国食品药品检定研究院. 中国食品药品检定研究院生物制品批签发产品公示情况[EB/OL]. [2023-02-21]. <https://bio.nifdc.org.cn/pqf/search.do>.
- [4] Krajden M, Cook D, Yu A, et al. Human Papillomavirus 16 (HPV 16) and HPV 18 Antibody Responses Measured by Pseudovirus Neutralization and Competitive Luminex Assays in a Two- versus Three-dose HPV Vaccine Trial[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18 (3): 418-423.
- [5] Nie J, Wang W, Wen Z, et al. Optimization and Proficiency Testing of a Pseudo Virus-based Assay for Detection of HIV-1 Neutralizing Antibody in China[J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 185: 267-275.
- [6] Carnell GW, Ferrara F, Grehan K, et al. Pseudo Type-based Neutralization Assays for Influenza: A Systematic Analysis [J]. *Front Immunol*, 2015, 29 (6): 161.
- [7] Zhu FC, Guan XH, Li YH, et al. Immunogenicity and Safety of a Recombinant Adenovirus Type-5-vectored COVID-19 Vaccine in Healthy Adults Aged 18 Years or Older: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 2 Trial[J]. *Lancet*, 2020, 396 (10249): 479-488.
- [8] Chen GL, Li XF, Dai XH, et al. Safety and Immunogenicity of the SARS-CoV-2 ARCoV MRNA Vaccine in Chinese Adults: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 1 Trial[J]. *Lancet Microb*, 2022, 3: 193-202.
- [9] 杨晓明, 侯继峰. 康复期血浆应用于急性病毒性传染病现状及治疗新型冠状病毒肺炎前景[J]. *中国生物制品学杂志*, 2020, 33 (3): 241-245.
- [10] Nie J, Wu X, Ma J, et al. Development of *In Vitro* and *In Vivo* Rabies Virus Neutralization Assays Based on a High-titer Pseudo Virus System[J]. *Sci Rep*, 2017, 20 (7): 42769.
- [11] Guan L, Yu Y, Wu X, et al. The First Chinese National Standards for SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody[J]. *Vaccine*, 2021, 39 (28): 3724-3730.
- [12] 黄维金, 王佑春. 假病毒技术在新发病毒性传染病防控产品评价中的应用[J]. *病毒学报*, 2020, 36 (6): 1177-1186.
- [13] 丁如霞, 王佑春, 黄维金. 病毒中和抗体检测方法研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2021, 49 (4): 61-65.
- [14] Nie J, Li Q, Wu J, et al. Quantification of SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody by a Pseudotyped Virus-based Assay[J]. *Nat Protoc*, 2021 (11): 3699-3715.
- [15] Nie J, Li Q, Wu J, et al. Establishment and Validation of a Pseudovirus Neutralization Assay for SARS-CoV-2 [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9 (1): 680-686.

- [16] 国家药品监督管理局药品审评中心. 国家药监局药审中心关于发布《新型冠状病毒预防用疫苗研发技术指导原则(试行)》等 5 个指导原则的通告(2020年第21号)[EB/OL]. (2020-08-14) [2023-06-23]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200814230916157.html>.
- [17] 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心. 当前关于新型冠状病毒中和抗体检测试剂的几点考虑[S]. 2021.
- [18] Wright E, Temperton NJ, Marston DA, et al. Investigating Antibody Neutralization of Lyssaviruses Using Lentiviral Pseudo Types: A Cross-species Comparison[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89 (9): 2204-2213.
- [19] 邓瑶, 吕新军, 于鹏程, 等. 基于狂犬病病毒CVS-11假病毒的中和抗体检测新技术及初步应用[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2016, 36 (10): 775-778.
- [20] Rodriguez MC, Fontana D, Garay E, et al. Detection and Quantification of Anti-rabies Glycoprotein Antibodies: Current State and Perspectives[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105 (18): 6547-6557.

(收稿日期 2023年8月28日 编辑 肖妍)