

流感病毒中和抗体检测方法的建立及验证

赵慧, 江征, 李娟, 刘书珍, 邵铭, 徐康维, 李长贵

中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室 北京 100050

摘要: 目的 建立检测流感病毒中和抗体效价的微量病毒中和法(microneutralization tests ,MNT) ,并进行验证。方法 建立改进的微孔板病毒中和法 ,并对该方法的关键影响因素(不同代次 MDCK 细胞和细胞培养板边缘效应)以及方法的准确性和精密性进行验证 ,采用改进的微孔板病毒中和法和血凝抑制(hemagglutination inhibition ,HI)试验分别检测甲型 H1N1 流感疫苗免疫的血清样本 85 人份 ,分析两种方法检测结果的相关性。结果 采用改进的微孔板病毒中和法 ,用不同代次 MDCK 细胞(25、30、35 代)以及在细胞培养板不同位置(边缘孔、非边缘孔)检测相同的血清样本的中和抗体滴度结果相同 ;该方法准确性和精密性良好 ,改进的微孔板病毒中和法和 HI 法测定甲型 H1N1 流感疫苗免疫后血清抗体效价结果的相关系数为 0.81 ,表明两种方法的检测结果之间呈良好的正相关性。结论 建立的微量病毒中和法可满足流感病毒中和抗体效价检测的要求 ,可用于评价疫苗的免疫效果。

关键词: 流感病毒 ;中和抗体 ;微量病毒中和法 ;血凝抑制试验

中图分类号 : R373.1 + 3 R392.33 文献标识码 : A 文章编号 : 1004-5503(2014)09-1199-04

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.000536

Development and validation of microneutralization test for determination of neutralizing antibody against influenza virus

ZHAO Hui , JIANG Zheng , LI Juan , LIU Shu-zhen , SHAO Ming , XU Kang-wei , LI Chang-gui

National Institutes for Food and Drug Control , Beijing 100050 , China ,

Corresponding author: LI Chang-gui E-mail: changguili@aliyun.com

Abstract : Objective To develop and validate a microneutralization test (MNT) for determination of neutralizing antibody against influenza virus. **Methods** Modified MNT was developed , of which the key influencing factors such as passage of MDCK cells and edge effect of various culture plates , as well as accuracy and precision , were verified. A total of 85 human serum samples immunized with influenza A H1N1 vaccine were determined by the modified MNT and hemagglutination inhibition (HI) test respectively , and the relationship between the determination results was analyzed. **Results** The determination results of serum samples by the modified MNT using various passages of MDCK cells in edge and non-edge holes were identical. The method showed high accuracy and precision. The relation coefficient of determination results by the modified MNT and by HI was 0.81 , indicating a good positive relationship. **Conclusion** The developed MNT met the need for determination of neutralizing antibody titer against influenza virus and might be used for evaluation of immune effect of vaccine.

Key words : Influenza virus; Neutralizing antibody; Microneutralization tests (MNT); Hemagglutination inhibition (HI) test

流行性感冒(简称流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病 ,其发病率为各种传染性疾病之首 ,是严重危害人类健康的重要传染病之一^[1]。据世界卫生组织报告 ,全球每年约有 15%人口因感染流感而导致上呼吸道系统感染 ,老年人以及慢性病患者是流感并发症的高危人群 ,每年由于流感导致死亡约 25 万 ~ 50 万人^[2]。接种流感病毒疫苗是预防流感最有效的手段。随着新型流感疫苗的研究的深入

以及接种疫苗人群的增加 ,检测血清抗体水平在流感流行病学研究、流感疫苗的免疫效果评价、临床诊断等方面均具有重要意义。在现有的几种流感血清抗体检测方法中 ,基于酶联免疫法的微量中和试验法与血凝抑制试验等其他方法相比 ,具有能够直接检测针对血凝素的中和抗体、快速、敏感度高、客观性强、特异性好等优点 ,可定量检测血清学抗体水平。本实验旨在建立检测流感病毒中和抗体的微孔板中和法(microneutralization test ,MNT) ,并进行验证 ,现将结果报道如下。

基金项目 : 国际科技合作交流专项(2013DFA31680) ; 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题(2012B3)。

通讯作者 : 李长贵 E-mail: changguili@aliyun.com

1 材料与方法

1.1 病毒、细菌及细胞 流感病毒 H1N1[A/New Caledonia/20/99 (H1N1)]鸡胚尿囊病毒液由北京科兴生物制品有限公司提供;MDCK 细胞由本室传代保存(用含 10%小牛血清的 DMEM 培养基培养,按 1:4 比例传代扩增);霍乱滤液购自美国 Sigma 公司。

1.2 血清样本 人血清样本均来自接种长春生物制品有限责任公司生产的甲型 H1N1 流感疫苗的志愿者。

1.3 主要试剂 牛血清白蛋白购自美国 Sigma 公司;DMEM 购自美国 GIBCO 公司;小鼠抗甲型流感病毒核蛋白单克隆抗体由北京万泰生物制品有限公司提供;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 改进的微孔板病毒中和法的建立 参照文献[3]方法进行。将待检血清或内部参考品分别用含 1%牛血清白蛋白的 DMEM 稀释 100 倍后,再对倍稀释,每个稀释度取 50 μ l 与等体积的病毒(100 TCID₅₀)混合,加入 96 孔细胞培养板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;每孔加入 1.5 \times 10⁴ 个 MDCK 细胞,同时设阴性细胞对照(细胞与病毒稀释液混合培养)和阳性细胞对照(细胞与 100 CCID₅₀ 的病毒混合培养),于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱中培养 18 ~ 20 h;细胞用 PBS 洗涤 1 次,加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的丙酮,室温固定 10 min;弃去丙酮,加入 100 μ l 小鼠抗甲型流感病毒核蛋白单克隆抗体(1:4 000 稀释),室温孵育 1 h;PBS 洗涤 4 次,每孔加入 100 μ l HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:4 000 稀释),室温孵育 1 h;PBS 洗涤 5 次,加入 100 μ l 底物显色液,显色 10 min 用 1 mol/L 硫酸终止反应后,上酶标仪读数,检测波长 450 nm,参比波长 620 nm。按下式计算细胞半数感染域值(X),判定中和反应结果。

$$X = (\text{阳性细胞对照平均 } A \text{ 值} - \text{阴性细胞对照平均 } A \text{ 值}) / 2 + \text{阴性细胞对照平均 } A \text{ 值}$$

每孔 A 值低于 X 值时,判为中和试验反应阳性,中和反应阳性血清的最高稀释度为血清的中和抗体滴度。

1.5 改进的微孔板病毒中和法的验证

1.5.1 细胞代次验证 用不同代次的 MDCK 细胞(分别为 25、30、35 代)按建立的方法对不同滴度(10、160)的血清样本进行中和抗体检测,每个样品平行检测 3 次,比较 3 次检测结果中最大值与最小值的比值,验证不同代次的细胞对该方法检测结

果的影响。

1.5.2 边缘孔效应验证 采用建立的方法对不同滴度(10、160)的血清样本分别在细胞培养板边缘孔与非边缘孔进行检测,重复检测 4 次,计算边缘孔与非边缘孔检测结果的比值,验证孔板的不同位置对该方法检测结果的影响。

1.5.3 准确性验证 取阳性血清样本 1 份,进行倍比稀释,取原倍、2、4、8、16 倍血清,采用建立的方法进行检测,每个稀释倍数重复检测 1 次,计算实际测得的中和抗体滴度与稀释后理论中和抗体滴度的比值。

1.5.4 精密性验证 取不同滴度(5、40、160)的阳性血清样本,采用建立的方法,在同一天工作日内分别重复检测 6 次,计算变异系数(CV),验证该方法的日内精密性;在 5 个工作日内重复检测 5 次,计算 CV 值,验证该方法的日间精密性。

1.6 血凝抑制(hemagglutination inhibition, HI)试验 参照文献[4]方法进行。取 0.1 ml 待检血清,预先加入 0.4 ml 霍乱滤液,37 $^{\circ}$ C 处理 16 h 后,以 1%鸡红细胞悬液吸附过夜,取上清,进行检测,血清滴度以稀释倍数的倒数表示。血清起始稀释倍数为 1:5,如为阳性,判定 HI 滴度为 5;如为阴性,按惯例判定 HI 滴度为 2.5。

1.7 改进的微孔板病毒中和法与 HI 法的相关性分析 采用改进的微孔板病毒中和法和 HI 法分别检测血清样本 85 人份,应用 SPSS 13.0 统计软件,采用 Spearman 相关性分析对检测结果进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 改进的微孔板病毒中和法的验证

2.1.1 不同代次细胞对检测结果的影响 使用第 25、30、35 代 MDCK 细胞,用建立的方法测得的不同滴度的血清样本的中和抗体滴度均为 10 或 160,结果具有很好的一致性,表明不同代次细胞对检测结果无影响。

2.1.2 孔板不同位置对检测结果的影响 两份血清使用边缘孔与非边缘孔重复检测 4 次,同一份血清在边缘孔和非边缘孔检测的抗体滴度均为 10 或 160,不同位置的抗体滴度的比值均为 1,表明孔板不同位置对检测结果无影响。

2.1.3 方法的准确性 用建立的方法实际测得各稀释倍数血清的中和抗体滴度与理论滴度之间的比值均为 1,见表 1。表明该方法准确性良好。

2.1.4 方法的精密性 用建立的方法在同一天工作日内重复检测一份阳性血清样本 6 次结果的 CV 值在 0 ~ 5% 之间 ,平均值为 1.7% ;不同工作日重复检测 5 次结果的 CV 值中 0 ~ 7.1% 之间 ,平均值为 3.9%。见表 2 和表 3。表明该方法精密性良好。

表 1 方法的准确性验证结果

Tab 1. Verification of accuracy of MNT

血清稀释倍数	理论中和抗体滴度	实测中和抗体滴度
原倍	160	160
2 倍	80	80
4 倍	40	40
8 倍	20	20
16 倍	10	10

表 2 方法的日内精密性验证结果

Tab 2. Intra-run reproducibility of MNT

血清	检测次数						几何平均数(GMT)
	1	2	3	4	5	6	
1	5	5	5	5	5	5	5
2	40	40	40	40	40	80	45
3	160	160	160	160	160	160	160

表 3 方法的日间精密性验证结果

Tab 3. Inter-run reproducibility of MNT

血清	检测次数					GMT
	1	2	3	4	5	
1	5	5	5	5	5	5
2	40	40	40	40	20	35
3	80	160	160	160	320	160

2.2 改进的微孔板病毒中和法与 HI 法的相关性 在 85 份血清样本中 ,有 72 份经改进的微孔板病毒中和法检测的中和抗体滴度大于等于 HI 法检测结果的 2 倍 ,9 份微孔板病毒中和法与 HI 法检测结果完全一致 ,4 份微孔板病毒中和法检测结果低于 HI 法 ,但相差不超过 2 倍 ;两种方法检测结果的几何平均滴度分别为 83(95% CI : 56 ~ 124)和 24(95% CI : 17 ~ 33) ,微孔板病毒中和法与 HI 法检测抗体滴度比值为 3.5 ,抗体效价结果的相关系数为 0.81 $P = 0.000$ 表明两种方法的检测结果之间呈良好的正相关性。两种方法检测结果的散点图见图 1。

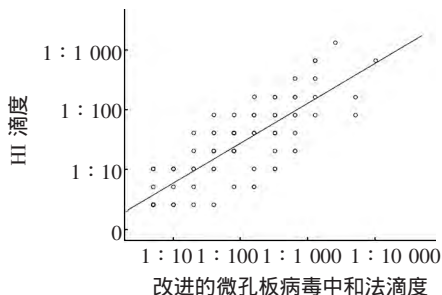


图 1 两种方法检测血清样本抗流感病毒抗体效价的相关性分析

Fig 1. Correlation between MNT and HI test for determination of antibody titers against influenza virus in serum samples

3 讨论

目前用于流感疫苗评价的血清学方法主要是 HI 法。作为评价季节性流感疫苗免疫效果的经典方法 ,HI 法的缺点是敏感度较低 ,且不能直接检测抗体对病毒的中和作用 ,微孔板中和试验较 HI 法更敏感 ,更能反映具有中和能力的抗体水平 ,且抗原无需纯化即可用于检测各种病毒亚型 ,但该方法检测周期长 ,检测结果判定不客观。改进的微孔板中和试验的基本原理是将流感病毒与系列稀释的待检血清混合后接种细胞 ,培养 18 ~ 20 h 后 ,病毒核蛋白将表达于细胞内 ,再进行 ELISA 检测。根据试验中阴性以及阳性细胞对照的平均 A 值判定样品中是否含有具有中和活性的抗体 ,中和反应阳性的血清最高稀释度即为血清的中和抗体滴度。该方法已被用于检测血清中抗流感病毒 H5 型抗体 ,其敏感性及其特异性均高于 HI 法^[5-7]。

本实验对改进的微孔板病毒中和法的关键影响因素(不同代次细胞和细胞培养板边缘效应)进行了验证 ,结果显示 ,使用不同代次 MDCK 细胞 ,用建立的方法检测同一份血清的结果具有良好的一致性 ;同一份血清在边缘孔和非边缘孔检测的中和抗体滴度差异不超过 2 倍 ,稀释不同倍数的同一份血清样本测得的中和抗体滴度与稀释后的理论抗体滴度完全一致 ,该方法检测不同抗体滴度的血清样本 ,日内及日间精密性的变异系数分别为 1.7% 和 3.9% ,表明该方法精密性良好。分别采用改进的微孔板病毒中和法和 HI 法测定甲型 H1N1 流感疫苗免疫后的人血清样本 85 份 ,几何平均滴度分别为 83 和 24 ,两种方法检测抗体滴度比值为 3.5 ,抗体效价结果的相关系数为 0.81 ,表明两种方法的检测结果之间呈良好的正相关性 ,表明改进的中和方法的敏感性优

(下转第 1206 页)

- [7] Wang WH, Yang J, Wang Q, *et al.* Determination of amino acids in tobacco by UPLC[J]. Chin J Spect Lab, 2010, 27(5): 1920-1924. (in Chinese)
王文辉, 杨俊, 王齐, 等. UPLC 测定烟叶中的氨基酸含量[J]. 光谱实验室, 2010, 27(5): 1920-1924.
- [8] Ma XL, Meng L, Batur, *et al.* Determination of free amino acids in serum and urine by precolumn derivatization HPLC with PITC and AQC [J]. Amino Acids & Biotic Resour, 2012, 34(3): 19-24. (in Chinese).
马晓丽, 孟磊, 巴吐尔, 等. 两种柱前衍生反相高效液相色谱法测定血液和尿液中游离氨基酸[J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(3): 19-24.
- [9] Hu Y, Huang ZY. Biogenic amines in fish determined by HPLC with pre-column dansylation [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2012, 12(11): 142-147. (in Chinese)
胡月, 黄志勇. 柱前衍生 HPLC 同时测定鱼中多种生物胺及其变化规律 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(11): 142-147.
- [10] 周天政, 朱梅芳. 丹磺酰氯柱前衍生-HPLC 法测定鱼粉中的组胺含量[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2012, 55(9): 76-78.
- [11] Jiang Y, Lu JH. Determination of four kinds of amino acids of compound α -keto acid tablets by HPLC [J]. China Med Herald, 2012, 9(18): 126-128, 131. (in Chinese)
蒋燕, 陆继好. HPLC 法测定复方 α 酮酸片中四种氨基酸的含量[J]. 中国医药导报, 2012, 9(18): 126-128, 131.
- [12] Huang L, Wu XM, Ji Y, *et al.* Determination of amino acids in placenta polypeptide injection by high performance liquid chromatography with pre-column AQC derivatization[J]. Chin J Biochem Pharma, 2012, 33(4): 373-376, 380. (in Chinese)
黄莉, 吴小曼, 纪宇, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定胎盘多肽注射液中的氨基酸[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(4): 373-376, 380.

收稿日期 2014-6-27 编辑 王佳凤

(上接第 1201 页)

于 HI 法, 与文献[8]报道一致。

综上所述, 采用改进的微孔板病毒中和法检测流感疫苗中和抗体具有良好的准确性和精密性, 能够更真实地反映待测样本的中和抗体水平。另外, 该方法试验时间短, 全部试验在 2 d 内即可完成, 判定结果客观, 适合测定大量血清样本, 可应用于流感疫苗临床试验, 评价疫苗的免疫原性, 尤其针对新研发的流感病毒疫苗的临床研究, 能更准确地评价新型疫苗的免疫原性, 并为疫苗的免疫剂量提供参考。

参考文献

- [1] Lamb RA, Takeda M. Death by influenza virus protein [J]. Nat Med, 2001, 7(12): 1286-1288.
- [2] WHO. Influenza, Revised March 2003[OL]. (2003-03-xx) [2014-02-06]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/> (accessed 6 February 2014).
- [3] Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, *et al.* Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(4): 937-943.
- [4] Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance [S]. Geneva Switzerland: WHO, 1982.
- [5] Bernstein DI, Edwards KM, Dekker CL, *et al.* Effects of adjuvants on the safety and immunogenicity of an avian influenza H5N1 vaccine in adults [J]. J Infect Dis, 2008, 197(5): 667-675.
- [6] Ehrlich HJ, Müller M, Oh HM, *et al.* A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture [J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2573-2584.
- [7] Nolan T, Richmond PC, Formica NT, *et al.* Safety and immunogenicity of a prototype adjuvanted inactivated split-virus influenza A(H5N1) vaccine in infants and children [J]. Vaccine, 2008, 26(50): 6383-6391.
- [8] Ozawa M, Kawaoka YC. Cross talk between animal and human influenza viruses [J]. Ann Rev Animal Biosci, 2013, 1(1): 21-42.

收稿日期 2014-05-28 编辑 何巍