

# 呼肠孤病毒Ⅲ型免疫荧光检测方法的建立及初步应用

王吉, 卫礼, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国药品生物制品检定所、国家实验动物质量检测中心, 北京 100050)

**【摘要】** 目的 建立呼肠孤病毒Ⅲ型(Reo3)免疫荧光(IFA)检测方法,应用于人用动物源性生物材料及生物制品外源Reo3的检测。方法 滴定病毒TCID<sub>50</sub>,筛选Reo3敏感细胞,依据国标IFA法制备抗原片,方阵法滴定免疫荧光素最佳工作浓度。并进行特异性、敏感性和稳定性试验。结果 选取BSC-1细胞作为Reo3敏感细胞,病毒感染力滴度(TCID<sub>50</sub>)为10<sup>-5.8</sup>/mL;免疫荧光素最佳工作浓度为1:100;与小鼠鼠痘(Ect)病毒、小鼠肝炎(MHV)病毒均无交叉反应;稳定性和敏感性试验显示,不同时间IFA检测灵敏度均为1:1280;可检测到的病毒滴度最低为10<sup>-4.1</sup>/mL。结论 建立的IFA法敏感性、特异性强,稳定性好,可用于人用动物源性生物材料及生物制品Reo3的检测。

**【关键词】** 呼肠孤病毒Ⅲ型;人用动物源性生物材料及生物制品;免疫荧光试验

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.08.001

## Establishment and Initial Application of an Immunofluorescence Assay in Detecting Mammalian Orthoreovirus 3

Wang Ji, Wei Li, Yue Bing-fei, He Zheng-ming

(National Institute for the Quality Control of Pharmaceutical and Biological Products, National Center for Quality of Laboratory Animals, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** To establish an immunofluorescence assay (IFA) method of detecting the mammalian orthoreovirus 3 (Reo3) in animal-derived biological materials and biological products for human use. **Methods** Reo3-sensitive cells were screened. The virus TCID<sub>50</sub> was titrated and antigen slides were prepared according to GB IFA. The best working concentration of IgG-FITC was titrated and the specificity, sensitivity and stability were tested. **Results** BSC-1 cells were selected as Japanese encephalitis virus (JEV)-sensitive cells. The TCID<sub>50</sub> of the virus was 10<sup>-5.8</sup>·mL<sup>-1</sup>. The best working concentration of the IgG-FITC was 1:100. There was no cross-reactivity with ectromelia virus and mouse hepatitis virus. The tests of sensitivity and stability showed that the detection sensitivity was 1:1280 at different time points. The lowest detected virus titer was 10<sup>-4.1</sup>·mL<sup>-1</sup>. **Conclusions** The established IFA method is good in sensitivity, specificity and stability, and can be used in detecting the Reo3 in animal-derived biological materials and biological products for human use.

**【Key words】** Mammalian orthoreovirus 3; Biological materials, human use; Biological products, human use; Immunofluorescence assay

[基金项目]“国家科技支撑计划”:疫苗类生物制品安全性评价技术研究(2008BAI54B01)。

[作者简介]王吉(1974-),女,助理研究员,研究方向:微生物学和免疫学。

[通讯作者]贺争鸣(1957-),男,研究员,博士,研究方向:微生物学和免疫学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

呼肠孤病毒 III 型 (Reo3) 属呼肠孤病毒科的正呼肠孤病毒属。此种病毒可感染所有哺乳动物,包括小鼠、地鼠、豚鼠、猫和犬等<sup>[1-2]</sup>。并且能在人、猴、豚鼠、地鼠、猫、狗、猪和牛的原代肾细胞以及 HeLa、KB、FL 和 L 细胞等传代细胞中增殖并引起细胞病变。Reo3 也能感染人,能引起儿童腹泻、呼吸道感染及脑膜炎等疾病<sup>[2-4]</sup>。由于上述动物和细胞存在 Reo3 的自然感染,而用上述动物原材料或细胞而生产的人用生物制品也可能存在 Reo3 的潜在污染,对人用动物原材料及动物源性生物制品的使用安全性造成潜在威胁<sup>[5]</sup>。

因此建立 Reo3 免疫荧光 (IFA) 检测方法,开展对人用动物原材料及动物源性生物制品外源 Reo3 的检测,保证生物原材料及制品的使用安全性至关重要。本文旨在建立简单、快速、特异、敏感的免疫荧光检测方法,对人用动物源性生物材料及其制品进行 Reo3 检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

Reo3 毒种、BSC-1 细胞、BHK<sub>21</sub> 细胞: 本室冻存; 免疫荧光素 (山羊抗小鼠 IgG-FITC): KPL 公司产品; SPF BALB/c 小鼠, 中国药品生物制品检定所实验动物资源中心生产 (许可证号: SCXK (京) 2009-0017); 小鼠抗 Reo3 血清及小鼠阴性血清: 本室制备; 乙型脑炎减毒活疫苗: 本所疫苗一室提供。

### 1.2 主要仪器

荧光显微镜: Olympus IX; 37℃ 水浴箱: 上海森信实验仪器有限公司 DK-4500B 型; 37℃ 培养箱: WGP-600; 多孔荧光片: Thermo 公司产品。

### 1.3 方法

1.3.1 敏感细胞的筛选和病毒感染力滴度 (TCID<sub>50</sub>) 测定: 选择 BHK<sub>21</sub> 细胞和 BSC-1 细胞分别接种 Reo3 毒种, 每天观察细胞病变 (CPE)。待细胞 50% ~ 80% 发生圆缩病变后, 收冻。分别将第 3 代 BHK<sub>21</sub> 细胞毒和 BSC-1 细胞毒以 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-11</sup> 作系列倍比稀释, 依次加入培养有 BHK<sub>21</sub> 细胞和 BSC-1 细胞的 96 孔细胞培养板 (costor) (1 ~ 11 列), 每个稀释度接种 1 列 (8 孔), 第 12 列不加病毒, 作为细胞对照。置 37℃ 培养观察 10 d, 记录结果<sup>[6]</sup>。

1.3.2 Reo3 阳性血清与阴性血清的制备:

1.3.2.1 免疫抗原的制备与纯化: 收获 Reo3 细胞毒于 4℃, 10 000 r/min 离心 1 h, 取上清液于 4℃,

40 000 r/min 离心 3 h, 收集沉淀于适量 PBS 中。再经 20% 蔗糖离心后, 用紫外分光光度法测定抗原蛋白含量。然后用 PBS 稀释至 1 mg/mL, 分装后冻存于 -70℃ 备用。

1.3.2.2 免疫接种方法及程序: (1) 第一次免疫: 取 0.3 mL 纯化 Reo3 抗原与 0.9 mL 弗氏完全佐剂混匀, 腹腔注射 6 只 SPF KM 小鼠, 每只注射 0.2 mL。(2) 第二次免疫: 在第一次免疫后第 14 天, 取 0.3 mL 纯化 Reo3 抗原与 0.9 mL 弗氏完全佐剂混匀, 腹腔注射每只小鼠 0.2 mL, 同时每只腹腔注射 0.5 mL 液体石蜡。(3) 第三次免疫: 在第一次免疫后第 21 天, 取 0.3 mL 纯化后 Reo3 抗原, 加入 0.9 mL 弗氏完全佐剂中, 混匀后腹腔注射每只小鼠 0.2 mL。

1.3.2.3 抗体的检测: 第一次免疫后第 35 天开始收集腹水, 每次收集后 2 000 r/min 离心 10 min, 上清液 56℃ 灭活 30 min, 冻存于 -70℃ 备用, 收集的腹水用本室 ELISA 法测其效价, 留取 A<sub>490</sub> > 1.0 的腹水混合后分装至 1.5 mL 离心管中冻存于 -70℃ 作为阳性对照备用。

1.3.2.4 阴性对照血清制备: 分离的 SPF 小鼠血清, 经 Reo3 ELISA 检测为阴性的样品, 56℃ 灭活 30 min, 用本室 ELISA 法测其效价 < 0.1, 分装至 1.5 mL 离心管中冻存于 -70℃ 作为阴性对照备用。

1.3.3 抗原片的滴定: 接种 Reo3 的敏感细胞, 病变达 70% ~ 80%, 滴片, 同时设正常细胞对照。冷丙酮固定, 置 -20℃ 冻存备用<sup>[7]</sup>。

1.3.4 操作和判断标准的确定: 依据《中华人民共和国药典》2010 版三部和国标进行实验和结果判定。在阴、阳对照成立的情况下, 待检血清与正常细胞反应无荧光, 与感染细胞反应有荧光判为阳性<sup>[7-8]</sup>。

1.3.5 免疫荧光素最佳工作浓度的确定: 小鼠 Reo3 阳性血清及阴性血清分别以 1:10 稀释<sup>[7]</sup>, 羊抗小鼠 IgG-FITC 以 1:50 ~ 1:3200 进行系列倍比稀释, 滴定荧光抗体最佳工作浓度。以出现 “+++” 的荧光抗体最大稀释比例为其最佳工作浓度。

1.3.6 敏感性试验: 将小鼠阳性血清从 1:10 ~ 1:5120 进行系列倍比稀释进行检测, 以出现 “++” 的最大稀释比例为其检测灵敏度; 将 Reo3 细胞毒以 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-11</sup> 作系列倍比稀释, 分别接种 BSC-1 细胞 48 h 后分别滴片, 与阳性血清进行免疫荧光反应, 以检测到出现 “++” 的病毒感染滴度来确定检

测方法的敏感性。

1.3.7 特异性试验:用建立的 IFA 法分别检测小鼠鼠痘(Ect)病毒和小鼠肝炎病毒(MHV)阳性血清,同时设标准阴、阳对照。用小鼠 Reo3 阳性血清和阴性血清与小鼠鼠痘(Ect)病毒感染 BHK<sub>21</sub> 细胞片进行交叉免疫荧光试验;同时与正常 BSC-1 细胞和 Reo3 感染 BSC-1 细胞进行玻片免疫荧光试验。

1.3.8 稳定性试验:将 3 个不同批次抗原片同时对小鼠阳性血清从 1:10 ~ 1:5120 进行检测;同 1 批次抗原片于 -20℃ 保存 1 个月、3 个月和 6 个月 3 个不同时间,分别对小鼠阳性血清从 1:10 ~ 1:5120 进行检测,观察其检测结果是否一致。

1.3.9 初步应用:

1.3.9.1 动物抗体的检测:用建立的 IFA 方法对 2008 年~2010 年国内 7 个厂家送检 60 份小鼠血清进行抗体检测,并记录结果。

1.3.9.2 Reo3 抗原的检测:利用细胞试验和 IFA 法对人用动物源性材料及生物制品进行检测。

(1)以国内 3 个公司生产的 9 批次乙脑减毒活疫苗为样品进行检测。每批次疫苗接种 BSC-1 细胞 2 瓶。同时设细胞对照 2 瓶,Reo3 毒种 2 瓶。37℃ 吸附 1.5 h,弃掉吸附的检品液体,加入细胞维持液,每 d 观察细胞形态,每 3~4 d 换液一次,并记录结果。

(2)9 批次疫苗接种 BSC-1 细胞,盲传 3 代。每代细胞进行滴片,分别与 1:10 的阴、阳血清进行免疫荧光反应。同时用已知病毒抗原片作阳性和阴性对照。

(3)选择 2010 年国内 6 个不同厂家送检的鼠源性单克隆抗体细胞株 10 批次,分别接种 BSC-1 细胞,同时设细胞对照 2 瓶,Reo3 毒种 2 瓶。每天观察细胞病变情况,并记录结果。盲传 2 代后的细胞滴片,分别与小鼠阴、阳血清进行免疫荧光反应<sup>[8]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 敏感细胞的筛选

BHK<sub>21</sub> 细胞和 BSC-1 细胞接种 Reo3 48 h 后,均

有 70%~90% 细胞出现 CPE,病毒感染力滴度分别为 10<sup>-5.3</sup>/mL 和 10<sup>-5.8</sup>/mL。选择 BSC-1 细胞为 Reo3 培养细胞。

### 2.2 Reo3 阳性血清与阴性血清的制备

制备免疫用抗原测蛋白浓度为 5.1 mg/mL。制备阳性对照(免疫血清及腹水 A > 1.0)共 15.0 mL。制备阴性对照血清 12.7 mL。

### 2.3 羊抗小鼠 IgG-FITC 最佳工作浓度的确定(表 1)。

滴定结果显示当 FITC 为 1:100 时正常细胞孔与阴、阳对照血清反应均无绿色荧光,也未观察到荧光背景干扰;Reo3 感染细胞孔与阴性对照血清反应无绿色荧光,与阳性对照血清反应产生强绿色荧光(图 1、2 见封二)。

### 2.4 敏感性试验

抗体检测最大稀释比例为 1:1280;检测病毒滴度最低为 10<sup>-4.7</sup>/mL。

### 2.5 特异性试验

用已建立 IFA 法检测小鼠鼠痘(Ect)病毒、和小鼠肝炎(MHV)病毒阳性血清,结果均为阴性。Reo3 阴性对照和阳性对照与小鼠鼠痘(Ect)病毒感染的 BHK<sub>21</sub> 细胞均无交叉免疫荧光反应。

### 2.6 稳定性试验

3 个不同批次抗原片同时对小鼠阴、阳性血清从 1:10 ~ 1:5120 进行检测,同 1 批次抗原片于 -20℃ 保存 1 个月、3 个月、6 个月三个不同时间对小鼠阳性血清从 1:10 ~ 1:5120 进行检测,检测结果均一致,检测灵敏度均为 1:1280。

### 2.7 应用

2.7.1 动物抗体的检测:IFA 法检测 60 份小鼠血清,有 4 份抗体阳性,56 份抗体阴性。

2.7.2 细胞接种和免疫荧光试验:(1)细胞接种试验显示 2 瓶 BSC-1 细胞对照连续观察无 CPE 产生(图 3),Reo3 毒种使 BSC-1 细胞发生明显 CPE(图 4);9 批次样品接种的 3 代 BSC-1 细胞均未发生 CPE,检测结果均为阴性(图 3、4 见封二)。(2)在

表 1 荧光素工作浓度滴定结果  
Tab.1 Titration results of the IgG-FITC

FITC 浓度 FITC concentration	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
正常 BSC-1 细胞 Normal BSC-1	- / +	-	-	-	-	-
Reo3 感染 BSC-1 细胞 Reo3-infected BSC-1 cells	+ + + +	+ + + +	+ + +	+ +	+	-

注: - / + 表示荧光背景干扰

阴阳对照成立的情况下,9 批次样品接种 3 代 BSC-1 细胞涂片与小鼠阴性血清及阳性血清均无绿色荧光反应,检测结果均为阴性。(3) 细胞接种试验显示在正常细胞对照成立的情况下,10 批次鼠源性单克隆抗体细胞株接种 BSC-1 细胞,均无 CPE 产生;免疫荧光试验显示,在阴、阳对照成立的情况下,10 批次单克隆抗体细胞株接种 BSC-1 细胞涂片与小鼠阴性血清及阳性血清均无绿色荧光反应,结果均为阴性。

### 3 讨论

敏感性试验显示抗体检测最大稀释比例为 1:1280;检测病毒滴度最低为  $10^{-4.7}$  /mL;特异性试验显示与小鼠易感性的其他病毒无交叉反应;稳定性试验显示不同批间和批内重复性试验检测灵敏度一致,均为 1:1280。说明本试验建立 IFA 法敏感性、稳定性好,特异性强。

本实验 BSC-1 细胞感染 Reo3 后,细胞内颗粒增多、细胞肿大、脱落、折光度增加,与 Reo3 的致细胞病变效应一致(图 4),且 Reo3 阳性血清的检测结果为细胞内出现强绿色荧光反应,为 IFA 检测中抗原抗体相结合的阳性表现(图 2);Reo3 阴性血清的 IFA 检测结果为红色细胞,未见绿色荧光,为典型的 IFA 检测阴性表现(图 1);说明所建立的 Reo3 的 IFA 法效果较好<sup>[10]</sup>。

本试验同时用本室建立的 ELISA 法对上述 IFA 检测的 60 份小鼠血清进行 Reo3 抗体检测。结果显示 IFA 法检测抗体阳性的 4 份血清用 ELISA 法检测,结果均为阳性;IFA 法检测抗体阴性的 56 份血清用 ELISA 法检测,结果均为阴性,2 种方法检测符合率为 100%。

用细胞接种和免疫荧光试验相结合检测 9 批次乙脑减毒活疫苗,3 代 BSC-1 细胞均未发生 CPE,3 代细胞滴片分别与 Reo3 阴、阳对照血进行免疫荧光反应,均为阴性。说明 9 批次疫苗均未被 Reo3 活毒感染,保证了疫苗使用的安全性。

同时用建立的 IFA 法检测了 2010 年国内 6 个厂家送检的鼠源性单抗细胞株 10 批次,结果显示均为阴性。与本室做的动物安全试验、动物抗体产生试验、鸡胚接种和血凝试验检测结果一致,也说明

了检测结果的准确性和可靠性。

本试验通过筛选,确定了 Reo3 敏感细胞,并滴了抗原片,为以后建立如大鼠、地鼠、等其他动物 Reo3 IFA 检测方法的建立奠定了基础。

本试验建立 IFA 法具有操作简便、快速、敏感、特异等特点<sup>[11]</sup>,利用细胞接种和免疫荧光相结合的检测方法具有稳定性好、检测结果可靠等特点,可应用于动物源性生物材料及生物制品外源 Reo3 的检测。

### 参考文献:

- [1] 侯丽波,佟巍,谢军芳,等. 小鼠呼肠孤病毒 III 型标准化血清制备及 ELISA 检测方法的建立. 中国比较医学杂志 [J]. 2010, 20(8): 60-64.
- [2] 赵亚力,孙衍庆,周捷,等. 外源 3 型呼肠孤病毒污染原地鼠肾细胞的光镜及电镜诊断 [J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(1): 33-35.
- [3] Roner MR, Steele BG. Features of the mammalian orthoreovirus 3 dearing II single-stranded RNA that direct packaging and serotype restriction. J Gen Virol 2007, 88: 3401-3412.
- [4] Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, et al. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. J Infect Dis. 2004, 189(9): 1664-7165.
- [5] 王吉,卫礼,巩薇,等. 乙型脑炎病毒 (JEV) 单克隆抗体的制备及初步应用 [J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23(3): 1-4.
- [6] 王吉,高正琴,卫礼,等. 乙型脑炎病毒 (JEV) IFA 检测方法的建立 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(4): 1-5.
- [7] 中华人民共和国国家标准,实验动物 微生物学检测方法 [S]. 免疫荧光试验, GB/T 14926. 51-2001: 10-12.
- [8] 绍明立,马晓伟,吴滨,等. 《中华人民共和国药典》[S]. 2010, 三部(附录 XII H), 鼠源性病毒检查法: 108-109.
- [9] 王军志,贺争鸣,岳秉飞,等. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 325-334.
- [10] 常继涛,李鑫,张亚科,等. 犊牛腹泻粪样中牛呼肠孤病毒的分离鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(9): 711-715.
- [11] Wright MH, Cera LM, Sarich NA, et al. Reverse transcription-polymerase chain reaction detection and nucleic acid sequence confirmation of reovirus infection in laboratory mice with discordant serologic indirect immunofluorescence assay and enzyme-linked immunosorbent assay results. Comp Med. 2004, 54(4): 410-417.

(修回日期)2010-03-03

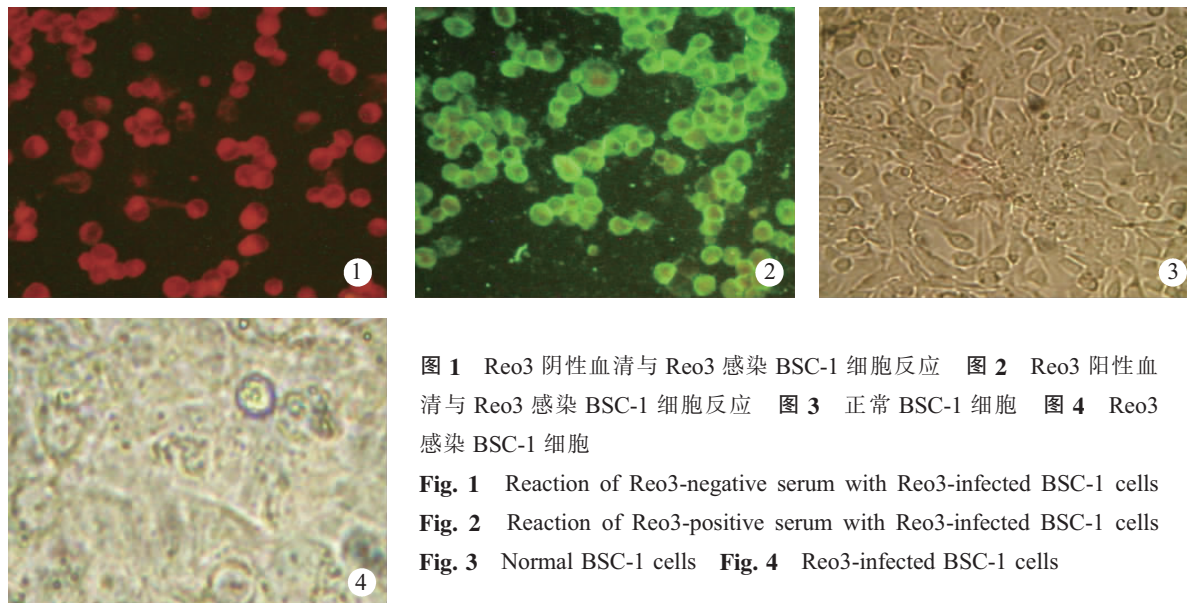
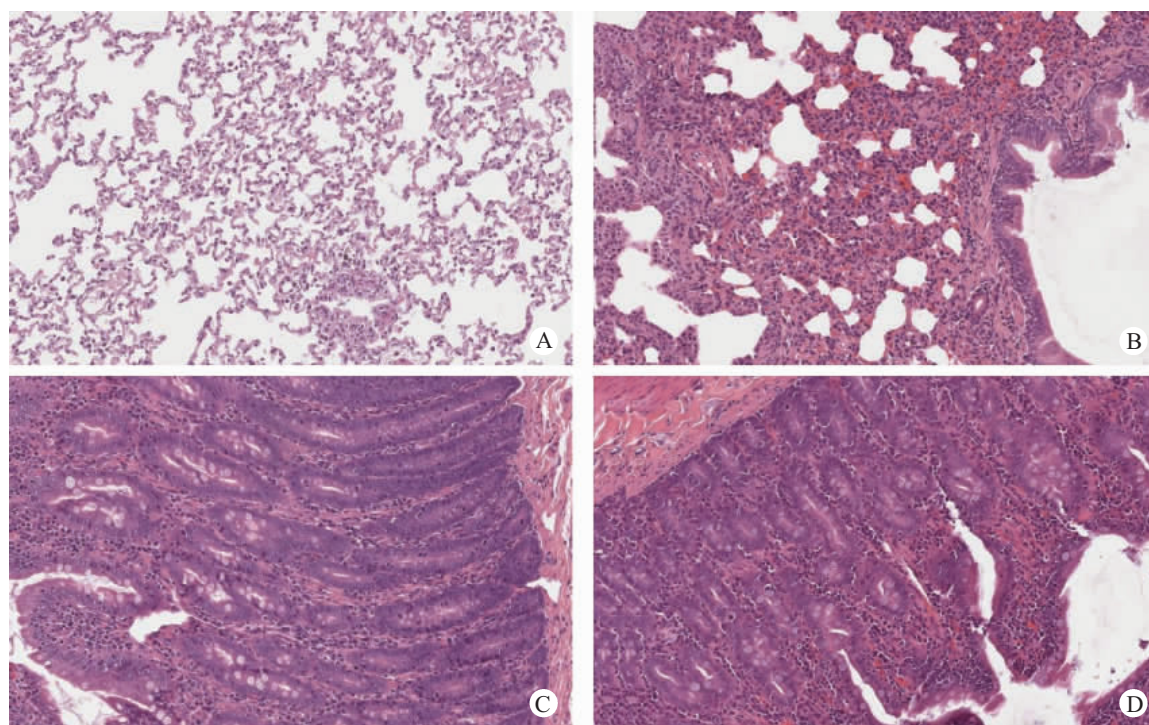


图 1 Reo3 阴性血清与 Reo3 感染 BSC-1 细胞反应 图 2 Reo3 阳性血清与 Reo3 感染 BSC-1 细胞反应 图 3 正常 BSC-1 细胞 图 4 Reo3 感染 BSC-1 细胞

Fig. 1 Reaction of Reo3-negative serum with Reo3-infected BSC-1 cells

Fig. 2 Reaction of Reo3-positive serum with Reo3-infected BSC-1 cells

Fig. 3 Normal BSC-1 cells Fig. 4 Reo3-infected BSC-1 cells



对照组动物的肺(A)、小肠(C)及感染组动物的肺脏呈局灶性间质性肺炎改变,局部肺间隔毛细血管扩张充血,炎细胞浸润(B)。A、B、C、D;(HE)。

图 4 感染 H3N2 雪貂的肺及小肠的组织病理学改变

No abnormality is seen in the lung (A) and small intestine (C) of the control ferrets. Focal interstitial pneumonia can be seen in the lung of infected ferrets, showing congestion of capillaries and infiltration of leukocytes in alveolar walls (B). No abnormality is seen in the small intestine in the infected ferrets (D). (HE staining)

Fig. 4 Histological appearance of the lung and small intestine in the ferrets.