

*Originalni članci/
Original articles*

VALIDACIJA BRZOG TESTA INHIBICIJE
FLUORESCENTNIH FOKUSA NA
ANTIRABIČNA ANTITELA

Correspondence to:

Dr Srđan Stankov
Pasterov zavod Novi Sad
Hajduk Veljkova 1
21000 Novi Sad
Srbija
Tel/Fax +381-21-420528
E-mail: stankov.paster@ptt.rs

VALIDATION OF THE RAPID FLUORESCENT
FOCUS INHIBITION TEST FOR RABIES
ANTIBODIES

Srđan Stankov, Dragana Vujin, Verica Simin,
Ljiljana Lazarević-Ivanc, Gordana Stojadinović i
Nenad Vranješ

Pasterov zavod Novi Sad

Ključne reči

antirabična antitela, RFFIT, validacija,
mikroplоче

Key words

rabies antibodies, RFFIT, validation,
microplates

Apstrakt

Modifikacija brzog testa inhibicije fluorescentnih fokusa (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) za određivanje neutrališućih antitela virusa besnila na mikropločama je standardizovana i validirana. U svrhu testiranja seruma pacijenata vakcinisanih protiv besnila, ovaj test je pokazao zadovoljavajuću tačnost, 100%-tnu specifičnost, varijabilnost unutar testa od 14%, varijabilnost između testova od 21% i linearnost u opsegu do oko 60 IU/mL. Osim toga, dobijeni rezultati su relevantni sa stanovišta adekvatne profilakse besnila.

UVOD

Prve in vitro tehnike za određivanje neutrališućih antitela na virus besnila (Rabies Virus-Neutralizing Antibodies - RVNA) razvijene su adaptacijom soja test virusa (Challenge Virus Standard - CVS) od virusa besnila na kulturi ćelija (1). Prvi test brze inhibicije fluorescentnih fokusa na besnilo za RVNA u ukupnom trajanju od najmanje četiri dana razvijen je od strane King-a i saradnika (2). Ovaj test je rađen na primokulturi ćelija pilećeg embriona. Kontinuirana ćelijska linija od bubrega beba hrčkova (Baby Hamster Kidney - BHK) je za istu svrhu uvedena 1968. godine od strane Lennette-a i Emmons-a (3). Nedugo zatim, test brze inhibicije fluorescentnih fokusa (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test - RFFIT) koji je trajao oko 24 sata uspešno je razvijen 1973. godine (4). U testu se koriste lab-tek TC komore kao fizički supstrat za BHK ćelijsku kulturu, na kojoj odlično raste CVS -11 soj test virusa besnila. Ovakva tehnika je i dalje bila komplikovana i skupa za rutinsku praksu, te je odmah najavljen pokušaj da se test prilagodi za rad na mikrotitar pločama. Međutim, do toga nije došlo sve do 1979 kada je izvođenje RFFIT-a na mikrotitar pločama prvi put objavljeno (5). U međuvremenu, RFFIT je uspešno korišćen i za otkrivanje antitela na virus limfocitarnog horiomeningitisa (6), antitela na virus denge (7), kao i antitela na

virus krpeljnog encefalitisa (8). Međutim, osim nedavno objavljene validacije RFFIT-a za određivanje potencije humanog antirabičnog imunoglobulina (9) nema drugih publikovanih postupaka validacije ovog testa. Zato je detaljnije ispitivanje karakteristika testa preduzeto na uzorcima seruma osoba vakcinisanih protiv besnila. Kao rezultat ovog ispitivanja, za RFFIT je potvrđena tačnost i specifičnost i određeni su granica detekcije, preciznost (unutartestovna i međutestovna) i linearnost. Na kraju, njegova pogodnost za profilaksu besnila je procenjena uzimajući u obzir sve posmatrane karakteristike, a posebno njegovu sposobnost da pouzdano utvrđuje zadovoljavajući nivo antitela od 0,5 IU/mL (internacionalnih jedinica po mililitru – International Units per milliliter).

MATERIJAL I METODE

2.1. Uzorci

U cilju ispitivanja svih važnih osobina testa u skladu sa nedavno iznetim kriterijumima za testove u kliničkoj virusologiji (10) ispitano je ukupno 55 ljudskih seruma. Od ovih, 26 seruma je prethodno bilo uzeto za rutinske laboratorijske analize za određivanje visine titra RVNA, od preventivno ili postekspoziciono vakcinisanih osoba (pozitivni ili slabo pozitivni serumi). Svih 26 uzoraka su podeljeni u 4 grupe.

Grupu I (6 seruma, N = 6) sačinjavali su slabo pozitivni serumi sa neutrališućom aktivnosti iznad granice detekcije, ali manjom od zadovoljavajućeg nivoa od 0,5 IU/mL; Grupa II (N = 7) formirana je od seruma sa aktivnostima u rasponu od 0,5 IU/mL do 2,5 IU/mL; Grupu III (N = 7) činili su serumi u rasponu od 2,5 IU/mL do 12,5 IU/mL. Konačno, Grupa IV (N = 6) sastojala se od seruma od 12,5 IU/mL do 62,5 IU/mL. Ova klasifikacija pozitivnih seruma formirana je na osnovu preliminarnog testiranja i obuhvata preko 95% vrednosti rezultata koji se dobijaju rutinskim testiranjem na RVNA. Za ispitivanje specifičnosti testa, korišćeno je 29 ljudskih seruma za laboratorijske analize koji ranije nisu bili povezani sa antirabičnom profilaksom (negativni ljudski serumi). Pored toga, korišćeni su i pseći serumi (negativni životinjski serumi – ukupno 21), koji nisu imali RVNA u odgovarajućem testu koji se primenjuje za određivanje titra antitela u životinjskim serumima - fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test ⁽¹¹⁾.

2.2. Tačnost

Internacionalni SZO i OIE referentni standard serumi razblaženi su prethodno do 0,5 IU/ mL pomoću PBS-a sa dodatkom 1% goveđeg serumskog albumina (Sigma) i čuvani u pojedinačnim dozama, dovoljnim za jedan test, na -80C. Referentni standardni serumi su uzeti kao uzorci, i testirani u triplikatu u jednom testu i u još dva ponovljena testa, tako da su dobijena po 3 rezultata za intra test i inter test varijaciju. Za svaku od ovih grupa rezultata određeno je da li aritmetička srednja vrednost rezultata odstupa od teoretske vrednosti više od polovine odgovarajućeg 95%-tnog intervala poverenja.

2.3. Specifičnost

Gore navedeni negativni uzorci (50 ukupno) su testirani jednom za proveru specifičnosti testa.

2.4. Granica detekcije

U svakom testu sa titracijom referentnog standardnog seruma određena je granična vrednost detekcije u IU/mL uzimajući u obzir ED50 referentnog standardnog seruma i teorijsku vrednost 0,35 kao ED50 negativnog seruma.

2.5. Određivanje preciznosti rezultata unutar istog testa i između ponovljenih testova

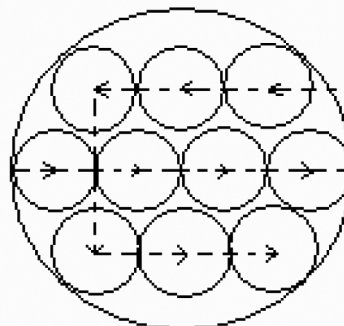
Slabo pozitivni i pozitivni serumi su testirani jednom u triplikatu i u još dva uzastopna testa, a dobijeni rezultati su korišćeni za određivanje unutartestovnu i međutestovnu preciznost. Srednja vrednost, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) izračunati su za svaki uzorak. Zatim je određen prosečni koeficijent varijacije između grupa I- IV i ukupni prosečni koeficijent varijacije unutar istog testa i između rezultata u različitim testovima. Koeficijenti varijacije unutar grupa su podvrgnuti Grubbs-ovom testu za isključenje eventualnih rezultata koji znatno odstupaju od normalnih varijacija unutar homogene grupe, a razlike CV-a za različite grupe su testirane u F testu. Kao dodatni pokazatelj preciznosti unutar testa, sume pozitivnih fluorescentnih polja su izračunate za svaku od dve kolone za pojedinačne uzorke, a razlike ovih suma i distribucija frekvencija razlika predstavljeni su Histogramom 1.

2.6. Linearnost

Ispitivanje linearnosti rađeno je na uzorku HRIG-a čija je potencija je prethodno bila određena na 175 IU/mL. Od njega je dalje pripremljeno osam direktnih razređenja tako da sadrže 0,20; 0,45; 1,0; 2,2; 5,0; 11,2; 25,0 i 55,9 IU/mL , koristeći negativan serum kao rastvarač. Ovi uzorci su bili testirani u tri uzastopna testa. Rezultati za svaki uzorak analizirani su uz log-log transformaciju. Određena je linearna regresiona funkcija zajedno sa granicama poverenja za nagib prave i odsečak ordinate kao i koeficijent korelacije r.

2.7. Materijali, oprema i izvođenje testa

Mikrotitar ploče sa 8 x 12 bunara sa površinom dna bunara od 0,35 cm² korišćene su za rast ćelijske kulture mišjih neuroblastoma ćelija (MNA). Kultura MNA dobijena je od Evropske banke animalnih ćelijskih kultura (European Collection of Animal Cell Cultures - ECACC), Porton Down, Velika Britanija, ECACC broj: 89121404. Soj virusa besnila za testiranje CVS-11 je dobijen od dr L. Šnajdera iz Saveznog instituta za virusne bolesti životinja, Tbingen, Nemačka; SZO standardni serum (2. Međunarodni standard za antirabični imunoglobulin) je nabavljen iz Nacionalnog instituta za biološke standarde i kontrolu, Potters Bar, Velika Britanija, a OIE standardni serum (OIE antirabični referentni pseći serum) je dobijen od francuske Agencije za bezbednost prehrambenih proizvoda (AFSSA) Nancy, Francuska. Oba standardna seruma su prethodno razređena sa PBS-om uz dodatak 1% goveđeg serumskog albumina do 0,5 IU/ml, razlivena u male porcije i čuvana na -80 oC. Kao podlogu za kulturu i rutinsko održavanje MNA ćelija kao i za postavku RFFIT-a korišćena je GMEM (Sigma-Aldrich) uz dodatak glutamina (584 mg / L) i gentamicina (50 mg / L.), 5% triptozo fosfata (TPB) (Difco) i 10% telećeg seruma (Veterinarski zavod Subotica). Priprema petostrukih razređenja, dodavanje podloge i konstantne doze test virusa, kao i ćelijske suspenzije na mikrotitar ploču obavljani su 12-kanalnom mikropipetom 20-300 µl Research pro (Eppendorf). Testovi su rađeni u Aura-Mini sigurnosnoj komori (Ehret). Ćelije sa smešama seruma i virusa inkubirane su u ugljen-dioksidnom inkubatoru, model 3241CO₂ (Napco) u 5% CO₂ i na temperaturi od 36°C. Posle intervala od 21 do 23 sata ploče su fiksirane acetonom i bojene



Slika 1 Položaj, pravac i redosled pregleda vidnih polja na dnu bunara mikrotitar ploče pri očitavanju RFFIT-a.

monoklonskim antirabijes konjugatom sa FITC fluorescentnom bojom (Fujirebio). Očitavanje mikrotitar ploča je vršeno na Opton RA34 epifluorescentnom mikroskopu. Prečnik mikroskopskog polja na uvećanju 100 X je prvo

Tabela 1 Rezultati za po 3 replikata uzoraka SZO i OIE referentnih seruma u istom testu.

Uzorak	Rezultat (IU/ml)			X	SD*	95% granice poverenja**
	Replik 1	Replik 2	Replik 3			
SZO	0.5546	0.4722	0.5117	0.5128	0.0412	0.4559 - 0.5697
OIE	0.4357	0.5117	0.5117	0.4863	0.0439	0.4424 - 0.5302

* standardna devijacija

**Aritmetička srednja vrednost $(X) \pm 1.96 SD/(N-1)^{1/2}$, N=3

Tabela 2 Rezultati za po 3 uzorka SZO i OIE referentnih seruma u 3 sukcesivna testa.

Uzorak	Rezultat (IU/ml)			X	SD*	95% granice poverenja**
	Test 1	Test 2	Test 3			
SZO	0.5546	0.5000	0.5546	0.5364	0.0315	0.4927 - 0.5801
OIE	0.4357	0.5419	0.5546	0.5107	0.0653	0.4200 - 0.6014

* standardna devijacija

**Aritmetička srednja vrednost $(X) \pm 1.96 SD/(N-1)^{1/2}$, N=3

Tabela 3 Unutartestovna preciznost za 26 uzoraka klasifikovanih u Grupe I – IV.

Grupa	Oznaka uzorka	Rezultati u IU/ml			X	SD*	CV (%)**	Srednji CV (%)	SD*	Ukupni CV (%)
		Replik 1	Replik 2	Replik 3						
I	550	0.1495	0.1904	0.1495	0.1631	0.0236	14.5	12.5	5.8	13.7
	545	0.2424	0.2847	0.2236	0.2502	0.0313	12.5			
	547	0.3344	0.2847	0.3624	0.3271	0.0393	12.0			
	546	0.5419	0.5000	0.5419	0.5279	0.0242	4.6			
	549	0.1621	0.1904	0.1621	0.1715	0.0163	9.5			
	505	0.4614	0.3344	0.3085	0.3681	0.0818	22.2			
II	592	2.1783	1.8545	1.7111	1.9146	0.2393	12.5	13,8	6.7	
	587	0.9742	0.8293	0.8293	0.8776	0.0837	9.5			
	534	1.5788	2.1783	1.7111	1.8227	0.3149	17.3			
	460	0.8988	0.8293	0.6011	0.7764	0.1557	20.0			
	457	1.7111	2.0099	1.2402	1.6537	0.3880	23.5			
	508	05546	05546	0.6515	0.5869	0.0559	9.5			
III	537	1.9655	1.8135	1.9655	1.9148	0.0878	4.6	10.3	8.7	
	601	12.5110	12.5110	9.0677	11.3632	1.9880	17.5			
	600	11.5437	12.5110	13.5594	12.5380	1.0081	8.0			
	599	5.5951	3.4524	5.5951	4.8809	1.2371	25.3			
	596	3.4524	3.4524	3.1854	3.3634	0.1541	4.6			
	588	3.7417	3.4524	3.7417	3.6453	0.1670	4.6			
	536	3.1854	3.1854	3.1854	3.1854	0.0000	0.0			
IV	629	4.2403	4.5956	3.6099	4.1486	0.4992	12.0	18.1	12.9	
	597	16.6540	16.6540	14.1783	15.8288	1.4293	9.0			
	533	18.0496	26.9905	19.5622	21.5341	4.7855	22.2			
	579	37.2396	40.3602	43.7423	40.4474	3.2522	8.0			
	444	15.3664	24.9036	26.9905	22.4202	6.1972	27.6			
	559	12.0705	13.0820	12.0705	12.4077	0.5840	4.7			
624	59.0207	50.2467	26.3949	45.2208	16.8836	37.3				

*standardna devijacija

** koeficijent varijacije

podešen na $\frac{1}{4}$ prečnika dna bunara na ploči. Odabirom 10 nepreklapajućih polja pregledano je ukupno 62,5% od ukupne površine dna bunara, a očitavanje je vršeno po šemi koja je prikazana na Slici 1. Tako je za svaki ispitivani uzorak pregledano ukupno 20 polja po razređenju (30 polja za standardni serum i CVS). Za razređenja seruma pozitivna polja su bila ona bez fluorescentnih fokusa, a za kontrolu titracije CVS-a polja sa najmanje jednim fokusom. Na osnovu ovako određenih brojeva pozitivnih polja po svakom razređenju, vrednosti ED50 računane su po jednačini Spearman – Kärbera ⁽¹²⁾, a zatim konvertovane u konačne rezultate u IU/mL ⁽¹³⁾.

2.8. FAVN test

FAVN test za animalne serume urađen je kao što je opisano od strane Cliquet i sar. ⁽¹¹⁾.

REZULTATI

3.1. Tačnost

Rezultati za SZO i OIE standardne serume prikazani su u Tabelama 1 i 2.

Kao što je prikazano, teorijske vrednosti su bile unutar 95%-tnog intervala poverenja dobjenih srednjih vrednosti. Prema tome, nije bilo značajnih odstupanja od tačnosti rezultata.

3.2. Limit detekcije i specifičnost

Koristeći uvek isto radno razređenje CVS-a, prosečna vrednost za - logED50 SZO standardnog seruma u 7 uzastopnih analiza bila je 1,0049 (SD = 0,0354), a kretala se u rasponu od 0,9432 do 1,0636. U isto vreme se za CVS doza CCID50 (50%-tna infektivna doza) kretala od 37 do 113 CCID50 (prosečno 73 CCID50), bez vidljive inverzne korelacije sa - logED50 za standardni serum. Prosek rezultata za negativne uzorke bio je 0,1110 IU/mL (opseg 0,0967 IU /mL do 0,1276 IU /mL) sa SD = 0,0091 IU /mL, tako da je interval (srednja vrednost \pm 3SD) iznosio od 0,0873 IU /mL do 0,1383 IU /mL. Dakle granica detekcije je bila 0,1383 IU /mL. Za sve negativne serume rezultati su bili identični teorijskim rezultatima za negativne serume i niži od granice detekcije, tako da je specifičnost testa bila 100%. Svi negativni uzorci, i humani i životinjski, su dali isti rezultat, tj. nije utvrđeno postojanje specifičnih antirabičnih antitela ni u jednom uzorku.

3.3. Preciznost

3.3.1. Unutartestovna preciznost

Pojedinačni rezultati za određivanje koeficijenta varijabilnosti za svaki uzorak pojedinačno i kao i koeficijenta varijabilnosti po grupama uzoraka i konačno ukupni koeficijent varijabilnosti za unutartestovnu preciznost, dati su u Tabeli 3.

Tabela 4 Međutestovna preciznost za 26 uzoraka klasifikovanih u Grupe I – IV.

Grupa	Oznaka uzorka	Rezultati u IU/ml			X	SD*	CV (%)**	Srednji CV (%)	SD*	Ukupni CV (%)
		Test 1	Test 2	Test 3						
I	550	0.1495	0.1948	0.1994	0.1812	0.0276	15.2	27.1	18.5	20.9
	545	0.2424	0.4357	0.2342	0.3041	0.1140	37.5			
	547	0.3344	0.2913	0.1697	0.2651	0.0854	32.2			
	546	0.5419	0.5117	0.4114	0.4883	0.0683	14.0			
	549	0.1621	0.1659	0.1445	0.1575	0.0114	7.2			
	505	0.4614	0.1530	0.2342	0.2829	0.1599	56.5			
II	592	2.1783	1.5788	2.4160	2.0577	0.4314	21.0	16.1	4.7	
	587	0.9742	1.2402	1.2691	1.1612	0.1626	14.0			
	534	1.5788	1.7111	2.4160	1.9020	0.4500	23.7			
	460	0.8988	0.7652	0.6667	0.7769	0.1165	15.0			
	457	1.7111	1.4567	1.7511	1.6396	0.1597	9.7			
	508	0.5546	0.7061	0.7226	0.6611	0.0926	14.0			
	537	1.9655	2.5587	2.6185	2.3809	0.3610	15.2			
III	601	12.5110	12.5011	12.0705	12.3609	0.2515	2.0	18.0	11.0	
	600	11.5437	6.0592	10.2761	9.2930	2.8714	30.9			
	599	5.5951	4.0520	6.8720	5.5064	1.4121	25.6			
	596	3.4524	3.7387	4.2403	3.8105	0.3988	10.5			
	588	3.7417	3.1829	4.5956	3.8401	0.7115	18.5			
	536	3.1854	2.9368	2.6164	2.9129	0.2852	9.8			
	629	4.2403	3.7387	6.3407	4.7732	1.3804	28.9			
IV	597	16.6540	16.2865	18.0639	17.0015	0.9383	5.5	22.6	16.3	
	533	18.0496	42.7770	60.4003	40.4090	21.2744	52.6			
	579	37.2396	54.4573	60.4003	50.6991	12.0290	23.7			
	444	15.3664	20.7336	22.9963	19.6988	3.9188	19.9			
	559	12.0705	15.0273	14.1895	13.7624	1.5240	11.1			
	624	59.0207	40.3921	40.3921	46.6016	10.7552	23.1			

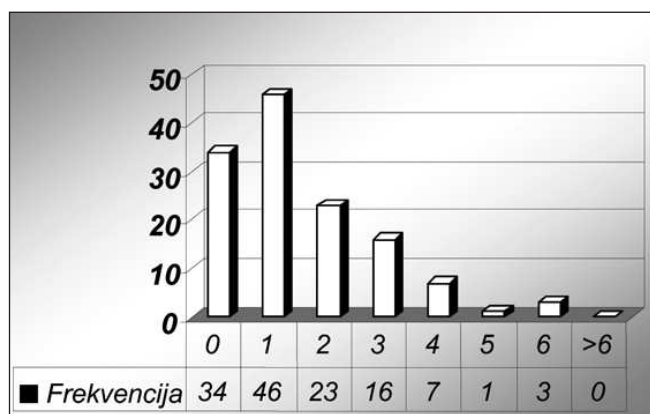
*standardna devijacija

** koeficijent varijacije

Ukupni koeficijent varijabilnosti unutar RFFIT testa bio je 14%.

U okviru iste grupe uzoraka nije utvrđen nijedan rezultat koji bi značajno odstupao preko granica varijabilnosti u Grubbs-ovom testu. Pored toga, analizom varijanse nije utvrđena heterogenost koeficijenata varijabilnosti između grupa I - IV ($F = 0.876$, $p > 0.05$).

Histogramski prikaz rezultata razlika suma pozitivnih fluorescentnih polja po kolonama za 130 ispitujućih uzoraka računajući i replikate dato je na Slici 2.



Slika 2 Distribucija razlika suma pozitivnih fluorescentnih polja po kolonama za 26 pozitivnih seruma analiziranih u studiji unutartestovne i međutestovne preciznosti u ukupno 130 analiza.

Kao što je prikazano na Slici 2, više od 95% utvrđenih razlika su manje od 6. Ova vrednost može da se koristi kao dodatni kriterijum za naknadnu proveru validnosti pojedinih rezultata testa.

U slučaju dvostrukih serijskih razređenja za standardne serume, ove razlike su manje od 4 (nije prikazano).

3.3.2. Međutestovna preciznost

Pojedinačni rezultati za određivanje međutestovne preciznosti, koeficijenti varijabilnosti po grupama i ukupan koeficijent varijabilnosti prikazani su u Tabeli 4.

Ukupni koeficijent varijabilnosti za međutestovnu preciznost kod RFFIT-a je bio 21%.

Kao ni kod studije unutartestovne preciznosti, u okviru iste grupe uzoraka nije utvrđen nijedan rezultat koji bi značajno odstupao preko granica varijabilnosti u Grubbs-ovom testu. Takođe, analizom varijanse nije utvrđena heterogenost koeficijenata varijabilnosti između grupa I - IV ($F = 0.876$, $p > 0.05$).

3.4. Linearnost

Osnovni rezultati ispitivanja linearnosti testa dati su u Tabeli 5, statistički parametri regresije dati su u Tabeli 6 a linija regresije je prikazana na Slici 3.

Logaritamski obrađeni rezultati za utvrđivanje linearnosti testa pokazuju da je test linearan u opsegu rezultata od 0,2 IU/mL do 55,9 IU/mL, gde je utvrđena snažna i značajna korelacija.

DISKUSIJA

Jedino karakteristike izvođenja testa na mikrotitar pločama su u ovom radu određene zbog svoje velike praktične prednosti u odnosu na korišćenje Lab-Tek komora za

Tabela 5 Rezultati ispitivanja linearnosti RFFIT-a.

Oznaka uzorka*	Rezultati u IU/ml			Srednja vrednost (IU/ml)	X**	Y***
	Test 1	Test 2	Test 3			
0.20	0.2185	0.2065	0.1819	0.2023	-0.6990	-0.6940
0.45	0.4886	0.5424	0.4409	0.4906	-0.3468	-0.3093
1,0	0.6220	0.6371	0.9096	0.7229	0.0000	-0.1409
2,2	2.2542	2.7119	3.0416	2.6692	0.3424	0.4264
5,0	3.3708	3.7417	4.1966	3.7697	0.6990	0.5763
11,2	10.3996	18.7083	15.2079	14.7719	1.0492	1.1694
25,0	34.7732	30.3198	36.8555	33.9828	1.3979	1.5313
55,9	71.7433	93.5415	133.5607	99.6151	1.7474	1.9983

*oznaka uzorka je teorijska vrednost nivoa RVNA u uzorku

** X = log teorijske vrednosti

*** Y = log srednje vrednosti

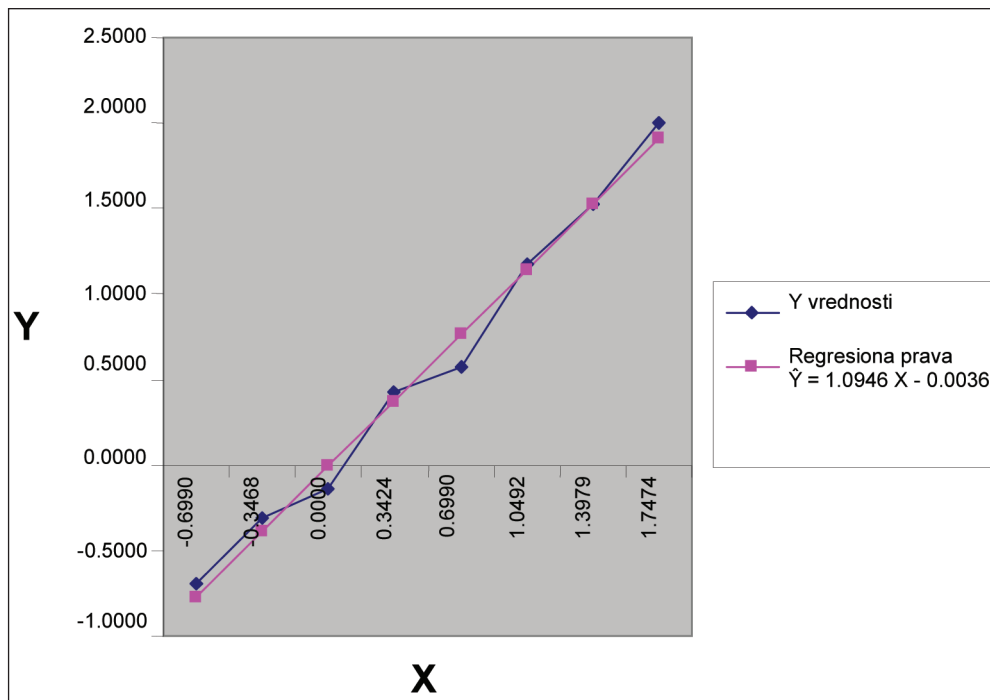
Tabela 6 Statistički parametri regresije za rezultate date u Tabeli 5.

	Koeficijenti	t vrednost	P vrednost	Donja 95% GP	Gornja 95% GP
Odsečak ordinate	-0.0036			-0.1198	0.1126
Nagib prave	1.0946			0.9731	1.2161
R	0.9939	22.0487	5.69E-07		
R kvadrat	0.9878				

GP = granica poverenja

rast ćelija u testu. Iako je u početku razvijena tehnika RFFIT-a na BHK ćelijama, korišćenje MNA ćelija za ovaj test je kasnije opisana od strane Smit J. i sar. (14), ali pri tome prednosti korišćenja MNA u odnosu na BHK ćelijsku liniju nisu eksplicitno navedene. U Laboratoriji za besnilo Pasterovog zavoda u Novom Sadu, MNA ćelije su se pokazale kao pogodnije zbog njihove veće otpornosti, koja se ogleda u dva glavna svojstva: prvo, veća otpornost na eventualne toksične efekte uzoraka, i drugo, veća otpornost ćelija u toku pranja, fiksacije i bojenja ćelijskog sloja. Ovo

testiranja pokazala je da nije bilo uzoraka sa lažno pozitivnim rezultatima, što znači da nije bilo detektovanja antirabičnih antitela preko stvarne granice detekcije. U tom smislu, RFFIT se pokazao jednako specifičan kao i FAVN test, samo što je limit detekcije za RFFIT bio oko 1,5 - 2 puta viši. Što se tiče preciznosti testa dobijeni ukupni CV za unutartestovnu varijaciju je 14%, a za međutestovnu varijaciju 21% što je ispod maksimalne varijacije za testove na živim sistemima (ćelijama i životinjama) od preko 50% (17). Poseban značaj ima predviđanje mogućih posledica varijaci-



Slika 3 Regresiona prava za rezultate studije linearnosti RFFIT-a.

je u skladu sa čvršćom adherencijom MNA ćelija na plastične ili staklene površinama u odnosu na rast BHK ćelija. Ova razlika se može lako pokazati na činjenici da se rutinsko pasažiranje BHK ćelija može obaviti sa čistim rastvorom EDTA bez tripsina, dok je tripsin neophodan za pasažiranje MNA ćelija (neobjavljeno zapažanje). Prečnik mikroskopskih polja prilagođen je tako da njegova veličina ne zavisi od optičkog sistema koji se koristi. Takođe, jednoznačno određen postupak očitavanja rezultata ne dozvoljava da različiti posmatrači dobijaju različite rezultate u istom bunaru na mikrotitar ploči (Slika 1).

Petostruka razređenja uzoraka su izabrana kao kompromis između preciznosti s jedne strane, i obuhvatnosti rezultata koji se uočavaju u rutinskoj praksi sa druge strane. Istovremeno, ograničen je broj serijskih razređenja (maksimum 5) jer svako razređenje može negativno da utiče na preciznost testa (15, 16). U isto vreme, faktor razređenja 2 za oba referentna standardna seruma je izabran jer je njihova vrednost ED50 unapred bila poznata, tako da prelazna zona sa samo četiri dvostruka razređenja može lako da se uoči. Dok Zalan i sar. (5) uspostavljaju sistem čitanja koji u odnosu na originalnu Lab-Tek tehniku testa ima isti proporciju posmatrane površine ćelijskog sloja, mi nismo smanjivali broj posmatranih polja po razređenju jer to može dovesti do niže preciznosti testa (12).

Testiranjem tačnosti RFFIT-a sa odgovarajućim referentnim materijalima smo pokazali da rezultati ne pokazuju značajna odstupanja od teorijske vrednosti. Specifičnost

testa oko minimalne zadovoljavajuće vrednosti antirabičnog imuniteta od 0,5 IU/ml. U eksperimentalnim studijama na psima i mačkama, minimalna zaštitna vrednost bila je 0,1 IU/ml za pse, a 0,2 IU/ml za mačke (18). Pod pretpostavkom da za čoveka ova vrednost nije veća od 0,2 IU/ml, tada bi oko 99% individua za rezultatima od 0,5 IU/ml imalo u stvarnosti nivo RVNA od preko 0,2 IU/ml ($X - 3 SD$), što bi se moglo smatrati zadovoljavajućim za potrebe rutinskog testiranja antirabičnog imuniteta kao i na ovim rezultatima zasnovanih mera profilakse besnila.

Takođe, potvrđeno je svojstvo linearnosti testa do oko 60 IU/ml, koji opseg obuhvata preko 95 % rezultata koji se javljaju u rutinskoj praksi.

ZAKLJUČAK

Izvršena je potpuna validacija brzog testa inhibicije fluorescentnih fokusa na kulturi ćelija za određivanje neutrališućih antitela virusa besnila. Ovaj test pokazao je zadovoljavajuća svojstva tačnosti, analitičke osetljivosti, specifičnosti, unutartestovne i međutestovne preciznosti i linearnosti. Na osnovu ovih svojstava zaključeno je da je test zadovoljavajući za rutinsko testiranje antirabičnog imuniteta pacijenata vakcinisanih protiv besnila i za sprovođenje odgovarajućih mera profilakse besnila.

Abstract

A modification of the rapid fluorescent focus inhibition test for determination of rabies virus-neutralizing antibodies performed on microplates was standardized and validated. For testing of sera from individuals vaccinated against rabies, this test showed satisfactory accuracy, 100% specificity, intra-test variability of 14%, inter-test variability of 21%, and linearity in the range up to about 60 IU/ml. Moreover, the obtained results were meaningful from the standpoint of adequate rabies prophylaxis.

REFERENCES

1. Kissling RE.. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958; 98: 223-225.
2. King DA, Kroghan DL, Shaw EL A rapid quantitative in vitro serum neutralization test for rabies antibody. *Canadian veterinary journal* 1965; 6: 187-193.
3. Lennette EH, Emmons RW.: The laboratory diagnosis of rabies: review and perspective. In: Nagano Y., Davenport F. (eds.): *Rabies. Proceedings of the Working Conference on Rabies*. Tokyo, University of Tokyo Press, 1971, pp. 77-90.
4. Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull WHO* 1973; 48: 535-541.
5. Zalan E, Wilson C, Pukitis D. A microtest for the quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. *J Biol Stand* 1979; 7: 213-220.
6. Thacker WL, Lewis VJ, Haller GJ, Baer GM. A rapid fluorescent focus-inhibition test for determining the neutralizing-antibody response to lymphocytic choriomeningitis virus. *Can J Microbiol* 1977; 23: 522-526.
7. Thacker WL, Lewis VJ, Baer GM, Sather GE. A rapid fluorescent focus-inhibition test for determining dengue neutralizing antibody and for identifying prototype dengue viruses. *Can J Microbiol* 1978; 24: 1553-1556.
8. Vene S, Haglund M, Vapalahti O, Lundkvist A. A rapid fluorescent focus inhibition test for detection of neutralizing antibodies to tickborne encephalitis virus. *J Virol Methods* 1998; 73: 71-75.
9. de Moura WC, Gallina NM, Fuches RM, Romijn PC, Leite JP. Validation of a virus neutralization potency test in BHK-21 cells for rabies immunoglobulins in a two-center study. *J Virol Methods* 2008; 154: 7-13.
10. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol* 2007; 40: 93-98.
11. Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods* 1998; 212: 79-87.
12. Aubert MFA.: Methods for the calculation of titres. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed., Geneva, WHO, 1996, pp. 445-459.
13. Wilbur LA, Aubert MFA.: The NIH test for potency. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed., Geneva, WHO, 1996, pp. 360-368.
14. Smith JS, Yager PA, Baer GM.: A rapid fluorescent focus inhibition test for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. (eds.): *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th ed., Geneva, WHO, 1996, pp. 181-192.
15. Barco JW, Gomez M, Karbowski JP, Yates I. Assay: Accuracy and Precision with Serial Dilution. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2007; 27: 1.
16. Hedges AJ. Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *Int J Food Microbiol* 2002; 76: 207-214.
17. World Health Organization.: *WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp. 15, Validation of analytical assays*. Geneva, WHO, 1997, pp. 65-73.
18. Aubert MFA. Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 1992; 11: 735-760.