

DOI:10.3969/cmba.j.issn.1673-713X.2011.06.002

两种 ELISA 试剂盒对我国单采血浆中水痘-带状疱疹病毒中和抗体滴度的测定和比较

王卓, 唐倩, 吕茂民, 马玉媛, 赵雄, 章金刚

【摘要】

目的 采用两种不同的检测抗水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 中和抗体间接 ELISA 法试剂盒, 对我国单采血浆中 VZV 特异性免疫球蛋白 (VZIG) 的效价进行测定, 比较两种试剂盒测定结果的相关性和血浆筛查的适用性, 并分析利用国内单采血浆研发生产 VZIG 的可行性。

方法 随机选取 182 份单采血浆样品, 100 倍稀释后, 使用 Virion/Serion 和 VaccZyme/Binding Site 两种商品试剂盒同时对样品进行测定, 根据评估系统公式或曲线方程计算每份样品中 VZIG 的效价; 采用 Pearson 乘积矩相关性方法对两种试剂盒的线性关系进行统计学分析。

结果 ①VZIG 高于 10 IU/ml 的血浆样品数量为 13 份 (7%, Virion) 和 16 份 (9%, VaccZyme); ②两种试剂盒检测结果之间的直线性关系系数 R^2 为 0.62 ($P < 0.0001$), 变异系数为 4%; ③Virion 与 VaccZyme 的工作范围有不同, 前者对于低效价 (0.2 ~ 0.4 IU/ml) 样品的测定具有很好的灵敏度, 而 VaccZyme 适用于高效价血浆样本 (> 150 IU/ml) 的检测。

结论 Virion 与 VaccZyme 结果具有一致性和相关性; 两种试剂盒的工作范围略有差异, VaccZyme 较 Virion 更适用于高效价 VZIG 原料血浆的检测, 可用于普通献浆员单采血浆中 VZV 中和抗体的筛查。

【关键词】 疱疹病毒 3 型, 人; 酶联免疫吸附测定; 免疫球蛋白

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2011, 6(6):405-409

水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 为双链 DNA 病毒, 属于疱疹病毒科, α 病毒属, 人类是其唯一宿主, 因此又称人疱疹病毒 3 型^[1]。VZV 感染多发生于青少年时期, 初次感染引发水痘, 症状消失后病毒可潜伏在背根神经节, 再次激活而引发带状疱疹^[2]。VZV 高危易感人群包括无水痘患病史或血清学检测病毒中和抗体为阴

性的免疫力缺陷患者、使用免疫抑制药物的患者、新生儿以及孕产妇等, 感染后可引起严重的并发症^[3-6]。此类易感患者如在暴露于 VZV 后 72 h 内及时注射水痘特异性的免疫球蛋白 (varicella-zoster immunoglobulin, VZIG) 可有效地降低患病风险, 减轻并发症的严重程度^[7-10]。

利用高通量、高特异性的筛查方法, 获得含有一定效价的 VZV 中和抗体的单采血浆是 VZIG 的制备前提和关键。为了解我国单采血浆提供者 VZV 中和抗体的水平, 本研究采用病毒糖蛋白 (glycoprotein, gp) 包被的两种商品抗 VZV IgG 间接法 ELISA 试剂盒, 对国内单采血浆中 VZV 中和抗体的效价进行测定, 通过对两种 ELISA 试剂盒检测结果的比较和分析, 探索利用中和抗体筛查技术研发制备 VZIG 的可行性, 并为自行建立相关筛查技术提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 血浆样品 血浆样品来自国内某血液制品厂浆站的单采血浆, 符合《中国药典》(2010 版, 第三部) 指定的血液制品人用原料血浆标准。随机选取 182 份, 其中男 109 份, 女 73 份, 平均年龄 41 岁, 水痘患病史或水痘疫苗接种史不详, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.1.2 gpELISA 试剂盒 抗 VZV 中和抗体 ELISA 检测试剂盒分别为 Virion (ELISA Classic VZV IgG), 购自德国 Serion 公司 (批号 SKZ.CV); VaccZyme (anti-VZV glycoprotein IgG), 购自英国 Binding Site 公司 (批号为 298478)。

作者单位: 100850 北京, 军事医学科学院野战输血研究所血液制品与代用品实验室

通讯作者: 章金刚, Email: zhangjg@bmi.nic.ac.cn

收稿日期: 2011-10-26

1.2 方法

1.2.1 Virion 对血浆样品 VZV 中和抗体的检测 待测血浆样品使用样品稀释液按照 1:100 的比例进行稀释,与质控血浆、阴性血浆依次加入到微量滴定板中,每个样品同时做 2 个复孔,37 °C 孵育 1 h 后依次加入酶标抗体、显色液、终止液,于紫外光波 405 nm 处读取吸光值。根据生产商提供的评估系统公式:浓度 = $\exp\{6.427 - \ln[3.414/(\text{样本检测平均值} \times 1.06/\text{质控血浆平均值} - 0.003) - 1]/0.947\}$, 计算各样本中 VZIG 的效价。

1.2.2 VaccZyme 对血浆样品 VZV 中和抗体的检测 单份血浆样品使用生产商提供的样品稀释液,以 1:100 的比例进行稀释,与不同浓度 (10.0、5.0、2.0、1.0 和 0.5 IU/ml) 的 VZIG 标准品、高/低质控血浆依次加入到微量滴定板中,每个样品同时做 2 个复孔,室温孵育 30 min 后依次加入抗人 IgG 抗体、酶标二抗以及显色底物等,反应终止后在 450 nm 紫外光波处读取各孔的吸光值。根据标准曲线方程计算各血浆样品中 VZIG 的浓度。

1.3 统计学处理

两种 ELISA 试剂盒测定结果之间的相关程度采用直线相关与统计学方法进行分析,以 Pearson 乘积矩相关系数定量表述线性相关的程度, $P < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 血浆样品 VZV 中和抗体的效价测定结果

两种 gpELISA 试剂盒测定的 182 份单人份血浆样品中 VZV 中和抗体的效价见表 1。VZIG 高于 10 IU/ml 分别是 13 份 (Virion) 和 16 份 (VaccZyme), 占总样本数的 7% 和 9%; 效价小于 10 IU/ml 分别为 161 份 (Virion) 和 135 份 (VaccZyme); 所测得的 VZIG 平均效价为 2.5 IU/ml (Virion, 174 份) 和 1.8 IU/ml (VaccZyme, 151 份)。其中, 样本稀释后所测得的吸光值通过标准曲线方

表 1 182 份原料血浆中 VZIG 效价的检测结果

Table 1 Titers of IgG to VZV in source plasma

VZIG 效价 VZIG titers	样本数 Sample number	
	Virion (%*)	VaccZyme (%)
> 10 IU/ml	13 (7)	16 (9)
< 10 IU/ml	161 (88)	135 (74)
N/A**	8 (5)	31 (17)

注: *占总样本数的百分比; **无效结果。

Notes: *Percentage of total samples; **Results not available.

程计算无法得到有效值,即在试剂盒检测限以外的样本数分别是 8 份 (Virion) 和 31 份 (VaccZyme), 因此未纳入结果分析。

2.2 Virion 和 VaccZyme 测定结果的相关性分析

分别以 Virion 和 VaccZyme 测定的同一样本中 VZIG 效价对数值为横、纵坐标上的取值,绘制散点图,分析两种试剂盒检测结果是否存在有统计意义的线性关系。由图 1 可知,两种 ELISA 检测试剂盒的相关系数 R^2 为 0.62, $P < 0.0001$, 说明两者检测结果成良好的线性关系,即结果具有相关性。

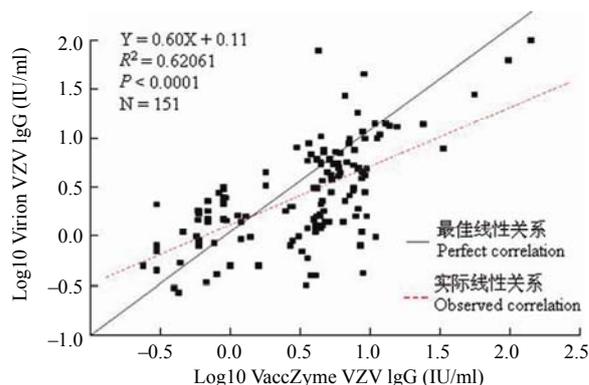


图 1 VaccZyme 和 Virion 检测血浆中 VZIG 结果的相关性分析

Figure 1 Comparison of Virion and VaccZyme assays correlation in the detection of anti-VZV IgG

2.3 Virion 和 VaccZyme 的结果差异性分析

绘制柱状图,对 Virion 和 VaccZyme 同时检测的单份血浆样品中 VZIG 的浓度进行比较,分析两者的差异性。如图 2 所示,同一份样品 Virion 高于 VaccZyme 为 90 份, Virion 低于 VaccZyme 为 61 份,两者检测结果的变异系数为 4%,说明在各自工作范围内,其对于同一份样品的检测结果具有很好的一致性。

2.4 Virion 和 VaccZyme 检测灵敏性和适用性的分析

对在 Virion 检测范围内且在 VaccZyme 检测范围之外的 22 份样品计算浓度后可知,其 VZIG 的效价均在 0.2 ~ 0.4 IU/ml 之间,即该 22 份血浆样本中的 VZIG 的效价低于 VaccZyme 的检测下限,说明对于低效价的检测, Virion 灵敏度要高于 VaccZyme; 而 VaccZyme 测定效价为 > 150 IU/ml 的样本 (n = 2), 因高于 Virion 的检测上限而无法计算,由此可知 VaccZyme 的工作上限较高,更适合高效价的样本筛选。

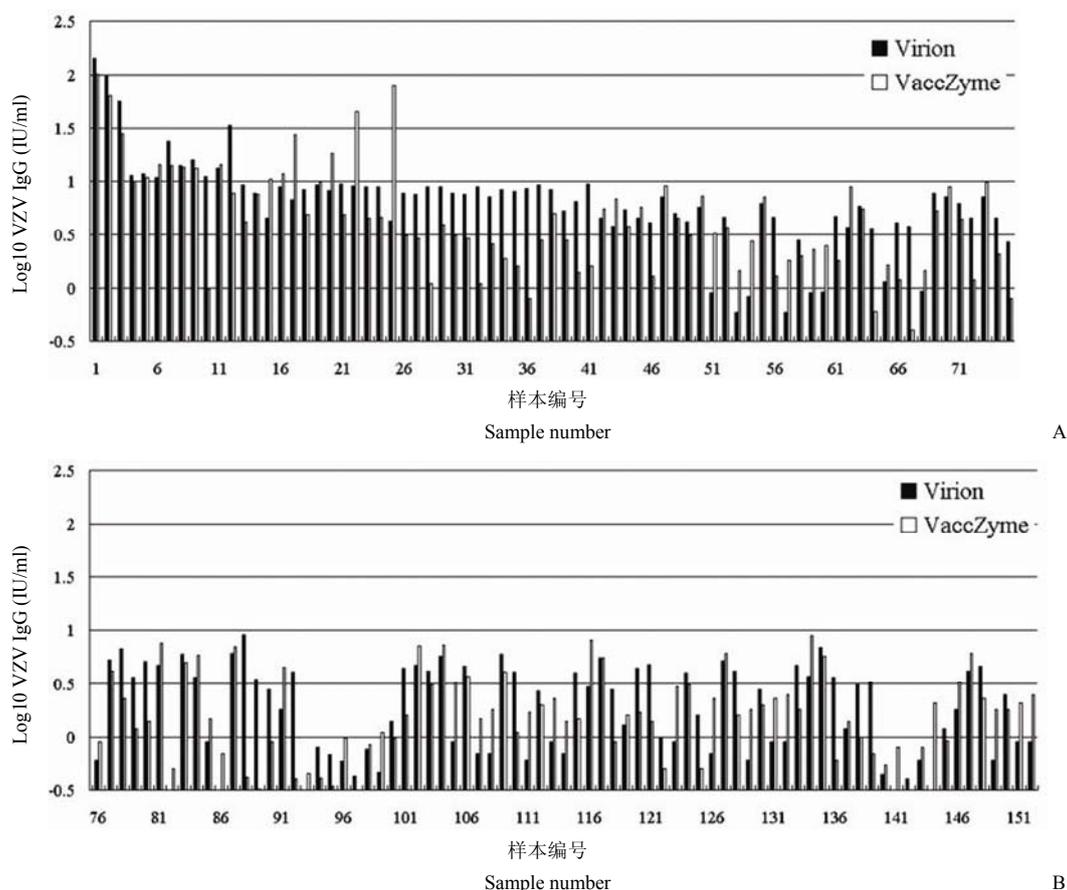


图 2 Virion 和 VaccZyme 测定单采血浆 VZIG 效价的比较

Figure 2 Comparison Virion and VaccZyme assays for detection the titer of VZV IgG in plasmapheresis donations

3 讨论

水痘-带状疱疹病毒的基因组包括 71 个 ORF, 可编码 33 种 VZV 特有蛋白和 13 种糖蛋白, 其中已发现至少 gE (gp I)、gB (gp II)、gH (gp III)、gI (gp IV)、gC (gp V) 和 gL (gp VI) 等 6 种糖蛋白共同存在于病毒囊膜表面和感染细胞的膜表面^[11]。体外研究证明, 这 6 种糖蛋白均可诱导中和抗体的产生。中和抗体对于水痘感染、恢复期以及病毒激活引起的带状疱疹具有中和病毒、减轻症状、促进恢复的重要作用^[12-13]。Mazur 等^[14]研究结果表明, 血清学检测 VZV 抗体效价为阴性的人群对 VZV 的感染几乎无任何抵抗力, 而 VZIG 的使用能够有效地保护高危易感人群。

VZIG 是利用特定的血清学检测方法将获得的含有一定效价 VZV 中和抗体的单采血浆进行混合, 并通过低温乙醇分离方法和一系列的病毒灭活/去除工艺, 制备的含有高效价 VZV 中和抗体的特异性免疫球蛋白^[15]。目前, 可用于 VZIG 血清学检测的方法主要有中和试验、膜抗原荧光抗体试验、补体结合试验、放射免疫测定、ELISA 法

等^[16-17]。由于原料血浆筛查需要高通量、高特异性、易操作的方法, 国际上市的 VZIG 产品多采用 ELISA 法对单采血浆进行筛选。商品化的 VZV 抗体检测试剂盒通常采用全病毒裂解液或纯化的病毒膜表面糖蛋白进行包被, 而病毒的中和抗原均为膜表面的糖蛋白, 因此由 gpELISA 筛选获得的原料血浆中 VZIG 的效价与金标准膜抗原荧光抗体试验相比具有很好相关性, 并且与单纯疱疹病毒、CMV 病毒等其他疱疹病毒的高免血浆无交叉反应^[18-19]。

本研究使用 Virion 和 VaccZyme VZV IgG gpELISA 试剂盒对我国 182 份单采血浆中 VZV 中和抗体的效价进行测定, 以判断采用国内原料血浆自行制备 VZIG 的可行性, 并评估两种试剂盒的相关性和适用范围。已知欧盟 EMEA 批准 VZIG 成品浓度为 100 IU/ml^[20], 因此血浆筛查标准可初步定为 > 10 IU/ml。通过检测, 符合此筛查标准的血浆在两种试剂盒中的检测结果分别是 13 份 (7%, Virion) 和 16 份 (9%, VaccZyme), 约占样品总量的 7%, 与国外筛选比例接近^[21]。

通过对 Virion 和 VaccZyme 检测结果的分析

可知, 其线性相关系数 R^2 为 0.62 ($P < 0.0001$), 检测结果的变异系数为 4%, 说明两者具有很好的相关性和一致性。但两种试剂盒的工作范围略有不同, 其中 Virion 对于效价在 50 mIU/ml 以下的样本具有很好的灵敏度, 因此适用于流行病学监测和疫苗接种评价等敏感性要求比较高的检测; VaccZyme 对于效价在 150 IU/ml 以上的样品具有较好灵敏度, 更适用于高效价的原料血浆筛查。对于两种 ELISA 试剂盒存在的差异, 分析原因可能是生产商采用不同浓度的病毒糖蛋白抗原包被微量滴定板, 或者是这两种检测体系分别采用了碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶显色系统, 但是这种差异对于血浆筛查而言是可以接受的, 提示了实验室建立筛选方法时可根据需要选择相应的反应系统。

结合国际筛选和制备 VZIG 的方法和标准^[17-19], 本试验的 ELISA 结果表明, 使用国内原料血浆制备水痘特异性免疫球蛋白具有可行性。在后续的研究中, 相关的检测结果需要经典方法(中和试验)和金标准(膜抗原免疫荧光法)进行验证和复核; 通过小量和中量制备的 VZIG 产品的终效价与原料血浆效价的比较, 建立适用于生产的原料血浆最终筛查标准和方法。

参考文献

- [1] Rahaus M, Desloges N, Wolff MH. Molecular biology of Varicella-Zoster virus. *Monogr Virol Basel*, 2006, 26:1-8.
- [2] Arvin AM. Varicella-zoster virus: molecular virology and virus-host interactions. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4(4):442-449.
- [3] Feldhoff CM, Balfour HH Jr, Simmons RL, et al. Varicella in children with renal transplants. *J Pediatr*, 1981, 98(1):25-31.
- [4] Feldman S, Lott L. Varicella in children with cancer: impact of antiviral therapy and prophylaxis. *Pediatrics*, 1987, 80(4):465-472.
- [5] Enders G, Miller E, Craddock-Watson J, et al. Consequences of varicella and herpes zoster in pregnancy: prospective study of 1739 cases. *Lancet*, 1994, 343(8192):1548-1551.
- [6] Alkalay AL, Pomerance JJ, Rimoin DL. Fetal varicella syndrome. *J Pediatr*, 1987, 111(3):320-323.
- [7] Brunell PA, Ross A, Miller LH, et al. Prevention of varicella by zoster immune globulin. *N Engl J Med*, 1969, 280(22):1191-1194.
- [8] Marin M, Güris D, Chaves SS, et al. Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, 2007, 56(RR-4):1-40.
- [9] Hambleton S, Gershon AA. Preventing varicella-zoster disease. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(1):70-80.
- [10] Wang Z, Zhao X, Lü MM, et al. Current status and trends in blood biologicals. *Chin J Biotechnol*, 2011, 27(5):730-746(in Chinese)
王卓, 赵雄, 吕茂民, 等. 血液制品的现状与展望. *生物工程学报*, 2011, 27(5):730-746.
- [11] Forghani B, Dupuis KW, Schmidt NJ. Epitopes functional in neutralization of varicella-zoster virus. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(11):2500-2506.
- [12] Keller PM, Neff BJ, Ellis RW. Three major glycoprotein genes of varicella-zoster virus whose products have neutralization epitopes. *J Virol*, 1984, 52(1):293-297.
- [13] Grose C, Litwin V. Immunology of the varicella-zoster virus glycoproteins. *J Infect Dis*, 1988, 157(5):877-881.
- [14] Mazur MH, Whitley RJ, Dolin R. Serum antibody levels as risk factors in the dissemination of herpes zoster. *Arch Intern Med*, 1979, 139(12):1341-1345.
- [15] Zaia JA, Levin MJ, Wright GG, et al. A practical method for preparation of Varicella-Zoster immune globulin. *J Infect Dis*, 1978, 137(5):601-604.
- [16] Krah DL. Assays for antibodies to varicella-zoster virus. *Infect Di Clin N Am*, 1996, 10(3):507-527.
- [17] Larussa P, Steinberg S, Waithe E, et al. Comparison of five assays for antibody to varicella-zoster virus and the fluorescent-antibody-to-membrane-antigen test. *J Clin Microbiol*, 1987, 25(11):2059-2062.
- [18] Hammond O, Wang Y, Green T, et al. The optimization and validation of the glycoprotein ELISA assay for quantitative varicella-zoster virus (VZV) antibody detection. *J Med Virol*, 2006, 78(12):1679-1687.
- [19] Wasmuth EH, Miller WJ. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for antibody to varicella-zoster virus using purified VZV glycoprotein antigen. *J Med Virol*, 1990, 32(3):189-193.
- [20] EMEA blood products working group. CPMP/BPWG/3726/02 Core SPC for human Varicella immunoglobulin for intramuscular use. London: 2005. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003432.pdf.
- [21] Dobkin MB. High titer Varicella-Zoster immune globulin for intravenous administration: US, 4717564. 1988-01-05.

The detection and comparison of neutralizing antibodies response to Varicella-Zoster virus in domestic plasmapheresis donations using two commercial ELISA kits

WANG Zhuo, TANG Qian, LV Mao-min, MA Yu-yuan, ZHAO Xiong, ZHANG Jin-gang

【Abstract】

Objective To use two different commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits in order to measure the titers of neutralization antibody to Varicella-zoster virus (VZV) in domestic plasmapheresis donations, and to compare the working range of the two kits for determination of which is more suitable for screening plasma or the preparation of varicella-zoster immunoglobulin (VZIG).

Methods VZV-specific envelope glycoproteins (gp) were used to coat the plate in two commercial ELISA kits (Virion/Serion and

VaccZyme/Binding Site) and to determine the titers of neutralization antibody in 182 plasmapheresis donations. The plasma were diluted 100 folds and tested by the two kits at the same time. Then the titers were calculated by the system evaluated formula supplied by the manufacturer or standard curve obtained from the test, and the correlation between the two kits was examined by Pearson's correlation coefficient test.

Results ① Results showed that there were 13 samples (7%, Virion) and 16 samples (9%, VaccZyme) with a titer of VZIG over 10 IU/ml respectively. ② Linear correlation between the two ELISA kits was 0.62 ($P < 0.0001$), and the coefficient of variation was 4%. ③ The Virion kit had excellent sensitivity at a lower work range (0.2 ~ 0.4 IU/ml), whereas, the VaccZyme showed excellent and stable sensitivity in the titer values over 100 IU/ml.

Conclusions There is a good concordance and correlation between Virion and VaccZyme. VaccZyme is more suitable for screening anti-VZV glycoprotein IgG because of its good stability in detecting the samples with highly titers. It is feasible to use domestic plasmapheresis donations for the preparation of VZIG.

【Key words】 Herpesvirus 3, human; Enzyme-linked immunosorbent assay; Immunoglobulins

Author Affiliation: Key Laboratory for Blood Products and Blood Substitutes, Institute of Transfusion Medicine, the Academy of Military Medicine Science (AMMS), Beijing 100850, China

Corresponding Author: ZHANG Jin-gang, Email: zhangjg@bmi.nic.ac.cn

www.cmbp.net.cn

Chin Med Biotechnol, 2011, 6(6):405-409

(上接 471 页)

大会制度和理事会议事制度,让理事、常务理事、副理事长更多地参与到协会决策中来,大家的事,大家办,把协会真正办成会员之家。

④加强行业自律和行业标准制订工作,开展细胞培养基生产行业的行业自律,争取设立标准委员会,加强标准的制订工作。

⑤加强与政府的联系,积极承担政府交办的任务,配备专门人员,建立与政府部门的沟通渠道,针对政府部门,开展一些项目研究,扩大协会在政府部门中的影响。

二、审议并通过了《中国医药生物技术协会专业委员会/分会管理办法》、《中国医药生物技术协会财务管理办法》和《中国医药生物技术协会分支机构财务管理办法》修订案

为了进一步推动、促进并规范协会下属各专业委员会/分会的日常管理和活动开展,同时更好地贯彻民政部关于社会团体“小金库”专项治理工作的精神,协会对《中国医药生物技术协会财务管理办法》、《中国医药生物技术协会二级机构财务管理办法》、《中国医药生物技术协会专业委员会/分会管理办法》中部分条款修订,由常月芬副秘书长、会员部文勇主任分别做了修订的说明。与会理事进行了审议并投票表决,通过了上述几个管理文件的修订案。

三、增补了副理事长单位和常务理事单位

会议还通过投票,增补中国生物技术集团公司为副理事长单位、湖北省中山医院为常务理事单位,并同意吸纳山东绿叶制药有限公司等 15 家单位为会员单位。

与会各位理事充分肯定了协会近一年的工作成绩,对协会今后的发展提出了一些意见和建议。理事们认为在提供信息服务上面,协会可以更充分发挥《会员通讯》、协会网站、杂志这几个平台的作用,作到信息及时、更新迅捷,其中网站可以与理事单位合作,共同开发共同管理;目前有关细胞治疗技术的管理问题,是各位从事临床工作的理事普遍关心的问题,希望协会能及时向卫生部反映业内的建议和意见;转化医学平台的建设非常必要,转化医学的实质内容是多层次多学科的交叉融合,使基础研究的成果迅速转化为临床可应用的理论、技术和药物,并根据临床医学的需求提出前瞻性的应用基础研究方向。该平台的设立将有助于我国生物医药产业的发展,并使相关科学研究进入良性循环。参会理事均表示,愿意积极参与共同建设。

最后,彭玉理事长就本次会议做了总结,感谢各位理事出席本次会议,并希望大家继续支持即将召开的第五届中国医药生物技术论坛。协会将于明年继续完善各项管理制度,如细化和落实会员代表大会制度和理事会议制度,希望各位理事、常务理事、副理事长更多地参与到协会工作中来,希望大家共同努力,为协会的发展多作贡献。

(文勇 整理)