

人巨细胞病毒特异性免疫球蛋白原料血浆的筛选

彭良俊, 林连珍, 高菲, 方亮, 李策生, 周志军

(武汉生物制品研究所, 武汉 430060)

摘要: 用北京贝尔公司的人巨细胞病毒 (HCMV) IgG 检测试剂盒检测 5~6 月入库的武汉生物制品研究所 (WIBP) 下属四个浆站共 7433 份普通血浆, HCMV-IgG 阳性率为 36%~55%。建立内部参考品 P₁、P₂、P₃、P₄ 用德国赛润公司的 HCMV-IgG 定量检测试剂盒对内部参考品进行标定, 效价分别为 648、962、1757、2940 PEI-U/ml。以 A₄₅₀ 值 > P₁ 为标准确定 HCMV-IgG 阳性的献血员名单, 按照检疫期的要求, 利用浆站管理系统软件查找献血员前 3 个月的血浆编号, 统计建档。逐批检测符合检疫期的建档血浆, 以 A₄₅₀ 值 > P₂ 为标准收集阳性血浆, 以 A₄₅₀ 值 > P₃ 为标准投料, 进行人巨细胞免疫球蛋白 (HCMV-Ig) 的低温乙醇纯化。通过成品的中和试验结果决定收浆方案是否可行。

关键词: 人巨细胞病毒 IgG; 内部参考品; 效价; 浆站管理系统软件; 检疫期

中图分类号: Q512⁺.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-5673(2009)04-0014-05

The sieving protocols of HCMV-IgG positive plasma for HCMV-Ig production PENG LIANG JUN, LI LIAN ZHEN, GAO FEI ET AL (Wuhan Institute of Biological Products, Wuhan 430060, China)

Abstract: 7433 Plasma samples from 4 plasma stations of WIBP were detected with Beijing Bayer ELISA kits in order to understand the ratio of positive HCMV-IgG plasma. The results showed that the positive rates of HCMV-IgG are between 36% to 55%. The inner references P₁, P₂, P₃ and P₄ were established and their potencies were standardised by German Serion HCMV-IgG quantitative ELISA kit, the titer is 648, 962, 1757 and 2940 PEI-U/ml respectively. The statistical form of positive HCMV-IgG donor was made in accordance with the standard of A₄₅₀ > P₁. According to quarantining period demand, the serial number of plasma donor 3 months ago was locked for using the plasma station management system software with the aim of establishing archives. Each batch of HCMV-IgG plasma was detected and the positive plasma was collected in the light of the standard of A₄₅₀ > P₂. The purification of HCMV-IgG was performed by low temperature ethanol technology. The feasibility of collecting plasma protocol was evaluated on the basis of the neutralization test result of final product.

Key word: HCMV-IgG; Inner reference; Potency; Plasma station management system software; Quarantining Period

人巨细胞病毒 (Human cytomegalo virus, HCMV) 也称人疱疹病毒 5 型 (HHV5), 属 β 疱疹病毒亚科。HCMV 是人类先天性病毒感染的最常见病原之一, 可致感染患儿中枢神经系统受累、多器官损害、智力低下或耳聋等; 在正常健康人中可引起单核细胞增多症; 在免疫缺陷者如器官移植受者、获得性免疫缺陷综合征者及癌症患者中可引起严重的感染, 甚至死亡^[1]。

目前人血浆来源的人巨细胞病毒特异性免疫球蛋白 (HCMV-Ig) 国际上已批准生产, 国内尚无同类产品问世。其临床治疗主要用于器官移植, 静脉注射 HCMV-Ig 患者血液中 HCMV-Ig 升高, 可以减轻

HCMV 感染的相关综合症和真菌、寄生虫的发生率, 提高移植器官的存活率。国内人特异性免疫球蛋白制剂品种较少, 而临床对特异性免疫球蛋白的应用则日趋广泛, 因此开发新的 HCMV-Ig 具有重要的意义, 于是其原料血浆的筛选提到了议事日程。

材料和方法

1 材料

1.1 标本来源

武汉生物制品研究所 (以下简称武汉所) 下属郧县、武穴、监利、君山 4 个单采血浆站 2009 年 5~6 月入库的普通血浆 7433 份。

1.2 试剂

北京贝尔生物工程有限公司 (以下简称贝尔) 出品的人巨细胞病毒 IgG 检测试剂盒 (96 人份), 批号 20090401; 德国维润/赛润公司 (以下简称赛润) 出品的人巨细胞病毒 IgG 定量检测试剂盒 (96 人

收稿日期: 2009-07-14 修回日期: 2009-09-10

通讯作者: 周志军 E-mail: zz0221@163.com

作者简介: 彭良俊, (1965-), 医学生物学工程师, 主要从事血液制剂的生产和管理。

份),批号为 SKY BA

2 方法

2.1 血浆筛选的内部参考品的选取

按照贝尔 HCMV-IgG检测试剂盒的要求,将郧县普通血浆 200份以 1:20稀释作为试样,反应模式为 30min 30min 10min,选取 A_{450} 值为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 左右的血浆,复试后按这 4 档分别混合,作为内部参考品 P₁, P₂, P₃, P₄

2.2 血浆筛选的内部参考品的确立

将内部参考品 P₁, P₂, P₃, P₄按照赛润 HCMV-IgG定量检测试剂盒的要求从 1:100稀释起始,再作 1:500, 1:1000稀释后作为试样,赛润试剂盒附带的标准血清直接作为试样,以赛润试剂盒的反应模式为 60min 30min 30min操作,按试剂盒附带的效价公式计算内部参考品 P₁, P₂, P₃, P₄的效价。所有的稀释样品同时也在贝尔试剂盒上作平行试验,按反应模式为 60min 30min 10min操作,比较两个试剂盒检测结果的相关性。

2.3 4个血浆站普通血浆的初次筛选

按贝尔 HCMV-IgG检测试剂盒的要求,血浆样品 1:20稀释作为试样,反应模式为 30min 30min 10min,以 A_{450} 值 > 0.15 为阳性判断标准,计算阳性

率。分别按 A_{450} 值 > P₁, A_{450} 值 > P₂ 的不同标准,将血浆分档登记。

2.4 4个浆站合格献血员及其对应的检疫期合格的血浆号的查找

在武汉所血源部的帮助下,利用浆站管理系统软件,先查找该次检测阳性 (A_{450} 值 > P₁) 的血浆号所对应的献血员的卡号,列出献血员名单,然后追溯该献血员对应的检疫期合格的血浆号 (3 个月前),登记造册,递交血源部,在投料前按名单找出这些血浆。

2.5 投料前阳性血浆的筛选

将合格献血员检疫期合格的血浆小样再次用贝尔 HCMV-IgG检测试剂盒检测,以 A_{450} 值 > P₃ 为标准,将合格的血浆收集至一定数量后,集中一起进行后续的低温乙醇法纯化 IgG。若成品 Ig 的中和抗体活性检测远高于国家要求,下次收集血浆可按 A_{450} 值 > P₂ 为标准,适度降低收浆标准;若成品 Ig 的中和抗体活性检测低于国家要求,下次收集血浆可按 A_{450} 值 > P₄ 为标准,适度提高收浆标准。

结果

1 血浆筛选的内部参考品的选择和试剂盒的考核

表 1 内部参考品在贝尔试剂盒中的线性稀释结果
Tab 1 The results of inner references dilution with Bayer kit

Dilution	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:20
P ₁	0.812	0.460	0.271	0.147	0.083	0.925
P ₂	1.299	0.808	0.461	0.227	0.137	1.376
P ₃	1.985	1.368	0.743	0.331	0.175	2.003
P ₄	2.406	1.874	1.047	0.487	0.268	2.466

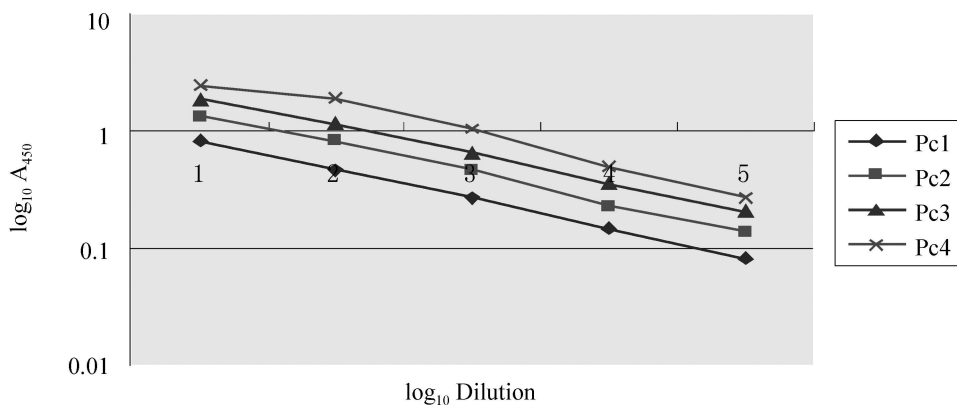


图 1 内部参考品在贝尔试剂盒中的线性关系比较

Fig 1 The comparison of inner references linear relation with Bayer kit

Pc₁ $r^2=0.9948$ Pc₂ $r^2=0.9338$ Pc₃ $r^2=0.9358$ Pc₄ $r^2=0.9695$

结果说明该试剂盒的线性较好, 可以进行半定量检测 HCMV- IgG 而实验中选择的内部参考品在

试剂盒上有明显的线性梯度, 可暂时作为收浆标准。

2 血浆筛选的内部参考品的效价确定

表 2 内部参考品在贝尔和赛润试剂盒中的检测结果

Tab 2 The detecting results of inner references dilution with Bayer and Serion kit

Dilution	Pc1	Pc2	Pc3	Pc4	Serion standard
	1:100	1:100	1:100	1:100	
Bayer A ₄₃₀	0.221	0.333	0.577	1.186	0.050
	0.215	0.374	0.505	1.197	0.062
	0.283	0.445	0.622	1.476	0.093
Serion A ₄₀₅	2.178	2.163	2.397	2.443	1.473
	1.721	2.099	2.164	2.259	1.112
	1.423	1.506	1.773	1.932	0.723
Dilution	Pc1	Pc2	Pc3	Pc4	Serion standard
	(1:500)	(1:500)	(1:500)	(1:500)	
Bayer A ₄₃₀	0.069	0.107	0.173	0.382	0.093
Serion A ₄₀₅	1.304	1.452	1.636	1.824	1.112
Dilution	Pc1	Pc2	Pc3	Pc4	Serion standard
	(1:1000)	(1:1000)	(1:1000)	(1:1000)	
Bayer A ₄₃₀	—	—	—	0.181	0.093
Serion A ₄₀₅	0.451	0.590	0.839	1.066	0.723
Potency { PEIU/m }	648	962	1757	2940	134

SKY 621 BA批次的赛润试剂盒的标准品 A₄₀₅ 值有效性范围在 0.43 ~ 1.48 而内部参考品在 1:100 稀释的 A₄₃₀ 值不在有效范围内, 故需要进一步稀释才能计算效价。

德国赛润试剂盒中抗体效价的计算公式:

$$Conc = \exp\{5.424 - \ln[2.314 / (Sample \times 0.87 / standard + 0.012) - 1] / 0.922\}$$

$$Conc = \exp\{5.424 - \ln[2.314 / (Sample \times 0.87 / standard + 0.012) - 1] / 0.922\}$$

内部参考品的效价 = 稀释样品的效价 × 10 (因为稀释倍数为 1:1000)

根据以上实验结果确定了内部参考品的 PEIU/m 效价 (Pc4 > Pc3 > Pc2 > Pc1), 建立了质量控制标准。

ODs in Bayer kit

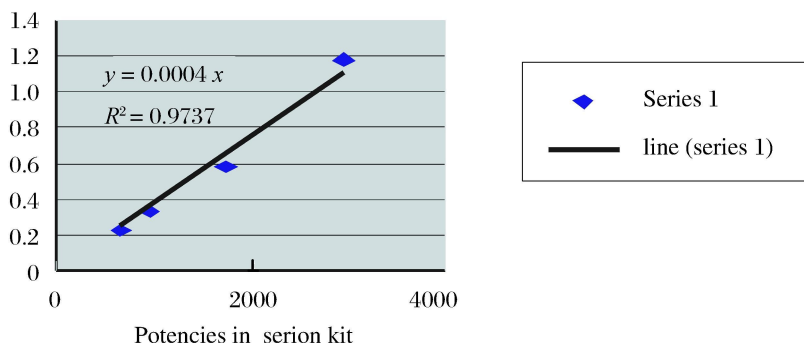


图 2 贝尔试剂盒和赛润试剂盒检测结果的相关性的比较

Fig 2 The comparison of relationship of the tested results between Bayer and Serion kits

从内部参考品在两种试剂盒的检测结果来看贝尔试剂盒与赛润试剂盒的相关性较好,其可靠性得

到初步验证。

3 原料血浆筛选方案的实施过程及结果

表 3 四个血浆站实施本方案的统计数据

Tab 3 The statistical data from 4 plasma stations according to plasma collecting program

	Yun xian	Wu xue	Jun shan	Jian li
200905-06 Total samples	3760	751	498	2424
Positive samples/ratio	1370(36.46%)	331(44.07%)	277(55.62%)	1295(53.42%)
200905-06> P ₁ samples/ratio	347(9.23%)	122(16.25%)	27(5.42%)	280(11.55%)
200905-06> P ₂ samples/ratio	199(5.29%)	68(9.05%)	9(1.81%)	185(7.63%)
Qualified donor numbers	261	75	27	234
200902-03 donor samples	331	35	7	261
200902-03> P ₂ Plasmas/ratio	167(50.45%)	13(37.14%)	—	105(40.23%)
200902-03> P ₃ Plasmas/ratio	89(26.89%)	10(28.57%)	—	65(24.90%)
200904 donor samples	325	45	21	188
200905-06 donor samples	413	37	27	286

结果显示按上述材料与方法的收浆方案实施后,2009年2~3月出库的 HCMV-IgG合格献血员检疫期合格的血浆小样中, A_{450} 值 > P₂的比例由小于 10%提高到 35%左右。

讨论

目前 HCMV特异性 IgG的检测,不同公司市场的试剂测定结果存在很大差异,主要是所采用的抗原成分及抗原制备过程的差异所致。对于 HCMV血清学诊断试剂盒应包含的抗原成分目前尚无一个国际公认的标准,暂按所用抗原的不同大致分为三类,即基于病毒裂解物抗原、基因工程重组蛋白抗原及化学合成多肽抗原的检测方法^[1]。目前国内仅有 2家获得 ISM检测试剂的国家药品生产文号,分别为北京现代高达和北京贝尔生物工程有限公司。IgG检测试剂均无国家药品生产文号。国外 IgG检测的重组蛋白抗原包含 4种结构蛋白和非结构蛋白成分,即 PUI32 (P150)、PUI44 (P52)、PUI83 (P65)、PUI80 (P38)^[2],在实验中选用的北京贝尔生物工程有限公司的包被抗原为 HCMV的 P52和 P65是国外 4个重组抗原中的 2个, P52与其它疱疹病毒的同源性最小,因此特异性更好^[3]; P65是 HCMV早期产生的一种结构蛋白,是其活动性感染的相对金标准^[4]。在检测过程中发现其阴阳性

可以分开,线性较好,作为合格的高效价血浆筛选试剂。

在用德国赛润试剂盒定量检测时,发现该标准品以北京贝尔试剂盒检测时出现阴性,这一点说明书中也有阐述,标准品在其它试剂盒可能呈现为阴性或临界值。而在赛润试剂盒中它是线性范围的中间值,阴阳性的判断由其读数乘以上下限的系数来决定,由此可肯定为阳性,这说明赛润试剂盒的敏感度高于贝尔试剂盒,但其标准品作为收浆标准似乎太低。从起始稀释倍数和线性范围及标准品 A_{450} 值来看,赛润试剂盒的敏感度高于北京贝尔试剂盒,但不适合用于高效价血浆的筛选。

在血浆筛选方案的确立上,先前考虑了 2种,其一是通过 HCMV-ISM的检测找出巨细胞病毒活动期的献血员,再跟踪其 3个月后的血浆 HCMV-IgG水平,结果发现在普通血浆 200份中,未发现 1例 HCMV-ISM阳性,故放弃此思路;其二是根据最近入库血浆的 HCMV-IgG检测结果,先找出 HCMV-IgG合格的献血员,再追踪这些献血员前几次的血浆,进行 HCMV-IgG检测,确定最终投料的血浆,实验结果表明此方法确实可行,不仅减少了筛选血浆所需试剂的成本和劳动量,提高了血浆入、出库的转运效率,同时也满足了制品原料血浆对国家检疫期的要求。实验中还可以连续监测这些献血员的抗体生成

和保持情况,如果掌握了其规律,对以后收浆方案的调整有一定的指导作用。当然,收浆方案是否可行还需要成品的鉴定才能肯定。

另外,实验中所检测的各浆站人巨细胞病毒 IgG的阳性率在 36%~55%左右,与文献报导的献血员的 IgG检出率在 54%~58%^[5]稍有出入,可能与使用试剂、地区差异有关,但对其筛选强阳性血浆没有影响。

主要存在的问题是市场上无针对中和抗体的抗原位点的试剂和用中和试验标定的高效价 HCMV-IgG标准品,无法对 ELISA检测结果与中和试验结果的相关性进行验证,这是下一步必须解决的问题。目前暂行方案是倒推法,由终产品的结果推断原料的质量,具有一定的风险,如果成功就需要进行回顾性验证。但在现有条件下,该方案具有费时较少,投

入低的优点,值得一试。

参考文献:

- [1] 孙立山,周文达. 人巨细胞病毒感染的实验室诊断研究进展 [J]. 检验医学 2005 20(3): 284 - 286
- [2] Maine GT, Stricker R, Schuler M, et al. Development and clinical evaluation of a recombinant antigen-based cytomegalovirus immunoglobulin M automated immunoassay using the Abbott AxSYM analyte [J]. Clin Microbiol 2000, 38: 1476 - 1481.
- [3] 周宗安,邓纪山,邓小昭,等. 抗人巨细胞病毒重组抗原 gB2 单克隆抗体的研制及应用研究 [J]. 解放军预防医学杂志 2003, 21(2): 82 - 85
- [4] 刘倩,黄维,崔寰,等. 人巨细胞病毒 P165 IgG-A快速诊断试剂的临床应用 [J]. 中国生物制品学杂志 2008 21(4): 323 - 326
- [5] 李春英,吕春兰,喻东威,等. 献血员 CMV感染的研究 [J]. 中国病毒学杂志 2000 15(2): 111 - 115.

《微生物学免疫学进展》2010年征订启事

《微生物学免疫学进展》为中华人民共和国卫生部主管、兰州生物制品研究所主办的国家级医学杂志,系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、《中国核心(遴选)数据库》收录期刊、《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库收录期刊,国内外公开发行。1973年创刊,主要刊登国内外医学、微生物学、免疫学、生物化学、遗传工程、流行病学等方面的基础理论、实验技术、产品研究等实验论文报告和发展动态及最新进展。以介绍方法学为主。欢迎卫生防疫、临床检验、生物制品研制、医学卫生科研、教学部门的工作人员和师生投稿、订阅。

本刊为季刊,国际标准刊号 ISSN 1005-5673,中国标准刊号 CN 62-1120/R,国际标准开本(A4)80页,全年4期,定价40元(含邮资)。

联系: 730046 甘肃省兰州市盐场路 888号

兰州生物制品研究所

《微生物学免疫学进展》编辑部

电话: (0931) 8316208 或 (0931) 8340711(传真)

E-mail: bj5866@sina.com 或 LSTSG@hotmail.com

《微生物学免疫学进展》编辑部