

· 硕博专栏论著 ·

单纯疱疹病毒 IgM 抗体(1+2型)时间分辨免疫荧光分析法的建立

杨运森^{1,2}, 周健伟³, 董志宁³, 刘天才¹, 吴英松¹

(1.南方医科大学检验与生物技术学院, 广东 广州 510515; 2.中国人民解放军第一八一医院医务处, 广西 桂林 541002; 3.广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东 广州 510130)

摘要:目的 利用时间分辨免疫荧光分析法研制单纯疱疹病毒 IgM 抗体(1+2型)检测试剂盒。方法 基于“捕获法”原理,在 96 孔酶标板上包被抗人 IgM 单克隆抗体, 标记特异性单纯疱疹病毒 1 型和 2 型单克隆抗体作为示踪物, 建立单纯疱疹病毒 IgM 抗体(1+2型)检测试剂, 并对自研试剂盒的各项性能进行评价, 与同类试剂盒进行方法学比对试验。结果 自研试剂盒的灵敏度与 ELISA 比较有较大的提高, 分析内变异系数 $\leq 4.29\%$, 分析间变异系数 $\leq 6.15\%$; 血清盘检测结果与该血清盘说明书提供的 Gull IFA 试剂的测试结果一致; 与进口酶免法试剂同时检测 293 份临床样本, 自制试剂盒的临床敏感性达 100%, 临床特异性达 98.88%, Kappa 值为 0.940 ($P < 0.001$)。结论 自研试剂盒灵敏度高、特异性强、精密度好, 与商业化的同类产品检测结果一致性好, 能满足临床应用的需要。

关键词:单纯疱疹病毒; IgM 抗体; 时间分辨免疫荧光分析法

中图分类号: R446.62 文献标识码: A 文章编号: 1672-3619(2016)12-1483-05

Time-resolved fluoroimmunoassay for herpes simplex virus type 1 and type 2 IgM antibodies

YANG Yun-sen*, ZHOU Jian-wei, DONG Zhi-ning, LIU Tian-cai, WU Ying-song

(* School of Laboratory Medicine and Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515; Medical Department of the 181st Hospital of the PLA, Guilin, Guangxi 541002, China)

Abstract: Objective A novel time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) methodology was developed for the determination of HSV IgM in human serum. **Methods** The assay was performed in 96-well microtiter plates coated with anti-IgM immunoglobulin. Eu^{3+} -labeled HSV-1 and HSV-2 monoclonal antibodies were used as tracers. The performance of self-test reagents was evaluated, compared with the similar kit. **Results** The assay sensitivity was higher than ELISA, the intra- and inter assay coefficients of variation were less than 4.29% and 6.15%, respectively. Serum panel tests were performed using TRFIA and the results were satisfactory. 293 clinical samples were tested simultaneously with ELISAs. TRFIA was highly sensitive (100%) and specific (98.88%), with a kappa value of 0.940. This result was in strong agreement with commercial ELISAs. **Conclusion** An effective, sensitive and specific detection of HSV type 1 and type 2 IgM TRFIA was successfully developed for diagnosis and clinical application.

Key words: Herpes simplex virus; IgM antibodies; Time-resolved fluoroimmunoassay

单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)是人类最常见的病原体,人是其唯一的自然宿主。主要通过直接密切接触和性接触传播。HSV 经口腔、呼吸道、生殖道粘膜和破损皮肤等多种途径侵入机体。HSV 有二个血清型,即 HSV-1 和 HSV-2, 两型病毒

核苷酸序列有 50% 同源性。HSV-1 感染多数引起口唇疱疹,部分会导致病毒性角膜炎、脑炎、新生儿感染^[1-2],在免疫力较弱的病人身上,比如接受化疗或有 AIDS 者,单纯疱疹病毒会引起难以控制的皮肤病变^[3]; HSV-2 常常通过生殖器感染,称为生殖器疱疹^[4], HSV-2 主要是一种性传播疾病,但 HSV-1 生殖器感染的发生率正在增加^[5]。HSV 通过胎盘感染,影响胚胎细胞有丝分裂,易发生流产、造成胎儿畸形、智力低下等先天性疾病。约 40~60% 的新生儿在通过 HSV-2 感染的产道时可被感染^[6],出现高热、呼吸困难和中枢神经系统病变,其中 60~70% 受染新生儿可因此而死亡,幸存者中后遗症可达 95%。

HSV IgM 在 HSV 感染后 3~5 d 即可出现,持续

基金项目: 国家科技部重大项目(2013ZX10004-803); 国家自然科学基金(81271931)

作者简介: 杨运森(1982-), 在职硕士研究生, 主管技师, 主要从事医疗管理及临床检验研究

通讯作者: 吴英松(1974-), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事分子诊断和新型免疫学检测技术研究, E-mail: yingsongwu@hotmail.com

12~16周左右,因此免疫学检测血清中HSV 特异抗体 IgM 呈阳性则提示有活动性感染,在优生优育及器官移植等方面有重大的临床意义。目前国内外临床有关 HSV IgM 检测的方法主要以酶联免疫法为主,灵敏度低、精密性和特异性差。时间分辨免疫荧光分析技术(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是继放射免疫分析之后标记物发展的一个新里程碑,已成为生物医学研究和临床超微量生化检验中一项最有发展前景的分析手段^[7]。本研究利用 TRFIA 研制了一种高灵敏、高特异的 HSV IgM 抗体(1+2型)定性测定试剂盒,并进行了分析性能评价,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要试剂 单纯疱疹病毒 1 型和 2 型抗原、特异性单纯疱疹病毒 1 型和 2 型单抗(鼠)购自美国 Meridian 公司;抗人 IgM 单克隆抗体(鼠)购自深圳市菲鹏生物股份有限公司;96 孔微孔板购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;铕标记试剂盒购自芬兰 PerkinElmer 公司;其余试剂为国产或购置国外的分析纯试剂;对照试剂为单纯疱疹病毒 1+2 型 IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)(意大利 Adaltis 公司);复核试剂盒为单纯疱疹病毒 1+2 型 IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)(Institut Virion\Serion GmbH 公司)。

1.1.2 主要仪器 时间分辨荧光检测仪 Victor™ 1420 购自芬兰 PerkinElmer 公司;洗板机购自北京拓普分析仪器责任有限公司;振荡器购自广州市丰华生物工程有限公司;冻干机购自美国 LABCONCO 公司;超滤离心管购自美国 MILLIPORE 公司;高速离

心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 反应板的制备 在包被缓冲液(50 mmol/L Tris, 0.9% NaCl, pH 7.4)中加入抗人 IgM 单克隆抗体使终浓度为 3 μg/ml,按照 100 μL/孔加入 96 孔酶标板中,4℃ 孵育过夜后加入封闭液(50 mmol/L PBS, 0.9% NaCl, 0.1% BSA, 0.2% Tween-20, pH 7.4),抽干备用。

1.3 抗体的标记 使用标记缓冲液,在超滤离心的作用下,将特异性单纯疱疹病毒 1 型和 2 型单抗进行浓缩及除杂处理,按照 5 : 1 质量比加入铕(Eu³⁺)标记物,25℃ 震荡孵育过夜(16~20 h),利用分子筛层析的方法进行纯化处理,以除去游离的铕,纯化使用的洗脱缓冲液为(50 mmol/L Tris, 0.9% NaCl, 0.2% BSA, pH 7.4),根据 280 nm 蛋白的吸光度的高低收集蛋白峰。加入 BSA 作为保护剂,0.1%叠氮钠,然后经过 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

1.4 抗原的制备 在抗原稀释液(50 mmol/L Tris-base, 0.9% NaCl, 1.5% BSA, pH 7.8)中加入适量的单纯疱疹病毒 1 型和 2 型抗原,充分混匀,冻干备用。

1.5 样本来源 用于截断值研究的 336 份健康体检人血清样本来自于广州达安临床检验中心;用于不同方法学比较的临床血清样本来自柳州市妇幼保健院,包括 HSV-1 型和 HSV-2 型 IgM 抗体阳性血清 11 份,HSV-1 型 IgM 抗体阴性且 HSV-2 型 IgM 抗体阳性血清 10 份,HSV-2 型 IgM 抗体阴性且 HSV-1 型 IgM 抗体阳性血清 7 份,HSV-1 型和 HSV-2 型 IgM 抗体阴性血清 265 份;商业化血清盘(PTH201)购自美国 BBI 公司。

1.6 方法学的建立 采用“捕获法”的原理,反应模式参考已发表的文献^[8]建立,使用 Victor™ 1420 多标记检测仪进行检测。反应模式见图 1。

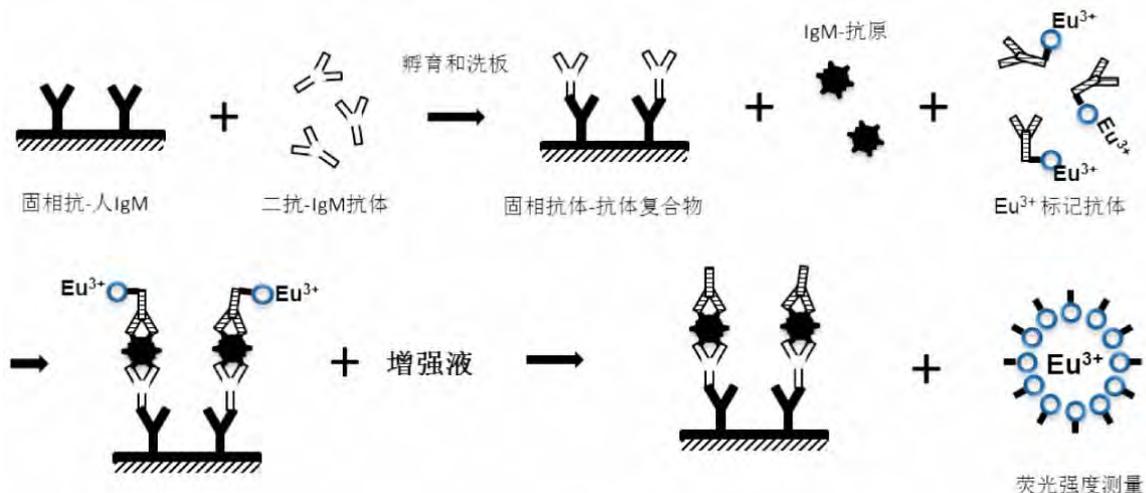
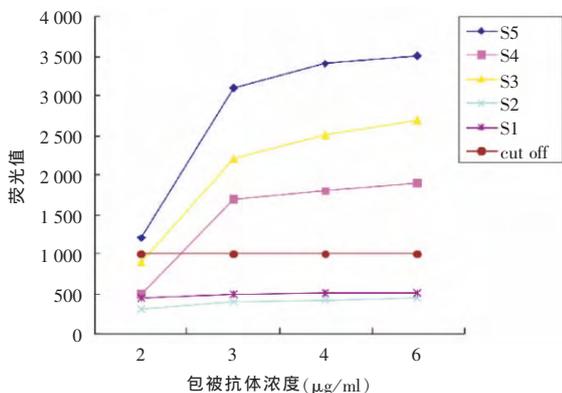


图 1 HSV-IgM TRFIA 反应模式图

Fig.1 Schematic representation of the TRFIA developed in this study

2 结果

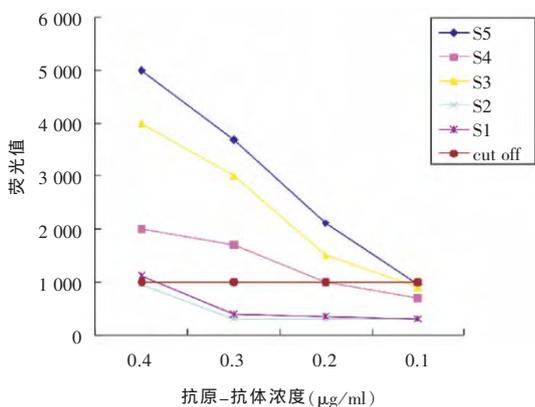
2.1 TRFIA 反应体系优化 如图 2 所示,当包被抗体的浓度达到 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,样本的荧光趋于稳定;如图 3 所示,当抗原-抗体复合物 (Eu^{3+}) 标记复合物浓度为 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 阴性样本和阳性样本能清楚的分辨出来。因此最终选择 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为最佳包被抗体浓度,0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为抗原-抗体复合物 (Eu^{3+}) 标记复合物最佳浓度。



注:抗人 IgM 单克隆抗体浓度从 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 稀释至 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,S1、S2 为阴性样本,S3、S4、S5 为阳性样本。

图 2 包被抗体浓度对荧光值的影响

Fig.2 Influence of coating concentration on fluorescence intensity



注:抗原-抗体复合物浓度从 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 稀释至 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,S1、S2 为阴性样本,S3、S4、S5 为阳性样本。

图 3 抗原-抗体复合物浓度对荧光值的影响

Fig.3 Influence of antigen-antibody complex on fluorescence intensity

2.2 截断值的建立 用自研试剂检测 336 份健康体检人血清,测定荧光值与阴阳性对照品荧光值的比值 $[S/(\text{NC}+\text{PC})]$,该比值为 0.08~2.91,97.6% 的样本在 0.50 以下,结合相关资料^[9],本试剂截断值为 $(\text{NC}+\text{PC})\times 0.5$ 。用样品的荧光值和截断值的比值 (S/co) 来表示时,待测样品的 S/co 值 ≤ 1.0 为阴性,待测样品的 S/co 值 > 1.0 为阳性。

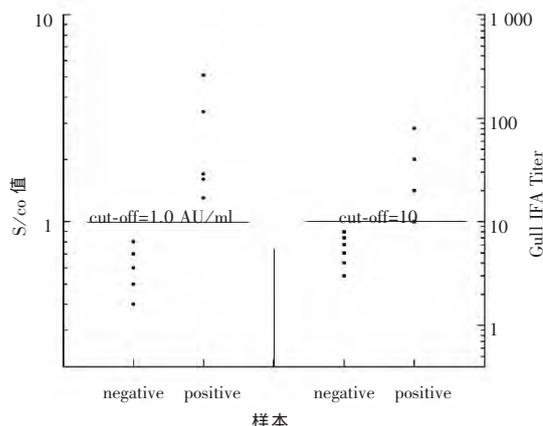
2.3 精密性 选取 3 个不同滴度的样本,在一次实验中每个样本进行 10 次检测,计算分析内精密性;在不同时间的 3 次实验中每个样本进行 10 次检测,计算分析间精密性。结果如表 1 所示,分析内变异系数 $\leq 4.29\%$,分析间变异系数 $\leq 6.15\%$ 。

表 1 分析内和分析间精密性检测结果

Tab.1 Intra- and inter-assay precision

	血样编号	均值 \pm SD(S/co 值)	CV(%)
分析内(n=10)	弱阳性	1.4 \pm 0.06	4.29
	阳性	2.7 \pm 0.08	2.96
分析间(n=30)	弱阳性	1.3 \pm 0.08	6.15
	阳性	2.8 \pm 0.10	3.57

2.4 商业血清盘检测 检测商业化的性能血清盘,结果如图 4 所示,血清盘说明书提供的 Gull IFA 试剂盒的测试结果比较,阳性符合率为 100%(17/17),阴性符合率为 100%(8/8)。



注:右边 Gull IFA 试剂盒的截断值为 10,共 17 份阴性样本和 8 份阳性样本;左边 TRFIA 试剂盒截断值为 $S/\text{co}=1.0$ 。

图 4 血清盘检测结果

Fig.4 Result of the performance panel determination

2.5 最低检出限 将阳性样本从 1 : 100 稀释至 1 : 500,每个稀释度重复检测 20 次,将检测结果的阳性率 $\geq 95\%$ 的最大稀释倍数作为试剂盒的最低检测限,同时用意大利 Adaltis 公司单纯疱疹病毒(1+2 型)IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)进行对比检测,结果如表 2 所示,当阳性样本稀释至 1:300 时阳性率仍为 100%,ELISA 为 0%。

2.6 不同方法学比较 对 293 份临床血样同时用自制和酶联免疫检测试剂进行检测,采用盲法、对照的临床试剂设计,用 SPSS13.0 统计软件对考核数据进行统计学分析。研究采用进口的意大利 Adaltis 公司单纯疱疹病毒 1+2 型 IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)作为对照试剂。复核试剂采用 Institut Virion\Serion

表 2 不同稀释度检测结果的比较

Tab.2 Comparison of TRFIA and ELISA results at various dilutions

稀释度	TRFIA HSV IgM 试剂盒		Adaltis HSV IgM 试剂盒	
	S/co 均值(n=20)	阳性率(%)	S/co 均值(n=20)	阳性率(%)
1:100	6.366	100	2.054	100
1:200	2.829	100	1.567	100
1:300	1.648	100	0.855	0
1:400	0.854	0	0.467	0
1:500	0.645	0	0.298	0

GmbH 公司单纯疱疹病毒 1+2 型 IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)。结果如表 3 所示,阳性符合率达 100.00%,阴性符合率 98.88%,总符合率为 98.98%,Kappa 值为 0.940($P < 0.001$)。3 例不符样本经复核试验,其中 2 例样本与考核试剂检测结果一致,1 例样本与对照试剂检测结果一致。比较结果表明,本自制 TRFIA 试剂盒与商业化 ELISA 试剂盒的检测结果一致性好,能满足临床的应用。

表 3 自研试剂与对照试剂比较

Tab.3 Comparison of TRFIA and ELISA for detection of HSV IgM

自研试剂(TRFIA)	对照试剂(ELISA)		合计
	阳性	阴性	
阳性	26	3	29
阴性	0	264	264
合计	26	267	293

3 讨论

HSV 感染的普遍性和终身性,其造成的健康问题是不可忽视的。HSV 与弓形体、风疹病毒、巨细胞病毒共同构成了与人类自然流产具有密切关系的主要病原体,妊娠期 HSV 血清学筛查可以明确孕妇是否感染病毒。而妊娠前和妊娠期 HSV 对比筛查是为了确定初次感染还是复发感染,以便提供治疗和干预的依据,目的是预防新生儿感染,预防治疗 HSV 感染已经成为优生优育方面的重要课题之一^[10-13]。随着社会的发展和生活方式的变化,HSV-1 和 HSV-2 引起的生殖器疱疹也造成越来越严重的社会和公共卫生问题^[14]。

目前检测单纯疱疹病毒常用的实验室方法有直接免疫荧光或组化染色,病毒分离培养,抗原乳胶凝集实验,血清抗体检测以及 PCR 分子技术。上述方法各有优势和不足。免疫荧光染色或免疫组化染色,是直接检测细胞内的 HSV 特异性抗原,可作为确诊性实验。不过病损皮肤粘膜的脱落细胞采集环节比较困难,降低了灵敏度。病毒分离培养是 HSV 感染

实验室最敏感的诊断方法,可对 HSV 病毒分离株进行分型。但细胞培养费时、费事,限制了在临床检验中的应用。抗原乳胶凝集试验是利用特异性的单克隆抗体与乳胶分子颗粒结合成复合物,当血清中有 HSV 抗原存在时,就会形成抗原-抗体-胶乳聚合物,出现肉眼可见的凝集现象。该方法优点是不需要特殊仪器,操作简便快速,适用于大批量标本的筛查。不过敏感性差,检出率只有 50%。PCR 技术检测灵敏度高,可检测到小至 3 个 PFU 的病毒量,已初步显出在临床病毒检验中的优越性。但是 PCR 方法灵敏度高,操作技术要求高,易污染而致假阳性,还需要人才技术培训、特殊仪器和进口试剂,目前在普及和推广方面仍有困难。

检测 HSV 血清学抗体仍是临床上最常用的判断 HSV 感染的方法,目前 HSV 特异性抗体主要有 IgG 和 IgM 两类^[15]。HSV-IgM 在 HSV 感染后 3~5 天即可出现,持续 12~16 周左右,因此免疫学检测血清中 HSV 特异性抗体 IgM 呈阳性则提示有活动性感染,在优生优育及器官移植等方面有重大的临床意义。目前国内临床有关 HSV-IgM 检测的方法主要以酶联免疫法为主,灵敏度低、准确性和特异性差。

HSV IgM 检测从方法原理又可以分为“间接法”和“捕获法”两种。前者需要包被特异性抗原,标记抗人 IgM 抗体,这种方法受血清中高浓度的 IgG 抗体和类风湿因子的影响非常大,需要对样本进行特殊的预处理,处理的效果受稀释液的成份、浓度和时间等影响;后者包被抗人 IgM 抗体,标记特异性抗原或者抗原-抗体复合物,该方法已经被证明了不受血清中高浓度的 IgG 抗体和类风湿因子等成分干扰^[16-17]。“捕获法”根据标记物不同而分为不同的形式,如标记抗原或者抗体^[16,18]。直接抗原标记很容易覆盖抗原表位,容易导致在抗原免疫反应中出现假阴性^[19];标记特异性抗体,形成抗原-抗体标记复合物被认为可以最大限度地保持抗原的活性^[8]。

本研究应用 TRFIA 的方法,基于特异性好的“捕获法”反应模式,成功研制的试剂盒灵敏度与 ELISA 比较有较大的提高,分析内精密性和分析间精密性均小于 10%,商业化的血清盘检测结果中,阳性符合率 100%,阴性符合率 100%,在临床样本比较中,自制试剂盒的临床敏感性达 100%,临床特异性达 98.88%,表明本研究自制的 TRFIA 法 HSV IgM 试剂盒具有灵敏度高、特异性精密性好的特点,具备良好的临床适用性,能为临床 HSV 的检测提供一个科学的、可靠的诊断依据。

参考文献

- [1] Kollias CM, Huneke RB, Wigdahl B, et al. Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis [J]. *J Neurovirol*, 2015, 21(1): 8-23.
- [2] Johnston C, Corey L. Current Concepts for Genital Herpes Simplex Virus Infection: Diagnostics and Pathogenesis of Genital Tract Shedding [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2016, 29(1): 149-161.
- [3] Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, et al. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies [J]. *AIDS*, 2006, 20(1): 73-83.
- [4] Roberts CM, Pfister JR, Spear SJ. Increasing Proportion of Herpes Simplex Virus Type 1 as a Cause of Genital Herpes Infection in College Students [J]. *Sex Transm Dis*, 2003, 30(10): 797-800.
- [5] Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes [J]. *The Lancet*, 370(9605): 2127-2137.
- [6] 周小涛, 马智超, 朱奕, 等. 一起新生儿口腔疱疹炎医院感染暴发流行病学调查 [J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(7): 992-994.
Zhou XT, Ma ZC, Zhu Y, et al. Epidemiological investigation on a hospital infection outbreak of newborns with oral herpes inflammation [J]. *J Trop Med*, 2015, 15(7): 992-994.
- [7] Skendzel LP. Rubella Immunity Defining the Level of Protective Antibody [J]. *Am J Clin Pathol*, 1996, 106(2): 170-174.
- [8] Zhou J, Lei L, Liang Q, et al. Dual-labeled time-resolved immunofluorometric assay for the determination of IgM antibodies to rubella virus and cytomegalovirus in human serum [J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(9): 603-608.
- [9] Chen J, Liu T, Chen Z, et al. Development of a Time-Resolved Fluorescence Immunoassay for Epstein-Barr Virus Zta IgA Antibodies in Human Serum [J]. *Viral Immunol*, 2015, 28(3): 179-183.
- [10] 王贤柱, 李玖军. 儿童单纯疱疹病毒脑炎诊治进展 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2014, 29(2): 155-158.
Wang XZ, Li JJ. Progress in diagnosis and treatment of herpes simplex virus encephalitis in children [J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics*, 2014, 29(2): 155-158.
- [11] 徐婉芳, 刘彦慧. 弓形体、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒病原体检测与自然流产的相关性研究 [J]. *当代医学*, 2013, 19(9): 22-23.
Xu WF, Liu YH. Toxicity of toxoplasmosis, rubella virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus pathogen and spontaneous abortion [J]. *Contemporary Medicine*, 2013, 19(9): 22-23.
- [12] 唐婕, 吴韶清, 潘敏. 广州市育龄妇女 TORCH 筛查回顾性分析 [J]. *热带医学杂志*, 2015, 15(6): 850-853.
Tang J, Wu SQ, Pan M. The retrospective analysis of TORCH screening in reproductive-age women in Guangzhou [J]. *J Trop Med*, 2015, 15(6): 850-853.
- [13] 覃仕锋, 罗洪斌, 李春美. 血清学指标检测在单纯疱疹病毒感染诊断中的临床价值 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(20): 4589-4591.
Tan SF, Luo HB, Li CM. Clinical value of serological indicators detection in the diagnosis of herpes simplex virus infection [J]. *Chin J Nosocomiol* Vol, 2015, 25(20): 4589-4591.
- [14] 张晓航, 吴嘉平, 贾哲甫, 等. 上海口岸入境人员单纯疱疹病毒 II 型抗体检测及其流行病学特征 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2015, 38(4): 238-241.
Zhang XH, Wu JP, Tan ZF, et al. Prevalence and characteristics of type 2 herpes simplex virus infection among persons entering China at Shanghai port [J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 2015, 38(4): 238-241.
- [15] Liang Q, Zhou J, Liu T, et al. Development of a time-resolved fluorescence immunoassay for herpes simplex virus type 1 and type 2 IgG antibodies [J]. *Luminescence*, 2015, 30(5): 649-654.
- [16] Namekar M, Ellis EM, O'Connell M, et al. Evaluation of a New Commercially Available Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Virus Infection [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(9): 3102-3106.
- [17] Lakos G, Teodorescu M. IgM, but not IgA rheumatoid factor interferes with anti-cardiolipin and anti β 2 glycoprotein I measurements: a quantitative analysis [J]. *Lupus*, 2011, 20(6): 614-619.
- [18] Bosshard PP. Usefulness of IgM-specific enzyme immunoassays for serodiagnosis of syphilis: Comparative evaluation of three different assays [J]. *J Infect*, 2013, 67(1): 35-42.
- [19] Stanker L, Scotcher M, Cheng L, et al. A Monoclonal Antibody Based Capture ELISA for Botulinum Neurotoxin Serotype B: Toxin Detection in Food [J]. *Toxins*, 2013, 5(11): 2212-2226.

收稿日期: 2016-09-27