

检测抗水痘-带状疱疹病毒抗体的糖蛋白 ELISA 的建立和初步验证

董金蓉 易应磊 刘芬 陈则

【摘要】 目的 建立抗水痘-带状疱疹病毒(varicella zoster virus, VZV)抗体的 VZV 糖蛋白(glycoprotein, gp)ELISA(VZVgp ELISA),提高抗 VZV 抗体的检测灵敏度。方法 将收获的 VZV 进行超声破碎和亲和层析,得到纯化的 VZVgp。以 VZVgp 作为包被抗原,用筛选的高滴度抗 VZV 抗体阳性血清摸索 ELISA 的相关条件来建立 VZVgp ELISA,并验证该法的特异性、精密度和灵敏度。同时将建立的 VZVgp ELISA 与同类进口试剂盒进行比较。结果 成功建立了检测抗 VZV 抗体的 VZVgp ELISA,该法特异性强、精密度高(变异系数 $<10\%$)、灵敏度高,与国外同类试剂盒检测结果间的差异无统计学意义($\chi^2 = 1.310, P = 0.252$)。结论 建立的 VZVgp ELISA 特异、灵敏,可用于人群血清抗 VZV 抗体的筛查和 VZV 感染的流行病学调查。

【关键词】 疱疹病毒,3 型;酶联免疫吸附测定;糖蛋白类;敏感性与特异性

基金项目: 国家重大新药创制专项(2013ZX09402-302-007);上海市科委科技支撑项目(16431904500)

Establishment and preliminary validation of glycoprotein ELISA for detection of anti-varicella zoster virus antibody Dong Jinrong, Yi Yinglei, Liu Fen, Chen Ze. No. 4 Research Laboratory, Shanghai Institute of Biological Products Co., Ltd., Shanghai 200051, China

Corresponding author: Dong Jinrong, Email: dongjinrong2013@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish glycoprotein ELISA assay for detection of anti-varicella zoster virus (VZV) antibody, in order to improve sensitivity of anti-VZV antibody detection. **Methods** VZV glycoprotein (VZVgp) was prepared from harvested VZV by ultrasonication and affinity chromatography. With VZVgp as coated antigen, ELISA conditions were found out using high titer anti-VZV antibody positive serum. The specificity, precision and sensitivity of VZVgp ELISA were validated. Meanwhile, VZVgp ELISA was compared with similar imported kit. **Results** VZVgp ELISA was successfully established and had high specificity, good precision (coefficient of variation $<10\%$) and high sensitivity. The difference of detection results between VZVgp ELISA and imported kit had no statistical significance ($\chi^2 = 1.310, P = 0.252$). **Conclusion** The established VZVgp ELISA has good specificity and sensitivity, and can be used for screening serum anti-VZV antibody in population and carrying on epidemiological investigation of VZV infection.

【Key words】 Herpesvirus 3, human; Enzyme-linked immunosorbent assay; Glycoproteins; Sensitivity and specificity

Fund program: National Science and Technology Major Project of China for “Major New Drugs Innovation and Development” (2013ZX09402-302-007); The Shanghai Municipal Science and Technology Support Project(16431904500)

水痘-带状疱疹病毒(varicella zoster virus, VZV)

是导致水痘和带状疱疹的主要病原体,在儿童初次感染引起水痘后,随着年龄逐渐增长和免疫水平下降,潜伏在人体神经节内的 VZV 在受到某些刺激后复发感染引起带状疱疹。Merck 公司的水痘减毒

活疫苗 Varivax 于 1995 年获得 FDA 批准,现已在很多国家获准使用。2006 年 5 月, FDA 批准了 Merck 公司的带状疱疹疫苗 Zostavax 用于 60 岁以上人群预防带状疱疹,随后在欧盟诸多国家也获批上市,2011 年批准该疫苗的适用人群扩大到 50 岁以上人群。

水痘减毒活疫苗免疫机体后能诱导细胞和体液免疫应答,由于疫苗株高度减毒,导致免疫后获得的抗 VZV 抗体水平常常比自然感染产生的水平低,但也能提供长期和有效的免疫保护作用,并且抗体水平能持续数年,对预防 VZV 初次感染具有一定的作用^[1]。抗 VZV 抗体水平的检测有诸多方法,包括膜抗原荧光抗体试验(FAMA)、加强型中和试验(ENT)、免疫黏连血凝测定^[2]、水痘(varicella, VAR)全病毒抗原包被的 ELISA(VAR ELISA)、VZV 糖蛋白(glycoprotein, gp)包被的 ELISA(VZVgp ELISA)、时间分辨荧光免疫分析^[3]等,所有的检测方法均可特异地检测到抗 VZV 抗体,但不同方法的特异性与敏感性存在一定的差异,其中 VZVgp ELISA 灵敏度高,客观性强,操作方便,自动化程度高,适于大规模血清的筛查。

目前国外已有商品化 VZVgp ELISA 检测试剂盒,如德国的维润赛润(Virion-Serion)试剂盒^[4],但价格昂贵,不适合在我国推广使用。随着水痘疫苗 2 针免疫法的推广和带状疱疹疫苗的逐步上市,迫切需要开发国产 VZVgp ELISA 试剂盒,用于评价接种者在疫苗免疫前后的抗体水平和健康人群的抗 VZV 抗体阳性率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 VZV 减毒活疫苗 Oka 株(采用冻干的水痘减毒活疫苗),由上海生物制品研究所有限责任公司(上海公司)提供;MRC-5 细胞(37 代以内),购自 ATCC 公司。

1.1.2 血清 研究用血清,采自上海市徐汇区健康献血者和上海公司职工献血者;阴性血清,1 份来自 ELISA 试剂盒,1 份由上海公司第四研究室筛选;WHO 抗 VZV 国际标准参考血清,批号为 W1044,由上海公司第五研究室馈赠。

1.1.3 主要试剂 MEM 培养基和胎牛血清,购自美国 GIBCO 公司;Lentil Lectin Sepharose 4B,购自美国 GE Healthcare 公司;Triton X-100 和 α -甲基甘露糖,购自美国 Sigma 公司;显色液和辣根过氧

化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG 和羊抗鼠 IgG,购自美国 KPL 公司;蛋白定量试剂盒(BCA),购自美国 Pierce 公司;VZVgp ELISA 检测试剂盒,购自德国维润赛润(Virion-Serion)公司;抗 VZVgp、VZVgE 和 VZVgH 单克隆抗体(单抗),由上海公司第四研究室自制。

1.1.4 主要仪器 AKTA explorer 蛋白纯化仪,GE Healthcare 公司产品;超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物科技公司产品;透析袋,美国 Pierce 公司产品;Multiskan MK3 酶标仪、洗板机,均为美国 Thermo 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 VZV 全病毒抗原的制备 用 MEM 和胎牛血清培养 MRC-5 细胞,当细胞密度达到 90% 以上时,按照感染复数(MOI) = 0.01 进行病毒接种,待细胞病变达到 +++,吸弃细胞培养基,用灭菌 PBS 洗涤 2 次,加入乙二胺四乙酸(EDTA)收获病变的细胞,离心后加入冻干稳定剂重悬,以超声波细胞破碎仪进行破碎(超声 3 s,间隔 5 s,总共处理 40 s),1 000 × g 离心 5 min,取上清即为 VZV 全病毒抗原(VAR)。以不接种 VZV 的 MRC-5 细胞抗原作为对照,制备方法同上。

1.2.2 VZVgp 的纯化 细胞培养方法和接毒条件同 1.2.1 项,待细胞病变达到 +++,加入细胞裂解液[20 mmol/L EDTA、100 mmol/L Tris、0.8% 十二烷基硫酸钠(SDS)]至细胞全部脱落,1 000 × g 离心 5 min,收获病毒。对收获的病毒进行 Lentil Lectin Sepharose 4B 亲和纯化:先用平衡缓冲液(pH7.4 的 50 mmol/L Tris、1 mol/L NaCl、1 mmol/L MgCl₂ · 6H₂O、0.1% Triton X-100)进行柱平衡,重复上样 3 次后,用平衡缓冲液再次平衡,然后用 0.2 mmol/L α -甲基甘露糖进行洗脱,得到纯化的 VZVgp。以不接种 VZV 的 MRC-5 细胞制备纯化的 MRC-5 细胞 gp(MCgp),方法同上。

1.2.3 纯化的 VZVgp 的鉴定 采用蛋白质印迹法对纯化的 VZVgp 进行特异性验证:各取 10 μ l 纯化的 VZVgp 和 MCgp 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳结束后将电泳装置置于冰浴中恒流 400 mA 转膜 60 min;转膜完成后将聚偏氟乙烯膜(PVDF)放入洗涤缓冲液(PBST)中洗涤 3 次,5 min/次;将洗涤后的 PVDF 放入含 5% 脱脂奶粉的 PBS 中 37 °C 封闭 1 h;选择抗 3 种含量丰富的 VZVgp(VZVgB、VZVgE 和 VZVgH) 抗体,用含

5%脱脂奶粉的 PBS 将抗体稀释 1 000 倍,并将 PVDF 放入抗体溶液中室温反应 1 h;洗涤 3 次后加入稀释 3 000 倍的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,室温反应 1 h;洗涤 3 次后加入显色液 TMB 显色。同时将纯化的 gp(VZV_{gp} 或 MC_{gp})装入透析袋置于 PBS 中 4 °C 透析过夜,用蛋白定量试剂盒(BCA)测定 VZV_{gp} 和 MC_{gp} 的浓度。

1.2.4 VZV_{gp} ELISA 的建立 先用 VAR ELISA 对 188 份研究用血清进行初筛,并以进口试剂盒中的阳性血清和阴性血清做对照,发现 99%以上血清均为阳性血清,选择其中 1 份高滴度抗 VZV 阳性血清(6 号)进行 VZV_{gp} ELISA 条件摸索。

1.2.4.1 最适包被抗原浓度的确定 采用方阵滴定法确定包被抗原浓度的最适浓度:分别将 VZV_{gp} 稀释为 0.625、1.250、2.500、5.000 mg/L 包被 96 孔酶标板,4 °C 包被过夜后,用 PBST 洗涤 3 次,3 min/次;将筛选的高滴度阳性血清和阴性血清按 1:100、1:400、1:1 600、1:6 400、1:25 600 梯度稀释后,加入酶标板的相应孔(100 μl/孔),37 °C 孵育 60 min 后用 PBST 洗涤 5 次;将 HRP 标记的羊抗人 IgG 二抗按照 1:8 000 稀释后加入各孔(100 μl/孔),37 °C 孵育 60 min 后用 PBST 洗涤 5 次;每孔加入 100 μl 显色液于 25 °C 孵育 10 min 后,加入终止液(100 μl/孔)终止反应;用酶标仪于 450 nm 波长处测定溶液的吸光度(A)。将 VZV_{gp} 和 MC_{gp} 的实测 A 值分别减去空白对照 A 值进行校正,根据 $A_{VZV_{gp}}/A_{MC_{gp}}$ 的比值来判定检测结果,规定 $A_{VZV_{gp}}/A_{MC_{gp}} > 2.1$ 判为阳性,其最高稀释度的倒数为血清抗体滴度。

1.2.4.2 特异性、精密度和灵敏度验证 将 10 μl 筛选的高滴度阳性血清(6 号)与 50 μg 纯化的 gp(VZV_{gp} 或 MC_{gp})于 25 °C 孵育 18 h 并按不同比例稀释后,分别用 VZV_{gp} 和 MC_{gp} 包被的 ELISA 检测处理血清的抗 VZV IgG 抗体活性,验证 VZV_{gp} ELISA 的检测特异性。

用同一批纯化的 VZV_{gp} 包被同一块酶标板后,由 3 名操作者按照建立的 VZV_{gp} ELISA 检测同一份阳性血清,验证 VZV_{gp} ELISA 的检测精密度,规定 $A_{VZV_{gp}}$ 的变异系数(coefficient of variation, CV)应 < 15%。

将阳性血清进行不同比例的稀释后,分别用建立的 VZV_{gp} ELISA 和 VAR ELISA 检测样品,根据 $A_{抗原}/A_{对照}$ 的比值来判断这 2 种 ELISA 方法的

检测灵敏度。

1.2.5 与同类进口试剂盒的比较 分别用建立的 VZV_{gp} ELISA 和进口试剂盒同时检测阳性血清(45 份)、阴性血清(2 份)和 WHO 国际标准参考血清(1 份),比较这 2 种 ELISA 试剂盒的检测结果。

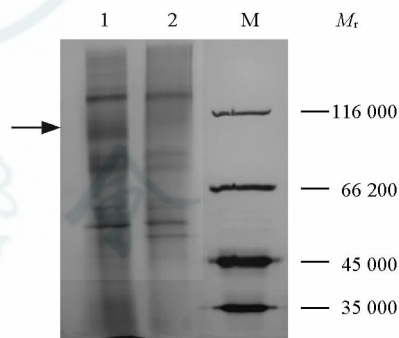
1.2.6 建立的 VZV_{gp} ELISA 的初步应用 用建立的 VZV_{gp} ELISA 和进口试剂盒同时检测 188 份研究用血清,比较用这 2 种试剂盒检测获得的血清阳性率。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS21.0 统计软件,以 χ^2 检验分析 VZV_{gp} ELISA 与进口试剂盒检测结果间的差异, $P > 0.05$ 为差异无统计学意义。

2 结果

2.1 VZV_{gp} 的提取和鉴定

纯化的 VZV_{gp} 和 MC_{gp} 经 SDS-PAGE 显示,前者在相对分子质量(M_r)80 000~90 000 处可见到明显的条带(图 1),与报道的 VZVgE M_r 一致;进一步用抗 VZVgB、VZVgE 和 VZVgH 单抗进行蛋白质印迹法显示,在 M_r 约 70 000、80 000~90 000 和约 110 000 处可分别见到与抗 VZVgB、VZVgE 和 VZVgH 单抗反应的条带(图 2),表明制备的蛋白为 VZV_{gp}。用蛋白定量试剂盒(BCA)检测显示,VZV_{gp} 和 MC_{gp} 的质量浓度分别为 225 和 167 mg/L。



注: M: marker; 1: 纯化的水痘-带状疱疹病毒糖蛋白; 2: 纯化的 MRC-5 细胞糖蛋白(对照)

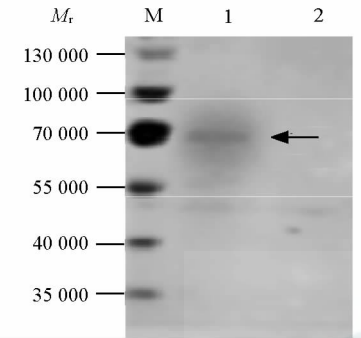
图 1 纯化的水痘-带状疱疹病毒糖蛋白的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

2.2 VZV_{gp} ELISA 的建立

2.2.1 最适包被抗原浓度的确定 表 1 显示,血清在稀释度为 1:25 600 时,VZV_{gp} 以 5.000、2.500 和 1.250 mg/L 质量浓度包被获得的 $A_{VZV_{gp}}/A_{MC_{gp}} > 2.1$,但以 0.625 mg/L 质量浓度包被获得的 $A_{VZV_{gp}}/A_{MC_{gp}} < 2.1$,因此,确定 VZV_{gp} 的最适包板浓度为 1.250 mg/L。

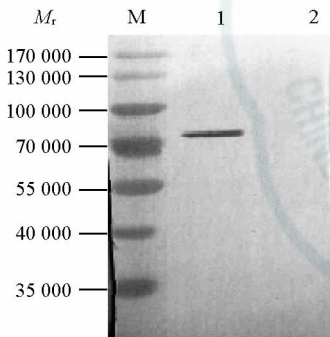
2.2.2 VZV_{gp} ELISA 的验证结果

2.2.2.1 特异性 表 2 显示, VZV_{gp} ELISA 检测未处理血清获得的 A 值明显高于经 VZV_{gp} 吸附的血清, 但与经 MC_{gp} 吸附的血清相当, 表明 VZV_{gp} ELISA 可特异性检测血清抗 VZV 抗体。



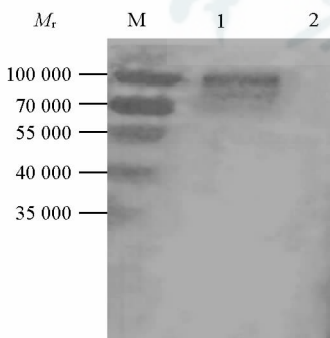
用抗水痘-带状疱疹病毒糖蛋白 B 单克隆抗体检测的蛋白质印迹图谱

(A)



用抗水痘-带状疱疹病毒糖蛋白 E 单克隆抗体检测的蛋白质印迹图谱

(B)



用抗水痘-带状疱疹病毒糖蛋白 H 单克隆抗体检测的蛋白质印迹图谱

(C)

注: M: marker; 1: 纯化的水痘-带状疱疹病毒糖蛋白; 2: 纯化的 MRC-5 细胞糖蛋白

表 1 VZV_{gp} 的最适包被浓度确定

血清 稀释度	抗原包被浓度 /(mg/L)	A _{VZV_{gp}}	A _{MC_{gp}}	A _{VZV_{gp}} /A _{MC_{gp}}
1 : 100	5.000	2.953	0.521	5.67
	2.500	2.917	0.375	7.78
	1.250	2.900	0.397	7.30
	0.625	2.616	0.430	6.08
1 : 400	5.000	2.500	0.159	15.72
	2.500	2.459	0.196	12.55
	1.250	2.382	0.224	10.63
	0.625	1.814	0.182	9.97
1 : 1 600	5.000	1.361	0.096	14.18
	2.500	1.396	0.098	14.24
	1.250	1.198	0.107	11.20
	0.625	0.802	0.127	6.31
1 : 6 400	5.000	0.499	0.081	6.16
	2.500	0.528	0.082	6.44
	1.250	0.416	0.101	4.12
	0.625	0.277	0.070	3.96
1 : 25 600	5.000	0.186	0.078	2.38
	2.500	0.214	0.075	2.85
	1.250	0.179	0.075	2.39
	0.625	0.121	0.079	1.53

注: VZV_{gp}: 水痘-带状疱疹病毒糖蛋白; A: 吸光度; MC_{gp}: MRC-5 细胞糖蛋白

表 2 VZV_{gp} ELISA 的特异性验证结果

血清	稀释度	吸光度值	
		VZV _{gp} 包被的 ELISA	MC _{gp} 包被的 ELISA
经 VZV _{gp} 处理	1 : 400	0.747	0.706
	1 : 1 600	0.348	0.303
	1 : 6 400	0.129	0.136
	1 : 25 600	0.092	0.105
经 MC _{gp} 处理	1 : 400	2.175	0.289
	1 : 1 600	0.989	0.146
	1 : 6 400	0.336	0.093
	1 : 25 600	0.161	0.074
未经处理	1 : 400	1.838	0.242
	1 : 1 600	0.716	0.144
	1 : 6 400	0.261	0.091
	1 : 25 600	0.107	0.071

注: VZV_{gp}: 水痘-带状疱疹病毒糖蛋白; MC_{gp}: MRC-5 细胞糖蛋白

2.2.2.2 精密度 由 3 名不同的操作者检测同一份血清显示, 各稀释度血清 A 值的 CV 均 < 10%, 表明建立的 VZV_{gp} ELISA 精密度良好(表 3)。

图 2 纯化的水痘-带状疱疹病毒糖蛋白的鉴定结果

表 3 VZVgp ELISA 的精密度验证结果

血清稀释度	A_{VZVgp}			CV/%	A_{MCgp}			CV/%
	1	2	3		1	2	3	
1 : 400	1.863	1.748	1.859	3.58	0.414	0.363	0.426	8.34
1 : 1 600	0.871	0.791	0.878	5.71	0.189	0.184	0.191	1.92
1 : 6 400	0.356	0.326	0.312	6.78	0.114	0.111	0.105	4.17
1 : 25 600	0.156	0.152	0.140	5.58	0.080	0.089	0.083	5.46

注: VZVgp:水痘-带状疱疹病毒糖蛋白; A:吸光度; CV:变异系数; MCgp:MRC-5 细胞糖蛋白

2.2.2.3 灵敏度 表 4 显示,采用 VAR ELISA 检测血清抗 VZV 抗体时,血清稀释度 < 1 : 6 400 获得的 $A_{\text{包被抗原}}/A_{\text{对照抗原}} > 2.1$,血清稀释度为 1 : 12 800 获得的 $A_{\text{包被抗原}}/A_{\text{对照抗原}} < 2.1$,因此 VAR ELISA 可检测的抗 VZV 抗体的最高滴度为 6 400;采用 VZVgp ELISA 检测血清抗 VZV 抗体时,血清稀释度为 1 : 25 600 获得的 $A_{\text{包被抗原}}/A_{\text{对照抗原}} > 2.1$,血清稀释度为 1 : 51 200 获得的 $A_{\text{包被抗原}}/A_{\text{对照抗原}} < 2.1$,因此建立的 VZVgp ELISA 可检测的抗 VZV 抗体的最高滴度为 25 600。研究表明,建立的 VZVgp ELISA 的检测灵敏度比 VAR ELISA 高 4 倍。

表 4 VZVgp ELISA 与 VAR ELISA 的灵敏度比较

血清稀释度	$A_{\text{包被抗原}}/A_{\text{对照抗原}}$	
	VAR ELISA	VZVgp ELISA
1 : 400	5.75	7.48
1 : 800	4.93	9.18
1 : 1 600	3.99	8.22
1 : 3 200	3.50	6.55
1 : 6 400	2.84	5.25
1 : 12 800	1.99	3.23
1 : 25 600	1.75	2.33
1 : 51 200	1.34	1.74

注: VZVgp:水痘-带状疱疹病毒糖蛋白; VAR:水痘-带状疱疹病毒全病毒抗原; A:吸光度

2.3 建立的 VZVgp ELISA 与进口试剂盒的比较

分别用 VZVgp ELISA 和进口试剂盒检测 WHO 国际标准参考血清(1 份)、自制的阳性血清(45 份)和阴性血清(1 份)以及进口试剂盒中的阴性血清(1 份),2 种试剂盒的检测结果一致(表 5)。

2.4 建立的 VZVgp ELISA 的初步应用

分别用 VZVgp ELISA 和进口试剂盒检测 188

份阳性血清显示(表 6),建立的 VZVgp ELISA 的阳性抗体检出率为 98.9%(186/188),进口试剂盒为 97.3%(183/188),两者的差异无统计学意义($\chi^2 = 1.310, P = 0.252$),表明建立的 VZVgp ELISA 可用于抗 VZV 抗体检测。

表 5 VZVgp ELISA 与进口试剂盒的检测一致性比较

待检血清	n	VZVgp ELISA	进口试剂盒
WHO 国际标准参考血清	1	阳性	阳性
自制的阳性血清	45	阳性	阳性
自制的阴性血清	1	阴性	阴性
进口试剂盒中的阴性血清	1	阴性	阴性

注: VZVgp:水痘-带状疱疹病毒糖蛋白

表 6 VZVgp ELISA 与进口试剂盒的阳性抗体检出结果比较(份)

进口试剂盒	VZVgp ELISA		
	阳性	阴性	合计
阳性	183	0	183
阴性	0	1	1
可疑	3	1	4
合计	186	2	188

注: VZVgp:水痘-带状疱疹病毒糖蛋白

3 讨论

在此项研究中,我们根据 VZVgp 的特性,采用亲和层析方法对 VZVgp 进行提纯,并用抗 3 种主要 VZVgp 的单抗(抗 VZVgB、VZVgE 和 VZVgH 单抗)对纯化产物进行蛋白质印迹法检测显示,纯化的 VZVgp 可分别与抗 VZVgB、VZVgE 和 VZVgH 单抗发生特异性反应,获得的 M_r 均与文献报道相一致^[5],表明制备的产物为 VZVgp。

我们采用方阵滴定法对建立 VZVgp ELISA 进

行最适包被抗原浓度研究,并确定最适包被抗原浓度为 1.250 mg/L。在对建立的 VZVgp ELISA 进行特异性验证时发现,该方法可特异性检出抗 VZV 抗体,然而,在进行特异性验证时因未找到抗单纯疱疹病毒 1 型/2 型或巨细胞病毒阳性血清以及抗 VZV 阴性血清,因此未进行交叉反应研究,嗣后拟进行进一步的特异性验证。在对建立的 VZVgp ELISA 进行灵敏度验证时发现,由于 VZVgp ELISA 采用纯度较高的 VZVgp 进行包板,因此 VZVgp ELISA 比 VAR ELISA 具有更高的灵敏度,最高抗体检测滴度比 VAR ELISA 提高约 4 倍,该结果与文献报道相一致^[6]。

据报道,检测抗 VZV 抗体有多种方法,其中 FAMA 在国内被认为是抗 VZV 抗体检测的“金标准”^[7],但该法劳动强度大,耗时较长,且对检测结果的判定具有较强的主观性^[4];ELISA 是 WHO 推荐的诊断 VZV 感染的常规方法^[8],具有特异性高、重复性好、操作简便、自动化程度高、客观性强等优点,适于大批量血清筛查,且该法已在相关疫苗临床研究中得到广泛应用^[9-10]。鉴于不同抗 VZV 抗体检测方法的特异性和灵敏度存在一定的差异,其中检测含较低水平抗 VZV 抗体的血清时,不同方法的灵敏度依次为 gp ELISA \approx ENT $>$ VAR ELISA \approx FAMA^[11],因此,我们将在后续研究中用 VZVgp ELISA 检测不同滴度(高、中、低)的抗血清并进行比较。

在此项研究中,由于筛到的阴性血清有限,所以规定 $A_{\text{包被抗原}}/A_{\text{对照抗原}} > 2.1$ 判作阳性。研究显示,建立的 VZVgp ELISA 对 188 份血清的检测结果与进口试验盒基本一致,检出阳性率间的差异无统计学意义($\chi^2 = 1.310, P = 0.252$)。这表明,我们已成功建立特异性强、灵敏度高的 VZVgp ELISA。后续我们将对 VZVgp ELISA 进行优化,使其能更准确地检出抗 VZV 抗体并进行定量,同时进一步提高其检测灵敏度。

参考文献

[1] Weinberg A, Levin MJ. VZV T cell-mediated immunity [J]. *Curr Top Microbiol Immuno*, 2010, 342: 341-357. DOI: 10.

1007/82_2010_31.

- [2] Gershon AA, Kalter ZG, Steinberg S, et al. Detection of antibody to varicella-zoster virus by immune adherence hemagglutination [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1976, 151(4): 762-765. DOI: 10.3181/00379727-151-39302.
- [3] Maple PA, Gray J, Breuer J, et al. Performance of a time-resolved fluorescence immunoassay for measuring varicella-zoster virus immunoglobulin G levels in adults and comparison with commercial enzyme immunoassays and Merck glycoprotein enzyme immunoassay [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(2): 214-218. DOI: 10.1128/CVI.13.2.214-218.2006.
- [4] Sauerbrei A, Wutzler P. Serological detection of varicella-zoster virus-specific immunoglobulin G by an enzyme-linked immunosorbent assay using glycoprotein antigen [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3094-3097. DOI: 10.1128/JCM.00719-06.
- [5] Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology* [M]. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 2786-2787.
- [6] Wasmuth EH, Miller WJ. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for antibody to varicella-zoster virus using purified VZV glycoprotein antigen [J]. *J Med Virol*, 1990, 32(3): 189-193. DOI: 10.1002/jmv.1890320310.
- [7] Krah DL. Assays for antibodies to varicella-zoster virus [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 1996, 10(3): 507-527. DOI: 10.1016/S0891-5520(05)70311-1.
- [8] World Health Organization. Requirements for varicella vaccine (live) [J]. *WHO Technical Report Series*, 1985(725): 102-133.
- [9] White CJ, Kuter BJ, Hildebrand CS, et al. Varicella vaccine (VARIVAX) in healthy children and adolescents: results from clinical trials, 1987 to 1989 [J]. *Pediatrics*, 1991, 87(5): 604-610.
- [10] Levin MJ, Oxman MN, Zhang JH, et al. Varicella-zoster virus-specific immune responses in elderly recipients of a herpes zoster vaccine [J]. *J Infect Dis*, 2008, 197(6): 825-835. DOI: 10.1086/528696.
- [11] Provost PJ, Krah DL, Kuter BJ, et al. Antibody assays suitable for assessing immune responses to live varicella vaccine [J]. *Vaccine*, 1991, 9(2): 111-116. DOI: 10.1016/0264-410X(91)90266-9.

(收稿日期:2016-08-30)