

水痘-带状疱疹病毒膜抗原荧光抗体试验的建立与评价

袁萍 徐水民 应通峰 王月红 费哲颖 王明丽 兰永发 张林亚 朱为

【摘要】 目的 建立用于检测血清中水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)特异性抗体的膜抗原荧光抗体(fluorescent antibody to membrane antigen, FAMA)试验并对其验证和评价。方法 用 VZV 感染细胞作为抗原制备抗原载玻片,以异硫氰酸荧光素标记的羊抗人 IgG 为二抗建立 FAMA 试验。对试验的灵敏度、特异性和重复性进行验证。用 FAMA 试验和市售 ELISA 试剂盒对 200 份血浆样品中的抗 VZV 抗体进行检测。采用 Spearman 秩相关检验对两种方法的检测结果进行比较。结果 FAMA 试验的灵敏度为 0.04 IU/ml,与常见的人疱疹病毒(单纯疱疹病毒 1 和 2 型、人巨细胞病毒)没有交叉反应且重复性良好。经 FAMA 试验检测,200 份血浆样品的抗体阳性率为 93.5%,抗体几何平均效价为 1:18.1,检测结果与市售 ELISA 试剂盒的符合率为 90.0%。两种方法的检测结果具有相关性,Spearman 秩相关系数为 0.49, $P < 0.0001$ 。结论 建立的方法具有良好的灵敏度、特异性和重复性,可用于血清中抗 VZV 抗体的检测。

【关键词】 荧光抗体技术; 疱疹病毒 3 型,人; 免疫球蛋白 G

Establishment and evaluation of a fluorescent antibody to membrane antigen test for varicella-zoster virus

Yuan Ping*, Xu Shuimin, Ying Tongfeng, Wang Yuehong, Fei Zheyang, Wang Mingli, Lan Yongfa, Zhang Linya, Zhu Wei. *No. 3 Research Laboratory, Shanghai Institute of Biological Products Co., Ltd., Shanghai 200051, China

Corresponding author: Zhu Wei, Email: zhuwei_sibp@163.com

【Abstract】 **Objective** To develop and evaluate a fluorescent antibody to membrane antigen (FAMA) test for detection of varicella-zoster virus (VZV)-specific antibody in plasma. **Methods** The FAMA test was established with VZV-infected cells as fixed antigen and fluorescein isothiocyanate labeled goat anti-human IgG as secondary antibody. The sensitivity, specificity and repeatability of the technique were validated. The antibodies in 200 plasma samples were determined with the established test and a commercial ELISA kit. The detection results of two methods were compared using Spearman's rank correlation test. **Results** FAMA test had high sensitivity with the detecting limit of 0.04 IU/ml. No cross reaction with other herpesviruses, such as herpes simplex virus (HSV) 1, 2 and human cytomegalovirus was observed. The antibody positive rate and geometric mean titer of 200 samples determined by FAMA test were 93.5% and 1:18.1, respectively. The result coincidence rate of FAMA test with the ELISA kit was 90.0%. The results of two methods were correlated with Spearman's rank correlation coefficient 0.49, $P < 0.0001$. **Conclusion** The developed method has good sensitivity, specificity and repeatability, and can be applied for detecting anti-VZV antibodies in sera.

【Key words】 Fluorescent antibody technique; Herpesvirus 3, human; Immunoglobulin G

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4211.2018.03.006

作者单位: 200051 上海生物制品研究所有限责任公司第三研究室(袁萍、王月红、兰永发、张林亚、朱为), 疫苗三室(应通峰); 200051 国药集团上海血液制品有限公司血源管理部(徐水民、费哲颖); 230032 合肥, 安徽医科大学微生物学教研室(王明丽)

通信作者: 朱为, Email: zhuwei_sibp@163.com

接种疫苗是预防和控制水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 传播的最有效手段。为评价疫苗接种效果,需要对血清中抗 VZV IgG 抗体进行检测。常用的检测方法有膜抗原荧光抗体 (fluorescent antibody to membrane antigen, FAMA) 试验、ELISA、间接免疫荧光抗体试验、免疫吸附血凝试验、补体扩大中和试验和放射免疫试验等^[1]。FAMA 试验是以感染 VZV 的细胞为抗原,待检样品为一抗,荧光标记的抗人 IgG 为二抗,检测样品中的 VZV 特异性 IgG 抗体。形成的抗原抗体复合物主要位于感染细胞表面,在荧光显微镜下可见独特的环状膜荧光^[2-3]。FAMA 试验具有良好的灵敏度、特异性和重复性,能很好地反映待检样品中的抗 VZV 抗体,所以被称为抗 VZV 抗体检测的“金标准”^[4]。本研究的目的是在实验室建立 FAMA 试验并对其进行验证和评价。

1 材料与方 法

1.1 病毒、细胞和标准品

VZV Oka 株由上海生物制品研究所有限责任公司(上海公司)疫苗三室提供,MRC-5 人二倍体细胞由第三研究室保存;人抗 VZV-IgG 国际标准品(10 IU/ml)购自英国国家生物标准与检定所。

1.2 试剂和仪器

胰蛋白酶消化液、胎牛血清和细胞培养基购自美国 Life Technologies 公司;异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的羊抗人、羊抗兔 IgG 购自美国 SouthernBiotech 公司;伊文思蓝染色液由上海公司第四研究室提供;12 孔载玻片购自美国 Electron Microscopy Sciences 公司;甲醛溶液购自国药集团化学试剂有限公司;VZV IgG ELISA 试剂盒购自德国 Virion Serion 公司;IX71 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 待检样品和对照样品

VZV 人免疫球蛋白(50 IU/ml)和 200 份献浆员血浆由国药集团上海血液制品有限公司提供;兔抗单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)1 和 2 型、人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)血清由安徽医科大学微生物教研室提供。

1.4 抗原载玻片的制备

用 VZV 感染单层 MRC-5 细胞,待细胞病变达 50%,用胰蛋白酶消化。将病变细胞移至离心管中,180 × g,离心 15 min。用 PBS 重悬细胞并计数。调整细胞密度至 1.5 × 10⁵/ml,将感染细胞加至 12 孔

载玻片,40 μl/孔。晾干后将载玻片置于 1% 甲醛溶液固定 1 h,用 PBS 洗 3 次后晾干, -20 °C 保存。同时制备正常 MRC-5 细胞载玻片作为对照。

1.5 FAMA 试验

1.5.1 操作步骤 将待检样品用 PBS 2 倍系列稀释后,加至感染细胞抗原载玻片,20 μl/孔。置湿盒中 37 °C 1 h。用 PBS 浸润洗 3 次,每次 5 min,晾干。将 FITC 标记的羊抗人 IgG 以 0.01% 伊文思蓝染色液 1 : 200 稀释后加至载玻片,20 μl/孔。置湿盒中 37 °C 1 h。用 PBS 浸润洗 3 次,每次 5 min,晾干。于荧光显微镜下观察结果,细胞表面出现环状荧光判为阳性,未出现完整的环状荧光或仅见灰色背景判为阴性。抗体效价 ≥ 1 : 4 判定样品为阳性。

1.5.2 灵敏度检测 将人抗 VZV-IgG 国际标准品 2 倍系列稀释至 2¹⁰,每个稀释度做 2 个复孔,按上述步骤进行试验。

1.5.3 特异性检测 将人抗 VZV-IgG 国际标准品加入正常 MRC-5 细胞载玻片,按上述步骤进行试验;将兔抗 HSV-1、HSV-2、HCMV 血清加入病变细胞载玻片,采用 FITC 标记的羊抗兔 IgG,按上述步骤进行试验。

1.5.4 重复性检测 将 VZV 人免疫球蛋白 2 倍系列稀释至 2¹⁵,每个稀释度做 2 个复孔,按上述步骤进行试验。

1.6 ELISA 操作步骤

按试剂盒操作步骤进行。所用溶液均由试剂盒提供,阳性和阴性对照血清无需稀释直接使用。将样品按 1 : 100(10 μl + 1 000 μl)稀释后加入微孔板内,每孔 100 μl,每块板设 1 个底物空白孔、1 个阴性对照孔和 2 个阳性对照孔。置湿盒中 37 °C 孵育 60 min 后,甩去孔内液体,加入 300 μl 洗涤缓冲液;甩去洗涤液,重复洗涤 4 次,拍干。加入底物溶液,每孔 100 μl。置湿盒中 37 °C 孵育 30 min 后,加入 100 μl 终止液终止反应。读取 405 nm 处的吸光度(A)值。底物空白的 A 值应 < 0.25,阴性对照必须为阴性,阳性对照的平均 A 值必须在 0.43 至 1.45 之间(减去底物空白 A 值后)。抗体浓度 > 100 mIU/ml 为阳性, < 50 mIU/ml 为阴性, 50 ~ 100 mIU/ml 为临界值,临界值样品需重新检测。

1.7 血浆样品检测

分别采用 FAMA 试验和 ELISA 对 200 份血浆进行检测。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行分析, 两种方法检测结果的比较采用 Spearman 秩相关检验($\alpha = 0.05$), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAMA 试验结果观察与判定

阳性样品中的抗体与感染细胞表面抗原形成抗原抗体复合物, 呈现完整的荧光环且背景为灰色; 若细胞边缘荧光环不完整, 或仅见灰色背景, 则为阴性, 见图 1。

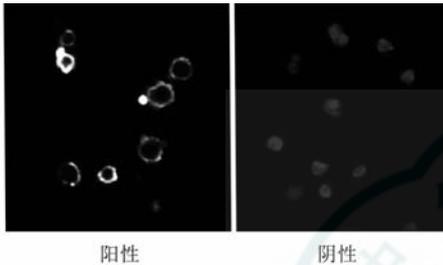


图 1 水痘-带状疱疹病毒膜抗原荧光抗体试验结果

2.2 灵敏度

标准品稀释至 256 倍仍可见阳性结果, 因此本方法的灵敏度为 0.04 IU/ml。

2.3 特异性

标准品与正常 MRC-5 细胞反应结果呈阴性, 兔抗 HSV-1、HSV-2、HCMV 血清与病变细胞反应结果均为阴性, 表明建立的试验特异性良好。

2.4 重复性

对 VZV 人免疫球蛋白进行多次检测, 平均效价为 1 : 1 448 (95% 置信区间为 1 : 1 062 ~ 1 : 1 974, $n = 8$), 相当于 57.9 IU/ml。样品效价上下浮动 1 个稀释度, 在允许误差范围内, 说明试验重复性良好。

2.5 血浆样品检测

采用 FAMA 试验和 ELISA 对 200 份血浆样品进行检测, 抗体阳性率分别为 93.5% 和 92.5%, 几何平均效价和几何平均浓度分别为 1 : 18.1 和 318.9 mIU/ml; 两种方法检测结果的符合率为 90.0% (表 1)。检测结果具有相关性, Spearman 秩相关系数为 0.49, $P < 0.000 1$ 。

表 1 FAMA 试验和 ELISA 对 200 份血浆样品中抗 VZV 抗体的检测结果

ELISA	FAMA 试验		合计
	阳性	阴性	
阳性	178	7	185
阴性	9	6	15
合计	187	13	200

注: FAMA: 膜抗原荧光抗体; VZV: 水痘-带状疱疹病毒

3 讨论

我们建立的 FAMA 试验特异性强, 没有发现与其他常见的人疱疹病毒有交叉反应; 灵敏度高, 最低可检出 0.04 IU/ml 抗 VZV 抗体; FITC 标记的荧光二抗采用伊文思蓝染色液进行稀释, 使得阳性结果和阴性结果容易分辨, 从而可将操作者的主观因素降到最低, 保证试验结果的准确性和重复性。该方法的缺点是实验步骤多, 需要进行细胞培养和病毒感染, 难以实现标准化和自动化, 很难进行大批量样品检测。

常用于检测抗 VZV 抗体的方法还有 ELISA。ELISA 的抗原主要有 3 种: VZV 感染细胞提取物、纯化的 VZV 糖蛋白、灭活的 VZV。ELISA 的优点是快速, 一次可以检测大量样品, 缺点是容易受到干扰, 缺乏良好的灵敏度和特异性^[5]。有研究表明, ELISA 检测为阴性的样品经 FAMA 法检测仍有 15% 阳性^[6]。

我们采用 FAMA 法和 ELISA 对献浆员血浆进行检测, 以了解献浆员血浆中的 VZV-IgG 水平。两种方法检测结果的符合率为 90.0%, 抗体几何平均效价和几何平均浓度分别为 1 : 18.1 (相当于 700 mIU/ml) 和 318.9 mIU/ml, 两种方法检测结果具有相关性。

参考文献

- [1] 宋颖丽, 姜典财, 李长贵. 血清中抗水痘病毒 IgG 抗体的检测方法 [J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(4): 415-416.
- [2] 谢云, 李秀玲, 刘立新, 等. 建立膜抗原荧光抗体试验评价北京株冻干水痘疫苗免疫效果 [J]. 微生物免疫学进展, 2005, 33(2): 6-10. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5673.2005.02.002.
- [3] 刘静静, 王明丽, 甘霖, 等. 应用膜抗原荧光抗体试验检测人群水痘-带状疱疹病毒血清抗体阳性率 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(4): 371-375. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.04.016.
- [4] Park R, Hwang JY, Lee KI, et al. Measurement of antibodies to varicella-zoster virus using a virus-free fluorescent-antibody-to-membrane-antigen (FAMA) test [J]. J Microbiol Biotechnol, 2015, 25(2): 268-273.
- [5] Sauerbri 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.
- [6] Heininger U, Braun-Fahrlander C, Desgrandchamps D, et al. Seroprevalence of varicella-zoster virus immunoglobulin G antibodies in Swiss adolescents and risk factor analysis for seronegativity [J]. Pediatr Infect Dis J, 2001, 20(8): 775-778.

(收稿日期: 2017-12-27)