

人细小病毒 B19 IgM 抗体间接 ELISA 检测方法的初步建立*

凌辉生, 储迅涛, 曾敏霞[△](珠海市丽珠试剂股份有限公司, 广东珠海 519060)

【摘要】 目的 利用原核表达并纯化的人细小病毒 B19(HPV B19)结构蛋白 VP1 初步建立 HPV B19 IgM 酶联免疫吸附试验(ELISA)的检测方法。**方法** 以纯化的重组蛋白包被酶标板,建立 IgM 间接 ELISA 检测方法,确定 Cut-off 值,并进行初步的应用。**结果** 建立间接 ELISA 方法 Cut-off 值为 0.25,灵敏度为 84.60%,特异性为 99.70%,与对照试剂盒检测结果符合率为 99.47%;用自产试剂盒检测 115 份孕妇和 1 700 份健康献血志愿者血清中 B19 IgM 抗体,阳性率分别为 12.17%和 1.59%。**结论** 通过包被 HPV B19-VP1 蛋白建立的间接 ELISA 检测方法可用于 HPV B19 早期感染或急性感染的辅助诊断。

【关键词】 人细小病毒 B19; VP1 结构蛋白; 酶联免疫; 辅助诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.05.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)05-0583-03

Development of an indirect enzyme linked immunosorbent assay for detecting IgM antibodies of human parvovirus B19*

LING Hui-sheng, CHU Xun-tao, ZENG Min-xia[△] (Method Reagent co., LTD, Zhuhai, Guangdong 519060, China)

【Abstract】 Objective Investigated prokaryotic expression and purification of structural protein VP1 of human parvovirus B19(HPV B19), and detected HPV infection by an IgM-ELISA method. **Methods** We established and preliminarily applied an indirect ELISA method detecting IgM where the purified recombinant protein(HPV B19-VP1) coated in microtiter plate as immunosorbent. **Results** In this study, we observed that the Cut-off value, sensitivity, and specificity of the IgM-ELISA established were 0.25, 84.6%, and 99.7% respectively. The coincidence rate of determination results by the home made kit and control kit was 99.47%. A total of 1700 serum samples from healthy donors and 115 serum samples from pregnant women were with HPV B19 IgM determined by the IgM-ELISA established, in which the positive rates of B19 IgM were 1.59% and 12.17% respectively. **Conclusion** Our results suggested that the indirect ELISA-IgM, in which HPV B19-VP1 were coated, may be an appropriate assisted method to diagnose the early or acute phase of HPV B19 infection.

【Key words】 human parvovirus B19; VP1 protein; ELISA; diagnostics

人细小病毒 B19(HPV B19)简称 B19 病毒,是 1975 年 Cossart 首次发现的一种单链线状小 DNA 病毒,属于细小病毒科,是目前细小病毒科中唯一引起人类疾病的病原体。B19 病毒能通过胎盘感染胎儿,引起胎儿水肿、自发性流产、死胎和感染性红斑等多种疾病,对胎儿及婴幼儿有较大的危害^[1-2];也可通过血液制品的输注传染给受血者,成为血液制品的主要污染源之一^[3]。因此,研究分析有关 HPV B19 病毒感染的诊断及防治措施,对促进孕妇健康、优生优育及血液制品的安全使用都有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 选择珠海市妇幼保健院孕妇血清、血浆标本 115 份及珠海血站健康献血者血清、血浆样品共 1 700 份作为研究材料。HPV B19-IgM 阴性血清和阳性血清来自珠海市妇幼保健院。

1.2 试剂与仪器 HPV B19-VP1 蛋白购自美国 Fitzgerald 公司,浓度 1.36 mg/mL;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgM(使用滴度 1:5 000)和 IgG-类风湿因子吸收剂购自深圳菲鹏生物有限公司;对照试剂 B19 IgM 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自德国维润赛润研发有限公司;其他如包被

液、封闭液以及显色系统均为本公司自产;ELISA 用 96 孔酶标板(可拆式)购自厦门怡佳美实验器材有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 B19 IgM 间接 ELISA 的建立 棋盘法进行间接 ELISA 最佳试剂工作条件的确定。(1)包被:以系列浓度的包被抗原(1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:4 000、1:5 000、1:6 000)包被酶标板,2~8 ℃ 孵育过夜,次日,弃去孔内溶液,洗涤;(2)封闭:每孔封闭液 120 μL,37 ℃ 条件下孵育 3 h,洗涤;(3)加入待检血清(经 IgG-类风湿因子吸收剂处理),100 微升/孔,37 ℃ 孵育 60 min;洗涤;(4)加酶标二抗:将酶标二抗分别稀释至 1:1 000、1:2 000、1:3 000、1:4 000、1:5 000、1:6 000,加入上述反应孔中,37 ℃ 孵育 30 min,洗涤;(5)底物显色:于各反应孔中加入底物缓冲液、底物液各 50 μL,37 ℃ 孵育 15 min;(6)终止反应:于各反应孔中加入终止液 50 μL;(7)A450/630 值测定,由阳性/阴性(P/N)值选择最佳抗原包被浓度和酶标二抗的最佳工作浓度。

1.3.2 重组蛋白 HPV B19-VP1 包被方式的确定 将重组 HPV B19-VP1 蛋白用包被缓冲液稀释至最佳浓度后,分别采用 37 ℃ 孵育 60、120、180 min 和 2~8 ℃ 过夜包被处理,进行

* 基金项目:广东省教育部产学研结合项目(2011B090400535)。

作者简介:凌辉生,男,在读硕士研究生,从事蛋白质与蛋白质工程研究。△ 通讯作者,E-mail:zengminxia@livzondiagnosics.com。

试验,根据结果计算 P/N 值,选择最佳包被条件。

1.3.3 IgG-类风湿因子吸收剂使用量的确定 按上步试验确定的抗原包被浓度及酶标记物浓度,IgG-类风湿因子按不同比例使用,选择合适的 IgG-类风湿因子吸收剂使用量以及 IgG-类风湿因子吸收剂的最适作用时间和最适反应温度。

1.3.4 酶标二抗最佳工作时间的确定 将酶标二抗稀释至最佳工作浓度后,每孔加入 100 μL,于 37 °C 分别孵育 10、20、30、40、50、60 min,每个反应重复 2 次。其他条件及操作方法相同,进行试验。

1.3.5 底物显色时间的确定 按已确定的包被浓度、酶标记物浓度及酶标记物反应时间;控制底物显色时间分别为 30、25、20、15、10、5 min,选择适当的底物显色时间。

1.3.6 临界值的确定 用建立的间接 ELISA 方法检测 500 份 HPV B19-IgM 阴性血清,对 A450/630 值进行频数分布分析,确定阴性均值(\bar{x})和标准差(s),以($\bar{x}+2s$)计算临界值。

1.4 间接 ELISA 检测方法性能评价 (1)敏感性试验:将 5 份 HPV B19-IgM 阳性血清和 1 份阴性血清分别作 1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 600、1 : 800、1 : 1 000 稀释,用已建立的 ELISA 方法检测。(2)重复性试验:对包括阴性血清在内的 4 份样品进行 3 批批内和 3 次批间重复性试验,测定 A450/630 值,计算每份血清 A450/630 值的 \bar{x} 和 s,以确定批内和批间试验的变异系数(CV)。(3)临床样品的检测:应用本试验建立的间接 ELISA 检测方法检测 1 700 份健康献血者血清、115 份孕妇血清的 HPV B19-IgM 抗体,以对照试剂盒检测结果为参考进行比较分析。

2 结 果

2.1 最佳包被浓度和酶标二抗工作浓度的确定 选定阳性血清的 A450/630 值 1.0 左右,且 P/N 值最大反应孔的抗原及酶标二抗的稀释倍数作为二者最佳的稀释倍数。故抗原稀释倍数为 1 : 2 000 和酶标二抗稀释倍数为 1 : 2 000 时,阳性血清 A450/630 值较大(1.031),且 P/N 值最大(19.453),因此抗原最佳包被滴度为 1 : 2 000,而最佳酶标二抗工作滴度为 1 : 2 000。见表 1。

2.2 最佳包被条件的确定 以最佳包被浓度包被后,分别 37 °C 包被 60、120、180 min 和 2~8 °C 包被过夜,包被后进行试验,结果显示当包被条件为 2~8 °C 过夜时 P/N 值最大,因此确定最佳包被条件为 2~8 °C 包被过夜。

2.3 IgG-类风湿因子吸收剂最佳使用量的确定 按照操作程序,样品经 IgG-类风湿因子吸收剂处理时,其阳性质控品的 A 值明显下降,说明特异性 IgG 存在会影响 IgM 的测定,而加入 IgG-类风湿因子吸收剂可以去除特异性 IgG 的干扰;当 IgG-类风湿因子吸收剂和样品的比例在 1 : 1 时,其效果最佳。比例为 2 : 1 时,和比例为 1 : 1 时效果一致。过少的使用量不能完全去除特异性 IgG 在 IgM 测定时的干扰,从而影响测定的效果;相同使用比例下,室温处理 30 min 与 2~8 °C 过夜处理效果一致,均可使用。综合考虑,样品最终稀释比例为 1 : 102,其模式为:500 μL 样品稀释液+10 μL 样品,取 75 μL 稀释后样品+75 μL IgG-类风湿因子吸收剂(1 : 1),室温 30 min 或 2~8 °C 过夜处理。见表 2。

2.4 酶标二抗最佳工作时间的确定 从图 1 可知,酶标二抗的作用时间为 30 min 时,阳性血清 A450/630 值较大(0.995),且 P/N 值最大(19.32),因此选择 30 min 为最佳酶标二抗作

用时间。见图 1。

表 1 重组蛋白抗原最佳包被浓度与酶标二抗工作浓度的确定

酶标二抗滴度	血清	抗原稀释倍数					
		1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000
1 : 1 000	-	0.057	0.056	0.057	0.057	0.057	0.056
	+	1.041	1.035	1.035	1.032	1.022	0.893
	P/N	18.263	18.482	18.158	18.105	17.930	15.946
1 : 2 000	-	0.053	0.053	0.056	0.056	0.057	0.056
	+	1.035	1.031	1.025	1.015	0.995	0.823
	P/N	19.528	19.453	18.304	18.125	17.456	14.696
1 : 3 000	-	0.057	0.056	0.057	0.056	0.057	0.056
	+	0.931	0.903	0.863	0.807	0.784	0.726
	P/N	16.333	16.125	15.140	14.411	13.754	12.964
1 : 4 000	-	0.053	0.053	0.056	0.056	0.057	0.056
	+	0.898	0.815	0.765	0.698	0.621	0.563
	P/N	16.943	15.377	13.661	12.464	10.895	10.054
1 : 5 000	-	0.056	0.053	0.057	0.056	0.057	0.056
	+	0.817	0.784	0.716	0.651	0.598	0.465
	P/N	14.589	14.792	12.561	11.625	10.491	8.304
1 : 6 000	-	0.053	0.056	0.056	0.056	0.057	0.056
	+	0.706	0.613	0.532	0.456	0.321	0.261
	P/N	13.321	10.946	9.500	8.143	5.632	4.661

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

表 2 IgG-类风湿因子吸收剂最佳使用量的确定

血清	2 : 1	1 : 1	1 : 2	1 : 3	未加吸附剂
P1	1.264	1.395	1.796	1.858	2.023
P2	0.517	0.528	0.807	1.074	1.186
P3	1.109	1.125	1.219	1.412	1.540
N1	0.008	0.007	0.005	0.015	0.016
N2	0.031	0.032	0.075	0.097	0.146

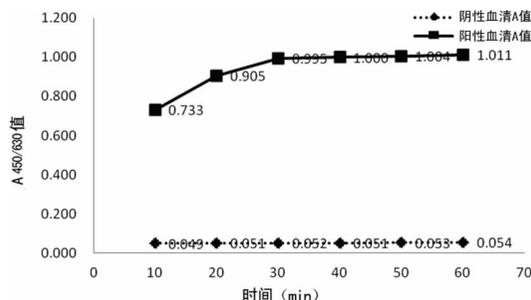


图 1 不同酶标二抗作用时间时样品的 A450/630 值

2.5 底物显色时间的确定 酶标二抗作用完成后,加入底物液、底物缓冲液显色,在 37 °C 下分别孵育 5、10、15、20、25、30 min,加入 2 mol/L H₂SO₄ 溶液终止反应后测定 A450/630 值,从图 2 可见显色 15 min 时 P/N 值最高,可作为最佳显色时间。见图 2。

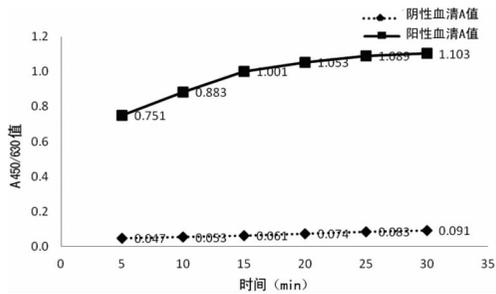


图 2 不同底物和底物缓冲液作用时间时样品的 A450/630 值

2.6 临界值的确定 对 500 份 HPV B19-IgM 阴性血清的 A450/630 值进行频数分布分析,其 \bar{x} 为 0.108, s 为 0.067, 临界值为 0.25。

2.7 敏感性试验 检测 HPV B19-IgM 阳性血清,当血清 1:600 稀释时,检测结果仍为阳性,所建立的方法具有较好的敏感性。

2.8 重复性试验 批内 CV 均值为 3.92%,批间 CV 均值为 4.62%,显示重复性良好,见表 3。

表 3 重复性试验结果

血清	批内重复性试验			批间重复性试验		
	\bar{x}	s	CV(%)	\bar{x}	s	CV(%)
1	0.065	0.004	2.64	0.067	0.004	5.67
2	0.319	0.014	4.39	0.327	0.018	5.50
3	0.658	0.021	3.19	0.663	0.024	3.62
4	1.206	0.019	1.63	1.213	0.032	2.64

2.9 临床样品检测 用本试验建立的 ELISA 方法对 1 700 份健康献血者血清进行 HPV B19-IgM 抗体检测,检测结果为阳性的血清 27 份,阳性率为 1.59%;与对照试剂检测结果比较分析,灵敏度为 84.60%,特异性为 99.70%;符合率为 99.47%。对 115 份孕妇血清 HPV B19-IgM 抗体检测,检测结果为阳性的血清 14 份,阳性率 12.17%;与对照试剂检测结果比较分析,灵敏度为 84.62%,特异性为 97.06%;符合率为 95.65%,见表 4、5。

表 4 1 700 份健康献血者血清 B19-IgM 的比较(n)

丽珠试剂	对照试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	22	5	27
阴性	4	1 669	1 673
合计	26	1 674	1 700

表 5 115 份孕妇血清 B19-IgM 的比较(n)

丽珠试剂	对照试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	11	3	14
阴性	2	99	101
合计	13	102	115

3 讨论

B19 病毒是一类无包膜的单链线状 DNA 病毒,其基因组包含 5 596 个核苷酸,有两个大的开放阅读框,左侧编码 NS1 非结构蛋白(77×10^3),右侧编码 VP1(84×10^3)和 VP2(58×10^3)两个主要的衣壳蛋白,VP1 和 VP2 组成衣壳包裹在 B19 病毒 DNA 表面,构成 B19 病毒的抗原性,其中 96% 由 VP2 组成,VP1 仅占 4%,B19 病毒的主要抗原表位位于 VP1 独特区和 VP1-VP2 链接区^[4-5]。虽然 VP1 的量比 VP2 少,但 VP1 大部分片段延伸并暴露在病毒表面,因此更容易与抗体结合,是主要的抗原。VP1 独特区能刺激机体产生中和性抗体,成为诊断试剂和疫苗研究的首选区段^[6-7]。

本文选用纯化的重组 B19 病毒 VP1 蛋白,建立了 HPV B19-IgM 间接 ELISA 检测方法,对 1 700 份健康献血者血清进行 HPV B19-IgM 抗体检测,检测结果为阳性的血清 27 份,阳性率为 1.59%。与德国维润赛润研发有限公司生产的 HPV B19-IgM ELISA 试剂盒进行平行比较分析,灵敏度为 84.60%,特异性为 99.70%,符合率为 99.47%。对 115 份孕妇血清 HPV B19-IgM 抗体检测,检测阳性血清 14 份,阳性率 12.17%,两种方法有较好的一致性。但其敏感性和特异性稍低,这可能与所用的原核细胞表达系统表达的 VP1 蛋白空间构象与实际有差异,影响表达蛋白的生物活性。

国外研究报道,B19 病毒可通过胎盘垂直传播,可引起孕妇流产、死胎、胎儿非免疫性水肿等症状。在 B19 病毒感染的流行期,3%~8% 的孕妇存在急性感染,胎盘垂直传播率达 33%~51%,在受感染的孕妇中约 5%~16% 胎儿发病或死亡^[8]。国内也有研究报道,在对孕早期妇女血清中 B19 病毒特异性 IgM 抗体的筛查发现,HPV B19-IgM 阳性率为 8.1%,明显高于 TORCH 其他几项病原体的感染率^[9]。因此在孕妇及待孕的妇女中开展 B19 病毒检测,对于提高妊娠质量具有重要意义。B19 病毒可通过血液制品传播,且难以灭活,使得经过分离处理的血浆制品仍可能遭受污染,有 5%~15% 的血浆池不能使用,造成损失,因此在献血者中开展 B19 病毒检测,对提高血液制品的质量及提高临床输血的安全性意义重大。

参考文献

- [1] 张国成. 儿童微小病毒 B19 感染的诊断与治疗[J]. 临床儿科杂志,2008,26(6):459-463.
- [2] Dina J, Vabret A, Rambaud C, et al. Fulminant myocarditis associated with parvovirus B19 infection in a child[J]. J Clin Virol,2008,42(1):70-71.
- [3] Modrof J, Berting A, Tille B, et al. Neutralization of human parvovirus B19 by plasma and intravenous immunoglobulins[J]. Transfusion,2008,48(1):178-186.
- [4] Plentz A, Diagnosis MS. Management and possibilities to prevent parvovirus B19 infection in pregnancy[J]. Future Virol,2011,6(12):1435-1450.
- [5] Nie X, Zhang G, Xu D, et al. The VP1-unique region of parvovirus B19 induces myocardial injury in mice[J]. Scand J Infect Dis,2010,42(2):121-128.
- [6] Zhao P, Dai M, Chen W, et al. Cancer trends in China[J]. Jpn J Clin Oncol,2010,40(4):281-285. (下转第 588 页)

血活化的间接标志^[4]。D-D 是交联纤维蛋白的降解产物, D-D 的增加对凝血酶有抑制作用, 可导致 TT 延长, 血浆 D-D 升高可见于肿瘤患者。纤维蛋白交联后构成恶性肿瘤细胞的保护层, 可形成肿瘤细胞的内源性防护机制, 促进血管再生, 肿瘤浸润和转移^[5]。在本研究中, MPC 患者的 FIB 与 D-D 水平分别为 $(5.06 \pm 1.30) \text{ g/L}$ 、 $(3.45 \pm 2.78) \mu\text{g/L}$, 其结果明显高于其他两组, 提示 D-D 与 FIB 水平的增加对 MPC 有一定的提示作用。

NLR 参数反映体内系统性炎症及患者的营养状态^[6], 可以预测肿瘤患者的生存时间和预后情况^[7]。本研究结果显示, MPC 患者 NLR 明显增高, 说明 NLR 对 PC 癌患者的转移情况有一定的提示作用。另外, 大部分 MPC 患者的 CRP 增高, 可能提示此部分患者存在肿瘤炎症反应及不良预后, 但此结论尚有待扩大病例观察验证。本研究为横断面研究, 进行连续性纵向研究可能会更好地评价 NLR 对 PC 诊断的临床价值。另外, 在其他肿瘤研究的最新报道中(如肝癌、胃癌、肺癌等), NLR 被用于肿瘤转移与患者生存质量与预后的判断^[8-10], 佐证了本研究选用 NLR 用于 MPC 判断的可行性。

在本研究组中, MPC 患者较多, 选用了 AKP 指标进行研究。Moslehi 等^[11]认为使用血浆 AKP 联合 PSA 可以提高 PC 患者骨转移的诊断率。在本研究中 MPC 患者的 AKP 与 PSA 明显高于 BPH、PC 患者, 与以往的报道一致^[12]。

总之, 本研究通过比较 BPH、PC、MPC 患者的凝血参数、血细胞指标和生化免疫项目的水平差异, 认为此 3 类指标联合检测对 MPC 患者的诊断有一定的临床价值。

参考文献

- [1] Tamhane UU, Aneja S, Montgomery D, et al. Association between admission neutrophil to lymphocyte ratio and outcomes in patients with acute coronary syndrome[J]. *Am J Cardiol*, 2008, 102(6): 653-657.
- [2] 王行环, 刘同族. 提高认识规范诊疗——《前列腺癌诊断标准》解读[J]. *中国卫生标准管理*, 2011, 2(4): 25-27.
- [3] Langer F, Chun FK, Amirkhosravi A, et al. Plasma tissue factor antigen in localized prostate cancer: distribution, clinical significance and correlation with haemostatic activation markers[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(3): 464-

470.

- [4] Haubold K, Rink M, Spath B, et al. Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate cancer[J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(6): 1147-1155.
- [5] Langer F, Spath B, Haubold K, et al. Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles in patients with cancer-associated disseminated intravascular coagulation[J]. *Ann Hematol*, 2008, 87(6): 451-457.
- [6] Avanzas P, Quiles J, López de Sá E, et al. Neutrophil count and infarct size in patients with acute myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2004, 97(1): 155-159.
- [7] Fock RA, Blatt SL, Beutler B, et al. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition[J]. *Nutrition*, 2010, 26(10): 1021-1028.
- [8] Zheng YB, Zhao W, Liu B, et al. The blood neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma receiving sorafenib[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(9): 5527-5531.
- [9] Balta S, Unlu M, Arslan Z, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte ratio in prognosis of gastric cancer[J]. *J Gastric Cancer*, 2013, 13(3): 196-200.
- [10] Balta S, Demirkol S, Kucuk U, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio May predict mortality in breast cancer patients[J]. *J Breast Cancer*, 2013, 16(3): 354-358.
- [11] Moslehi M, Cheki M, Salehi-Marzizarani M, et al. Predictors of bone metastasis in pre-treatment staging of asymptomatic treatment-naïve patients with prostate cancer[J]. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*, 2013, 32(5): 286-289.
- [12] Williams SA, Jelinek CA, Litvinov I, et al. Enzymatically active prostate-specific antigen promotes growth of human prostate cancers[J]. *Prostate*, 2011, 71(15): 1595-1607.

(收稿日期: 2013-09-30 修回日期: 2013-11-10)

(上接第 585 页)

- [7] Fukuda M, Yokozaki H, Shiba M, et al. Genetic and epigenetic markers to identify high risk patients for multiple early gastric cancers after treatment with endoscopic mucosal resection[J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2007, 40(3): 203-209.
- [8] Lamont RF, Sobel JD, Vaisbuch E, et al. Parvovirus B19

infection in human pregnancy[J]. *BJOG*, 2011, 118(2): 175-186.

- [9] 古丽娜·沙丁, 段玲, 阿依古丽·力提甫, 等. 185 例孕妇 TORCH 系列病原体及人细小病毒 B19 感染的检测[J]. *中华医学杂志*, 2004, 28(6): 371.

(收稿日期: 2013-10-16 修回日期: 2013-11-12)

欢迎投稿

欢迎订阅