

IPV - D 抗原检测试剂参考品的制备及标定

谭振国 龙润乡 杨 蓉 罗芳宇 李 华 谢天宏 杨 婷 岳 磊 谢忠平

摘 要 **目的** 制备一套可对 IPV - D 抗原检测进行质量控制的参考品。**方法** 用组织培养的方法制备出 3 套用于 IPV - D 抗原 I、II、III 型的参考品;每个型别参考品有 22 份样品,包含 10 份阳性参考品,10 份阴性参考品,1 份灵敏度参考品,1 份精密性参考品;每个型别参考品经 9 人次标定。**结果** IPV - I、II、III 型参考品中 10 份阳参全部阳性,10 份阴参全部阴性,灵敏度标定值分别 1413.13、1684.66、1561.95DU/ml,精密性参考品平均 CV 值分别为 4.52%、6.54%、5.68%;参考品 37℃ 放置 5 天,反复冻融 5 次稳定性良好。**结论** 制备的 IPV - D 抗原检测试剂参考品经各项试验检测结果合格,可用于 IPV - D 抗原检测试剂的质控。

关键词 IPV - D 抗原 参考品 质量控制 标定

中图分类号 R392 - 33

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.013

Preparation and Calibration of Reference Reagents for Testing Antigens of IPV - D. Tan Zhenguo, Long Runxiang, Yang Rong, et al. Institute of Medical Biology Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Yunnan 650118, China

Abstract Objective To prepare a group of reference products for quality control over testing antigens of IPV - D. **Methods** Three groups of reference products were prepared for type I, II and III antigens of IPV - D via tissue culturing, including 10 positive reference products, 10 negative reference products, 1 reference product for sensitivity and 1 reference product for precision. Each type of reference product was calibrated by 9 persons. **Results** All 10 positive reference products were positive and 10 negative reference products were negative among IPV - I, II and III antigens, where the calibrated sensitivity was 1413.13DU/ml, 1684.66DU/ml and 1561.95DU/ml respectively, while the average CV of the precise reference products was 4.52%, 6.54% and 5.68% respectively. After they were placed at 37℃ for 5 days, the reference products showed high stability after repeated freezing and thawing. **Conclusion** The reference products, which were prepared for testing antigens of IPV - D, were tested to be conforming in different tests and could be used for quality control over the reagents for testing antigens of IPV - D.

Key words Antigens of IPV - D; Reference; Quality control; Calibration

脊髓灰质炎是由 3 种血清型(I、II、III 型)脊髓灰质炎病毒(*poliovirus*, PV)中任意一型引起的急性传染病。PV 侵入中枢神经系统,并在脊髓前角细胞复制,引起麻痹型脊灰病例。目前 PV 在巴基斯坦、阿富汗、尼日利亚和印度仍有传播,使我国脊灰野病毒输入性风险持续存在^[1,2]。2011 年我国新疆维吾尔自治区发生了由巴基斯坦输入的脊髓灰质炎野病毒引起的暴发疫情^[3-6]。全球消灭脊灰形势不容乐观,尤其是与我国相邻国家脊灰疫情呈高发态势,我国发生脊灰野毒株(WPV)输入的风险增大^[7,8]。根据世界卫生组织要求,2008 年停止使用脊髓灰质炎减毒

活疫苗(OPV),届时需要使用脊髓灰质炎灭活疫苗(IPV)来维持脊灰的免疫水平,直到脊灰病毒消失,不再对人类健康构成威胁^[9]。随着全球首剂 Sabin 株 IPV 在中国医学科学院医学生物学研究所研制成功,IPV 的生产已成为防控脊灰感染流行,维持人群高免疫水平的关键^[10]。无论疫苗的生产,还是临床检测都会用到相应的抗原检测试剂,为获得质量可靠、性能稳定的检测试剂,对检测试剂进行质量控制是必须的。在此前提下,笔者单位制备及标定了 3 套分别为 I、II、III 型 IPV 抗原检测试剂的参考品,用于 IPV - D 抗原检测试剂的质控,现将结果报道如下。

材料与方法

1. 参考品的组成: I 型参考品包含 10 份阳参、10 份阴参、1 份灵敏度参考品,1 份精密性参考品; II 型参考品包含 10 份阳参、10 份阴参、1 份灵敏度参考品,1 份精密性参考品; III 型参考品包含 10 份阳参、10 份阴参、1 份灵敏度参考品,1 份精密性参考品。

基金项目:云南省重点新产品开发计划项目(2012BC006);云南省应用基础研究面上项目(2010ZC230)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

通讯作者:龙润乡,电子信箱:runxianglong@imbeams.com.cn; 谢忠平,电子信箱:xzp218@126.com

(1)阳性参考品(阳参):经组织培养得到 IPV - I、II、III 3 个型别的病毒收获液,各型别病毒收获液经甲醛灭活后按不同浓度进行稀释,制备成 10 份阳性参考品。各型别阳性参考品经核酸检测确认,酶标检测无型别交叉。(2)阴性参考品(阴参):非 Polio 肠道病毒 7 份,其他型别 IPV - D 抗原 2 份,本型别

IPV - C 抗原 1 份。IPV 病毒原液 56℃ 90min,D 抗原可转为 C 抗原。(3)灵敏度参考品:IPV - I、II、III 型病毒原液加入 2% BSA 作为保护剂,经酶标检测无交叉。(4)精密性参考品:病毒原液按不同浓度进行稀释,选取吸光度值为 0.6 ~ 0.8 浓度稀释后备用。

表 1 阴性参考品的组成

型号	阴参 1	阴参 2	阴参 3	阴参 4	阴参 5	阴参 6	阴参 7	阴参 8	阴参 9	阴参 10
I 型	ECHO6	CoxB3	CoxB5	CoxA16	ECHO2	CoxA7	HAV	IPV - II	IPV - III	I - C
II 型	ECHO6	CoxB3	CoxB5	CoxA16	ECHO2	CoxA7	HAV	IPV - I	IPV - III	II - C
III 型	ECHO6	CoxB3	CoxB5	CoxA16	ECHO2	CoxA7	HAV	IPV - I	IPV - II	III - C

2. 国家标准品:Sabin 株脊髓灰质炎效力检测国家参考品,批号 201301。

3. 试剂:本室制备的 IPV - I、II、III 型 D 抗原检测试剂盒,批号 20151117。

4. 设备:离心机,水浴锅,隔水式恒温培养箱,二氧化碳培养箱,酶标仪。

5. 检测方法:使用本室制备的 IPV - D 抗原检测试剂盒(ELISA 法)检测,国家抗原含量参考品 I、II、III 型均稀释至 8U/ml 后,在板上作 2 倍系列稀释;待标灵敏度参考品 I、II、III 型均按 1:200 稀释后,在板上作 2 倍系列稀释;每型别阴参 10 份,每份 1 孔;阳参 10 孔,每份 1 孔;每型别精密性参考品 1 份,连加 10 孔。待测样品 100 毫升/孔,设阴性 2 孔、

阳性 2 孔、空白 1 孔,各型待标参考品分别加入 IPV - I、II、III 型抗原检测板中,37℃ 保温 2h;0.01MPBST 洗板 5 次,分别加入 I、II、III 型 IPV - HRP,100 毫升/孔,37℃ 保温 1h;0.01MPBST 洗板 5 次,TMB37℃ 显色 10min 终止反应。在 450nm 波长处测量样品吸光度值(A 值)。

6. 稳定性试验:(1)热稳定性试验:将 3 套参考品 37℃ 放置 3 天、5 天后,取出检测。(2)冻融试验:将 3 套参考品反复冻融 3 次、5 次后,取出检测。

结 果

1. 阳性参考品标定结果:使用 3 批次 IPV 抗原检测试剂、9 人次对 10 份阳性参考品进行检测,检测结果均为阳性,阳性参考品符合率为 100% ,见表 2。

表 2 阳性参考品标定结果

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I 型阳参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
II 型阳参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
III 型阳参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

2. 阴性参考品标定结果:3 批 9 人次检测结果,7 种非 IPV - I 型的肠道病毒均没有检出,对 IPV - I 型 C 抗原及 IPV - II、III 型病毒液进行检测,未发现

有交叉反应,10 份阴性参考品符合率为 100% ,结果表明本试剂具有良好的特异性,见表 3。

表 3 阴性参考品标定结果

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I 型阴参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
II 型阴参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
III 型阴参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

3. 灵敏度参考品标定结果:使用 IPV 抗原检测试剂、9 人次分别对 I、II、III 型灵敏度参考品进行标

定。I 型灵敏度参考品平均含量参为 1413.13DU/ml,95% CI:1329.63 ~ 1496.62DU/ml,9 次检测值均

在此范围内,待标品检测 r^2 值范围为 0.97 ~ 1.00,平均值为 0.99;Ⅱ型灵敏度参考品平均含量参为 1684.66DU/ml,95% CI: 1499.21 ~ 1870.12DU/ml,9 次检测值均在此范围内,待标品检测 r^2 范围 0.98 ~ 1.00,平均值为 0.99;Ⅲ型灵敏度参考品平均含量参

为 1561.95DU/ml,95% CI: 1313.80 ~ 1810.10DU/ml,9 次检测值均在此范围内,待标品检测 r^2 范围 0.95 ~ 1.00,平均值为 0.98。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型灵敏度参考品 r^2 均 >0.95,显示标定线性值较好,符合检测试剂对线性的要求,见表 4。

表 4 灵敏度参考品标定结果

检测次数	Ⅰ型		Ⅱ型		Ⅲ型	
	含量(DU/ml)	线性(r^2)	含量(DU/ml)	线性(r^2)	含量(DU/ml)	线性(r^2)
1	1444.02	0.99	1700.16	0.99	1644.26	0.98
2	1489.10	0.98	1723.74	0.98	1451.16	0.99
3	1356.96	0.97	1603.00	0.99	1595.13	1.00
4	1430.33	0.98	1706.19	0.98	1351.87	0.95
5	1415.26	0.98	1625.33	1.00	1466.39	1.00
6	1417.63	0.99	1633.69	0.98	1772.30	1.00
7	1390.24	0.99	1598.23	0.99	1530.25	0.98
8	1413.27	0.99	1805.68	1.00	1537.88	0.99
9	1361.33	1.00	1765.95	0.99	1708.31	0.97
平均值($\bar{X}$)	1413.13	0.99	1684.66	0.99	1561.95	0.98
标准差(SD)	40.94		73.94		132.60	
$\bar{X}-1.96SD$	1329.63		1499.21		1313.80	
$\bar{X}+1.96SD$	1496.62		1870.12		1810.10	

4. 精密性参考品标定结果:检测试剂的精密度用变异系数来衡量。在板上连加 10 孔精密性参考品,其变异系数($CV, \%$) = [标准差(SD)/平均值($\bar{X}$)] × 100%。9 人次检测结果显示Ⅰ型精密度参考品 CV 值范围在 2.57% ~ 7.15%,平均值为 4.52%;Ⅱ型精

密度参考品 CV 值范围为 4.56% ~ 9.07%,平均值为 6.54%;Ⅲ型精密度参考品 CV 值范围为 2.37% ~ 9.87%,平均值为 5.68%。各批次 CV 值均小于 15%,符合检测试剂对精密度要求,见表 5。

表 5 精密性参考品标定结果(%)

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ⅰ型精密度参考品 CV	5.14	2.64	7.15	5.70	3.90	2.57	3.75	6.00	3.84
Ⅱ型精密度参考品 CV	4.98	7.30	6.71	9.07	6.67	5.80	4.85	8.88	4.56
Ⅲ型精密度参考品 CV	2.37	9.21	7.82	9.87	5.01	5.99	4.10	3.99	2.77

5. 稳定性实验结果:Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型待标参考品在 37℃加速破坏试验或冻融试验后,10 份阳参均为阳性,10 份阴参均为阴性,精密性参考品的 CV 值均小于 15%,灵敏度参考品的检测下限与 -70℃对照组比较,未见下降,各型灵敏度参考品线性良好,均 >0.95。各型参考品检测指标均符合质量要求,见表 6。

讨 论

酶联免疫吸附试验抗原抗体的结合不是一种简单的化学反应,而是一种生物反应,方法本身变异性较大。生物标准物质是用生物方法实验时,使其表示的效价或活性由不同地点、不同条件、不同操作者得

表 6 Ⅰ型参考品稳定性试验结果

组别	37℃		冻融次数		-70℃
	3天	5天	3次	5次	对照组
10份阳参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
10份阴参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
CV值(%)	5.38	9.34	4.85	3.22	1.54
检测下限(DU/ml)	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
线性(r^2)	0.98	0.98	0.97	0.96	0.97

出相对一致性结果的一种工具。因此,标准物质作为生物制品生产检定中必不可少的重要组成部分,在生物制品质量控制和效力评价中发挥重要作用^[11]。诊断试剂参考品一般从灵敏度、特异性、精确性、稳定性

表 7 II 型参考品稳定性试验结果

组别	37℃		冻融次数		-70℃
	3 天	5 天	3 次	5 次	对照组
10 份阳参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
10 份阴参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
CV 值(%)	4.79	3.91	3.89	13.72	7.80
检测下限(DU/ml)	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
线性(r^2)	0.95	0.97	0.98	0.97	0.97

表 8 III 型参考品稳定性试验结果

组别	37℃		冻融次数		-70℃
	3 天	5 天	3 次	5 次	对照组
10 份阳参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
10 份阴参	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
CV 值(%)	4.02	8.00	7.96	6.18	2.97
检测下限(DU/ml)	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49
线性(r^2)	0.99	0.99	0.99	0.99	0.97

4 个方面进行考察^[12,13]。本研究的阳性参考品使用高、中、低不同浓度的病毒原液制备,其目的在于高浓度的阳参用于防止抗原浓度过高引起钩状效应的存在,而使检测出假阴性。低浓度的阳参则是针对弱阳性样品是否能被检出而设置;阴性参考品包含了 7 份非 Polio 其他肠道病毒、2 份其他型别 Polio 病毒、1 份本型别 polio - C 抗原。由于肠道病毒之间有较高的同源性,一般抗原检测容易出现交叉反应,笔者选择了 ECHO6、CoxB3、CoxB5、CoxA16、ECHO2、CoxA 7、HAV 7 种病毒的标准株及疫苗株,以此来排除肠道病毒对 IPV - D 抗原检测的干扰^[12]。使用其他 2 个型别的 Polio 病毒,用于检测是否存在型间交叉。Polio 病毒有 D、C 两种抗原,C 抗原不能刺激机体产生中和抗体,只有 D 抗原能刺激机体产生保护性抗体,D 抗原可作为 IPV 体外效力测定的重要指标,它与体内免疫原性有效好的一致关系^[9]。因此,阴参中设置的本型别 polio - C 抗原,用于检测疫苗中是否含有无效的 C 抗原。

通过标定灵敏度参考品的含量,在检测过程中一方面可以监测试剂盒的检测下限,另一方面还可以通过已知含量的参考品来计算未知样品的含量。根据国家药典对诊断试剂的要求,用于酶联诊断试剂的精密度(CV 值)应不高于 15% ($n = 10$)^[14]。本研究标定的精密性参考品选取检测吸光度值 0.6 ~ 0.8 的样品来控制检测试剂的孔间差。

稳定性是标准物质的特性量值随时间变化的性质,即在规定的時間间隔和环境条件下,标准物质的特性量值报纸在规定范围的性质^[15]。考虑到参考品

在保存、使用、运输过程中可能出现的情况,笔者设计了热稳定性试验和冻融试验对参考品的稳定性进行考察。实验结果显示,37℃ 放置 5 天或冻融 3 次仍可达到质控参考品的合格标准,通过分别使用 I、II、III 型 IPV - D 抗原检测试剂对 I、II、III 型抗原参考品进行检测,结果均符合参考品的要求。

综上所述,由本室制备的 IPV - D 抗原的 3 个型别的参考品是成功的,能够对 IPV - D 抗原检测试剂的质量控制起到重要的作用,对疫苗的质量提供了有效保障。

参考文献

1 Callaway E. Public health: polio's moving target[J]. Nature, 2013, 496(7445): 290 - 292

2 Kazi A, Murtaza A, Khoja S, *et al.* Monitoring polio supplementary-immunization activities using an automated short text messaging system in Karachi, Pakistan [J]. Bull World Health Organ, 2014, 92(3): 220 - 225

3 郭玉双,魏强. 脊髓灰质炎病毒实验室工作人员免疫策略现状与展望[J]. 中国疫苗和免疫, 2016,22(4):473 - 475

4 余文周,温宁,张勇,等. 我国现阶段维持无脊髓灰质炎状态面临的挑战和对策[J]. 中国疫苗和免疫,2013, 19(5):468 - 472

5 Emmanuel VIDOR,舒俭德. 脊髓灰质炎病毒灭活疫苗:全球消灭脊髓灰质炎的必然选择[J]. 中华预防医学杂志, 2016,50(12): 1021 - 1031

6 宁桂军,温宁. 世界卫生组织关于脊髓灰质炎疫苗的立场文件(2014 年 2 月)[J]. 中国疫苗和免疫,2014,20(4):376 - 380

7 谷金莲,于洋,梁争论,等. 中国 2014 年脊髓灰质炎野病毒输入传播的风险评估结果[J]. 中国病毒病杂志, 2015, 5(2):184 - 187

8 樊春祥,张丽芬,宋凯军,等. 2012 年北京市房山区常住人口脊髓灰质炎病毒抗体分析预防[J]. 中国疫苗和免疫 2015,21(1):1 - 5

9 杨怀德,姜述德,张新文,等. 脊髓灰质炎病毒 Sabin 株 D 抗原定量及其中和抗体检测的研究[J]. 云南大学学报:自然科学版, 2007, 29(S1): 373 - 381

10 董少忠,朱文兵,等. Sabin 株脊髓灰质炎灭活疫苗在全球消灭脊髓灰质炎最后阶段的作用[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(12):1032 - 1035

11 张洁. 生物标准物质的制备、发展及管理[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(8): 630 - 632

12 龙润乡,李华,杨蓉,等. 肠道病毒 71 型抗原检测试剂参考品制备与标定[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(3):184 - 187

13 付岳,高旭年,黄杰. 体外诊断试剂质量评价与标准物质溯源[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2017, 9(2):73 - 77

14 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:63 - 66

15 曹丽梅,王一平,陈国庆,等. 我国生物检测用国家标准物质现状与思考[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(8):886 - 888

(收稿日期:2018 - 05 - 28)
(修回日期:2018 - 06 - 14)

• 57 •