

人用狂犬病疫苗 ELISA 快速鉴别试验的建立及验证^{*}

曹守春¹ 唐建蓉^{1**} 胡巧玲² 徐葛林² 李加¹ 吴小红¹ 刘景华¹ ,
曲小肃¹ 石磊泰¹ 董关木^{1**}

(1. 中国药品生物制品检定所 北京 100050; 2. 武汉生物制品研究所 武汉 430060)

摘要 目的: 建立人用狂犬病疫苗快速鉴别试验并进行验证。方法: 采用双抗体夹心 ELISA ,以 4 株抗狂犬病毒核蛋白单抗包被微孔板 ,通过捕捉样品中狂犬病病毒核蛋白进行快速鉴别试验 ,对该方法进行特异性、灵敏度、重复性和适用性验证。结果: 采用双抗体夹心 ELISA 进行鉴别试验 ,验证结果显示该方法具有较高的特异性和灵敏度 ,RSD < 15% ,对于不同疫苗生产毒株均可有效鉴别。结论: 双抗体夹心 ELISA 可以替代传统效力试验对人用狂犬病疫苗进行快速鉴别。

关键词: 生物制品; 疫苗; 狂犬病; 鉴别; 酶联免疫吸附试验; 验证

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011)09 - 1754 - 04

Establishment and validation of the rapid identification test on rabies vaccine by ELISA methods^{*}

CAO Shou - chun¹ ,TANG Jian - rong^{1**} ,HU Qiao - ling² ,XU Ge - lin² ,
LI Jia¹ ,WU Xiao - hong¹ ,LIU Jing - hua¹ ,QU Xiao - su¹ ,
SHI Lei - tai¹ ,DONG Guan - mu^{1**}

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products ,Beijing 100050 ,China;

2. Wuhan Institute of Biological Products ,Wuhan 430060 ,China)

Abstract Objective: To establish and validate a method of rapid identification testing of rabies vaccine for human use which in order to replace the previously methods. **Method:** To set up the double - antibody sandwich ELISA methods that coated microplates by four strain monoclonal antibodies against rabies virus nucleoprotein. Then validate the method by specificity ,sensitivity ,repeatability and applicability. **Results:** The results of validation show that the ELISA method had high specificity and sensitivity. The RSD was less than 15% . The ELISA method had specific response with different rabies virus vaccine strains(such as CTN ,PV etc.) . **Conclusion:** The identification testing by ELISA is rapid ,high specific and high sensitivity. It can replace the traditional potency test for the identification test of rabies vaccine.

Key words: biological; vaccine; rabies; identification test; ELISA; validation

在病毒类疫苗生物制品的质量控制与评价中需要进行鉴别试验 ,人用狂犬病疫苗的鉴别试验同效力试验 ,效力试验不仅耗时长 ,而且当效力试验不符

合规定时则鉴别试验不成立 ,因而无法进行鉴别^[1]。在日常的监督或委托检验工作中经常涉及需要对人用狂犬病疫苗进行鉴别试验 ,且具有一定

^{*} “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(项目批准号:2009ZX10004 - 804)

^{**} 通讯作者 董关木 Tel: (010) 67095442; E - mail: donggm@ nicpbp. org. cn
唐建蓉 Tel: (010) 67095744; E - mail: tangjr60429@ 163. com

的时限要求,所以迫切需要建立一种快速、特异、敏感的人用狂犬病疫苗鉴别试验。本文采用双抗体夹心 ELISA,以抗狂犬病病毒核蛋白单抗包被微孔板,捕捉检品中狂犬病病毒核蛋白抗原,之后加入酶标抗体显色进行结果判定,验证结果显示通过双抗体夹心 ELISA 可以对人用狂犬病疫苗进行快速鉴别,现报道如下。

1 疫苗制品和试剂

1.1 疫苗制品 人用狂犬病疫苗第 7 批效力国家标准品(简称国家标准品),人用狂犬病疫苗(Sanofi Pasteur S. A. PM 株,辽宁成大生物股份有限公司 PV 株,武汉生物制品研究所 CTN 株,宁波荣安生物公司 aG 株,Chiron Behring Vaccines Privated Ltd. Flury-LEP 株),冻干乙型脑炎灭活疫苗(简称灭活乙脑疫苗),双价肾综合征出血热灭活疫苗(简称出血热疫苗)。以上疫苗均为企业送检产品。流感病毒裂解疫苗(简称流感疫苗)和甲型肝炎灭活疫苗(简称甲肝疫苗)为商业化产品。

1.2 实验试剂 抗狂犬病病毒核蛋白单抗及酶标抗狂犬病病毒核蛋白抗体(武汉生物制品研究所),ELISA 常规化学试剂(均为分析纯),人血白蛋白(华兰生物),小牛血清(北京民海),明胶(Sigma, USA),麦芽糖(北京化学试剂公司),右旋糖酐(Sigma, USA)。

2 方法

2.1 人用狂犬病疫苗 ELISA 鉴别试验 抗狂犬病病毒核蛋白单抗混合物包被微孔板,每孔 100 μL (100 ng) 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。弃包被液,加入适当稀释的待测样品,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗板 3 次,加入酶标抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h,洗板 6 次,加 TMB 避光显色 10 min,2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸终止显色,酶标仪比色读取 $A_{450\text{ nm}}$ 值,试验同时设立阳性对照,阴性对照和空白组各 2 孔,其中阳性对照为人用狂犬病疫苗第 7 批效力国家标准品。结果判定:阴性对照孔吸光度的平均值 $\times 2.1$ 作为 cut-off 值,其中如果阴性对照孔的平均吸光度值小于 0.05,按 0.05 计算,高于 0.05 则按实际吸光度计算,阳性对照孔吸光度平均值应不小于 0.4。

2.2 特异性验证 取流感疫苗等其他企业用疫苗原倍浓度上样检测,每孔 100 μL ,记录 $A_{450\text{ nm}}$ 值,根据 cut-off 值,对检测结果作出判定。为验证人用狂犬

疫苗中辅料成分是否有非特异反应,取不同浓度人血白蛋白、明胶、麦芽糖、右旋糖苷等疫苗中常见的辅料或冻干保护剂进行检测。

2.3 灵敏度验证 取国家标准品由 10 倍开始进行 2 倍系列稀释,根据 cut-off 值对检测结果作出判定。

2.4 精密度验证 组内精密度试验,取国家标准品复溶 320 倍稀释后,平行 10 份,进行 ELISA 检测,记录 $A_{450\text{ nm}}$ 值。组间精密度试验,取国家标准品复溶 320 倍稀释后,取 100 μL 进行 ELISA 检测,记录 $A_{450\text{ nm}}$ 值,于不同工作日内各重复 6 次。

2.5 适用性验证 分别取不同企业送检的人用狂犬病疫苗鉴别试验合格产品,从中随机选取疫苗生产毒株为 PV、PM、CTN、aG 和 Flury LEP 的对应疫苗各 6 批,80 倍稀释后进行双抗体夹心 ELISA 检测,记录 $A_{450\text{ nm}}$ 值。

3 结果

3.1 特异性验证 选用流感疫苗(鸡胚)、灭活乙脑疫苗(地鼠肾细胞)、出血热疫苗(地鼠细胞及 Vero 细胞)及甲肝疫苗(Vero 细胞)等进行检测,结果见表 1,从中可以看出其他人用疫苗检测结果均为阴性。为验证疫苗中辅料成分对实验的影响程度,对人血清白蛋白、明胶、麦芽糖、右旋糖苷等疫苗中常见的辅料或冻干保护剂进行了检测,结果亦为阴性。其中人血清白蛋白浓度在 1% 时,450 nm 下的吸光度值平均仅为 0.021。以上结果显示该 ELISA 鉴别试验与非狂犬病疫苗及人血清白蛋白等疫苗辅料成分无交叉反应,特异性良好。

表 1 特异性试验:非狂犬病疫苗检测结果

Tab 1 The results of specificity test about non-rabies vaccine

疫苗制品(vaccine)	$A_{450\text{ nm}}$
乙脑疫苗(地鼠)(JEV)	0.017
出血热疫苗(地鼠)(HFRS)	0.013
出血热疫苗(vero)(HFRS)	0.011
甲肝疫苗(vero)(HAV)	0.042
流感疫苗(鸡胚)(Flu vaccine)	0.031
阳性对照(positive)	2.673
阴性对照(negative)	0.053
空白(blank)	0.021

3.2 灵敏度验证结果 将人用狂犬病疫苗国家标准品($6.7 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行2倍系列稀释,可见在160倍稀释后,对应效价仅为 $0.04 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, ELISA检测结果依然为阳性,450 nm吸光度值为1.784(详见表2)。表明该ELISA检测方法的灵敏度能够用于对狂犬病病毒抗原的定性检测,可满足鉴别试验需要。

表2 检测灵敏度验证结果

Tab 2 Validation results of sensitivity

稀释倍数(dilution)	对应效价(potency) / $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$	$A_{450 \text{ nm}}$
10	0.67	4.915
20	0.34	3.800
40	0.17	2.760
80	0.08	2.035
160	0.04	1.784

3.3 精密度验证结果 精密度验证分组内精密性和组间精密性两方面进行验证,结果见表3所示。组内重复性试验10个平行结果均呈强阳性,RSD为3.7%;组间重组性试验为同一样品在不同工作日下的6次结果,RSD为10.8%。以上检测数据显示ELISA鉴别实验检测数值具有较好一致性,精密度良好。

表3 人用狂犬病疫苗 ELISA 鉴别试验精密度验证结果

Tab 3 Validation results of the precision on the identification tests by ELISA

试验次数(No.)	$A_{450 \text{ nm}}$	
	组内精密性 (group precision)	组间精密性 (intermediate precision)
1	0.543	0.580
2	0.593	0.554
3	0.575	0.546
4	0.57	0.485
5	0.539	0.485
6	0.562	0.517
7	0.558	/
8	0.552	/
9	0.553	/
10	0.519	/
RSD/%	3.7	10.8

4 ELISA 快速鉴别试验的适用性验证

为了解ELISA快速鉴别试验方法对不同企业生产人用狂犬病疫苗的检测结果,分别取狂犬病病

毒PM株、PV株、CTN株、aG株和Flury LEP株相应疫苗制品各6批,进行检测,将疫苗进行40倍稀释后,450 nm吸光度值均在2.0以上(详见表4),鉴别实验均为阳性,与传统鉴别实验(效力试验)结果符合率为100%。

表4 不同狂犬病疫苗株的检测结果

Tab 4 results of different rabies vaccine strains which identified by ELISA

疫苗毒株 (strains)	批(Lot)	$A_{450 \text{ nm}}$ 值区间 (the value range of $A_{450 \text{ nm}}$)	$A_{450 \text{ nm}}$ 均值 (the average of $A_{450 \text{ nm}}$)
PM	6	2.381 ~ 2.652	2.519
PV	6	2.504 ~ 2.649	2.572
CTN	6	2.053 ~ 2.663	2.431
aG	6	2.060 ~ 2.759	2.476
Flury LEP	6	2.481 ~ 2.971	2.557

5 讨论

在病毒类疫苗生物制品的质量控制与评价中需要进行鉴别试验,2005年版中国药典三部中对于成品检定中的鉴别试验大多数涉及的是传统生物检测技术,其局限性主要表现为实验周期长,敏感度较低,人用狂犬病疫苗成品检定的鉴别试验同效力试验^[1]。效力试验要求具有免疫原性的疫苗在受试动物体内诱导产生一定量中和抗体,从而保护或部分保护受病毒攻击的实验动物。试验周期需要28 d,而且中间环节操作烦琐,并且当疫苗因各种原因免疫原性丧失时,效力试验不成立,无法得出正确的鉴别试验结论,尤其不适于快速检验工作的需要。而ELISA检测是基于特异抗原抗体间的免疫识别后的结合反应,具有快速、简便、重复性好等优点,重组乙型肝炎疫苗(CHO细胞)的ELISA鉴别试验方面已有文献报道^[2]。

狂犬病病毒属于弹状病毒科(Rhabdoviridae),狂犬病毒属(Lyssa virus),基因组是不分节段的单股负链RNA,大小为12 kb左右,主要编码5种病毒结构蛋白,即核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)、RNA聚合酶(L),其中狂犬病毒核蛋白由450个氨基酸组成,相对分子质量为 5.05×10^4 ,不同毒株之间具有较强的保守性,氨基酸同源性在98%~99.6%之间^[3]。对于狂犬病病毒属的分型鉴定早期亦采用针对核蛋白的多抗血清结合补体试验或免疫荧光法进行,在病毒的复制周

期中核蛋白亦是表达丰度较高的结构蛋白质。因此有必要建立针对核蛋白的 ELISA 检测技术进行鉴别试验。徐葛林等将狂犬病病毒 CVS 株免疫小鼠,采用传统杂交瘤技术成功获得多株抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体,经与美国 CDC 和法国巴斯德研究所的协作研究证明其中 4 株单抗能识别狂犬病病毒核衣壳抗原上 4 种不同的位点^[4,5]。

采用该 4 株单抗混合包被微孔板,通过双抗体夹心 ELISA 检测人用狂犬病疫苗中的核蛋白抗原从而对疫苗进行鉴别,结果显示该方法具有良好的特异性、灵敏性和重复性。适用于对不同生产毒株和不同企业生产工艺的人用狂犬病疫苗的鉴别,对不同条件下长期搁置的疫苗,其中所含病毒抗原免疫原性已明显降低,效力实验甚至不符合规定(-20℃放置 20 年,37℃放置 2 周和在 56℃放置 2 月)的狂犬病疫苗检测结果均为阳性,可以对疫苗进行有效鉴别。ELISA 快速鉴别试验的建立,可在 2 h 内得出鉴别试验结论,较传统的效力试验省时省力,尤其适用于狂犬病疫苗的“打假”工作。但该 ELISA 方法只是定性检测,对于疫苗的有效性(糖蛋白含量)评价仍需用效力试验(小鼠法)进行检测。同时由于包被抗体为单克隆抗体,价格昂贵,因此存在一定的应用限制。

上述验证结果表明,该双抗体夹心 ELISA 方法具有良好的特异性、灵敏度和可重复性,适用于不同毒株生产的人用狂犬病疫苗,可用于该疫苗的鉴别试验,在监督检验工作中具有良好的应用价值和意义。

参考文献

- 1 ChP(中国药典).2005. Vol III(三部):90
- 2 DONG Li - zi(董厉子),YANG Yi(杨屹),CHEN Wan - ge(陈万革) *et al.* Study of the method of detecting recombinant CHO hepatitis B vaccine[重组乙型肝炎疫苗(CHO 细胞)鉴别试验的方法研究]. *Biotechnology*(生物技术) 2006 26(5):38
- 3 YU Yong - xin(俞永新),DONG Guan - mu(董关木),ZHU Jia - hong(朱家鸿). *Rabies and Rabies Vaccine*(狂犬病和狂犬病疫苗). Beijing(北京): China Medico - Pharmaceutical Science and Technology Publishing House(中国医药科技出版社) 2009
- 4 XU Ge - lin(徐葛林),LU Xiao - zhi(鲁晓知),ZHU Jia - hong(朱家鸿) *et al.* Preparation and application of MCABS to rabies virus glycoprotein and nucleoprotein(抗狂犬病毒糖蛋白及核蛋白单抗的研制及应用). *Chin J Biol*(中国生物制品学杂志) 1996 9(1):23
- 5 Xu Gelin, Weber Patrick, Hu Qiaoling *et al.* A simple sandwich ELISA(WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals* 2007 35(4):297

(本文于 2010 年 11 月 25 日收到)

《化妆品稽查工作指南》出版发行

由国家食品药品监督管理局稽查局牵头,药品市场监督办公室具体组织编写的《化妆品稽查工作指南》一书日前已由中国科学技术出版社出版发行。

本书是食品药品监督管理系统第一本全面阐述、指导化妆品稽查执法工作的读物,对今后的化妆品监督,特别是各级食品药品监管部门工作人员开展稽查执法工作,具有普及知识和指导实践的重要意义。本书的第一部分采用一问一答的形式,介绍了化妆品基础、生产企业监管、经营企业监管、监督抽检、行政处罚等知识;第二部分介绍了在监管实践中发生的五个典型案例并进行分析;第三部分对现行的化妆品规范性文件进行汇编。三大部分各有侧重又互为补充,不仅阐述了现行化妆品监管政策和规章制度,又结合案件实例介绍了稽查执法操作实践和监管理念。《化妆品稽查工作指南》的出版,对于全面强化化妆品监管工作、提高全国各级食品药品监管部门的化妆品稽查人员素质和执法水平、依法查处化妆品违法事件将发挥积极的作用。

详情请浏览: www.nicpbp.org.cn