

文章编号 1006-8147(2020)03-0261-05

论 著

## 光激化学发光分析法定性检测血清 CMV-IgM 抗体

刘浩<sup>1,2</sup>, 李军普<sup>1</sup>, 崔亚琼<sup>1</sup>, 于洋<sup>1</sup>, 张月香<sup>2</sup>, 李会强<sup>1</sup>

(1.天津医科大学医学检验学院, 天津 300203; 2.天津市中心妇产科医院检验科, 天津 300100)

**摘要** 目的: 建立一种基于光激化学发光分析(LiCA)技术定性检测血清 CMV-IgM 抗体的新方法。方法: 利用 CMV 抗原包被的发光微球, 生物素标记的鼠抗人 IgM 抗体以及链霉亲和素包被的感光微球共同构成完整的分析体系, 优化反应缓冲液、抗原抗体工作浓度和待检血清稀释比例, 并进行方法学评价和临床结果比对。结果: 本方法的批内和批间变异系数为 5.3%~6.1% 和 6.9%~9.8%, 均小于 10%; ROC 曲线分析显示, 曲线下面积为 0.997, 灵敏度为 100%, 特异度为 98.9%; 在 100 例血清样本的检测中, 本方法与 LIAISON 检测结果符合率为 95.0%。结论: 成功建立了 LiCA 间接法反应模式定性检测 CMV-IgM 抗体的方法。该检测方法操作简单、快速、灵敏度高, 有潜在的临床应用前景。

**关键词** CMV-IgM 抗体; 产前筛查; 光激化学发光分析; 均相免疫分析; 定性分析

中图分类号 R446.61

文献标志码 A

### Qualitative detecting CMV-IgM in human serum based on a light-initiated chemiluminescent assay

LIU Hao<sup>1,2</sup>, LI Jun-pu<sup>1</sup>, CUI Ya-qiong<sup>1</sup>, YU Yang<sup>1</sup>, ZHANG Yue-xiang<sup>2</sup>, LI Hui-qiang<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Tianjin Central Hospital of Obstetrics and Gynecology, Tianjin 300100, China)

**Abstract Objective:** To establish a light-initiated chemiluminescent assay (LiCA) for qualitative detection of CMV-IgM antibody in human serum. **Methods:** The assay was performed by incubating CMV antigen-coated chemibeads, biotinylated mouse anti-human IgM antibody and streptavidin-coated sensibeads. The assay buffer, working concentration of antigen and antibody and dilution ratio of serum were optimized. Furthermore, analytical performance was evaluated and the consistency of the results between LiCA and LIAISON was tested. **Results:** The intraassay and interassay coefficient of variation were both less than 10%, ranging from 5.3% to 6.1% and 6.9% to 9.8%. ROC curve analysis showed that the area under the curve, sensitivity and specificity were 0.997, 100%, and 98.9%, respectively. The accordance rate was 95.0% between LiCA and LIAISON in the measurement of CMV-IgM antibody in 100 serum samples. **Conclusion:** Indirect LiCA for qualitative detection of CMV-IgM antibody has been successfully established. The assay is simple, rapid, highly sensitive and has potential clinical prospects.

**Key words** CMV-IgM antibody; prenatal screening; light-initiated chemiluminescent assay; homogeneous immunoassay; qualitative analysis

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)是孕前或孕早期 TORCH 检测重要指标之一<sup>[1]</sup>。CMV 是引起全世界先天性和围产期感染的重要病原体。CMV 感染通常是无症状的,但在免疫功能不全的患者以及通过胎盘传染的胎儿,它的发病率和死亡率会显著提高。孕妇在怀孕初期前 3 个月内首次感染 CMV 可能导致胎儿流产、死胎、畸形<sup>[2]</sup>;新生儿先天性 CMV 感染可能导致新生儿黄疸、肝脾肿大、皮肤瘀点、感音神经性听力损失、宫内发育迟缓,甚至死亡<sup>[3]</sup>。因此,产前筛查 CMV 感染有助于优生优育、发病风险评估以及后期抗病毒治疗。目前国内 TORCH 的实验室检测方法主要为血清学检测和病毒核酸检

测,其中血清学检测 IgM 抗体已作为初步诊断早期感染的重要依据和流行病学的筛查,广泛应用于临床<sup>[4]</sup>。

迄今为止,国内外已开展多种检测 CMV-IgM 抗体的实验室方法,包括胶体金免疫层析法、荧光免疫分析法、酶联免疫检测法、化学发光免疫分析法等。其中胶体金免疫层析法操作简单、快速,但灵敏度较低;荧光免疫分析法特异性较高,但试剂所需费用昂贵,不适合大规模筛查;酶联免疫检测法是临床最常见的一种方法,灵敏度较高,但操作步骤繁琐、耗时较长;化学发光免疫分析法发展至今已逐渐替代其他方法,成为实验室检测 CMV-IgM 抗体的主要方法,具有快速、灵敏度高,易于自动化等特点,虽日渐成熟,但操作仍繁琐,需多次分离和洗涤过程,提高了结果出错的概率。光激化学发光

基金项目 国家自然科学基金面上项目资助(81772259)

作者简介 刘浩(1988-),女,初级检验技师,硕士在读,研究方向:主病毒实验室诊断方法学;通信作者:李会强, E-mail: lhq@tmu.edu.cn。

分析法(light initiated chemiluminescent assay, LiCA)是一种新型均相检测技术<sup>[5]</sup>,此方法无分离和洗涤过程,目前尚无 LiCA 检测 IgM 抗体的相关报道。本研究旨在探索一种新的基于 LiCA 技术的 CMV-IgM 抗体检测方法,建立一套完善的检测体系,并进行方法学评价和临床结果比对。

## 1 材料与方法

1.1 临床标本 实验所用临床标本均取自天津市中心妇产科医院产前筛查妇女和孕早期妇女。共 210 例血清样本,其中 40 例阳性和 70 例阴性血清样本由雅培 ARCHITECT 化学发光免疫分析仪两次检测确定,100 例血清来自随机产前筛查妇女。所有血清样本分装并保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 主要试剂 CMV(pp150, pp65, pp52)重组抗原购自厦门万泰沧海生物公司;鼠抗人 IgM 抗体购自英国 Abcam 公司;长臂活化生物素(Sulfo-NHS-LC-Biotin) 购自美国 Pierce 公司;发光微球(chemibead, CB)与链霉亲和素(streptavidin, SA)包被的感光微球(sensibead, SB)由北京科美生物公司提供。

1.3 仪器 LiCA 分析仪器购自上海博阳生物公司。

1.4 发光微球的包被 分别用抗人 IgM 抗体和 CMV 抗原包被发光微球。参考使用说明书,取 2 mg 发光微球于 0.1 mol/L pH 6.0 的 2-吗啉乙磺酸(MES)缓冲液中离心洗涤,将抗体/抗原与处理过的发光微球以质量比 20:1 混合于 0.1 mol/L pH 6.0 的 MES 缓冲液中,所得混合溶液再与 25 mg/mL 氰基硼氢化钠( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ )以体积比 25:1 于 $37^{\circ}\text{C}$ 避光 48 h,之后用 0.1 mol/L pH 6.0 的 MES 缓冲液反复离心洗涤 3 次,使抗体/抗原包被于发光微球,并调节其浓度为 10 mg/mL。

1.5 生物素的标记 分别用生物素标记抗人 IgM 抗体和 CMV 抗原。根据参考文献<sup>[6-7]</sup>,取生物素于二甲基甲酰胺溶液中进行溶解,将抗体/抗原于 0.1 mol/L pH 8.0 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  缓冲液中充分透析,然后取处理过的生物素和抗体/抗原以摩尔比 20:1 混合于 $37^{\circ}\text{C}$ 搅拌 1 h,最后于 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下在 0.1 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液中透析 24 h,去除游离生物素,获得生物素化(biotinylation, Bio)抗体/抗原。

1.6 检测模式 对 CMV-IgM 抗体而言,有两种分析模式可供选择<sup>[8-9]</sup>,分别是捕获二抗模式和固相抗原模式,前者称为捕获法,后者称为间接法,检测原理见图 1。具体检测步骤如下:捕获法中于微孔依次加入 15  $\mu\text{L}$  稀释血清,25  $\mu\text{L}$  CB-抗人 IgM 抗体,25  $\mu\text{L}$  Bio-CMV 抗原(图 1A);间接法中依次将 15  $\mu\text{L}$  稀释血清,25  $\mu\text{L}$  CB-CMV 抗原,25  $\mu\text{L}$  的 Bio-抗人 IgM 抗体加入微孔(图 1B);然后将微孔板 $37^{\circ}\text{C}$ 孵育 17 min,避光条件下加入 175  $\mu\text{L}$  SB-SA, $37^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,孵育完成后,用 LiCA 分析仪器读取 CB-SB 偶联后产生的光信号。

1.7 条件优化 对反应体系中的缓冲液、抗原浓度、抗体稀释比例和血清稀释比例进行优化。

1.8 临界指数 检测收集来的 50 例阳性和 60 例阴性血清样本,将检测结果进行 ROC 曲线分析。曲线下面积(AUC)范围为 0.5~1.0,一般情况下  $\text{AUC}>0.9$  时表示该方法具有较高的诊断性能<sup>[10]</sup>。间接法 LiCA 采用定性检测 CMV-IgM 抗体,实验结果以样本信号值/临界信号值(S/Co)表示。

## 1.9 方法学评价

1.9.1 精密度 当批内变异系数(CV) $<10\%$ ,批间 CV $<20\%$ 时,表明实验精密度为可接受。准备阴性、

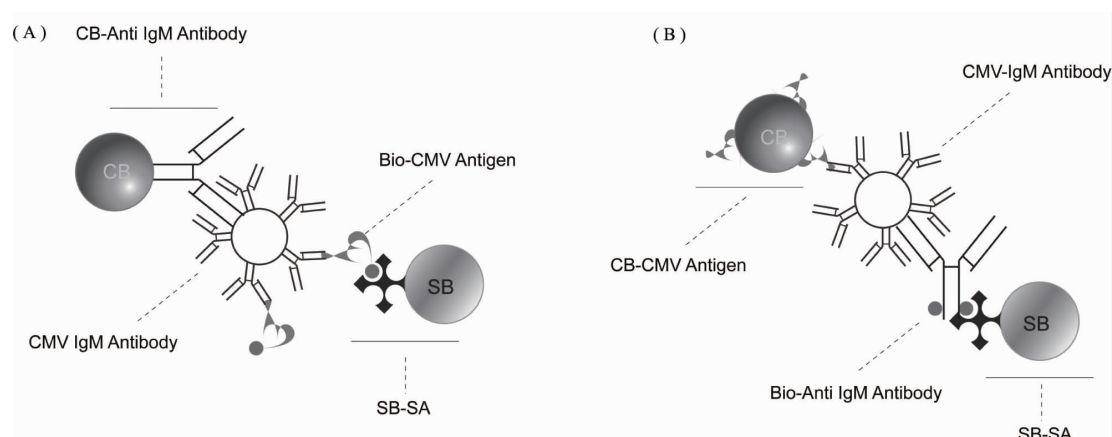


图1 捕获法(A)和间接法(B)CMV-IgM 抗体检测原理示意图

Fig 1 Schematic diagram of the capture (A) and indirect (B) formats for detecting CMV-IgM antibody on LiCA

弱阳性、强阳性 3 个水平的混合血清样本,每个血清在同一天相同条件下重复检测 10 次,计算反应批内 CV; 每个血清做副孔在相同条件下连续检测 10 d,计算反应批间 CV。

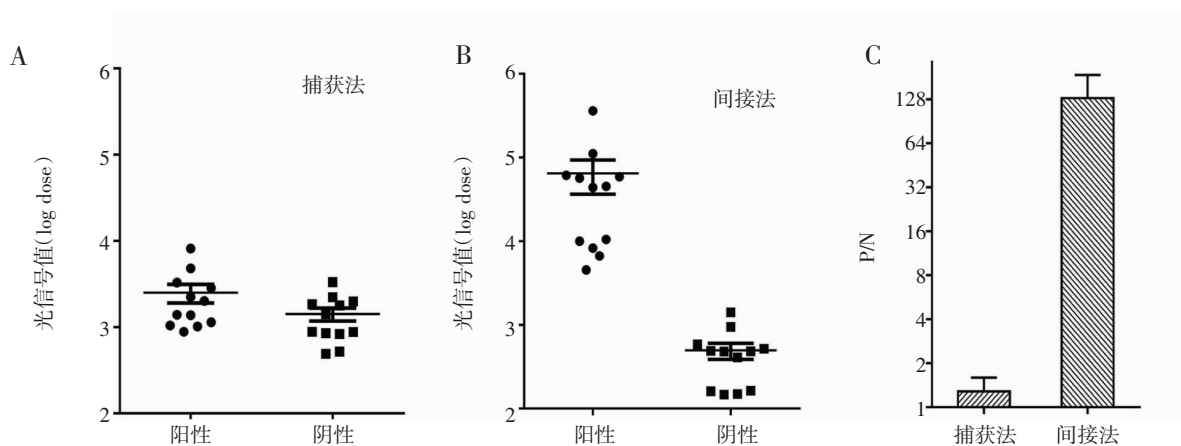
1.9.2 特异性 为评价其他 IgM 抗体对 CMV-IgM 抗体检测的影响,利用本实验建立的方法分别对 5 份弓形虫、5 份风疹病毒、5 份单纯疱疹病毒和 5 份类风湿因子 IgM 抗体阳性的血清进行检测。

1.9.3 检测结果比对 分别用本实验建立的间接法 LiCA 与意大利索灵公司 LIAISON 化学发光免疫分析仪对 100 例临床血清样本进行检测。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。对 LiCA 与 LIAISON 检测结果进行 *Kappa* 一致性检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 确定检测模式 从图 2A 中能明显看出,捕获法中两组样本的光信号值没有显著差别,不能正确区分阳性样本和阴性样本;而如图 2B 所示,在间接法中两组样本的光信号值相差较大,阳性样本和阴性样本区分明显;并且间接法的总 CMV-IgM 抗体阳性信号值/阴性信号平均值(P/N)比值高于捕获法(图 2C)。因此,本实验的最终检测模式为间接法。



注:A.捕获法;B.间接法;C.总 P/N 的比较

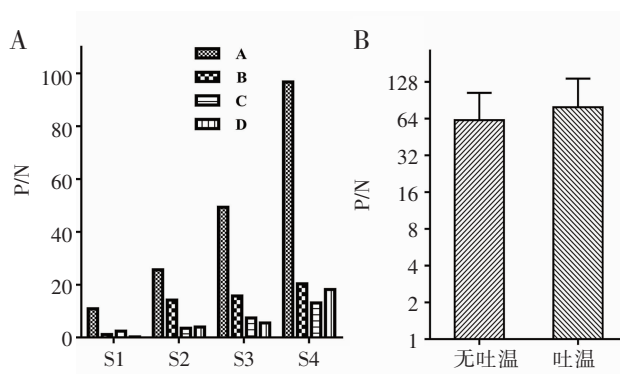
图2 捕获法和间接法比对结果

Fig 2 Comparison of the results between capture and indirect formats

## 2.2 条件优化

2.2.1 缓冲液 准备 4 种缓冲液,缓冲液 A: 0.1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液、0.3 mol/L NaCl 溶液、10 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA);缓冲液 B: 10 mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液;缓冲液 C: 0.1 mol/L pH 6.0 MES 缓冲液、10 mg/mL BSA;缓冲液 D: 0.02 mol/L pH 8.0 Hepes 缓冲液、0.15 mol/L NaCl 溶液、0.03 mg/mL BSA。利用 4 种缓冲液分别检测 4 个不同浓度的阳性混合血清和 20 例阴性血清,通过对 P/N 比值的比较选出反应最优缓冲液。如图 3A 所示,在使用缓冲液 A 时 4 个阳性混合血清的 P/N 比值均最高;进一步优化缓冲液 A,向其中加入了一种表面活性剂-0.01% 吐温-20,结果显示添加了吐温后的总 P/N 高于不添加的(图 3B)。因此,实验最终缓冲液为 0.1 mol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液、0.3 mol/L NaCl 溶液、0.01% 吐温-20 和 10 mg/mL BSA。

2.2.2 工作浓度 将 CB-CMV 抗原稀释至 1.25、2.50、3.75、5.00  $\mu\text{g/mL}$ ,如图 4A 所示,保持其他条件



注:A.比较 4 种缓冲液的 P/N;B.比较缓冲液 A 中添加和不添加 0.01% 吐温-20 的总 P/N

图3 缓冲液对检测结果的影响

Fig 3 Effect of different buffers on the testing results

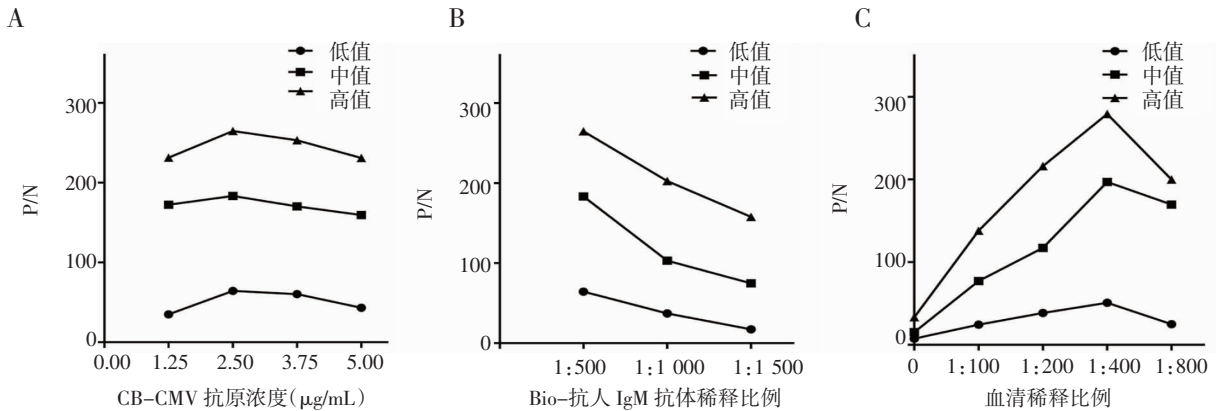
不变,低、中、高 3 个水平的阳性混合血清在 CB-CMV 抗原浓度为 2.50  $\mu\text{g/mL}$  时 P/N 达到了最大值,实验开始出现钩状效应。将 Bio-抗人 IgM 抗体倍比稀释至 1:500,1:1 000 和 1:1 500,保持其他条件不变,3 个水平的阳性血清在 Bio-抗人 IgM 抗体稀释比例为 1:500 时 P/N 最大(图 4B)。因此,本实



验最终 CB-CMV 抗原浓度为 2.50  $\mu\text{g/mL}$ , Bio-抗人 IgM 抗体稀释比例为 1:500。

在 CB-CMV 抗原浓度为 2.50  $\mu\text{g/mL}$ , Bio-抗人 IgM 抗体稀释比例为 1:500 的条件下, 将待检血清

样本倍比稀释至 1:100、1:200、1:400 和 1:800。结果(图 4C) 显示 P/N 比值随着血清稀释比例的增加而增加, 直至达到 1:400 开始下降。因此, 本实验选择 1:400 作为待检血清稀释比例。

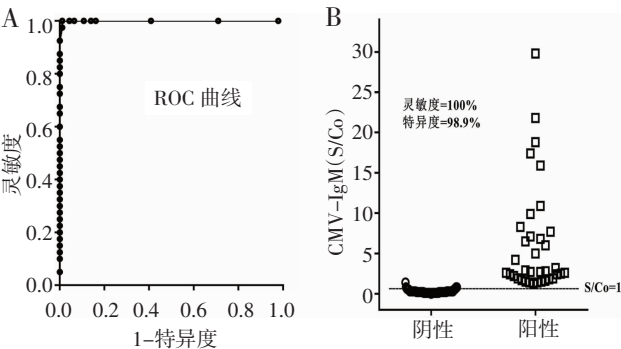


注: A.不同抗原浓度对检测结果的影响; B.不同抗体稀释比例对检测结果的影响; C.不同血清稀释比例对检测结果的影响

图 4 各组分稀释比例对检测结果的影响

Fig 4 Effect of different dilution ratio of each component on the testing results

2.3 最佳临界指数 如图 5A 所示, AUC 为 0.997 (95% CI: 0.992~1.002), 此时临界值为 5819 cps, 灵敏度为 97.1%(95% CI: 0.901~0.997), 特异度为 100% (95% CI: 0.912~1.000)。当 IgM(S/Co) 为 1.45 时, 特异度达到了最大, 为 100%(95% CI: 0.961~1.000), 此时的灵敏度较低, 为 92.5%(95% CI: 0.796~0.981)。当 IgM(S/Co) 为 1 时, 灵敏度达到最大值, 为 100% (95% CI: 0.912~1.000), 此时的特异度也较高, 为 98.9%(95% CI: 0.941~0.999)。故当 IgM(S/Co) < 1 时, 样本可视为阴性, 当 IgM(S/Co)  $\geq$  1 时, 样本可视为阳性(图 5B)。



注: A.间接法 LiCA 检测 CMV-IgM 抗体的 ROC 曲线; B.阴性和阳性血清样本检测结果(S/Co)的分布

图 5 临界指数的选择

Fig 5 Selection of cutoff value

2.4 方法学评价

2.4.1 精密度 如表 1 所示, 本实验的批内 CV 分别为 5.9%, 6.1%, 5.3%; 批间 CV 略高, 分别为 9.8%, 9.7%, 6.9%。

表 1 LiCA 检测 CMV-IgM 抗体的精密度结果

Tab 1 Precision for detecting CMV-IgM antibody on LiCA

样本	批内变异系数			批间变异系数		
	Mean(S/Co)	SD(S/Co)	CV(%)	Mean(S/Co)	SD(S/Co)	CV(%)
阴性	0.375	0.022	5.9	0.394	0.388	9.8
弱阳性	2.232	0.136	6.1	1.973	0.192	9.7
强阳性	33.891	1.812	5.3	33.637	2.319	6.9

2.4.2 特异性 检测结果均为阴性, 结果表明弓形虫、风疹病毒和类风湿因子与本实验 CMV-IgM 抗体的检测无交叉反应。

2.4.3 检测结果比对 如表 2 所示, 相对于 LIAISON, 间接法 LiCA 的总体符合率为 95%, 阳性符合率为 92.5% (37/40), 阴性符合率为 96.7% (58/60), 灵敏度为 94.9%(37/39), 特异性为 95.1%(58/61)。一致性检验,  $Kappa=0.895$ ,  $P<0.01$ 。

表 2 两种方法检测结果比对

Tab 2 Comparison of LiCA and LIAISON

LiCA	LIAISON		合计
	阳性	阴性	
阳性	37	3	40
阴性	2	58	60
合计	39	61	100

3 讨论

CMV-IgM 抗体是产前筛查 CMV 感染的常用血清学指标。本实验探索了一种基于 LiCA 技术定性检测血清 CMV-IgM 抗体的新方法。LiCA 是一种由光激发的均相免疫分析技术, 最早起源于 20 世纪 90 年代的鲁米诺氧通道免疫法<sup>[1]</sup>。具有免洗涤、免分离、高通量、灵敏度高、易使用、易于自动化、成本

低等优势<sup>[12-14]</sup>。其核心在于发光微球和感光微球在距离200 nm时的化学能量传递,感光微球在680 nm激发光的作用下,将周围的氧气转化为单线态氧,单线态氧会将能量传递到相聚200 nm范围内的发光微球上的化学发光物质,使其在520~612 nm处产生光信号;当两者相聚超过200 nm,单线态氧将衰变到基态氧并进入下一个能量循环<sup>[15-16]</sup>。

在本研究中,相较于捕获法分析模式,采用Li-CA间接法分析模式,待检抗体优先与感光微球表面的抗原结合,游离于液相中的抗人IgM抗体更能够抵抗待检血清标本中其他IgM抗体的干扰。本方法的AUC为0.997,表明该方法能较好的区分样本的阴性和阳性,具有较高的诊断性能。批内和批间CV均<10%,表明该方法具有良好的重复性;与弓形虫、风疹病毒和类风湿因子均无交叉反应,证明该方法具有较高特异性;与LIAISON相比,总体符合率为95.0%,阳性符合率为92.5%,阴性符合率为96.7%,灵敏度为94.9%,特异性为95.1%,经一致性检验, $Kappa=0.895$ , $P<0.01$ ,说明该方法与LIAISON之间具有较好的一致性,具有潜在的临床应用前景。此外,在LiCA技术中,1  $\mu$ g化学微球包含 $2\times 10^8$ 微球,在680 nm激发光的作用下,每个感光微球每秒均可释放60 000个单线态氧,如此强的信号放大使得LiCA具有较高灵敏度<sup>[17]</sup>。本研究利用LiCA高灵敏度的特点,将血清进行两次20倍稀释,降低血清中总IgM抗体浓度的同时有效削弱了非特异性IgM抗体对检测的干扰,而LiCA的高灵敏度,使得LiCA体系仍具有检测低浓度CMV-IgM抗体的能力。

以上实验结果表明本研究初步建立的LiCA检测CMV-IgM抗体的方法具有良好的分析性能。此外,该检测体系还具有很多其他优点,如无洗涤和分离步骤,减少了因分离洗涤过程带来的误差;全程共需32 min,整个过程操作简单,快速;实验仅需15  $\mu$ L稀释血清,样本用量较少;试剂稳定性高,成本低,易配制;易实现商业化和自动化,适合大规模筛查等。

本研究成功建立了LiCA间接法分析模式检测CMV-IgM抗体,改善了传统方法干扰因素多,时间长,过程繁琐等缺点,实现了均相、免分离、免洗涤检测,为临床提供了一种新的微量、便捷、高效的CMV-IgM抗体的检测方法。

#### 参考文献:

- [1] Manicklal S, Emery V C, Lazzarotto T A, et al. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(1):86
- [2] Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier A G, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome[J]. Prenat Diagn, 2013, 33(8):751
- [3] Yamamoto A Y, Mussi-Pinhata M M, Isaac M D, et al. Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population[J]. Pediatr Infect Dis J, 2011, 30(12):1043
- [4] 孙立山,周文达. 人巨细胞病毒感染的实验室诊断研究进展[J]. 检验医学, 2005, 20(3):284
- [5] Bian Y, Liu C S, She T T, et al. Development of a light-initiated chemiluminescent assay for the quantitation of sIgE against egg white allergens based on component-resolved diagnosis[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(5):1501
- [6] 周宇捷,相平,孙颖,等. 血清总IgE鲁米诺氧通道免疫分析方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(11):1033
- [7] Cui Y Q, She T T, Zhao H, et al. Competitive light-initiated chemiluminescent assay: using 5- $\alpha$  dihydrotestosterone-BSA as competitive antigen for quantitation of total testosterone in human sera[J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(3):745
- [8] Gentile M, Galli C, Pagnotti P, et al. Measurement of the sensitivity of different commercial assays in the diagnosis of CMV infection in pregnancy[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(8):977
- [9] Sakata H, Tsurudome M, Hishiyama M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for mumps IgM antibody: comparison of IgM capture and indirect IgM assay[J]. J Virol Methods, 1985, 12(3/4):303
- [10] Tiwari A K, Pandey P K, Negi A, et al. Establishing a sample-to cut-off ratio for lab-diagnosis of hepatitis C virus in Indian context[J]. Asian J Transfus Sci, 2015, 9(2):185
- [11] Ullman E F, Kirakossian H, Singh S, et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(12):5426
- [12] Zhuang S H, Guo X X, Wu Y S, et al. Quantum dot-based luminescent oxygen channeling assay for potential application in homogeneous bioassays[J]. J Fluoresc, 2016, 26(1):317
- [13] Poulsen F, Jensen K B. A luminescent oxygen channeling immunoassay for the determination of insulin in human plasma[J]. J Biomol Screen, 2007, 12(2):240
- [14] Wu F, Wang L, Guo Q M, et al. A homogeneous immunoassay method for detecting interferon- $\gamma$  in patients with latent tuberculosis infection[J]. J Microbiol Biotechnol, 2016, 26(3):588
- [15] Bielefeld-Sevigny M. Alpha LISA immunoassay platform-The "No-Wash" high-throughput alternative to ELISA[J]. Assay Drug Dev Technol, 2009, 7(1):90
- [16] Welsh K J, Huang R S, Actor J K. Rapid detection of the active cardiac glycoside convallatoxin of lily of the valley using LOCI digoxin assay[J]. Am J Clin Pathol, 2014, 142(3):307
- [17] Yasgar A, Jadhav A, Simeonov A, et al. Alpha screen-based assays: ultra-high-throughput screening for small-molecule inhibitors of challenging enzymes and protein-protein interactions [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1439:77

(2019-10-22 收稿)