

# HPV16/18 假病毒中和抗体检测方法的验证

赵慧<sup>1</sup>, 李娟,<sup>1</sup> 潘晖榕,<sup>2</sup> 林玉香,<sup>2</sup> 李少伟,<sup>3</sup> 李长贵<sup>1\*</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050; 2. 厦门万泰沧海生物技术有限公司, 厦门 3610223; 3. 厦门大学生命科学学院, 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005)

**摘要:** **目的** 应用假病毒中和法建立检测血清HPV16/18中和抗体滴度检测方法并进行验证。**方法** 分别采用不同批次假病毒以及不同代次细胞对不同滴度的HPV16/18阳性血清进行多次平行检测, 考察这些因素对检验结果的影响; 同时通过对抗HPV16/18双价阳性血清、抗HPV16单价阳性血清和抗HPV18单价阳性血清的检测进一步评估中和抗体检测法的准确性、特异性及重复性。**结果** 不同批次假病毒和不同代次细胞对检验结果的影响均在四倍范围内, 此外该检测法的准确性、特异性、重复性均在可接受标准范围之内。**结论** 建立的假病毒法可满足中和抗体效价检测的要求, 可用于评价疫苗的免疫效果。

**关键词:** HPV16/18 中和抗体; 假病毒; 方法学; 验证

中图分类号: 文献标志码: 文章编号:

## Validation of pseudovirion neutralization antibody assay for detecting HPV 16 or HPV 18 antibodies

\* ZHAO Hui<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, PAN Hui-rong<sup>2</sup>, LIN Yu-xiang<sup>2</sup>, LI Shao-wei<sup>3</sup>, LI Chang-gui<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop and validate a pseudovirion-based neutralization assay (PBNS) in determination the titers of serum neutralizing antibodies, including HPV 16 and HPV 18 antibodies. **Methods** PBNS assay was repeatedly used in detection the titers of both antibodies of HPV 16 and HPV 18 in three different serum samples for observing the effects of different batches of pseudovirion and different passages of cells on the experiment results. The developed method was also evaluated for accuracy, specificity and reproducibility based on the detection antibodies of HPV 16 and HPV 18 by positive sera in both positive (HPV 16 and HPV 18) valent or single positive (either HPV16 or HPV18) valent. **Results** The effects of different conditions including batches of pseudovirion and passages of cells on the antibody titers varied within a quadruple range. Furthermore, the accuracy, specificity and reproducibility of the developed method were acceptable. **Conclusion** The established PBNS can meet the detection requirements for neutralizing antibodies of HPV 16 and HPV 18, which could be used in evaluating the immune effect of the related vaccine.

**Keywords:** Neutralization antibodies for HPV 16/18; Pseudovirion; Method; Validation

收稿日期: 2012.9.26

修回日期: 2012.11.13

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2012AA02A402); 国际科技合作项目 (2010DFB30100)

通讯作者: 李长贵 E-mail: changguili@yahoo.com.cn

作者简介: 赵慧 (1980-), 女, 助理研究员 主要从事病毒疫苗质量控制工作

人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus HPV) 疫苗是预防宫颈癌, 尖锐湿疣等HPV感染相关疾病的有效手段<sup>[1]</sup>。目前在全球范围内已经有两种预防性HPV疫苗获批上市, 它们分别是默克公司生产的四价疫苗 (Gardasil) 和葛兰素史克公司生产的二价疫苗 (Cervarix)。这两种疫苗均被证明具有良好的有效性及安全性<sup>[2-4]</sup>。国内也有企业正在积极进行HPV预防性疫苗的研制, 并有多家企业产品进入了临床试验阶段。免疫原性评价是HPV预防性疫苗临床研究中的重要内容。世界卫生组织在其指导原则建议把中和抗体水平作为评价疫苗免疫原性的指标<sup>[5]</sup>。在现有的几种HPV中和抗体检测方法中, 假病毒法较之于与竞争ELISA法及其它方法具有能够直接检测具有中和活性的所有抗体, 且不受抗原表达系统来源影响而被称为“金标准”<sup>[6,7]</sup>。但是假病毒法检验周期长, 检测过程复杂, 缺乏标准化试剂, 因此只有对该方法进行全面的、充分的验证才能保证其在临床试验中使用的准确及可靠。本研究对拟用于国产HPV预防性疫苗临床试验的假病毒法进行了方法学验证, 为该方法的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及设备

抗HPV16、抗HPV18单价阳性山羊血清由厦门万泰沧海生物技术有限公司制备<sup>[8,9]</sup>;抗HPV16/18双价阳性人血清由中国食品药品检定研究院提供;带有GFP报告基因的HPV16/18假病毒由厦门万泰沧海生物技术有限公司制备<sup>[10,11]</sup>;293FT细胞购自Invitrogen公司, 培养于含10% FBS 的DMEM 完全培养基中;荧光倒置显微镜 (NikonTi-SMicroscope) 为日本尼康公司产品。

### 1.2 假病毒中和实验检测方法:

将  $1.5 \times 10^4$  个/孔 293FT 细胞接种在 96 孔细胞培养板, 置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中至少培养 4h。将用 10% DMEM 预稀释至合适浓度的待检血清倍比稀释, 每个稀释度取 60μL 血清样本与同样体积的稀释至 MOI=0.2 的假病毒混合, 室温孵育 1h。取 100μL 孵育后的血清和假病毒混合液加入上述 96 孔细胞培养板中, 72h 后于荧光显微镜下观察结果。同时设阴性对照以及空白对照。待检血清呈现的荧光信号位于阴性对照一半时所在的最大血清稀释倍数即为其中和抗体滴度。

### 1.3 假病毒中和实验检测方法验证

1.3.1 不同批次假病毒对中和试验检测结果的影响 使用 3 批不同的 HPV16 和 HPV18 假病毒, 对抗 HPV16/18 双价阳性人血清样品进行平行检测, 计算 3 次检测结果中最大值与最小值的比值, 验证不同假病毒批次对检测结果的影响。

1.3.2 不同细胞代次对中和试验检测结果的影响 使用第 15、20 以及 30 代次的 293FT 细胞对抗 HPV16/18 双价阳性血清样品进行检测, 测得每个样品抗 HPV16 型和抗 HPV18 型中和抗体滴度的 3 次平行检测结果, 计算检测结果中最大值与最小值的比值, 验证不同细胞代次对检测结果的影响。

1.3.3 准确性 取抗 HPV16 以及抗 HPV18 单价血清各 1 份, 分别进行原倍、4 倍、16 倍、64 倍、256 倍系列稀释后作为独立的血清样本, 用建立的假病毒中和法进行检测, 每个稀释倍数重复检测 1 次, 计算实际测得的中和滴度结果与稀释后理论中和滴度的比值, 考察该方法的准确性。

1.3.4 特异性 以 HPV18 假病毒对 3 份抗 HPV16 单价血清进行中和抗体检测,同时以 HPV16 假病毒对三份抗 HPV18 单价血清进行中和抗体检测,计算两个不同型别假病毒之间的交叉反应,考察该方法的特异性。

1.3.5 重复性 多次平行检测三个不同滴度的 HPV16/18 阳性血清样本,考察该方法的重复性。

#### 1.4 验证结果的判定标准

目前并无相关的法规或指导原则对相应的判定标准进行界定,也未见其他研究者的类似验证工作,因此依据长期工作经验,认为在进行血清稀释的试验中,当稀释倍数为二倍时,这种试验可接受的误差为上下一个梯度,即在四倍范围内波动,据此制定试验标准。在平行试验中,不同批次假病毒、细胞代次以及重复性检测的结果中其最大值与最小值的比值均不大于 4。准确性验证中所测得的中和滴度结果与理论滴度偏差不超过 2 倍。在特异性验证中,抗 HPV16 与抗 HPV18 抗体之间的交叉反应滴度小于同型别滴度的 1%,作为判定标准。

## 2 结果

### 2.1 不同批次假病毒对检验结果的影响:

3 份血清使用 3 批假病毒所得的检测结果比值均不大于 4,在验证标准范围内。结果(见表 1)。

表 1 使用不同批次假病毒检测 3 份血清滴度结果

Tab. 1 Antibody titers for HPV 16 and HPV 18 in three serum samples detected by PBNS with the different batches of pseudovirion

病毒类型	假病毒批次	中和抗体滴度		
		血清 1	血清 2	血清 3
HPV16	20110824	320	5120	40960
	20111202	320	5120	20480
	20110427	320	5120	40960
	均值	320	5120	32510
HPV18	20110824	320	2560	10240
	20110826	320	1280	10240
	20110921	320	2560	20480
	均值	320	5120	12902

### 2.2 不同代次细胞对检验结果的影响:

3 份血清使用第 15、20、30 代次细胞所得的检测结果的比值均不大于 4,在验证标准范围内。结果(见表 2)。

### 2.3 准确性:

同一份血清分别进行原倍、4 倍、16 倍、64 倍、256 倍系列稀释后,其实际检测的抗 HPV16 以及

HPV18 型抗体滴度与理论滴度之间的比值均为 1（结果未出示），在验证标准范围内。

表 2 使用不同代次细胞的检测结果

Tab. 2 Antibody titers for HPV 16 and HPV 18 detected by PBNS with the different passages of cells

血清样品	HPV16 中和抗体滴度				HPV18 中和抗体滴度			
	第 15 代	第 20 代	第 30 代	均值	第 15 代	第 20 代	第 30 代	均值
血清 1	320	320	640	403	640	320	640	508
血清 2	5120	5120	5120	5120	2560	1280	2560	2032
血清 3	40960	40960	40960	40960	10240	10240	20480	12902

#### 2.4 特异性:

HPV16 单阳性血清样本型特异性中和抗体检测滴度均高于 655360，与 HPV 18 型特异性抗体的交叉滴度均低于 40，远小于同型别滴度的 1%。同样，HPV18 单阳性血清样本型特异性中和抗体检测滴度均高于 1310720，与 HPV 16 型特异性抗体的交叉滴度均低于 160，远小于同型别滴度的 1%，在验证标准范围内。结果（见表 3）。

表 3 假病毒中和法特异性验证

Tab.3 Validation test for specificity of PBNS

血清样本	HPV16 中和抗体滴度	HPV18 中和抗体滴度
HPV16 单阳性 血清	1	>1310720
	2	655360
	3	655360
HPV18 单阳性 血清	1	40
	2	40
	3	40

2.5. 重复性: 14 次重复检测结果最大值与最小值的比值均不大于 4。例如，血清样本 1 的 HPV18 型抗体的 14 次假病毒中和抗体检测结果中，抗体滴度最大值为 640，最小值为 320，其最大值与最

小值的比值为 2。结果（见表 4）。

表 4 重复性验证

Tab. 4 Validation test for reproducibility of PBNS

检测结果	血清 1-中和抗体滴度		血清 2-中和抗体滴度		血清 3-中和抗体滴度	
	HPV16	HPV18	HPV16	HPV18	HPV16	HPV18
1	320	320	5120	2560	40960	10240
2	320	320	5120	1280	20480	10240
3	320	320	5120	2560	40960	20480
4	320	640	5120	2560	40960	10240
5	320	320	5120	1280	40960	10240
6	640	640	5120	2560	40960	20480
7	320	320	2560	2560	20480	20480
8	320	320	2560	2560	20480	20480
9	320	320	1280	2560	20480	20480
10	320	320	2560	2560	20480	10240
11	320	320	5120	2560	20480	20480
12	320	320	1280	2560	20480	20480
13	320	320	2560	2560	10240	20480
14	320	320	1280	2560	20480	10240
均值	336	353	3121	2319	24965	15217
(95% CI)	(334~338)	(350~356)	(3118~3124)	(2316~2322)	(24962~24968)	(15214~15220)

### 3 讨论

目前在 HPV 预防性疫苗临床试验中用于抗体滴度检测的方法主要有直接 ELISA 法，单表位竞争 ELISA 法以及假病毒法<sup>[12]</sup>。在这几种方法中，直接 ELISA 法具有检测方法简便，适于进行高通量检测的突出优点<sup>[13]</sup>，但是由于该方法并不是直接检测标本中抗体对病毒入侵的阻断作用，而是检测标本中所有能够与抗原反应的抗体，只能够间接反应中和抗体水平。此外，该方法依赖于所使用的检测抗原，不同表达系统来源的检测抗原可能对检测结果产生影响。单表位竞争 ELISA 法能够检测标本中针对特定中和表位的抗体水平，较直接 ELISA 法结果更能反映标本中具有中和能力抗体水平<sup>[14]</sup>。但是该方法依然无法完全检测出标本中具有中和活性的所有抗体。假病毒法是模拟抗体阻断病毒进入细胞的生物过程，最能直接反应抗体的保护效果，是国际公认的 HPV 中和抗体检测的金标准。尽管假病毒法具有上述优势，但是存在检测周期长，影响因素众多等问题。要将其应用于临床试验中需要对其进行充分的方法学验证，以保证检测结果的准确、可靠。

研究对假病毒中和检测法中关键影响因素（不同批次假病毒和不同代次细胞）及此方法的方法

学性能（准确性、重复性、特异性）进行了验证，通过对 3 个不同抗体滴度水平的 HPV16/18 双阳性验证血清，采用不同批次假病毒、不同代次细胞、细胞培养板不同位置等试验条件对验证血清进行中和抗体滴度检测，结果显示，同一份待检验血清的所有检测结果之间的差异不超过 4 倍，即判别血清滴度的所在稀释度之间相差不超过 2 个梯度，均在验证标准范围内。而且多次重复检测结果也都在验证标准范围之内。在对该方法的准确性验证结果显示，同一血清样本采用不同稀释方法所测得的中和抗体滴度结果与稀释后理论滴度完全一致，完全符合验证标准。而特异性验证结果也显示，HPV16 与 HPV18 之间的交叉滴度均远远小于同型别滴度的 1%，基本可以视为无交叉反应，同时也说明 HPV16/18 假病毒中和检测法具有较高的特异性。因此，研究证实，通过对检测过程的严格控制等手段，假病毒法在进行 HPV16/18 中和抗体检测时具有良好的准确性、重复性、特异性，能够较为真实的反应待测标本中的中和抗体水平，可以在 HPV 预防性疫苗临床试验中应用于疫苗的免疫原性评价。

当然，假病毒法今后能否更为广泛应用还有赖于高通量检测能力的提高，检测周期的缩短以及操作流程的简化。

## 参考文献

- [1] Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles [J]. *Virology*, 1991,185(1): 51-257.
- [2] Schiller JT, Castellsague X, Villa LL, et al. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results [J]. *Vaccine*, 2008, 26(10):53-61.
- [3] Descamps D, Hardt K, Spiessens B, et al. Safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for cervical cancer prevention: a pooled analysis of 11 clinical trials [J]. *Hum Vaccin*, 2009, 5(5):332-340.
- [4] Paavonen J, Naud P, Salmeron J, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women [J]. *Lancet*, 2009, 374(9686):301-314.
- [5] World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines to assure the quality, safety and efficacy of recombinant human papillomavirus virus-like particle vaccines. Geneva. [2007]. <http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/humanpapillomavirus/HPVg%20Final%20BS%202050%20.pdf>
- [6] Yeager MD, Aste-Amezaga M, Brown DR, et al. Neutralization of human papillomavirus (HPV) pseudovirions: a novel and efficient approach to detect and characterize HPV neutralizing antibodies [J]. *Virology*, 2000, 278(2):570-577.
- [7] Pastrana DV, Buck CB, Pang YY, et al. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18 [J]. *Virology*, 2004, 321(2):205-216.
- [8] 魏旻希, 李少伟, 黄博, 等. 人乳头瘤病毒 16 型病毒样颗粒的制备及其免疫原性研究 [J]. *病毒学报*, 2009, 25(4): 245-250.
- [9] 谢明辉, 李少伟, 沈文通, 等. 人乳头瘤病毒 18 型病毒样颗粒在大肠杆菌中的表达及免疫原性分析 [J]. *生物工程学报*, 2009, 25(7): 1082-1087.
- [10] 卢五迅, 程通, 李少伟, 等. 人乳头瘤病毒 16 型假病毒中和实验的建立和初步应用 [J]. *生物工程学报*, 2006, 22(6): 990-995.

[11] 郑舟, 周国栋, 张雅丽, 等. 人乳头瘤病毒假病毒制备方法的优化[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2009, 48(02): 269-273.

[12] Dessy FJ, Giannini SL, Bougelet CA, et al. Correlation between direct ELISA, single epitope-based inhibition ELISA and pseudovirion-based neutralization assay for measuring anti-HPV-16 and anti-HPV-18 antibody response after vaccination with the AS04-adjuvanted HPV-16/18 cervical cancer vaccine[J]. Hum Vaccin, 2008, 4(6): 425-434.

[13] Harper DM, Franco EL, Wheeler C, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2004, 364(9447): 1757-1765.

[14] Opalka D, Lachman CE, MacMullen SA, et al. Simultaneous quantitation of antibodies to neutralizing epitopes on virus-like particles for human papillomavirus types 6, 11, 16, and 18 by a multiplexed luminex assay[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(1): 108-115.

(本文编辑: 陈金元)

