

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2013.05.021

水痘-带状疱疹病毒抗原的 ELISA 定量检测方法的建立

周 钦^① 贾继宗^① 刘 剑^② 陈丽宏^② 杨连威^② 曾丽文^① 韩金乐^① 叶祥忠^① 李益民^① 夏焕章
(沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

中国图书分类号 R392.1 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2013)05-0542-05

[摘要] 目的: 建立水痘-带状疱疹病毒(VZV) 抗原的双抗体夹心 ELISA 定量检测方法, 用于质控 VZV 灭活疫苗研发和生产中抗原含量。方法: 以 VZV 中和单抗 5F6C8 为包被抗体, 8H5D1 为酶标抗体, 构建定量检测 VZV 抗原的双抗体夹心 ELISA 方法, 并对本方法的特异性、灵敏度、准确性、线性和稳定性等性能进行分析。结果: 建立的双抗体夹心定量检测 VZV 抗原的 ELISA 方法, 线性范围为 0.4 μg ~ 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 相关系数为 $R^2 = 0.994$, 定量限度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 变异系数 $CV < 15\%$, 准确性回收率介于 87.5% ~ 111.6% 之间, 稳定性 37 $^{\circ}\text{C}$ 6 天的回收率 $> 80\%$ 。与 VZV 以外的相关病毒样本没有交叉反应。结论: 构建的 VZV 抗原 ELISA 定量检测方法的各项性能符合定量检测需要, 可用于 VZV 灭活疫苗的研发和生产过程的抗原含量检测。

[关键词] 水痘-带状疱疹病毒; 抗原; 双抗体夹心 ELISA

Development of a quantitative ELISA detection method for Varicella Zoster Virus (VZV) antigen

ZHOU Qin, JIA Ji-Zong, LIU Jian, CHEN Li-Hong, YANG Lian-Wei, ZENG Li-Wen, HAN Jin-Le, YE Xiang-Zhong, LI Yi-Min, XIA Huan-Zhang. College of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

[Abstract] **Objective:** To develop a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (Q-ELISA) to determine the concentration of Varicella Zoster Virus (VZV) antigen. This method was used to determine VZV antigen content at each stage of VZV inactivated vaccine developing and manufacturing process. **Methods:** A double antibody sandwich Q-ELISA was developed to determine concentration of VZV antigen, which was based on the the high-affinity neutralizing monoclonal antibodies 5F6C8 as capture antibodies and 8H5D1 as HRP-labeled antibody. The performance of reagent were evaluated. **Results:** The Q-ELISA for VZV antigen content was successfully developed. The reagent had good performance. The quantitation scope was 0.4 μg ~ 13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, The coefficient correlation was 0.994, the limit of detection was 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the recovery was between 87.5% and 111.6%. The stability was up to 80% after reagent was heated for 6 days at 37 $^{\circ}\text{C}$. The variation coefficient was lower than 15%, and the reagent was no reaction with other sample except VZV antigen. **Conclusion:** The Q-ELISA for VZV antigen was developed with good specificity, accuracy and stability. The method can be used to determine VZV antigen content during development and production of VZV inactivated vaccine.

[Key words] Varicella Zoster Virus (VZV); Antigen; Double antibody sandwich ELISA

水痘-带状疱疹病毒 (Varicella Zoster Virus, VZV) 是疱疹病毒科^[1] α -疱疹病毒亚科的成员, 是一种具有高度传染性的病毒, 能引发水痘 (Varicella) 和带状疱疹 (Herpes Zoster)。病毒初次感染引发水痘, 产生发热、皮疹和瘙痒等症状, 同时, 病毒会

潜伏于感觉神经中枢, 且具有终生潜伏性。在儿童中水痘通常是自愈的, 但是至少有 1% 的 15 岁以下儿童会出现并发症, 如细菌二次感染、肺炎、脑炎、肝炎、关节炎和眼部综合征等, 其中 10% ~ 50% 的儿童因为感染需要就诊。现研究发现至少有 15% 水痘患者机体的潜伏病毒在一定条件下会再激活产生带状疱疹, 且带状疱疹的发病率随年龄增加而提高^[2,3], 50% 带状疱疹患者分布于 60 岁以上人群。愈后神经痛是带状疱疹的主要并发症, 一般持续半年左右, 有时可长达一年, 甚至更长时间, 严重困扰患者身心健康。水痘和带状疱疹及其相关的并发症已经成为公共卫生问题而逐渐受到人们的重视, 预

①北京万泰生物药业股份有限公司, 北京 102206

②厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005

作者简介: 周 钦 (1988 年 -), 男, 在读硕士, 主要从事病毒及疫苗检测方法研究, E-mail: zhouqinhubei@126.com;

指导教师: 叶祥忠 (1967 年 -), 男, 硕士, 高级工程师, 主要从事疫苗与诊断试剂研发方面的研究, E-mail: yxzh_hb@163.com。

防和治疗成为研究的重点。接种活疫苗是预防水痘和带状疱疹的最经济的措施,但是,对器官移植患者或细胞免疫缺陷者而言^[4],减毒活疫苗存在安全性问题,因而,对这类人群而言,灭活疫苗在预防带状疱疹上更安全。研发 VZV 抗原检测试剂,是对在 VZV 疫苗特别是在灭活疫苗的研制过程中,准确质控病毒抗原含量,指导疫苗研发、质控疫苗生产和保障疫苗放行的最有效手段。

本文介绍一种灵敏的、准确的和特异的 VZV 抗原检测系统以及该系统在 VZV 抗原检测中的相关应用,为 VZV 疫苗的检测提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 抗体及参考品 VZV 单克隆抗体 5F6C8 由厦门大学提供,VZV 单克隆抗体 8H5D1 由北京万泰生物药业股份有限公司(下称万泰公司)提供。

1.1.2 检测样品 水痘-带状疱疹病毒(VZV)、巨细胞病毒(CMV)、单纯疱疹病毒 I/II(HSV I/II)、甲型肝炎病毒(HAV)、柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)和人肠道病毒 71 型(EV71)由万泰公司保存。

1.1.3 其他试剂 牛血清白蛋白(BSA)、辣根过氧化物酶(HRP)(美国 Sigma 公司);BCA 试剂(美国 Thermo 公司),单抗-HRP 由万泰公司制备。

1.2 单抗的制备 以纯化的 VZV 糖蛋白(VZV-gp)为免疫原^[5],免疫 BALB/c 小鼠,采集并检测免疫后小鼠血清抗 VZV-gp 抗体滴度,当血清抗体滴度达到 1×10^4 时,取安乐死小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤 Sp2/0 细胞按经典 PEG 方法融合。间接 ELISA 法筛选特异性杂交瘤细胞。杂交瘤细胞经腹腔接种小鼠生产腹水,腹水经硫酸铵沉淀和 Q Sepharose High Performance 和 Protein A 柱层析得到纯化的单克隆抗体(mAb)。

1.3 单克隆抗体筛选 用 VZV-gp 包被酶标板,用间接法分析单抗效价;将效价高的抗 VZV 的单抗用斑点杂交法及 Western blot 法检测抗体的特异性,细胞中和法测单抗效价,选择特异性好的抗体构建双抗体夹心系统。

1.4 单克隆抗体抗原表位分析 用叠加 ELISA 法进行抗原表位分析^[6]。根据公式: $AI = [2 \times A(1+2) / (A1 + A2 - 1)] \times 100\%$,计算 2 株单抗之间的重叠率。其中 $A(1+2)$ 为两株单抗叠加后的 $OD_{450\text{nm}}$ 值, $A1$ 为一株单抗的 $OD_{450\text{nm}}$ 值, $A2$ 为另一株单抗的 $OD_{450\text{nm}}$ 值;若 $AI > 50\%$,表示两株单抗可能识别不同抗原表位, AI 值越大,说明两株单抗重叠可能性越小。

1.5 双抗体夹心 ELISA 法的建立 将纯化后用于包被的单抗和 HRP 标记的单抗作系列稀释,采用方阵试验确定两者最佳的使用浓度,采用正交试验和平行试验筛选并确定封闭液、样品稀释液和酶标抗体稀释液组方,建立双抗体夹心检测方法^[7]。

1.6 性能分析 根据《中华人民共和国药典》三部(2010 版)^[8]对检测方法验证的要求,对试剂的线性、准确性、特异性和稳定性等性能进行分析。

1.6.1 准确性试验 将 VZV 抗原内部参考品用样品稀释液稀释为高值(12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、中值(6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、低值(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)共 3 个浓度的 VZV 抗原溶液,用本方法进行测定,每个浓度样品作 3 个重复检测,计算稀释标准品的测定值和理论标示值的比值,即回收率,分析试剂的准确性。

1.6.2 精密性试验 对高值(12 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、中值(6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、低值(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)3 个浓度的 VZV 抗原稀释标准品,在 3 人次独立试验中,对每一稀释度作 3 个重复测定。比较测定值和真实值,计算均值、标准偏差,分析试剂精密性。

1.6.3 直线性和定量限度试验 用样品稀释液将 VZV 抗原参比品稀释到 26、13、6.5、3.25、1.6、0.8、0.4、0.2、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用本方法进行测定,以抗原浓度对 OD 值作直线回归分析,分析最佳线性范围,确定定量限度。

1.6.4 稳定性试验 通过 37 $^{\circ}\text{C}$ 热破坏性试验预测试剂的稳定性。用在 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 天和 6 天的试剂,测定 VZV 抗原的吸收值,以 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置的试剂作对照,计算于 37 $^{\circ}\text{C}$ 与 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置的试剂检测样品的 OD 值之比,分析试剂的稳定性。

1.6.5 特异性试验 用本方法分别检测灭活的 VZV 收获液、CMV 收获液、HSV I / II 收获液、CA16 收获液、HAV 收获液,用本方法分别检测小牛血清、小鼠血清、正常人血清、人血白蛋白、MRC-5 细胞、MEM 培养基。分析本试剂的特异性。

1.7 方法的应用 抗原量检测用本方法检测 23 批冻干带状疱疹减毒活疫苗(万泰公司制备)中 VZV-Ag 的含量,并同时检测冻干活疫苗的病毒滴度,根据检测结果拟定疫苗病毒滴度与抗原含量之间的关系。

2 结果

2.1 单克隆抗体筛选 根据抗体滴度、细胞中和水平、斑点杂交、Western blot 和配对后检测 VZV 抗原的灵敏度,筛选到两株用于试剂构建的单抗,5F6C8 单抗用于包被;8H5D1 单抗用于 HRP 标记的组合最

优。两株单抗的特性见表 1 和图 1、2。

2.2 单克隆抗体抗原表位分析 采用叠加 ELISA 法对两株单抗进行抗原表位分析,见表 2。结果表明 5F6C8 识别 VZV-gp 上的一个抗原表位,8H5D1 识别 VZV-gp 上的另一个抗原表位。

2.3 双抗体夹心方法建立 通过优化 ELISA 试验条件,确定 VZV 抗原的双抗体夹心 ELISA 定量检测系统:单抗用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释到 2.0 μg/ml 包被 96 孔板,100 μl/孔,4℃ 过夜,弃液;用封闭液封闭,200 μl/孔,37℃ 温育 2 小时;加稀释样品,100 μl/孔,37℃ 温育 1 小时;洗板 5 次,加酶标抗体工作液,100 μl/孔,37℃ 温育 45 分钟,洗板 5 次,加 TMB 显色液,100 μl/孔,37℃ 温育 15 分钟,加 2 mol/L H₂SO₄ 终止,450/630 双波长读 A 值。绘制标准曲线,拟定标准方程,代入样品的 A 值,计算待检品抗原活性值。

2.4 性能分析

2.4.1 准确性和精密性 待检品的回收率介于 87.5% ~ 111.6% 之间;重复检测和精密度检测的变异系数 < 15%。结果如表 3 所示。

表 1 两株抗体的特性

Tab.1 The characteristics of two VZV antibodies

McAb name	Purpose	Neutralizing antibody titer	Antibody titer	Epitope	Ab type
8H5D1	HRP sign	320	1:100 K	Linear	IgG ^{2a}
5F6C8	coating	256	1:1950 K	Linear	IgG ¹

表 2 叠加 ELISA 试验结果

Tab.2 The result of superposable ELISA test

Mabs	5F6C8	8H5D1
5F6C8		
8H5D1	69.45%	

表 3 准确性及精密性验证结果

Tab.3 Verification of accuracy and precision of Q-ELISA

VZV antigen concentration(μg/ml)	Average (μg/ml)	Recovery ratio (%)	CV (%)
12	12.4 ± 0.6	98.7-106.6	0.2
6	6.2 ± 0.6	96.3-111.6	1.0
3	2.9 ± 0.5	87.5-110.2	3.6

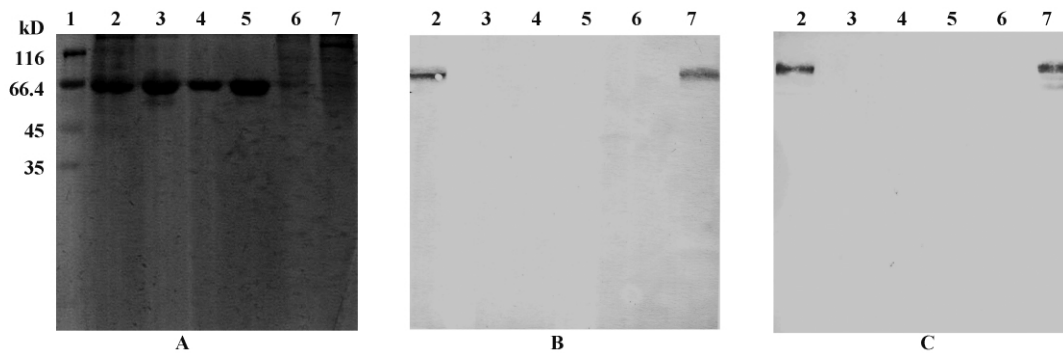


图 1 两株 VZV 抗体的 Western blot 实验

Fig.1 Western blot of antibodies against VZV

Note: A. SDS-PAGE of samples; B. Western blot of 5F6C8; C. Western blot of 8H5D1 (1. Marker; 2. VZV-gp; 3. NBS; 4. Vaccine protectant; 5. Plasbumin; 6. MRC-5; 7. VZV).

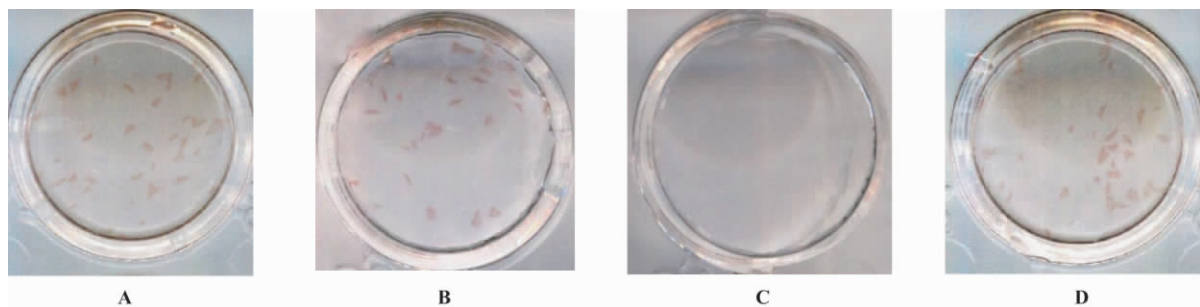


图 2 抗体的斑点杂交分析

Fig.2 Plaque assay of monoclonal antibody against VZV

Note: A. 5F6C8 plaque assay; B. 8H5D1 plaque assay; C. Negative hybridization; D. Positive hybridization.

2.4.2 线性和定量限度 VZV-gp 抗原内部参比品用样品稀释液稀释为 26、13、6.5、3.25、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 μg/ml 后,用本方法测定吸光值,以浓度和吸光值作回归分析得到,线性范围为 0.4 μg ~ 13 μg/ml、 $R^2 = 0.994$ 定量限度为 0.4 μg 的标准曲线,见图 3。

2.4.3 稳定性试验 通过 37℃ 热破坏试验预测试剂的稳定性。在 37℃ 放置 3 天和 6 天的试剂,测定吸收值,试剂存放稳定性 > 80% 见表 4。

2.4.4 特异性试验 用本方法测定特异性试验样品,检品的 $A_{450/630}$ 均小于 0.4 μg/ml,小于 Cutoff 值 (0.075),即无交叉反应。

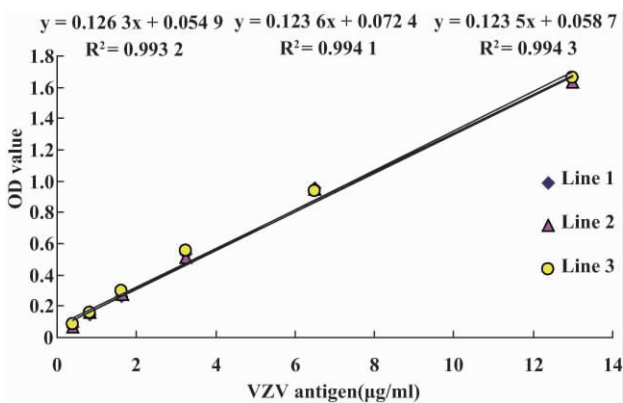


图 3 VZV 抗原内部参比品的标准曲线
Fig. 3 Standard curve of internal reference of VZV antigen

表 4 试剂的热稳定性性能分析结果

Tab. 4 Verification of thermostability of Q-ELISA

37℃ (d)	Coating recovery	Enzyme recovery	Sample recovery	Entirety recovery
3	100%	85%	96%	83%
6	100%	86%	93%	82%

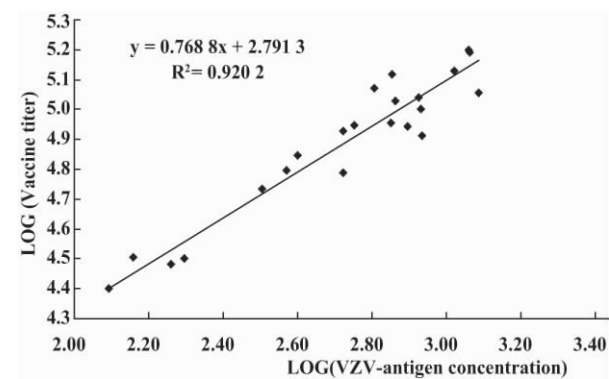


图 4 VZV-antigen 含量与带状疱疹疫苗滴度的相关性分析
Fig. 4 Correlation analysis of VZV-antigen concentration and Herpes Zoster vaccine titer relationship

2.5 抗原量检测 用本方法检测冻干带状疱疹疫苗的结果显示,疫苗抗原含量与疫苗病毒滴度呈现良好的相关性, $R = 0.96$, 见图 4。

3 讨论

带状疱疹是由潜伏于人感觉神经中枢的 VZV 再激活引发的沿神经末梢分布的真皮性疱疹^[9], 随年龄增加带状疱疹发病率急剧增加, 60 岁以上带状疱疹患者占 50% 以上, 愈后神经痛 (PHN) 是最常见的并发症^[10], 随年龄增加 PHN 发病率和严重性都增加, 带状疱疹这种发病规律是因为细胞免疫应答水平随年龄增加而降低所致。细胞免疫低下者或细胞免疫缺陷者如化疗患者、HIV 患者、器官移植者易患带状疱疹, 这类人群接种带状疱疹活疫苗风险更大, 接种灭活疫苗可能是较好的选择。

Atsuko 等^[11] 将默克公司的热灭活水痘疫苗接种于移植前和移植后的造血细胞移植患者, 临床显示疫苗组接种者体内 $IFN-\gamma$ 和 $TNF-\alpha$ 水平显著高于安慰剂组。水痘疫苗针对 VZV 特异的 CD4 T 细胞在造血细胞移植前后能给患者提供持久和稳固的细胞免疫应答。灭活 VZV 疫苗包含的多种病毒蛋白能提高患者体内的细胞免疫应答, 降低移植受体水痘和带状疱疹的发病率, 避免减毒活疫苗在移植患者体内的再活化引发水痘或带状疱疹的风险; Rebecca^[12] 进行的类似研究并得出相同结论。Steven 等^[13] 就默克公司水痘减毒活疫苗与水痘热灭活疫苗免疫的血清阳性健康成人, 比较免疫后成人体内抗体滴度, 发现两种免疫方式所产生的抗体滴度水平没有差异, 并指出水痘灭活疫苗可以解决免疫受损患者例如 HIV 感染者或者肿瘤化疗患者因不能使用减毒活疫苗问题。随后 Anthony 等^[14] 就默克公司水痘减毒活疫苗与水痘热灭活疫苗在健康老年人体内进行了同样的研究, 比较了两种免疫方式所产生 T 细胞数量、抗体水平、 $IFN-\gamma$ 水平, 并得出 VZV 灭活疫苗和 VZV 减毒活疫苗在安全性、抗体水平和 T 细胞应答方面具有相同效果的结论, 进一步印证了灭活 VZV 疫苗的功效和应用。

本文介绍的 VZV 抗原定量检测方法, 是以针对 VZV 抗原的亲合力高、中和性好的特异性单抗为基础构建的, 试剂性能稳定, 不随抗体批次不同而变化。本 VZV 抗原定量检测试剂直线性好、灵敏度高, 可以质控 VZV 灭活疫苗中 Ag 含量, 用于疫苗生产工艺中病毒培养条件优化、病毒纯化方法建立、灭活条件选择、制品稳定性等研究中抗原含量分析。

(下转第 552 页)

- 20 Ochi T, Fujiwara H, Okamoto S *et al.* Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety [J]. *Blood*, 2011; 118(6): 1495-1503.
- 21 Provasi E, Genovese P, Lombardo A *et al.* Editing T cell specificity towards leukemia by zinc finger nucleases and lentiviral gene transfer [J]. *Nat Med*, 2012; 18(5): 807-815.
- 22 Nicholson E, Ghorashian S, Stauss H. Improving TCR gene therapy for treatment of haematological malignancies [J]. *Adv Hematol*, 2012; 2012: 404081.
- 23 Thomas S, Stauss H J, Morris E C. Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer [J]. *Immunology*, 2010; 129(2): 170-177.
- 24 Kronig H, Hofer K, Conrad H *et al.* Allorestricted T lymphocytes with a high avidity T-cell receptor towards NY-ESO-1 have potent anti-tumor activity [J]. *Int J Cancer*, 2009; 125(3): 649-655.
- 25 Zhao Y, Bennett A D, Zheng Z *et al.* High-affinity TCRs generated by phage display provide CD4⁺ T cells with the ability to recognize and kill tumor cell lines [J]. *J Immunol*, 2007; 179(9): 5845-5854.
- 26 Kuball J, Hauptrock B, Malina V *et al.* Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain [J]. *J Exp Med*, 2009; 206(2): 463-475.
- 27 Johnson L A, Morgan R A, Dudley M E *et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen [J]. *Blood*, 2009; 114(3): 535-546.
- 28 Parkhurst M R, Yang J C, Langan R C *et al.* T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis [J]. *Mol Ther*, 2011; 19(3): 620-626.
- 29 Robbins PF, Morgan R A, Dudley ME *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1 [J]. *J Clin Oncol*, 2011; 29(7): 917-924.
- 30 Chinnasamy N, Wargo J A, Riley JP *et al.* A TCR targeting the HLA-A* 0201-restricted epitope of MAGE-A3 recognizes multiple epitopes of the MAGE-A antigen superfamily in several types of cancer [J]. *J Immunol*, 2011; 186(2): 685-696.

[收稿 2012-06-20]

(编辑 倪鹏)

(上接第 545 页)

VZV 滴度检测经典方法为蚀斑法,但蚀斑法耗时长,本系统检测的冻干带状疱疹疫苗中 Ag 含量,与蚀斑法检测的疫苗病毒滴度具有良好的相关性,相关系数为 0.96,表明本法可以辅助用于病毒滴度估算,可以缩短检测时间和加速研究进程。此外,本试剂以中和单抗为基础构建的,若检测的抗原活性水平与免疫后产生的中和抗体水平之间具有相关性,则可用于疫苗免疫效力的预估,但此推测有待于疫苗临床后验证。

5 参考文献

- 1 ANN M. ARVIN. Varicella-zoster virus [J]. *J Clin Microbiol Rev*, 1996; 3: 361-381.
- 2 Gnann J W Jr, Whitley R J. Herpes zoster [J]. *N Engl J Med*, 2002; 347: 340-346.
- 3 David W W, Judith B. Herpes zoster [J]. *J Clin Rev*, 2007; 334: 1211-1215.
- 4 Andrea D, John A, G Saul K *et al.* Vaccinations for adult solid-organ transplant recipients: current recommendations and protocols [J]. *J Clin Microbiol Rev*, 2003; 3: 357-364.
- 5 Yusuke H, Tokuhiko C, Takuma I *et al.* Preparation of mouse monoclonal antibody for RB1CC1 and its clinical application [J]. *Plos One*, 2012; 7: e320-352.
- 6 曾妮, 宫苗苗, 程朝飞 *et al.* 抗狂犬病病毒 N 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 2011; 27: 866-870.
- 7 贾继宗, 韩金乐, 杨亮 *et al.* 柯萨奇病毒 A 组 16 型抗原的 ELISA 定量检测方法建立 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012; 28: 351-354.
- 8 国家药典编辑委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 333-334.
- 9 Oxman M N, Levin M J, Johnson GR *et al.* A Vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults [J]. *N Engl J Med*, 2005; 352: 2271-2284.
- 10 Robert A, Anne F, Stéphane T *et al.* Immunogenicity and safety of ZOSTAVAX® approaching expiry potency in individuals aged ≥ 50 years [J]. *Hum Vaccin*, 2011; 7: 1060-1065.
- 11 Atsuko H, Hideomi A, Mary R *et al.* Use of an inactivated varicella vaccine in recipients of hematopoietic-cell transplants [J]. *N Engl J Med*, 2002; 347: 26-34.
- 12 Rebecca L R, Sonia N, Leigh Z *et al.* Early reconstitution of immunity and decreased severity of herpes zoster in bone marrow transplant recipients immunized with inactivated varicella vaccine [J]. *J Infect Dis*, 1997; 176: 578-585.
- 13 Steven J S, Barbara V S, Frederick G H. Serologic response and reactogenicity to booster immunization of healthy seropositive adults with live or inactivated varicella vaccine [J]. *Anti Res*, 1992; 17: 213-222.
- 14 Anthony R H, Kim B, Myron J L. Immune response to secondary immunization with live or inactivated VZV vaccine in elderly adults [J]. *Vir Immun*, 1994; 7: 31-36.

[收稿 2013-01-09]

(编辑 倪鹏)