

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2015.06.017

I 型单纯疱疹病毒单克隆抗体的制备及其应用

尹炳谦^① 贾继宗^① 赵风强^① 韩金乐^① 黄承浩^② 叶祥忠^① 张景海^③
(沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R392 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2015)06-0798-05

[摘要] 目的: 制备并筛选 HSV-1 单抗, 建立定量检测 HSV-1 病毒颗粒抗原的双抗体夹心 ELISA 方法, 用于 HSV-1 病毒颗粒的质控。方法: 以 HSV-1 免疫 BALB/c 小鼠制备单克隆抗体, 以筛选的中和单克隆抗体 1F6 为捕捉抗体, HRP 标记的 2B1 为检测抗体, 构建定量检测 HSV-1 病毒颗粒抗原的双抗体夹心 ELISA 方法, 并对本方法的特异性、灵敏度、精密度、准确性和线性等性能进行验证。用本方法定量检测的病毒量与病毒滴度作回归分析。结果: 构建的双抗体夹心定量检测 HSV-1 病毒颗粒抗原的 ELISA 方法, 线性范围为 0.125 ~ 2 μg/ml, 相关系数为 $R^2 = 0.9955$, 定量限度为 0.125 μg/ml, 试剂的变异系数 $CV < 10\%$, 抗原回收率介于 85.6% ~ 107.1% 之间。与 HSV-1 以外的其他样本无交叉反应。本方法检测与病毒感染滴度具有很好的相关性。结论: 成功构建了定量检测 HSV-1 含量的 ELISA 方法, 为 HSV-1 病毒颗粒抗原定量检测提供快速手段。

[关键词] HSV-1 病毒; 溶瘤; 颗粒完整性; 病毒滴度

Preparation and application of monoclonal antibodies against Herpes simplex virus-1

YIN Bing-Qian, JIA Ji-Zong, ZHAO Feng-Qiang, HAN Jin-Le, HUANG Cheng-Hao, YE Xiang-Zhong, ZHANG Jing-Hai. College of Life Science and Biological Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

[Abstract] **Objective:** To prepare and screen monoclonal antibodies against Herpes simplex virus-1 (HSV-1), and develop a double antibody sandwich quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (Q-ELISA) for detection of HSV-1 particle. This method was used to control the quality of viral particle in the developing and manufacturing process of HSV-1. **Methods:** BALB/c mice was immunized with HSV-1 to prepare monoclonal antibodies. A double antibody sandwich Q-ELISA was developed to determine concentration of HSV-1 particle, which was based on the neutralizing monoclonal antibody 1F6 as capture antibody and 2B1 as HRP-conjugated antibody. The performance of the reagent was evaluated, including specificity, sensitivity, precision, accuracy and linear. And the relation between the amount of virus detected by this method and the virus titer was analyzed by regression analysis method. **Results:** The Q-ELISA for HSV-1 particle was developed. The quantitation scope was 0.125 - 2 μg/ml, the coefficient correlation was 0.9955, the limit of detection was 0.125 μg/ml, the recovery was between 85.6% and 107.1%, the variation coefficient was lower than 10%, and the reagent does not react with other samples except HSV-1 antigen. This method has a good correlation with virus titer. **Conclusion:** The Q-ELISA for HSV-1 particle was successfully developed, which provide a new approach for rapid and quantitative detection of HSV-1 antigen.

[Key words] HSV-1; Oncolytic; Particle integrity; Virus titer

单纯疱疹病毒-1 (HSV-1) 是引发人口唇部皮肤、口腔黏膜感染、引起发热等的病原体, 属于疱疹病毒科 α 病毒亚科的成员, 可通过呼吸道、皮肤和黏

膜密切接触传播。HSV-1 宿主范围广, 感染效率高, 具有嗜神经性, HSV-1 可潜伏和激活, 引发溃疡、发热等, 严重影响健康。

HSV-1 病毒颗粒直径约为 180 nm, 由包膜、皮层和核衣壳组成的双链 DNA 病毒。HSV-1 基因组大小为 152 kb, 可操作空间大, 可缺失突变, 也可被改造为外源基因的载体, 用于治疗药物研究, 目前重组 HSV-1 已应用于肿瘤治疗中。缺失 ICP34.5 的 HSV-1 丧失嗜神经毒性且不影响其复制^[1], 为其改造成减毒活疫苗或肿瘤治疗药物打开了视窗。研究发现核苷酸还原酶基因突变的重组 HSV-1, 如核糖

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。
③通讯作者, E-mail: jinghaizhang@foxmail.com。
作者简介: 尹炳谦(1989年-)男, 主要从事病毒及疫苗检测方法研究, E-mail: ybq0510@sina.com。
指导教师: 叶祥忠(1967年-)男, 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。

核苷还原酶(RR,ICP6)缺失^[2],仅能在具有增殖能力的细胞中增殖,如在肿瘤细胞中增殖并抑杀肿瘤细胞。通过插入特异性启动子控制 HSV-1 复制所必需的立即早期基因如 ICP4、ICP27 等,使其靶向性感染目标细胞。另外,向重组 HSV-1 中插入免疫调节因子如 IL-12、GM-CSF 或 B7-1 等基因^[3],可增强其溶瘤效应。通过基因工程技术改造得到安全性好、靶向性强、复制效率高、可调控的重组 HSV-1,使其作为抗肿瘤药物成为可能^[4]。目前多个溶瘤 HSV-1 已进入临床试验阶段,并在肿瘤治疗方面取得较理想的结果^[5]。

本文介绍一种针对 HSV-1 糖蛋白中和表位的、灵敏、准确和特异的双抗体夹心定量检测 HSV-1 抗原的 ELISA 方法,为重组 HSV-1 疫苗或溶瘤 HSV-1 药物的研制提供一种快捷的抗原定量检测的方法,可加速药物研发进程或提高质控水平。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 抗体及参考品 HSV-1 单克隆抗(1F6、2B1)由北京万泰生物药业股份有限公司制备并保存。抗原定量参考品由北京万泰生物药业股份有限公司制备并保存。

1.1.2 检测样品 单纯疱疹病毒(HSV)、水痘-带状疱疹病毒(VZV)、巨噬细胞病毒(CMV)、柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)、人肠道病毒 71 型(EV71)、甲型肝炎病毒(HAV)由北京万泰生物药业股份有限公司保存。

1.1.3 细胞 ARPE 细胞来自 ATCC,由北京万泰生物药业股份有限公司保存。

1.1.4 其他试剂 牛血清白蛋白(BSA)、辣根过氧化物酶(HRP)购自 Sigma 公司;BCA 试剂购自 pierce 公司;HRP 标记的单克隆抗体由北京万泰生物药业股份有限公司制备;硝酸纤维素膜购自 whatman 公司。

1.2 单克隆抗体制备 HSV-1 病毒颗粒抗原与弗氏佐剂按 1:1 乳化后,经腹腔接种 SPF 级 BALB/c 小鼠 100 μg /只,每 2 周加强免疫 1 次,50 μg /只/次,共免疫 4 次,最后 1 次经尾静脉注射 HSV-1 抗原,100 μg /只,3 天后摘取脾脏并分离脾细胞。免疫的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 PEG 方法融合,通过间接法筛选分泌抗 HSV-1 抗体的杂交瘤细胞,并经有限稀释法克隆化培养。腹腔注射杂交瘤细胞,制备腹水。腹水经硫酸铵沉淀、Protein A 柱纯化得到单克隆抗体。

1.3 单抗分析

1.3.1 SDS-PAGE 分析 用 12% 的聚丙烯酰胺分离胶,按 90 V、30 min,120 V、45 min,对纯化后的单抗 2B1 和 1F6 进行 SDS 变性凝胶电泳作纯度分析。

1.3.2 Western blot 分析 将用 293 细胞瞬时转染表达的 HSV-1 的各种糖蛋白(gB ~ gK)经 SDS-PAGE 后于 90 V、100 mA 下电转移至硝酸纤维素膜上,膜于 4 $^{\circ}\text{C}$ 用 5% 脱脂牛奶封闭过夜。次日加入合适稀释度的单抗,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇动 1 h,用 PBST 洗涤 5 min/次,洗涤 3 次,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇动 1 h,用 PBST 洗涤 5 min/次,洗涤 3 次,加 AEC 显色。其中 HSV-1 感染的 ARPE 细胞为阳性对照,ARPE 细胞蛋白为阴性对照。

1.3.3 ELISPOT 分析 将每毫升 1×10^5 U2OS 细胞接种到 96 微孔细胞板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的温箱中培养 24 h 后,转染 11 种糖蛋白的真核表达质粒,转染 48 h 之后用 ELISPOT 检测,同时设细胞对照。在微孔中加入 50 μl 的 1% 的多聚甲醛,室温避光 5 min;1 \times PBS 洗涤微孔 1 次,每孔加入 100 μl 的 0.1% Triton 室温下处理 5 min;用 1 \times PBS 洗涤微孔 1 次,加入单克隆抗体,100 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;用 1 \times PBS 洗涤微孔 5 次,加入 GAM-HRP 二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;用 1 \times PBS 洗涤微孔 5 次,加入 TMB 显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,肉眼观察斑点。

1.4 双抗体夹心 ELISA 法的建立 通过方阵实验确定包被单抗 1F6 和 HRP 标记单抗 2B1 的最佳使用浓度,用正交试验、平行试验设计筛选样品稀释液、酶稀释液和封闭液^[6]。单抗 1F6 用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释到 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,包被 96 孔酶标板,100 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h,包被板用 PBST(T 为 0.05% Tween20)洗涤 1 次,用含 2% BSA 的 10 mmol/L PB 封闭液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h,用样品稀释液作 2 倍比系列稀释的样品加入微孔中,100 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min,用 PBST 洗涤微孔,300 μl /孔,洗涤 5 次,加 HRP 标记的 2B1,100 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 min,用 PBST 洗涤微孔,300 μl /孔,洗涤 5 次,加 TMB 显色液,100 μl /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 15 min,加 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,50 μl /孔,用 450/630 读微孔光密度值。

1.5 性能分析 根据《中华人民共和国药典》三部(2010 版)对检测方法验证的要求^[7],对本试剂的线性、准确性、精密度、特异性等性能进行分析。

1.5.1 准确性试验 用样品稀释液稀释 HSV-1 抗原内部参考品为高值(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、中值(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、低值(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 3 个浓度后,用本方法测定。每个浓

度样品作 3 份重复检测,计算稀释参考品的测定值和理论标示值的比值,即回收率,分析本方法的准确性。

1.5.2 精密性试验 对高值(2 μg/ml)、中值(1 μg/ml)、低值(0.5 μg/ml) 3 个浓度的 HSV-1 抗原稀释参考品 3 人次进行独立试验,每一稀释度作 3 份重复测定。比较测定值和真实值,计算均值、标准偏差,分析试剂精密性。

1.5.3 直线性和定量限度实验 用样品稀释液将 HSV-1 抗原参比品稀释到 2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625 μg/ml 后,用本方法测定。以抗原浓度和对应的 OD 值作直线回归分析,分析最佳线性范围,确定定量限度。

1.5.4 特异性试验 用本方法分别检测病毒培养液、ARPE 细胞蛋白、CMV、VZV 等,分析本试剂的特异性。

1.6 与病毒滴度相关性分析 HSV-1 纯化的不同收集峰和不同批次的目标峰分别用本方法检测各样品的 HSV-1 抗原活性,同时用蚀斑法检测各个样品的病毒滴度。通过比较两种方法的检测结果,分析本方法检测与病毒滴度的相关性。

2 结果

2.1 单克隆抗体筛选 根据抗体滴度、特异性、中和效价、表位类型和配对检测 HSV-1 的灵敏度,筛选到两株用于试剂构建的单抗。两株单抗的特征见图 1~3 和表 1。

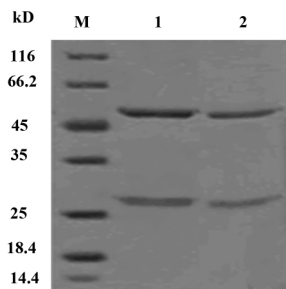


图 1 HSV-1 单抗的 SDS 还原型凝胶电泳
Fig. 1 SDS-PAGE of monoclonal antibody against HSV-1
 Note: M. Marker; 1. 2B1; 2. 1F6.

表 1 两株单抗的特性

Tab. 1 Characteristics of two HSV-1 monoclonal antibodies

Name	Purpose	Antibody titer	Antibody affinity	Neutralizing titer (400 PFU/ml)	Epitope	
					Western blot	ELISPOT
2B1	HRP sign	2560	96.0%	32	gC	gC
1F6	Coating	160	73.0%	4	NA	gB

Note: NA. Do not react with each kind of glycoproteins, including gB-gK.

2.2 双抗体夹心方法的建立 单抗 1F6 用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6) 稀释到 3.0 μg/ml 包被 96 孔板,100 μl/孔,37℃ 温育 2 h 后,弃液;封闭 200 μl/孔,37℃ 温育 2h,弃液;加样,100 μl/孔,37℃ 温育 1 h;洗板 5 次,加酶标抗体工作液,100 μl/孔,37℃ 温育 45 min,洗板 5 次,加 TMB 显色液,100 μl/孔,37℃ 温育 15 min,加 2 mol/L H₂SO₄ 终止液 50 μl/孔。用 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。

2.3 性能分析

2.3.1 准确性和精密性 待检品的回收率均值介于 85.6% ~ 107.1% 之间,同一试验重复检测和不同试验者检测的变异系数 < 10%。准确性和精密度

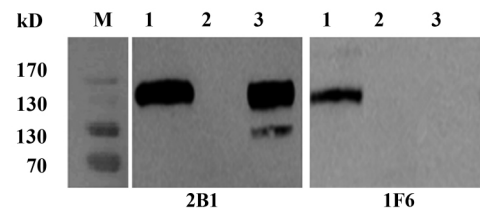


图 2 HSV-1 单抗的 Western blot 分析
Fig. 2 Western blot of monoclonal antibody against HSV-1

Note: 2B1. 1. HSV-1 virus; 2. ARPE cell protein; 3. HSV-1 gC. 1F6. 1. HSV-1 Virus; 2. ARPE cell protein; 3. HSV-1 gB-gK.

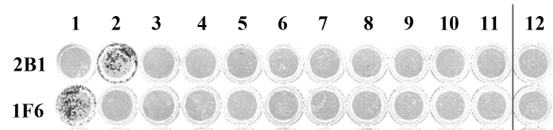


图 3 HSV-1 单抗的表位鉴定(ELISPOT 法)
Fig. 3 The epitope identification of the monoclonal antibody against HSV-1

Note: 1. Glycoprotein B; 2. Glycoprotein C; 3. Glycoprotein D; 4. Glycoprotein E; 5. Glycoprotein G; 6. Glycoprotein H; 7. Glycoprotein I; 8. Glycoprotein J; 9. Glycoprotein K; 10. Glycoprotein L; 11. Glycoprotein M; 12. Cell protein.

表 2 方法的准确性及精密性

Tab.2 Accuracy and precision of developed ELISA method

HSV-1 antigen($\mu\text{g/ml}$)	Recovery ratio(%)	CV(%)
2	95.2 - 103.3	3.0
1	91.2 - 102.2	3.8
0.5	85.6 - 107.1	5.7

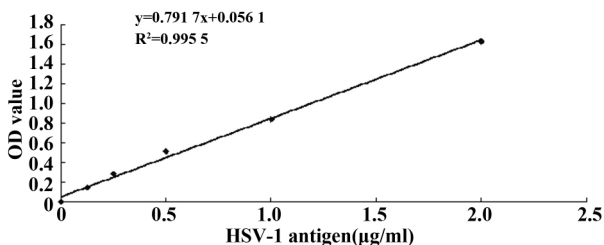


图 4 HSV-1 抗原内部参比品的标准曲线

Fig. 4 Standard curve of internal reference of HSV-1 antigen

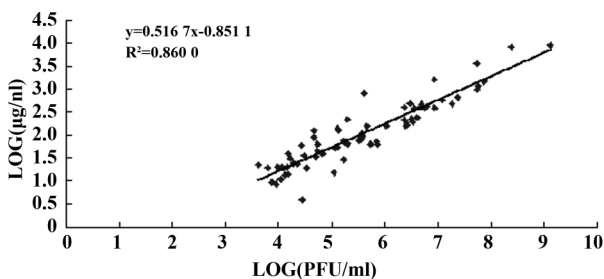


图 5 两种检测方法的相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of two detection methods

分析结果如表 2 所示。

2.3.2 线性 and 定量限度 用本方法测定抗原内部参比品的线性范围为 $0.125 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ 、 $R^2 = 0.9955$ ，定量限度为 $0.125 \mu\text{g/ml}$ ，见图 4。

2.3.3 特异性试验 用建立的方法测定非 HSV 样品，待检样品的 A450/630 均小于 Cutoff 值 (0.105)，即无交叉反应。表明该检测试剂的特异性良好。

2.3.4 与病毒滴度相关性分析 本方法检测纯化过程不同峰和不同批次目标峰的抗原活性与蚀斑法检测的病毒滴度的相关性分析统计结果，见图 5。

3 讨论

经过基因工程改造的重组 HSV-1 能够选择性地 在肿瘤细胞中大量增殖并最终杀死肿瘤细胞。美国 Amgen 公司溶瘤免疫疗法 T-Vec 治疗黑色素瘤

的 III 期临床试验取得积极数据^[8]，并且与施贵宝的 Yervoy 联合免疫治疗黑色素瘤 I 期研究中效果显著，而且未表现出毒性^[9]。德国 Medigene 公司开发的 NV1020 用于治疗结直肠癌转移性肝癌，在 I/II 期临床中取得了安全和疗效数据，患者一年生存率可达到 47.2%^[10,11]。Feng 等^[12] 构建了一种新型 HSV-1 重组溶瘤病毒 KTR27，即删除了 HSV-1 在正常细胞中复制所必需的 ICP0 基因，同时，增加了四环素调控 ICP27 基因，使病毒在肿瘤细胞中复制严格受四环素调控，且重组病毒在肿瘤细胞中的复制比在正常细胞更高效。重组 HSV-1 已广泛应用于肿瘤治疗研究中，故开发一种快速检测重组 HSV-1 的方法对加快重组 HSV-1 工艺研究和提高重组 HSV-1 质量具有重要价值。

经细胞培养生产病毒疫苗或治疗药物是病毒制剂制备的主要方式，其中，就病毒制剂而言，颗粒性病毒是基础。病毒在细胞内复制过程中产生多种组装形式^[13-15]，如完整病毒颗粒、无核酸的空心颗粒、病毒亚单位等。不同制备工艺产生的各种组装比例有较大差别，提高颗粒病毒产率是病毒制备工艺优化的方向。完整病毒量可以通过细胞培养法检测病毒滴度加以判定，但是存在周期长、通量小、成本高、技术要求高等不足^[16]。PCR 法检测虽然灵敏度高，但是，样本易污染导致假阳、成本也比较高、且不能反映病毒颗粒性，不能用于病毒颗粒的质控^[17]。ELISA 法具有简洁、准确、快速、通量大等特点，可根据需要开发出针对亚单位、颗粒抗原的检测试剂，用于工艺优化和产品质控。

本文所用的两株单抗是用纯化的病毒颗粒免疫小鼠制备的杂交瘤细胞，由杂交瘤细胞分泌的，单抗由病毒颗粒及其经热变性的病毒经差减筛选获得的，仅与病毒颗粒反应。综合 Western blot 和 ELIS-POT 结果可得 1F6 是针对 gB 糖蛋白的构单抗，2B1 是针对 gC 糖蛋白的单抗，且 gC 和 gB 之间没有相互作用^[18,19]，只有病毒在形成颗粒时才能通过这对抗体的双抗体夹心检测出来，所以，这两株单抗是检测病毒颗粒的，且本方法检测的病毒抗原活性与蚀斑法检测的病毒滴度具有很好的相关性， $r = 0.93$ ，据此推测本方法可初步用于病毒制备的颗粒检测甚至病毒滴度检测，为加快重组 HSV-1 的工艺研究进程提供了快速检测方法。

参考文献:

- [1] Anthony Orvedahl, Diane Alexander, Zsolt Tallóczy, et al HSV-1 ICP34.5 Confers Neurovirulence by Targeting the Beclin 1 Auto-

- phagy Protein [J]. *Cell Host & Microbe* 2007, 1(1): 23-35.
- [2] L Miao, C Fraefel, K C Sia, et al. The potential application of a transcriptionally regulated oncolytic herpes simplex virus for human cancer therapy [J]. *Br J Cancer* 2014, 110(1): 94-106.
- [3] Jacqueline N. Parkera, Luz-Andrea Pfistera, Debra Quenellea, et al. Genetically engineered herpes simplex viruses that express IL-12 or GM-CSF as vaccine candidates [J]. *Vaccine*, 2006, 24(10): 1644-1652.
- [4] William F. Goins, Shaohua Huang, Justus B. Cohen, et al. Engineering HSV-1 Vectors for Gene Therapy [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1144: 63-79.
- [5] Manservigi R, Argnani R, Marconi P. HSV recombinant vectors for gene therapy [J]. *Open Virol J* 2010, 4: 123-156.
- [6] 贾继宗, 韩金乐, 杨亮, 等. 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.
- [7] 国家药典编辑委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 北京医药科技出版社, 2010: 2271-2284.
- [8] Robert Hans Ingemar Andtbacka, Frances A. Collichio, Thomas Amatruda, et al. OPTiM: a multicenter, randomized phase 3 trial of talimogene laherparepvec versus subcutaneous GM-CSF for the treatment of unresected stage IIIB/C and IV melanoma: FC-022 [J]. *J Deut Derma Gesellschaft* 2013, 11(7): 8.
- [9] Igor Puzanov, Mohammed Milhem, Robert Andtbacka, et al. Phase 1 results of a phase 1b/2, multicenter, open-label trial to evaluate safety and efficacy of talimogene laherparepvec (T-VEC) and ipilimumab (ipi) vs ipi alone in previously untreated, unresected stage IIIB-IV melanoma [J]. *J Immunother* 2013, 1(1): 84.
- [10] Sze DY, Chari R, Geller D, et al. Abstract No. 62: Phase I/II study of the oncolytic herpes virus NV1020 to treat liver-dominant metastatic colorectal cancer [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2008, 19(2): 25-26.
- [11] Geevarghese SK, Geller DA, Haan HA, et al. Phase I/II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver [J]. *Human Gene Therapy* 2010, 21(9): 1119-1128.
- [12] Feng Yao, Nao Murakami, Oliver Bleiziffer, et al. Development of a regulatable oncolytic herpes simplex virus type 1 recombinant virus for tumor therapy [J]. *J Virology*, 2010, 84(16): 8163-8171.
- [13] Bataille D, Epstein AL. Herpes simplex virus type 1 replication and recombination [J]. *Biochimie*, 1995, 77(10): 787-795.
- [14] Mateu MG. Assembly, stability and dynamics of virus capsids [J]. *Arch Biochem Biophys* 2013, 531(1-2): 65-79.
- [15] Seyffert M, de Oliveira AP, Fraefel C, et al. Multifluorescence live analysis of herpes simplex virus type-1 replication [J]. *Methods Mol Biol* 2014, 1144: 235-247.
- [16] Michael Costello MT, Sabatin L, Yungbluth P. Herpes simplex virus infections and current methods for laboratory detection [J]. *Clinical Microbiology Newsletter* 2006, 28(24): 185-192.
- [17] Slomka MJ, Emery L, Munday PE, et al. A comparison of PCR with virus isolation and direct antigen detection for diagnosis and typing of genital herpes [J]. *J Med Virol*, 1998, 55(2): 177-183.
- [18] Gallagher John R, Atanasiu Doina, Saw Wan Ting, et al. Functional fluorescent protein insertions in herpes simplex virus gB report on gB conformation before and after execution of membrane fusion [J]. *PLoS Pathogens* 2014, 10(9): 1-16.
- [19] Frink RJ, Eisenberg R, Cohen G, et al. Detailed analysis of the portion of the herpes simplex virus type 1 genome encoding glycoprotein C [J]. *J Virol*, 1983, 45(2): 634-647.

[收稿 2014-12-19]
(编辑 许四平)

(上接第 797 页)

- [4] Maylin S, Laouénan C, Martinot-Peignoux M, et al. Role of hepatic HCV-RNA level on the severity of chronic hepatitis C and response to antiviral therapy [J]. *J Clin Virol* 2012, 53(1): 43-47.
- [5] 张力, 张文娟. HCV 抗体 ELISA 检测假阳性分析 [J]. *医学检验* 2014, 4(3): 114-116.
- [6] 刘松坚, 徐云峰. 类风湿因子及其浓度对甲肝丙肝 IgM 抗体的影响 [J]. *中国疗养医学* 2009, 18(9): 842-843.
- [7] Wang TY, Kuo HT, Chen LC, et al. Use of polymerase chain reaction for early detection and management of hepatitis C virus infection after needlestick injury [J]. *Ann Clin Lab Sci* 2002, 32(2): 137-141.
- [8] 尹朝伦, 阮艳秋, 钟辉秀, 等. HBe-IgG 致丙型肝炎抗体测定假阳性研究 [J]. *临床检验杂志*, 1998, 16(4): 216-217.
- [9] 王正芳, 张素华, 解松刚, 等. 抗-HCV CLIA 检测 S/CO 值与确证试验结果的相关性探讨 [J]. *实验与检验医学* 2014, 32(4): 429-430.
- [10] 宋具昆, 周京琳, 罗洪, 等. 非综合征性唇腭裂患者血浆代谢组学的初步研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2009, 27(2): 147-149.
- [11] 黄光磊, 罗洪. 贵州地区先天性唇腭裂患者血浆代谢组学的初步研究 [J]. *口腔医学研究* 2011, 27(9): 801-807.
- [12] 程锦锥, 朱恒鹏. 中国药品市场报告 [M]. 北京: 社会科学文献出版社, 2012: 1-348.

[收稿 2015-01-21]
(编辑 张晓舟)