

## 人巨细胞病毒 IgG 抗体标准品研究进展 \*

吴恩应 张 佩 张运佳 丁玉江 郭采平<sup>△</sup>

(深圳市卫武光明生物制品有限公司 广东 深圳 518107)

**摘要** :人巨细胞病毒(CMV)是威胁人类健康的最重要病原之一。高 CMV 抗体效价的免疫球蛋白 G(IgG)制剂,为临床医生在预防和治疗用药上提供了一个有价值的选择。而 CMV 免疫球蛋白标准品对于制品的 CMV 抗体效价测定以及高效价血浆的筛选都至关重要。该标准品对于器官移植/输血安全测试,以及临床诊断都是不可或缺。本综述提供了一种人巨细胞病毒 IgG 标准品制剂方法以及目前研究进展的概述。此外,本文还关注应用于不同领域的不同 CMV IgG 抗体效价单位。故本文为人巨细胞病毒免疫球蛋白的开发,人巨细胞病毒 IgG 抗体诊断试剂的标准化,以及为其质量控制提供参考。

**关键词** :人巨细胞病毒;人巨细胞病毒免疫球蛋白 G 抗体;标准品

**中图分类号** :R373 R392 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2012)25-4970-03

## The State of International Standard Material for Cytomegalovirus Immunoglobulin G Determinations\*

WU En-ying, ZHANG Pei, ZHANG Yun-jia, DING Yu-jiang, GUO Cai-ping<sup>△</sup>

(Shenzhen Wei Wu Guangming Biological Products Co., Ltd, Guangdong Shenzhen 518107, China)

**ABSTRACT**: Cytomegalovirus (CMV) remains one of the most important pathogens threatening health of people. Immunoglobulin G (IgG) preparations with high antibody titers against CMV are valuable adjunctive prevention and treatment option for clinicians. The anti-CMV immunoglobulin standard is critical for CMV antibody titer quantification of these preparations and selection of high titer plasma. It is also required in testing for both transplantation/transfusion safety and clinical diagnostic purposes. This review provides a summary of the process and current state of anti-Cytomegalovirus IgG standard material preparations. Besides, it sheds a light on the different titer units of anti-Cytomegalovirus immunoglobulin G used in different conditions. Therefore, this paper would give a review on development of anti-Cytomegalovirus immunoglobulin, the standardization and of diagnostics reagents for anti-Cytomegalovirus IgG and their quality control.

**Key words**: Cytomegalovirus; Anti-Cytomegalovirus immunoglobulin G; Standard material

**Chinese Library Classification(CLC)**: R373, R392 **Document code**: A

**Article ID**:1673-6273(2012)25-4970-03

### 前言

近年来,人巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)严重危害人类健康,普通人群感染相当普遍,其中亚洲人群的血清抗体阳性率近 80%。免疫缺陷、肝、肾、心脏等器官移植,以及肿瘤患者等可产生广泛的 CMV 复发性感染。此外,孕期妇女和儿童人巨细胞病毒感染较为严重,是引起出生缺陷和各种不可逆损伤的重要因素<sup>[1,2]</sup>。人巨细胞病毒感染早期诊疗重要性越来越受重视。一般用于 CMV 血清学检测的项目包括 IgG 及 IgM 抗体检测,其检测技术主要有空斑减少实验(Plaque Reduction Neutralization Test)及 ELISA 等<sup>[3,4]</sup>。CMV 引起的疾病疫苗开发目前尚未成功,而目前 CMV 感染主要通过抗病毒药物及特异性免疫球蛋白进行治疗<sup>[5]</sup>。无论是研制 CMV 特异性免疫球蛋白,还是体外诊断试剂,都离不开 CMV IgG 抗体国际标准品或参考品。因此,本文对 CMV IgG 抗体国际标准品的研制进展作简要概述。

### 1 CMV IgG 抗体国际标准品制定进展

#### 1.1 国际标准品制定机构

生物制品国际标准品制定由 WHO 生物制品标准化专家委员会 (Expert Committee on Biological Standardization, ECBS) 负责。ECBS 是 WHO 每年一度关于生物制品标准化的最高级别会议,一方面介绍 WHO 关于生物制品标准化的最新政策和各类技术指南的重点,另一方面介绍合作中心在生物制品标准化研究中的新技术、新方法和标准物质的最新动态。现有的 ECBS WHO 合作中心包括:英国国家生物制品检定所(NIB-SC)、美国 FDA 生物制品评价与研究中心(FDA-CBER)、日本传染病研究所(NIID)、澳大利亚治疗商品管理局(TGA)及韩国食品药品管理局 (KFDA)。而德国国家疫苗和血清研究所 (Paul-Ehrlich-Institut, PEI)则承担 WHO 合作中心对于血液制品及体外诊断试剂质量保证工作。我国中检院(NICBPB)正在申报加入该组织<sup>[6]</sup>。

\* 基金项目:广东省中国科学院全面战略合作项目"病毒感染重症救治特效抗体药物技术及产品研发"(2009B091300101)

作者简介:吴恩应(1980-)男,硕士,工程师,生物制药。电话:0755-27401074, E-mail: wuenying@hotmail.com

△通讯作者:郭采平, E-mail: gcpzy0402@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-03-06 接受日期:2012-03-31)

1.2 CMV IgG 抗体国际标准品制定的进程

1.2.1 "第1套CMV IgG 抗体国际标准品" 依照1987年ECBS第37次会议决议 相关单位制定了第1套CMV IgG 抗体国际标准品文件。同时,ECBS要求荷兰阿姆斯特丹红十字会输血中心(CLB)找寻一种合适的 anti-CMV 免疫球蛋白标准品材料。1988年,PEI制备了第1套CMV 免疫球蛋白标准品制剂(98 PEI U/ml)。该批标准品被有些学者定义为"第1套CMV IgG 抗体国际标准品"<sup>[7,8]</sup>。

1.2.2 建议的CMV IgG 抗体国际标准品 1994年ECBS第45次会议上,介绍了5个候选CMV 免疫球蛋白标准品制剂,关于该课题的两个联合研究在同时进行,并且相关材料已准备好。在此基础上,1995年由CLB根据PEI的质控品制备了建议的国际标准品(Proposed International Standard, pIS)。pIS的原料血浆来源于志愿者及无偿捐献者,其CMV IgG 抗体效价通过美国雅培公司CMV IgG 抗体ELISA半定量方法进行测定。原料血浆选用CMV IgG 抗体效价超过10 PEI U/ml的血浆,共320 L进行混合。静脉注射免疫球蛋白制作采用常规用于临床用途的静脉注射免疫球蛋白制备方法,即按照Cohn乙醇分离

法,包括pH4胃蛋白酶消化步骤。分离得到的pIS制品冻干于安瓿瓶中,蛋白含量57 mg/ml,效价为59 PEI U/ml。以上标准品描述列于表1,其中PEI标准品应用较为广泛,在CLB标准品基础上,用PEI标准品进行标定,制备了pIS标准品,后者在ELISA抗原特异性更佳,而CSL标准品则与pIS相近<sup>[9,10]</sup>。

1.2.3 制剂制备方法未能通过ECBS会议 1995年底,ECBS第46次委员会报告了一个针对人巨细胞病毒免疫球蛋白抗体国际标准品候选工作的双单位联合研究成果。由于临床上人巨细胞病毒免疫球蛋白抗体的治疗效果仍未被证实,会议认为此种标准品的建立还不紧迫,应进一步评估后提供新的报告。尽管委员会同意建议的pIS由CLB实验室分发,然而该标准品不能用于评价血浆产品的效价,而只适用于验证免疫球蛋白制剂过程中的一致性。故CMV 免疫球蛋白标准品制剂制备方法最终未能通过作为一个WHO标准品制剂程序<sup>[10,11]</sup>。然而,委员会也认同更优的标准品对于评估血清中抗人巨细胞病毒抗体的诊断试剂盒是必需的,因此要求丹麦哥本哈根 Statens Serum institut 去收集高滴度的人巨细胞病毒IgM及IgG抗体血清库并开展联合研究<sup>[12]</sup>。

Table 1 Candidates of anti-CMV Standard<sup>[10]</sup>

Standard Material	Descriptions
PEI Standard	PEI Reference Preparation for CMV Immunoglobulin (1st lot: 98 PEI U/ml, 1988; 2nd lot.: 110 PEI U/ml, 1996)
CSL Standard	Prepared by Commonwealth Serum Laboratories (CSL, Victoria, Australia). The characteristics of this standard preparation are similar to those described for pIS.
Behringwerke standard	Obtained from Behringwerke (Marburg, Germany)
CRTS Standard	Preparation from the Centre Regional de Transfusion Sanguine (CRTS).
Proposal International Standard(pIS)	Prepared by CLB according to 1st PEI standard ,Protein content 57 mg/ml, 59 PEI U/ml

1.2.4 "第2套CMV IgG 抗体国际标准品" 由于PEI第1套PEI CMV 免疫球蛋白标准品制剂于1995年已发放完,由PEI在血清学检测的验证期间建立了称作"第2套国际标准品",即第二批CMV 免疫球蛋白标准品制剂(效价为110 PEI U/ml,制备于1996年)。这个标准品广泛使用,根据需求分发到世界各地实验室作为研究用途,批放行量每年约8-12支<sup>[12,13]</sup>。

1.2.5 WHO CCs第一次会议关于CMV IgG 抗体国际标准品的讨论 2007年,WHO举行了生物制品标准及标准化合作中心(WHO Collaborating Centres for Biological Standards and Standardization, WHO CCs)第一次会议。对于器官移植或输血安全及临床诊断应用中关于CMV感染的分子检测项目,最常规的项目包括对IgG及IgM抗体。当前需要这两类检测试剂盒进行标准化,然而当前还没有可用的国际标准品制剂,但是该标准品对于CMV 抗体检测诊断试剂盒的评估是必需的。对于CMV 抗体国际标准品不作为一个紧急优先的事项,该议题将会在下次会议中重新讨论<sup>[14]</sup>。

1.2.6 WHO CCs第二次会议关于CMV IgG 抗体国际标准品的讨论 2009年,国际上召开了WHO CCs第二次会议,介绍了CMV 抗体国际标准品的制定情况。首先,当前尚无可用的特别欧洲药典专著或被广泛接受的实验方案,用于测定免疫球蛋白

中的CMV 抗体效价。其次,由于目前仍无CMV 免疫球蛋白产品的国际标准品,临床用药推荐的剂量仍然依靠经验。同时,从PEI的角度来看,由于第2批标准品仍足够几年使用,重新建立一个用于免疫球蛋白制剂质控的新标准品制备的标准方法还不紧迫。然而,WHO合作中心成员寻求一种标准品,用于如器官移植以及输血至CMV易感人群(如新生儿、孕妇、免疫抑制病人)的临床研究、临床诊断、异种基因型的脐带血干细胞及不同组织制剂等领域。对于诊断目的,鉴于目前现有的物质多数为IgG,建议应开发单独的IgG及IgM标准品。该免疫球蛋白制剂可以是一种合适的候选血液制品参考品制剂,IgG相关材料已经准备好<sup>[15]</sup>。

2 CMV IgG 抗体效价单位

关于CMV IgG 抗体检测目前国内外尚无统一标准,尽管1995年WHO已发布了CMV IgG的国际标准,但至今尚未提供有关标准品<sup>[4]</sup>。关于CMV IgG 抗体效价单位,主要有三种(表2) PEI的PEI U/ml,CSL公司所采用的自定单位以及WHO推荐的IU/ml<sup>[10,11]</sup>。效价单位定义各自自标准品,其描述见本文1.2.2。

Table 2 Titer unit of CMV IgG Standard <sup>[10,11]</sup>

Standards	Titer unit	Manufacturers of Related Products
Proposed WHO International Standard (pIS)	IU/ml	Diagnostics reagent :Bioelisa, DiaPro and Diesse
PEI Standard	PEI U/ml	Blood Product :Biotest (Cytotec) Diagnostics reagent :Euroimmun and Serion
Company Standard	Highest dilution of neutralizing 50% of virus	Blood product :CSL Behring (Cytogam) Diagnostics reagent :Abbott

Note: \*Information from manufacturers' introductions.

### 3 发展趋势

随着人巨细胞病毒相关疾病研究的深入 ,CMV 的危害越来越受重视。与此同时 ,临床上 CMV IgG、IgM 抗体检测 ,以及疾病治疗药物巨细胞特异性免疫球蛋白的需求逐年增加<sup>[16]</sup>。而相关国际标准品建立工作不断推进 ,2009 年 ,中国食品药品检定研究院开始分发巨细胞病毒 IgM 抗体国家参考品 ,2010 年 ,由 WHO ECBS 通过并委托相关机构分发 CMV 的 DNA 第一批国际标准品<sup>[17,18]</sup>。可见 ,CMV IgG 抗体标准品的建立紧迫性不断增加。

预计在下届 WHO ECBS 年会上 ,有关 CMV IgG 抗体的标准化工作将得到更多讨论。而 pIS 标准品由于在实验室及生产中应用较广 ,可能会成为 CMV IgG 抗体国际标准品首选。CMV IgG 国际标准品则有望在近期出台。

#### 参 考 文 献 (References)

[1] 王敏,毛建平.人巨细胞病毒检测技术[J].中国生物工程杂志,2007,27(2): 103-107  
Wang Min, Mao Jian-ping. The Technologies Development on Human Cytomegalovirus Detection [J]. China Biotechnology, 2007, 27(2):103-107

[2] 段泓宇,喻韬,万朝敏.巨细胞病毒感染诊断及治疗进展[J].中华妇幼临床医学杂志,2010,6(1):68-71  
Duan Hong-yu, Yu Tao, Wan Chao-min. Diagnosis and Treatment Progress of Cytomegalovirus Infection [J]. Chin J Obstet Gynecol Pediatr, 2010, 6(1) :68-71

[3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV infection [EB/OL]. <http://www.cdc.gov/cmvp/clinical/lab-tests.html>, 2011-06-23

[4] 张佩,吴恩应,陈玉琴,等.特异性抗体效价检测技术概述[J].现代生物医学进展,2011,11(17): 3382-3385  
Zhang Pei, Wu En-ying, Chen Yu-qing, et al. Quantitative Detection of Specific Antibodies [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011,11(17):3382-3385

[5] 张萌,安利莎,侯林浦,等.人巨细胞病毒特异性 IgG 抗体检测方法的建立及应用[J].中国生育健康杂志,2009,20(3):154-157  
Zhang Meng, An Li-sha, Hou Lin-pu, et al. Establishment and application of novel method for detecting specific cytomegalovirus IgG antibody [J].Chinese Journal of Reproductive Health, 2009, 20 (3): 154-157

[6] WHO international laboratory & collaborating centres for biological standards [EB/OL]. [http://www.who.int/biologicals/collaborating\\_centers/en/index.html](http://www.who.int/biologicals/collaborating_centers/en/index.html), 2011-11-14

[7] WHO Expert Committee on Biological Standardization [R]. Thirty-seventh report. Geneva, World Health Organization, 1987, p.16 (WHO Technical Report Series, No. 760)

[8] WHO Expert Committee on Biological Standardization [R]. Thirty-eighth report. Geneva, World Health Organization, 1988, P.18 (WHO Technical Report Series, No. 771)

[9] WHO Expert Committee on Biological Standardization [R]. Forty-fourth report. Geneva, World Health Organization, 1994 (WHO Technical Report Series, No. 848).

[10] Lelie PN, van Dalen CM, Burckhard JJ, et al. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Collaborative Studies for the evaluation of a proposed international Standard for anti-Cytomegalovirus immunoglobulin [M]. Geneva, World Health Organization, 1995: 1814

[11] Hansen GA, Vestergaard BF. Anti-cytomegalovirus serum, human need for international reference preparations of Anti-Cytomegalovirus IgG and IgM Serum, Human [M]. Geneva, World Health Organization, 1995:1797

[12] WHO Expert Committee on Biological Standardization [R]. Forty-fifth report. Geneva, World Health Organization, 1995, p15 (WHO Technical Report Series, No. 858)

[13] WHO Expert Committee on Biological Standardization [R]. Forty-ninth report. Geneva, World Health Organization, 1998, p16 (WHO Technical Report Series, No. 872)

[14] Development of WHO Biological Reference Preparations for Blood Safety-related in vitro Diagnostic Tests. Report of a meeting with the WHO Collaborating Centres for Biological Standards and Standardization [R]. Geneva, World Health Organization, 2007:13

[15] Development of WHO Biological Reference Preparations for Blood Safety-related in vitro Diagnostic Tests. Report of the 2nd meeting with the WHO Collaborating Centres for Biological Standards and Standardization [R]. Geneva, World Health Organization, 2009:11

[16] Planitzer CB, Saemann MD, Gajek H, et al.Cytomegalovirus neutralization by hyperimmune and standard intravenous immunoglobulin preparations [J]. Transplantation, 2011,92(3):267-270

[17] 中国食品药品检定研究院. 国家药品标准物质目录[EB/OL].<http://www.nifdc.org.cn/bzwz/CL0481/>, 2011-12-01  
National Institutes for Food and Drug Control. List of National Drug Reference Standards [EB/OL]. <http://www.nifdc.org.cn/bzwz/CL0481/>, 2011-11-31

[18] WHO International Laboratories for Biological Standards. WHO International Biological Reference Preparations (BLOOD PRODUCTS AND RELATED SUBSTANCES) [EB/OL] [http://www.who.int/bloodproducts/ref\\_materials/](http://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/), 2011-05-25