(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108931655 A
(43)申请公布日 2018.12.04

(21)申请号 201810820863.1

(22)申请日 2018.07.24

(71)申请人 中山大学肿瘤防治中心(中山大学附属肿瘤医院、中山大学肿瘤研究所)
地址 510060 广东省广州市越秀区东风东路651号

(72)发明人 刘万里 陈浩 陈树林 毛敏杰 刘纹 李林芳

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205
代理人 胡辉

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品和质控品及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品和质控品及其制备方法。本发明原料容易获取，制备工艺简单，校准品制备的校准曲线相关性高、真实可靠，本发明检测的VCA和EA的NPC阳性率高，具备准确性高、灵敏度好、特异性强以及稳定性好的特点，可以用于临床病人疗效的监测。进一步提高了抗EB病毒的VCA-IgA以及EA-IgA抗体的校准品和质控品的产品性能，在生物检测领域发挥重要作用。

CN 108931655 A

1.一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的校准品的制备方法，其特征在于，步骤如下：

1)通过免疫荧光法，选取含EB病毒VCA-IgA以及EA-IgA抗体的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去沉淀；

2)向步骤1)处理的血浆加入氯化钙水浴，离心取上清，将鼻咽癌血浆和正常人血浆按比例混合，滤膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体校准品。

2.一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的质控品的制备方法，其特征在于，步骤如下：

1)通过免疫荧光法，选取含EB病毒VCA-IgA以及EA-IgA抗体的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去沉淀；

2)向步骤1)处理的血浆加入氯化钙水浴，离心取上清，将鼻咽癌血浆和正常人血浆混合，滤膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体质控品。

3.根据权利要求1或2所述的制备方法，其特征在于，步骤1)中，鼻咽癌病人血浆中EB病毒VCA-IgA滴度为1:800～1680。

4.根据权利要求1或2所述的制备方法，其特征在于，步骤1)中，鼻咽癌病人血浆中EB病毒EA-IgA滴度为1:220～420。

5.根据权利要求1或2所述的制备方法，其特征在于，步骤2)中所述的水浴的条件为32～41℃恒温水浴1～3小时。

6.根据权利要求1或2所述的制备方法，其特征在于，步骤2)中所述的校准品的鼻咽癌血浆与正常人血浆混合比例为1:5～10。

7.根据权利要求1或2所述的制备方法，其特征在于，步骤2)中所述的质控品的鼻咽癌血浆与正常人血浆混合比例为1:350～650。

8.根据权利要求1所述的制备方法，其特征在于，所述的校准品的赋值方法包括以下步骤：通过化学发光法对上一批次和最新批次制备的校准品进行检测，得到光量子数并代入公式计算：最新批次校准品的浓度＝上一批次校准品浓度×最新批次的光子数/上一批次的光子数，即完成最新批次校准品赋值。

9.根据权利要求2所述的制备方法，其特征在于，所述的质控品的赋值方法包括以下步骤：用化学发光法检测得到质控品光子数，将其代入到校准曲线得到对应的质控品浓度，即完成质控品赋值。

10.一种检测EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的试剂盒，包括抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体校准品以及抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体质控品。

抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品和质控品及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品和质控品及其制备方法，属于生物检测领域。

背景技术

[0002] 鼻咽癌是我国常见的头颈部肿瘤，它的发生与EB病毒(Epstein-Barr)相关。我们通过检测EB病毒的衣壳抗原抗体(VCA-IgA)和早期抗原抗体(EA-IgA)，进行鼻咽癌的筛查和疗效观察。目前，VCA-IgA和EA-IgA公认的抗体血清学检测方法是免疫荧光法(IFA)，以VCA 的全蛋白作为抗原进行VCA-IgA抗体的检测，具有特异性高的特点，而且以滴度半定量作为结果，对临床疗效监测有一定的帮助。但是IFA自动化弱、主观性强、设备要求高，阻碍了其在大批量筛查检测的应用。

[0003] VCA-IgA和EA-IgA抗体的第二个检测方法：ELISA法，具有低成本、自动化等优势。第三种方法是新兴的化学发光检测法，具有自动化和精密度高的特点，缺点是成本高于ELISA 法，且厂家一般给出光子数并通过各个厂家各自赋值的校准品计算定量结果。由于目前市场上尚无结合两者的标准品，阻碍了后面两种便捷、高效方法的进一步发展。首先，由于缺乏标准品使得ELISA法仅能筛选出阴阳性两种结果，无法进行定量，临床疗效监测无法进行；其次，我国具有许多生产VCA-IgA和EA-IgA抗体ELISA和化学发光试剂盒的厂家，各个检测方法的结果无法进行统一比较，造成重复检测的浪费。

[0004] ELISA法在实际操作中受多种因素的影响，易导致检测结果的偏差，为了提高实验的准确性，临界值质控的设置显得非常重要。目前市面上缺乏有效的鼻咽癌ELISA检测临界值质控血清，常规的ELISA试剂盒常常只配备阴性和强阳性质控，无法对检测灰区的结果进行有效的监控。临床实验室需要耗时耗力对临界值质控进行配置，而且从临床样本中获得临界值质控的血清存在不少难度，而且缺乏统一标准，质量也没有保障。目前临界值质控品配置大多采用阳性血清和阴性血清进行一定比例稀释配置，采用ELSIA法需要多次检测S/CO值，筛选出合适的浓度，需要耗时耗力。而且ELISA法检测的线性结果远不如IFA法，对鼻咽癌病人VCA-IgA抗体高值的检测存在明显的后带现象，使检测不准确。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品。

[0006] 本发明的目的在于提供一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原抗体的质控品。

[0007] 本发明的再一目的在于提供一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品的制备方法。

[0008] 本发明的再一目的在于提供一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原抗体的质控品的制备方法。

[0009] 本发明所采取的技术方案是：

[0010] 一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的校准品的制备方法，步骤如下：

[0011] 1)通过免疫荧光法，选取含EB病毒VCA-IgA以及EA-IgA抗体的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去沉淀；

[0012] 2)向步骤1)处理的血浆加入氯化钙水浴，离心取上清，将鼻咽癌血浆和正常人血浆按比例混合，滤膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体校准品。

[0013] 一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的质控品的制备方法，步骤如下：

[0014] 1)通过免疫荧光法，选取含EB病毒VCA-IgA以及EA-IgA抗体的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去沉淀；

[0015] 2)向步骤1)处理的血浆加入氯化钙水浴，离心取上清，将鼻咽癌血浆和正常人血浆混合，滤膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体质控品。

[0016] 进一步的，加入防腐剂和冻干保护剂冷冻干燥进行保存。

[0017] 进一步的，所述的冻干保护剂为甘氨酸、甘露醇、氯化钾的至少一种。

[0018] 进一步的，步骤1)中，鼻咽癌病人血浆中EB病毒VCA-IgA滴度为1:800～1680。

[0019] 进一步的，EB病毒VCA-IgA滴度为1:1280。

[0020] 进一步的，步骤2)中所述的滤膜为醋酸纤维素膜。

[0021] 进一步的，步骤1)中，鼻咽癌病人血浆中EB病毒EA-IgA滴度为1:220～420。

[0022] 进一步的，步骤2)中所述的水浴条件为32～41℃恒温水浴1～3小时。

[0023] 进一步的，步骤2)的离心在10000rpm离心30分钟。

[0024] 进一步的，步骤2)中所述的校准品的鼻咽癌血浆与正常人血浆混合比例为1:5～10。

[0025] 进一步的，步骤2)中所述的质控品的鼻咽癌血浆与正常人血浆混合比例为1:350～650。

[0026] 进一步的，所述的校准品赋值方法包括以下步骤：通过化学发光法对上一批次和最新批次制备的校准品进行检测，得到光量子数并代入公式计算：最新批次校准品的浓度＝上一批次校准品浓度×最新批次的光子数/上一批次的光子数，即完成校准品赋值。

[0027] 进一步的，所述的质控品赋值方法包括以下步骤：用化学发光法检测质控品光子数并代入校准曲线可得到对应的质控品浓度，即完成质控品赋值。

[0028] 一种检测抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的试剂盒，包括抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体校准品以及抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体质控品。

[0029] 本发明的有益效果是：

[0030] 本发明原料容易获取，制备工艺简单；通过血浆制备得到的抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原IgA抗体校准品和质控品，制备的校准曲线相关性高、准确性高，不仅定性而且还可以定量读取抗体的浓度，检测的VCA-IgA和EA-IgA的鼻咽癌(NPC)阳性率高；具备灵敏度好、特异性强以及稳定性好的特点，可以用于临床病人疗效的监测。本发明在赋值方面采用了IFA和化学发光法联合进行赋值，既缩短摸索的时间，提高特异性和赋值的精密度。

附图说明

[0031] 图1为使用本发明校准品和欧蒙试剂盒检测得到的VCA-IgA校准曲线。

[0032] 图2为使用本发明校准品和欧蒙试剂盒检测得到的EA-IgA校准曲线。

[0033] 图3为使用本发明校准品和同昕试剂盒检测得到的VCA-IgA校准曲线。

[0034] 图4为使用本发明校准品和同昕试剂盒检测得到的EA-IgA校准曲线。

[0035] 图5为使用本发明校准品及欧蒙检测试剂盒的VCA-IgA的ROC曲线。

[0036] 图6为使用本发明校准品及欧蒙检测试剂盒的EA-IgA的ROC曲线。

[0037] 图7为使用欧蒙试剂盒及试剂盒自带校准物的VCA-IgA的ROC曲线。

[0038] 图8为使用欧蒙试剂盒及试剂盒自带校准物的EA-IgA的ROC曲线。

具体实施方式

[0039] 一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的校准品的制备方法,步骤如下:

[0040] 1)通过免疫荧光法,选取含EB病毒VCA-IgA以及EA-IgA抗体的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆,分别离心去沉淀;

[0041] 2)向步骤1)处理的血浆加入氯化钙水浴,离心取上清,将鼻咽癌血浆和正常人血浆按比例混合,滤膜过滤,制得VCA-IgA和EA-IgA抗体校准品。

[0042] 一种抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的质控品的制备方法,步骤如下:

[0043] 1)通过免疫荧光法,选取含EB病毒VCA-IgA以及EA-IgA抗体的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆,分别离心去沉淀;

[0044] 2)向步骤1)处理的血浆加入氯化钙水浴,离心取上清,将鼻咽癌血浆和正常人血浆混合,滤膜过滤,制得VCA-IgA和EA-IgA抗体质控品。

[0045] 优选的,加入防腐剂和冻干保护剂冷冻干燥进行保存。

[0046] 优选的,所述的冻干保护剂为甘氨酸、甘露醇、氯化钾的至少一种。

[0047] 优选的,步骤1)中,鼻咽癌病人血浆中EB病毒VCA-IgA滴度为1:800～1680。

[0048] 优选的,步骤2)中所述的滤膜为醋酸纤维素膜。

[0049] 优选的,步骤1)中,鼻咽癌病人血浆中EB病毒EA-IgA滴度为1:220～420。

[0050] 优选的,EB病毒VCA-IgA滴度为1:1280。

[0051] 优选的,步骤2)中所述的水浴条件为32～41℃恒温水浴1～3小时。

[0052] 优选的,步骤2)的离心在10000rpm离心30分钟。

[0053] 优选的,步骤2)中所述的校准品的鼻咽癌血浆与正常人血浆混合比例为1:5～10。

[0054] 优选的,步骤2)中所述的质控品的鼻咽癌血浆与正常人血浆混合比例为1:350～650。

[0055] 进一步的,所述的校准品赋值方法包括以下步骤:使用化学发光法对上一批次和最新批次制备的校准品进行检测,得到光量子数并代入公式计算:最新批次校准品的浓度＝上一批次校准品浓度×最新批次的光子数/上一批次的光子数,即完成校准品赋值。

[0056] 进一步的,所述的质控品赋值方法包括以下步骤:用化学发光法检测质控品光子数并代入校准曲线可得到对应的质控品浓度值,即完成质控品赋值。

[0057] 一种检测抗EB病毒的衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体的试剂盒,包括抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体校准品以及抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原的IgA抗体质控品。下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0058] 实施例1校准品的制备方法

[0059] (1)通过免疫荧光法(IFA)选取EB病毒VCA-IgA滴度为1:1280和EA-IgA抗体滴度为

1:320的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去除沉淀和干扰物；

[0060] (2)向步骤(1)处理后的血浆中加入18mmol/L氯化钙，置于38℃的恒温水浴2小时，10000rpm离心30分钟后分离，取上清。将鼻咽癌血浆和正常人血浆按1:8的比例混合，0.2μm醋酸纤维素膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体校准品；

[0061] (3)将制得的校准品分装，加入防腐剂和50g/L冻干保护剂，冷冻干燥成冻干粉保存。

[0062] 实施例2校准品的制备方法

[0063] (1)通过免疫荧光法(IFA)选取EB病毒VCA-IgA滴度为1:800和EA-IgA抗体滴度为1:220的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去除沉淀和干扰物；

[0064] (2)向步骤(1)处理后的血浆中加入18mmol/L氯化钙，置于35℃的恒温水浴2小时，10000rpm离心30分钟后分离，取上清。将鼻咽癌血浆和正常人血浆按1:5的比例混合，0.2μm醋酸纤维素膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体校准品；

[0065] (3)将制得的校准品分装，加入防腐剂和10g/L冻干保护剂，冷冻干燥成冻干粉保存。

[0066] 实施例3校准品的制备方法

[0067] (1)通过免疫荧光法(IFA)选取EB病毒VCA-IgA滴度为1:1680和EA-IgA抗体滴度为1:420的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去除沉淀和干扰物；

[0068] (2)向步骤(1)处理后的血浆中加入18mmol/L氯化钙，置于35℃的恒温水浴3小时，10000rpm离心30分钟后分离，取上清。将鼻咽癌血浆和正常人血浆按1:10的比例混合，0.2μm醋酸纤维素膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体校准品；

[0069] (3)将制得的校准品分装，加入防腐剂和10g/L冻干保护剂，冷冻干燥成冻干粉保存。

[0070] 实施例4质控品的制备方法

[0071] (1)通过免疫荧光法(IFA)选取EB病毒VCA-IgA滴度为1:1280和EA-IgA抗体滴度为1:320的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去除沉淀和干扰物；

[0072] (2)向步骤(1)处理后的血浆中加入18mmol/L氯化钙，置于35-38℃的恒温水浴2小时，10000rpm离心30分钟后分离，取上清。将鼻咽癌血浆和正常人血浆按1:200的比例混合，0.2μm醋酸纤维素膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体质控品；

[0073] (3)将制得的质控品分装，加入防腐剂和10～50g/L冻干保护剂，冷冻干燥成冻干粉保存。

[0074] 实施例5质控品的制备方法

[0075] (1)通过免疫荧光法(IFA)选取EB病毒VCA-IgA滴度为1:800和EA-IgA抗体滴度为1:220的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去除沉淀和干扰物；

[0076] (2)向步骤(1)处理后的血浆中加入18mmol/L氯化钙，置于38℃的恒温水浴2小时，

10000rpm离心30分钟后分离，取上清。将鼻咽癌血浆和正常人血浆按1:350的比例混合，0.2μm醋酸纤维素膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体质控品；

[0077] (3)将制得的质控品分装，加入防腐剂和10g/L冻干保护剂，冷冻干燥成冻干粉保存。

[0078] 实施例6质控品的制备方法

[0079] (1)通过免疫荧光法(IFA)选取EB病毒VCA-IgA滴度为1:1680和EA-IgA抗体滴度为1:420的鼻咽癌病人血浆、EB病毒VCA-IgA和EA-IgA抗体阴性的正常人血浆，分别离心去除沉淀和干扰物；

[0080] (2)向步骤(1)处理后的血浆中加入18mmol/L氯化钙，置于38℃的恒温水浴2小时，10000rpm离心30分钟后分离，取上清。将鼻咽癌血浆和正常人血浆按1:650的比例混合，0.2μm醋酸纤维素膜过滤，制得VCA-IgA和EA-IgA抗体质控品；

[0081] (3)将制得的质控品分装，加入防腐剂和10g/L冻干保护剂，冷冻干燥成冻干粉保存。

[0082] 每批次校准品及质控品的赋值

[0083] 校准品的赋值：我们将首批制备和验证的校准品赋值为16000IU/mL，然后在每批新产品初步制备完成后我们使用深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的VCA-IgA和 EA-IgA抗体检测试剂盒(化学发光法)，从-80℃取出首批次的校准品和第二批次制备的校准品(各20个)，4℃放置24小时后进行检测。取出校准品室温放置30分钟后检测。放入仪器进行检测，然后根据赋值公式计算校准品的浓度值。计算平均浓度值和不确定度。

[0084] 赋值公式如下：

[0085] 最新批次校准品的浓度＝上一批次校准品浓度×最新批次的光子数/上一批次的光子数；

[0086] 例如：

[0087] 第二批次校准品的浓度＝首批次校准品浓度×第二批次的光子数/首批次的光子数；

[0088] 第三批次校准品的浓度＝第二批次校准品浓度×第三批次的光子数/第二批次的光子数；

[0089] 以此类推。

[0090] 质控品的赋值：先制备横纵坐标分别为校准品浓度、校准品光子数的校准曲线；接着将最新批次的质控品，从-80℃选出3只质控品，4℃放置24小时后，室温放置30分钟，使用化学发光法(深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的VCA-IgA和EA-IgA抗体检测试剂盒)进行检测，重复10次，计算平均浓度值和标准偏差。将质控品的光子数代入到校准曲线上得出对应的质控品浓度，即完成最新批次质控品的赋值。

[0091] 实施例7本发明校准品的校准曲线

[0092] 方法：我们在两个医院分别采用欧蒙和同昕的ELSIA试剂盒对本发明的校准品进行验证，绘制标准曲线。

[0093] 将100μL标准品(试剂盒原来配备的)、阳性对照品、阴性对照品和稀释后的本发明制备的校准品，室温温育30min。缓冲液清洗3次，每次300μL。倒掉以去除残存的清洗液。滴加100μL酶结合物到微孔，室温温育30min。清洗缓冲液清洗3次，每次300μL。滴加100μL 底

物液到每一微孔，室温避光温育15min。以同样的速度和顺序滴加100μL终止液到每一微孔，30分钟内测定波长为450nm的吸光度。如表1所示。

[0094] 表1本实验使用的试剂盒

[0095]

		中山大学附属肿瘤医院	揭阳市人民医院
生产厂家	VCA-IgA	欧蒙	同昕
	EA-IgA	欧蒙	同昕
检测抗原肽段	VCA-IgA	Gp125	p18
	EA-IgA	EA-D	EA-D

[0096] 结果：

[0097] 结果显示无论采用欧蒙和同昕试剂盒，标准曲线的相关性r都无限接近于1，相关性好。

[0098] 使用本发明制备的校准品和欧蒙试剂盒在中山大学肿瘤医院进行检测，绘制的曲线分别为VCA-IgA(Y＝72.86+898.41x+1086.88x^2，r＝0.999)(图1)和EA-IgA(Y＝55.17+4617.4 x+1250.6x^2，r＝0.999)(图2)，标准曲线相关性均达到0.999以上。

[0099] 用本发明制备的校准品和北京同昕试剂盒在揭阳市人民医院进行检测，绘制的曲线分别为VCA-IgA(Y＝420.80+733.57x+6071.88x^2，r＝0.993)(图3)和EA-IgA(Y＝573.32+2071.13 x+3033.95x^2，r＝0.995)(图4)。

[0100] 目前，大多数的试剂盒采用临界值附近的物质作为校准品，因为仅是一个定值，且无溯源性，仅能用于定性结果的判断。另外由于试剂盒线性范围较窄，试剂盒提供的一个临界值校准品不可反馈真实的结果。从图1～图4种可知，本发明校准品真实性可靠、性能好，有利于实验结果的比对，可以用于临床病人疗效的监测。

[0101] 实施例8本发明校准品对不同VCA-IgG、EA-IgG的检测方法的比对

[0102] 方法：我们挑选20例经临床确诊的鼻咽癌样本，使用本发明制备的校准品，同时在两家医院分别采用欧蒙、同昕试剂盒检测VCA和EA(方法同实施例2)，代入到欧蒙VCA-IgA标准曲线Y＝72.86+898.41x+1086.88x^2、欧蒙EA-IgA标准曲线Y＝55.17+4617.4x+1250.6x^2。

[0103] 代入到到同昕VCA-IgA标准曲线Y＝420.80+733.57x+6071.88x^2、同昕EA-IgA标准曲线 Y＝573.32+2071.13x+3033.95x^2。以及采用血清学金标准方法(IFA)进行测试。

[0104] 其中IFA的实验步骤：先滴加30μL稀释后的血清到加样板反应区，将载片覆有生物薄片的一面朝下，盖在加样板的凹槽里，室温温育30min；接着用盛有PBS-吐温缓冲液冲洗载片，再浸洗至少5分钟；滴加25μLFITC标记二抗到反应区，温育；PBS-吐温缓冲液冲洗载片，再浸洗至少5分钟；最后用盖玻片直接放在凹槽里，滴加甘油到反应区，放在荧光显微镜下判读。

[0105] 表2 20例样本使用欧蒙、同昕试剂盒测得的VCA-IgG和EA-IgG

[0106]

	VCA-IgG			EA-IgG		
病例	欧蒙浓度值(IU/mL)	同昕浓度值(IU/mL)	IFA（金标准）	欧蒙浓度值(IU/mL)	同昕浓度值(IU/mL)	IFA（金标准）
1	7383.894	9273.104	1：320	736.06	5471.619	1：20
2	6206.712	10599.14	1：640	9289.25	9275.767	1：10
3	5880.807	3167.503	1：640	6566.63	221.855	1：40
4	3979.042	3973.811	1：320	1488.71	374.3708	1：20
5	1649.349	4488.683	1：20	1797.03	255.03	1：20
6	189.4038	1418.882	阴性	403.71	386.4448	阴性
7	3612.272	6538.455	1：40	671.63	259.896	1：20
8	3409.861	2530.899	1：80	4118.11	9959.129	1：40
9	4959.55	3182.075	1：320	1907.13	410.5013	1：40
10	2320.628	8525.083	阴性	534.28	761.8812	1：20
11	1567.292	3949.525	1：40	2548.03	956.2797	1：40
12	916.8152	2638.059	1：20	741.03	5795.809	阴性
13	1398.775	1108.016	1：20	856.12	337.9893	1：20
14	756.4569	8423.08	1：40	10174.27	2785.973	阴性
15	2281.753	7116.472	阴性	534.28	237.5297	1：20
16	532.1141	3148.074	阴性	578.22	2308.303	阴性

[0107]

17	957.4061	1006.013	1：10	1552.94	328.6046	阴性
18	140.0249	423.1397	阴性	303.41	461.6845	阴性
19	449.5446	3619.23	阴性	351.03	217.9067	阴性
20	1608.076	12653.77	1：80	11324.46	4564.561	阴性
Cutoff	421.85	2333.09	1：20	514.0176	235.1	阴性

[0108] 结果：表2中的Cutoff值是一个临床临界值，使用试剂盒测得的抗体浓度，会以此值在同等条件下判断样本的阴阳性，如果样本的检测浓度大于该临界值，则为阳性；否则为阴性。

[0109] 欧蒙检测的VCA和EA的NPC阳性值分别为90％、80％，同昕检测的VCA和EA的 NPC阳性值分别85％、95％，发现使用本发明两个试剂盒检测得到的阳性率较高，个别偏差及检测浓度的差异可能是由于两种试剂盒检测的EB病毒抗原肽段不同造成的。

[0110] 相比于传统的间接免疫荧光法(IFA)，使用本发明标准品制备的校准曲线后，欧蒙和同昕ELISA试剂盒获得抗体的具体浓度，而且阳性率更高，与病人的临床诊断更吻合。

[0111] 实施例9本发明在鼻咽癌(NPC)筛查中的性能

[0112] 为了验证使用标准曲线的定值方法，在鼻咽癌筛选中更具有优势，我们使用本发明和试剂盒配备的校准品同时进行检测，评估其临床应用价值。

[0113] 方法：收集鼻咽癌病人治疗前和正常人的血浆，采用本发明制备的校准品标准曲线，以及欧蒙ELISA试剂盒的校准品对VCA-IgA、EA-IgA进行检测。

[0114] 表3不同校准品在NPC(鼻咽癌)筛查的性能参数

[0115]

		判定临界值	灵敏性	特异性	AUC	95%CI	
A 本发明制备的校准品	VCA	>294.58	91.30	90.91	0.937	0.878	0.973
	EA	>514.0176	81.25	73.81	0.810	0.733	0.873
B 欧蒙试剂盒	VCA	1.066	91.30	89.61	0.906	0.840	0.951
	EA	>0.366[a]	77.08	71.43	0.697	0.606	0.779
		>0.8[b]	45.83	89.29			
		>1.1[c]	39.58	92.86			

[0116] 注：A:A组为使用本发明自制校准品的性能参数；

[0117] B:B组为使用试剂盒自带校准品的性能参数；

[0118] a：根据ROC曲线选出的最佳cutoff值；

[0119] b/c：根据试剂盒提供的cutoff值。

[0120] 结果：结果表3和图5～8中可知，以曲线下面积(AUC)评价，本发明校准品用检测VCA-IgA的AUC大于试剂盒校准品检测VCA-IgA的AUC(0.937>0.906)，说明本发明检测VCA具有较高的准确性；本发明检测EA-IgA的AUC比试剂盒校准品检测EA-IgA的AUC 大(0.810>0.697)，说明本发明检测EA具有高的准确性。另外，灵敏性、特异性均优于欧蒙试剂盒配备的接近临界值的校准物。

[0121] 实施例10本发明校准品和质控品的稳定性

[0122] 将本发明制备的质控品从-30℃取出后，放入4℃，分别在第一天、第三天、第七天使用同昕试剂盒对VCA-IgA的高低两个浓度进行检测。

[0123] 表4 VCA-IgA在不同天数的检测结果(误差为±20％)

[0124]

	检测结果			回收率	
	第一天	第三天	第七天	第三天	第七天
高浓度 VCA-IgA（16000IU/mL）	15122.1	14893.1	12654.7	98.5%	83.7%
低浓度 VCA-IgA（500 IU/mL）	562.64	539.2	663.9	95.8%	117.8%
高浓度 EA-IgA(16000 IU/mL)	16123	14987	15110	93.0%	93.7%
低浓度 EA-IgA(500 IU/mL)	496	532	471	107.2%	95.0%

[0125] 结果:从表4中可以看出,本发明制备的校准品和质控品,回收率在80%-120%的行业标准内,在4度中可稳定保存至少七天。

[0126] 实施例11本发明校准品和质控品的不精密度

[0127] 使用VCA-IgA和EA-IgA抗体检测试剂盒(化学发光法)(深圳市新产业生物医学工程股份有限公司生产的)。将质控品和校准品每天检测三次浓度值,连续检测五天,分别计算均值和批内不精密度。结果发现,本校准品和质控品的批内不精密度均小于10%的要求(见表5)。

[0128] 表5校准品和质控品的不精密度

[0129]

	VCA		EA	
	校准品	质控品	校准品	质控品
均值（AU/ml）	12.08	1.446	26.682	12.879
批内不精密度	2.47%	6.55%	3.50%	1.93%

[0130] 注:单位(AU/ml)为新产业仪器曲线计算出的浓度值单位

[0131] 实施例12本发明校准品和质控品的瓶间差异

[0132] 随机选取同批号的最小包装单元的校准品、质控品各7只,对每包装单元的浓度测试3 次。按下面的公式计算测试结果的平均值($\overline{X}_1$)和标准差S_1;另用上述校准品、质控品中的 1个最小包装单元连续重复测试6次,计算测试结果的平均值($\overline{X}_2$)和标准差S_2;按下列各公式计算瓶间重复性CV%。

[0133] 公式1 $$\overline{X}=\frac{\sum_{i=1}^{n}x_i}{n}$$

[0134] 公式2 $$S=\sqrt{\frac{\sum X_i^{\,2}-\frac{(\sum X_i)^2}{n}}{n-1}}$$

[0135] 公式3 $$S_{瓶间}=\sqrt{S_1^{\,2}-S_2^{\,2}}$$

[0136] 公式4 $$CV_{瓶间}(\%)=S_{瓶间}/\overline{X}_1\times 100$$

[0137] 当$S_1<S_2$时，令$CV_{瓶间}=0$

[0138] 式中：

[0139] $\overline{X}$----平均值；S----标准差；n----测量次数；x_i----指定参数第i次测量值。

[0140] 表6校准品和质控品的瓶间差异

[0141]

	VCA		EA	
	校准品	质控品	校准品	质控品
均值（$\overline{X}_1$）	11.93	1.36	26.60	12.40
标准差（S_1）	0.622	0.199	1.005	0.622
均值（$\overline{X}_2$）	11.51	1.23	26.05	11.21
标准差（S_2）	0.177	0.083	0.572	0.286
$S_{瓶间}$	0.597	0.180	0.826	0.909
CV%	5.00	13.19	3.10	7.33

[0142] 注：均值单位为AU/mL，为新产业仪器曲线计算出的浓度值单位

[0143] 表6结果发现，本校准品和质控品的瓶间差异小于15％，说明标准品、质控品的瓶间差异小，符合校准品和质控品制备规范的要求。

[0144] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

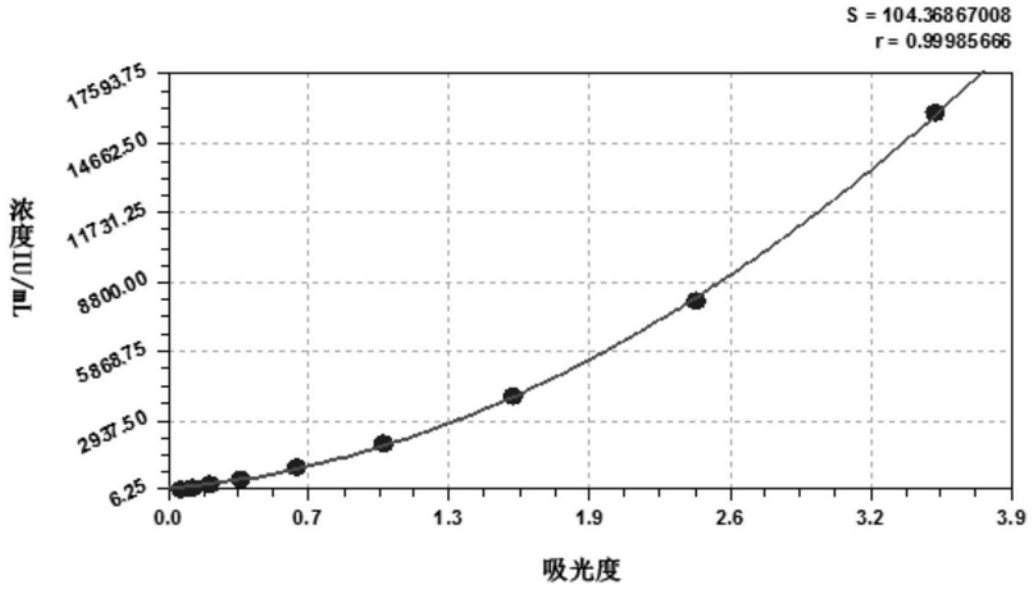
S = 104.36867008
r = 0.99985666
浓度IU/mL
17593.75
14662.50
11731.25
8800.00
5868.75
2937.50
6.25
0.0
0.7
1.3
1.9
2.6
3.2
3.9
吸光度

图1

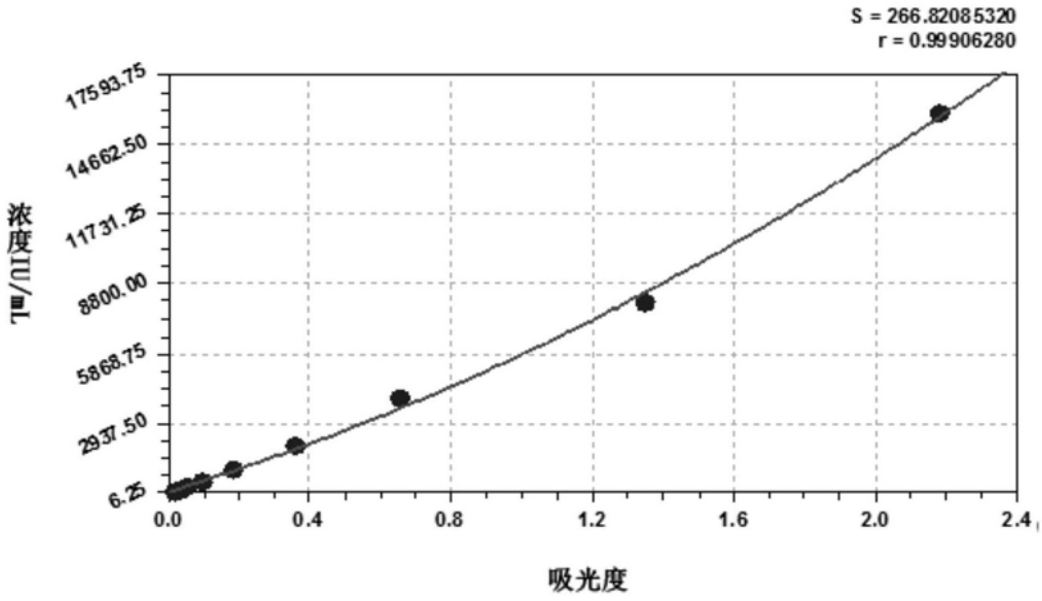
S = 266.82085320
r = 0.99906280
浓度IU/mL
17593.75
14662.50
11731.25
8800.00
5868.75
2937.50
6.25
0.0
0.4
0.8
1.2
1.6
2.0
2.4
吸光度

图2

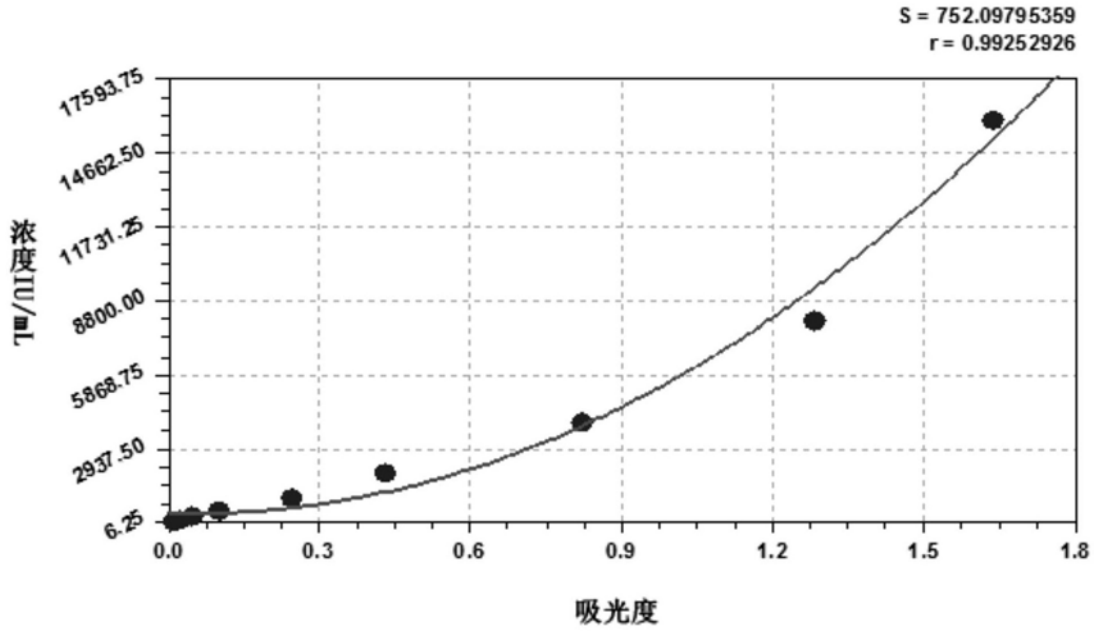
S = 752.09795359
r = 0.99252926
17593.75
14662.50
11731.25
8800.00
5868.75
2937.50
6.25
浓度IU/mL
0.0
0.3
0.6
0.9
1.2
1.5
1.8
吸光度

图3

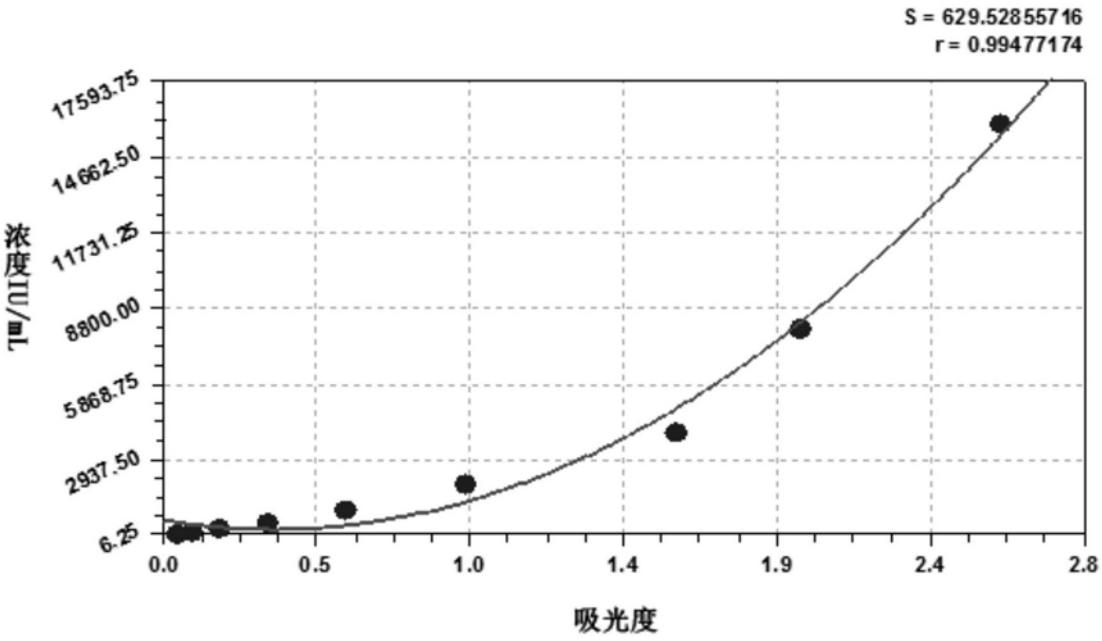
S = 629.52855716
r = 0.99477174
17593.75
14662.50
11731.25
8800.00
5868.75
2937.50
6.25
浓度IU/mL
0.0
0.5
1.0
1.4
1.9
2.4
2.8
吸光度

图4

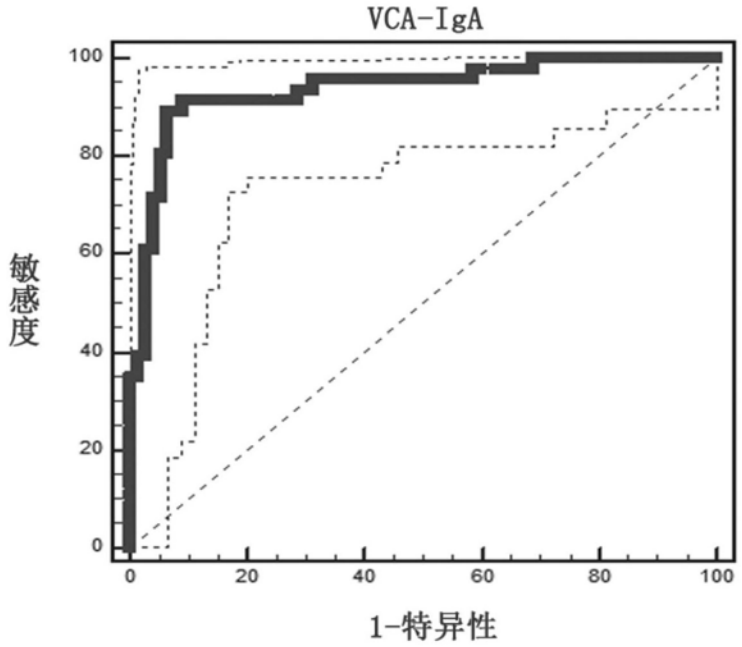

图5

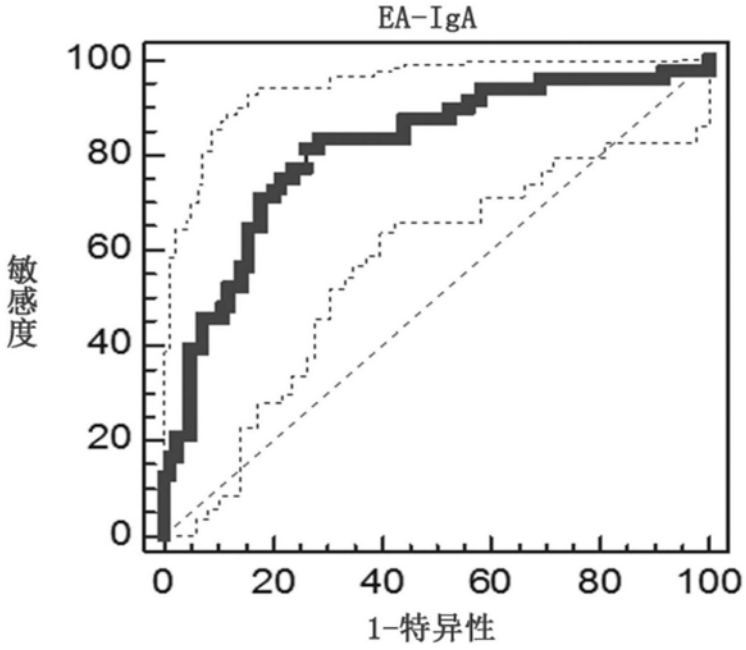

图6

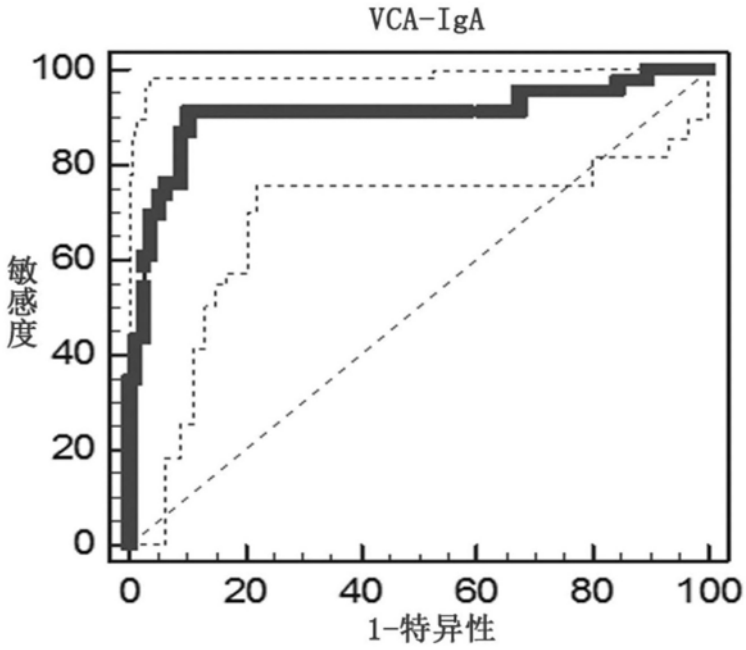
VCA-IgA
100
80
60
40
20
0
敏感度
0
20
40
60
80
100
1-特异性

图7

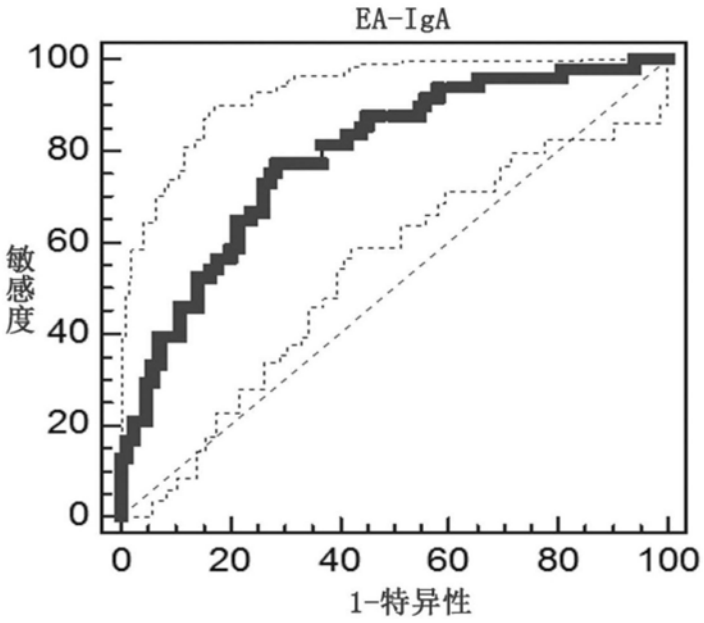
EA-IgA
100
80
60
40
20
0
敏感度
0
20
40
60
80
100
1-特异性

图8

专利名称(译)	抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品和质控品及其制备方法		
公开(公告)号	CN108931655A	公开(公告)日	2018-12-04
申请号	CN201810820863.1	申请日	2018-07-24
[标]发明人	刘万里 陈浩 陈树林 毛敏杰 刘纹 李林芳		
发明人	刘万里 陈浩 陈树林 毛敏杰 刘纹 李林芳		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/57407 G01N2800/14		
代理人(译)	胡辉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了抗EB病毒衣壳抗原和早期抗原抗体的校准品和质控品及其制备方法。本发明原料容易获取，制备工艺简单，校准品制备的校准曲线相关性高、真实可靠，本发明检测的VCA和EA的NPC阳性率高，具备准确性高、灵敏度好、特异性强以及稳定性好的特点，可以用于临床病人疗效的监测。进一步提高了抗EB病毒的VCA-IgA以及EA-IgA抗体的校准品和质控品的产品性能，在生物检测领域发挥重要作用。

	检测结果			回收率	
	第一天	第三天	第七天	第三天	第七天
高浓度 VCA-IgA（16000IU/mL）	15122.1	14893.1	12654.7	98.5%	83.7%
低浓度 VCA-IgA（500 IU/mL）	562.64	539.2	663.9	95.8%	117.8%
高浓度 EA-IgA(16000 IU/mL)	16123	14987	15110	93.0%	93.7%
低浓度 EA-IgA(500 IU/mL)	496	532	471	107.2%	95.0%