

基于核蛋白的麻疹病毒 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用

任虎¹ 曹蕾² 毛乃颖² 张荣波¹ 赵培蓓³ 李海² 马若群² 王慧玲² 张燕²
许文波^{1,2,4}

¹安徽理工大学医学院,淮南 232001; ²中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 国家卫生健康委员会医学病毒和病毒病重点实验室 世界卫生组织西太平洋地区麻疹/风疹参比实验室,北京 102206; ³邯郸市疾病预防控制中心 056004; ⁴中国科学院生物安全大科学研究中心,武汉 430071

任虎和曹蕾对本文同等贡献

通信作者:许文波,Email:wenbo_xu1@aliyun.com,电话:010-58900187

【摘要】 目的 以原核系统表达的麻疹病毒核蛋白作为包被抗原,初步建立检测麻疹病毒抗体的间接 ELISA 方法,并将其应用于人群抗体水平的评估。**方法** 对各项实验条件进行筛选和优化,确定间接 ELISA 法的操作流程,并检测了 157 份健康儿童和新生儿母亲血清中的抗麻疹病毒 IgG 抗体,与商品化麻疹病毒 ELISA IgG 抗体检测试剂盒进行比较。**结果** 本研究建立的间接 ELISA 方法批内和批间的重复性试验变异系数均小于 10%,与试剂盒检测结果相比,血清标本的总符合率为 95.5%,灵敏度和特异度分别可达 94.8%和 98.3%。其中,两种方法检测的 85 份 0~15 岁健康儿童血清麻疹病毒 IgG 抗体阳性率,无论是<8 月龄组或 8 月龄~15 岁组,结果差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.313, P > 0.05$; $\chi^2 = 0.000, P > 0.05$),且通过本研究所建立的 ELISA 方法检测的麻疹病毒抗体水平表现出与试剂盒检测结果在不同年龄组一致的增减趋势,两种方法定量结果的相关系数 r 为 0.893 ($P < 0.001$),显示出该方法具备的定量潜力。**结论** 本研究建立的 ELISA 方法具有良好的稳定性,且灵敏度高、特异度强,与商品化试剂盒检测结果无明显差异,可用于麻疹病毒血清流行病学调查和疫苗免疫后人群抗体水平的评估。

【关键词】 麻疹病毒;核蛋白;血清;间接酶联免疫吸附试验

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10732401)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2020.01.013

Establishment and application of indirect ELISA for detection of measles virus IgG antibody based on nucleoprotein

Ren Hu¹, Cao Lei², Mao Naiying², Zhang Rongbo¹, Zhao Peibei³, Li Hai², Ma Ruoqun², Wang Huiling², Zhang Yan², Xu Wenbo^{1,2,4}

¹Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China; ²NHC Key Laboratory of Medical Virology and Viral Diseases, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO WPRO Regional Reference Measles/Rubella Laboratory, Beijing 102206, China; ³Handan Center for Disease Control and Prevention, Handan 056004, China; ⁴Center for Biosafety Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

Ren Hu and Cao Lei contributed equally to the article

Corresponding author: Xu Wenbo, Email:wenbo_xu1@aliyun.com, Tel:0086-10-58900187

【Abstract】 Objective To establish an indirect ELISA method for detection of measles virus antibody based on the nucleoprotein of measles virus expressed in prokaryotic system selected as the coating antigen. **Methods** The working conditions were screened and optimized to determine the operation process of indirect ELISA. The anti-measles virus IgG antibody in 157 sera of healthy children and mothers of newborn infants was detected and compared with the commercial measles virus ELISA IgG antibody detection kit. **Results** The result showed that the coefficient of variation of intra and inter assay repeatability of the

indirect ELISA was less than 10%. Compared with the result of the commercial kit, the total concordance rate of serum samples was 95.5%, and the sensitivity and specificity were 94.8% and 98.3%, respectively. There was no significant difference between the two methods ($\chi^2 = 0.313, P > 0.05$; $\chi^2 = 0.000, P > 0.05$) in the positive rate of measles virus IgG antibody in 85 healthy children at the age of 0~15 years. The level of measles virus antibody detected by ELISA established in this study showed the same increasing and decreasing trend as that detected by the commercial kit in different age groups. The correlation coefficient r of the quantitative result was 0.893 ($P < 0.001$), which showed the quantitative potential of the method.

Conclusions The ELISA method established in this study has good stability, high sensitivity and specificity, and there was no significant difference between the detection results of commercial kit and the ELISA method. It can be used for the seroepidemiological investigation of measles virus and the evaluation of antibody level of the population after vaccination.

【Key words】 Measles virus; Nucleoprotein; Serology; Indirect ELISA

Fund programs: National Science and Technology Major Project (2018ZX10732401)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2020.01.013

麻疹是由麻疹病毒 (measles virus, MV) 引起的一种严重的疫苗可预防疾病, 在世界范围内广泛流行并造成死亡^[1]。MV 具有高度传染性, 即使在免疫力水平达到 90% 以上的人群中也可引起暴发流行^[2]。因此, 为阻断 MV 的传播, 世界卫生组织 (world health organization, WHO) 推荐各国 5 岁以下儿童麻疹疫苗覆盖率应达到 95%, 同时要求对人群 MV IgG 抗体水平进行调查, 常用的方法包括噬斑减少中和试验 (plaque reduction neutralization assay, PRNA) 和酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), PRNA 法被认为是评价保护性抗体水平的金标准, 但该方法成本高、耗时长, 故在进行大量样品检测时, 常用 ELISA 法^[3-4]。我国自 1965 年开始使用 MV 减毒活疫苗, 2008 年麻疹疫苗纳入实施扩大国家免疫规划, 近年来 MV 发病率和死亡率显著下降, 我国现处于接近麻疹消除阶段^[5], 检测人群 MV IgG 抗体水平, 及时了解麻疹疫苗接种后人群免疫效果, 对麻疹的预防和消除都极为重要。

目前市场上已有多种商品化 MV IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒, 而中国 MV IgG 抗体检测多依赖于可定量的进口试剂盒, 但其价格昂贵。国产试剂盒仅能定性分析, 且检测结果不稳定, 限制了应用, 开发具有中国知识产权的可定量检测试剂盒对麻疹消除具有重大的现实意义。商品化试剂盒多使用灭活全病毒作为抗原, 抗原的制备涉及活病毒操作, 过程繁琐且成本较高。研究表明, 在 MV 感染或疫苗接种后机体针对核蛋白产生抗体最早且最为丰富^[6-7]。已有研究使用重组 MV 核蛋白作为抗原, 多种表达系统均可用于重组核蛋白的制备^[8-10], 其中原核表达系统最为简单, 可大量生产, 大大降低了试

剂盒制备成本, 且原核表达的核蛋白也具有天然的构象, 可被血清中针对构象表位的核蛋白抗体特异识别^[11]。故本研究选取原核表达的 MV 核蛋白作为抗原, 建立了 MV IgG 抗体的间接 ELISA 检测方法, 为进一步开发灵敏性高、特异性强、可定量的血清 MV 抗体检测试剂打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 2005 年采集并经商品化试剂盒确定阴性和阳性的 67 份广东省健康儿童血清标本和 2010 年随机采集未知阴性和阳性的 90 份江苏省赣榆县 0~15 岁健康儿童与新生儿母亲的血清标本由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所麻疹室保存, 标本采集经家属知情同意。原核表达的重组核蛋白由本研究室制备保存, Pierce™ BCA Protein Assay Kit 购自上海英潍捷基公司; 酶标板购自海门市英科实验器材有限公司; HRP 酶标二抗 goat anti-human IgG-HRP (浓度: 0.4 mg/ml) 购自 Santa Cruz 公司; TMB 单组分显色液和 ELISA 终止液购自北京索莱宝公司; 微量紫外可见分光光度计购自 Thermo 公司; 商品化 MV IgG 抗体检测试剂盒购自德国维润赛润公司 (货号: ESR102G)。

1.2 间接 ELISA 方法的建立

1.2.1 最佳抗原包被和二抗浓度组合条件摸索: 将抗原按 0.02、0.1 和 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 稀释后包被于 96 孔酶标板, 每孔 100 μl 。选取已确定阳性和阴性的血清各一份, 分别按 1:100 稀释, 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 。二抗分别按 0.02、0.04 和 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 稀释, 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 组成矩阵, 进行间接 ELISA, 用紫外可见分光光度计测定 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值。选取阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值适中且 P/N 值 (阳性血清与阴性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值之比) 最大

的组合进行后续实验。

1.2.2 最佳封闭液的确定:选取 10 份阳性血清和 20 份阴性血清,封闭液分别为 5%脱脂奶粉和 10%胎牛血清,做不加封闭液的对照孔,200 μL /孔,其余按已确定的最佳条件,进行间接 ELISA,测定 OD_{450 nm} 值,分析阳性及阴性血清的读值变化以确定最佳的封闭液。

1.2.3 最佳二抗孵育时间的确定:选取已确定阳性和阴性的血清各一份,在上述确定的最佳条件下,二抗孵育时间分别为 30、60 和 90 min,进行间接 ELISA 试验,选取最佳条件的原则同方法 1.2.1。

1.2.4 临界值的确定:使用条件优化的间接 ELISA 法,对 67 份广东省健康儿童血清 MV IgG 进行检测,与商品化试剂盒的检测结果比较,使用 GraphPad Prism 5.01 软件,根据测定的 OD_{450 nm} 值绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,选取 Youden 指数(Youden 指数=灵敏度+特异度-1)最大值对应的 OD_{450 nm} 值作为本方法的最佳临界值,检测血清的 OD_{450 nm} 值大于临界值时判定为阳性,小于临界值时判定为阴性。

1.2.5 重复性试验:制备 3 批试剂盒,选取 6 份抗体水平不同的阳性血清,按照所建立的 ELISA 方法,于 3 个不同时间段进行平行操作,每份血清重复 2 孔,同时设定对照,测定 OD_{450 nm} 值,选取第一批试剂盒做批内重复,每份血清重复 8 孔,计算试剂盒批内和批间的变异系数。

1.3 间接 ELISA 方法的应用 使用所建立的 ELISA 方法对 90 份来自江苏省赣榆县 0~15 岁健康儿童与新生儿母亲的血清 MV IgG 进行检测,并与商品化试剂盒的检测结果进行比较,计算两种方法的符合率、灵敏度及特异度^[12],商品化试剂盒的检测按操作说明书进行。

2 结果

2.1 间接 ELISA 方法的建立

2.1.1 最佳抗原包被和二抗浓度的确定:采用矩阵法确定最佳抗原包被和二抗浓度,结果显示,当抗原包被浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,二抗浓度为 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,阳性血清的 OD_{450 nm} 值为 1.4544,阴性血清值较低,且此时 P/N 值最大,故选择 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度包被和 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 二抗浓度进行进一步条件的优化(表 1)。

2.1.2 最佳封闭液的确定:分别以 5%脱脂奶粉和 10%胎牛血清作为封闭液,对 3 组试验阳性血清的

检测结果影响较小;对于阴性血清的检测,未封闭组表现出较高的背景值干扰,5%脱脂奶粉和 10%胎牛血清封闭可明显降低背景值的干扰,但 5%脱脂奶粉封闭液组有 4 份阴性血清出现假阳性结果(表 2),故最终确定可降低背景值,且检测结果较为稳定的 10%胎牛血清为最佳封闭液。

表 1 最佳抗原包被和二抗浓度的确定

Tab.1 Determination of the coating protein concentration and secondary antibody concentration

| 二抗浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | 蛋白包被浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|---------|----------------|
| | 0.02 | 0.1 | 0.5 |
| 0.02(P) | 1.170 4 | 2.060 6 | 2.627 5 |
| 0.02(N) | 0.258 0 | 0.268 3 | 0.340 3 |
| 0.02(P/N) | 4.53 | 7.68 | 7.72 |
| 0.04(P) | 0.658 9 | 1.165 6 | 1.454 4 |
| 0.04(N) | 0.159 6 | 0.170 1 | 0.205 6 |
| 0.04(P/N) | 4.12 | 6.85 | 7.07 |
| 0.08(P) | 0.398 1 | 0.655 5 | 0.829 2 |
| 0.08(N) | 0.106 8 | 0.112 7 | 0.128 0 |
| 0.08(P/N) | 3.72 | 5.81 | 6.47 |

注:加粗部分为选定条件. P 表示阳性血清. N 表示阴性血清

Note: The bold part is the selected condition, P indicates the positive serum, N indicates the negative serum

表 2 最佳封闭液的确定

Tab.2 Determination of the blocking solution

| OD _{450 nm} | 封闭液 | | |
|----------------------|---------|---------|----------------|
| | 未封闭 | 5%脱脂奶粉 | 10%胎牛血清 |
| 1 | 0.375 8 | 1.410 1 | 0.155 6 |
| 2 | 0.410 6 | 1.159 2 | 0.214 8 |
| 3 | 0.244 9 | 1.136 6 | 0.083 9 |
| 4 | 0.330 5 | 0.577 5 | 0.113 5 |

注:加粗部分为选定条件

Note: The bold part is the selected condition

2.1.3 最佳二抗孵育时间的确定:在其他试验条件确定的情况下,随着孵育时间的延长阳性血清及阴性血清 OD 值均有所增高,但当二抗孵育时间为 90 min 时,P/N 值最大,更有利于对阳性和阴性血清的区分,故确定二抗的最佳孵育时间为 90 min(表 3)。

2.1.4 建立间接 ELISA 检测方法的操作流程:通过上述对间接 ELISA 各条件的探索,最终确定间接 ELISA 操作流程为:按 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗原浓度过夜包被,100 μL /孔。洗板 4 次,10%胎牛血清 200 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。洗板 4 次,加入 1:100 稀释的待测血清,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。洗板 4 次,0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 酶标二抗 100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 30 min。洗板 4 次,TMB 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 30 min。50 μL /孔

ELISA 终止液终止,测定 OD_{450 nm} 值。

表 3 最佳二抗孵育时间的确定

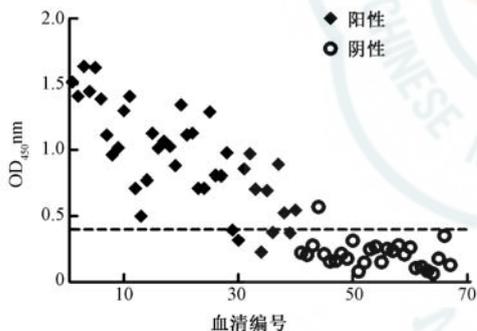
Tab.3 Determination of the incubation time for enzyme labeled antibody

| OD _{450 nm} | 二抗孵育时间 | | |
|----------------------|---------|---------|----------------|
| | 30 min | 60 min | 90 min |
| P | 0.662 4 | 1.190 5 | 1.406 0 |
| N | 0.112 4 | 0.168 2 | 0.184 3 |
| P/N | 5.89 | 7.07 | 7.62 |

注:加粗部分为选定条件。P 表示阳性血清。N 表示阴性血清

Note: The bold part is the selected condition, P indicates the positive serum, N indicates the negative serum

2.1.5 临界值的确定:对 67 份广东省健康儿童血清标本进行检测,结果显示,40 份 MV IgG 阳性血清和 27 份 MV IgG 阴性血清的检测结果大致分布在 2 个区域内(图 1)。使用 GraphPad Prism 5.01 软件分析检测的结果,得到如图 2 所示的 ROC 曲线,求得本研究 Youden 指数的最大值为 0.913,所对应的 OD_{450 nm} 值为 0.361,故最终确定的临界值为 0.361,该值对应的灵敏度为 95.0%,特异度为 96.3%。



注:虚线表示临界值 OD_{450 nm} = 0.361

图 1 40 份阳性血清和 27 份阴性血清的检测结果分布

Note: dotted line indicates cut-off value OD_{450 nm} = 0.361

Fig.1 Scattergram of result for the 40 positive sera and 27 negative sera

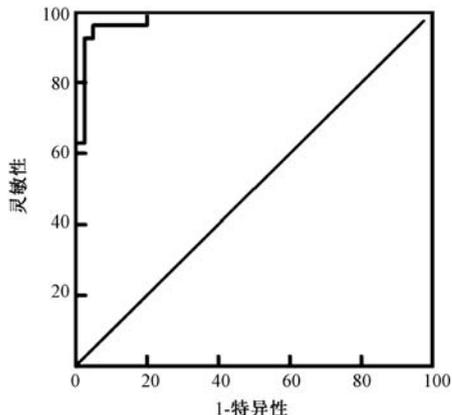


图 2 受试者工作特征曲线

Fig.2 Receiver operating characteristic curve

2.1.6 批内和批间重复性试验:重复性试验结果显示(表 4),血清批内重复性的变异系数在 1.82%~4.43%之间,批间重复性的变异系数在 3.99%~8.22%之间,均小于 10%,表明本研究建立的间接 ELISA 方法具有较好的重复性和稳定性。

表 4 批内和批间重复性试验结果

Tab.4 The result of into-and inter-batches repeatability assay

| 血清标本 | 重复次数 | 批内重复性 | | 批间重复性 | | |
|------|------|--------------------------------|----------|--------------------------------|-----------------|------|
| | | OD _{450 nm} (平均值±标准差) | 变异系数 (%) | OD _{450 nm} (平均值±标准差) | 变异系数 (%) | |
| 1 | 8 | 0.961 2±0.031 5 | 3.15 | 3 | 0.946 0±0.044 0 | 4.65 |
| 2 | 8 | 0.855 4±0.019 9 | 1.99 | 3 | 0.856 3±0.048 6 | 5.68 |
| 3 | 8 | 0.747 9±0.044 3 | 4.43 | 3 | 0.746 3±0.029 8 | 3.99 |
| 4 | 8 | 0.554 4±0.033 1 | 3.31 | 3 | 0.572 1±0.047 0 | 8.22 |
| 5 | 8 | 0.466 1±0.023 6 | 2.36 | 3 | 0.479 9±0.035 7 | 7.43 |
| 6 | 8 | 0.419 6±0.018 2 | 1.82 | 3 | 0.427 4±0.024 5 | 5.73 |

2.2 间接 ELISA 方法的应用

2.2.1 符合率、灵敏性及特异性的计算:使用建立的 ELISA 方法对 90 份江苏省血清标本进行检测,结果显示有 54 份标本为阳性,36 份为阴性。而用商品化试剂盒检测,57 份为阳性,32 份为阴性,1 份为可疑阳性,两者的符合率为:86/90×100% = 95.6%;灵敏性为:54/57×100% = 94.7%;特异性为:32/32×100% = 100%(表 5)。

表 5 建立的间接 ELISA 法检测 MV IgG 抗体符合率结果

Tab.5 Concordance rate of measles IgG antibody detected by the indirect ELISA

| 本研究建立间接 ELISA 法 | 维润赛润试剂盒 | | 合计 |
|-----------------|---------|----|----|
| | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 54 | 0 | 54 |
| 阴性 | 3 | 32 | 35 |
| 合计 | 57 | 32 | 89 |

2.2.2 两种方法的定性检测结果比较:将江苏省血清标本分为<8 月龄组(40 份)和 8 月龄~15 岁组(45 份),建立 ELISA 法和商品化试剂盒计算得到的 MV IgG 抗体阳性率在<8 月龄组分别为 17.5%(7/40)和 22.5%(9/40),在 8 月龄~15 岁组分别为 93.3%(42/45)和 95.5%(43/45),由 Chi-square test 检验结果可知,无论是<8 月龄组或 8 月龄~15 岁组,两种检测方法得到的阳性率结果差异均无统计学意义($\chi^2 = 0.313, P > 0.05$; $\chi^2 = 0.000, P > 0.05$),而建立 ELISA 法得到的阳性率结果在两个年龄组之间差异有统计学意义($\chi^2 =$

49.878, $P < 0.001$)。

2.2.3 两种方法的定量检测结果比较:将江苏省血清标本分为新生儿、1 月龄、2 月龄、3 月龄、4 月龄、5 月龄、6 月龄、7 月龄、8 月龄、9~11 月龄、1 岁、2 岁、3 岁、4 岁、5 岁、6~10 岁、11~15 岁以及新生儿母亲(与新生儿对应)共 18 个组,每组各 5 份,计算各组标本的几何平均浓度(geometric mean concentration, GMC)(试剂盒定量)和平均 OD_{450 nm} 值(建立 ELISA 法测定),调查各组 MV IgG 抗体 GMC 在 17.4 mIU/ml(7 月龄组)~1815.9 mIU/ml(1 岁组)之间。0~7 月龄儿童抗体 GMC 随月龄增加呈整体下降趋势,至 7 月龄达到最低;8 月龄组抗体 GMC 开始上升,至 1 岁达到最高峰,2~4 岁有所降低并维持在 1061.2 mIU/ml~1128.6 mIU/ml 水平;4~15 岁又呈下降趋势;新生儿与新生儿母亲的 MV IgG 抗体 GMC 水平相似。建立 ELISA 法各组标本的平均 OD_{450 nm} 值增减趋势与试剂盒结果相似(图 3),且经相关性分析得出,两种方法测定结果的相关系数 r 为 0.893($P < 0.001$),相关程度较大(图 4)。

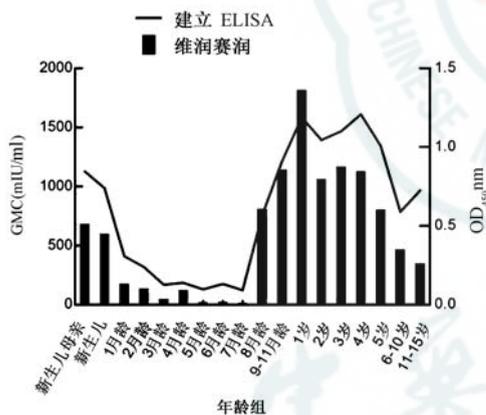


图 3 不自明 MV 抗体水平的比较

Fig.3 Comparison of MV antibody levels between two methods

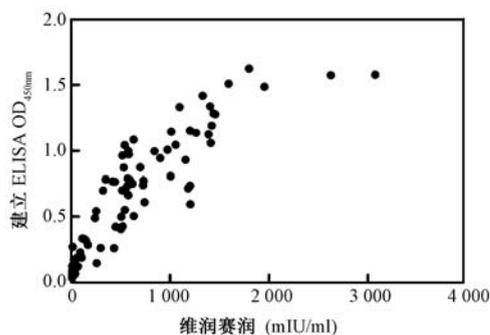


图 4 建立 ELISA 检测值与维润赛润定量值的相关性

Fig.4 Correlation of quantitative values in Virion-serion with OD_{450 nm} values in Indirect ELISA

3 讨论

本研究建立的间接 ELISA 方法特异度、敏感度、稳定性和定量能力均与进口试剂盒有较高的符合度。为了符合商品化试剂盒的稀释标准,本研究将血清稀释度确定为 1:100,在此基础上,对抗原包被浓度、二抗浓度、封闭液及二抗孵育时间进行了筛选和优化。首先,本研究对抗原包被和二抗浓度的组合进行了筛选,结果显示,随着抗原包被浓度的增加, P/N 值逐渐增大,但当抗原包被浓度增加到 0.5 μg/ml 时,阳性血清的 OD 值最高已达到 2.6275,故本研究未继续对更高抗原包被浓度进行探索。而随着二抗浓度的增加, P/N 值逐渐减小,由此变化规律可推断, P/N 值最大的组合应在矩阵的右上方,但综合考虑阳性、阴性血清的检测值及 P/N 值,本研究选择抗原包被浓度为 0.5 μg/ml 且二抗浓度为 0.04 μg/μl 为最佳组合。其次,本研究对封闭液进行了优化,结果显示,10%胎牛血清的封闭效果较好。值得注意的是,5%脱脂奶粉的封闭效果与 10%胎牛血清相当,但 5%脱脂奶粉会使阴性血清的检测值异常升高,由阴性值变成了强阳性值,该现象为本研究首次报道,可能会限制脱脂奶粉的使用,具体原因还需进一步的试验探索。最后,本研究优化了二抗的孵育时间,数据显示,随着孵育时间的延长, P/N 值逐渐增大,但其增长速度开始放缓,考虑到试验的整体时长,本研究选取 90 min 作为最佳二抗孵育时间。通过对反应条件的优化,建立间接 ELISA 方法批内及批间的变异系数均小于 10%,表明其具有较好的重复性和稳定性。

为了评价建立间接 ELISA 方法的应用价值,与商品化 MV IgG 抗体检测试剂盒进行了比较,共检测血清 157 份,结果显示两种方法的一致性非常好,总符合率达到 95.5%,且建立间接 ELISA 方法具有较高的灵敏度和特异度,分别为 94.8% 和 98.3%。相对于商品化试剂盒的检测结果,本研究建立的 ELISA 方法检测的阳性血清例数较少,可能是因为商品化试剂盒包被的抗原是麻疹全病毒,其检测的抗体不止含有核蛋白抗体,还具有针对其他 MV 蛋白的抗体。但由于本研究建立的方法仅与商品化试剂盒进行比较,而试剂盒检测是否存在假阳性结果也不可不知,因此还应经中和试验等其他方法进行验证,从而得出更精确的结果。

对于江苏省赣榆县 0~15 岁健康儿童血清标本

的检测,两种方法无论在小年龄组还是在较大年龄组均无明显的差异。0~8 月龄健康儿童由于母传抗体的衰减致使 MV 抗体水平较低,之后随着年龄的增长,MV 抗体水平出现了明显的升高,这与江苏省 8 月龄首次接种麻疹疫苗的免疫程序相符^[13-14]。国内相关研究表明,我国麻疹发病年龄向两极转移,8 月龄以下及 15 岁以上人群发病比例较高^[15-17],本研究结果也进一步显示 11~15 岁人群 MV 抗体水平有所下降。提示此方法对于及时发现免疫水平低下及空白人群,进行针对性免疫接种,降低麻疹暴发的风险有一定实际意义。

Warnes 等^[9]最早将原核表达 MV 核用于血清抗体的检测,但可能由于未对核蛋白进行纯化造成检测出现了较高的背景干扰。陈寅等^[18]使用原核表达并纯化了 MV 核蛋白,其建立的间接 ELISA 方法与商品化试剂盒的符合率高达 98.9%,与本研究结果相似,但其只与国产试剂盒的定性结果进行比较,能否用于定量研究还未可知。本研究建立的间接 ELISA 方法,无论从定性还是定量分析,均与进口定量试剂盒有较高的符合度。本研究选取的 N 蛋白基因序列来源于 1 株 H1 基因型的野毒株,MV 疫苗株均为 A 基因型,虽然 MV 只有 1 个血清型^[19],基因型别的差异是否会对检测产生影响仍需大量背景清楚的血清检测对比数据来验证。此外,本研究建立 ELISA 方法与商品化试剂盒定量结果趋势一致性结果显示其具备一定的定量能力,为实现定量研究,应当进一步使用国际标准血清进行标定。

综上所述,本研究建立的 MV 抗体间接 ELISA 检测方法具有良好的重复性和稳定性,且灵敏性高、特异性强,可在 MV 血清流行病学调查和疫苗免疫后人群抗体水平的评估方面发挥重要的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 任虎、曹蕾:实验操作、论文撰写;毛乃颖、张荣波:对文章的知识性内容作批评性审阅;赵培蓓、李海、马若群:统计学分析;王慧玲、张燕:提供材料;许文波:设计实验,对文章的知识性内容作批评性审阅

参考文献

[1] WHO. More than 140,000 die from measles as cases surge worldwide [EB/OL]. <https://www.who.int/news-room/detail/05-12-2019-more-than-140-000-die-from-measles-as-cases-surge-worldwide>.

[2] Gay NJ. The theory of measles elimination; implications for the

design of elimination strategies [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189 (suppl 1): S27-35. DOI: 10.1086/381592.

[3] World Health Organization. Measles vaccines: WHO position paper-April 2017 [J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2017, 92 (17): 205-227.

[4] WHO, Regional Office for Europe. Guidance on conducting serosurveys in support of measles and rubella elimination in the WHO European Region. 2013. http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/236648/Guidance-on-conducting-serosurveys-in-support-of-measles-and-rubella-elimination-in-the-WHO-European-Region.pdf.

[5] 国家卫生健康委员会疾病预防控制局. 2018 年全国法定传染病报告发病死亡统计表 [S]. 2019-04-24.

[6] Graves M, Griffin DE, Johnson RT, et al. Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections [J]. *J Virol*, 1984, 49 (2): 409-412.

[7] Norrby E, Gollmar Y. Appearance and persistence of antibodies against different virus components after regular measles infections [J]. *Infect Immun*, 1972, 6(3): 240-247.

[8] Hummel KB, Erdman DD, Heath J, et al. Baculovirus expression of the nucleoprotein gene of measles virus and utility of the recombinant protein in diagnostic enzyme immunoassays [J]. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(11): 2874-2880.

[9] Warnes A, Fooks AR, Stephenson JR. Production of measles nucleoprotein in different expression systems and its use as a diagnostic reagent [J]. *J Virol Methods*, 1994, 49(3): 257-268. DOI: 10.1016/0166-0934(94)90141-4.

[10] Samuel D, Sasnauskas K, Jin L, et al. Development of a measles specific IgM ELISA for use with serum and oral fluid samples using recombinant measles nucleoprotein produced in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Clin Virol*, 2003, 28(2): 121-129. DOI: 10.1016/s1386-6532(02)00273-1.

[11] Warnes A, Fooks AR, Dowsett AB, et al. Expression of the measles virus nucleoprotein gene in *Escherichia coli* and assembly of nucleocapsid-like structures [J]. *Gene*, 1995, 160(2): 173-178. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00227-w.

[12] 陈红利,曹蕾,邢文月,等.腮腺炎病毒核蛋白原核表达及其血清学检测方法的建立 [J]. *中国病毒病杂志*, 2017, 7 (3): 185-190. DOI: 10.16505/j.2095-0136.2017.03.005.

[13] Science M, Savage R, Severini A, et al. Measles antibody levels in young infants [J]. *Pediatrics*, 2019, 144 (6): e20190630. DOI:10.1542/peds.2019-0630.

[14] 唐广心,连昌虎,刘晓军.58 对母婴麻疹抗体水平衰减的研究 [J]. *实用预防医学*, 2016, 23 (10): 1190-1192. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.10.012.

[15] 朱轶姮,施素洁.苏州市 2008 年麻疹疫情分析 [J]. *江苏预防医学*, 2010, 21 (1): 25-26. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9070.2010.01.008.

[16] 许雷,张嘉陵,谷利妞,等.2008-2017 年连云港市麻疹流行病学特征及免疫水平监测分析 [J]. *现代预防医学*, 2019, 46 (7): 1295-1297.

[17] 张吉,丁亚兴,孙静,等.天津市 2012—2014 年 0-44 岁健康人群麻疹抗体水平监测分析 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2018, 24 (1): 36-38.

[18] 陈寅,卢亦愚,冯燕,等.麻疹核蛋白基因的表达及检测应用的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(5): 1078-1080.

[19] 春梅,安淑华,王艳华.麻疹临床变异和研究进展 [J]. *西藏医药杂志*, 2014, 35(1): 57-60.

(收稿日期:2019-12-03)

(本文编辑:唐溯英)