

定量酶联免疫吸附试验在检测麻疹 IgG 抗体中的应用与比较

毛乃颖¹, 蒋小泓¹, 吴立萍², 南立娟³, 许文波¹

(1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100050; 2. 山西省疾病预防控制中心, 太原 030012;

3. 内蒙古自治区疾病预防控制中心, 呼和浩特 010020)

摘要:目的 对定量酶联免疫吸附试验(ELISA)在麻疹病毒 IgG 抗体检测中的应用进行评价,并与传统的半定量 ELISA 方法做比较。方法 收集 2003 年的 92 份山西省和内蒙古自治区健康成人血清,用德国维润公司定量 ELISA 试剂盒测定麻疹 IgG 抗体滴度。这些血清已经用半定量方法将抗体滴度分为阴性和 1:200、1:800、1:3 200、1:12 800 四个组。将两种方法测定的结果进行比较。结果 定性测定结果分析发现,92 份血清标本中,5 份阴性,1 份可疑,86 份阳性,与传统半定量 ELISA 方法的一致率为 96.74%,统计分析两实验结果差异无显著的统计学意义。定量测定结果分析发现,随着抗体滴度的增高,该组血清抗体国际单位(IU)也随之上升,均数也随之增高,抗体滴度分组与抗体 IU 呈明显的正相关,相关系数(r_s)为 0.963, $P < 0.000$ 。可重复性检验证明该试剂的可重复性较好。结论 定量 ELISA 方法在麻疹以及其它病毒血清学研究中的应用具有优势。

关键词: 麻疹; IgG 抗体; 定量酶联免疫吸附试验

中图分类号: R373.11 文献标识码: A 文章编号: 1006-916X(2005)03-0187-03

Comparative Study on Application of Quantitative ELISA for Detection of Measles Antibody MAO Nai-ying, JIANG Xiao-hong, WU Li-ping et al. (*Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China*)

Abstract: Objective In order to compare the quantitative ELISA with traditional semi-quantitative ELISA on measles IgG antibody. **Methods** 92 samples of serum from Shanxi and Inner Mongolia were tested by German Viron-Serion reagent, which had been tested by semi-quantitative method with five grades of negative, 1:200, 1:800, 1:3200 and 1:12 800. **Results** Analysis on qualitative results showed that in 92 samples, 5 were negative, 1 was suspicious, 86 were positive, and consistency rate was 96.74% with traditional semi-quantitative ELISA. The difference of two methods had no statistical significance. Analysis on quantitative results showed that along with the dilution ratio increased, the test value and mean of international unit of serum antibody increased. Dilution ratio and international unit were positively relative, and the relative coefficient, r_s , was 0.963 ($P < 0.000$). Test of repeatable proved the reagent could be well repeated. **Conclusion** The quantitative ELISA on measles has imperative advantage in the fields of serology studies.

Key words: Measles; IgG antibody; Quantitative ELISA

麻疹是疫苗可预防传染病中导致儿童死亡的首要原因。世界卫生组织(WHO)估计,每年全球约有 70 万人死于麻疹及其并发症^[1]。2000 年 WHO 制定了全球控制麻疹行动计划,要求到 2005 年将全球

麻疹死亡人数减少到 1999 年的一半^[2]。而实验室支持是麻疹监测网络中不可或缺的一环,也是行动计划成功的关键因素之一。酶联免疫吸附试验(ELISA)是检测麻疹 IgG 抗体最常用的实验室血清学检测方法,传统的 ELISA 通过血清稀释将阳性血清标本的抗体含量划分为 1:200、1:800、1:3 200、1:12 800 四个滴度,是一种半定量检测方法。近年来,定量 ELISA 由于能获得准确的抗体水平,而得到广泛应用^[3-5]。通过抗体定量就能准确了解机体的免疫水平,并可以对不同时间和地点的检测结

收稿日期: 2005-03-02; 修回日期: 2005-03-15

作者简介: 毛乃颖(1973-),男,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所实习研究员,硕士,从事麻疹和肠道病毒的分子流行病学及诊断方法学研究。

责任作者: 许文波, e-mail: wenchun@public.bta.net.cn 电话: (010) 63028480

果进行比较。为了对定量 ELISA 在麻疹病毒抗体检测中的应用进行评价,对传统的半定量检测结果与定量 ELISA 检测结果进行比较,我们比较了山西省、内蒙古自治区 92 份血清麻疹抗体半定量检测结果和定量 ELISA 方法的结果。

材料与方法

- 1 血清与试剂来源** 血清标本来自 2003 年山西省和内蒙古自治区正常成人麻疹 IgG 抗体水平调查血清 92 份,应用中国疾病预防控制中心(CDC)病毒病预防控制所国家麻疹实验室 ELISA-IgG 检测试剂检测麻疹 IgG 抗体。这些血清抗体滴度被划分为 5 组:阴性($< 1:200$)、 $1:200$ 、 $1:800$ 、 $1:3200$ 、 $1:12800$ ^[9]。本实验随机挑选阴性组血清标本 6 份, $1:200$ 、 $1:800$ 、 $1:3200$ 组各 20 份, $1:12800$ 组 26 份,共 92 份血清标本。麻疹病毒 IgG 抗体定量 ELISA 试剂盒购自德国维润-赛润公司,批号 SIU. CU,有效期至 2006 年 6 月。
- 2 检测方法** 血清标本 $1:100$ 稀释后,加入微孔板, 37°C 孵育 60min,洗 4 遍后加入 $100\mu\text{l}$ 酶标 IgG 抗体, 37°C 孵育 30min,洗 4 遍后加入底物, 37°C 孵育 30min,终止后于 405nm 和 630nm 双波长测吸光度(OD)值,按操作说明书进行。
- 3 结果判定** 结果定性,上下临界值由阳性对照平均值乘特定系数获得,大于临界值为阳性,小于临界值为阴性,两者之间为可疑值,需重新检测。结果定量,首先用阳性对照平均值与阳性对照参考值求 F 因子,所有血清标本 OD 值乘以 F 因子后,利用试剂盒附送的质量控制评估表和标准曲线求血清中的抗体国际单位(IU)。
- 4 统计方法** SPSS 9.0。

结 果

1 两种检测方法结果定性比较

从 2003 年山西省和内蒙古自治区麻疹 IgG 抗体水平调查血清中,随机挑选 6 份阴性标本和 86 份不同抗体水平的阳性标本,检测方法使用国家麻疹实验室半定量 ELISA 检测试剂,抗体滴度 $< 1:200$ 为阴性, $\geq 1:200$ 均为阳性。然后用德国维润试剂进行检测,定性后发现 1 份由国家麻疹实验室试剂鉴定为阴性的血清在德国维润试剂定为阳性,OD 值为 0.398,刚刚高于临界值上限。另 1 份由国家麻疹实验室试剂鉴定为阴性的血清在德国维润试剂定为可疑值。而 1 份由国家麻疹实验室试剂定为阳性,血清抗体滴度为 $1:200$ 的标本被维润试剂定为阴性(表 1)。统计分析表明,两种方法在麻疹 IgG 抗体检测一致率为 96.74%,两者差异无显著统

计学意义($P > 0.05$)。

表 1 两种 ELISA 检测方法定性结果比较

国家麻疹实验室 ELISA	维润定量 ELISA			合计
	阴性	可疑	阳性	
阴性	4	1	1	6
可疑	0	0	0	0
阳性	1	0	85	86
合计	5	1	86	92

2 两种检测方法定量结果相关性比较

国家麻疹实验室麻疹 IgG 抗体检测试剂是一种抗体水平半定量方法,通过血清的稀释将抗体水平分为 4 个滴度,即 $1:200$ 、 $1:800$ 、 $1:3200$ 、 $1:12800$,这种定量结果是不连续的。维润试剂盒定量 ELISA 是一种可连续检测血清中麻疹抗体水平(IU),对同一抗体滴度组中的抗体 IU 进行统计分析,将抗体 IU < 150 和 > 5000 的数据剔除,因为这些数据无法进行统计分析,发现随着抗体滴度的增高,相应 IU 的均数和中位数也随之增高(表 2)。

表 2 两种 ELISA 检测方法定量结果比较(mIU/ml)

抗体滴度(1:)	样本数	均数	中位数	标准差	95%正常 值范围
200	19	463	370	248	175 ~ 938
800	20	851	810	253	465 ~ 1294
3200	20	2078	1780	1137	705 ~ 4329
12800	20	2234	1989	823	875 ~ 3564

对两种检测方法结果进行相关分析,得出 Spearman 相关系数(r_s)为 0.963($P < 0.000$),说明两种方法的检测结果是高度相关的。

3 定量 ELISA 的可重复性分析

为了检测维润试剂定量结果的可靠性,在第 1 次检测 7d 后,对前 44 份血清标本进行了第 2 次检测。对两次结果 OD 值与 F 因子(F 因子=阳性血清参考 OD 值/阳性血清平均 OD 值)相乘校正后, $t = 1.436$, $P > 0.05$,说明前后两次检测结果一致。

讨 论

本研究结果表明,定量 ELISA 方法与半定量 ELISA 方法相比,在麻疹病毒 IgG 抗体定性方面是高度一致的,92 份血清标本中只有 3 份结果不一致,一致率为 96.74%。统计分析表明,两种方法实验结果差异无显著的统计学意义,说明两种方法具有相同的敏感性和特异性。

在定量方面,抗体滴度分组与抗体 IU 呈明显的正相关(r_s 为 0.963)。随着抗体滴度的增高,该

组血清抗体 IU 值也随之上升,均数与中位数也随之增高。但由于不同抗体滴度分组之间的血清 IU 范围差异过小,无法将抗体滴度分组与抗体 IU 范围对应起来。但可重复性检测也说明了定量 ELISA 不仅具有较高的敏感性与特异性,而且该试剂也具有较好的可重复性。进一步说明定量 ELISA 方法在血清抗体水平定量方面具有较好的准确性。

定量 ELISA 的关键在于抗体浓度标准曲线的制作,标准曲线的精确度决定了检测标本抗体浓度换算的准确性,精确的标准曲线呈两头弯曲中间平坦的 S 型。而制作标准曲线是一项复杂而繁琐的工作,为了解决这一问题,德国维润试剂中带有 1 张已经做好的标准曲线图,只需要将已校正的被测标本 OD 值在曲线中就可以找到对应的抗体水平 IU。从而在操作简便的基础上,保证了抗体浓度定量的准确性。

总之,该商品化的定量 ELISA 方法操作简单,在保持敏感性和特异性的基础上,还能准确的评价

出血清中抗体水平,使不同时间和地点的检测结果具有了较好的可比性,在麻疹病毒以及其它病原微生物的血清学研究中具有优势。

参考文献:

- [1] WHO. The world health report 1999: making a difference[R]. Geneva, 1999.
- [2] WHO. Strategies for reducing global measles mortality[J]. WER, 2000, 75(50): 409-416.
- [3] 侯林蒲,姜英涛,牛向兰. 间接酶联免疫定量检测风疹 IgG 的方法学研究[J]. 中国生育健康杂志, 2003, 14(2): 116-118.
- [4] Conrad AJ, Chiang EY, Andeen LE. quantitation of intrathecal measles virus IgG antibody synthesis rate; subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis[J]. J Neuroimmunol, 1994, 54(1-2): 99-108.
- [5] Malley R, Vernacchio L, Devincenzo J, et al Enzyme-linked immunosorbent assay to assess respiratory syncytial virus concentration and correlate results with inflammatory mediators in tracheal secretions[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2000, 19(1): 1-7.
- [6] 郭可骞,刘玉清,张礼璧. ELISA 法测定麻疹抗体的优越性[J]. 病毒学报, 1987, 3(1): 86-91.

· 文 摘 ·

美国 2003 ~ 2004 学年入学儿童接种率

美国 2010 年的一项健康目标,是使在幼儿园期间儿童的接种率保持在 $\geq 95\%$ 。为了解进入幼儿园儿童的免疫接种率,1 份提交国家免疫项目的报告分析了 2003 ~ 2004 学年由州、哥伦比亚特区(DC)和美国 8 个地区上报的接种率数据。结果显示,在 45 个地区中,除乙型肝炎(乙肝)疫苗和水痘疫苗外,其余疫苗的报告接种率均 $> 90\%$ 。但每个地方要求接种的疫苗种类和调查方法不同;在 7 个州只有 $< 20\%$ 符合条件的儿童被调查。调查人数的不同强调了美国疾病控制与预防中心(CDC)要继续加强州、DC 和各地的预防接种活动,完善调查方法,提高自动报告水平。

2003 ~ 2004 学年,除 1 个州外,其余均报告了幼儿园入学儿童的接种率水平。50 个州报告了包括脊灰疫苗、百白破联合疫苗、麻疹疫苗和风疹疫苗的接种率;49 个州报告了流行性腮腺炎疫苗的接种率。43 个州报告了乙肝疫苗的接种率,33 个州报告了水痘疫苗的接种率。DC 报告了以上所有疫苗的接种率。计算接种率时使用现在的免疫程序。

报告所有入学儿童接种率的州从 2002 ~ 2003 学年的 18 个上升到 2003 ~ 2004 学年的 22 个。有 21 个州,在调查 $> 80\%$ 的注册儿童后,对接种率进行了估算。其余 7 个州在调查 $< 20\%$ 的注册儿童后,对接种率进行了估算。通过对各州幼儿园入学儿童接种率的估计,计算全国的入学儿童接种率。

除乙肝疫苗和水痘疫苗外,16 个州其它疫苗的报告接种率为 $90\% \sim 95\%$,9 个州 $> 95\%$ 。从全国来看,除水痘疫苗报告接种率为

93.3% 外,其它疫苗报告接种率均 $> 95\%$ 。

从 2002 ~ 2003 学年开始,美国 CDC 提供了新的报告系统,帮助各州和各地报告入学儿童的接种率。各州的报告显示,现在的自动报告和计算机系统使接种率的报告更容易。美国 CDC 也鼓励使用更规范的报告标准,与以前的报告不同,本次只使用幼儿园入学儿童的接种率数据,而不像以前还包括小学一年级新生的接种率数据。

为保证无儿童漏种疫苗,州法律规定儿童在入学前要提供预防接种证明,这被称为美国免疫项目的“安全网”。安全网有赖于学校护士、教师和其他人帮助,以确定未及时接种儿童。2002 ~ 2003 学年和 2003 ~ 2004 学年全国高接种率说明,在儿童入学时要求提供预防接种证明对成功提高疫苗接种的重要性。国家也计算 19 ~ 35 月龄儿童的接种率水平。儿童入学时的接种率比小年龄组的接种率高,说明查验预防接种证明的入学法律是保证高接种率的关键。

但本调查有 2 个局限,一是因各州和地区法律要求入学儿童接种的疫苗和针次不同,选择方法不同,所以对接种率的估算方法不同。选择的限制限制了各州间接接种率的可比性。二是所有州都未调查私立学校及在家学习儿童的接种率。因此无法了解在家读书和上传统学校儿童的接种率之间的差异。

(CDC. Vaccination Coverage Among Children Entering School—United States, 2003—04 School Year MMWR, 2004, 53(44): 1041—1044. 马丽莉编译,李军宏校)