

【论著】

酶联免疫吸附试验与中和抗体试验检测麻疹抗体比较研究

傅燕, 许国章, 董红军, 胡逢蛟, 倪红霞, 张姝, 马瑞

【摘要】 目的 探讨酶联免疫吸附试验(ELISA)和中和抗体试验(NT)在麻疹抗体检测中的应用价值。**方法** 以 NT 为“金标准”,同时用德国 Virion/Serion 的定量 ELISA 试剂盒检测 364 份麻疹抗体滴度,将两种方法测定的结果进行比较。**结果** NT 的阳性率为 57.69%,几何平均滴度(GMT)为 1:5.48,ELISA 的阳性率为 42.86%,平均抗体活性值为 48.57 IU/L。定性结果发现,ELISA 特异度为 99.35%,其敏感度即阳性符合率为 73.81%,且阳性符合率随着滴度增加呈现增高的趋势($z = -5.99, P < 0.001$)。Fisher 精确概率法发现,滴度 1:2 组、滴度 1:4 组与其他各组阳性符合率差异均有统计学意义($P < 0.05$),滴度 1:8 组与滴度 $\geq 1:64$ 组阳性符合率差异有统计学意义($P < 0.05$),其余各组间阳性符合率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。定量结果发现,ELISA 抗体活性值与 NT 滴度呈明显正相关,相关系数 $r = 0.884, P < 0.001$ 。**结论** 德国 Virion/Serion 的定量 ELISA 试剂盒在检测低滴度麻疹抗体时易出现假阴性,检测高滴度麻疹抗体时,两种方法敏感性接近;滴度临界值为 1:8~1:16。该试剂可推荐用于健康人群麻疹抗体水平监测。

【关键词】 酶联免疫吸附试验;中和抗体试验;麻疹抗体

中图分类号:R511.1 文献标识码:A 文章编号:1009-6639(2011)12-1024-03

Comparison of ELISA and neutralization test in the detection of measles antibody FU Yan, XU Guo-zhang, DONG Hong-jun, HU Feng-jiao, NI Hong-xia, ZHANG Shu, MA Rui. Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo, Zhejiang 315010, China
Corresponding author: FU Yan, E-mail: fuy@nbcdc.org.cn

【Abstract】 Objective To explore the diagnostic value of ELISA and neutralization test (Nt) in the detection of measles antibody. **Methods** A total of 364 serum samples were tested for measles antibody by ELISA and Nt. Nt is a traditional method and still considered as gold standard for the detection of measles antibody. The performance of quantitative ELISA kit (Virion/Serion, German) was compared to Nt. **Results** The positive rate and activity of measles antibody were 42.86% and 48.57 mIU/ml by ELISA, and were 57.69% and 1:5.48 (GMT) by Nt, respectively. The specificity of ELISA was 99.35%. The positive coincidence rate of measles antibody was 73.81% between the two methods and increased with antibody titer ($z = -5.99, P < 0.001$). There was a correlation between the concentrations of measles antibody quantified by Nt (titer) and ELISA (IU) ($r = 0.884, P < 0.001$). **Conclusion** Nt is more sensitive than ELISA in the detection of serum with measles antibody titer lower than 1:8. The ELISA kit is applicable for epidemiological survey among healthy population.

【Key words】 ELISA; Neutralization test (Nt); Measles antibody

中和抗体试验(neutralization test, NT)是检测麻疹人群抗体水平最敏感、最可靠的方法,但因其需要组织培养、耗时费力而受到限制;酶联免疫吸附试验(ELISA)具有敏感、特异、简便、快速的特点,是目前最常用的麻疹抗体检测方法,但在检测低水平抗体时易出现假阴性^[1]。本文用上述两种方法检测

364 份麻疹疫苗免疫前后儿童血清及小月龄婴儿血清中麻疹抗体水平,以对 ELISA 和 NT 在麻疹抗体检测中的应用进行评价,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

2007 年在宁波市镇海区采集麻疹疫苗株“沪 191”初免儿童免前、免后血清 32(双)份;并随机选取 0、3、6、8、9 月龄未患过麻疹的本地常住婴儿作为研究对象采集血清,每组 60 份,0、3、6、8 月龄婴儿均未接种过麻疹疫苗,9 月龄婴儿指按免疫程序及时接种麻疹疫苗后一个月的婴儿。

基金项目:浙江省宁波市科技计划项目(200801C4010026)

作者单位:宁波市疾病预防控制中心,浙江 宁波 315010

作者简介:傅燕,副主任技师,主要从事病毒性疾病检测工作

通讯作者:傅燕, E-mail: fuy@nbcdc.org.cn

1.2 方法

1.2.1 ELISA 法 IgG 抗体检测 用德国 Virion/Se-rion 试剂盒检测 IgG 抗体,严格按照说明书操作。血清 1:100 稀释后与之反应,单孔定量,单位为 IU/L。判断标准为 ≥ 200 IU/L 为阳性, < 200 IU/L 为阴性。试验同时设空白、阴性和阳性对照。

1.2.2 中和抗体测定 将待测血清 56℃ 30min 灭活,从 1:2 倍比稀释至 1:1 024。在 96 孔细胞板中,25 μ l 各稀释度血清分别与 25 μ l 麻疹病毒液(含 100 TCID₅₀)混合,37℃ 中和 1h,然后加入 100 μ l Vero-slam 细胞,于 37℃ 5% CO₂ 培养,从第 7 天开始逐日观察细胞病变至第 10 天,抗体滴度 $\geq 1:2$ 为阳性,每批试验同时做阳性、阴性血清对照和病毒滴度回滴,确定攻击病毒范围为 32~320 TCID₅₀。

1.3 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件。NT 抗体与 ELISA IgG 抗体定量结果相关性比较采用 Spearman 秩相关,两种方法的阳性符合率采用 Fisher 精确概率检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ELISA 与 NT 检测麻疹抗体定性结果

364 份血清中,ELISA 检测阳性率为 42.86% (156 份),NT 检测阳性率为 57.69% (210 份),两种方法一致性为 84.62% (308 份),其中阳性符合率即 ELISA 法敏感度为 73.81% (155/210),特异度为 99.35% (153/154)。ELISA 法阳性预测值达到 99.36% (155/156),阴性预测值为 73.56% (153/208)。

2.2 不同滴度 NT 抗体下 ELISA-IgG 抗体定量结果

364 份血清中,ELISA 抗体活性值范围 0.10~8131.17 IU/L,平均抗体活性值为 48.57 IU/L; NT 抗体范围在 $< 1:2 \sim > 1:1024$ 之间,GMT 为 1:5.48。将 ELISA 定量结果分成 3 组,分别是阴性(< 200 IU/L)、低抗体保护水平(200~IU/L)、中高抗体保护水平(800~IU/L),各组相对应中和抗体 GMT 依次为 1:1.37、1:11.91、1:69.86; 两

种方法具有良好的相关性,相关系数 $r=0.884$, $P<0.001$,见表 1。

2.3 不同滴度 NT 抗体下两种检测方法的阳性符合率

将 NT 抗体阳性的样本按不同滴度分组,同时对 ELISA 结果进行定性分析。采用趋势检验发现两种方法阳性符合率随着滴度增加呈现增高的趋势($\chi^2=-5.99$, $P<0.001$)。采用 Fisher 精确概率法对各组阳性符合率两两比较发现:滴度 1:2 组、滴度 1:4 组与其他各组阳性符合率差异均有统计学意义($P<0.05$),滴度 1:8 组与滴度 $\geq 1:64$ 组阳性符合率差异有统计学意义($P<0.05$),其余各组间阳性符合率差异均无统计学意义($P>0.05$)。提示:滴度 1:8~1:16 为临界值,值得关注,见表 2。

3 讨论

麻疹是由麻疹病毒引起的一种以发热、呼吸道卡他症状和全身斑丘疹为特征的急性病毒性传染病,该病传染性强,致死率高。20 世纪 60 年代以来,麻疹疫苗的广泛应用使麻疹的发病率、死亡率大幅度降低^[2-3],2005 年我国向世界卫生组织(WHO)西太平洋区承诺于 2012 年消除麻疹,而麻疹网络实验室在加速麻疹控制中起着重要的作用^[4]。

目前,检测麻疹抗体水平的血清学方法有 NT、血凝抑制(HAI)试验、ELISA、被动凝集试验(PHA)、间接免疫荧光试验(IFA)等^[5]。其中 NT 是“金标准”,然而,因其技术要求高、耗时、昂贵而受到一定限制;ELISA 是目前广泛使用的麻疹抗体检测方法,但在检测低水平抗体时易出现假阴性^[1]。因此,有必要对 ELISA 检测结果的可信度进行证实,并且需要筛选高敏感性、高特异性且便于推广使用的 ELISA 检测试剂来研究麻疹流行病学,观察当前人群对麻疹的免疫状况,评价疫苗免疫效果,为制定消除麻疹措施提供科学依据。

此次试验选择麻疹疫苗免疫前后儿童血清各 32 份及小月龄(0, 3, 6, 8, 9 月)婴儿血清每组 60 份共 364 份血清,用上述两种方法检测其麻疹抗体并

表 1 不同滴度 NT 抗体下 ELISA-IgG 抗体定量结果

ELISA 法 IgG 抗体滴度 (1:)	中和抗体滴度 (1:)												总计
	< 2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	> 1024	
< 200	153	27	21	4	2	1	—	—	—	—	—	—	208
200~	—	2	13	14	19	9	2	1	1	—	—	—	61
800~	1	—	—	—	17	16	26	16	8	8	—	3	95
合计	154	29	34	18	38	26	28	17	9	8	0	3	364

表 2 不同滴度 NT 抗体下两种检测方法的阳性符合率

NT 抗体滴度 (1:)	样本数	ELISA 阳性数	阳性符合率 (%)
2	29	2	6.90
4	34	13	38.24
8	18	14	77.78
16	38	36	94.74
32	26	25	96.15
≥64	65	65	100.00

对结果进行比较,证实在检测低水平 NT 抗体时,ELISA 与 NT 的阳性符合率差异有统计学意义,ELISA 不如 NT 敏感,在检测高水平 NT 抗体时,两种方法的阳性符合率差异无统计学意义,两者敏感性接近,且阳性符合率随着滴度增加呈现增高的趋势,NT 抗体滴度临界值为 1:8~1:16。另外,虽然 NT 抗体滴度 >1:2 就判为阳性,但有报道认为 NT 抗体滴度处于 1:8~1:16 才对机体具有保护意义^[6-8],这恰好也是上述的临界滴度范围。而且,此次试验还发现 ELISA 结果具有保护性抗体水平 (>200 IU/L) 者对应中和抗体 GMT 为 1:11.91,三者不谋而合。因此,可以推测,在上述 NT 抗体滴度临界值 1:8~1:16 以上时,ELISA 完全可以取代经典的 NT。

然而,目前市场上麻疹抗体定量试剂盒的质量存在较大差异^[9-10],本研究选用的是德国 Virion/Serion 的定量 ELISA 试剂盒,该试剂盒操作简便,耗时少,结果判断准确、可靠,但成本过高,根据以上结果,在条件允许的情况下,该试剂盒可以投入目前各级疾病预防控制中心检测人群麻疹抗体水平使用。但实际

工作中 ELISA 试验除易受试剂盒质量影响外,不同实验条件、操作等诸多因素也会导致结果差异较大,所以在试剂选择和实际操作中均需严格把关,做好质控工作。

参考文献

- [1] Cohen BJ, Parry RP, Doblas D, *et al.* Measles immunity testing: comparison of two measles IgG ELISAs with plaque reduction neutralisation assay [J]. J Virol Methods 2006, 131 (2): 209-212.
- [2] 陆璐,朱宏幼,陈云华,等.麻疹疫苗对麻疹发病率的影响[J].中国公共卫生管理,2006,22(1):45-47.
- [3] 殷大鹏.麻疹疫苗[J].中国疫苗和免疫,2008,14(5):470-473.
- [4] 卫生部.2006—2012 全国消除麻疹行动计划 [S]. 2006.
- [5] 刘岩,王锋,刘兰芬,等.麻疹抗体的检测方法 [J]. 现代预防医学,2008,35(13):2493-2494.
- [6] Samb B, Aaby P, Whittle HC, *et al.* Serologic status and measles attack rates among vaccinated and unvaccinated children in rural Senegal [J]. Pediatr Infect Dis J, 1995, 14(3): 203-209.
- [7] Hutchins SS, Dezayas A, Le Blond K, *et al.* Evaluation of an early two-dose measles vaccination schedule [J]. Am J Epidemiol, 2001, 154(11): 1064-1071.
- [8] Argüelles MH, Orellana ML, Castello AA, *et al.* Measles virus-specific antibody levels in individuals in Argentina who received a one-dose vaccine [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2733-2738.
- [9] 陈辉,段永翔.两种麻疹抗体 IgG 定量检测方法的比较 [J]. 现代预防医学,2005,32(6):634-635.
- [10] 毛乃颖,朱贞,蒋小泓,等.麻疹 IgG 抗体定量检测酶联免疫吸附试验试剂的比较和评价 [J]. 中国疫苗和免疫,2009,15(3):215-218.

(收稿日期:2011-09-08)

(陈继彬 编辑)

论文撰写规范

图位:以排于首次提及的相应正文所在自然段落后为宜,或简单集中于文末。

插图宽度:以占一栏或两栏宽度为宜,图旁一般不串文。病理(组织)切片图应注明染色方法、放大或缩小倍数,插图为黑白图,若需作彩色图,应注明,并另付制作彩色图的制版费。插图应具自明性。

座标图:纵横座标轴的标目均应平行排在标轴外,纵轴标目以“顶左底右”排。标目由物理量名称、符号和相应单位组成。量与单位间用斜线隔开。座标轴上应标明标值线(刻度线)和标值,否则,应在座标轴尾端画出箭头。

图题:一律排在图下方。图序号使用阿拉伯数字,全文从“1”开始连续编码,只有 1 幅图也应编 1。插图必须具有自明性。

图中注释或说明语均放于图与图题之间。