

## 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

毛乃颖, 朱贞, 蒋小泓, 崔爱利, 张燕, 许松涛, 许文波

(中国疾病预防控制中心病毒预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 世界卫生组织西太平洋区麻疹参比实验室, 北京 100050)

**摘要:** **目的** 对目前中国市场上已有的两种麻疹IgG抗体定量检测酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 试剂 (德国Virion/Serion试剂和德国IBL试剂) 进行比较和评价, 筛选适用于2006年全国人群麻疹血清流行病学调查的试剂。**方法** 以蚀斑减少中和试验 (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT) 的检测结果为“金标准”, 分别用两种ELISA试剂检测52份麻疹IgG抗体组合血清, 然后对试剂的定性和定量能力进行全面分析和评价。**结果** 两种ELISA试剂均能正确的将13份PRNT结果为阴性的血清判定为阴性, 特异度均为100%。两种试剂中, Virion/Serion试剂的敏感度为94.9%, 与PRNT结果的相关性Kappa值为0.902, 相关系数为0.878 ( $P<0.01$ ); IBL试剂敏感性为58.8%, 与PRNT结果的相关性Kappa值为0.441, 相关性系数为0.850 ( $P<0.01$ )。**结论** Virion/Serion试剂的特异性、敏感性较好, 有单孔IgG抗体定量能力, 价格适中, 适于在自动化工作平台工作站中开展大规模血清样本的检测。

**关键词:** 蚀斑减少中和试验; 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(2009)03-0215-04

**Comparison and Evaluation of Enzyme-linked Immunization Assay Kits with Plaque Reduction Neutralization Test for Detection of Measles IgG Antibody** MAO Nai-ying, ZHU Zhen, JIANG Xiao-hong, et al. (*World Health Organization Western Pacific Region Regional Reference Measles Laboratory, State Key Laboratory for Molecular Virology & Genetic Engineering, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China*)

**Abstract: Objective** To evaluate and comparison of 2 commercial ELISA kits (Virion/Serion kit and IBL kit) which ELISA kit will be used in sero-epidemiological survey in China in 2006 by Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT). **Methods** 52 serum panel which contain different levels of measles antibody were used. **Results** The results showed that the sensitivity, PPV and accurate of Virion/Serion kit achieved highest score when taking PRNT as “gold standard”. Virion/Serion kit showed good relationship with PRNT titer: the correlation coefficients are 0.878 ( $P<0.01$ ). IBL kit get lower correlation coefficients 0.850 ( $P<0.01$ ). The test value and mean of unit of serum antibody increased along with neutralizing titers increased. **Conclusion** The Virion/Serion kit is good in sensitivity and specificity. It has quantitative for single well. The kit is suitable for sera epidemiology survey to detection of automatic workstation in China.

**Key words:** Plaque reduction neutralization test; Measles IgG antibodies; Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay

2005年, 包括中国在内的世界卫生组织 (WHO) 西太平洋区承诺于2012年消除麻疹, 然而近年来中国麻疹发病率仍维持在较高的水平<sup>[1-2]</sup>。为消除麻疹, 需要建立高度敏感和特异的实验室

检测方法, 常用的方法有中和试验 (Neutralization Test, NT)、血凝抑制试验 (Hemagglutination Inhibition, HAI)、乳胶凝集试验 (Particle-agglutination, PA) 和酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 等。其中HAI和PA由于与中和抗体的相关性较低, 目前已经很少使用<sup>[3]</sup>; NT是最为敏感和可靠的麻疹抗体检测方法<sup>[4]</sup>; ELISA是目前最常用的麻疹抗体检测方法, 不仅具有较好的敏感性和特异性, 同时还具有易标准化、操作方便、能快速获得结果等优点, 但不同生产

收稿日期: 2009-03-18; 修回日期: 2009-03-31

基金项目: 卫生部麻疹IgG检测专项

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预防控制所助理研究员, 硕士, 从事麻疹、风疹病毒血清学和肠道病毒的分子流行病学研究。

责任作者: 许文波

商的试剂质量存在较大的差异。

蚀斑减少中和试验 (Plague Reduction Neutralization Test, PRNT) 是在 NT 的基础上发展起来的麻疹中和抗体检测方法<sup>[5]</sup>, 是检测麻疹抗体的“金标准”, 具有高度的敏感性和特异性。有研究认为, PRNT 的敏感性是普通 NT 的 10 倍, HAI 的 60 倍, 要比用 ELISA 检测麻疹抗体敏感和特异得多<sup>[6-7]</sup>。NT 通过检测人体内麻疹抗体抑制麻疹病毒复制的能力, 是唯一可靠的人体液免疫水平的定量检测方法, 但由于 PRNT 工作量大、耗费时间、花费高, 且需要有经验的工作人员进行操作, 不适合用于大规模的人群抗体水平调查, 多用于对其他检测方法的评价。

本研究用 PRNT 对目前中国市场上的两种麻疹抗体定量检测 ELISA 试剂质量进行了评价, 利用由 52 份包含不同麻疹抗体水平的血清组成血清盘, 对两种 ELISA 试剂检测麻疹 IgG 抗体的定性和定量检测能力进行全面评估, 为 2006 年全国麻疹血清流行病学调查试剂的筛选提供依据。

## 材料与方法

**1 组合血清** 52 份血清来自 2005 年 5 个省麻疹抗体检测项目, 包含不同水平的麻疹抗体。

**2 ELISA 检测** 从市场上采购两种商品化麻疹 IgG 抗体检测试剂, 德国 Virion/Serion 试剂和 IBL 试剂。用两种试剂分别对组合血清进行了麻疹 IgG 抗体检测和定量。Virion/Serion 试剂将患者血清 1:100 稀释后与之反应, 单孔定量, 单位为毫国际单位/毫升 (mIU/ml)。判定标准为  $\geq 200$  mIU/ml 为阳性,  $< 150$  mIU/ml 为阴性, 两者之间为临界值。IBL 试剂将患者血清 1:100 稀释后与之反应, 抗体滴度  $< 8$  U (单位)/ml 为阴性,  $> 12$  U/ml 为阳性, 两者之间为临界值。具体操作参见试剂说明。

**3 PRNT** 血清 56°C 30min 灭活补体, 用 2% 细胞维持液进行系列 4 倍稀释, 从 1:4~1:4096。120 $\mu$ l 稀释好的血清中加入相同体积蚀斑形成单位 (Plague Forming Unit, PFU) 为 25 的麻疹病毒悬液, 病毒为 NM05-1 野毒株 (H<sub>1</sub> 基因型), 混匀, 于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中和 90min。然后取 100 $\mu$ l 病毒中和后的混合液加入到生长有单层 Vero/SLAM 细胞 (非洲绿猴肾细胞/淋巴信号激活因子转染的非洲绿猴肾细胞) 孔中, 每个稀释度 2 孔, 于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱吸附 60 min, 吸去接种物, 然后每孔各加 1ml 含 1% 琼脂培养基, 于 37°C 培养。每个培养板设细胞对照和病毒对照。每天观察致细胞病变效应 (Cytopathic Effect, CPE), 出现 CPE 后吸出琼脂培养基, 每孔加入滴结晶紫溶液进行染色, 最后吸出结晶紫并干燥培养板, 计算蚀斑数。并用 Reed-Muench 计算 PFU 减少 50% 的血清稀释度的倒数为抗体滴度。结果判定: 滴度  $\geq 1:4$  为阳性, 反之为阴性。

**4 统计分析** 用 Excel 和 SPSS 分别对两种 ELISA 试剂与 PRNT 比较的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、相关性和准确度等进行分析。

## 结果

### 1 两种试剂定性结果分析

用 PRNT 对 52 份组合血清进行麻疹中和抗体检测, 有 39 份的中和抗体滴度  $\geq 1:4$  为阳性, 其余 13 份为阴性。用两种 ELISA 试剂分别对 52 份组合血清检测麻疹 IgG 抗体, 两种试剂都能准确的将 PRNT 阴性血清判定为阴性, 特异度均为 100%, 因此其阳性预测值也均为 100%, 但敏感度有所不同, Virion/Serion 试剂为 94.9%, IBL 试剂为 58.8%。综合比较, Virion/Serion 试剂与 PRNT 结果的一致性为 96.2%, 相关性好, Kappa 值为 0.902; 而 IBL 试剂与 PRNT 结果的一致性为 70.2%, 相关性较差, Kappa 值仅为 0.441 (表 1)。将两种 ELISA 试剂与 PRNT 的检测结果差异进行统计分析, 结果显示, 只有 Virion/Serion 试剂的麻疹 IgG 抗体检测结果与 PRNT 的结果差异无显著的统计学意义 ( $\chi^2=0.5$ ,  $P>0.05$ )。

表 1 两种麻疹 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒与 PRNT 法的比较结果  
Table 1 The Comparison Results between Two Measles IgG ELISA Kits and PRNT Assay

ELISA 试剂 ELISA Reagent	PRNT		敏感度 (%) Sensitivity	特异度 (%) Specificity	阳性预测值 (%) Positive Prospective Value	阴性预测值 (%) Negative Prospective Value	一致性 (%) Consistency	Kappa 值
	+	-						
Virion/ Serion	+	37	94.9	100	100	86.7	96.2	0.902 ( $P<0.001$ )
	-	2						
IBL	+	20	58.8	100	100	48.1	70.2	0.441 ( $P<0.001$ )
	-	14						

### 2 两种试剂定量结果分析

将 52 份组合血清按中和抗体滴度分为 4 组, 分别是  $< 1:4$ 、 $1:4\sim$ 、 $1:120\sim$ 、 $1:>1052$ , 然后分

别对各组的两种 ELISA 麻疹 IgG 抗体检测的结果进行定量, 获得均值以及最大和最小值的区间。表 2 显示, 随着中和抗体滴度的升高, 两种 ELISA 试剂

的定量检测结果的均值也随之增加,在中和抗体滴度 $<1:4$ 和 $>1:1052$ ,未观察到两种ELISA试剂的定量结果与其它组之间有交叉,但在弱阳性组( $1:4\sim$ )和中等麻疹抗体水平组( $1:120\sim$ )中发现两种

ELISA试剂的检测结果存在交叉,尤其是IBL试剂在 $1:120\sim 1:1052$ 有假阴性结果,将中等麻疹中和抗体滴度的血清判定为阴性,而Virion/Serion试剂将弱阳性组的麻疹血清判定为阴性。

表 2 不同麻疹中和抗体滴度血清的两种ELISA定量检测结果比较  
Table 2 The Comparison of Two ELISA Quantification Results for Different Measles Neutralization

PRNT 中和抗体滴度(1: PRNT Neutralization Antibody Titer	标本数 No. of Specimens	ELISA检测定量结果均值 Mean Values of ELISA Quantification Results	
		Virion/Serion	IBL
<4	13	23.4 (0.0~107.8)	2.5 (1.3~4.3)
4~	26	750.8 (133.7~1596.3)	11.7 (3.2~27.8)
120~	9	1981.7 (944.2~2898.1)	42.2 (0.9~77.7)
>1052	4	4993.4 (4973.5~5000.0)	1315.8 (408.2~2521.3)

将所有的麻疹抗体定量结果进行对数(Log)转换,然后对两种试剂定量检测结果与PRNT结果进行相关性分析,结果显示, Virion/Serion试剂与

PRNT结果具有良好的相关性,相关系数为0.878 ( $P<0.01$ ),而IBL试剂与PRNT结果的相关性为0.850 ( $P<0.01$ ) (图1)。

图 a. Vition/Serion

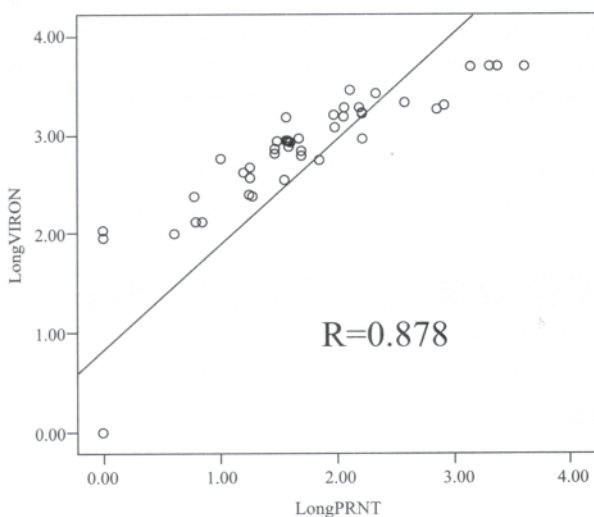


图 b. IBL

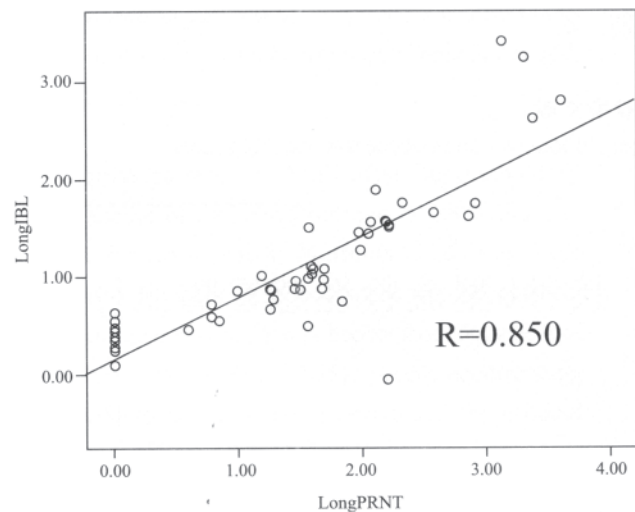


图1 两种试剂麻疹IgG抗体定量结果与PRNT结果的相关性分析  
Figure1 The Consistency Analysis between Two Measles IgG ELISA Kits and PRNT

### 讨 论

为了筛选适用于2006年中国大规模人群麻疹抗体水平调查的ELISA检测试剂,本研究用PRNT作为“金标准”,对中国市场上已有的两种麻疹IgG抗体检测试剂的定性和定量能力进行全面评价。从评价结果看,PRNT的敏感性要高于ELISA试剂,和以前的研究结果一致<sup>[9]</sup>,主要是由于PRNT试验中血清浓度较高,从1:4开始稀释,而ELISA的稀释度多数是1:100或1:200。此外,PRNT检测的中和抗体包

括所有类型的IgM、IgG、IgA抗体,而ELISA试剂只检测IgG抗体。两种ELISA试剂均能正确的将PRNT检测为阴性的血清判定为阴性,特异度均为100%。但两种ELISA试剂均不同程度的出现了假阴性结果,主要出现在PRNT滴度较低的血清中,但IBL试剂在对PRNT滴度较高的血清中也出现假阴性,说明该试剂的敏感性较差。Virion/Serion试剂的敏感度较好(94.4%),与PRNT结果的相关性Kappa值为0.902。综合评价,两种试剂中, Virion/Serion试剂的定性能力较好。

在定量能力方面,考虑到有研究发现,在体内

中和抗体滴度 $<1:120$ 时,仍有可能感染麻疹病毒, $1:120\sim 1:1052$ 会产生无症状感染或轻型麻疹,只有 $>1:1052$ 时,才能有完全的保护避免麻疹感染<sup>[8,10]</sup>。因此,本研究将52份血清按中和抗体滴度的不同分为4组,然后对各组血清的两种ELISA试剂定量检测结果进行比较。结果发现,随着中和抗体水平的升高,两种ELISA试剂定量结果均值也同步增加,有较好的相关性,说明IgG抗体与中和抗体有较好的相关性,能反映人对麻疹病毒感染的保护的实际情况,可用于人群麻疹抗体水平调查。从定量结果的相关性看, Virion/Serion试剂与PRNT结果具有良好的相关性,相关系数为0.878 ( $P<0.01$ ),而IBL试剂与PRNT结果的相关性为0.850 ( $P<0.01$ )。

综合考虑,由于Virion/Serion试剂的定性和定量能力在两种试剂中均最好,而且具有价格适中、便于在自动化工作平台使用等优点,因此,在2006年全国人群麻疹抗体血清流行病学调查中使用该试剂。

#### 参考文献:

[1] 卫生部.2006~2012全国消除麻疹行动计划[S].2006.

- [2] 马超,罗会明,安志杰,等.中国2006~2007年麻疹流行病学特征及消除麻疹措施分析[J].中国疫苗和免疫,2008,14(3):208-213.
- [3] Miyamura K, Sato TA, Sakae K, *et al.* Comparison of gelatin particle agglutination and hemagglutination inhibition tests for measles sero epidemiology studies[J]. Arch Virol, 1997, 142(10):1963-1970.
- [4] Lee MS, Cohen B, Hand J, *et al.* A simplified and standardized neutralization enzyme immunoassay for the quantification of measles neutralizing antibody[J]. J Virol Methods, 1999, 78(1-2):209-217.
- [5] Albrecht P, Herrmann K, Burns GR. Role of virus strain in conventional and enhanced measles plaque neutralization test[J]. J Virol Methods, 1981, 3(5):251-260.
- [6] Ward BJ, Aouchiche S, Martel N, *et al.* Measurement of Measles Virus-specific Neutralizing Antibodies: Evaluation of the Syncytium Inhibition Assay in Comparison with the Plaque Reduction Neutralization Test[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 1999, 33(3):147-152.
- [7] Rabenau HF, Marianov B, Wicker S, *et al.* Comparison of the neutralizing and ELISA antibody titres to measles virus in human sera and in gamma globulin preparations[J]. Med Micro and Immun, 2007, 196(3):151-155.
- [8] Chen RT, Markowitz LE, Albrecht P, *et al.* Measles antibody: reevaluation of protective titers[J]. J Infect Dis, 1990, 162(5):1036-1042.
- [9] 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.
- [10] Lee MS, Nokes DJ, Hsu HM, *et al.* Protective Titers of Measles Neutralizing Antibody[J]. J Med Virol, 2000, 62(4):511-517.

## 接种b型流行性感嗜血杆菌结合疫苗致婴儿过敏反应1例报告

曹丽萍

(昌邑市人民医院, 山东 昌邑 261300)

**关键词:** 预防接种; b型流行性感嗜血杆菌结合疫苗; 过敏反应

**中图分类号:** R186 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-916X(2009)03-0218-01

患儿5月龄,男性。2008年5月接种第3剂b型流行性感嗜血杆菌结合疫苗(Haemophilus Influenzae Type b Conjugate Vaccine, Hib;兰州生物制品研究所生产,每瓶0.5ml,含纯化Hib荚膜多糖 $\geq 10\text{mg}$ ),按常规消毒,上臂三角肌肌肉注射0.5ml。约10min后,婴儿面部出现痒感,烦躁,呼吸急促, T 37°C, P 100/min, R 28/min, BP 70/40mmHg (10mmHg=1.33Kpa),急性病容。20min左右,发现婴儿面部有红色散在风团样皮疹,

高出皮肤,胸、腹部呈片状团块,触之发硬。给予10%的葡萄糖100ml,氟美松3mg,10%的葡萄糖酸钙10ml静滴,症状缓解,次日消退。

本疫苗用纯化的Hib荚膜多糖与破伤风类毒素共价结合而成。为无色透明的液体,含防腐剂。适用于3月龄~5岁儿童,对本疫苗成分有过敏反应,特别是对破伤风类毒素有过敏史者禁用。但该患儿已在3、4月龄接种过Hib,无不良反应,此次是第3剂接种。为避免意外,每次接种前应告之,让家长知晓该疫苗有可能发生的不良反应及对策。接种前备好抢救药品,接种后观察30min。家长在接种后观察反应,以防止疫苗反应发生无心理准备。

收稿日期: 2008-12-11;修回日期: 2009-04-15

作者简介: 曹丽萍(1964—),女,山东省昌邑市人,山东昌邑人民医院主管护师,主要从事预防接种工作。