

IgM抗体捕捉ELISA法在麻疹血清学诊断上的优越性

中国预防医学科学院病毒学研究所
中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
中国人民解放军302医院

郭可蹇 宋光运 张礼璧
张荣珍 郑锡茹 武士珍
王凝芳

麻疹疫苗的使用明显降低了麻疹的发病率,但每年仍有相当数量的病人。典型麻疹可以依靠临床症状作诊断,轻型病人就不容易。且麻苗使用后轻型病人增多,需要血清学检测来帮助诊断。本实验室在研究了抗体捕捉ELISA法(ACELISA)的基本条件后,确证了该方法在麻疹IgM抗体测定上的特异性和敏感性^[1]。本文进一步比较了ACELISA法、血凝抑制法(HI)和ELISA法查IgG抗体(ELISA-IgG)在诊断麻疹上的敏感性,显示了ACELISA法的优越性。

材料和方法

一、麻疹患者血清:为1984年至86年临床诊断为麻疹患者的双份血清。来自解放军302医院、华北油田卫生防疫站、北京市东城区及海淀区卫生防疫站,共100对。其中患者有科氏斑者46例,轻型33例。文中“采血之病日”以发热当天起计算。

二、疫苗免疫婴儿双份血清:系8个月易感儿,首次接种麻苗(沪191)前后的双份耳血共51对,用ELISA法同时测定免疫前后的IgG抗体和免后的IgM抗体。

三、HI法:常规微量血凝抑制法。

四、ELISA-IgG法:详见文献^[2]。大致步骤为:1.包被麻疹抗原与对照抗原;2.加入连续稀释的待测血清;3.加马抗人IgG辣根过氧化物酶结合物;4.邻苯二胺-H₂O₂底物显色并终止。抗体滴度以P/N值 ≥ 2.1 的血清最

高稀释度表示。

五、ACELISA-IgM法:详见文献^[1]。大致步骤为:1.包被5 μ g/ml羊抗人IgM μ 链抗体(sigma);2.加1:100与1:400稀释的待测血清各两孔;3.分别加麻疹抗原与对照抗原各1孔;4.麻疹单克隆抗体16单位/100 μ l(1:20,000);5.羊抗鼠IgG辣根过氧化物酶结合物;6.邻苯二胺-H₂O₂底物,显色后终止。以同一血清稀释度麻疹抗原孔OD/对照抗原孔OD ≥ 2.1 者为阳性,对照OD不足0.05者按0.05计算。本文中OD值除另有说明外均以1:100血清的麻疹抗原孔OD表示(对照抗原孔OD校正至0.05)。部分血清连续4倍稀释测定,P/N值 ≥ 2.1 的最高血清稀释度为其IgM抗体滴度。

六、诊断标准:三种方法的双份血清都同时测定,ELISA法双份血清在同一块板上测定。HI法与ELISA-IgG法双份血清抗体滴度相差4倍或以上者(包括升高及降低)诊断为阳性,IgM抗体1:100及1:400 P/N都 ≥ 2.1 时判为阳性,若仅1:100 P/N ≥ 2.1 则需再重复一次,若P/N仍 ≥ 2.1 也判为阳性。

本文中血清抗体滴度都以其倒数表示。

结 果

一、三种方法用于麻疹病人诊断的阳性率:用HI、ELISA-IgG和ACELISA-IgM法测定100对临床诊断为麻疹病人血清,其中8对血清三种方法诊断均为阴性,余下92对血清

表 1

三种血清学方法诊断麻疹的比较

组别	病例数	采血之病日			HI		ELISA-IgG		ACELISA-IgM	
		第一次	第二次	间隔(平均)	确诊数	%	确诊数	%	确诊数	%
1	20	3~11	8~19	3~13(5.7)	14	70	20	100	20(17)②	100 (85)②
2	29	2~12	34~79	27~69(53)	20	68.9	22	75.9	29(27)	100 (93.1)
3	43	1~21	18~59	13~50(34)		ND①	34	79	42(38)	97.7(88)
计	92				34/49	69.4	76/92	82.6	91/92(82/92)	98.9(89.1)

①ND,未做 ②括号内数字为第1份血清的确诊数与百分率。

表 2

三种方法测定麻疹患者双份血清的诊断结果分析

分 类	编 号	姓 名	年 龄	采血之病日		HI		ELISA-IgG		ACELISA-IgM***				
				第 一 次	第 二 次	1	2	1	2	1		2		
										OD	滴度	OD	滴度	
I. HI(+)	1	黄××	25	3	11	<10	80	<100	1600	0.42	6400	0.80	≥25600	
	2	刘 ×	28	10	40	8	64	<400	6400	0.96	25600	0.44	1600	
	ELISA-IgG (+)	3	于××	11	7	15	20	160	400	102400	1.04	25600	1.25	≥25600
		4	鹿××	7	8	13	10	80	1600	25600	0.44	1600	0.78	25600
	ACELISA-IgM(+)	5	范××	13	7	74	≥512	128	102400	25600	0.29	ND*	—**	<100
		6	宋××	13	10	78	≥512	128	409600	102400	0.86	ND	—	<100
		7	刘××	13	3	34	≥512	64	102400	6400	0.50	ND	—	<100
II. HI(-)	8	徐××	16	8	15	80	80	400	6400	0.87	25600	0.72	25600	
	9	周××	6	8	13	160	160	1600	6400	1.02	≥25600	0.91	≥25600	
	ELISA-IgG (+)	10	吕××	26	6	11	10	10	400	1600	0.23	1600	0.33	1600
		11	赵××	25	9	12	40	40	25600	102400	0.87	≥25600	0.96	≥25600
	ACELISA-IgM(+)	12	董××	27	14	19	80	80	1600	6400	0.76	25600	0.99	≥25600
		13	李××	17	3	49	160	80	409600	25600	1.37	≥25600	—	<100
	III. HI(-)	14	苏××	13	8	44	512	512	25600	25600	1.04	ND	0.18	ND
ELISA-IgG (-)		15	宋 ×	6	8	50	128	64	25600	25600	0.23	ND	0.20	ND
		16	段××	20	4	59	256	512	25600	25600	0.22	ND	—	<100
ACELISA-IgM(+)		17	许 ×	19	4	59	256	128	25600	25600	0.29	ND	—	<100
18	库 ×	10	6	60	160	160	102400	102400	0.64	1600	—	<100		
IV. HI(+) IgM(+) IgM(-)	19	郑××	8	1	45	40	160	1600	102400	—	<100	—	<100	
V. HI(-)	20	马 ×	6月	9	13	2	2	100	100	—	<100	—	<100	
	ELISA-IgG (-)	21	刘 ×	6	4	71	2	2	400	400	—	<100	—	<100
		22	刘 ×	6	7	74	<8	<2	<400	<400	—	<100	—	<100
	ACELISA-IgM(-)	23	吴 ×	17	7	40	<2	<2	<400	<400	—	<100	—	<100
		24	马 ×	2	5	45	4	4	1600	1600	—	<100	—	<100
	25	张 ×	6	8	38	16	16	400	400	—	<100	—	<100	
	26	茅××	11	3	34	40	40	6400	6400	—	<100	—	<100	
	27	孙××	13	5	36	ND		6400	6400	—	<100	—	<100	

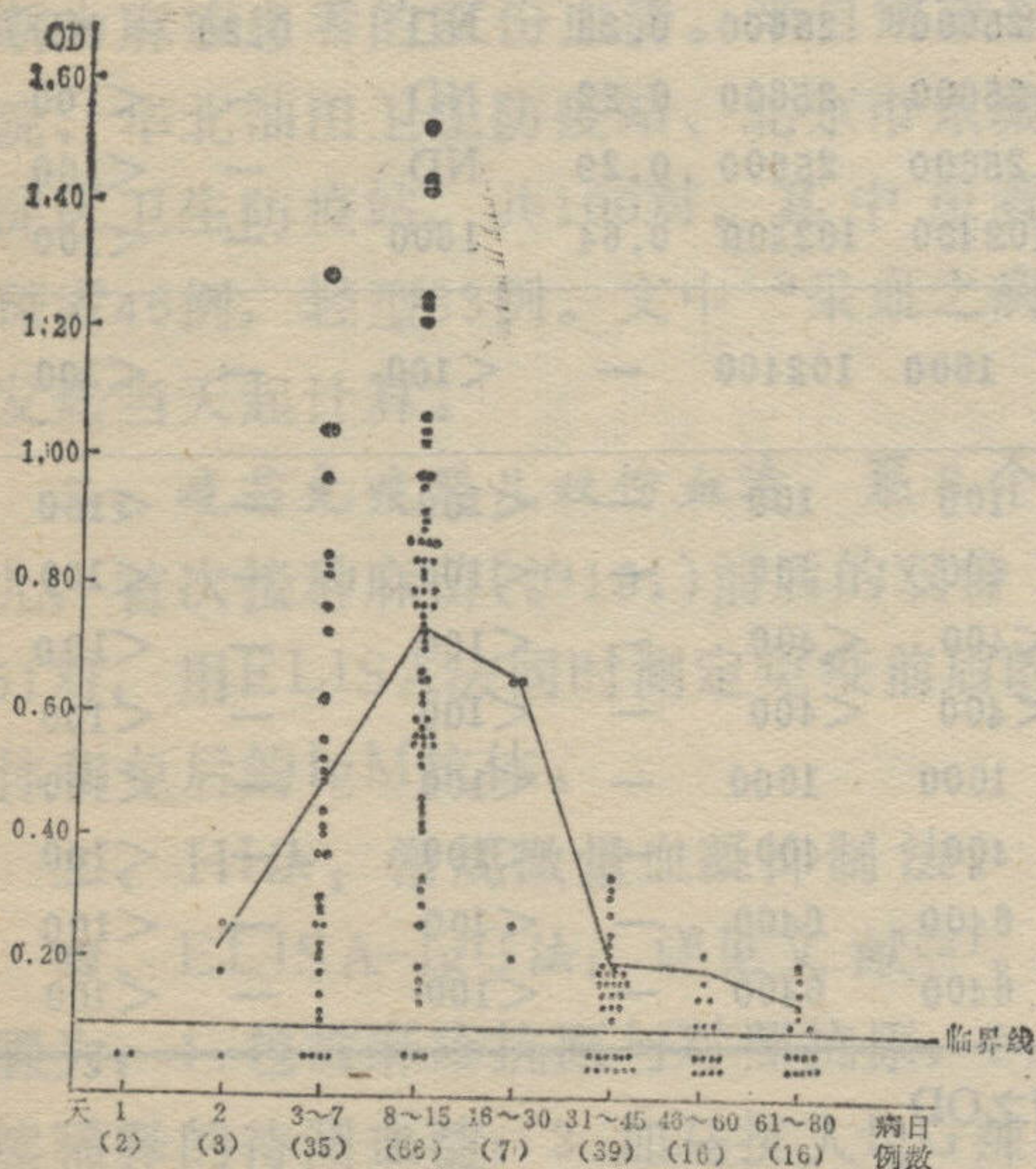
* ND,未做; **血清1:100时P/N<2.1; ***1:400血清之OD

的诊断阳性率AC ELISA-IgM法为98.9%, ELISA-IgG法82.6%, HI法69.4%, HI阳

性者ELISA-IgG都阳性, ELISA-IgG阳性者除一份外, ACELISA-IgM也都阳性, 说

明ACELISA法是最敏感和可靠的(表1)。为了进一步分析这三种方法敏感性不同的原因,选其中有代表性的部分结果列于表2,并在以后加以讨论。

二、IgM抗体的动态分布:对个体做IgM抗体动态观察有一定困难,故将所做184份血清的IgM抗体OD值以病日为横坐标绘于附图中,可大致反映IgM抗体动态的变化,图中可见起病后二天内IgM抗体出现少(2/5);OD值也低(阳性OD均值0.22)。3~7天IgM抗体明显升高,31/35查到(88.6%),OD均值为0.50。8~15天阳性率增至63/66(95.5%),OD均值也达0.72。16~30天IgM抗体开始下降(但本组血清较少),一个月后30.8%已查不到IgM抗体,阳性者OD很多在0.2以下。2个月后仅少数能查到。表明IgM抗体的出现确实反映了近期麻疹的感染,完全可以作为诊断的依据。就个体说每个人IgM抗体出现的时间与所能达到的滴度是不相同的,有少数患者在发病第9天还未查到。一般说90%患者第一份血清就可作出诊断(表1)。其余的在第二份血清也可作出诊断,92例患者中仅1例未测到IgM抗体。



附图 麻疹IgM抗体动态分布

三、初次疫苗免疫的IgM抗体反应:在免

疫反应上自然感染与疫苗免疫有着量和质的一定差别,绝大多数易感儿免疫后IgG抗体阳转,但其滴度较自然感染者低,IgM抗体反应未见报道。本文中51名8月龄易感儿免前IgG抗体除1例为1:100外(ELISA法均<1:100),免后有2名在14天未测出IgG抗体阳转,故未统计于百分率中,表3中可见免后14~29天中IgG抗体阳转者36%可查到IgM抗体,OD较自然感染为低。免后41~48天仅2例(7.4%)IgM抗体阳性,说明弱毒感染后其IgM抗体反应少、低,持续时间也短。

表3 初次疫苗免疫的IgM抗体反应

人数	免后天数	IgG抗体		IgM抗体	
		阳转数	阳性数 %	OD范围*	平均
24	14~29	22	8 36	0.14~0.63	0.31
27	41~48	27	2 7.4	0.15~0.20	0.175

* 血清1:100

讨论

一、抗体捕捉ELISA法是目前国际公认的检测IgM抗体的最敏感方法之一[3], Pederson于1982年报告用于测定麻疹IgM抗体,急性期血清IgM抗体滴度可达1:25600[4]。我国尚无人用于麻疹的诊断。本文的结果再一次证实该方法是一种理想而实用的方法,其优点是:

1.敏感:诊断阳性率高(抗体滴度可达 $\geq 1:25600$),且在病后2~3个月还能测出微量IgM抗体。敏感的原因在于:①方法本身:该法不受IgG抗体干扰,能把很少量IgM抗体捕捉到板上,通过敏感的含酶的检测系统显示出来,因而其诊断阳性率大大高于其他检测IgM抗体的方法。同时其特异性也是有保证的[1]。②本文结果表明,几乎100%麻疹患者包括轻型患者都能产生IgM抗体,尽管抗体出现时间和滴度上有差异。这就使本方法有实用意义,并能获得高的诊断率。本文中100对血清中有9对未查到IgM抗体(见表2第19~27号),但分析起来,表2第19号病例(肯定是麻疹)极可能是第一份血采集太早(1天),而第2份又失之过

晚(45天)。第20~23号病例病后抗体仍极低不可能是麻疹患者。24~27号病例临床上属轻型,不典型,双份血清抗体无任何变化,且都属于正常人的抗体水平,属其他出疹性疾患的可能性很大。③本实验ACELISA法采用自身血清加正常细胞抗原作对照,使判断阳性的标准个体化,避免了用一个值来判断所有血清标本可能导致的假阳性与假阴性结果。

2. 第一份血90%可达到诊断目的。

3. 诊断时间较早,少数病人第一次血清阴性者可在1~2周后采第二次(不要过晚),多数能测出IgM抗体。其他如ACELISA法用血清量少(5 μ l),不需猴血球等也是其优点,用目测也能判定结果。

二、HI法不敏感原因除了受采血时间影响较大外,还可能因为:①HI法与ELISA法所反映的抗体不完全相同;②方法本身不够灵敏;③IgM抗体在血抑中也有一定作用,而减弱了双份血清的对比。

三、有文献报告麻苗免疫后再患病不产生IgM抗体,因而以此来鉴别原发无效免疫与续发无效免疫^[5]。本文结果不支持这种论点,因为从本文结果中98.9%的病例能查到IgM抗体,患者年龄80%以上大于10岁。在实行计划免疫的北京地区不可能不发生续发无效免疫的病例,本文结果中部分患者早期IgG抗体就很高(如表2中7、13号病例),很象再度免疫的抗体反应类型。表明可能是“续发无效免疫”,但这些病例IgM抗体水平仍很高。文献报告IgM(-)可能是作者使用了层析柱提取IgM和以HI法测抗体方法学的敏感性欠佳,加上处理过程中少数IgM的丢失导致部分麻疹患者IgM抗体检测为阴性的结果。

摘 要

本文用ACELISA法、ELISA-IgG法、HI法测定了临床诊断为麻疹的100对患者双份血清,其中8份三种方法都为阴性。余92对血清的三种方法诊断

阳性率分别为ACELISA法98.9%, ELISA-IgG法82.6%, HI法69.4%, 证明ACELISA法是诊断麻疹较好的方法,有敏感、特异、早期、多数仅需单份血清就能诊断等的优点。IgM抗体发病第二天开始出现,病后第2周达到高峰,一个月后明显下降或阴转,故ACELISA法诊断的适宜采血时期为发病第3~25天。

The Advantages of IgM Antibody Capture ELISA for Measles Diagnosis Guo Kejian, et al., Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing, etc.

100 paired sera from measles patients diagnosed by clinics were tested for further confirmation by IgM antibody capture ELISA (ACELISA), IgG-ELISA and HI tests. From them 8 cases showing negative results in their paired sera by all the three tests were considered not to be suffered from measles infection. The other 92 pairs of sera showed indices of recent measles infection by one to three of these tests and the positive diagnostic rates were different by each test, i.e. IgM-ACELISA 98.9%, IgG-ELISA 82.6%, HI 69.4%. The ACELISA was proved to be the best method for measles diagnosis with the advantages of sensitivity, specificity and earlier diagnosis.

Measles IgM antibody starts at the 2nd day of illness and goes to its peak by about the 2nd week. It decreases and begins to convert to negative by one month after onset of the disease. Thus, the optimal blood collecting time for measles diagnosis by ACELISA is considered approximately from the 3rd to the 25th day of illness.

参 考 文 献

1. 郭可睿,等. ELISA“抗体捕捉法”测定病毒特异性IgM抗体的研究. 病毒学报 待发表.
2. 郭可睿,等. ELISA法检测麻疹抗体的优越性. 中华微生物学与免疫学杂志 1986;6:218
3. Meurman O. Detection of Antiviral IgM antibodies and its Problem, A Review in "Current Topics in Microbiology and Immunology" 1982: 104:101~122.
4. Pederson IR, et al. Detection of Measles IgM antibodies by enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) Acta Pathol et Microbiol Scand B 1982; 90:153.
5. Nagy G, et al. The Use of IgM tests for analysis of the Cause of Measles Vaccine failures; Experience gained in an epidemic in Hungary in 1980 and 1981 J Med Virol 1983; 13:93.

(王颖同志参加部分工作,江永珍同志提供酶结合物,朱少云同志及北京市东城区、海淀区卫生防疫站提供部分血清及流行病学资料,特此致谢)