

血清流行病学现场调查免疫酶法 实用价值的研究

吴建民¹ 林修寿¹ 钟性吾¹ 张旭² 陆宗孟¹ 袁庆辉²

提要 我们用免疫酶法对湖南省鼻咽癌高发区及低发区现场人群共计104200名进行了EB病毒VCA-IgA抗体普查, 检出鼻咽癌的灵敏度为88.5%, 特异度99.2%, 现场阳性试验的诊断价值为2.63%, 这比从临床应用免疫酶法诊断鼻咽癌的结果(灵敏度89.2%, 特异度83.3%)来推算现场阳性试验的诊断价值(0.11%)高约24倍, 证明该法直接用于现场普查大规模人群比临床应用具有更大的实用价值和优越性。

关键词 免疫酶法 血清流行病学 现场调查 鼻咽癌

血清流行病学调查方法除要求敏感性和特异性高之外, 还必须具有适用于研究大样本的特点。我们在湖南省鼻咽癌高发及低发地区应用免疫酶法对30岁以上人群共计104200名进行了EB病毒VCA-IgA抗体普查, 现将该法在现场调查大样本实用价值的研究结果报告如下。

材料与方法

一、抗原细胞片的制备: 在有40孔(4行10列)的载玻片上, 将含有EB病毒的B95-8细胞悬液在孔内涂成单层, 用冷丙酮在4℃固定10分钟后保存备用。

二、待检血清: 从被检者耳垂采血, 分离血清, 先取1:5及1:10进行抗体阳性筛选检测, 继之再测定血清抗体水平。

三、免疫酶法: 定性检测每份血清用2孔, 将1:5、1:10各1滴(0.025ml)加在孔内的细胞上, 37℃吸附30分钟后, 用0.01M PBS(pH7.4)洗三次, 再滴加适当浓度的酶标抗体于各孔, 37℃作用30分钟, PBS洗三次, 进行酶标染色(染色液为3,3-二氨基联苯胺和过氧化氢Tris-HCl缓冲液), 将细胞片浸入染色液中显色8~10分钟, 用普通显微镜观

察, 每次试验均设有阳性血清、阴性血清、酶标抗体及PBS等四种对照。

四、结果判断: 在低倍镜下对每孔细胞必须观察至少六个视野有无阳性细胞, 方为有效判断。

1. 定性标准: 凡加有 $\geq 1:5$ 血清的细胞孔, 六个视野的阳性细胞总数在6个以上或其中一个视野有3个以上的阳性细胞, 判为阳性。阳性细胞总数为1~5者, 判为可疑, 进行重测, 未发现阳性细胞者为阴性。

2. 定量标准: 根据阳性细胞数及其着色深浅程度, 分别判以“-”及“+~卅”, 并以“++”的稀释度为该血清的抗体滴度, “+”表示在少数视野看到几个呈浅棕色的阳性细胞, “++”是在2/3以上的视野观察到棕色的阳性细胞, “卅”与“卅”为所有视野的阳性细胞数均在5个以上, 分别呈较深棕色和深棕色。

结 果

一、B95-8细胞中含EB病毒VCA-IgA

1 湖南医学院流行病学教研室

2 湖南省肿瘤医院免疫研究室

抗原的阳性率：取本室制备的B95-8细胞片10张，在低倍镜下，累计60个视野的细胞总数为18780个，再滴加1:10 VCA-IgA阳性血清于细胞片上，用免疫酶法进行检测，同样累计60个视野的阳性细胞总数为1020个，测得本实验的B95-8细胞片含EB病毒VCA-IgA抗

原阳性率为5.4%。

二、载玻片上不同部位细胞孔酶标染色反应敏感性的比较：在60张细胞片的第1、5、9列共计720个细胞孔上，均加1滴1:10 VCA-IgA阳性血清，进行免疫酶染色后，按“-、+~卅”判断结果，详见表1。

表 1 60张B95-8细胞片不同部位免疫酶标反应结果

结果分级	第 1 列					第 5 列					第 9 列					合计 孔数
	-	+	++	卅	卅卅	-	+	++	卅	卅卅	-	+	++	卅	卅卅	
第 1 行	9	13	11	22	5	7	11	7	26	9	6	13	15	15	11	180
第 2 行	7	11	13	13	16	7	12	19	13	9	7	13	12	14	14	180
第 3 行	10	7	13	19	11	7	15	13	17	8	4	11	18	14	13	180
第 4 行	9	13	10	17	11	7	16	15	14	8	8	9	16	17	10	180
小 计	35	44	47	71	43	28	54	54	70	34	25	46	61	60	48	720

根据表 1 结果，用统计学按等级分组资料的秩和检验处理纵列细胞间酶标试验反应程度之比，无显著性差异 ($H=1.23, P>0.50$)，横行细胞之间试验反应的敏感性也无显著性差异 ($H=0.79, P>0.75$)。

三、免疫酶法普查人群VCA-IgA抗体阳性判断标准的选择：取VCA-IgA抗体阳性血清100份，其中效价1:5的30份，1:10的30份，1:20的15份，1:40的15份及 $\geq 1:80$ 的10份，每份血清均取原有效价和1:5两个稀释度，分为两组同时进行免疫酶试验(表2)。

从表 2 我们发现用各血清原有效价的稀释度进行试验所见阳性视野里阳性细胞平均数比较近似，而阴性视野比例则随血清效价增高而减少。当将所有血清均用1:5进行试验时，阳性视野里阳性细胞平均数随血清效价的增高而增大，而阴性视野比例则随效价的增高而下降至0~0.5%。

四、免疫酶法检测EB病毒VCA-IgA抗体用于临床诊断鼻咽癌的灵敏度和特异度：从湖南医学院附属一院和省肿瘤医院取确诊为鼻咽癌患者血清130份，头颈部其他肿瘤患者血清67份，正常人血清160份进行VCA-IgA抗体测定，结果见表3。

表 2 免疫酶法阳性临界滴度的选择与无阳性细胞阴性视野的关系

	1:5	1:10	1:20	1:40	$\geq 1:80$	
血清效价	1:5	1:10	1:20	1:40	$\geq 1:80$	
份数	30	30	15	15	10	
取血清稀 释度	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	
第一 组 试 验	镜检视野 总数	180	180	90	90	60
阳性视野 平均阳性 细胞数	5.2	5.3	5.4	5.1	4.9	
阴性视野 总数	23	20	8	6	4	
阴性视野 比例	12.8%	11.1%	8.9%	6.7%	6.7%	
第二 组 试 验	取血清稀 释度	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
镜检视野 总数	180	180	90	90	60	
阳性视野 平均阳性 细胞数	5.2	11.6	14.6	15.6	16.1	
阴性视野 总数	23	1	0	0	0	
阴性视野 比例	12.8%	0.5%	0	0	0	

表 3 临床应用免疫酶法检测不同对象EB病毒VCA-IgA抗体结果

检测对象	被检 人数	阳性 数	阳性率 (%)	GMT
鼻咽癌患者	130	116	89.2	1:68.9
头颈部其他肿 瘤患者	67	32	47.8	1:10.7
正常人	160	6	3.8	1:7.1

表3显示鼻咽癌患者的VCA-IgA抗体阳性率及GMT均明显高于正常人和头颈部其他肿瘤病人的阳性率和GMT,用于临床诊断鼻咽癌的灵敏度是89.2%,特异度83.3%。

五、现场应用免疫酶法普查鼻咽癌的诊断价值:采集我省鼻咽癌高发区(湘西、湘南)现场人群血清85797份,及低发区(新晃)18403份,共计104200份,其中包括病检确诊为鼻咽癌患者26份。检测结果表明现场应用中检出鼻咽癌的灵敏度为88.5%,特异度99.2%(表4),现场阳性试验的诊断价值为2.63%^[1]。

表4 免疫酶法普查现场人群EB病毒VCA-IgA抗体结果

检测对象	被检人数	阳性数	阳性率(%)	GMT
鼻咽癌病人	26	23	88.5	1:35.3
正常人	104,174	852	0.8	1:11.8

讨 论

一、EB病毒VCA-IgG抗体普遍存在于各种人群的血清中,而VCA-IgA抗体只多见于鼻咽癌患者,对鼻咽癌是特异的^[2,3]。B95-8细胞是一种生产EB病毒的细胞株,其壳抗原(VCA)的阳性率一般为5~10%,我们制备的B95-8细胞片VCA抗原阳性率为5.4%,符合免疫酶法检测VCA-IgA抗体的要求。

二、任何血清学方法用于现场普查时,确定阳性临界滴度及结果判断标准甚为重要,因为这与该方法在实际应用中的灵敏度和特异度密切相关,本研究表明选用1:5作为阳性临界滴度是适宜的,漏检率低,按我们所定的标准来判断结果,玻片上不同部位的细胞孔之间对试验的敏感性比较均衡,经统计学处理无显著性差异,结果可靠。按本室操作技术熟练程度,每人每天可检测10~15张细胞片即200~300份标本(包括对照),所以该法是在现场进行大样本血清抗体检测快速准确的方法。

三、我们将该法用于临床测得鼻咽癌病人

的阳性率及GMT均明显高于正常人和头颈部其他肿瘤患者,这与国内外文献报道相似。根据用于临床诊断鼻咽癌的灵敏度89.2%、特异度83.3%并参考湖南省鼻咽癌高发区患病率约20/10万的调查结果,按耿贯一氏所述普查方法的评价标准,从临床诊断的灵敏度与特异度来推算现场普查104200人的真阳性数为19,假阳性数为17429,阳性总数为17448,推算出阳性试验的诊断鼻咽癌的现场实用价值为0.119。而事实上,我们直接把该法应用于鼻咽癌现场普查时,其阳性试验的诊断价值为2.63%,这比从临床推算出的现场诊断价值高约24倍。因此,我们认为该法在现场普查大样本时要比临床应用于小样本具有更大的实用价值和优越性。尤其鉴于鼻咽癌的现患率很低,在数以万计的人群普查中,如从临床和病理检查入手,则需对全部普查对象进行研究,所需人力物力等工作量之大,花费经费之巨,可以想见,因而是现实的,也是难以办到的,而我们现在首先应用免疫酶法在现场进行普查,筛选出VCA-IgA抗体阳性的875人,再对他们进行临床观察和病理检查,工作量可减少99%(1-875/104200),因此,我们认为这是一个既敏感特异又简便经济值得推广用于血清流行病学现场调查的好方法。

A Study of the Practical Value on the Immunoenzyme Method in the Seroepidemiological Field Survey Wu Jianmin et al., Hunan Medical College

This paper reports the serological survey using immunoenzyme method of EB virus VCA-IgA antibody of a total of 104,200 people in high and low nasopharyngeal carcinoma (NPC) incidence regions in Hunan Province. The sensitivity and specificity of detecting NPC in field survey are 88.5% and 99.2% respectively. The diagnostic value of the field positive test is 2.63%. It is about 24 times higher than the value obtained by presumption from the sensitivity (89.2%) and specificity (83.3%) of this method used in clinical diagnosis of NPC. Therefore the immunoenzyme method directly applied to survey a large size of population in epidemiologi-

cal field is more practically valuable and advantageous as compared with the clinical application.

Key Words Immunoenzyme method Sero-epidemiolog Field survey Nasopharyngeal carcinoma

参 考 文 献

1. 耿贯一主编 《流行病学》上册,人民卫生出版社, 1979: 167~169.
2. Henle G, et al. Epstein-Berr virus specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1976; 17: 1.
3. 刘育希, 等. 应用免疫酶法测定鼻咽癌病人的免疫球蛋白A抗体. *中华肿瘤杂志* 1979, 1: 8.

广东地区丁型肝炎病毒感染的初步调查报告

广州市传染病医院 黄己实 吴婉芬 何世瑤 刘 芹

国内有关丁型肝炎病毒(HDV)感染的文献报道尚不多,一些调查资料证实我国HDV感染确有存在,但其感染率甚低。我们应用固相放射免疫法(SPRIA)检测血清中抗-HD,对广东地区的292例HBsAg阳性血清进行检测,旨在初步了解本地区HDV感染的状况,现将结果报告如下。

一、选择对象: 292例HBsAg阳性血清来自本院1985年4月到1986年3月住院的患者和第一军医大学附属南方医院骆抗先教授赠送的无症状携带者的血清标本。按1984年南宁病毒性肝炎会议的诊断依据划分各临床型。

二、检测方法: 抗-HD采用SPRIA法,试剂盒由ABBOTT公司提供(NO1042, ABBOTT ANTI-DELTA Test Kit)。HBsAg采用ELISA法,试剂盒由上海传染病医院提供。

三、结果: 292例HBsAg阳性的血清标本,其中包括:急性乙肝42例,慢迁乙肝39例,慢活乙肝40例,重型乙肝(急、慢性)10例,甲乙混合型肝炎5例,肝硬化40例,无症状携带者116例,检测抗-HD结果均阴性。

四、讨论:

1977年Rizzetto等报告发现δ抗原抗体系统,此后各国学者对δ抗原及其相关肝炎进行深入地研究,

1984年Rizzetto等建议,将δ因子及其抗原抗体和相关肝炎分别命名为δ肝炎病毒(HDV), δ抗原(HD Ag), δ抗体(抗-HD)和δ肝炎(HD)。流行病学调查HDV感染遍及世界各地,但不同地区存在着很大差异。1984年许健音报告(《中华微生物学和免疫学杂志》1984; 4(2): 127)证实我国确有HDV感染存在,近一年多来国内一些学者初步调查认为我国HDV感染率甚低(第四届全国病毒性肝炎会议(北京), 1985年12月)。据报道上海、河南、河北、长春等地区尚未发现HDV感染的证据,北京、广西的HDV感染率为2%,台湾为8%。此次我们检测广东地区不同临床类型HBV感染者292例血清, HBsAg全部阳性,而抗-HD均阴性,未能发现本地区有HDV感染的证据。广东是HBV感染的高发地区,本文调查结果看来至今HDV感染可能极少。且国内已发现有HDV感染的地区,其感染率也较低,初步资料表明,在我国急性肝炎、慢性肝炎、爆发性肝炎以及无症状携带者的发病及形成方面,HDV感染似乎不起重要作用。然而我国属HBV感染高发地区,一旦HDV输入而引起传播流行,将会导致严重的后果。因此各地区应密切监视HDV传播的可能途径,防止HDV感染进一步扩散,也是目前病毒性肝炎防治工作一个重要内容。