

• 技术方法 •

空斑减少中和试验与血凝抑制试验测定 血清抗麻疹病毒抗体的比较

孔 健 郭绍红 连文远

摘要 为了对比空斑减少中和试验与血凝抑制试验在评价人血清抗麻疹病毒抗体测定结果时的异同,对328名3~6月龄儿童接种沪191麻疹疫苗前后的血清样本用以上两种方法进行了测定。结果表明,在测定免前血清抗麻疹病毒抗体时,空斑减少中和试验比血凝抑制试验灵敏,在测定免后血清抗麻疹病毒抗体时,两种方法测定结果无显著性差异。空斑减少中和试验能测出婴儿血清中存在的极少量的母传抗体,在考核母传抗体对麻疹疫苗免疫效果的影响时,应考虑选用。

关键词 空斑减少中和试验 血凝抑制试验 麻疹疫苗

Comparison between The Plaque Reduction Neutralization Test and the Hemagglutination Inhibition Test in Determination of Human Anti-measles Antibodies Kong Jian, Guo Shao-hong, Ze Wen-yuan. National Vaccine and Serum Institute, Beijing 100024

Abstract In order to evaluate the difference between plaque reduction neutralization test (PNt) and hemagglutination inhibition (HI) test on human anti-measles antibodies, pre-and postimmunization sera collected from 328 infants aged 3-6 months who were immunized with Shanghai 191 measles vaccine, were detected by both methods. The results demonstrated that PNt was more sensitive than HI when they were used to measure the pre-immunization sera. No significant difference was found between these two methods when they were used to measure the post-immunization sera. PNt can be used to test low level maternal anti-measles antibodies in infants, especially for estimating the effect of maternal anti-measles antibodies on the immunogenicity of measles vaccine.

Key words Plaque reduction neutralization test Hemagglutination inhibition test Measles vaccine

空斑减少中和试验,是一种经典的中和抗体滴度的测定方法,其测定抗体的灵敏度远高于血凝抑制试验及补体结合试验,重复性较好,可真实地反映血清抗体中和麻疹病毒的能力,国外对麻疹疫苗的免疫效果进行评价时多采用该试验。我们对3~6月龄婴儿接种沪191麻疹疫苗前后的血清标本,用空斑减少中和试验、血凝抑制试验对血清抗麻疹抗体的含量进行了测定,并对两种方法的

测定结果进行了对比。

材料及方法

一、细胞株及培养基: 试验中所用的Vero细胞为对麻疹病毒敏感的克隆株,代次为35~55代,无支原体污染,用于试验中麻疹病毒列4株的繁殖、病毒空斑形成单位的滴定以及空斑减少中和试验。培养基为含10%小牛血清的199。覆盖物为含5%小牛血清、0.75%羧甲基纤维素钠的199。培养条件为5%CO₂, 37℃。

二、麻疹病毒：空斑减少中和试验用麻疹病毒为列 4 株，用前在 Vero 细胞上传 2 代，病变细胞数达 75%~90% 时停止培养，-30℃ 冻融 2 次，4℃ 10 000r/min 离心 15 分钟，将上清分装于 2ml 小瓶中，-30℃ 冻存。

三、病毒滴度的滴定：采用空斑形成单位法滴定^[1]。用于空斑减少中和试验病毒的滴度不得低于 10 000pfu/ml，用前至少滴定 3 次，误差不大于 10%。

四、标准血清与待检血清：人抗麻疹国际标准血清 66/202,5IU/ml，待测血清为 328 名 3~6 月龄婴儿用沪 191 麻疹疫苗免疫前后的血清。

五、空斑减少中和试验：采用 Vero 细胞空斑减少中和试验法^[2,3]，以麻疹病毒列 4 株为攻击毒株。待测血清起始稀释度为 1:4，连续 4 倍稀释，最高稀释度为 1:1 024。免前、免后血清与人抗麻疹国际标准血清同时测定，按寇氏法计算抑制 50% 空斑形成的血清稀释度，作为空斑减少中和试验滴度。每次试验所设国际标准血清的效价相差不得超过 10%，阴性对照不应有空斑形成，病毒对照空斑数应在 20~35pfu/孔（24 孔板法）。

空斑减少中和试验血清抗体含量的计算：按寇氏法计算抑制 50% 空斑形成的滴度，再与国际标准血清 66/202 的滴度相比，计算出每毫升血清中含抗麻疹抗体的毫国际单位数 (mIU/ml)，按本方法滴定，66/220 的效价为 1/660，由于待检血清的最低稀释度为 1:4，相当于 30mIU/ml [计算方法为：待测血清抗体含量 (mIU/ml) = (5 000/660) ÷ (待测血清的滴度)]，因此我们将血清抗体含量 ≥ 30mIU/ml 定为阳性。

六、血凝抑制试验：按《常见病毒病实验技术》中的方法进行^[4]。66/220 的血凝抑制滴度为 1:64，由于该试验的起始稀释度为 1:2，因此我们将待检血清抗体含量 ≥ 156mIU/ml 定为阳性 [计算方法：待测血清抗体含量 (mIU/ml) = (5 000/64) ÷ (待测血清的滴度)]。

七、统计方法：*t* 检验与配对卡方检验。

结果与讨论

一、两种抗体测定方法用于免前血清抗体麻疹抗体的测定：由于空斑减少中和试验可以检测到 30mIU/ml 的抗麻疹抗体，而血凝抑制试验只能检测到 156mIU/ml 以上含量的抗体，因此，我们以空斑减少中和试验结果为准，来观察血凝抑制试验的灵敏度、特异度及两种试验的一致性，结果见表 1。由此表可以得出血凝抑制试验的灵敏度为 20.8%、特异度为 91.3%，两种方法判定结果的符合率为 55.2%。

表 1 两种方法用于免前抗体测定的结果

| 血凝抑制试验 | 空斑减少中和试验 | | 合计 |
|--------|----------|-----|-----|
| | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 35 | 14 | 49 |
| 阴性 | 133 | 146 | 279 |
| 合计 | 168 | 160 | 328 |

母传抗麻疹抗体均为 IgG 型，其抑制血凝的能力低于 IgM 型抗体。再者也可能由于婴儿体内母传血清抗麻疹抗体的含量低于血凝抑制试验的检测下限 (156mIU/ml)，而又高于空斑减少中和试验检测下限 (30mIU/ml)，因此，结果显示血凝抑制试验的灵敏度仅为 20.8% 这也是很自然的，尽管血凝抑制试验的特异度高达 91.3%，但两种试验方法判定结果的符合率仅为 55.2%。

配对 χ^2 检验表明，两种方法检测结果的差异非常显著 ($\chi^2=96.33$, $P<0.001$)，空斑减少中和试验的阳性检出率高于血凝抑制试验。

二、两种方法用于免后 1 个月血清检测的结果：表 2 为两种方法检测 3~6 月龄婴儿用沪 191 麻疹疫苗免疫后 1 个月血清抗麻疹抗体的结果。由表 2 可计算出血凝抑制试验的灵敏度为 91.5%、特异度为 31.8%，两种方法判定结果的符合率为 87.5%，判定结果

的差异无显著性 ($\chi^2=2.95$, $P>0.05$)。与检测免前血清结果不同的是特异度、灵敏度发生了根本不同的变化, 此时的血清中存在有大量的 IgM 型抗体, 血清抗体含量较免疫前有了大幅度的增长。灵敏度、特异度是否与抗体的类型、抗体的含量有关, 需要在以后的试验中进一步验证。

表 2 两种方法检测免后血清抗麻疹抗体的结果

| 血凝抑制 试 验 | 空斑减少中和试验 | | 合计 |
|-------------|----------|----|-----|
| | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 280 | 15 | 295 |
| 阴性 | 26 | 7 | 33 |
| 合计 | 306 | 22 | 328 |

三、两种方法所测抗体滴度的分布: 见表 3。将以上各组抗体的效价转换为血清抗体含量 (mIU/ml) 后, 计算抗体的平均含量及标准差, 结果见表 4。 t 检验表明, 两种方法对免后血清抗体的测定结果无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 3 空斑减少中和试验及血凝抑制试验
测定血清抗麻疹抗体滴度的分布

| 效价 (倒数) | 空斑减少中和试验 | | 血凝抑制试验 | |
|------------|----------|-----|--------|-----|
| | 免前 | 免后 | 免前 | 免后 |
| <2 | 161 | 22 | 279 | 33 |
| 2~ | 0 | 0 | 31 | 19 |
| 4~ | 22 | 0 | 12 | 68 |
| 8~ | 32 | 2 | 3 | 51 |
| 16~ | 45 | 35 | 3 | 83 |
| 32~ | 43 | 29 | | 57 |
| 64~ | 20 | 61 | | 13 |
| 128~ | 4 | 63 | | 4 |
| 256~ | 1 | 69 | | |
| 512 | | 39 | | |
| 1024~2048 | | 8 | | |
| 合计 | 328 | 328 | 328 | 328 |

通过对以上结果的分析, 不难发现, 空斑减少中和试验的检测下限低于血凝抑制试验, 能检出血清中所含的极少量抗麻疹抗体,

表 4 空斑减少中和试验及血凝抑制试验测定
血清抗麻疹抗体的 GMT (mIU/ml)

| | 免 前 | | 免 后 | |
|-------|--------------|------------|--------------|------------|
| | 空斑减少 中和试验 | 血凝抑制 试验 | 空斑减少 中和试验 | 血凝抑制 试验 |
| GMT | 38.3 | 92.6* | 849.7 | 691.1 |
| SD | 5.6 | 1.6 | 5.2 | 3.2 |
| N | 328 | 328 | 328 | 328 |
| t 值 | | | | 1.845 |

* 免前未测到抗体者, 抗体浓度按 78mIU/ml 计算, 该数据与实际值误差较大, 因此两种方法间未做比较。

在探讨母传抗体对麻疹免疫应答的影响及考查麻疹疫苗的免疫原性时尤为适用。尽管它能对血清中抗麻疹抗体做精确测定, 但操作繁琐, 工作量大, 设备要求条件高, 出结果慢, 因此, 难于在常规血清学检验及疫苗效果考核中推广。血凝抑制试验尽管不如空斑减少中和试验灵敏, 但操作简单, 出结果快, 易于处理大批标本, 是适用于基层卫生防疫单位的首选方法。空斑减少中和试验检测的是血清中和抗体, 血凝抑制试验测定的是血凝抑制抗体, 因此, 两者检测的结果不完全一致也是不难理解的。另外, 我们对部分血清标本也进行了细胞病变法测定中和抗体, 其检测下限为 52mIU/ml, 不如空斑减少中和试验法灵敏。

参 考 文 献

- 1 Mann GF, Allison LMC, Copeland JA, et al. A simplified plaque assay system for measles virus. J Biological Standard, 1980, 8: 219.
- 2 Albrecht P, Herrmann K, Burns GR. Role of virus strain in conventional and enhanced measles plaque neutralization test. J Virol Methods, 1981, 3: 251.
- 3 Markowitz LE, Sepulveda J, Dian-ortega JL, et al. Immunization of six-month-old infants with different doses of Edmonston-Zagreb and Schwartz measles vaccines. N Engl J Med, 1990, 322: 580.
- 4 中国医学科学院流行病学防治研究所编. 常见病毒病实验技术. 北京: 科学出版社, 1978. 246.

(收稿: 1995-11-13 修回: 1995-12-20)