

检测 SARS 患者血清中抗-SARS-CoV IgG 的四种试剂盒比较

刘学恩 李杰 李永华 王玲 李彤 陆海英 王广发 朱万孚
高晓明 王佑春 赵振东 徐小元 庄辉

【摘要】 目的 比较 4 种试剂盒检测 SARS 患者血清中抗-SARS-CoV IgG 的灵敏度和特异度。方法 用 2 种酶联免疫吸附试验(EIA)和 2 种间接免疫荧光法(IFA)试剂盒分别检测 18 例 SARS 患者的 99 份系列血清及 123 份阴性参比血清标本中抗-SARS-CoV IgG。结果 在患者发病第 1 周 4 种试剂盒均未检出抗-SARS-CoV IgG;自发病第 2 周,除 EIA 甲未能检出外,EIA 乙和 2 种 IFA 均从血清中检出抗-SARS-CoV IgG,其阳性率分别为 57.1%(4/7)、57.1%(4/7)和 42.9%(3/7)。4 种试剂盒最早检出时间分别为发病后第 16、12、13 和 9 天。于发病后第 3 周该 4 种试剂盒的检出率分别为 52.6%(10/19)、94.7%(18/19)、78.9%(15/19)和 84.2%(16/19)。但自发病第 4 周后,该 4 种试剂盒的检出率相同。检测 123 份阴性参比血清表明,除 EIA 乙的特异度为 94.9% 外,其余 3 种试剂盒的特异度均为 100%。结论 2 种 IFA 的灵敏度和特异度均较 2 种 EIA 高,2 种国产 EIA 试剂盒质量尚需进一步提高。

【关键词】 严重急性呼吸综合征;SARS 冠状病毒

Comparison among four kits in detection of anti-SARS-CoV IgG in sera of SARS patients LIU Xue-en*, LI Jie, LI Yong-hua, WANG Ling, LI Tong, LU Hai-ying, WANG Guang-fa, ZHU Wan-fu, GAO Xiao-ming, WANG You-chun, ZHAO Zhen-dong, XU Xiao-yuan, ZHUANG Hui. *Department of Microbiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China
Corresponding author: ZHUANG Hui. Email: zhuanghu@publica.bj.cninfo.net

【Abstract】 Objective To compare the sensitivity and specificity of four kits for detection of anti-severe acute respiratory syndrome(SARS)-CoV IgG in sera of SARS patients. **Methods** Anti-SARS-CoV IgG was detected in 99 serial sera from 18 SARS patients and in 123 negative reference sera, using two enzyme linked immunosorbent assays(EIA No. A and No. B) and two indirect immunofluorescence assays(Australian IFA and Euroimmun IFA). **Results** Anti-SARS-CoV IgG was not detected in sera collected from SARS patients at the first week after onset by any of the four kits, however, it was detectable in sera obtained at the second week of illness by EIA No. B, and two IFA, but not by EIA No. A, with the positive rates of 57.1%(4/7), 57.1%(4/7) and 42.9%(3/7), respectively. The anti-SARS-CoV IgG was first determined in sera on the 9th day by Euroimmun IFA, 12th day by EIA No. B, 13th day by Australian IFA, and 16th day by EIA No. A. The positive rates of antibody on the 3rd week after onset were 84.2%(16/19), 94.7%(18/19), 78.9%(15/19) and 52.6%(10/19) respectively. They were identical since the 4th week after the disease onset. Through detection of 123 negative reference sera, the specificity of EIA No. A and two IFA was 100%, with exception of 94.9% for EIA No. B. **Conclusion** The sensitivity and specificity of the two IFAs were relatively higher than that of the two EIAs. The quality of the two homemade EIAs should be improved.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome; Severe acute respiratory syndrome-CoV

严重急性呼吸综合征(SARS)是一种新出现的传染病。目前在临床和研究工作中开展的 SARS 特异性检测方法主要有:细胞培养^[1]、核酸检测(RT-

PCR)^[2]和抗体检测^[3]。抗体检测包括酶联免疫法(EIA)、间接免疫荧光法(IFA)和免疫印迹法(WB)。EIA 和 IFA 操作简便,灵敏度和特异度较高。本研究应用 4 种 EIA 和 IFA 试剂盒对 SARS 患者血清标本以及抗-SARS-冠状病毒(CoV) IgG 阴性参比血清进行检测,以比较该 4 种试剂盒的灵敏度和特异度,现将结果报告如下。

作者单位:100083 北京大学基础医学院病原生物学系(刘学恩、李杰、李永华、王玲、李彤、陆海英、王广发、朱万孚、高晓明、赵振东、徐小元、庄辉);中国药品生物制品检定所(王佑春)

通讯作者 庄辉 Email: zhuanghu@publica.bj.cninfo.net

材料与方 法

1. 血清标本来源 :18 例 SARS 患者的 99 份系列血清于 2003 年 3~5 月采自北京胸科医院 SARS 病房。根据卫生部颁发的《传染性非典型肺炎临床诊断标准(试行)》诊断,并经 2 种 EIA 检测为抗-SARS-CoV IgG 阳性。其中男性 5 例,女性 13 例,年龄为 19~52 岁。采血时间最早为发病后第 7 天,最晚为发病后第 51 天。每例患者连续采血 3~8 次,间隔时间为 1~9 天不等。另有 123 份血清采自非 SARS 人群,经 2 种 IFA 试剂盒和 WB 法确证为抗-SARS-CoV IgG 阴性,作为阴性参比血清。

2. 检测方法 :采用甲生物技术有限公司和乙生物药业有限公司生产的 2 种 EIA 试剂盒,以及澳大利亚维多利亚州立传染病参比实验室和德国欧蒙公司生产的 2 种 IFA 试剂盒,检测血清中抗-SARS-CoV IgG。

甲生物技术有限公司生产的 EIA 是用纯化的 SARS-CoV 裂解液抗原包被微孔板,以辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗人 IgG 酶结合物,建立间接 EIA 法。乙生物药业有限公司生产的 EIA 试剂盒则是用基因重组 SARS-CoV N 和 S 蛋白包被微孔板,以 HRP 标记的基因重组 SARS-CoV N 和 S 蛋白为酶标记物,建立双抗原夹心 EIA 法。澳大利亚维多利亚州立传染病参比实验室及德国欧蒙公司生产的 IFA 抗原片,分别由感染 SARS-CoV 的 Vero 细胞和人淋巴细胞制备而成,待检血清分别为 1:75 和 1:40 稀释。血清与抗原反应后,加入荧光素标记的抗人 IgG(γ 链),37℃ 孵育 30 min 后,在荧光显微镜下,观察荧光图像并判定结果。该 4 种试剂盒均按说明书严格操作并判定结果。

结 果

1. 4 种试剂盒检测 SARS 患者系列血清结果:

表1 4 种试剂盒检测 18 例 SARS 患者 99 份系列血清抗-SARS-CoV IgG 结果

发病后周数	被检血清份数	EIA 甲		EIA 乙		澳大利亚 IFA		欧蒙 IFA	
		阳性份数	阳性率(%)	阳性份数	阳性率(%)	阳性份数	阳性率(%)	阳性份数	阳性率(%)
1	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2	7	0	0.0	4	57.1	4	57.1	3	42.9
3	19	10	52.6	18	94.7	15	78.9	16	84.2
4	18	17	94.4	17	94.4	17	94.4	17	94.4
5	18	18	100.0	18	100.0	18	100.0	18	100.0
≥6	34	34	100.0	34	100.0	34	100.0	34	100.0
合计	99	79	79.8	91	91.9	88	88.9	88	88.9

注 :发病后第 2 周 EIA 甲与 EIA 乙及两种 IFA 比较 χ^2 值分别为 5.60、5.60 和 3.82, P 值均 < 0.05 ; 发病后第 3 周 EIA 甲与 EIA 乙及欧蒙 IFA 比较 χ^2 值分别为 8.69 和 4.38, P 值均 < 0.05 ; 发病 4 周后 4 种试剂盒的检出率差异无统计学意义

由表 1 可见 4 种试剂盒检测 18 例 SARS 患者的 99 份系列血清,在发病第 1 周均未检出抗-SARS-CoV IgG,自发病第 2 周,除 EIA 甲未能检出外, EIA 乙、澳大利亚和欧蒙 IFA 均可从血清中检出抗-SARS-CoV IgG,其阳性率分别为 57.1%(4/7)、57.1%(4/7)和 42.9%(3/7),最早检出时间分别为发病后第 12、13 和 9 天。自发病第 3 周起, EIA 甲也可检出血清中抗-SARS-CoV IgG,首例检出时间为发病第 16 天,其第 3 周的检出率为 52.6%(10/19),略低于其他 3 种试剂(分别为 94.7%、78.9 和 84.2%),但自发病第 4 周后该 4 种试剂盒的检出率相同。

2. 4 种试剂盒检测阴性参比血清结果 :应用 4 种试剂盒分别检测 123 份阴性参比血清,除 EIA 乙检出 5 份阳性外(其假阳性率为 5.1%,特异度为 94.9%),其余 3 种试剂盒检测均为阴性,特异度均为 100%。

讨 论

本研究检测的 18 例 SARS 患者均按卫生部颁发的《传染性非典型肺炎临床诊断标准(试行)》诊断,并经抗-SARS-CoV IgG 抗体检测为阳性,说明均为确诊的 SARS 病例,因而排除了由于混杂有非 SARS 患者所引起的选择偏倚。本研究用 4 种试剂盒检测 18 例 SARS 患者的 99 份系列血清,在发病第 1 周均未检出抗-SARS-CoV IgG,自发病第 2 周,除 EIA 甲未能检出外, EIA 乙、澳大利亚和欧蒙 IFA 均可从血清中检出抗-SARS-CoV IgG,用该 4 种试剂盒检测 123 份抗-SARS-CoV IgG 阴性参比血清表明,除 EIA 乙的特异度为 94.9% 外,其余 3 种试剂盒的特异度均为 100%。

WHO 报告,SARS 患者于发病后 10 天左右血清中可检出抗-SARS-CoV 抗体^[4]。我国国家 SARS 防治紧急科技行动北京组^[5]报道,用 EIA 和 IFA 检测 267 例不同病程的 SARS 患者血清,于发病 4 天

内,抗-SARS-CoV IgG 检出率 EIA 为 20%、IFA 为 30.8%。各家最早检出抗-SARS-CoV IgG 时间不同,可能与确定发病日期的标准及所用试剂不同有关。病原微生物侵入机体后,刺激机体免疫系统产生抗体需要一段时间。同时,由于个体和入侵的病原微生物各异,患者产生抗体的时间也不同,一般 IgM 抗体于发病后 3~7 天产生,IgG 抗体于 7~14 天产生。目前,人感染 SARS-CoV 后的致病机理尚不十分清楚,有必要扩大样本,对 SARS 患者血清抗-SARS-CoV 消长规律作进一步研究。

对上述 4 种试剂盒的灵敏度和特异度综合分析表明 2 种 IFA 的灵敏度和特异度均较高,既能在发病后及早检出抗-SARS-CoV IgG,又可避免假阳性结果,其缺点是观察结果时需用荧光显微镜,并需有经验的技术员判读。EIA 甲的特异度较高,但在检测早期 SARS 患者的血清标本时,灵敏度相对较低。EIA 乙灵敏度虽较高,但其特异度相对较低,仅为

94.9%,假阳性率为 5.1%。该 2 种国产抗-SARS-CoV IgG EIA 质量尚需进一步提高。在临床应用时,最好用 2 种方法同时检测,当结果不一致时,应用 WB 法确证,以提高血清学诊断的准确性。

参 考 文 献

- 1 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 384:1967-1976.
- 2 WHO. PCR primers for SARS developed by WHO network laboratories. <http://www.who.int/entity/csr/sars/primers/2003-04-17/en>
- 3 WHO. Severe acute respiratory syndrome (SARS): Laboratory diagnostic tests. <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003-04-29>
- 4 Update71-status of diagnostic tests, training course in China. 2003-06-02. <http://www.who.int/mediacentre/releases>
- 5 国家 SARS 防治紧急科技行动北京组. 传染性非典型肺炎的血清学诊断研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26:339-342.

(收稿日期:2003-10-29)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

567 例婴幼儿重症肺炎高危因素分析

吕媛 易银沙 邓昶 易尚辉

肺炎是我国儿童死亡的第一位死因。为探讨婴幼儿重症肺炎的主要危险因素,本文采用 logistic 模型对湖南省 13 家县级以上医院收治的重症肺炎患儿开展了前瞻性研究。

1. 资料与方法 病例来源于我省幼儿重症肺炎课题协作组成员医院儿科,自 2000 年 7 月 1 日至 2001 年 6 月 30 日期间因重症肺炎住院、年龄为 1 月龄至 3 岁的 567 例患儿。其中男性 428 例,女性 139 例。临床诊断标准为①新近出现咳嗽、咳痰或原呼吸道疾病加重,并有脓痰,有或无胸痛;②发热;③肺实变体征或湿罗音;④白细胞 $>10 \times 10^9/L$ 或 $<4 \times 10^9/L$,有或无核左移;⑤胸部 X 线:片状、斑片状阴影,或间质改变,有或无胸液。诊断以上 1~4 项中任何 1 项加上第 5

项,并排除其他疾病,即可确诊。将各因子有关资料进行量化赋值,运用 SAS 6.21 软件进行多因素 logistic 回归分析。

2. 结果与分析 用 logistic 模型对各因素进行多因素分析,确定影响婴幼儿重症肺炎转归的主要因素有 9 个,结果见表 1。

调查结果表明,婴幼儿的个体因素(如佝偻病、先天性心脏病、营养不良、贫血等)都较明显地增加了发生重症肺炎的危险性。社会环境因素中母亲的文化程度越低及就诊时间越长,重症肺炎的预后越差。从多因素分析可见,婴幼儿重症肺炎的发生和预后与多种因素有关,儿保工作者应重视儿童的体质状况,尤其是注重改善营养状况,同时还应加强健康教育,提高母亲的文化素质。

表1 婴幼儿重症肺炎转归的多因素 logistic 回归分析

因素	β	S_{β}	Wald 值	P 值	β'	OR 值(95% CI)
年龄	-0.051	0.013	16.730	0.000	-0.2112	0.952(0.9267~0.9737)
就诊时间	1.008	0.438	5.303	0.021	0.2162	2.73(1.162~6.457)
就诊距离	-0.436	0.245	3.158	0.046	-0.1803	0.64(0.400~1.046)
先天性心脏病	1.309	0.410	10.188	0.001	0.2381	3.70(1.657~8.271)
营养不良	0.051	0.013	16.730	0.000	0.2772	1.05(1.027~1.079)
营养支持疗法	-1.791	0.656	7.448	0.006	-1.1777	0.16(0.046~0.604)
器官衰竭数	1.207	0.430	7.889	0.005	0.2130	3.34(1.440~7.762)
母亲文化程度	-0.563	0.206	7.504	0.006	-0.1450	0.56(0.380~0.852)
危重病儿评分	-0.212	0.035	35.978	0.000	-0.5668	0.80(0.754~0.867)