

测定白喉毒素抗体三种试验方法的比较

程明洁[#] 韩晓华[#] 王春永[#] 舒 晴[#] 陈品卿^{*} 沙淑芳^{*} 赵 越^{*} 杨喜文^{*}

测定白喉毒素抗体,体内法主要为皮内锡克氏试验(ST),体外法常用的有免疫扩散法(ID)、反向火箭电泳法(RRIEP)、间接血球凝集试验(IHA)及酶联免疫吸附试验(ELISA)等,目前公认ELISA法敏感性高,特异性强。

本试验选择长春市郊某农场的白喉爆发流行区15~25岁健康男性为观察对象,测定其免疫力,在ST法基础上,再用IHA法及ELISA法测定血清白喉毒素抗体,比较三种试验方法的敏感性。

材料和方法

一、锡克氏试验:采用长春生物制品研究所生产的锡克氏毒素液,用常规方法进行皮内接种,96小时判定结果,当受试侧皮肤局部红晕直径 ≥ 1.0 厘米、对照侧无反应即为阳性。

二、间接血球凝集试验(微量法):

1.材料:

①抗原:精制白喉类毒素1,110Lf/毫升,系长春生物制品研究所产品,批号:793-8。

②标准白喉抗毒素:10单位/毫升,为北京药品生物制品检定所提供,批号:白抗004。

③10%醛化冻干羊血球:长春生物制品研究所提供,批号:81-1。

④被检血清:采自白喉爆发流行区的健康者。

2.方法及步骤:取南京无线电原件厂生产的8×12孔V型塑料板,用已知标准抗毒素与精制白喉类毒素做方阵法滴定,确定标准抗毒素效价和抗原最适稀释浓度。本试验用的抗原稀释度为30Lf/毫升,标准抗毒素效价为1:256。被检血清经56℃30分钟灭活后加50%羊血球吸收,置4℃过夜,除去非特异性凝集物。每份被

检血清稀释两排孔,从2至1024作倍比稀释,第一排为试验孔,第二排为对照孔。用定量滴管向第一排各孔分别加0.5%抗原致敏血球0.025毫升,第二排各孔分别加对照血球0.025毫升,以试验孔出现“++”凝集为判定终点,对照孔全部阴性或凝集效价低于试验孔两孔以上时,方认为结果成立;否则复试。每次试验同时设置抗原对照和血球对照。

被检血清中抗毒素量=被检血清终点稀释度×标准抗毒素终点稀释度所含单位数。

三、酶联免疫吸附试验:

1.材料:

①抗原:同前。

②结合物:羊抗人IgG酶标记抗体,系北京生物制品研究所产品,批号:81-1。

③载体:1×4cm聚苯乙烯塑料管平底带盖,上海塑料九厂生产,批号:790303。

④底物:邻苯二胺,北京化工厂生产。

⑤参考血清:以IHA阳性高效价的多份血清混合为阳性参考血清,阴性多份血清混合为阴性参考血清。

⑥被检血清:同前。

⑦测定仪:721型分光光度计。

2.方法及步骤:

①包被抗原量及被检血清最适稀释倍数的确定:用阳性及阴性参考血清与抗原作方阵式滴定,确定本试验包被抗原浓度为20微克/毫升,被检血清最适稀释度为1:40。

②参考血清标准曲线绘制:阳性及阴性参考血清均从1:40开始至10240二倍法稀释,反应结果用721型分光光度计测光密度OD值,光程

*白求恩医科大学流行病学教研室

•长春市卫生防疫站

为0.5厘米, $\lambda=492\text{nm}$ 。本试验取三次测定结果的均值, 以血清稀释度为横座标, 相对应的OD值为纵座标, 划曲线(图1); 然后用相关回归法确定OD值与血清稀释倍数相对应的标准曲线(图2)。阳性血清最高OD值 ≥ 1.5 , 最低为0.1; 阴性血清最高OD值为0.6, 最低为0.1。因阳性和阴性血清呈明显差别的界限为OD值=0.3处, 故确定OD值 ≥ 0.3 为阳性, 其所对应的血清稀释度为1:2560, 即为一个单位。每份被检血清稀释度为1:40, 效价从标准曲线查出。经测算, 两系数的P值皆 <0.01 。

③抗原包被: 每管加已稀释好的抗原1.0毫升, 放4℃过夜, 然后用pH7.2PBS-吐温20洗涤三次, 两次之间静止3分钟。

④加被检血清1.0毫升, 置室温2小时, 再洗涤三次, 方法同前。

⑤加结合物(1:8,000)1.0毫升, 室温下2小时, 洗涤同前。

⑥加底物液(0.04%)1.0毫升, 室温下30分钟, 加2M硫酸0.015毫升, 如终止反应立即测OD值。

结 果

一、三种试验方法阳性率: 见表1。

表1 三种试验方法的阳性率比较

试验方法	检测人数	阳性人数	阳性率(%)
ST	158	62	39.24
IHA	152	79	51.97
ELISA	137	111	81.02

二、三种试验方法敏感性的比较:

1. 从白喉抗毒素抗体的检出率比较三种方法的敏感性: 表2可见, 以ELISA法检出率最高, 为81.02%; ST法次之(60.58%); IHA法最低(52.55%)。经统计学处理, 差异显著($\chi^2=25.86$, $P<0.01$)。

2. 从试验结果的符合率看敏感性的差异(包括阳性和阴性): 表3可见, 在137例受检者中, 三种方法的试验结果符合者共84例, 符合率为61.3%。其中两种方法符合者有三种情况:

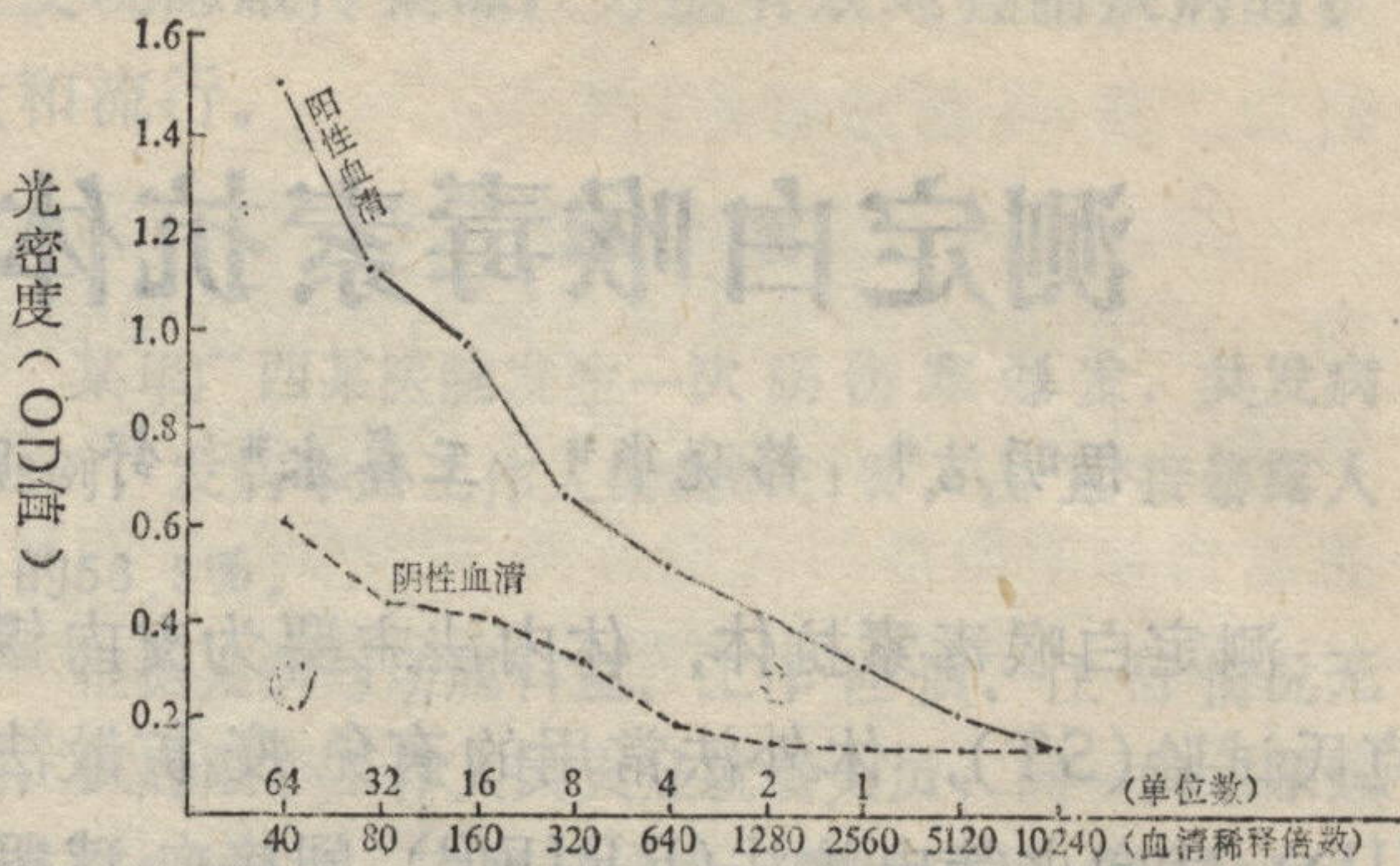


图1 阳性、阴性血清反应曲线

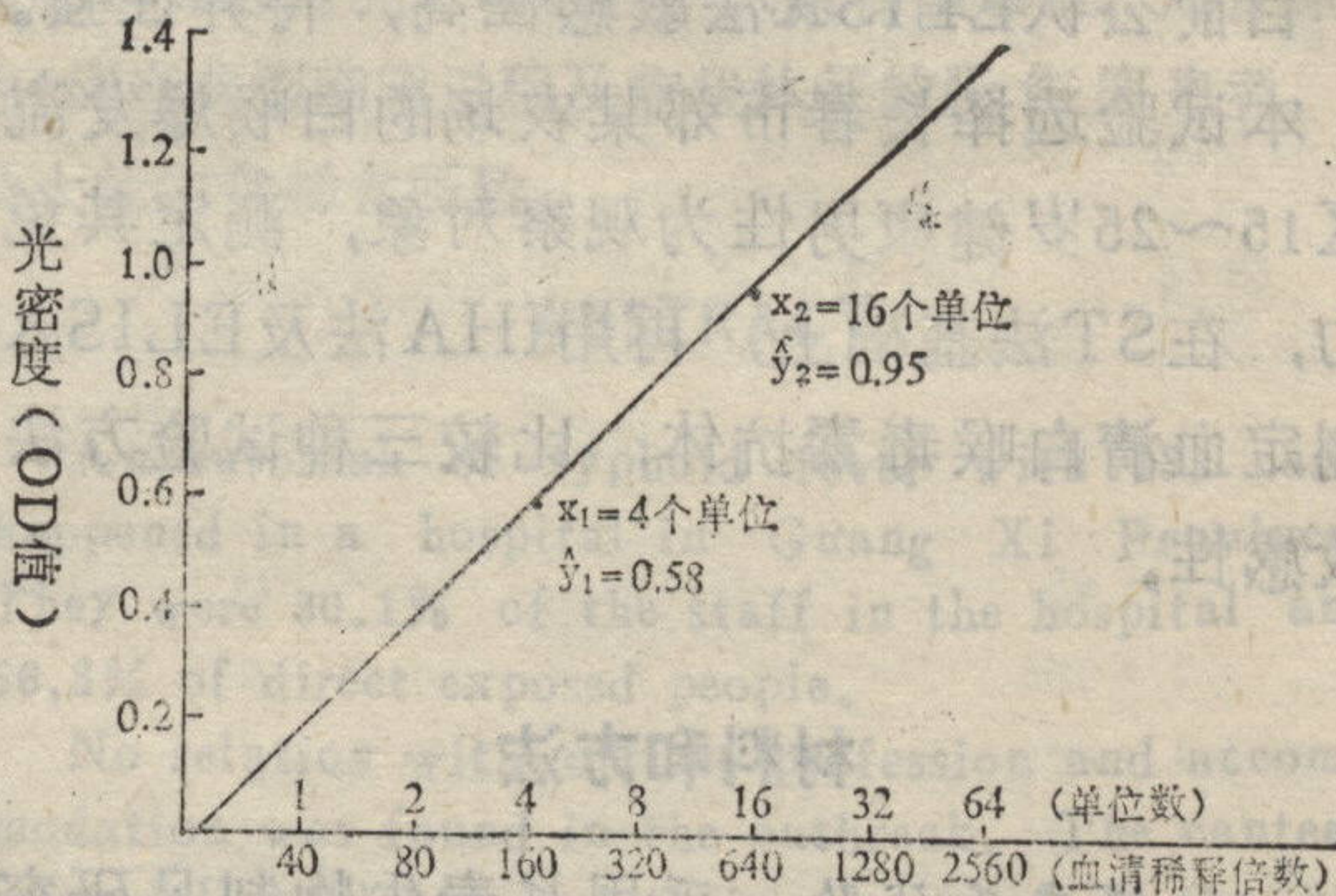


图2 标准曲线

表2 三种方法检测免疫力结果的比较

白喉抗毒	ELISA 法		ST 法		IHA 法	
素抗体	例数	%	例数	%	例数	%
检出	111	81.02	83	60.58	72	52.55
未检出	26	18.98	54	39.42	65	47.45
合计	137	100	137	100	137	100

①ST与ELISA结果相符, 符合率为73.72%; ②ST与IHA结果相符, 符合率为78.73%; ③IHA与ELISA结果相符, 符合率为70.07%。两项结果符合者的三组间无显著差异; 但三项组显著低于两项组符合率($\chi^2=10.04$, $P<0.05$)。

表3 三种方法检测结果的符合率

符合情况	例数	符合率%
三种符合	84	61.3
ST.ELISA 符合	101	73.72
ST.IHA 符合	108	78.83
IHA.ELISA 符合	96	70.07

三、IHA法及ELISA法检测白喉抗毒素抗体水平的比较: IHA法检测152例, 阳性79例, 阳性率为51.97%, 抗体水平效价在1:4~1:128之间, GMT为18.85; 抗毒素单位在0.0157~0.5之间, GMT为0.073。ELISA法检测137例, 阳性111例, 阳性率为81.02%, 抗体水平在1:64~2560之间, GMT为441, 后法较前法敏感23.4倍(表4)。

表4 IHA与ELISA两法检测的抗体水平

方法	检测 例数	阳性 例数	阳性率 (%)	GMT
IHA法	152	79	51.97	18.85
ELISA法	137	111	81.02	441

讨 论

一、用上述三种方法测定白喉抗毒免疫力, 无论是敏感性或抗体水平, 均以ELISA法居首, 三种符合率为61.3%。其中ELISA法阳性率为81.02%, ST和IHA两法分别为60.58%和52.55%。因ST和IHA两方法的敏感性不及ELISA, 导致三者符合率低。

二、本试验中ST和ELISA两法符合率为73.72%低于王惠贤等报告的结果(99.4%), 其原因有待进一步探讨。

三、在白喉抗毒素免疫力的测定中, ST法的敏感性仅次于ELISA法, 但某些人对毒素有过敏反应, 且只能定性, 结果观察时间长, 是其不足之处。ELISA法敏感性高, 并可测定免疫力水平, 方法简便易行, 可在白喉

免疫力水平的监测中推广应用。

四、ELISA法虽敏感、特异, 但有时出现试验误差, 如其中1例经ST及IHA两法检测为阳性, 而ELISA法却为阴性, 可能系操作原因造成。因此, 每份标本的同一稀释度各设两管, 取结果均值为宜。

摘 要

本文介绍了应用ST、IHA、ELISA三种方法对健康成人进行了白喉免疫力的测定。

ST用常规法, IHA采用中国医学科学院1981年制定的白喉抗毒素试验方法, ELISA用间接法。ST阳性率为39.24%, IHA阳性率为51.97%, ELISA阳性率为81.02%。三种方法以ELISA最敏感, 三种试验一致符合率为61.3%。IHA抗体水平在1:4~128之间, GMT=18.85, 抗毒素单位在0.0157~0.5之间, GMT=0.073, ELISA抗体水平在1:64~1:2560之间, GMT=441。IHA与ELISA之间敏感性相差23.37倍。由于ELISA敏感易行, 宜推广应用。

ABSTRACT

ST, IHA and ELISA methods were used in a survey of immunity to diphtheria among healthy adults. ST was adopted using the routine method whereas IHA was used according to the diphtheria antitoxin method formulated by the Chinese Academy of Medical Sciences in 1981. The indirect method of ELISA was used. The results of the three tests were as follows: the rates of positive reaction were 39.24% in ST, 51.97% in IHA and 81.02% in ELISA which was found to be the most responsive of the three methods. The accordant rate of the three tests was 61.3%. The levels of diphtheria antibody observed in healthy adults were as follows: in IHA 1:4-128 with GMT=18.85, ST 0.0157-0.5 with GMT=0.073, and ELISA 1:64-1:2560 with GMT=441. The responsiveness of ELISA was 23.37 times higher than that of IHA.