

文章编号: 1003-4692(2009)05-0467-03

【论著】

双抗原夹心 ELISA 检测鼠疫 F1 抗体技术的应用

刘合智, 张懿晖, 杨晓燕, 王海峰, 杜国义, 胡乐乐, 杨顺林, 董国润

【摘要】 目的 研究双抗原夹心酶联免疫吸附试验(DAgS-ELISA)检测鼠疫 F1 抗体技术在鼠疫监测中的实用性。方法 用 DAgS-ELISA 和间接血球凝集试验(IHA)微量法对比检测 558 份标本鼠疫 F1 抗体。结果 IHA 检测出阳性 33 份, DAgS-ELISA 检出阳性 31 份, 阳性符合率为 90.91%, 阴性符合率 99.81%, 总符合率 99.28%, 二者检出阳性率分别为 5.91% 和 5.56%, 差异无统计学意义($\chi^2=0.25, P=0.625$)。2 种方法测定 27 份鼠疫免疫血清均阳性, IHA 微量法的敏感性高于 DAgS-ELISA($t=3.023, P=0.006$)。结论 DAgS-ELISA 检测鼠疫 F1 抗体敏感性低于 IHA 微量法, 但特异性好, 无前滞反应, 可避免初筛漏检问题。

【关键词】 酶联免疫吸附试验; 鼠疫耶尔森菌; F1 抗原; 抗体

中图分类号: R254.8

文献标识码: A

Application of double antigens sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAgS-ELISA) on the detection of *Yersinia pestis* F1 antibody LIU He-zhi, ZHANG Yi-hui, YANG Xiao-yan, WANG Hai-feng, DU Guo-yi, HU Le-le, YANG Shun-lin, DONG Guo-run. Anti-plague Institute of Hebei Province, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

【Abstract】 Objective To study the practicability of double antigens sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAgS-ELISA) on the detection of *Yersinia pestis* F1 antibodies. **Methods** A total of 558 samples antibodies of anti-F1 antigen were detected by DAgS-ELISA and trace indirect hemagglutination assay (trace-IHA). **Results** Thirty three samples were positive tested by IHA, 31 positive by DAgS-ELISA, the positive accordance rate was 90.91%, 99.81% for negative accordance rate, 99.28% for the total accordance rate. The positive rate detected by IHA and DAgS-ELISA were 5.91% and 5.56% respectively, and no statistics difference was found ($\chi^2=0.25, P=0.625$). About 27 the immuno-serum were positive detected by IHA and DAgS-ELISA methods, and the sensitivity of IHA test were all higher than that of DAgS-ELISA ($t=3.023, P=0.006$). **Conclusion** Sensitivity of DAgS-ELISA is lower than that of trace-IHA, but its specificity is better and no primary inhibitory phenomena, and could exempt from leak detection in the preliminary screening.

【Key words】 Enzyme linked immunosorbent assay; *Yersinia pestis*; Fraction-1 antigen; Antibody

鼠疫是甲类传染病之一, 对鼠疫自然疫源地的主动监测, 及时准确地诊断疫情是发现鼠疫, 制定防控措施

的必要技术保障。目前我国的鼠疫监测技术还是以经典的“四步检验”方法和血清学方法为主。现场监测中鼠疫 F1 抗体的检测主要以间接血球凝集试验(IHA)为主, 多年的应用效果反映, IHA 反应体系存在着一些不可避免的非特异凝集和有明显的前滞反应, 易出现假阳性或初筛漏检问题, 判断阳性材料时必须

基金项目: 河北省医学适用技术跟踪项目(GL200635)

作者单位: 河北省鼠疫防治所检验科(张家口 075000)

作者简介: 刘合智(1964-), 男, 河北宣化人, 副主任医师, 从事鼠疫病原学及流行病学研究。E-mail: hbshfs-liuhezhi_01@163.com

物咬伤后要及时进行正规程序的免疫接种。加强高效狂犬病疫苗的研制, 提高免疫效果。(3)加强健康教育, 普及狂犬病防治知识。狂犬病可防不可治, 被犬伤后应尽快到正规医院进行伤口处理和预防接种是目前预防狂犬病最有效的方法。(4)加强疫情监测, 及时掌握狂犬病发病态势。建立狂犬病监测机制, 及时掌握人间狂犬病疫情和人群暴露情况, 切实做好狂犬病的防控工作。

参考文献

[1] 张永振, 肖东楼, 孙玉辉, 等. 中国 1984—2002 年狂犬病流行情况及防治对策[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 883-886.

[2] 汪垂章, 陆献耀. 狂犬病 6 例发病情况分析[J]. 浙江预防医学, 2008, 20(7): 19-20.

[3] Hatch C, Sneddon J, Jalloh GA. Descriptive study of urban rabies during the civil war in sierra Leone: 1995-2001[J]. Trop Anim Health Prod, 2004, 36(4): 321-334.

[4] 谭明杰, 谢艺红, 莫兆军, 等. 狂犬病潜伏期及影响暴露后狂犬病疫苗接种的多因素分析[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(10): 829-830.

[5] 宋森, 唐青. 中国 2005 年狂犬病流行相关因素分析[J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(11): 956-959.

[6] 伏晓庆, 常利涛. 1995—2006 年云南省狂犬病流行情况及防控对策[J]. 疾病监测, 2007, 22(10): 659-661.

[收稿日期: 2009-04-17]

进行三排复试以减少假阳性^[1]。目前,国际上多数国家已普遍采用 ELISA 等技术作为常规检测技术应用于鼠疫监测中,探索基层适用可行的新技术是我国鼠疫监测发展的重点^[2]。本研究应用双抗原夹心酶联免疫吸附试验(DAgS-ELISA)检测各类血清样本中的鼠疫 F1 抗体,结果表明,该法敏感特异,操作简便,并可避免 IHA 的前滞反应产生的初筛漏检情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料 鼠疫阳性参考血清和鼠疫诊断血清,为中国疾病预防控制中心(CDC)鼠疫布氏菌病基地产品;鼠疫菌 EV 株免疫兔血清 5 份(反复冻融的 2002 年免疫血清 2 份);F1 抗原免疫 Balb/c 小鼠血清 22 份,康保县鼠疫疫源地达乌尔黄鼠(*Spermophilus dauricus*)血清 112 份,长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)血清 16 份,人血清 195 份。非鼠疫疫源地沽源县达乌尔黄鼠血清 121 份,承德市围场县达乌尔黄鼠血清 87 份。共 558 份,均由本所鼠疫室提供。

1.2 仪器及试剂 酶标检测仪为热电(上海)仪器有限公司产品,型号 Multiskan Mk3;酶标试剂及酶标测定板为新疆维吾尔自治区 CDC 提供。鼠疫 F1 抗原为卫生部兰州生物制品研究所产品,批号 720。IHA 试剂为中国 CDC 鼠疫布氏菌病基地生产(2008 年)。

1.3 抗体检测方法 采集分离的血清标本经 56 ℃ 30 min 灭活,用 DAgS-ELISA 和 IHA 微量法平行检测标本中 F1 抗体。

1.3.1 DAgS-ELISA 备检标本首先进行初筛,每份标本做 1 孔,初筛阳性标本进行复检,每份标本倍比稀释做 20 孔。平持反应板并距白色背景 5~10 cm,由板的正上方向下观察反应结果。具体方法及结果判定参考文献^[3]。目测结果后,在 10~15 min 内,置酶标仪双

波长(检测波长 492 nm,参照波长 630 nm)检测,读取吸光度(A)值,A 值大于阴性对照 A 值的 2.1 倍以上为阳性孔。

1.3.2 IHA 微量法 操作方法和结果判定按文献^[4]“附录 E”执行。

1.4 统计学方法 抗体滴度以几何均数 G 表示,2 个均数采用配对设计的 t 检验判断 2 种检测方法敏感性有无统计学意义,用配对计数资料的 χ^2 检验分析 2 种检测方法阳性率差异有无统计学意义。

2 结果

2.1 DAgS-ELISA 和 IHA 微量法检测样本鼠疫 F1 抗体结果 2 种方法对比检测样本 558 份,IHA 微量法检测出阳性 33 份,DAgS-ELISA 检测出阳性 31 份,免疫血清 2 种方法检出阳性结果均为 27 份,敏感度和特异度一致。康保县鼠疫疫源地采集的动物血清和人血清,DAgS-ELISA 检测出阳性 4 份,其中达乌尔黄鼠 1 份(1:4),人血清 3 份(2 份 1:4,1 份 1:8);IHA 微量法共检出阳性 6 份,其中达乌尔黄鼠 2 份(1:4),人血清 4 份(2 份 1:16,1:4 和 1:32 各 1 份)。检出总阳性率 DAgS-ELISA 为 5.56%(31/558),IHA 微量法为 5.91%(33/558)(表 1)。

2.2 鼠疫免疫血清 F1 抗体检测结果 2 种方法测定 27 份鼠疫免疫血清均阳性,DAgS-ELISA 最高检出滴度是 1:2¹⁶,抗体浓度越高外观反应颜色越深,A 值越大,无前滞反应;IHA 微量法最高检出滴度是 1:2¹⁷,抗体浓度高的前几孔有一定的前滞反应,凝集相不典型。阳性血清的滴度分布及结果见表 2。检测结果经配对设计 t 检验比较,IHA 微量法的敏感性高于 DAgS-ELISA ($t=3.023, P=0.006$)。由 95% 可信区间(95% CI)看出,随着敏感性的增高,trace-IHA 的可信区间明

表 1 DAgS-ELISA 和 IHA 微量法检测 558 份标本鼠疫 F1 抗体结果

样本	来源	宿主	数量(份)	DAgS-ELISA		trace-IHA	
				阳性	阴性	阳性	阴性
鼠疫菌免疫血清	本所实验室	家兔	5	5	0	5	0
F1 抗原免疫血清	本所实验室	小白鼠	22	22	0	22	0
血清	康保县	达乌尔黄鼠	112	1	111	2	110
血清	康保县	长爪沙鼠	16	0	16	0	16
血清	康保县	人	195	3	192	4	191
血清	沽源县	达乌尔黄鼠	121	0	121	0	121
血清	围场县	达乌尔黄鼠	87	0	87	0	87
合计			558	31	527	33	525

表 2 DAgS-ELISA 和 IHA 微量法检测 27 份鼠疫免疫血清 F1 抗体结果

方法	F1 抗体滴度分布(1:)													G(1:)	95%CI
	8	32	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16 384	32 768	65 536	131 072		
trace-IHA		1	1	1	1	1	1	6	2	6	4		3	6671.08	2 963.47~15 018.61
DAgS-ELISA	1	1	1			1	5	5	7	4	1	1		3511.27	1 608.66~7 665.02

显增宽,而DAgS-ELISA的可信区间要集中的多,可见敏感性增高必然会使特异性降低。

2.3 DAgS-ELISA和IHA微量法检测结果的相关性分析 在558份血清样本中DAgS-ELISA共检出F1抗体阳性标本31份,IHA微量法共检出阳性33份(表3)。2种检测方法的阳性符合率为90.91%,阴性符合率99.81%,总符合率99.28%(Kappa=0.934)。DAgS-ELISA总的阳性检出率为5.56%,稍低于IHA微量法(5.91%),但二者差异无统计学意义($\chi^2=0.25, P=0.625$)。

表3 DAgS-ELISA和IHA微量法检测标本F1抗体结果比较

DAgS-ELISA	trace-IHA		合计
	阳性	阴性	
阳性	30	1	31
阴性	3	524	527
合计	33	525	558

3 讨论

鼠疫感染的确诊,均以从患者样本中分离到鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)或血清抗体有4倍以上升高为标准,但从恢复期患者的样本中分离到鼠疫菌通常是十分困难的。IHA微量法是鼠疫免疫学检测的重要方法之一,具有敏感性高特异性强的优点,被列为血清学检测的常规方法。但该法因自身反应体系存在一些不可避免的非特异性反应,或者因使用的试剂质量问题而出现血球凝集相不典型,以及难以克服的前滞反应而发生初筛漏检问题,使结果出现偏差甚至错误,给及时准确地诊断疫情、发现鼠疫造成困难。近年来随着酶联免疫技术、胶体金技术、免疫荧光技术的应用使疾病的诊断更加简便快速。快速检测鼠疫F1抗体的抗体捕捉ELISA的建立和应用,给鼠疫血清学检测提供了新的方法,该法简便快速,敏感特异,为鼠疫的追溯诊断和暴发鼠疫的流行病学监测提供了强大的技术保障^[5]。

F1抗体捕获ELISA属于经典的间接ELISA(I-ELISA),是检测鼠疫抗体最常用的检测技术。有报道在检测健康人血清时其特异性可达96.1%,检测有39%的血清样本中含有抗耶尔森菌外膜蛋白抗体的26份疫苗接种者血清中鼠疫F1抗体阳性22份,高于免疫印迹法(20份),纯化F1抗原包被的ELISA反应板检测F1抗体的敏感性和特异性不受其他抗鼠疫菌抗原的抗体影

响^[6]。但I-ELISA特异性差,且检测不同的宿主血清,需要针对不同宿主的免疫球蛋白-酶结合物,使其使用和推广受到很大限制。DAgS-ELISA技术在临床检验中的应用,提高了疾病的特异性诊断能力,减少了假阳性的发生^[7]。

本试验研究DAgS-ELISA检测标本中鼠疫F1抗体,并与敏感性和特异性较高的IHA微量法作为参考标准来评价DAgS-ELISA检测鼠疫F1抗体的效果。DAgS-ELISA与I-ELISA的不同之处是将间接ELISA的酶标二抗换成酶标F1抗原,使反应体系中的每一步反应均是一对一的特异性反应,而提高了检测的特异性。用DAgS-ELISA检测558份血清样本鼠疫F1抗体,总的阳性检出率为5.56%,稍低于IHA微量法(5.91%),相关性比较2种方法差异无统计学意义($P>0.05$),且DAgS-ELISA无前滞反应,有效地避免了初筛漏检的问题,可以作为一种快速检测方法应用于鼠疫监测中。但DAgS-ELISA的敏感性低于IHA微量法,可能由于DAgS-ELISA的反应体系减少了非特异性反应,基本是抗原抗体的特异性反应,虽然敏感性低于IHA,特异性却好于IHA。DAgS-ELISA操作简便快速,其目测法不需要特殊仪器,总反应时间与IHA微量法相同,并且成本较低,易于基层工作人员掌握,同时也是一种可质量控制的方法,易于推广应用。

参考文献

- [1] 于国林,董兴齐,马永康,等.鼠疫诊断的现状、问题及对策[J].中华流行病学杂志,2003,24增刊:12-13.
- [2] 海荣.鼠疫诊断技术在我国的发展及应用前景[J].中国地方病学杂志,2007,26(5):473-474.
- [3] 刘合智,史献明,白雪薇,等.胶体金免疫层析法检测鼠疫F1抗体技术的应用及效果评价[J].中国地方病学杂志,2006,25(6):611-614.
- [4] 中华人民共和国卫生部政策法规司.WS 279-2008 鼠疫诊断标准[S].北京:人民卫生出版社,2008.
- [5] Rasoamanana B, Leroy F, Boissier P, et al. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(5):587-591.
- [6] Neubauer H, Rahalison L, Brooks TJ, et al. Serodiagnosis of human plague by an anti-F1 capsular antigen specific IgG/IgM ELISA and immunoblot [J]. Epidemiol Infect, 2000, 125(3):593-597.
- [7] 王显军,冯开军,李忠,等.双抗原夹心酶联免疫试验检测急性布鲁氏菌病患者抗体真实性观察[J].中国地方病学杂志,2007,26(6):584-585.

[收稿日期:2009-03-20]