

· 论 著 ·

采用快速荧光灶抑制试验对一种狂犬病病毒抗体竞争性 ELISA 检测法的评价*

吕新军¹, 王伟伟², 李云云³, 张国强², 马学军^{1△}

(1. 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所, 北京 102206; 2. 北京天坛生物制品有限公司 100024; 3. 山西医科大学公共卫生学院, 太原 030001)

摘要:目的 以快速荧光灶抑制试验(RFFIT)检测结果为标准, 确定竞争性酶联免疫吸附试验(ELISA)检测人血清样品中狂犬病病毒抗体的能效。方法 对 100 份人血清样品采用 RFFIT 检测狂犬病病毒中和抗体, 采用竞争性 ELISA 检测狂犬病病毒抗体, 分析两种方法检测结果的相关性和一致性。结果 经回归分析, 两方法检测结果之间有线性关系, 回归方程 $\hat{Y}=2.320+0.333X$, 相关系数 $r=0.504$; 经 χ^2 检验, 两种方法阳性检出率差异无统计学意义($\chi^2=3.70, P>0.05$), 两种方法有相关性($\chi^2=16.50, P<0.05$); 经 Scheffé 可信区间法分析, RFFIT 不同检测值范围内 ELISA 阳性检出率之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 本组评价的竞争性 ELISA 与 RFFIT 检测结果之间有相关性, 但一致性较差, 还需要进一步改进。

关键词:酶联免疫吸附测定; 快速荧光灶抑制试验; 相关性; 一致性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)06-0640-02

An evaluation on a competitive ELISA for the test of rabies virus antibody by RFFIT

Lv Xinjun¹, Wang Weiwei², Li Yunyun³, Zhang Guoqiang², Ma Xuejun^{1△}

(1. Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2. Beijing Tiantan Biological Products Limited Company, Beijing 100024, China; 3. Public Health Academy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Objective To determine the efficiency of competitive ELISA on the detection of antibodies against rabies virus in human sera compared with the results of RFFIT as gold standard. Methods 100 human sera are tested by RFFIT for rabies virus neutralizing antibodies and by competitive ELISA for antibodies against rabies virus. The correlation and consistency between the results of ELISA and RFFIT was analyzed by statistic methods. Results By logistic analysis, the results of ELISA and RFFIT were correlated, the equation was $\hat{Y}=2.320+0.333X$, the correlative coefficient(r) was 0.504. By χ^2 test, the difference between the positive rate of ELISA and RFFIT results was not significant($\chi^2=3.70, P>0.05$), the qualitative results between ELISA and RFFIT was related($\chi^2=16.50, P<0.05$). By Scheffé analysis, the difference of positive rates of ELISA results in different range of RFFIT values was not significant. Conclusion The results of ELISA and RFFIT are correlated but with worse consistency. The ELISA should be improved continuously.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay; rapid fluorescent focus inhibition test; correlation; consistency

细胞法是狂犬病病毒中和抗体体外检测标准方法, 包括快速荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)和荧光抗体病毒中和试验(fluorescent antibody virus neutralisation test, FAVN), 它们对设备和技术要求较高, 主要在少数专业狂犬病实验室进行, 应用范围有限^[1]。狂犬病病毒抗体检测的酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)操作简单, 普通实验室即可进行, 容易推广应用^[1]。北京天坛生物制品有限公司采用狂犬病病毒全病毒包被检测板通过竞争性 ELISA 测定狂犬病病毒抗体, 各要素制备较简单, 操作条件较易实现, 本研究采用 RFFIT 对该方法进行评价, 结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 100 份待测人血清样品由北京天坛生物制品有限公司提供, 每份样品平均分为两管, 其中一份由北京天坛生物制品有限公司采用竞争 ELISA 法检测, 另一份由中国疾病预防控制中心病毒预防控制所进行 RFFIT 检测。待测血清样品置 4℃ 冰箱冷藏, 测定前在室温下平衡 30 min, 然后 56℃ 水

浴灭活 30 min, 取出后在室温下平衡 30 min 进行检测。

1.2 竞争 ELISA 法操作程序 按照文献[2]的方法进行 ELISA 检测。采用 CVS-II 和 3aG 株细胞培养上清液等比例混合后包被 96 孔检测板, 竞争性酶标抗体系灭活 CVS-II 毒株免疫兔血清采用生物素-亲和素标记获得, 阳性对照物为狂犬疫苗免疫人血清, 阴性对照物为未接种狂犬疫苗人血清。所用酶标仪为 BIO-RAD Model 680 型。

1.3 RFFIT 法操作程序 按照文献[3]的方法进行 RFFIT 检测。每次检测均设立标准品、弱阳性对照血清、强阳性对照血清、阴性对照血清、CVS-II 病毒对照、正常细胞对照。结果计算按照 Reed&Muench 法进行, 利用 Excel 表格函数功能设计为方便使用的软件。

1.4 统计学处理 采用统一的 Excel 记录样品检测信息, 采用 SPSS 13.0 软件进行检测结果的统计学分析, 包括两种检测方法检测结果的相关性分析、两种方法阳性检出率的比较。

2 结 果

2.1 两种方法的相关性分析 RFFIT 检测结果(以 X 代表)

* 基金项目:十一五科技重大专项——传染病检测技术研究-传染病病原体诊断和组合检测技术(2008ZX10004-002)。△ 通讯作者, E-mail: maxj2004@yahoo. com. cn.

小于 0.5 IU/mL 血清 33 份, 0.5 IU/mL $\leq X < 1.0$ IU/mL 血清 25 份, $X \geq 1.0$ IU/mL 血清 42 份, 其中 1.0 IU/mL $\leq X < 2.0$ IU/mL 血清 16 份, $X \geq 2.0$ IU/mL 血清 26 份。对两种方法检测结果进行相关性分析, 相关系数 $r = 0.504$, $P < 0.01$, 按照 $\alpha = 0.05$ 水准可认为两种方法检测结果之间具有相关关系, 但关联程度不高, 回归方程 $Y = 2.320 + 0.333X$ 。

2.2 两种方法定性结果一致性分析 RFFIT 检测值大于或等于 0.5 IU/mL 可判定为阳性结果, 竞争性 ELISA 检测结果大于或等于 0.5 IU/mL 可判定为阳性结果, 两种方法检测 100 份人血清样品的定性结果一致率为 73%。以 RFFIT 结果为标准, ELISA 法假阴性率为 28.36% (19/67), 假阳性率为 24.24% (8/33), 即阳性符合率为 71.64% (48/67), 阴性符合率为 75.76% (25/33)。经卡方检验两种方法阳性检出率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.70$, $P > 0.05$), 且两种检测方法检测结果之间有相关性 ($\chi^2 = 16.50$, $P < 0.05$)。

2.3 RFFIT 不同检测值范围 ELISA 检测定性结果一致性分析 将 100 份人血清样品 RFFIT 检测值分为 4 层, 分别计数各层 ELISA 检测定性结果, 分析各层间阳性检出率差异, 经 Scheffé 可信区间法分析, 各层 95% 可信区间均包含 0, 故认为各层阳性检出率之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以 RFFIT 结果为标准, $X < 0.5$ IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 24.24% (8/33), 0.5 IU/mL $\leq X < 1.0$ IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 32.00%, 1.0 IU/mL $\leq X < 2.0$ IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 37.50%, $X \geq 2.0$ IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 19.23%。

3 讨论

ELISA 检测在一般实验室就可进行, 操作简单, 单流程数小时即可完成, 适合批量样品检测, 价格低廉, 是适合大范围狂犬病病毒抗体筛查的方法^[4]。ELISA 检测法包被抗原为狂犬病病毒全病毒、糖蛋白/核蛋白抗原, 测定的不仅是狂犬病病毒中和抗体, 也包括一些非中和抗体, 用等价单位 EU/mL 表示^[5]。

已经报道的 ELISA 检测法包括竞争法、双抗夹心法、间接法等, 成功的 ELISA 法检测的灵敏度和特异性均应在 85% 以上^[6-7]。本研究的竞争性 ELISA 与 Clique 和 McElhinney^[2] 报道的竞争性 ELISA 相似, 但后者检测兽用狂犬病疫苗免疫的狗或猫血清中狂犬病病毒中和抗体效价与 FAVN 检测结果相关性很高 ($r = 0.98$), 假阴性率 (2.13%) 和假阳性率 (3.65%) 较低, 适合大量免疫动物血清的筛查; Feysaguet 等^[7] 报道的 PLATELIATM RABIES II ELISA 试剂盒采用狂犬病病毒糖

蛋白包被检测板, 与 RFFIT 检测比较灵敏度为 98.6%, 特异度为 99.4%, 几乎可以替代 RFFIT 进行狂犬病病毒中和抗体检测。

近年来, 国内狂犬病病毒抗体 ELISA 检测试剂盒研发取得了一定进展, 间接法 ELISA 试剂盒在全病毒抗原包被基础上已发展到采用纯化狂犬病病毒糖蛋白作为包被抗原, 同样的技术可以移植到竞争性 ELISA。国内相继开发的一系列人源或鼠源狂犬病病毒中和性单克隆抗体经酶标可尝试用于竞争性 ELISA 检测狂犬病病毒抗体, 由于竞争者为中和性抗体, 检测结果与真实的中和抗体水平可能更接近。下一步拟在包被抗原和竞争抗体方面进行改进, 探索利用基因工程表达狂犬病病毒糖蛋白包被检测板和应用酶标狂犬病病毒中和性单克隆抗体作为竞争抗体, 以期进一步提高该方法的灵敏度和特异度。

参考文献

- [1] 扈荣良. 狂犬病理论与防治[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 227-229.
- [2] Cliquet F, McElhinney LM. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus specific antibodies from vaccinated dogs and cats[J]. J Virol Methods, 2004, 9(117): 1-8.
- [3] World Health Organization. WHO Expert consultation on Rabies, 2004, First Report; WHO technical report series # 931[M]. Geneva, Switzerland; WHO, 2005.
- [4] 孙招金, 薛素强, 刘晓慧, 等. ELISA 与 FAVN 方法检测犬狂犬病抗体的比较[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(3): 204-206.
- [5] Sugiyama M, Yoshiki R, Tatsuno Y, et al. A new competitive enzyme linked immunosorbent assay demonstrates immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 18(6): 727-730.
- [6] 徐葛林. 国内外狂犬病毒实验室检测与诊断技术的研究及进展[J]. 中国计划免疫, 2005, 4(11): 147-150.
- [7] Feysaguet M, Dacheux L, Audry L, et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIATM RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test on human samples from vaccinated and non-vaccinated people[J]. Vaccine, 2007, 20(25): 2244-2251.

(收稿日期: 2010-08-18)

(上接第 639 页)

递的原理, 实验方法(国产 UA 试剂)的检验结果也可具有溯源性, 故可以用国产 UA 试剂替代 Olympus 原装 UA 试剂。

参考文献

- [1] The National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples[S]. Approved Guideline, Second Edition, 2002.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; Approved guideline[S]. NCCLS, 1999.
- [3] 杨昌国, 许叶. 精密度评价和方法学比较中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(1): 47-49.

- [4] 张凤川, 刘松坚, 卿翠莲. NCCLS EP9-A 在仪器评价中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(4): 359-362.
- [5] 张秀明, 郑松柏, 孙蕾, 等. 应用 Westgard 方法评价决定图判断生化检测系统性能的可接受性[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(1): 86-90.
- [6] 国家质量技术监督局. GB/T15481-2000 idt ISO17025:1999. 检测和校准实验室能力的通用要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 1-15.
- [7] 魏昊, 丛玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 72-75.

(收稿日期: 2010-08-12)