

• 论 著 •

血清白喉和破伤风抗体检测方法的建立及应用

谭亚军, 夏德菊, 张华捷, 董国霞, 晁 哲, 田 霖, 侯启明, 马 霄[△]

(中国食品药品检定研究院/卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘 要:目的 建立定量检测抗白喉抗体、抗破伤风抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法。方法 分别用纯化的白喉类毒素、破伤风类毒素作为包被抗原,白喉、破伤风人源血清抗体标准品作为标准品,对供试品和标准品的剂量反应曲线进行拟合,以平行线法建立定量检测抗白喉抗体(Anti-DT)、抗破伤风抗体(Anti-TT)的 ELISA 方法。并进行方法学验证和应用研究。结果 两种定量检测 ELISA 方法的验证结果均符合规定。定量检测 Anti-DT 的 ELISA 方法的定量限为 0.084 mU/mL,回收率为 97.6%,批内变异系数(CV)≤3.40%,批间 CV≤5.05%;检测 Anti-TT 方法的定量限为 0.175 mU/mL,回收率为 97.5%,批内 CV≤2.42%,批间 CV≤5.58%。应用上述两种 ELISA 方法,对白喉破伤风疫苗用于婴儿基础免疫后的免疫原性进行了检测分析和评价。结论 所建立的白喉、破伤风血清抗体 ELISA 检测方法,准确度高,重复性好,适合于一般实验室开展工作,可用于白喉破伤风疫苗免疫接种后的血清学效果评价和白喉破伤风疾病的流行病学研究。

关键词:白喉; 破伤风; 抗体; 酶联免疫吸附试验; 定量检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)16-2237-04

Establishment and application of serum antibodies detection methods of diphtheria and tetanus

TAN Yajun, XIA Deju, ZHANG Huajie, DONG Guoxia, CHAO Zhe, TIAN Lin, HOU Qiming, MA Xiao[△]

(National Institutes for Food and Drug Control/Key Laboratory of Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To establish the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods for the quantitative determination of IgG antibodies against diphtheria (DT) and tetanus (TT). **Methods** Purified diphtheria toxoid and tetanus toxoid were respectively used as the coating antigens, the human-derived serum antibody standard substance of DT and TT served as the standard substance. The dose-response curves of the tested samples and standard substance were fitted. Then the two quantitative ELISA methods for determining the antibody to DT (Anti-DT) and antibody to TT (Anti-TT) were established with the parallel lines method. Then the methodological verification and application study were conducted. **Results** The validation results of the two quantitative ELISA measurement methods were in accordance with the regulations. The quantity limit of ELISA method for quantitative detection of Anti-DT demonstrated to be 0.084 mIU/mL, its average recovery rate was 97.6%. The intra-assay coefficient of variation(CV) and inter-assay CV of this Anti-DT assay were ≤ 3.40% and ≤ 5.05%, respectively. The quantity limit of ELISA method for quantitative detection of Anti-TT demonstrated to be 0.175 mIU/mL, its average recovery rate was 97.5%. The intra-assay CV and inter-assay CV of this Anti-TT assay were ≤ 2.42% and ≤ 5.58%, respectively. These two methods were applied for the immunogenicity evaluation after infantile basic immunization by diphtheria and tetanus vaccines. **Conclusion** The two established quantitative ELISA methods demonstrate high accuracy and good reproducibility, which are suitable for the ordinary laboratory to carry out the work and can be used in the serological effect evaluation after diphtheria and tetanus vaccine immunization and epidemiological study of diphtheria and tetanus disease.

Key words: diphtheria; Tetanus; antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; quantitative determination

白喉是一种急性上呼吸道感染,由革兰阳性白喉棒状杆菌引起,其产生的外毒素在局部和全身可引起大范围膜和器官的损害。人群对白喉普遍易感,以儿童为多。在实施白喉疫苗计划免疫接种前,白喉是引起儿童死亡的一个重要原因。目前许多发展中国家仍然有白喉疾病的流行^[1-2]。破伤风是由革兰阳性破伤风梭状芽孢杆菌感染引起的高致死性疾病。破伤风类毒素疫苗的应用可以有效地预防破伤风疾病的发生。但目前,在大部分发展中国家破伤风仍然是一个主要的公共卫生问题。世界范围内每年死于破伤风的人数约为 100 万,其中约 80% 为新生儿^[1-2]。目前全世界使用的白喉破伤风疫苗均为细菌产生的外毒素白喉毒素和破伤风毒素经精制-甲醛脱毒后制成的类毒素疫苗。类毒素不具有外毒素的毒性,但保留了其免

疫原性,能刺激机体免疫系统产生特异的保护性抗体,通过对人群的广泛接种可有效降低疾病的发病率和病死率。本研究的目的是建立定量检测抗白喉抗体(Anti-DT)和抗破伤风抗体(Anti-TT)的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法,并进行方法学验证,应用于白喉破伤风疫苗临床试验的免疫原性评价,为白喉破伤风疫苗的质量控制和白喉破伤风疾病的流行病学研究等提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 包被抗原白喉类毒素、破伤风类毒素由中国食品药品检定研究院百白破疫苗与毒素室保存;破伤风人源免疫球蛋白国家标准品(批号 001,规格 10 U/支)^[3-4]由中国食品药品检定研究院百白破疫苗与毒素室保存;白喉人源抗体国际

标准品(批号 10/262,规格 2 U/支)^[5]由英国国家生物制品检定所提供;辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 为美国 Life Technologies 公司产品;96 孔酶标板为德国 Greiner 公司产品;底物邻苯二胺(OPD)为美国 Sigma 公司产品,其他试剂为国产分析纯。

1.2 ELISA 检测方法的建立 应用方阵滴定法分别确定白喉和破伤风包被抗原的最佳工作浓度,将包被抗原用 pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释至确定的包被浓度,以 100 μl/孔包被 ELISA 板,4 ℃过夜。然后加入等体积一系列不同稀释浓度的抗体标准品(白喉为 1:100~1:51 200;破伤风为 1:500~1:256 000),用于确定两种抗体检测方法的检测线性范围,以抗体标准品不同稀释度为横坐标(X 值),其相应的吸光度值(Absorbance, Abs)为纵坐标(Y 值),应用 Molecular Devices 酶标仪 Softmax Pro 软件分析进行四参数拟合绘制标准曲线。

1.3 方法学验证

1.3.1 线性 对 1.2 建立的检测 Anti-DT 抗体和 Anti-TT 抗体的 ELISA 方法的标准曲线进行线性范围确认,重复测定 6 次。

1.3.2 定量限 以白喉抗体国际标准品 1:3 200~1:51 200 5 个稀释度的样品作为待测样品,1:200 稀释液作为标准品;破伤风抗体国家标准品 1:16 000~1:25 600 5 个稀释度的样品作为待测样品,1:1 000 稀释液作为标准品,依次加入已包被抗原的酶标板 A 排中,待测样品和标准品同时进行 2 倍系列稀释至第 8 孔,应用已建立的 ELISA 方法,分别测定各样品抗体水平,每个样品重复测定 6 次。计算每个样品测定结果与理论值的偏差,以确定检测方法的定量限。

1.3.3 准确度 采用平行线 ELISA 法测定血清 Anti-DT、Anti-TT 抗体含量是同时测定供试品和标准品的剂量反应曲线,而且两条曲线必须具有平行性,即供试品和标准品的活性成分仅是量的不同而没有质的区别。在方法的准确度验证时首先通过软件计算供试品与标准品的剂量反应曲线的平行性参数是否符合规定,然后进行回收试验。选取低浓度的白喉破伤风临床血清样品,分别添加已知高浓度的 Anti-DT(10 U/mL)和 Anti-TT(2 U/mL)样品,再进行 ELISA 检测,所加已知高浓度样品与低浓度血清样品之间的体积比例为 1:9,根据公式{回收率(%)=[C×(V₀+V)-C₀×V₀]/(V×C_s)×100%}(V:加入高浓度已知物体积;V₀:低浓度血清样品体积;C:低浓度样品加入高浓度已知样品后的检测浓度;C₀:低浓度血清样品的检测浓度;C_s:已知样品的浓度)进行计算。每种抗体检测 10 份样品,最后得出平均回收率。

1.3.4 精密度 选取含 Anti-DT 和 Anti-TT 高和低浓度的样本溶液(Anti-DT 分别为 1 U/mL 和 0.1 U/mL, Anti-TT 分别为 5 U/mL 和 0.5 U/mL),每种抗体检测 10 份样品,重复试验 3 次,计算测定结果的平均值和标准差,得出批内变异系数(CV)和批间 CV,评价方法的精密度。

1.4 应用研究 应用已建立两种定量检测白喉、破伤风血清抗体的 ELISA 方法,对吸附白喉破伤风疫苗用于婴儿基础免疫的免疫原性进行评价。接种前采集血清样品预稀释 20 倍,接种后采集血清样品预稀释 200 倍,超出检测范围的样本,将其加大预稀释倍数再进行检测。对标准品和样品的剂量反应曲线进行四参数方程拟合,根据曲线方程、标准品和样本各自的稀释倍数,计算出样本中相应的抗体含量。

2 结 果

2.1 ELISA 方法标准曲线的建立 应用方阵滴定法确定了 ELISA 方法中两种抗原白喉类毒素和破伤风类毒素的最佳包被工作浓度分别为 5 Lf/mL,并确定了 Anti-DT 和 Anti-TT 两种抗体检测方法的检测线性范围。以抗体标准品 8 个不同稀释度(白喉为 1:200~1:25 600;破伤风为 1:1 000~1:128 000)为横坐标(X),其相应的 Abs 值为纵坐标(Y),应用酶标仪 Softmax Pro 软件对两种 ELISA 方法进行四参数拟合,获得了线性关系良好的标准曲线方程,结果见图 1 和图 2。

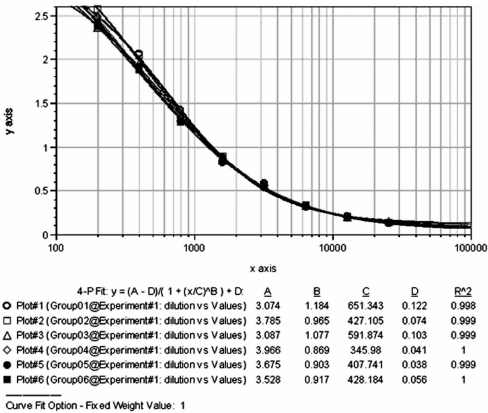


图 1 Anti-DT ELISA 检测方法的标准曲线

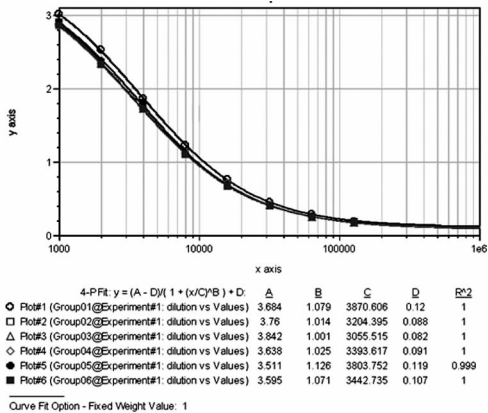


图 2 Anti-TT ELISA 检测方法的标准曲线

2.2 方法学验证

2.2.1 线性 重复 6 次建立标准曲线,标准曲线 $Y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$ 中四个相关参数及相关系数见图 1 和图 2。得到的标准曲线的 R² 值均符合规定,这些结果也证实了白喉和破伤风抗体标准品浓度与相应 Abs 值之间,在检测范围内有良好的线性关系,表明了两种 ELISA 检测方法的可靠性。

2.2.2 定量限 应用上述建立的两种检测抗体的 ELISA 方法,测定不同稀释度的白喉人源抗体国际标准品和破伤风人源抗体国家标准品,根据检测结果与理论值偏差≤20%的最大稀释倍数来确定方法的定量限。当白喉抗体标准品稀释至 1:25 600 时检测偏差为 7.73%,稀释至 1:51 200 时检测偏差>20%,因此检测 Anti-DT 抗体的定量限为 0.084 mU/mL。当破伤风抗体标准品稀释至 1:64 000 时检测偏差为 11.79%,稀释至 1:128 000 时检测偏差>20%,因此检测 Anti-TT 抗体的定量限为 0.156 mU/mL。结果见表 1 和表 2。

2.2.3 准确度 平行性分析证明白喉、破伤风血清供试品和

标准品的剂量反应曲线均具有平行性。回收试验结果显示检测 Anti-DT 和 Anti-TT 两种 ELISA 检测方法的平均回收率分别为 97.6% 和 97.5%, 符合规定。

表 1 Anti-DT ELISA 检测方法的定量限验证结果

稀释倍数	理论值 (mU/mL)	Anti-DT 检测结果(mIU/mL)						检测均值 (mU/mL)	偏差(%)	可接受标准
		1	2	3	4	5	6			
3 200	0.625	0.592	0.644	0.600	0.632	0.521	0.553	0.590	5.55	偏差≤20%
6 400	0.312 5	0.348	0.346	0.351	0.351	0.370	0.351	0.353	12.91	
12 800	0.156 25	0.169	0.151	0.143	0.145	0.156	0.149	0.152	2.61	
25 600	0.078 125	0.085	0.086	0.086	0.086	0.082	0.080	0.084	7.73	
51 200	0.039 063	0.027	0.036	0.030	0.035	0.025	0.028	0.030	22.77	

表 2 Anti-TT ELISA 检测方法的定量限验证结果

稀释倍数	理论值 (mU/mL)	Anti-TT 检测结果(mIU/mL)						检测均值 (mU/mL)	偏差(%)	可接受标准
		1	2	3	4	5	6			
16 000	0.625	0.707	0.679	0.671	0.660	0.633	0.642	0.665	6.45	偏差≤20%
32 000	0.312 5	0.351	0.364	0.372	0.374	0.369	0.336	0.361	15.52	
64 000	0.156 25	0.188	0.179	0.170	0.168	0.188	0.155	0.175	11.79	
128 000	0.078 125	0.135	0.135	0.133	0.131	0.104	0.126	0.127	62.99	
256 000	0.039 063	0.128	0.123	0.123	0.124	0.129	0.126	0.126	221.28	

2.2.4 精密度 试验结果显示, Anti-DT 的 ELISA 检测方法在高浓度时平均批内 CV% 和批间 CV% 分别为 2.03% 和 2.70%, 低浓度时平均批内 CV% 和批间 CV% 分别为 3.40% 和 5.05%; Anti-TT 的 ELISA 检测方法在高浓度时平均批内 CV% 和批间 CV% 分别为 1.54% 和 2.75%, 低浓度时平均批内 CV% 和批间 CV% 分别为 2.42% 和 5.58%, 符合规定。

2.3 应用研究 应用已建立的两 种 ELISA 检测白喉、破伤风抗体方法, 对吸附白喉破伤风疫苗临床试验的免疫前和完成基础免疫后血清样本进行检测分析, 结果显示, 在接种前婴儿血清中白喉、破伤风抗体浓度非常低, 在完成三剂免疫后, 除 2 例受试者的 Anti-DT 未阳转外, 其他受试者均出现白喉、破伤风血清抗体阳转, 两种抗体平均浓度呈显著性增长(见表 3)。

表 3 白喉破伤风疫苗临床试验的血清学检测结果

抗体	检测 人数	免疫前抗体 滴度(U/mL)	免疫后抗体 滴度(U/mL)	阳转率 (%)
Anti-DT	1 101	0.027	1.780	99.820
Anti-TT	1 101	0.037	4.657	100.000

3 讨 论

随着生物技术的进步, 联合疫苗作为一次、多价、高效、覆盖广泛、易于仓储和冷链运输的理想疫苗, 已经成为疫苗发展的重要方向。目前世界上已批准使用的各种联合疫苗达几十种, 其在减少接种针次、简化免疫程序、降低免疫成本、提高疫苗接种覆盖率、减低疫苗的不良 反应方面发挥了重要作用^[1-2]。无细胞百日咳-白喉-破伤风联合疫苗是使用较早的、且应用较好的联合疫苗, 目前国内外疫苗企业以此为基础还开发出很多新的联合疫苗, 如与 b 型流感嗜血杆菌疫苗、脊髓灰质炎灭活疫苗、乙型肝炎疫苗的联合。联合疫苗不是简单的组合疫苗,

随着抗原组成越来越多, 日益复杂, 需要更加提高联合疫苗中每一种疫苗组份的质量要求, 否则可能影响联合疫苗的整体免疫效果。而且对于每种新的联合疫苗必须通过临床试验监测受试人群在接种疫苗后的免疫应答水平和人体接种的反应性, 以此来评估所选择相容性抗原联合和配比的最佳程度, 以及不同疫苗组份的免疫效果是否存在干扰等情况^[6]。因此, 建立特异性强、重复性好的实验室检测方法对于疫苗接种后免疫原性效果评价尤为重要。

本研究通过应用特异性强、纯度高的白喉、破伤风类毒素抗原作为包被抗原, 白喉、破伤风人源血清抗体标准品作为标准品, 同时对供试品和标准品的剂量反应曲线进行拟合, 以平行线法分别建立了定量检测 Anti-DT、Anti-TT 的 ELISA 检测方法。方法学验证以及应用研究结果显示, 这两种 ELISA 方法的准确性较高, 重复性较好, 对于评价包含白喉破伤风组分的联合疫苗的免疫学效果评价提供了重要手段。

在我国一些人群白喉破伤风抗体水平监测分析的研究中^[7-11], 常使用间接血凝法进行检测, 该项技术已十分成熟, 但是它的不足之处也日益明显。在致敏血球的制备环节中, 存在诸多影响因素, 使其批间差异较大; 因样品稀释孔数较多和用肉眼判断凝集终点, 增加了操作误差和结果判断的主观随意性, 重复性和稳定性差^[12]; 现行的血凝法其单位与国际单位不同, 且无法换算, 仅反映了抗体高或低的变化趋势, 不能准确反映抗体水平。这些因素导致难以对不同实验室之间的检测结果进行一致性评价。本研究建立的 ELISA 方法, 通过应用白喉破伤风人源血清抗体标准品, 可以对人群中 Anti-DT、Anti-TT 进行定量检测分析, 其操作简单方便, 结果客观准确, 重复性好, 检测周期短, 能提高不同实验室检测分析结果的一致性, 不仅可用于白喉破伤风疫苗接种效果的血清学评价, 还可用于监测不同年龄组的健康人群及产妇的特异性(下转第 2242 页)

底腺黏膜“血清学活检”的作用,可作为胃癌高危人群的筛查方法^[8]。G17 是一种由消化道 G 细胞分泌的胃肠激素,由胃窦及十二指肠、空肠上段的 G 细胞分泌,在胃癌的发生和发展过程中发挥一定的作用。萎缩性胃炎伴随的高胃泌素状态对胃黏膜癌变有促进作用^[9]。HP 感染是胃癌发生最重要的危险因素。1994 年国际癌症研究机构将 HP 列为胃癌发病的 I 类致癌原。但单独对 HP 进行检测,虽然灵敏度高,但是特异度较低。有研究将血清 PG、G17 与 HP 联合用于胃癌的筛查,发现其可以排除 85% 的胃癌诊断,可作为大规模人群中早期筛查的有效指标^[10]。本研究将胃功能 4 项 PG I、PG II、PG I/PG II、G17 的水平及 HP 阳性率在胃癌、健康人及胃部良性病变患者中的水平进行比较,发现 PG I、PG I/PG II 呈现明显的下降趋势,HP 阳性率有显著上升趋势,差异均有统计学意义($P<0.05$)。有研究证实,将 PG、G17 与 HP 联合检测的特异度要高于单独 PG 检测和单独的 HP 检测,对早期胃癌的诊断具有更高的价值^[11]。G17 随着病情的严重程度呈现上升趋势,在对照组、萎缩性胃炎组、胃癌组,胃溃疡组中差异的有统计学意义($P<0.05$)。但对照组与浅表性胃炎组,胃溃疡组与萎缩性胃炎组,萎缩性胃炎组与胃癌组差异无统计学意义($P>0.05$)。虽然 PG、G17、HP 不能用于胃癌的最后确诊,但对于筛查出的阳性人群进一步行胃镜及病理检查能够减轻患者的痛苦,节省花费,可为大规模人群进行胃癌早期排查提供理论依据。

综上所述,血清胃功能指标检测能较好地区分胃部良性病变与恶性病变,可作为早期筛查的重要指标,其成本低,患者易于接受,对于检测结果阳性者,应进行胃镜下检查,以提高胃癌的早期诊断率。

参考文献

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statis-

(上接第 2239 页)
白喉破伤风抗体水平等流行病学研究,以了解我国个体以及人群的免疫状况,有利于疫苗接种策略的制定。

参考文献

[1] Stanley A, Walter AO, Paul AO. Vaccines[M]. 6 Ed, UK: Elsevier, 2012; 153-166, 746-772, 981-1007.
[2] 赵铠, 章以浩, 李河民. 医学生物制品学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007; 975-1005.
[3] Sesardic D, Wong MY, Gaines Das RE, et al. The first international standard for antitetanus immunoglobulin, human; pharmaceutical evaluation and international collaborative study[J]. Biologicals, 1993, 21(1): 67-75.
[4] 赵建荣, 顾磊, 马霄, 等. 人破伤风免疫球蛋白国家标准品的研制[J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(3): 322-326.
[5] WHO/BS/2012. 2192 Collaborative study for the calibration and commutability assessment of the proposed 1st international standard for diphtheria antitoxin human[S]. 2012.
[6] Dhillon S, Keam SJ. DTaP-IPV/Hib vaccine (Pentacel) [J]. Paediatr Drugs, 2008, 10(6): 405-416.

tics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(1): 69-90.
[2] 中华医学会. 临床诊疗指南——病理学分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
[3] 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见(全国第二届慢性胃炎共识会议 2006 年 9 月 14—16 日, 上海)[J]. 胃肠病学, 2006, 11(11): 674-684.
[4] 唐光定, 江伟河, 黄海深. 胃功能四项在胃部疾病和胃癌早期筛查中的应用研究[J]. 临床医学, 2016, 36(1): 15-17.
[5] 徐巧莲, 万小勇, 杜燕, 等. 血清胃蛋白酶原检测在胃癌筛查中的价值[J]. 胃肠病学, 2012, 17(6): 614-617.
[6] 朱国民, 邱峰. 三种血清胃蛋白酶原检测方法在胃癌筛查中的比较分析[J]. 检验医学, 2012, 27(11): 961-962.
[7] 石贞玉, 厉永强, 吴铭, 等. 血清 PG 检测在胃癌早期筛查及术后监测中的应用[J]. 河南大学学报(医学版), 2014, 33(3): 188-189.
[8] 吕艳丽, 李毅, 刘光顺, 等. 胃癌高发区血清胃蛋白酶原初筛加高危人群胃镜检查方案与直接胃镜筛查方案的效果比较[J]. 中华肿瘤杂志, 2013, 35(5): 394-397.
[9] 李林, 张立新, 艾冬琴, 等. 血清胃蛋白酶原和胃泌素-17 检测在胃癌筛查中的应用[J]. 海南医学, 2015, 26(22): 3335-3337.
[10] 马颖杰, 曹邦伟, 李琴, 等. 胃癌患者及其化疗后胃蛋白酶原与胃泌素变化的临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(3): 186-189.
[11] 官娜, 李金花, 刘冬, 等. 血清 PG 与抗 HpAb 联合检测在胃癌筛查中的应用价值[J]. 中国老年保健医学, 2015, 13(1): 23-25.

(收稿日期: 2017-02-14 修回日期: 2017-04-14)

[7] 戚小华, 凌罗亚, 陈恩富, 等. 吸附无细胞百日咳-白喉-破伤风联合疫苗的安全性及免疫原性研究[J]. 中国疫苗和免疫, 2013, 19(4): 308-311.
[8] 陈秀丽, 徐岷田. 国产吸附无细胞百白破联合疫苗的免疫持久性[J]. 职业与健康, 2009, 25(11): 1121-1123.
[9] 刘跃红, 卢紫燕, 单芙蓉, 等. 深圳市健康人群白喉百日咳破伤风抗体水平监测[J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 15(3): 226-228.
[10] 侯启明, 马霄, 田博, 等. 中国不同区域婴儿抗百日咳白喉破伤风母体抗体水平的调查[J]. 中国计划免疫, 2006, 37(3): 209-211.
[11] 侯启明, 马霄, 张庶民, 等. 百白破联合疫苗基础免疫后不同时间的抗体水平研究[J]. 中国计划免疫, 2004, 18(1): 20-22.
[12] Gentili G, Pini C, Collotti C. The use of an immuno-enzymatic assay for the estimation of tetanus antitoxin in human sera: a comparison with seroneutralization and indirect haemagglutination[J]. J Biol Stand, 1985, 13(1): 53-59.

(收稿日期: 2017-02-02 修回日期: 2017-04-02)