

论著·临床研究

不同 ELISA 系统检测人血清百日咳 IgG 抗体的比较研究*

卫 辰,晁 哲,吴 燕,骆 鹏,王丽婵[△],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 102629)

摘 要:**目的** 使用 A、B、C 3 组酶联免疫吸附试验(ELISA)系统进行百日咳疫苗临床血清检测,每组 ELISA 系统包括至少一种百日咳毒素(PT)、一种丝状血凝素(FHA)和一种黏附素(PRN)包被抗原,其中 C 组抗原包括 2 种 FHA 抗原,酶标二抗是相同的抗人 IgG 抗体。比较不同包被抗原对百日咳疫苗临床血清中 3 种 IgG 抗体检测结果的影响。**方法** 收集 164 对无细胞百日咳、白喉和破伤风疫苗基础免疫前、免疫后临床血清,使用 ELISA 法检测和计算血清百日咳 IgG 抗体的转阳率和单位值。使用 χ^2 检验比较转阳率差异,使用方差分析比较抗体检测结果。**结果** A 组抗原检测 IgG 抗体结果为 PT 82.19 IU/mL, FHA 81.66 IU/mL, PRN 39.34 IU/mL; 转阳率均为 100.0%。B 组抗原检测结果为 PT 95.59 IU/mL, FHA 57.39 IU/mL, PRN 40.76 IU/mL; 转阳率 PT 抗体为 99.4%, 其余为 100.0%。C 组抗原检测结果为 PT 60.74 IU/mL, 2 种 FHA 分别为 29.33 IU/mL 和 53.32 IU/mL, PRN 34.05 IU/mL, 转阳率为 99.4%、95.1%、100.0% 和 98.8%。3 组抗原检测的临床血清转阳率经 χ^2 检验 FHA 差异有统计学意义($P < 0.05$), PT 和 PRN 差异无统计学意义($P > 0.05$); 抗体 GMC 经方差分析,所有组抗原检测 3 个抗体值之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 本次人临床血清抗体转阳率和抗体值达到保护力水平,但是不同抗原检测系统之间差异均有统计学意义,应尽快建立百日咳抗血清 IgG 检测用抗原试剂国家参考品。

关键词:百日咳; 临床血清; 标准抗原; IgG 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.007

中图法分类号:446.6

文章编号:1673-4130(2019)22-2717-05

文献标识码:A

A comparative study of different ELISA systems for detection of IgG antibodies against pertussis in human serum*

WEI Chen, CHAO Zhe, WU Yan, LUO Peng, WANG Lichan[△], MA Xiao[▲]

(National Institutes for Food and Drug Control/Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective The clinical serum of pertussis vaccine was detected by using group A, B and C ELISA systems. Each group of ELISA systems consisted of at least one pertussis toxin (PT), one filamentous hemagglutinin (FHA) and one adhesin (PRN) coated antigen. Group C antigens included two FHA antigens, and the second enzyme labeled antibody was the same anti-human IgG antibody. The purpose of this study was to compare the effects of different coated antigens on the detection of three IgG antibodies in clinical serum of pertussis vaccine. **Methods** Totally 164 pairs of clinical sera of acellular pertussis, diphtheria and tetanus vaccines were collected before and after basic immunization. The positive conversion rate and unit value of serum pertussis IgG antibody were detected and calculated by ELISA. The difference of positive conversion rate was compared by χ^2 test, and the results of antibody detection were compared by variance analysis. **Results** The results of IgG antibody detection by group A antigen were PT 82.19 IU/mL, FHA 81.66 IU/mL, PRN 39.34 IU/mL, and the positive conversion rates were 100.0%. The results of antigen detection in group B were PT 95.59 IU/mL, FHA 57.39 IU/mL, PRN 40.76 IU/mL. The positive conversion rate of PT antibody was 99.4%, and the others were 100.0%. The results of antigen detection in group C were PT 60.74 IU/mL,

* 基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09738-005)。

作者简介:卫辰,男,副研究员,主要从事百日咳疫苗质量控制、临床检测与标准化研究。 [△] 通信作者, E-mail: maxiao421@sina.cn.

[▲] 共同通信作者, E-mail: leechan221@163.com.

本文引用格式:卫辰,晁哲,吴燕,等. 不同 ELISA 系统检测人血清百日咳 IgG 抗体的比较研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22):

FHA 29.33 IU/mL and 53.32 IU/mL, PRN 34.05 IU/mL, respectively. The positive conversion rates were 99.4%, 95.1%, 100.0% and 98.8%. There was significant difference in FHA among the three groups by χ^2 test ($P < 0.05$), there was no significant difference in PT and PRN among the three groups ($P > 0.05$), and there was significant difference among the three antibody values of all groups by variance analysis ($P < 0.05$).

Conclusion The positive conversion rate and antibody value of human clinical serum reached the level of protection, but there were significant differences among different antigen detection systems. The national reference for antigen reagent for pertussis antiserum IgG detection should be established as soon as possible.

Key words: pertussis; clinical serum; standard antigen; IgG antibody

我国和大多数发达国家如美国、欧盟、日本等国都在使用不良反应小的无细胞百日咳、白喉和破伤风联合疫苗(DTaP)。与西方国家使用的将百日咳鲍特氏菌有效抗原分别层析纯化、精确配比的组分无细胞百白破疫苗(DTAcP)不同,占DTaP市场95%的国产疫苗仍然是使用传统的蔗糖密度梯度离心混合提纯,抗原成分复杂且各组分占比不固定的共纯化DTaP。DTAcP各抗原的纯度在95%以上,根据配方不同包括1~5种百日咳鲍特氏菌抗原蛋白^[1-2],而共纯化DTaP要求蛋白总纯度在85%以上,通常只包括百日咳毒素(PT)和丝状血凝素(FHA),偶尔也包括少量黏附素(PRN)和微量的菌毛Fim2/3型。目前我国10多家企业均在研发新纯化工艺的DTAcP和以DTAcP为基础的多联疫苗^[1],众多研发中的DTAcP多联疫苗和已上市产品都需要进行临床试验,检测血清中抗百日咳鲍特氏菌抗原的IgG抗体以判定疫苗有效性。百日咳疫苗临床试验使用酶联免疫吸附试验(ELISA),以WHO百日咳抗血清国际标准品(06/140)和从国际标准品溯源的第1代人源百日咳抗血清国家参考品为标准,对血清样品进行酶标抗体单位值测定,结果由酶标IgG抗体值和转阳率判定。目前,我国临床血清百日咳抗体ELISA试验的检测用抗原并没有国际和国家统一的参考品,以往临床试验多由厂家自己提供临床检测用抗原^[3]。随着临床试验设计更加复杂和完善,可能需要多组对照疫苗。疫苗临床试验不再是2个厂家之间样品免疫效果的比较,而是多个厂家、多个工艺、多种抗原构成的样品之间的比较。ELISA包被抗原的选择可能会影响到临床试验检测结果,进而影响到整个临床试验的成功与否。并且在百日咳疑似病例的临床血清学诊断中,不同来源包被的百日咳抗原也将影响到血清阳性结果的判定,继而影响百日咳疾病的确诊和发病率统计。本研究参考之前有关ELISA系统比较的文献,使用3组不同来源共10个百日咳鲍特氏菌有效组分抗原PT、FHA和PRN对同一组国产共纯化DTaP临床基础免疫血清进行ELISA检测^[4-7],并对结果进行比较研究,也是国内首次对共纯化DTaP的PRN抗体进行检测研究。现报道如下。

1 试剂与方法

1.1 样品 中国食品药品检定研究院保存的共纯化DTaP基础免疫临床血清样本164对,包括免疫前和免疫后血清。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 ELISA包被抗原 国内公司A提供3种液体保存抗原,以A表示:PT(A1-201701)、FHA(A2-201702)、PRN(A3-201703);国际公司B提供3种液体保存抗原,以B表示:PT(B1-200603)、FHA(B2-200401)、PRN(B3-200601);中国食品药品检定研究院提供4种冻干抗原,其中FHA2种抗原,以C表示:PT(C1-200701)、FHA(C2-200702)、FHA(C3-20140524)、PRN(C4-201606001)。

1.2.2 标准血清 WHO百日咳抗血清国际标准品(06/140),每支单位值(PT335 IU, FHA130 IU, PRN65 IU)。

1.2.3 其他主要试剂耗材及仪器 PBS(MP 0218054991);吐温20(MP 103168);酶标山羊抗人IgG结合物(Invitrogen A24524);显色底物OPD(Sigma P9187);96孔酶标板(Greiner, 655080);血清稀释板(Greiner公司);酶标仪(Molecular SPECTRA MAX LPOS)。

1.3 方法 3种抗原均以3 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度用pH 9.6的碳酸盐缓冲液包被酶标板,每孔100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST洗板3次,加入0.5%的BSA稀释液,将预先稀释20倍的免疫后样品血清,以1/20的比例加入酶标板第一行的A1-A11孔中,免疫前血清不稀释直接加入孔中,A12孔中加入200倍稀释的标准血清,酶标板自上而下倍比稀释,37 $^{\circ}\text{C}$,1 h;洗板,加入已稀释好的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$,1 h;再次洗板,加入底物液,室温避光15 min;2 mol/L硫酸终止,在450 nm读取吸光度值。采用酶标仪分析软件,运用四参数法绘制标准曲线,计算每份血清中PT、FHA、PRN的抗体值。免疫前免疫后血清使用全部抗原进行检测。

1.4 统计学处理 以免疫前血清为基准,对3种抗原检测的免疫后血清计算转阳率。阳转标准为PT的IgG抗体 $> 20 \text{ IU/mL}$,FHA的IgG抗体 $> 20 \text{ IU/mL}$,PRN的IgG抗体为免疫后4倍增长;PT及

FHA 免疫后 IgG 抗体未达到 20 IU/mL 的样品若达到免疫后抗体四倍增长也判定为阳转^[3]。对不同抗原包被的抗体检测结果转阳率采用 χ^2 检验。对 3 组免疫后数据抗体几何均值(GMC)采用 SPSS22.0 软件进行统计学分析,用单因素方差分析进行多组差异比较,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水平 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 试验的有效性 10 种抗原包被的酶标板阳性血清稀释度符合四参数方程分析要求, $R^2>0.95$,各个系统试验结果有效。

2.2 人抗百日咳 IgG 抗体测定结果分析

2.2.1 免疫前抗体水平及不同 ELISA 抗原检测的抗体转阳率及保护率比较 基础免疫前血清抗体水平及阳性率极低,不同抗原检测转阳率一致。免疫前

血清 PT 和 FHA 的 IgG 抗体分别有 1 例和 2 例阳性,阳性率 PT 为 0.6%,FHA 为 1.2%,PRN 为 0.0%。在免疫后的 164 份血清中,PT 抗体用 A1 检测为 100.0%阳性,用 B1 和 C1 检测均有 1 例未达到 20 IU/mL 且没达到 4 倍增长,转阳率为 99.4%;FHA 抗体用 A2、B2、C3 检测为 100.0%阳性,用 C2 检测有 8 例未达到 20 IU/mL 且没达到 4 倍增长,转阳率为 95.1%;PRN 抗体 A3 和 B3 检测为 100.0%阳性,用 C4 检测有 2 例未达到 4 倍增长,转阳率为 98.78%。对转阳率做 χ^2 检验,PT 和 PRN 的转阳率差异无统计学意义($\chi^2=1.004, P=0.605; \chi^2=4.016, P=0.134$)。FHA 的转阳率经 χ^2 检验,FHA 抗体转阳率差异有统计学意义($\chi^2=24.296, P=0.000$)。见表 1。

表 1 不同 ELISA 体系检测转阳率比较

	免疫前 PT			免疫后 PT			免疫前 FHA		
	总数(<i>n</i>)	阳性(<i>n</i>)	阳性比例(%)	总数(<i>n</i>)	阳性(<i>n</i>)	阳性比例(%)	总数(<i>n</i>)	阳性(<i>n</i>)	阳性比例(%)
A	164	1	0.6	164	164	100.0	164	2	1.2
B	164	1	0.6	164	163	99.4	164	2	1.2
C	164	1	0.6	164	163	99.4	164	2	1.2
C*							164	2	1.2

注: * 表示有 C2 和 C3 2 个 FHA 抗原,C3 抗原的 FHA 抗体检测结果单独列出

续表 1 不同 ELISA 体系检测转阳率比较

	免疫后 FHA			免疫前 PRN			免疫后 PRN		
	总数(<i>n</i>)	阳性(<i>n</i>)	阳性比例(%)	总数(<i>n</i>)	阳性(<i>n</i>)	阳性比例(%)	总数(<i>n</i>)	阳性(<i>n</i>)	阳性比例(%)
A	164	164	100.0	164	0	0.0	164	164	100.0
B	164	164	100.0	164	0	0.0	164	164	100.0
C	164	156	95.1	164	0	0.0	164	162	98.8
C*	164	164	100.0						

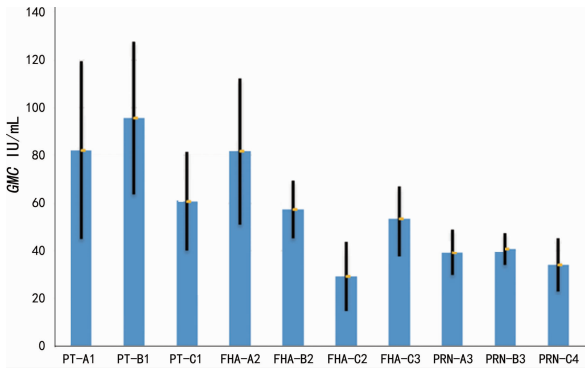


图 1 不同 ELISA 检测体系 GMC 及置信区间

2.2.2 不同抗原检测的抗体 GMC 水平及相关性分析 免疫前血清 PT、FHA、PRN 的 GMC 分别为 2.52 IU/mL、2.09 IU/mL 和 1.17 IU/mL。免疫后

血清 PT 抗体检测结果为 A1(82.19 IU/mL)、B1(95.59 IU/mL)和 C1(60.74 IU/mL)。免疫后血清 FHA 抗体检测结果为 A2(81.66 IU/mL)、B2(57.39 IU/mL)、C2(29.33 IU/mL)和 C3(53.32 IU/mL)。免疫后血清 PRN 抗体检测结果为 A3(39.34 IU/mL)、B3(40.76 IU/mL)和 C4(34.05 IU/mL),见图 1。对免疫后血清 PT、FHA 和 PRN 结果分别进行方差分析。3 组 PT 抗体检测结果之间差异有统计学意义($F=65.09, P<0.05$),事后 LSD-*t* 检验两两结果之间差异有统计学意义($P<0.05$)。4 组 FHA 抗体检测结果之间差异有统计学意义($F=218.49, P<0.05$),事后 LSD-*t* 检验 B2 和 C3 结果差异无统计学意义($P>0.05$),其余两两结果之间差异有统计学意义($P<0.05$)。3 组 PRN 抗体检测结果之间差

异有统计学意义($F=21.28, P<0.05$), 事后 LSD- t 检验 A3 和 B3 结果差异无统计学意义($P>0.05$), 其余两两结果之间差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

国内共纯化 DTaP 疫苗生产均使用来源于中国食品药品检定研究院的百日咳 CS 株, 国外 DTacP 疫苗生产使用百日咳 Tohoma 株, 2 种百日咳菌基因序列有一定区别^[8]。公司 A 和中国食品药品检定研究院的 ELISA 检测用百日咳抗原均由 CS 株发酵后层析纯化得到, 公司 B ELISA 检测用抗原由 Tohoma 株发酵后层析纯化得到。菌株、发酵条件、纯化工艺的不同意味着抗原结构可能有所不同。共纯化工艺中百日咳鲍特氏菌抗原混合脱毒, 会导致不同抗原蛋白在戊二醛作用下互相交联形成复杂结构, 其抗原表位与 DTacP 生产工艺中分别纯化脱毒的组分抗原的表位有着较大区别。抗原结构、抗原含量和佐剂含量的区别通常会导致共纯化百日咳疫苗临床血清与未经脱毒处理的纯化抗原结合, 通常会弱于 DTacP 临床血清。本次临床血清检测使用的包被抗原中, A 公司抗原为 2017 年新制备的液体保存抗原; B 公司为 2004—2006 年制备的液体保存抗原; 中国食品药品检定研究院 PT-C1 和 FHA-C2 均为 2007 年制备的冻干保存抗原, 由于剩余量不足, FHA 试剂已更换为 2014 年制备 C3 冻干抗原, PRN-C4 为 2016 年制备的冻干抗原。使用中国食品药品检定研究院 2 种 FHA 试剂抗原检测临床血清结果和转阳率有显著性差异, 表明 FHA-C2 与其他 FHA 抗原结构有较大区别, 分析原因可能是我国 10 年间的纯化工艺改变导致 FHA 的结构发生了一定变化, 对抗原抗体结合有一定影响。3 组抗原在检测 PT、FHA 和 PRN 3 种抗体 GMC 之间差异有统计学意义。本研究结果说明同样的临床血清, 同样的试验方法, 同样的酶标二抗和显色底物的前提下, 不同来源的 PT、FHA、PRN 抗原检测的 IgG 抗体 GMC 结果有显著性差异。因此, 不同来源的百日咳抗原检测的人百日咳血清 IgG 抗体结果不具备直接可比性, 转阳率略有差别, 各个公司产品用本公司 ELISA 检测系统会得到更高的抗体结果和转阳率。为了使不同公司产品临床检测血清的检测结果更加客观、公平、公正和具有可比性, 应统一推广使用中国食品药品检定研究院的 C 组 ELISA 系统进行检测。

2007 年以来已发表的 DTaP 临床研究文献表明, 以往采用 ELISA 方法检测不同公司在国内的临床血清样本时, 国内公司通常使用中国食品药品检定研究院统一的包被抗原的试剂, 而国外公司则使用本公司包被抗原^[9-14]。共纯化 DTaP 只检测 PT 和 FHA 抗体, 故未有 PRN 抗体相关的报道, PT 抗体为 33~97

IU/mL, FHA 抗体为 25~59 IU/mL。本研究结果显示 PRN 抗体为 34.05 IU/mL, 该结果可以对未来我国 DTacP 的临床试验提供参考数据。与国外公司 DTacP 临床结果相比, 共纯化百日咳疫苗 FHA 抗体普遍存在较大差距, 提示国内 DTacP 研发企业对此需要足够关注。

我国有 10 余家公司在研发 DTacP 和以此为基础的多联疫苗, 已有 5 家公司取得临床批件。除了临床试验以外, 基层医院和疾病预防控制中心部门都急需人百日咳血清抗体的检测以协助临床确诊病例。随着主动监测向县一级疾病预防控制中心部门的扩大, 需要统一的百日咳组分标准抗原, 配合我国已制备的人源百日咳抗血清国家参考品^[15-16]。

4 结 论

建立标准化的人百日咳血清 IgG 抗体检测 ELISA 体系, 将使我国临床试验和疾病监测结果更具有真实性和可比性, 使百日咳血清诊断更加科学和规范。

参考文献

- [1] 卫辰, 王丽婵, 晁哲, 等. 2012—2016 年组分百日咳疫苗质量趋势分析及评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(3): 225-229.
- [2] 李玉峰, 尹遵栋, 李艺星, 等. 百日咳疫苗保护效果及持久性的研究进展[J]. 中国疫苗和免疫, 2017, 23(2): 230-234.
- [3] 侯启明, 马霄, 张庶民, 等. 3 组分的无细胞百白破联合疫苗安全性和免疫原性研究[J]. 中国计划免疫, 2003, 9(1): 3-5.
- [4] 李娟, 李红, 崔晓雨, 等. 人乳头瘤病毒疫苗临床血清学 ELISA 检测方法比对研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(1): 17-19.
- [5] 黄学勇, 李幸乐, 张白帆, 等. 人抗狂犬病病毒 IgG 抗体 3 种检测系统的可比性研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(8): 1172-1174.
- [6] 李红, 李亚南, 李茂光, 等. 1, 3, 5 和 7F 型肺炎球菌荚膜多糖抗体 IgG 定量检测 ELISA 方法的验证[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13): 1551-1555.
- [7] 于鹏程, 由淑珍, 卢学新, 等. RFFIT、FAVN、ELISA 及狂犬病中和抗体检测试剂盒对狂犬病抗体检测的比较研究[J]. 病毒学报, 2017, 33(2): 265-268.
- [8] 徐颖华, 卫辰, 王丽婵, 等. 百日咳鲍特菌基因组多态性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(22): 2691-2694.
- [9] 黄莉荣, 李艳萍, 张庶民, 等. 无细胞百白破联合疫苗的安全性及免疫原性研究[J]. 应用预防医学, 2009, 15, 99(2): 111-114.
- [10] 陈立煌, 刘李, 何泽东, 等. 2 种吸附无细胞百白破联合疫苗基础免疫的安全性及免疫原性对比研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(19): 3751-3753.
- [11] 戚小华, 凌罗亚, 陈恩富, 等. 吸附无细(下转第 2724 页)

Altman 一致性检验显示在对照组和疾病组 2 种检测方法的测量结果相差幅度均较大,不能被临床接受,因此,不能作为发色底物法的替代方法。可能由于凝固法干扰因素多,如血浆 FⅧ水平升高、高脂血症、狼疮性抗凝物均可影响凝固法测得的血浆蛋白 C 活性^[14]。目前认为肝素含量低于 1~2 U/mL,不会影响凝固法的检测;但是当含有阿加曲班、水蛭素、比伐卢定等凝血酶抑制剂时,会使检测结果假性升高^[15]。而发色底物法当肝素含量不超过 2 U/mL 时不会影响检测结果,而且凝血酶抑制剂亦不会影响试验。发色底物法常见的干扰酶类有凝血酶、活化的 FXa、激肽释放酶和组织纤维酶原激活剂等^[10]。KHOR 等^[15]建议来自弥散性血管内凝血患者、含有组织纤溶酶原激活剂的样本或者采血缓慢的幼儿可应用空白对照。这样可排除干扰物质的作用,缩短报告时间,同时节省试剂成本。由于发色底物法干扰因素较少,比凝固法准确,目前对于检测蛋白 C 缺乏的筛查比较推荐的方法是发色底物法^[7]。此外,本研究纳入数据均是单次测量,没有采取多次测量求平均值的方法,不能消除测量随机误差的影响。检测蛋白 C 抗凝活性的 2 种方法均受分析前因素和实验室各种因素的影响,要尽量排除分析前因素影响,定期校准仪器。本次研究仅针对相对健康人和急性脑梗死患者,对于其他血栓性疾病的比对分析尚需进一步研究,以使易栓症筛查的方法学标准化、数据精准化,更好地指导临床诊疗工作。

4 结 论

实验室在比较不同方法检测一致性时应采取多种方法从不同角度进行联合评价,以避免某一方法评价中局限性的影响,使评价结论更为合理、客观。

参考文献

[1] MIDDELDROP S, LEVI M. Thrombophilia: an update [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33(6): 563-572.

[2] 闫振宇, 华宝来, 马西虎, 等. 672 例静脉血栓栓塞症相关

(上接第 2720 页)

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.

[12] 邹光荣, 兰红, 项美娟, 等. 吸附无细胞百白破联合疫苗的免疫原性及免疫持久性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(12): 1805-1808.

[13] 胡家全, 李贵凡, 胡月梅, 等. 吸附无细胞百白破联合疫苗的安全性和免疫原性研究[J]. *江苏预防医学*, 2017, 28(1): 9-11.

[14] 李艳萍, 张庶民, 叶强, 等. 白喉-破伤风-无细胞百日咳-b

危险因素分析[J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(9): 579-582.

[3] GOLDENBERG N A, JOHNSON M. Protein C deficiency [J]. *Haemophilia*, 2008, 14(60): 1214-1221.

[4] 王增智, 赵秀清, 李杰, 等. 无诱因肺血栓栓塞症患者天然抗凝蛋白活性缺陷发生率的研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(6): 518-521.

[5] 倪亚莉, 邓伟. 易栓症与反复胚胎种植失败的相关性研究[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(1): 60-63.

[6] 邓昊昱, 陈家伦, 谢辉, 等. 凝血因子和抗凝蛋白检测诊断急性静脉血栓栓塞症[J]. *中华普通外科杂志*, 2013, 28(3): 222-225.

[7] BAGLIN T, GRAY E, GREAVES M, et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia [J]. *Br J Haematol*, 2010, 149(2): 209-220.

[8] KOTTKE-MARCHANT K, COMP E. Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin, and endothelial cell protein C receptor [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, 126(11): 1337-1348.

[9] DING Q, SHEN W, YE X, et al. Clinical and genetic features of protein C deficiency in 23 unrelated Chinese patients [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 50(1): 53-58.

[10] 陆松松, 吴迪, 贾玫. 蛋白 C 的检测方法及研究进展[J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(4): 297-305.

[11] 刘宇明, 许治强, 周伯荣, 等. 蛋白 C、抗凝血酶Ⅲ在缺血性脑血管病发病机制中的作用[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2011, 18(5): 379-380.

[12] 欧东仁, 房淑欣. 急性脑梗死患者血中抗凝蛋白活性的改变[J]. *中国脑血管病杂志*, 2007, 4(6): 275-276.

[13] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 易栓症诊断中国专家共识(2012 年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(11): 982.

[14] 包承鑫. 遗传性易栓症的诊断[J]. *诊断学理论与实践*, 2006, 5(5): 452-454.

[15] KHOR B, VAN COTT E M. Laboratory tests for protein C deficiency [J]. *Am J Hematol*, 2010, 85(6): 440-442.

(收稿日期: 2019-04-11 修回日期: 2019-07-12)

型流行性感嗜血杆菌联合疫苗对中国婴儿安全性和免疫原性的研究[J]. *中国疫苗和免疫*, 2010, 16(2): 97-104.

[15] 卫辰, 晁哲, 王丽婵, 等. 第 1 代百日咳毒素国家参考品的标定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(8): 853-857.

[16] 徐颖华, 卫辰, 王丽婵, 等. 第 1 代国家人源抗百日咳血清参考品的制备[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(10): 1211-1213.

(收稿日期: 2019-03-04 修回日期: 2019-05-16)