

# 酶联免疫吸附试验检测狂犬病抗体的实际应用探讨

李 繁, 吴寒光, 段新华, 施远国, 罗国强, 陈雨晴, 李颖鑫

(深圳市动物疫病预防控制中心, 广东 深圳 518052)

**摘要:**为探讨酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测狂犬病免疫抗体水平的应用价值,检测了深圳市 10 个行政区的 290 份犬血清,以荧光抗体病毒中和试验(FAVN)法作为金标准,分析检测结果的一致性、符合率及定量检测有效性等指标。结果显示:Kappa 值为 0.545,一致性评价为中度一致;总符合率为 87.59%,中和效价 0.51~2.00 IU/mL 的样品出现假阴性的概率较大;相同中和效价的样品 S/CO 值呈多区间分布现象。建议在基层应用于免疫效果评价的实际检测时,ELISA 方法可用于定性检测的初步筛查,不建议用作定量检测的方法。

**关键词:**狂犬病;抗体;酶联免疫吸附试验

[中图分类号] S858.292 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)03-0037-04

## Exploration on Detecting Antibody Against Rabies by ELISA

LI Fan, WU Han-guang, DUAN Xin-hua, SHI Yuan-guo, LUO Guo-qiang,

CHEN Yu-qing, LI Ying-xin

(Shenzhen Animal Disease Control Center, Shenzhen Guangdong 518052, China)

**Abstract:** This study is to explore the application value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in detecting the level of rabies immune antibody. We tested 290 canine sera from 10 administrative districts of Shenzhen. We use the fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) method as the gold standard to analyze the consistency, coincidence rate and quantitative detection effectiveness of the test results and other indicators. The results showed that the Kappa value was 0.545, and the consistency evaluation was moderately consistent. The total coincidence rate was 87.59%, and samples with a neutralizing titer of 0.51-2.00IU/mL had a higher probability of false negatives. In addition, the S/CO values of samples with the same neutralization titer showed a multi-interval distribution phenomenon. Therefore, this study suggests that the ELISA method can be used for preliminary screening of qualitative detection when it is applied to the actual detection of immune effect evaluation at the grassroots level, and it is not recommended to be used as a quantitative detection method.

**Key words:** rabies, antibody, ELISA

狂犬病是由弹状病毒科的狂犬病毒(Rabies virus, RV)引起的人畜共患传染病,主要在野生动物(狼、狐狸、鼬鼠、蝙蝠等)及家养动物(狗、猫、牛等)中流行传播。人狂犬病主要被患病动物咬伤所致,或与密切接触有关,感染发病后进展速度快,病死率高达 100%。动物接种狂犬病疫苗是预防人狂犬病最有效的手段,因此加强犬、猫的狂犬病免疫工作具有十分重要的公共卫生意义。

动物接种疫苗后,科学评价免疫效果有赖于准确检测和监测血清中狂犬病免疫抗体水平,现有的检测方法有多种,如荧光抗体病毒中和试验(FAVN)、快速荧光灶抑制试验(RFFIT)、小鼠病毒

中和试验(MNT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等,前三种方法特异性强、准确性好,但都需要活病毒,试验时间长,对实验室生物安全条件和仪器设备配置要求高,不适合在基层检测中推广应用。而 ELISA 检测操作简便快捷,成本也不高,近年来已有商品化的试剂盒应用于狂犬病免疫抗体的监测,以评估免疫效果。本研究以 FAVN 法为标准,对 ELISA 检测的符合率、特异性、灵敏度、假阳性、假阴性、OD 值区间分布等参数进行全面分析,探讨 ELISA 方法的应用价值,为基层检测业务的开展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂盒 狂犬病毒抗体 ELISA 检测试剂盒,批号:RV20211008E,由国内某生物药业有限公司生产。

[收稿日期] 2022-10-10

[作者简介] 李繁(1968-),男,广西南宁人,硕士,高级兽医师,主要从事动物防疫和食品安全检测与监督管理工作。E-mail:lf682000@163.com

1.1.2 仪器 洗板机:BIOTEX ELX808,酶标仪:BIOTEX ELX50,精密移液器:Eppendorf。

1.1.3 检测样品 犬血清。

## 1.2 方法

1.2.1 样品采集 犬只来自深圳市 10 个行政区,随机采样,无菌采血 3mL,凝固后分离血清于离心管中,一式两份,-20℃保存待检。

1.2.2 中和试验 委托军事医学科学院军事兽医研究所 OIE 狂犬病参考实验室检测,检测方法为荧光抗体病毒中和试验(FAVN)。中和效价 $\geq 0.5$  IU/mL,判样品阳性,表示该份血清的来源动物具备狂犬病免疫保护能力,中和效价 $< 0.5$  IU/mL,判样品阴性,表示该份血清的来源动物无狂犬病免疫保护能力。

1.2.3 ELISA 检测 严格按试剂盒使用说明书进行样品稀释、加样、孵育、洗板、显色、终止反应、读板等操作。以酶标仪双波长 450nm 和 630nm 读取 OD 值,并计算 A 值和 S/CO 值:A 值=OD450nm-OD630nm,S/CO 值=样品 A 值/临界对照 A 值。当 S/CO 值 $\geq 1.0$ ,判样品阳性;S/CO 值 $< 1.0$ ,判样品阴性。

1.2.4 数据分析处理 采用 SPSS 软件对检测结果分析处理,进行一致性检验,计算 Kappa 值,评估 ELISA 与 FAVN 的检测结果一致性,并对阳性符合率、阴性符合率、总符合率、特异性、灵敏度、OD 值与抗体水平的关联性和分布等进行计算分析。

## 2 结果与数据统计

### 2.1 样品定性检测结果

结果见表 1,共检测了来自深圳市 10 个行政区的 290 份犬血清,FAVN 法检测为阳性样品 260 份、阴性样品 30 份,ELISA 法检测为阳性样品 228 份、阴性样品 62 份。

表 1 FAVN 法与 ELISA 法试验结果一致性比较

FAVN 法结果	ELISA 法结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	226	34	260
阴性	2	28	30
合计	228	62	290

上表数据,经采用 SPSS 软件进行诊断结果一致性检验,Kappa 值为 0.545。

260 份 FAVN 法阳性样品中,ELISA 法检测为 226 份阳性,阳性符合率为 86.92%;30 份 FAVN 法阴性样品中,ELISA 法检测为 28 份阴性,阴性符合率为 93.33%;总符合率为 87.59%(254/290)

### 2.2 不同中和效价的样品检测结果

FAVN 法中和效价 $\geq 0.5$  IU/mL,判样品阳性,中和效价 $< 0.5$  IU/mL,判样品阴性。将阴性样品分类设 2 个中和效价区间,阳性样品设 10 个中和效价区间,分别对 ELISA 法检测结果的符合率进行了分区间计算,结果见表 2 和图 1。符合率最高为 100%,最低为 55.88%。

表 2 不同中和效价的样品 ELISA 法检测结果

中和效价 (IU/mL)	0~0.20	0.21~0.49	0.5	0.51~2.00	2.01~5.00	5.01~10.00	10.01~15.00	15.01~20.00	20.01~25.00	25.01~30.00	30.01~35.00	35.01~40.50
样品数量	20	10	8	34	53	9	76	2	7	0	16	55
ELISA 阴性	20	8	3	15	11	1	6	0	0	0	0	0
ELISA 阳性	0	2	5	19	42	8	70	2	7	0	16	55
符合率(%)	100	80	62.5	55.88	79.25	88.89	92.11	100	100	—	100	100

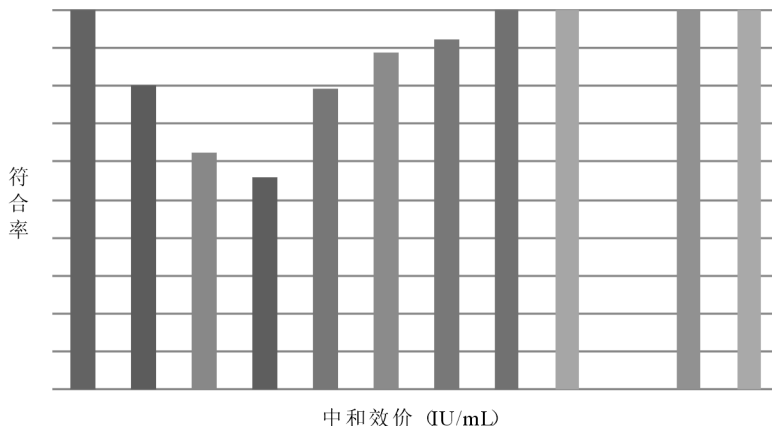


图 1 不同中和效价的样品 ELISA 法检测结果符合率

### 2.3 相同中和效价的样品检测结果

选取表 2 中 ELISA 法与 FAVN 法检测结果一致的样品,分析同一中和效价的不同样品的 OD 值大小分布区间。考虑统计数量的要求,选择了同一中和效价的样品数量  $\geq 20$  份者,其中 4.5 IU/mL

样品 34 份,13.5 IU/mL 样品 55 份,40.5 IU/mL 样品 55 份。以上 144 份样品 OD 值经计算 S/CO 值最高为 7.3。S/CO 值分区统计结果见表 3 和图 2~图 4。

表 3 相同中和效价的样品 ELISA 检测 S/CO 值区间分布

中和效价 (IU/mL)	S/CO 值							合计
	1.0~1.9	2.0~2.9	3.0~3.9	4.0~4.9	5.0~5.9	6.0~6.9	7.0~7.9	
4.5	16	6	6	5	1	0	0	34
13.5	13	14	9	17	2	0	0	55
40.5	5	15	8	14	8	3	2	55

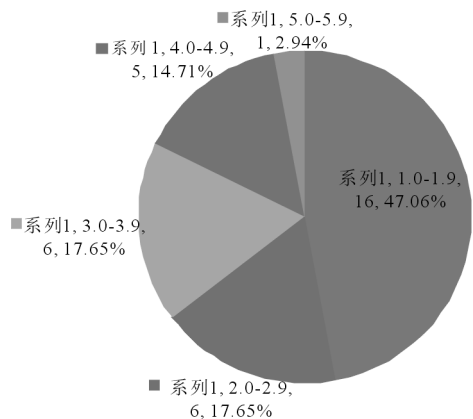


图 2 中和效价 4.5IU/mL 的样品 ELISA 检测 S/CO 值分布图

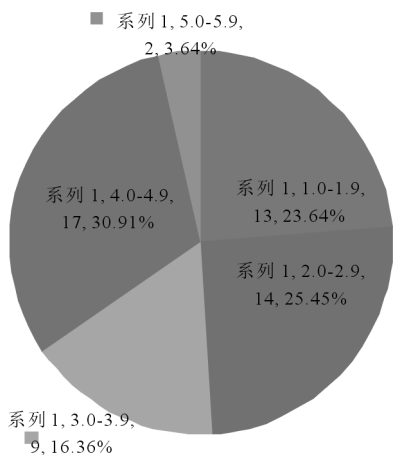


图 3 中和效价 13.5IU/mL 的样品 ELISA 检测 S/CO 值分布图

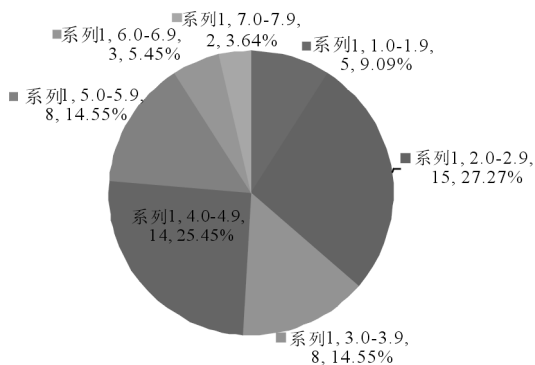


图 4 中和效价 40.5IU/mL 的样品 ELISA 检测 S/CO 值分布图

表 3 数据和图 2~图 4 分布图显示,中和效价 4.5 IU/mL 和 13.5 IU/mL 的样品无 S/CO 值  $\geq 6.0$  的检测值,其它各 S/CO 值区间均有分布。中和效价 4.5 IU/mL 的样品 S/CO 值在 1.0~1.9 区间的百分率最高(47.06%),中和效价 13.5 IU/mL 的样品 S/CO 值在 4.0~4.9 区间的百分率最高(30.91%);中和效价 40.5 IU/mL 的样品 S/CO 值在 2.0~2.9 区间的百分率最高(27.27%),4.0~4.9 区间的百分率为 25.45%。

### 3 讨论

#### 3.1 免疫保护屏障

当犬群免疫覆盖率达到 70% 以上时,即可有效抑制狂犬病的传播。荧光抗体病毒中和试验 (FAVN) 是国际兽医局 (OIE) 推荐用于检测动物血清狂犬病抗体活性的方法。本次研究检测样品来自深圳 10 个行政区,FAVN 法检测免疫保护合格率达 89.66%;经初步分析犬只免疫史,发现成年和经多次免疫的犬血清中和效价水平都较高,而幼年犬、仅初免或未按要求加强免疫的,则中和效价水平较低或不合格。深圳市 2006 年颁布《深圳市养犬管理条例》,实行狂犬病免费强制免疫制度,市政府将每年的 4 月和 9 月定为犬类狂犬病强制免疫行动月,不断提高免疫率,并将狂犬病疫苗经费纳入财政预算,统一采购进口狂犬病灭活疫苗,以提高免疫质量。经多年的免疫效果监测发现,深圳市的犬类狂犬病免疫抗体合格率一直保持在较高水平,建立了良好的免疫保护屏障。

#### 3.2 定性检测

Kappa 检验常用于评价待验证的诊断实验方法与金标准的一致性,Kappa 取值 0~1 之间,Kappa  $\geq 0.75$ ,说明两种方法诊断结果一致性较好;  $0.4 \leq$  Kappa  $< 0.75$ ,说明两种方法诊断结果一致性一般;

$Kappa < 0.4$ , 说明两种方法诊断结果一致性较差。本研究数据经采用 SPSS 软件对 FAVN 法和 ELISA 方法进行诊断结果一致性检验,  $Kappa$  值为 0.545, 表明该 ELISA 检测试剂盒的结果为中度一致。王培等曾比较 6 种国产和进口的不同品牌的商品化试剂盒,  $Kappa$  值由高至低依次为: 0.583、0.549、0.465、0.370、0.184、0.105, 前两种均为进口试剂盒, 本次试验所用试剂盒  $Kappa$  值为 0.545, 说明检测效能与进口产品相近。

阳性符合率通常用于评估检测的灵敏度, 而阴性符合率是检测特异性的指标, 本次试验所用 ELISA 试剂盒的阳性符合率为 86.92%; 阴性符合率为 93.33%; 总符合率为 87.59%。说明特异性强, 出现假阳性的概率较小, 相比较则阳性符合率略低, 说明产品的灵敏度有待提高, 检测时出现假阴性的概率会大于出现假阳性的概率, 在基层应用 ELISA 法检测时, 对检测结果分析时应予注意。

从不同中和效价的样品检测结果可以看出, 中和效价 0.00~0.20 IU/mL 和中和效价  $\geq 15.01$  的样品符合率均为 100%, 说明这些中和效价区间的样品 ELISA 法检测时不会出现假阳性和假阴性。符合率最低的为中和效价 0.51~2.00 IU/mL 的样品, 符合率仅为 55.88%; 其次为中和效价 0.5 IU/mL 的样品, 符合率为 62.5%; 说明这两个中和效价区间的样品, ELISA 法检测时容易出现假阴性的结果。随着中和抗体效价的升高, 符合率也逐步提高, 这提示在作免疫效果评价时, 若为初次免疫, 且接种后时间不长的犬只, 建议对 ELISA 法检测的阴性结果进一步进行验证。

动物免疫应答产生的抗体水平为包含中和抗体在内的所有抗体的总和, 其特异性结合位点既有狂犬病毒颗粒内部的结构蛋白或酶, 也有病毒外部蛋白表位如糖蛋白等, 因此血清抗体水平始终不能代表保护性中和抗体的水平, 这也是 ELISA 法与 FAVN 法检测结果有差异的根本原因。不同品牌厂家的产品, 由于生产工艺和技术不同, 其酶标板上包被不同的抗原或者不同的单抗或多抗, 纯度也有差异, 此外疫苗种类和来源不同, 其免疫应答抗体的组成和水平也会有差异, 因此 ELISA 法检测结果的可靠性受多种因素的影响, 建议各地应通过采集当地犬只血清进行试剂盒比对试验, 选择特异性强、灵敏度高、稳定性好的产品用于免疫抗体水平监测的初步筛查。

### 3.3 定量检测

本次试验中和效价 4.5 IU/mL 和 13.5 IU/mL

的样品无 S/CO 值  $\geq 6.0$  的检测值, 47.06% 中和效价 4.5 IU/mL 的样品其 S/CO 值区间为 1.0~1.9; 而中和效价为 40.5 IU/mL 的样品则有 9% 的检测值为 S/CO 值  $\geq 6.0$ 。但更需要注意的是, 在 ELISA 法检测 S/CO 值 (1.0~5.9) 由低至高的各个区间中, 相同区间内各个中和效价的阳性样品均有分布, 也就是说中和效价与 S/CO 值两者之间并不存在一一对应的线性关系, 高中和效价的样品其 S/CO 值可能也会小于低中和效价的样品, 反之, 低中和效价的样品其 S/CO 值可能也会高于高中和效价的样品。因此利用 ELISA 法作为检测狂犬病免疫保护抗体水平的定量检测方法, 其有效性难以确认。

于鹏程等通过检测 60 份免疫后的人血清, 认为 ELISA 法可用于定量检测 0.5~10 IU/mL 的有效线性范围的血清样本, 与本次研究的结果有异, 可能与所用试剂盒不同有关, 而且人和动物的血清样本、以及免疫疫苗和抗体结构等均有差异。袁洁等在对广州地区家养犬只开展免疫抗体水平监测中也发现 ELISA 在测定具体的抗体滴度方面与 FAVN 仍有较大误差。我们认为, 在检测动物血清样本时, 与 FAVN 法的金标准比较, ELISA 方法的定性效能尚存在诸多差异, 若用于定量检测, 需要做更广泛深入的研究。

### 参考文献:

- [1] 吴江平. 狂犬病防治技术规范指导手册[M]. 北京, 中国广播电视出版社, 2006.
- [2] 扈荣良, 张守峰, 刘晔, 等. 狂犬病动物抗体水平检测和监测[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(3): 293-295.
- [3] 宋兴共, 杨洪全, 薛素强. 狂犬病抗体水平检测方法综述[J]. 广东畜牧兽医科技, 2009, 34(3): 46-48.
- [4] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗(第二版)[M]. 北京, 中国医药科技出版社, 2009.
- [5] 涂长春. 我国狂犬病流行现状及原因[J]. 动物保健, 2006(8): 11-12.
- [6] WHO. Expert consultation on rabies (First report) [J]. Geneva, 2004, 13: 48-58.
- [7] 王培, 雷琪莉, 邓柏林, 等. 6 种狂犬病病毒 ELISA 抗体检测试剂盒的比对[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(1): 79-82.
- [8] 郑佳琳, 江飙, 郭霄峰. 优化密码子以提高狂犬病病毒糖蛋白基因在原核细胞的表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(5): 403-407.
- [9] 陈腾, 张锦霞, 张静远, 等. 狂犬病病毒不同毒株糖蛋白免疫原性的比较研究[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(4): 502-506.