

中国破伤风抗体检测技术研究进展

王传林¹ 李明¹ 吕新军²

¹北京大学人民医院急诊科 创伤救治中心 100044; ²中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052

通信作者: 吕新军, Email: 73xj@163.com

【摘要】 我国非新生儿破伤风防控形势严峻, 强化含破伤风类毒素疫苗(TTCV)的主动免疫是非新生儿破伤风防控的关键。通过破伤风抗体(TAB)检测可以明确个体的TTCV免疫状态, 从而正确实施TTCV主动免疫。国外对TAB检测技术的研究呈现停滞状态, 而国内有现实的TAB检测需求, 破伤风抗体检测技术仍然处于动态发展过程中。本文收集国内也相对有限的TAB检测技术资料, 对国内应用和发展的小鼠毒素中和试验(MTNT)、间接血凝法(IHA)、凝胶双向扩散试验或Rubin法、酶联免疫吸附试验(ELISA)、胶体金(CG)法等TAB检测技术进行总结, 以期为国内TAB检测提供较全面的依据。由于缺乏国内TAB检测和国际机构、参考试剂的对比研究, 我国的TAB检测技术尚未实现国际化认可。我国特殊的破伤风防控形势使得TAB检测技术研究在国内有一定的现实意义, ELISA、CG法等快速检测试剂具备一定的应用价值。

【关键词】 破伤风类毒素; 疫苗; 抗体; 酶联免疫吸附试验; 胶体金

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2020.02.021

Research progress of tetanus antibody detection technology in China

Wang Chuanlin¹, Li Ming¹, Lyu Xinjun²

¹Trauma Center and Emergency Department, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China; ²Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Corresponding author: Lyu Xinjun, Email: 73xj@163.com

【Abstract】 The situation of prevention of non-neonatal tetanus in China is severe. Strengthening the active immunization with tetanus toxoid vaccine (TTCV) is the key to prevent the non-neonatal tetanus. Through the detection of tetanus antibody (TAB), the immune status of individual can be determined, so as to implement the active immunization of TTCV correctly. The research on TAB detection technology is stagnant in abroad, but still in a development process in China since there is a realistic demand for TAB detection. This review collects relatively limited data of TAB detection technology in China, and summarizes the techniques such as mice toxin neutralization test (MTNT), indirect hemagglutination assay (IHA), double agar gel immune diffusion test (Rubin method), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and colloidal gold (CG), in order to provide a comprehensive basis for domestic TAB detection. The TAB detection technology in China has not yet achieved international recognition due to the lack of comparative study of domestic and international institutions and reference reagents. The special domestic situation of tetanus prevention makes the research of TAB detection technology have a certain practical significance, and rapid detection reagents such as ELISA and CG method have a certain application value in China.

【Key words】 Tetanus toxoid; Vaccine; Antibody; Enzyme-linked immunosorbent assay; Colloidal gold

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2020.02.021

破伤风(tetanus)是由破伤风梭状芽孢杆菌(*clostridium tetani*)经伤口侵入机体,在适宜厌氧环境下繁殖,产生破伤风外毒素(tetanus toxin),侵犯神经系统,以肌肉强直性痉挛、苦笑面容为典型临床表现的感染性疾病^[1]。全球儿童

计划免疫中含破伤风类毒素疫苗(tetanus toxoid containing vaccine, TTCV)的接种对于有效控制破伤风的流行至关重要^[1]。然而,随着TTCV诱导破伤风抗体(tetanus antibody, TAB)的衰减,机体外伤后发生破伤风的几率增加^[2]。近年

来,国内成人破伤风病例时有报道,提示了成人 TTCV 强化免疫的必要性^[3]。临床上,接诊医生应当了解接受外伤处置患者的 TTCV 免疫史,必要时应当通过必要的 TAB 检测手段明确患者的 TTCV 免疫状态,以便进行正确的外伤后破伤风预防^[4]。

TAB 检测技术包括小鼠毒素中和试验(mice toxin neutralization test, MTNT)、间接血凝法(indirect hemagglutination assay, IHA)、凝胶双向扩散试验或 Rubin 法、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金(colloidal gold, CG)法、毒素结合抑制试验(toxin-binding inhibition test, ToBI)、神经节苷脂抑制试验、PC-12 细胞毒性中和试验^[5],其中 MTNT、IHA、Rubin、ELISA 和 CG 法在国内已经应用,ELISA 和 CG 法是临床 TAB 检测的适宜技术。本文就国内 TAB 检测技术及进展状况进行综述。

一、MTNT 法

MTNT 法是基于动物的毒素中和实验,基本原理是将破伤风人免疫球蛋白(human tetanus immunoglobulin, HTIG)标准品和待检样品同时进行系列稀释(各稀释度间隔为 5%),然后以固定量的破伤风试验毒素中和 HTIG 标准品和待检样品中的 TAB,腹部皮下接种小鼠检测不同稀释度 HTIG 标准品和待检样品中和作用后的剩余破伤风试验毒素,待检样品的 TAB 效价以与 HTIG 标准品对照小鼠同时死亡的最高稀释度来判定。MTNT 法需要专业的动物实验室进行,小鼠接种后需要观察 5 d,受动物个体差异、试验毒素性质等多因素影响,检测结果稳定性较差,但是该方法反应 TAB 的体内活性,对于破伤风被动免疫制剂的活性检测有不可替代的作用^[6]。MTNT 法是 WHO 和《中国药典(2015 年版)》推荐的 TAB 检测标准方法,其他 TAB 检测方法的检测效能均以 MTNT 法评价^[6]。MTNT 法的检测水平可以达到 0.001 IU/ml,依据 TTCV 临床试验数据,WHO 建议的 TAB 保护水平为 0.01 IU/ml,但是对该保护水平值目前仍然存在争议^[7]。

二、IHA 法

IHA 法是正向血凝试验,将破伤风类毒素先吸附于鸡红细胞表面,使之成为致敏红细胞,将 HTIG 标准品和待检样品在 V 型血凝板同时进行系列倍比稀释(16 个稀释度),然后以固定量的致敏红细胞与 TAB 作用,观察不同稀释度 HTIG 标准品和待检样品的致敏红细胞凝集现象,以出现++ 以上致敏红细胞凝集的最高稀释度作为反应终点,比较 HTIG 标准品和待检样品的反应终点判断待检样品 TAB 效价,待检样品 TAB 效价(HAU/ml)=致敏红细胞最低检出量×待检样品凝集反应终点对应稀释倍数^[8]。IHA 法在制备致敏鸡红细胞环节影响因素多、批间差异较大,实验结果需要隔夜观察,肉眼观察凝集终点增加了判断的主观性,检测结果稳定性较差,并且结果单位为 HAU/ml,无法与标准国际单位进行换算,同时,该方法对 IgM 抗体检测更加敏感^[8]。IHA 法对实验室条件要求较低,操作方便,在国内仍然有一

定的应用^[9]。

三、Rubin 法

Rubin 法是典型的凝胶扩散试验,需要制备中间有长的凹槽、两侧有加样孔的琼脂糖凝胶板,中间长的凹槽加入固定量的破伤风试验毒素,两侧加样孔加入 HTIG 标准品和待检样品,经过破伤风试验毒素、HTIG 标准品和待检样品的双向扩散和结合,观察比较 HTIG 标准品和待检样品对应沉淀线判定待检样品 TAB 效价。Rubin 法需要进行 24 h 凝胶扩散,肉眼观察比较沉淀线精确度不足,仅能进行定性和半定量检测^[10]。然而,Rubin 法对实验室条件要求较低,用于比较样品 TAB 效价和某个界值时结果直观,因此在需要进行 TAB 效价检测的单位中仍有应用价值^[11]。

四、ELISA 法

ELISA 法是应用最普遍的抗体检测技术。理论上,间接 ELISA、双抗原夹心法 ELISA、竞争性 ELISA 都可以进行 TAB 效价测定。目前,国内研发的间接 ELISA 法、双抗原夹心 ELISA 法已经用于 TAB 效价测定^[9,11],但竞争性 ELISA 法检测 TAB 效价在国内还没有相关研究报道。

1. 间接 ELISA 法:以纯化的破伤风类毒素作为抗原包被 ELISA 检测板,将 HTIG 标准品系列稀释品和待检样品加入检测孔,使得 TAB 与包被抗原结合,TAB 再与 HRP 或生物素-亲和素标记的抗人二抗结合,加入底物显色,酶标仪读取吸光度值(A 值),以 HTIG 标准品效价、OD 值分别作为横、纵坐标绘制标准曲线,依据待检样品 A 值在标准曲线上计算相应效价值。间接 ELISA 法对实验室要求低,操作便捷,数小时即可完成,同时,对检测样品要求较低,样品使用量极少,是目前应用最普遍的 TAB 检测技术^[11-12]。间接 ELISA 法需要经过 MTNT 法评价灵敏性、特异性、稳定性、重复性等系列指标,以确定方法的检测效能^[11-12]。由于 MTNT 法检测 TAB 稳定性较差,国内研究者在评价间接 ELISA 法检测 TAB 效能时通常平行进行 IHA 和(或)Rubin 法检测^[9,11]。丁玉江等^[11]采用 MTNT、Rubin、间接 ELISA 法同时检测 10 份 TTCV 免疫者血浆的 TAB 效价,每份血浆以每种检测方法测定 10 次,结果显示 Rubin 法判定的检测值区间范围与 MTNT 法检测结果吻合,间接 ELISA 与 MTNT 法检测结果呈正相关关系($r=0.987$),间接 ELISA 法检测结果比 MTNT 法检测结果平均高 8.7%,间接 ELISA 法平均变异系数(coefficient of variation, CV)为 4.69%。李荣贞等^[12]采用 MTNT、间接 ELISA 法同时检测 10 份 HTIG 的 TAB 效价,MTNT 法测定 3 次计算平均值,同一批次的间接 ELISA 法试剂盒测定 3 次计算平均值,结果显示间接 ELISA 与 MTNT 法检测结果相关系数 $r=0.91$,间接 ELISA 法检测同一份质控品的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)或 CV 为 2%~4%。丰达星等^[13]对比标准法与间接 ELISA 法对 300 份健康人血清的 TAB 效价检测结果,相关系数 $r=0.988$,间接 ELISA 法检测灵敏性 94.1%,特异性 96.8%,标准法检测平均值和间接 ELISA 法检测平均值之间差异无统计学意义。然而,Perry 等^[7]对 5 种不同的 TAB 效价间接 ELISA 法检测

试剂盒对人血清 T 的检测结果进行比较分析,发现采用不同间接 ELISA 法检测试剂盒的检测结果之间差异具有统计学意义,而且这种差异将会影响临床医生对个体免疫状态的评判。部分研究者认为将 0.1 IU/ml 作为 TTCV 免疫后 TAB 阳转的界值(达到保护水平)更加合适。

2. 双抗原夹心 ELISA 法:双抗原夹心 ELISA 法以纯化的破伤风类毒素作为抗原包被 ELISA 检测板,将 HTIG 标准品系列稀释品和待检样品加入检测孔,使得 TAB 与包被抗原结合,TAB 再与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的破伤风类毒素结合,加入底物显色,酶标仪读取 A 值,以 HTIG 标准品效价、A 值分别作为横、纵坐标绘制标准曲线,依据待检样品 A 值在标准曲线上计算相应效价^[9,14]。张国强等^[9]利用该方法对 630 份成年健康献血员血清进行 TAB 效价检测,结果显示仅有 77 份血清(12.2%, 77/630)为 TAB 阳性(≥ 0.01 IU/ml),而对 6 228 份经过 TTCV 3 针免疫的献血员血清进行 TAB 效价检测,结果显示全部血清 TAB 阳转(≥ 0.01 IU/ml),其中 TAB 效价 <0.5 IU/ml 的血清 1 946 份(31.2%, 1 946/6 228),TAB 效价 2~8 IU/ml 的血清 3 733 份(60%, 3 733/6 228),TAB 效价 >8 IU/ml 的血清 549 份(8.8%, 549/6 228)。这项研究揭示出健康成人 TTCV 免疫已经严重衰退,是外伤后发生破伤风的重要风险因素;同时,TTCV 加强免疫对于成年人效果可靠,对于 TTCV 免疫状况衰退的个体,TTCV 加强免疫是必要的,可以防止 TTCV 免疫状况衰退而发生外伤后的破伤风感染。双抗原夹心 ELISA 法在 TAB 检测中应用还不普遍,有待进一步的深入研究。

张燕等^[14]建立了 TAB 双抗原夹心 ELISA 检测法,同英国 Binding Site 公司生产的 TAB 间接 ELISA 检测试剂盒进行了比较,对 63 份样品的检测结果进行分析,相关系数 $r=0.971$,检测结果平均值之间差异无统计学意义。一般 TAB 间接 ELISA 法检测时需要将血清进行数千倍的稀释,微小的稀释误差对检测结果的影响较大;张燕等建立的 TAB 双抗原夹心 ELISA 检测法在调配时降低了灵敏度,血清作 100 倍稀释即可,减少了样品稀释对检测结果的影响。

双抗原夹心 ELISA 法与间接 ELISA 法原理类似,操作类似,检测特异性更高,该方法的研究数据在逐步积累,具有良好的应用前景。

3. 竞争性 ELISA 法:以抗破伤风单克隆抗体作为竞争性抗体构建 TAB 检测的竞争性 ELISA 检测方法是现实可行的^[5,15]。不同于间接 ELISA、双抗原夹心 ELISA 法检测的是针对破伤风类毒素的总抗体,竞争性 ELISA 法检测的是破伤风保护性抗体(中和抗体),与 MTNT 的检测意义相同,因此在理论上具备更高的特异性^[5,15]。国内至今尚无检测 TAB 的竞争性 ELISA 法相关研究报道,这与 TAB 检测的间接 ELISA 法检测效能良好并且普遍应用有关,研究者和使用者都没有足够的理由(必要的数据)去探索另外一种检测性能未知的新方法。竞争性单克隆抗体来源存在一定限制以及在操作方法上较为复杂可能是限制此类方法生产和普

遍应用的重要因素。

五、CG 法

基于免疫金标记技术(immunogold labelling technique)的 TAB 检测 CG 试剂在国内已经研制成功,包括斑点免疫金渗滤法(dot immunogold filtration)和胶体金免疫层析法(colloidal gold immunochromatography)两种检测试剂。胶体金法检测 TAB 快速、简便,对实验室无任何特殊要求,适合床旁诊断和现场诊断,但是该方法是定性或半定量检测方法,需要 TAB 定量检测时不适用^[15]。

斑点免疫金渗滤法是以硝酸纤维素膜为载体,将破伤风类毒素点样在膜上,封闭,加待检样品,洗涤后加胶体金标记的葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A, SPA),观察显色结果。马霄等^[16]以斑点免疫金渗滤法制备破伤风抗体胶体金检测试剂盒(半定量),检测灵敏性达到 0.007 8~0.015 0 IU/ml;对 31 份 TTCV 免疫豚鼠血清采用该方法、STNT 法、IHA 法平行检测,结果显示该方法与 STNT 法相关系数 $r=0.96$,样品 TAB 效价平均值差异无统计学意义;对 11 份人血清采用该方法、STNT 法、IHA 法平行检测,结果显示该方法与 STNT 法相关系数 $r=0.999$,样品 TAB 效价平均值差异无统计学意义。

胶体金免疫层析法是在硝酸纤维素膜上包被检测线和质控线,检测线侧贴有玻璃纤维膜结合垫,包被胶体金标记破伤风类毒素,质控线侧贴有吸水垫,包被 TAB(IgG)。将待检样品和上样缓冲液加入样品孔,在层析作用下前移,溶解结合垫上的胶体金标记破伤风类毒素并发生反应,再前移至检测线、质控线并结合,观察检测线和质控线的颜色。

由于破伤风类毒素结构简单、抗原性良好,以破伤风类毒素为要素制备的 ELISA、胶体金试剂检测性能较好,基本能够满足 TAB 定性和(或)定量检测的要求。基于大量的人群 TAB 效价检测数据,成人随着年龄的增长 TTCV 免疫水平衰减,部分 TAB 效价低于保护水平(0.01 IU/ml),外伤后发生破伤风的危险增加^[16]。由于国内成人 TTCV 加强免疫并不普遍,从国内成年人破伤风病例报告情况来看,对成人外伤等情况进行 TTCV 免疫史咨询和 TAB 效价检测对于补齐成人 TTCV 免疫缺口是必要的,有助于采取必要的主被动免疫措施降低破伤风发病风险^[17-18]。国产 TAB 检测试剂的检测性能可以满足检测需求,竞争性 ELISA 法尚无相关报道,但是随着破伤风单克隆抗体研制的快速进展,未来研制 TAB 竞争性 ELISA 法的条件更加成熟。新的抗体检测技术也将带动 TAB 检测技术进一步发展,并在破伤风防控中发挥应有的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Tetanus vaccines: WHO position paper-February 2017[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2017, 92(6): 53-76.
- [2] 张春焕,伍业健,贺晴.广州市 2016 年人群破伤风抗体水平监测结果分析[J].热带医学杂志,2018,18(9):1242-1245.

- DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2018.09.030.
- [3] 陈羽婷, 马慧敏, 熊号峰, 等. 48 例成人破伤风患者的临床特点及救治分析[J]. 北京医学, 2018, 40(7):683-686. DOI: 10.15932/j.0253-9713.2018.07.022.
- [4] 中国创伤救治联盟, 北京大学创伤医学中心. 中国破伤风免疫预防专家共识[J]. 中华外科杂志, 2018, 56(3):161-167. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5815.2018.03.001.
- [5] 王晗, 于蕊, 于长明, 等. 人破伤风基因工程中和抗体的研究进展[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2013, 33(5):379-384. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2013.05.016.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[M]. 2010 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [7] Perry AL, Hayes AJ, Cox HA, et al. Comparison of five commercial anti-tetanus toxoid immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assays[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(12):1837-1839. DOI:10.1128/CVI.00294-09.
- [8] Gentili G, Pini C, Collotti C. The use of an immunoenzymatic 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. DOI: 10.1016/S0092-1157(85)80033-0.
- [9] 张国强, 冯素英, 王晋, 等. 酶联免疫破伤风抗体定量试剂的研制及应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2006, 34(2):23-27. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5673.2006.02.006.
- [10] Rubin ME, Sayed HI, Bowman JM. Determination of tetanus anti-toxin levels in hyperimmunized volunteers[J]. Vox Sang, 1980, 38 (1): 6. DOI:10.1111/j.1423-0410.1980.tb02323.x.
- [11] 丁玉江, 江昭伟, 庞日强, 等. 一种检测人破伤风免疫血浆特异性抗体的快速准确方法[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(6): 475-477. DOI: 10.3969/j.issn.1004-549X.2005.06.008.
- [12] 李荣贞, 赵军, 李庆英, 等. 酶联免疫法与中和实验法检测破伤风抗体效价[J]. 药学研究, 2015, (7):381-383.
- [13] 丰达星, 张珍英, 徐瑾, 等. 破伤风抗体(IgG)定量检测试剂盒(酶联免疫法)使用评价[J]. 中外健康文摘, 2011, 8(46): 18-20. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5085.2011.46.011.
- [14] 张燕, 叶小书, 陈寒柏, 等. 破伤风类毒素抗体酶联双抗原夹心法定量检测试剂的研制及评价[J]. 微生物学免疫学进展, 2007, 35 (2):15-18. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5673.2007.02.005.
- [15] Borrow R, Balmer P, Roper MH, et al. The immunological basis for immunization series module 3: tetanus update 2006 [EB / OL]. [2019-01-01]. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript/iah/iah.xis&src=google&base=WHOLIS&lang=p&nextAction/lnk&exprSearch=i924159551&indexSearch=ID>.
- [16] 马霄, 田霖, 赵建荣, 等. 破伤风抗体胶体金检测试剂盒的研制[J]. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(6):353-355. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5503.2003.06.012.
- [17] 佟立波, 王友豪, 车吉泊, 等. 某部 2016 年新兵破伤风抗体水平流行病学调查[J]. 中国疫苗和免疫, 2018, 24 (1): 53-56.
- [18] 宁桂军. 2012 年美国免疫实施咨询委员会关于 >65 岁成人使用破伤风类毒素降低抗原含量的白喉类毒素和无细胞百日咳联合疫苗的最新建议[J]. 中国疫苗和免疫, 2013, 19 (2): 190-191.

(收稿日期:2019-08-27)

(本文编辑:梁明修)

·文献速览·

四联抗逆转录病毒疗法作为 HIV 感染者的一线治疗方案效果并不优于三联疗法

冯琦, 周傲霜, 邹华春, 等. 四联与三联抗逆转录病毒疗法作为 HIV 感染者一线治疗的比较: 一项基于随机对照试验的系统综述和 Meta 分析[J]. 英国医学杂志中文版, 2020, 23(1):19-28.

在过去 20 年中, 不断有人开展随机对照试验来比较四联与三联抗逆转录病毒疗法(cART)作为 HIV 感染者一线治疗的效果。但同时期内, 临床实践指南却一直推荐三联 cART 作为标准一线治疗, 很少提及四联疗法。为此, 中国香港中文大学冯琦及其同事开展了一项系统综述和 Meta 分析来比较四联与三联 cART 作为 HIV 感染者一线治疗的疗效和安全性, 探讨现有试验对临床实践和未来研究的意义, 并将研究结果发表在 *The BMJ* 上。

该研究通过荟萃分析 12 项随机对照试验的结果, 发现四联疗法在免疫细胞应答、病毒学应答、艾滋病事件、死亡

和严重不良反应等方面并不优于标准的三联疗法。这一发现为当前推荐三联疗法作为一般 HIV 患者一线治疗的指南提供了支持。

由于四联疗法比三联疗法更可取的可能性较低, 因此在决定是否要开展新的比较二者之间疗效的试验时, 要考虑到这类试验通常成本高昂, 而且会对参与研究的患者造成潜在的伤害, 从而慎重决策。当然, 本研究并不排除当有新的抗逆转录病毒药物种类出现时, 包含该类药物的四联疗法比三联疗法更好的可能性。

(齐文安编译 中华医学会杂志社)