

特异性抗体效价检测技术概述*

张佩 吴恩应 陈玉琴 郭采平[△]

(深圳市卫武光明生物制品有限公司 广东 深圳 518107)

摘要 特异性抗体效价是生物制品活性(浓度)的重要标志,通常采用生物学方法来测定,并以抗体与其相应抗原反应产生的、可观察到的标准免疫反应来表示。抗原抗体间除发生特异性反应外,还会产生交叉反应,从而使特异性抗体效价的检测出现偏差,这在实际应用中亟需避免。特异性抗体效价检测技术是疾病诊断、特异性免疫球蛋白制备和疫苗评价等领域的关键技术,在生物制品质量控制及医学临床实践中意义重大。本文对抗体效价检测的常规技术及其研究进展进行简要综述,并对这些技术的特异性、灵敏性、检测周期及应用情况等方面进行比较分析,以期对特异性抗体效价检测技术有一个系统全面的认知,有利于研究人员在实际应用中选择合适的技术,共同推动抗体检测技术的发展。

关键词 特异性抗体 抗体效价 病毒感染力 中和反应 中和效价

中图分类号 R446 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 17-3377-05

Quantitative Detection of Specific Antibodies*

ZHANG Pei, WU En-ying, CHEN Yu-qin, GUO Cai-ping[△]

(Shenzhen Wei Wu Guangming Biological Products Co., Ltd, Guangdong Shenzhen 518107, China)

ABSTRACT: Specific antibody titers was the index of the potency (concentration) of biological products, which is detected by biological methods, and it was estimated by the standardized level of the immune response of antibody with the antigen. It would also yield cross-reactions between antibody and the antigen, resulting in determination deviation of specific antibody titers, which occurred frequently and need to resolve in practice. Quantitative determination of specific antibody titers was crucial technology for disease diagnosis, specific IgG purification and vaccine assessment, which was practical significance in quality control of biological products and clinical medicine. This paper gives a review on the quantitative assessment technologies of antibody titers, including the conventional methods, and their research progress. Moreover, the specificity, the sensitivity, the period, and the application of these methods were discussed.

Key word: Specific Antibody; Antibody Titers; Virus Infectivity; Neutralization Reaction; Neutralization Titer

Chinese Library Classification (CLC): R446 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3377-05

前言

特异性抗体(Specific Antibody)指在特定抗原分子上,每一决定簇(化学基团)均可刺激机体产生的、与之发生免疫反应的相应抗体。特异性抗体可通过与抗原分子特异性结合并发生中和反应(Neutralization Reaction),可中和毒素的毒性作用或阻断病毒对靶细胞的侵袭。特异性抗体效价(Specific Antibody Titer)是疾病诊断、特异性免疫球蛋白制备和疫苗评价等领域的重要指标,对其检测在临床上意义重大^[1-3]。特异性抗体效价一般采用生物学方法检测,包括病毒中和试验法、免疫标记技术、血凝抑制试验、双向免疫扩散技术等,其原理均基于抗原抗体间的结合反应。除与其特异性抗体发生反应外,抗原还与非特异抗体发生交叉反应。该反应无需与目的表位完全匹配,当针对相同抗原的抗体过量时则易于发生交叉反应,使特异性抗体效价的检测出现偏差。故在实际应用中,选择合适的抗体效价检测方法尤为重要。目前,根据已知抗原特性、抗原与抗体反应特点以及结果判定方法的不同,多种抗体活性的测定方法得以建

立。本文对常规抗体效价检测技术和其研究进展,及一些新技术进行简要综述。

1 常规测定方法

1.1 病毒中和试验法(Neutralization Test)

病毒中和试验法是以测定病毒的感染力为基础建立的免疫学实验技术,通过比较病毒受其特异抗体中和后的残存感染力,进而判定样品中和病毒能力。中和试验法极为特异和敏感,可在体内及体外进行。方法主要有如下几种:

1.1.1 体内攻击试验 - 小鼠中和试验 该方法被称为病毒滴度测定的“金标准”^[1]。检测原理 固定病毒倍比稀释抗体法,同时设标准抗体(已知效价的抗体)做平行试验,以测定特异性 IgG 的抗病毒中和效价,将待检样本和标准抗体分别倍比稀释,加等量已知毒力的病毒液摇匀,置合适条件下进行中和反应后,接种小鼠,根据小鼠发病情况,计算中和效价。该方法直接,特异性好、灵敏度高,能真实反映样本的中和效价。

1.1.2 直接细胞病变计数 该方法是针对能使靶细胞产生病变

* 基金项目 广东省中国科学院全面战略合作项目“病毒感染重病救治特效抗体药物技术”(2009B091300101)

作者简介 张佩(1984-),女,硕士,生物制药。电话 0755-27401074, E-mail zhp.smile@gmail.com

[△]通讯作者 郭采平, E-mail gcpzy0402@yahoo.com.cn

(收稿日期 2011-04-10 接受日期 2011-05-05)

的病毒的特异性抗体效价的检测^[5]。通过显微镜观察抗体中和病毒后的细胞病变程度,测定相应样本的特异抗体水平。方法直观,但周期长,而且病变细胞计数会受主观因素影响。

1.1.3 空斑减少实验 (Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT) PRNT 是检验抗病毒中和效价的常用方法^[4-5]。正常细胞在代谢过程中都可以摄入活性染料,但在病毒感染时,细胞则会丧失染料摄取能力,而形成无色的细胞蚀斑。病毒被特异性抗体中和后再感染细胞,细胞蚀斑的形成数量随之减少,因此,就可以根据细胞蚀斑数量的多少计算出该中和病毒的抗体效价。一般定义使空斑减少 50 % 的样品稀释度即为该样品的中和效价,用 Reed-muench 法或 Karber 法计算。常用的染色方法有 琼脂糖-中性红法、甲基纤维素-结晶紫法^[6-7]。

PRNT 是检测和定量已接种牛痘疫苗者体内中和抗体的金标准。Borges MB 等将 182 例有痘苗接种史的受试者按年龄(31~35 岁和 ≥ 35 岁)分为 2 组,对斑点减少中和试验的重复性及可靠性进行横向调查,结果显示该方法具有很好的敏感性(92.7 %)、特异性(90.8 %)和良好的重复性[ICC0.89 (0.88, 0.92)]^[2]。该方法可提供比较可靠的结果,缺点是依赖于人工计数,费时费力。Zielinska E 等提出了用图像分析软件进行斑点自动计数的改良方法,改良后 PRNT 方法和原始 PRNT 方法的检测结果高度相关($r=0.9580$)^[8],同时具有客观、快速及可靠的特点,在疫苗临床试验对中和抗体滴度的评估等多个领域得到推广应用。

1.2 免疫标记技术

结合抗原抗体反应的特异性和标记分子极易检测的高度敏感性,形成了免疫标记技术。免疫标记技术主要有酶标抗体技术、荧光抗体标记技术和同位素标记抗体技术。它们的敏感性和特异性远超过常规血清学方法,其中酶标抗体技术最为简便,应用较广。

1.2.1 酶标记技术 酶标记技术是根据抗原抗体反应的特异性和酶催化反应的高度敏感性而建立起来的一种免疫检测技术^[9]。酶是一种有机催化剂,催化反应过程中不被消耗,能反复作用,微量的酶即可导致大量的催化过程,如果产物为有色可见产物,则更为敏感。二抗与酶标记物交联后仍保持了免疫活性和酶活性。反应液颜色的深浅与被测抗体的量相关,该有色产物可用分光光度计加以测定,能快速测得抗体的效价。用于标记的酶有辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP)、葡萄糖氧化酶等,其中以前两种酶应用最为广泛。酶标记技术根据抗原水平又可分为两种:

(1) 固相水平 - 酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)

原理为:①抗原结合于固相载体表面而不失其活性;②检测时,固相抗原首先与待测抗体结合,后者再和酶标抗体结合,随后加入相应底物后,可催化底物呈显色反应。该方法操作简单,速度快,适合做大规模筛选,但存在非特异结合,易出现交叉反应。

(2) 组织水平 - 中和组织培养酶免疫测定法(Neutralization Tissue-culture Enzyme Immunoassay, NTC-EIA)

该方法主要步骤 将病毒与连续不同稀释度的检测样品中和,再感染敏感细胞,最后用 ELISA 方法测定残余病毒量,

NTC-EIA 与传统的 PRNT 测量的病毒平均滴度高度相关($r=0.9994$)。研究表明该方法灵敏度非常高(检测限为 10 pfu)^[10]。

上述免疫标记技术中,以 ELISA 发展最快,是检测生物分子抗原和抗体的常用方法。此技术具有敏感、特异、简便、快速、易于标准化和商品化等优点。广泛用于临床检验、医学实验、药物毒物检测等领域,已成为免疫诊断和分子生物学研究中应用最广泛的免疫学方法之一。

1.2.2 荧光抗体标记技术 (Immunofluorescence) 该技术将荧光色素标记在抗体或抗原上,与相应的抗原或抗体特异性结合,最后通过荧光酶标仪进行荧光检测^[11]。荧光强度与检测的抗原或抗体的量相关。荧光色素标记技术灵敏度高,荧光素在 10^{-6} 的超低浓度时,仍可被专门的短波光原激发,在荧光显微镜下可观察到荧光。荧光抗体标记技术是将抗原抗体反应的特异性、荧光检测的高灵敏性、以及荧光检测仪检测技术的精确性三者结合的一种免疫检测技术。该方法同样可分为两类:

(1) 固相水平。抗原结合于固相载体表面,检测时,固相抗原首先与待测抗体结合,后者再和标有荧光的抗体结合。

(2) 组织水平 - 快速荧光灶抑制试验(Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, RFFIT)

RFFIT 是将固定量的病毒与系列稀释的待测血清在体外中和后,加入敏感细胞孵育,最后用荧光标记的抗核蛋白抗体染色,以检测未被中和的残余病毒(荧光灶),最后与病毒对照组比较,计算各种待测血清病毒荧光灶单位减少 50 % 的稀释度,然后与已知滴度的参考血清比较,计算每种待测血清的中和抗体滴度。RFFIT 试验需要的人力、时间、实验室和动物饲养空间均较少,一次可检测多种血清样本,而且通过多次体外 RFFIT 与小鼠体内血清中和试验的比较研究。Vene S 等评估蜱传脑炎疫苗免疫后的抗体反应,实验结果显示 RFFIT 的灵敏度 $>90\%$,该方法被认为是检测蜱传脑炎最特异、有效的方法^[12]。RFFIT 被认为已完全可以取代小鼠血清中和试验,是体外实验代替体内实验的一个典范。

1.2.3 同位素抗体标记技术 其为最早建立的标记免疫测定方法^[13],基本原理是利用标记抗原和非标记抗原对特异性抗体的竞争结合。该方法具有灵敏度高(可测定到 ng 甚至 pg 水平)、特异性强(可分辨结构类似的抗原)和准确性好(ng 量的回收率接近 100 %)等优点。在临床检验中是定量测定微量蛋白质、激素和药物等的首选方法。但因放射性同位素的使用需要特定的检测设备和防护设施,使其应用受到一定限制。

1.3 血凝抑制试验(Haemagglutination Inhibition Test, HI)

血凝抑制试验的基本原理是抗原抗体特异结合后不能再与凝集原结合^[14]。检测时,先将抗原与抗体混合,隔一定时间后再加入新鲜血细胞,此时,因抗体已与先加入的抗原结合,不能再与致敏颗粒血细胞结合,因此不会出现凝集现象。HI 试验操作步骤简单,一般实验室均可操作,灵敏度为 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、经济、快速,在数小时内即可完成大量血清样品的检测,适合一般性的大规模操作。最近,Regina A 等检测抗流感病毒 A 的新变种 H1N1/09,分别采用固相水平免疫荧光抗体标记技术、HI 和中和试验,发现免疫荧光抗体标记技术不适合检测流感 H1N1/09 病毒,而 HI 和中和试验,对该病毒的敏感性接近,且检测结果

接近^[14]。Regina A 还提出了在疫苗接种后免疫反应不易分析的情况下,应优先考虑 HI 试验的观点。

此外,其他研究也证明 HI 检测 H1N1 特异性抗体与中和试验有相似的结果^[15-17]。如,Stephenson I 等比较用于检测抗流感病毒中和抗体的 HI 试验和病毒中和试验的可重复性,分别用这 2 种方法对 8 个国家 11 个实验室的参与者血清进行了检测,总体而言,同一实验室内用 HI 测定的抗体滴度基本一致^[15]。

1.4 双向免疫扩散技术

该技术的基本原理为抗原抗体在同一凝胶内扩散相遇后形成特异性的沉淀线。将抗原与抗体分别加入同一凝胶板中两个相隔一定间距的小孔内,使两者进行相互扩散,当抗原抗体浓度之比相适宜时,彼此相遇形成一白色弧状沉淀线^[18]。具体操作 将玻璃板用水洗净后用 75 %乙醇冲洗,晾干后放在水平台上备用。将 1 %琼脂融化后,置 56 °C 水浴在玻璃板上铺胶,约 1.5 mm 厚,凝固后打孔(直径 3 mm),孔间距 10 mm。抗血清(抗体预先作系列倍比稀释即 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 等比例)。凝胶板置湿盒内,室温扩散 24 h。观察结果,以出现沉淀带的血清最大稀释度为抗体效价,多用于临床抗体效价检测。在一些实验室初步探讨免疫球蛋白效价时也经常用到。如中国人民解放军军医学院毒物研究所初步检测呼吸道合胞病毒重组疫苗的抗血清效价^[18]。采用双向免疫扩散技术测得抗血清效价为 1:64,同时通过重组蛋白与血清抗体间形成单一的沉淀线反映重组蛋白具有良好免疫反应性。该技术简便,经济,可大规模检测,但灵敏度较低(<1 mg/L)、易出现假阴性结果。

2 各技术特点及应用比较

上述检测方法的特点及其应用情况归纳如表一所示。小鼠中和法特异性最强,能真实的反应特异性抗体效价,是 WHO 推荐的检测特异抗体效价的标准方法,在实际应用中通常作为评价疫苗、验证其他方法的标准方法。PRNT 在目前临床、疫苗评价、各种病原体中和抗体检测的研究中应用得较多。HI 较 PRNT 操作简单,经济、容易普及,但灵敏度不高,特异性会受一些因素影响,在流感中和抗体检测的研究中使用较广泛。从抗原固定方式来看,组织水平的免疫标记技术如 NIC-EIA、RFFIT,特异性较固相水平好,如 Regina A 反应固相水平的荧光标记技术检测流感病毒中和抗体不如 HI 法,与 PRNT 法结果的差异大,而且狂犬病毒中和抗体 RFFIT 法得到 WHO 的认可,较小鼠中和法和 PRNT 周期短,可大规模操作,而且结果读取可自动化,减少主观性带来的偏差^[14]。固相水平的免疫标记技术,特异性受固相结合的抗原及其他一些因素的影响,存在交叉反应,易出现假阳性,但不需要接触活病毒安全系数高,而且易操作,速度快,自动化读取结果,可大规模操作,适合高通量筛选,初步检测抗体效价,如特异性免疫球蛋白的原料血浆的筛选。双向免疫扩散,方法简单,经济,容易普及,适合基层和初步检测。

综合来看,以上这些方法各有其优缺点,结合各技术的特点,在实际应用中可根据不同检测目的,选择合适的方法或不同方法组合。

3 新技术在特异性抗体效价检测中的应用

3.1 荧光基因标记技术

运用现代的分子生物学技术,将一些标记基因如荧光蛋白基因重组到病毒株上形成的带有标记的工程病毒株,实现荧光基础微量中和试验检测未被中和的残余病毒,进而计算特异抗体的效价,适合高效筛选。

Wang Z 等利用表达 GFP 的人巨细胞病毒重组体建立了荧光基础微量中和试验,并与传统的 PRNT 进行比较,回归分析显示,两种方法的关联度 $r^2 \geq 0.92$ ^[19]。该方法适于检测所有能标记加强 GFP 的病毒,实现了自动化操作,适用于大规模样本的检测。

3.2 酶基因标定技术

Kolokoltsov AA 等报道了检测抗委内瑞拉脑炎病毒中和抗体的新方法,其中一种就是基于荧光素酶的检测方法,这是一种新的快速的病毒测定法,主要是对病毒与细胞膜融合时释放放入细胞的病毒荧光素酶进行实时检测,在病毒与细胞接触后 15 min 内就可以检测到相应信号^[20]。

Manischewitz J 等利用人 β 半乳糖苷酶 β -gal 基因重组到病毒株上形成带有酶标记的工程病毒株,通过酶反应能快速检测未被中和的残余病毒,进而计算出样本的抗体效价^[21]。

以上两种方法都是用分子生物学技术构建的假病毒试验,适合高通量筛选,但是对于各个亚型抗体的鉴别则还需用传统的 PRNT 和其他试验进一步验证。

4 展望

小鼠中和法是 WHO 推荐用于检测特异抗体效价的标准方法,但周期长、难以大规模操作,难以在临床和生产中推广。PRNT 等体外实验特异性强,保留小鼠中和法的优点,仍存在周期长,试验条件要求高等缺点,难以大规模操作。固相水平的 ELISA、免疫荧光等体外实验,存在特异性不强易出现假阳性的缺点,但操作简单、灵敏度高、速度快,易商品化、适合高通量筛选。随着组织水平的免疫标记技术、单克隆抗体技术和其他新技术的发展,体外实验的特异性逐渐得到提高。适合大规模操作的体外实验代替体内实验将是发展的趋势,到目前为止,有些体外实验特异性灵敏度接近小鼠中和试验,如《中华人民共和国药典(2010 版)》中收录的乙型肝炎免疫球蛋白放免法及 WHO 推荐的狂犬病毒中和抗体首选滴定法 RFFIT^[2]。

近年来,现代分子生物学技术在病毒诊断、药物筛选、中和抗体效价检测等领域广泛应用,如体外合成抗原代替全病毒用于 ELISA,构建报告基因重组病毒和假病毒用于检测^[19-21]。该技术具有检测直观,结果易于量化,客观准确等优点,适合高通量筛选,在抗体效价检测方面将也是一个重要的发展趋势。

参考文献(References)

- [1] 国家药典委员会编 中华人民共和国药典[M].2010 版.第 3 部.北京:中国医药科技出版社,2010,192-234
National Pharmacopoeia Committees. Pharmacopoeia of the Peoples Republic of China. [M]. 2010 Edition, Part 3, Beijing: China Medical Science Press, 2010,192-234(In Chinese)
- [2] Borges MB, Kato SE, Damaso CR, et al. Accuracy and repeatability of a micro plaque reduction neutralization test for vaccinia antibodies[J]. Biologicals, 2008,36(2):105-110

表 1 特异性抗体效价检测方法的比较

Table 1 Comparison of different methods of specific antibody titers testing

Classification			Characters	Applications & Researches	References
Neutral-ization Tests	In vivo	MNT	Powerful specificity, high sensitivity, veracity, taking 2~4 weeks, requirement of live virus and animals, small-scale assays, manual counting, and the method being difficult to manage.	The standardized method of virus neutralization assays for antibody titers recommended by WHO. Quantitative test of antibody titers to venom, rabies, tetanus and et al, Assessing vaccine response.	[1]
			High specificity, sensitive, veracity, taking of 1~2 weeks, requirement of live virus and cell culture, small-scale assays, manual counting, and the method being difficult to manage.		
	In vitro	CPE	This method is applicable for the virus inducing the CPE.	Titer end point dilution method	
			High specificity, high sensitivity (1 pfu), veracity, taking 1~2 weeks, requirement of live virus and cell culture, small-scale assays, manual counting or semi-automatic counting, and the method being difficult to manage.		
	Tissue-level Antibodies Tests	PRNT	High specificity, high sensitivity (<1 ng/L), veracity, taking 3~4 days, requirement of live virus and cell culture, large-scale assays; automatic measuring the results, objectively.	The standardized method of virus neutralization assays for antibody titers recommended by WHO; Testing neutralizing antibody titers against SARS	[5] [6]
			High specificity, high sensitivity (<1 ng/L), veracity, taking 3~4 days, requirement of live virus and cell culture, large-scale assays; automatic measuring the results, objectively.		
NTC-EIA		High specificity, high sensitivity (<1 pg/L), reliable, taking 3~4 days, requirement of live virus and cell culture, large-scale assays; automatic measuring the result, objectively.	Smallpox Vaccination assessment	[10]	
		RFFIT	Specificity is easily affected by antigen, prone to false-positive, sensitivity (<1 ng/L), taking about 3 hours, large-scale assays, automatic measuring the results, objectively, safely.		Testing Rabies neutralizing Antibody titers; Tick-borne encephalitis Vaccination assessment
Immuno Labeled Assay	ELISA	Specificity is easily affected by antigen, prone to false-positive, sensitivity (<1 pg/L), taking about 3 hours, large-scale assays; automatic measuring the results, objectively, safely.	Screening tests for antibodies to Cytomegalovirus; diagnosis of Cytomegalovirus (CMV) infection.	[9] [3]	
		Specificity is easily affected by antigen, prone to false-positive, sensitivity (<1 pg/L), taking about 3 hours, large-scale assays; automatic measuring the results, objectively, safely.			
	Sol-id-phase Antibody Tests	Im-munofluo-rescence	Specificity is easily affected by antigen, prone to false-positive, sensitivity (<1 pg/L), taking about 3 hours, large-scale assays; automatic measuring the results, objectively, safely.	Highly quantitative serological detection of anti-CMV antibodies	[11]
		Isotope labeling Antibod-ies	Specificity is easily affected by antigen, prone to false-positive, sensitivity (<1 pg/L), taking about 3 hours, large-scale assays; automatic measuring the result, objectively and safely.	Highly quantitative serological detection of anti- Hepatitis B immunoglobulin antibodies	
Double Immunodiffusion	HI	Specific, sensitivity (0.1 μ g/L), rapid, large-scale assays; the method being easy to manage.	Highly-quantitative serological detection of anti- influenza antibodies	[15] [16]	
		Sensitivity (<1 mg/L), taking 24 h, large-scale assays; requirement of live virus, the method being easy to manage, economic, large-scale operation, being suitable for primary detection.			
				Quantitatively serological detection of anti-RSV antibodies	[18]

[3] Grnt PCA, Ronalds CJ, Kangro HO. Screening tests for antibodies to cytomegalovirus: an evaluation of five commercial products[J]. J Clin Pathol, 1985,38:1059-1064

[4] Morens DM, Halstead SB, Repik PM, et al. Simpli?ed plaque reduc-

tion neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells:comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization[J]. J Clin Microbiol, 1985,22:250-254

[5] Orr N, Forman M, Marcus H, et al. Clinical and immune responses af-

- ter revaccination of Israeli adults with the Lister strain of vaccinia virus[J]. J Infect Dis, 2004, 190:1295-1302
- [6] Wang S, Sakhatkyy P, Chou TH, et al. Assays for the assessment of neutralizing antibody activities against Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) associated coronavirus (SCV)[J]. J Immunol Methods, 2005, 301(1/2):21-30
- [7] 蒋虹, 乔红伟, 佟巍, 等. SARS-CoV 细胞空斑试验[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(8):65-66
JIANG Hong, QIAO Hong-wei, TONG Wei, et al. Plaque Assay in SARS-CoV Titration [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2009, 19(8):65-66 (In Chinese)
- [8] Zielinska E, Liu D, Wu HY, et al. Development of an improved microneutralization assay for respiratory syncytial virus by automated plaque counting using imaging analysis[J]. Virol J, 2005, 2(84). <http://www.virologyj.com/content/2/1/84>
- [9] Alexander PI, Eugenia MD. ELISA as a possible alternative to the neutralization test for evaluating the immune response to poliovirus vaccines. Expert Rev Vaccines, 2005, 4(2), 167-172
- [10] Osnat E, Udy O, Shlomo L. Development of a tissue-culture-based enzyme-immunoassay method for the quantitation of anti-vaccinia-neutralizing antibodies in human sera [J]. Journal of Virological Methods, 2005, 130:15-21
- [11] Peter DB, Alexandra TI, Kathryn HC. Highly quantitative serological detection of anti-cytomegalovirus (CMV) antibodies [J]. Virology Journal, 2009, 6(45). <http://www.virologyj.com/content/6/1/45>
- [12] Vene S, Haglund M, Lundkvist A, et al. Study of the serological response after vaccination against tick-borne encephalitis in Sweden[J]. Vaccine, 2007, 25(2):366-372
- [13] 曾常茜, 陶志华, 吕世静. 临床免疫学检验实验指导[M]. 第二版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010
ZENG Chang-qian, TAO Zhi-hua, LV Shi-jing. Guideline of clinical immunology experiments [M]. Second Edition. Beijing: China Medical Science Press, 2010, 63-67 (In Chinese)
- [14] Regina A, Janina G, Annemarie B. Determination of serum antibodies against swine-origin influenza A virus H1N1/09 by immunoXuoescence, haemagglutination inhibition, and by neutralization tests: how is the prevalence rate of protecting antibodies in humans? [J]. Med Microbiol Immunol, 2010, 199:117-121
- [15] Stephenson I, Das RG, Wood JM, et al. Comparison of neutralizing antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study [J]. Vaccine, 2007, 25 (20): 4056-4063
- [16] Doerr HW, Allwinn R, Cinatl J. Against the new H1N1 Influenza (swine Influenza): vaccinate or don't vaccinate (all)? That is currently the question[J]. Infection, 2009, 37(5):379-380
- [17] Greenberg ME, Lai MH, Hartel GF, et al. Response to a monovalent 2009 influenza A (H1N1) vaccine [J]. N Engl J Med, 2009, 361(25): 2405-2413
- [18] 梅兴国, 范昌发, 龚伟, 等. 用于预防、诊断和治疗呼吸道合胞病毒感染的嵌合抗原及其抗体[P]. 中国. 200510009119.6. 2009-8-19
MEI Xing-guo, FAN Chang-fa, GONG Wei, et al. The chimeric antigen of RSV and its antibody for prevention, diagnosis and therapy of respiratory syncytial virus [P]. China. 200510009119.6. 2009-8-19 (In Chinese)
- [19] Wang Z, Mo C, Kemble G, et al. Development of an efficient fluorescence-based microneutralization assay using recombinant human cytomegalovirus strains expressing green fluorescent protein [J]. J Virol Methods, 2004, 120(2):207-215
- [20] Kolokoltsov AA, Wang E, Colpitts TM, et al. Pseudotyped viruses permit rapid detection of neutralizing antibodies in human and equine serum against Venezuelan equine encephalitis virus [J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 75(4):702-709
- [21] Manischewitz J, King LR, Bleckwenn NA, et al. Development of a novel vaccinia-neutralization assay based on reporter-gene expression [J]. J Infect Dis, 2003, 188:440-448