

微量免疫酶染色检测斑疹伤寒 IgM、IgG 抗体

耿 峪* 赵允祺 路景世 杨崇华

(第四军医大学唐都医院传染科,西安 710038)

摘要 本文介绍了微量免疫酶染色 (Micro-IP) 检测斑疹伤寒 IgM、IgG 抗体的方法, Micro-IP 与临床诊断的符合率为 78.9%。IgM 抗体早于第四病日阳性, 第一周阳性率达 76.2%, 适于早期诊断。检测 IgG 抗体适于流行病学调查。Micro-IP 检测免疫免及患者血清抗体为群特异性(对普氏及莫氏立克次体均反应)。

关键词 斑疹伤寒;微量免疫酶染色;微量免疫荧光

以免疫过氧化物酶技术 (IP) 检测立克次体 IgM、IgG 抗体仅见于恙虫病^[1]的报道, 在斑疹伤寒方面主要应用微量免疫荧光 (Micro-IF)^[2,3]。IP 与 IF 具有同样的敏感性和特异性^[4], 但 IP 不需荧光显微镜, 更易于普及应用。本研究集 IF 微量法和 IP 简便之优点, 建立了斑疹伤寒微量免疫酶染色 (Micro-IP) 方法, 检测 IgM、IgG 抗体, 并与 Micro-IF 作了比较。结果报道如下。

材料和方法

(一) 抗原及免疫血清

斑疹伤寒群(普氏及莫氏)、斑点热群(北亚热及精河株)及 Q 热 (II 相) 立克次体颗粒性抗原及相应免疫血清, 分别由成都生物制品研究所及军事医学科学院提供。

* 现在单位: 解放军 302 医院微生物研究室。

(二) 血清标本

临床诊断斑疹伤寒患者 78 例, 血清 139 份, 于 1984—1986 年采自本院及辽阳市传染病院住院及随访患者。健康人血清 134 份采自西安及长春市农民献血员。上述血清标本加硫柳汞至 1:10000, 储存于 -20°C 。

(三) 酶结合物

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗人 IgM (μ 链)、羊抗人 IgG 及羊抗兔 IgG 血清, 分别由解放军 302 医院、军事医学科学院及北京生物制品研究所提供。

(四) 微量免疫酶染色检验方法

普氏、莫氏立克次体抗原液各为干重 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (含等量 10% 鸡胚卵黄囊液)

↓
用钢笔尖蘸取抗原液 (莫、普), 分别点于 12 格载片上, 丙酮固定 10min

↓
分加稀释的待检血清于各抗原点上

↓
加酶标抗体; 然后加底物 (DAB) 染色

↓
立克次体染成棕褐色为阳性。

(五) 对照试验

Micro-IF 见文献 [4]。

结 果

(一) 试验影响因素

抗原悬液中加入卵黄囊液有助于抗原点的粘附、定位及背景衬托, 减少非特异性着色。抗原用量以 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 干重为宜, 若增至 300—400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 立克次体过于密集, 不易分清个体, 若减至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下, 立克次体着色较少, 效价降低。抗原悬液经分级离心洗涤后, 既可除去可溶性抗原, 减少背景着色; 又可去除聚集成堆的立克次体, 镜下呈个体分散的立克次体着色, 清晰可辨。

(二) 特异性检验

以稀释液、染色中不加第一抗体及正常卵

黄囊作空白对照; 以正常兔血清, 非流行区健康人血清作阴性对照, 立克次体不着色或着色甚浅。IgM 抗体阳性的 8 份患者血清, 以 0.2mol/L 2-ME (2-巯基乙醇) 处理后 IgM 抗体效价下降 8—64 倍, 几何均数效价 (GMT) 下降 16 倍。

(三) 群、型特异性测试

将斑疹伤寒群 (普氏及莫氏)、斑点热群 (北亚、精河) 及 Q 热 II 相五种立克次体颗粒性抗原分别点于同一张载玻片的同一格内, 同时测定相应免疫抗体, Micro-IP 只对同群免疫血清呈阳性反应, 群内两型 (普氏、莫氏) 效价相等或相差小于 4 倍, 表明 Micro-IP 为群特异性。

以普氏及莫氏两型抗原同时测定斑疹伤寒患者 IgM、IgG 抗体, 两型效价相等或相差 2 倍者占 60% 以上, 而两型效价相差 ≥ 4 倍的血清中, 普氏高于莫氏和莫氏高于普氏者, 两种抗体均各占一部分, 而以上病例经微量凝集试验 (MA) 证实均为鼠型斑疹伤寒^[5], 流行病学资料及临床表现也符合鼠型特点。

(四) 健康人抗体水平及诊断阈值

检测西安地区健康人血清 113 份, IgM1:16 阳性 6 份 (5.3%), IgG1:16—1:128 阳性 73 份 (64.6%)。长春地区 21 份血清中仅 2 份 (9.5%) IgG1:16—1:32 阳性、IgM 均阴性。Micro-IP 与 Micro-IF 的符合率, IgM 为 97.3%, IgG 为 96.4%。以上结果表明 Micro-IP 检出的抗体为特异性反应, 系由于斑疹伤寒隐性或既往感染所致。根据健康人抗体水平选定诊断效价, 单份血清或双份血清之一 IgM $\geq 1:32$, IgG $\geq 1:256$, 或双份血清 IgG 抗体效价 4 倍增长并达 1:128。非流行区降低一个滴度。

据此标准, 检测流行性出血热、伤寒、钩端螺旋体病等非斑疹伤寒患者血清 50 份, 均未检出有诊断意义的 IgM 或 IgG 抗体。

(五) Micro-IP 与临床诊断的符合率

检测 71 例临床诊断斑疹伤寒现症患者血清 IgM、IgG 抗体, 其中双份血清 51 例, 阳性 44 例; 单份血清 20 例, 阳性 12 例。与临床诊断的

符合率分别为 86.3% 和 60.0%。总符合率为 78.9%。

(六) 斑疹伤寒抗体动态变化

IgM 抗体最早于第四病日阳性, 第一周阳性率达 76.2%, GMT 已达诊断水平。第二周阳性率达 93.2%, GMT 达高峰, 第三周全部阳性。效价开始下降, 可持续至 9 个月。IgG 抗体较 IgM 产生、下降为晚(图 1)。

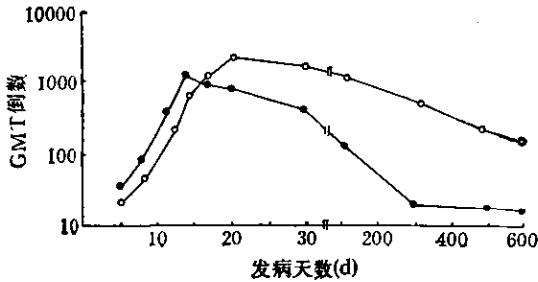


图 1 不同病程斑疹伤寒 IgM、IgG 抗体动态变化
●—● Micro-IP-IgM ○—○ Micro-IP-IgG

(七) Micro-IP 与 micro-IF 的比较

两法共同检测 67 例均阳性 53 例, 均阴性 17 例, 符合率达 100%。检测 IgM、IgG 抗体两法效价相等或仅相差 2 倍者均占 80% 以上。结果表明 Micro-IP 与 Micro-IF 具有较好的一致性。

讨 论

本研究介绍了斑疹伤寒 Micro-IP 染色方法, 探讨了试验影响因素。经各种阴性对照, 2-巯基乙醇 (2-ME) 耐性试验以及与 Micro-IF 比较, 结果表明, Micro-IP 检测斑疹伤寒 IgM、IgG 抗体具有较好的特异性。

检测斑疹伤寒等立克次体病 IgM、IgG 抗体, 国内外主要应用 Micro-IF, 其敏感性高, 特异性好, 成为评价其它方法的可靠技术。本文结果表明 Micro-IP 与 Micro-IF 具有较高的一致性, 抗体效价水平也很相近。但前者较后

者更为简便, 适于一般临床实验室应用, 而且标本可长期保存, 便于复查。

Micro-IP 检测 IgM 抗体, 第一周阳性率达 70% 以上, 抗体 GMT 已达诊断水平, 单份血清多有诊断价值, 而 IgG 抗体或其它血清学方法多需检测双份血清。3 例患者未检出 IgM 抗体, 而发病早期即可检出高效价 IgG 抗体, 落矶山斑点热也有此现象^[2], 与疫苗接种或既往感染有关。

以 Micro-IP 检测流行区健康人 IgG 抗体, 阳性率 (1:16—1:128) 达 60% 以上, 而非流行区则很低, 流行区健康人 IgM 抗体呈 1:16 阳性者 6 份 (53%), 其 IgG 抗体呈 1:64—1:128 阳性, 可能为近期曾受斑疹伤寒立克次体感染。选定现症患者诊断效价时, 应根据当地健康人抗体水平而定。

检测不同群、型立克次体免疫兔及患者血清, 结果表明 Micro-IP 为群特异性。通常认为 Micro-IF 只对小白鼠抗血清呈型特异^[4]。免疫酶染色检测斑疹伤寒抗体亦为群特异^[4]。Micro-IP 虽不能区别流行性与鼠型斑疹伤寒, 但同时应用两种抗原, 在病程早期 IgM 抗体效价较低时, 可以提高检出率。

Micro-IP 的主要优点是, 可以在同一张载玻片上同时应用两种或多种抗原, 测定一份标本中某种未知抗体, 以区别同一疾病的不同群、型, 也可试用于几种易混淆的传染病早期诊断和鉴别诊断, 并且可节省试剂、时间和工作量。

参 考 文 献

1. Yamamoto S, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 15: 1128, 1982.
2. Philip RN, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 3:51, 1976.
3. Ormsbee R et al.: *Am. J. Epidemiol.* 105:261, 1977.
4. 耿峪等: 中华医学检验杂志, 11(1): 25, 1988.
5. 耿峪, 赵允祺: 中国人兽共患病杂志, 2(4): 49, 1986.
6. 魏曦主编: 医用立克次体学, 第 109—149 页, 1984.

DETECTION OF IGM AND IGG ANTIBODIES OF TYPHUS FEVER BY MICROIMMUNOPEROXIDASE

Geng Yu Zhao Yunqi Lu Jingshi Yang Chonghua

(*Department of Infectious Disease, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038*)

Microimmunoperoxidase (Micro-IP) test was established for detection of IgM and IgG antibodies of typhus fever. 71 cases with clinically diagnosed typhus fever were examined and the positive rate was 86.3% for paired sera and 60.0% for single sera. The results coincided with those of Micro-IF in all cases. IgM can be detected as early as 4th day after onset and persisted as long as 9 months. 76.2% sera showed positive reaction in the first week post onset. Micro-IP showed group specificity to sera from immunized rabbits and the patients with typhus fever. The advantages of Micro-IP were simple, rapid, sensitive, specific and economic for reagents and time.

Key words Typhus fever; microimmunoperoxidase; microimmunofluorescence