

间接免疫荧光试验应用于钩端螺旋体病的血清学诊断

苏州医学院流行病学教研组

(苏州)

表 1 190 例钩体病人感染的血清型分布

血清群	血清型	例数	共计
黄疸出血	沃尔登	1	43
	——*	42	
爪哇	爪哇	16	20
	——*	4	
犬	犬	4	22
	未定型**	1	
	——*	17	
秋季	摩尔斯	10	24
	班金南	3	
	A。	1	
	未定型**	2	
	——*	8	
澳洲	澳洲	2	4
	——*	2	
波摩那	波摩那	2	4
	——*	2	
流感伤寒	临 6	8	18
	未定型**	6	
	——*	4	
七日热	七日热	10	22
	中和	2	
	——*	10	
巴达维亚	巴叶赞	20	26
	未定型**	5	
	——*	1	
致热	——*	1	1
未定	——*	6	6

注: 150 例培养阳性的菌株: 79 株已经型血清鉴定, 14 株只经群血清定群(**), 另 57 株尚未鉴定者与培养阴性者均按凝集试验最高价统计(*)。

本文于 1977 年 8 月 8 日收到。

近年来由于免疫荧光技术的发展, 对不少疾病的诊断采用免疫荧光技术已渐趋成熟, 用本法进行钩体疾病的病原及血清学诊断亦开始受到重视。1963 年 Pillot^[1] 首先用间接免疫荧光试验作钩体病血清学诊断的尝试, 随后今村晋^[2]、沈振黄^[3]、宅见贤二^[4]、Torten^[5]、Hischberg^[6]、Udomsakdi^[7]、Sandhu^[8] 等亦相继报道本法的试用结果。初步显示间接免疫荧光试验为钩体病的血清学诊断提供了一个有应用价值的前景。但现有资料大都观察数量少、取材、技术程序及判断准标等均不统一, 尚须从多方面进一步观察才能作出适当评价。本文报道 190 例钩体病人双相血清间接免疫荧光试验的敏感性、滴度动态、特异性、重复性及与显微镜凝集试验的比较结果。

材料及方法

(一) 血清

从各地收集 190 例钩体病人双相血清 380 份, 其中 150 例诊断根据阳性血培养, 40 例根据双相血清显微镜凝集试验。病人感染的血清型包括 9 个群 12 个血清型(表 1); 另外收集非流行区健康人血清 50 份及 22 例培养及凝集试验均为阴性的“疑似”病人血清 44 份以核反应的特异性。

(二) 显微镜凝集试验

按常规方法进行, 滴度 1:400 以上者为阳性, 双相血清以恢复期血清滴度有四倍以上增长者为阳性, 但如急性期为阴性, 恢复期血清达 1:200 者亦列为阳性。

(三) 免疫荧光试验

1. 荧光抗体: 系异硫氰基荧光黄(FITC)标记之兔抗人 IgG 荧光抗体, 标记抗体对正常人血清的免疫电泳只在 γ 区有一条沉淀线, 按 Kawamura^[9] 法测定 FITC 浓度为 215.2 微克/毫升、蛋白

含量 24.8 毫克/毫升、F/P 克分子比值为 3.5、按 Beutner^[10] 法以琼脂扩散试验测定其滴度为 4 单位/毫升，用已知阳性病人血清作方阵滴定其平切终点 (Plateau end-points) 为 1:32，实际染色时采用 1:8 稀释作为工作浓度。

2. 抗原：采用多价混合抗原作为基底，将各型钩端螺旋体菌液按常规方法培养。取菌龄 5—8 天生长良好的培养液按各地的菌型分布决定抗原的组成，一般以 4—5 个血清型的菌液等量混合，混合后用接种环取少量菌液涂于玻片上，待干后于室温下用丙酮固定 5 分钟备用。

3. 染色方法：被检血清 56℃ 30 分钟灭活，用磷酸盐缓冲液倍比稀释从 1:50—1:6400，分别滴加在抗原涂片上置于湿盒内 37℃ 结合 40 分钟，用缓冲液洗涤 15 分钟换洗液 3 次，滴加荧光抗体一大滴置湿盒内 37℃ 结合 30 分钟，冲掉荧光抗体，以缓冲液洗涤 15 分钟，待干，加 pH 9.5 缓冲甘油封装镜检。

4. 抑制试验及阴性血清对照：为保证反应

结果的特异性，处理每批血清时均设抑制试验及阴性血清对照。

5. 光源、滤光片及显微镜：用 250 瓦超高压汞灯作为激发光源，加 BG₁₂ 及 OG₁ 滤片以 BV 系蓝紫光加暗视野集光器镜检，一般用 10 × 10 或 10 × 20 倍观察钩端螺旋体的形态即可分辨清楚。

6. 结果判定：钩端螺旋体的形态特殊，结合形态及染色亮度进行判断其标准如下：① 菌体稍膨胀，呈明亮的淡绿色 +++，② 菌体清晰，呈明亮的淡绿色 ++，③ 菌体能分辨清楚、亮度稍暗 +，④ 菌体模糊或形态不典型、亮度差 ±，菌体看不到—。以 + 作为判定终点，滴度 1:100 以上者为阳性，双相血清以恢复期血清滴度较急性期呈四倍以上增长者为阳性。如急性期为阴性则恢复期滴度达 1:100 者亦列为阳性。

结 果

190 例钩体病人血清标本的荧光试验及显微镜凝集试验结果列于表 2，其中 186 例血清荧光

表 2 钩体病例恢复期血清荧光试验及凝集试验滴度分布

试验名称	检查数	滴 度										阳 性		几 何 平均值
		—	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	数	(%)	
荧光 试验	190	4	5	20	33	28	52	36	10	2	—	181	95.2	1:527
	100.0	2.1	2.6	10.5	17.3	14.7	27.3	18.9	5.2	1.0	—			
凝集 试验	190	9	—	9	10	29	16	29	47	32	9	162	85.2	1:1588
	100.0	4.7	—	4.7	5.2	15.2	8.4	15.2	24.7	16.8	4.7			

注： $\chi^2=11.17, df=1, P<0.001$ 。

表 3 138 例血培养阳性病人 276 份双相血清荧光试验滴度

病 日 (天)	检查数	荧 光 试 验 滴 度										阳 性 (%)	几 何 平均值
		—	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400			
1—3	96	54	11	15	7	7	—	1	1	—	32.2	1:136	
4—7	41	19	6	10	2	3	1	—	—	—	39.2	1:117	
8—14	7	1	—	2	1	1	—	1	1	—	85.7	1:399	
15—21	70	1	2	4	17	11	14	14	5	2	95.7	1:562	
22—28	36	1	1	2	8	5	14	5	—	—	94.4	1:478	
29以上	26	1	—	5	3	5	3	8	1	—	96.1	1:513	

△ 150 例培养阳性病人中有 12 例发病或采血日期记录不完整未列入本表统计。
不同病期的阳性率 $\chi^2=112.24, df=5, P<0.001$ 。

试验的滴度在 1:50—1:6400 之间,几何平均值为 1:527,其中 5 例表现为 1:50 低滴度,4 例在 1:50 稀释时未能检出抗体。滴度达 1:100 以上阳性标准者有 181 例,阳性检出率 95.2%,漏检者占 4.7%。显微镜凝集试验有 181 例检出凝集抗体,滴度在 1:100—1:12800 之间,几何平均值为 1:1588,滴度达 1:400 以上阳性标准者 162 例,阳性检出率 85.2%,滴度在 1:200 以及阴性者占 14.7%。

病人血清荧光试验滴度的按日分布见表 3;表中结果显示血清中的免疫荧光抗体出现较早,滴度随发病日期增长而增高,至第四周达最高值。如以 1:100 以上作为荧光试验的阳性标准,则在发病的 1—3 天、4—7 天、第二、三、四周的阳性率分别为 32.2%、39.2%、85.7%、95.7%、94.4%,滴度的几何平均值亦随发病日期增长而增高至第三周达最高值(1:562),逐后又有下降趋势。

表 4 比较了两种血清学方法在钩体病例双相血清标本中抗体增长的动态:恢复期血清荧光试验滴度较急性期呈四倍以上增长者有 128 例(占 85.3%),滴度增长两倍者 10 例(6.6%)、滴度无动态者 6 例(3.9%),另 6 例为阴性。150 例钩体病双相血清显微镜凝集试验中有 124 例(82.6%)的恢复期血清滴度较急性期呈四倍以上的增长,

6 例增长不足四倍,2 例无动态,18 例为阴性。上述结果说明钩体病人血清中的荧光试验抗体在病程中有明显的动态变化,多数病例恢复期血清的滴度较急性期呈现有意义的增长。

在疾病不同时期荧光试验与显微镜凝集试验检出情况的比较结果列于表 5;结果显示从第二病周以后两种血清学试验结果相符者占 80% 左右,但在第一病周两法的符合率较低,其原因大都由于荧光试验的阳性率在第一时间时高于显微镜凝集试验所致,这一结果提示,荧光试验抗体的出现较凝集抗体出现为早。

表 6 为钩体病人恢复期血清荧光试验与显微镜凝集试验滴度间关系的比较,经计算其等级相关系数为 0.25、显著性检验 $P < 0.01$ 差别非常显著,提示两法的滴度存在着一定程度的正相关。

为考核荧光试验的特异性,采取非疫区健康人血清 50 份及 22 例显微镜凝集试验及血培养均为阴性的“疑似”病人血清 44 份进行试验。结果前者有两份(4%)后者有一份出现 1:50 低滴度,未发现滴度达 1:100 以上者。

对荧光试验滴度的重复性亦作了初步观察,以 17 份钩体病人阳性血清用同一批号荧光抗体间隔一个月后重复试验,两次试验的终点滴度相同或相差在一个稀释度以内者 14 份(82.4%),相

表 4 150 例培养阳性钩体病人双相血清荧光试验及显微镜凝集试验滴度

试验方法	检查数	阳 性		二 倍 增 长		无 动 态		阴 性	
		例 数	(%)	例 数	(%)	例 数	(%)	例 数	(%)
荧光试验	150	128	85.3	10	6.6	6	3.9	6	3.9
凝集试验	150	124	82.6	6	3.9	2	1.3	18	11.9

表 5 不同病期荧光试验与显微镜凝集试验阳性结果的比较

病 日	检 查 数	荧光 凝集 -	荧光 凝集 +	荧光 凝集 -	荧光 凝集 +	两法符合的 (%)
1—3	96	59	5	26	6	67.7
4—7	41	25	—	14	2	65.8
8—14	7	1	—	—	6	100.0
15—21	70	1	2	13	54	78.5
22—28	36	1	1	6	28	80.5
29以上	26	1	—	5	20	80.7
计	276	88	8	64	116	73.9

表 6 钩体病例血清荧光试验及显微镜凝集试验滴度分布

凝集试验	荧 光 试 验										
	—	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	计	几 何 平均 值
—	3	—	1	1	—	2	2	—	—	9	565.6
1:100	—	—	—	3	2	3	—	—	1	9	544.3
1:200	—	1	—	—	4	4	1	—	—	10	492.3
1:400	—	—	5	8	3	4	7	2	—	29	461.6
1:800	—	1	3	8	—	3	1	—	—	16	237.8
1:1600	—	2	4	4	5	10	2	1	1	29	429.7
1:3200	—	1	3	3	8	14	12	6	—	47	765.4
1:6400	1	—	3	6	5	8	8	1	—	32	559.4
1:12800	—	—	1	—	1	4	3	—	—	9	740.6
计	4	5	20	33	28	52	36	10	2	190	489.3
几 何 平均 值		1055	1543	1015	1414	1763	2357	2111	400	1588	

差两个稀释度者 3 份,首次试验的几何平均值为 1:470。第二次为 1:679($t=1.007$ $P>0.05$)差别不显著,说明在试验条件基本相同的情况下荧光试验的滴度有一定的重复性。

讨 论

根据血培养阳性确诊的钩体病例双相血清荧光试验与显微镜凝集试验比较结果,荧光试验总的效价水平虽低于显微镜凝集试验,但前者无论在阳性检出率或恢复期血清效价增长情况均接近或超过显微镜凝集试验。

对钩体病人血清中抗体动态分析表明,荧光试验抗体较凝集抗体出现为早,在急性期的阳性检出率高于显微镜凝集试验,发病第二周以后两法的敏感性则大体相似,至第四周荧光试验滴度又有下降趋势,提示免疫荧光抗体出现较早,消失亦速。

荧光试验基本上是一种定性反应,为了临床诊断的目的无需很多稀释度,在每批试验中如能设置阳性血清对照则有助于核实试验结果的可靠性与一致性。

Torten (1966), Udomsakdi (1972) 倡用以水生株 Patoc I 为“广谱”抗原作钩体病的免疫荧光试验,经我们初步试用以 Patoc I 株为基底其滴度及检出率均较低,双相血清抗体增长的动态亦不甚明显,采用多价混合抗原可获得较高的检出率。

现有的结果提示:通过对多价抗原适当的组合有可能筛选出敏感性高能检出各型钩端螺旋体感染的多价抗原。

免疫荧光技术的缺点及局限性在于,要求制备良好的荧光抗体及正确地掌握操作技术,钩端螺旋体涂片后在染色过程中较易脱落,这些问题均有待进一步改进解决。

参 考 文 献

- [1] Pillot, J., and Dazambuja, S.: *Ann. Inst. Past.*, 104: 137—141, 1963.
- [2] 今村晋, 芦沢義郎: 日本卫生杂志, 19: 365—368, 1965.
- [3] 沈振黄等: 中华医学杂志, 51 (6): 358—361, 1965.
- [4] 宅见贤二, 山本幸直: 日本传染病学会杂志, 39 (6): 206—209, 1965.
- [5] Torten, M., Shenberg, E., and Van der Hoeden, J.: *J. Infect. Dis.*, 116: 537—543, 1966.
- [6] Hisehberg, N., Durhan, N. E.: *Publ. Hlth. Lab.*, 25: 63—66, 1973.
- [7] Udomsakdi, S. et al.: *J. Med. Assoc. Thai.*, 55: 101—106, 1972.
- [8] Sandhu, T. S. et al.: *Can. J. Comp. Med.*, 36: 34—37, 1972.
- [9] Kawamura, A.: *Fluorescent antibody techniques and their applications*, University of Tokyo Press, Tokyo University Park Press, Baltimore and Manchester, 1969.
- [10] Beuter, E. H., M. R. Spuleveda, and E. V. Barnett: *Bull. W. H. O.*, 39: 587—606, 1968.