

青岛地区供血者巨细胞病毒特异性抗体检测

青岛医学院 赵澄泉 邵济钧

提要 我们采集青岛地区344名供血者单份血清做巨细胞病毒(HCMV)感染状况调查。用IFA测HCMV-IgG, ELISA测HCMV-IgM、HCMV-IgA。其抗体阳性率分别为99.45%、4.65%和3.20%。结果表明青岛地区供血者HCMV感染普遍,活动性感染的发生率高于国外的报道。根据目前的状况,以HCMV-IgG做为筛选供血者的指标是不现实的。

关键词 巨细胞病毒 供血者 特异性抗体 间接免疫荧光试验 酶联免疫吸附试验

输血是HCMV水平传播的主要途径之一。受血者HCMV感染率与供血者的感染状况直接相关。经输血感染HCMV的患者大多无临床症状,但在免疫缺陷者、早产儿、器官移植受者等高危人群常可导致严重危害^[1]。我国是HCMV感染的高发国家,但尚未见到供血者感染状况调查的报道,为此我们应用IFA和ELISA对青岛地区344名供血者血清HCMV特异性抗体进行了检测。

材料和方法

一、毒株: HCMV AD 169由卫生部北京生物制品研究所赠给。细胞: 人胚肺二倍体细胞,系本室建株及传代,应用14~19代的细胞。

二、IFA测HCMV-IgG: 羊抗人IgG荧光抗体由卫生部上海生物制品研究所生产,批号8603,工作浓度1:16。抗原片制备和检测方法见参考文献^[2]。

三、ELISA测HCMV-IgM、HCMV-IgA:

1. 抗原制备: 以0.15M pH7.4PBS将接种毒株并出现90~100%病变的细胞洗三次,刮下悬浮于pH9.75的甘氨酸缓冲液中, -70℃冻融一次,超声波粉碎仪处理2分钟, 4℃, 5000g离心15分钟,上清液即为HCMV抗原,分装,置-70℃冰箱保存备用。用前经方阵滴定,选出最佳稀释度。同法制备正常细胞抗

原。

2. 酶标抗体: HRP标记的鼠抗人IgM单克隆抗体为上海生物制品研究所生产,批号8701,工作浓度1:550。HRP标记的兔抗人IgA抗体,宁波免疫制剂厂生产,批号870101,工作浓度1:30。

3. ELISA步骤: 参照Middeldorp和Levy所述方法^[3,4],并进行了部分改进。在96孔酶标板(上海生物制品研究所赠)内包被已稀释抗原100μl,置37℃1小时后,4℃过夜;每孔加10%胎牛血清100μl,置37℃1小时;加入100μl已稀释血清,置37℃2小时;加入酶标抗体100μl,置37℃2小时。上列各步均用0.5%吐温-20PBS洗4次,每次4分钟。加入底物(联苯二胺)100μl,置37℃半小时后,随即加入2M的硫酸50μl终止反应。最后用ELISA测定仪(490nm)读取OD值。每次实验均设正常细胞抗原、空白、阳性血清及阴性血清对照。每份待测血清加2孔,阴性对照血清加4孔,取均数, P/N>2判为阳性。

四、特异性试验:

1. 2-巯基乙醇(2-ME)阻断试验: 按戴斌等介绍的方法进行^[5]。

2. 特异性抗原阻断试验: 已稀释血清与抗原混合后,37℃2小时,离心取上清做ELISA,阻断率>50%为阻断试验阳性。

3. 交叉试验: IFA测EBV-IgM、IgA和

HSV-I IgM、IgA抗体，操作方法按常规。

4. RF检测：用上海生物制品研究所制备的人IgG致敏的乳胶试剂，检测方法按说明。

五、IFA测抗核抗体(ANA)：大鼠肝印片由青岛医学院附属医院检验科赠，常规操作，血清1:10出现特异性荧光者判为阳性。

六、供血者来源，血清标本处理及最终结果判定：1986年11月~1987年3月在青岛医学院附属医院血库随机采集344个健康供血者(男228名，女116名，年龄20~45岁)的单份血清，存放于-30℃冰箱，集中进行检测。测定HCMV-IgM、HCMV-IgA时，血清均由10% SpA吸收(上海生物制品研究所产品，血清与SpA的比例为1:5)。血清初筛稀释度为1:100，初筛阳性血清做特异性试验，然后做滴度测定。用已知阴性血清筛选出40份HCMV-IgM、HCMV-IgA均为阴性的血清，等量混合做为本试验的阴性对照血清。

结 果

一、IFA测HCMV-IgG抗体：344个供血

者中，仅2人HCMV-IgG阴性(滴度<1:40)，其HCMV-IgM、HCMV-IgA也为阴性。

二、ELISA测HCMV-IgM、HCMV-IgA抗体：344个供血者中HCMV-IgM阳性16人(4.65%)，HCMV-IgA阳性11人(3.20%)，均经阻断试验证实，未出现交叉反应。RF全部阴性。

1. 不同年龄及性别抗体阳性分布：HCMV-IgM阳性率女性高于男性，但卡方检验无显著性差异($P>0.05$)。20~29岁年龄组HCMV-IgM阳性率明显高于30岁以上人群($P<0.05$)，前一年龄组中，女性高于男性($P<0.05$)。HCMV-IgA阳性率在各年龄组及男女间均无显著性差异，见表1。

2. 不同血型供血者抗体阳性分布：统计学处理表明不同血型供血者间HCMV-IgM及HCMV-IgA阳性率均无显著性差异($P>0.05$)，见表2。

3. 阳性供血者HCMV-IgM、HCMV-IgA滴度：供血者HCMV-IgM、HCMV-IgA的滴

表1 供血者各年龄组及男女间HCMV-IgM、HCMV-IgA阳性分布

年龄组 (岁)	HCMV-IgM		HCMV-IgA	
	男	女	男	女
20~29	2/52(3.85)*	6/25(24.00)	1/52(1.92)	0/25(0)
30~39	4/120(3.33)	1/73(1.37)	6/120(5.00)	1/73(1.37)
40~45	2/56(3.57)	1/18(5.56)	0/56(0)	3/18(16.67)
合计	8/228(3.51)	8/116(6.90)	7/228(3.07)	4/116(3.45)

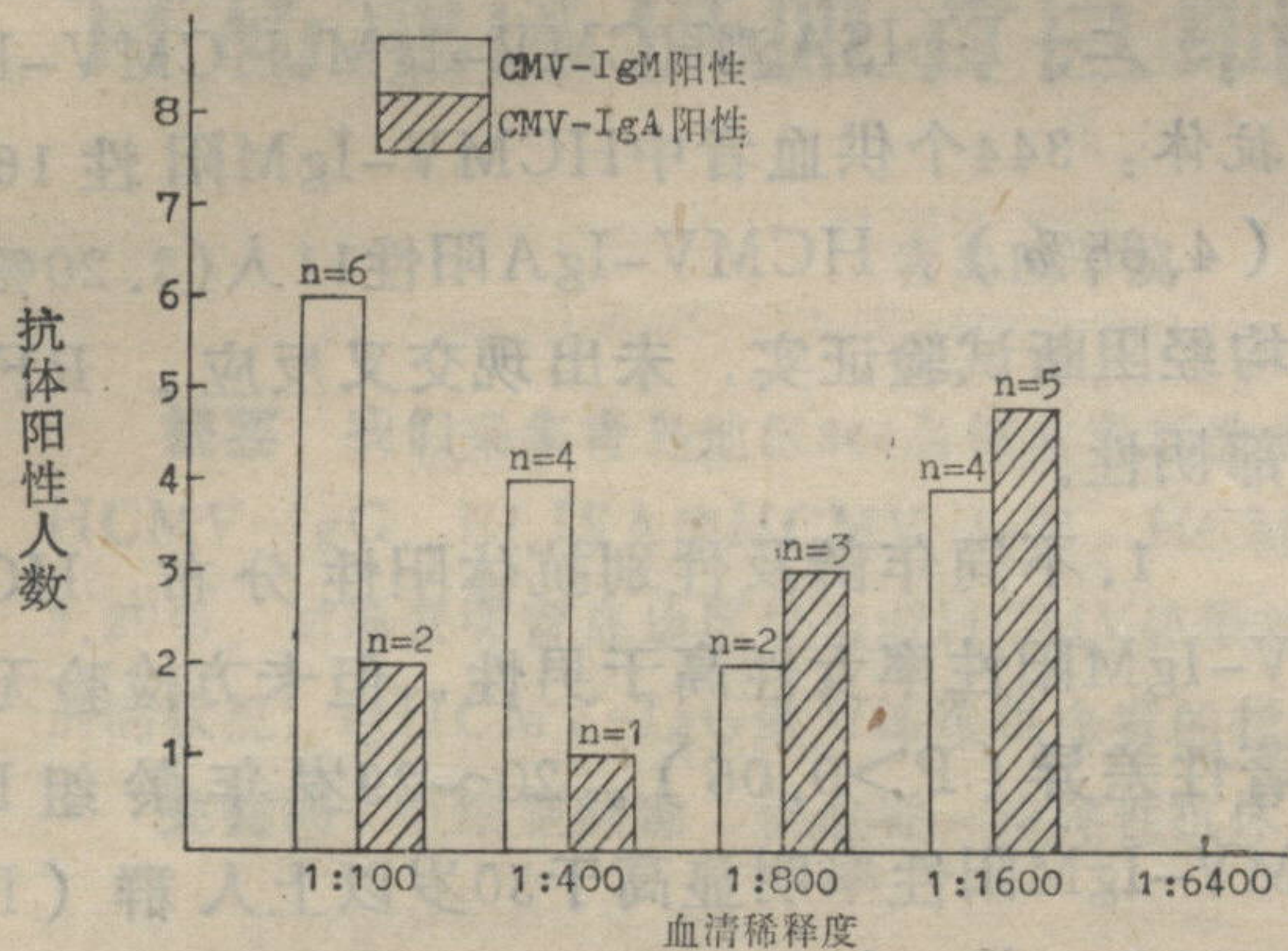
* 阳性人数/检测人数(阳性率%)

表2 不同血型供血者HCMV-IgM、HCMV-IgA阳性分布

血型	HCMV-IgM		HCMV-IgA	
	男	女	男	女
A	1/63(1.59)*	3/37(8.11)	2/63(3.17)	0/37(0)
B	4/79(5.06)	2/36(5.56)	2/79(2.53)	2/36(5.56)
O	3/62(4.84)	2/25(8.00)	1/62(1.61)	1/25(4.00)
AB	0/24(0)	1/18(5.56)	2/24(8.33)	1/18(5.56)

• 同表1

度范围为1:100~1:1600, 几何平均滴度(GMT)分别为366.7和705.3, 无很高滴度者出现, 见附图。



附图 阳性供血者CMV特异性抗体滴度

三、IFA测ANA: 从HCMV-IgG阳性血清中, 随机取86份检测ANA, 结果全部阴性。

讨论

综合国外资料输血传播HCMV感染的发生率约为13.5~54.9%, 并且受血者的感染与供血者的感染状况直接相关。美国和欧洲一些国家约40~80%的供血者血清抗体阳性。我国是HCMV感染高度流行的国家。本文结果供血者抗体阳性率为99.42%, 广州和北京的正常成人抗体阳性率分别为86.7%和95.8%^[6,7]。闻玉梅等检测了181名孕妇, 阳性率为99.45%。结果稍有差异, 可能与不同的地区、不同的人群和不同的检测方法有关。正常个体获输血后HCMV感染常无临床症状, 但对免疫功能低下或缺陷患者却危害极大, 甚至危及生命。许多国家对HCMV抗体阴性者输血时, 已规定选用HCMV抗体阴性的供血者, 以防止HCMV的输血传播。就我国目前情况, 受血者和供血者HCMV抗体阳性率均较高, 阴性者极少, 即便是对高危人群的输血也难以选择阴性供血者, 故必须建立其它选择指标。

IFA测定HCMV-IgG时, 血清中ANA的存在可能引起假阳性。我们对86份HCMV-

IgG阳性血清检测ANA, 结果全部阴性, 故ANA的存在对本文HCMV-IgG的阳性率似无明显影响。

血清中存有HCMV-IgM、HCMV-IgA一般表示有近期感染或活动性感染。输用这种血液极易获输血后HCMV感染。不同国家供血者抗体阳性率不同, 荷兰HCMV-IgM阳性率为0.16%^[9], 挪威Strand报道2种抗体阳性率均为1.81%^[10], 美国Wilhelm检测了119例血清HCMV-IgG阳性供血者, 其中8例HCMV-IgM阳性(6.7%)^[11]。本文结果HCMV-IgM、HCMV-IgA阳性率分别为4.65%和3.20%, 合计阳性率为7.56%, 表明青岛市供血者HCMV活动性感染的发生率较高, 从某种意义上讲, 有相当比例的“正常”供血者是危险供血者。HCMV-IgM总计阳性率在男女间无明显差异。在20~29岁年龄组HCMV-IgM阳性率明显高于30岁以上人群, 可能因为本年龄组女性的阳性率较高(P<0.05)。妊娠能使孕妇体内潜伏的病毒再活动。推测这组人群HCMV-IgM阳性率的增加可能与妊娠有一定关联。血型与HCMV活动性感染之间未发现有意义的关系。

本文HCMV-IgM、HCMV-IgA阳性者估计绝大多数为复发感染。一般认为复发感染中, HCMV-IgA的阳性率高于HCMV-IgM, 本文结果相反, 可能因为试验中所用酶标抗人IgA试剂敏感性低于酶标抗人IgM单克隆抗体。在正常人群中HCMV-IgM、HCMV-IgA的滴度相对较低, 本组阳性者抗体滴度最高为1:1600, GMT分别为366.7和705.3。这也提示这些阳性者绝大多数为非显性复活感染。本文所有阳性者均未发现有诊断意义的临床症状。

鉴于供血者有相当数量的HCMV活动性感染者, 且高危人群一旦输用此种血液可能引起严重后果。因此我们建议对高危人群输血前, 应常规检测供血者血清HCMV-IgM、HCMV-IgA, 剔除阳性者, 以减少HCMV的输血性传播。

Detection of Specific Antibodies to Cytomegalovirus in the Blood Donors in Qingdao Zhao Chengquan, Shao Jijun, Department of Microbiology, Qingdao Medical College

The detection of cytomegalovirus (CMV) infection in the blood donors in China has not been reported the literature available at hands. 344 serum samples from healthy blood donors in Qingdao were examined for the presence of CMV-IgG by IFA and CMV-IgM, CMV-IgA by ELISA. The frequency of positive donors was 99.45%, 4.65%, and 3.20%, respectively. The result showed CMV infection was rather common in the donors, the rate of active CMV infection was also higher than that abroad. We suggest that when blood is transfused to high risk patients, CMV-IgM and CMV-IgA should be examined regularly on donors to exclude or reduce the incidence of transfusion-associated CMV infection. At present it is not practical for CMV-IgG as a screening marker in our country.

Key words CMV Donors Specific antibodies IFA ELISA

参 考 文 献

1. 赵澄泉综述. 输血与巨细胞病毒感染. 国外医学微生物学分

册 1988; 11(2): 53.

2. 戚艺华, 等. 测定人巨细胞病毒特异性抗体四种实验方法的比较. 中华微生物学和免疫学杂志 1987; 7(3): 147.
3. Middeldorp JM, et al. Detection of immunoglobulin M and G antibodies against cytomegalovirus early and late antigen by ELISA. J Clin Microbiol 1984; 20(4): 763.
4. Levy E, et al. Determination of IgA antibodies to human cytomegalovirus by enzyme linked immunosorbant assay. J Med Virol 1980; 6: 249.
5. 戴斌, 等. 用SpA吸收法测定麻疹及风疹特异性IgM的应用. 中华微生物学和免疫学杂志 1983; 3(1): 26.
6. 常汝虚, 等. 广州地区HSV和CMV抗体年龄分布. 中华流行病学杂志 1986; 2(5): 257.
7. 张礼壁, 等. ELISA检测我国儿童的CMV抗体. 首届全国病毒学学术会议论文集. 天津: 1986: 101.
8. 闻玉梅, 等. 酶联免疫法检测巨细胞病毒抗体. 中华传染病杂志 1984; 2(3): 193.
9. 王萃章摘. 巨细胞病毒抗体试验及其临床评价. 国外医学输血及血液学分册 1987; 10(2): 110.
10. Strand QA, Hoddevik GM. The diagnostic significance of specific serum IgA detection in cytomegalovirus infection Arch Virol 1984; 82: 173.
11. Wilhelm JA, et al. The risk of transmitting cytomegalovirus to patients receiving blood transfusions. J Infect Dis 1986; 154(1): 169.

(标本采集过程中, 蒙承青岛医学院附属医院血库董爱兰、辛萍和于英晨同志大力协助, 特此致谢)

一起褐家鼠引起的钩端螺旋体病爆发流行

四川宜宾地区卫生防疫站 杨宗佑 韩凤池

1987年8月下旬至9月上旬, 素称“小乌克兰”的兴文县共乐区发生钩端螺旋体(简称钩体)病爆发流行。波及共乐、水楠、久庆、五星、东阳、鱼跳、同乐七个乡。共发生病例425例, 死亡4例。其中, 共乐乡发病105例, 死亡2例, 占总发病例的24.71%(105/425)。9月上旬我站赴共乐乡处理疫情及进行流行病学调查。

取病程3~6日未经青霉素治疗的10例患者血液

接种改良柯氏培养基培养, 分离到钩体8株。用鼠夹于稻田埂、红薯菜地捕获鼠类和鼬类56只, 分属褐家鼠、黄胸鼠、四川短尾鼬共3种。接种30份标本于含5-氟脲嘧啶改良柯氏培养基培养, 从14只褐家鼠中分离到钩体4株, 15只四川短尾鼬分离2株, 总阳性率为20.0%。经鉴定, 从患者和动物分离的14株钩体均为澳洲型。