

一种快速诊断钩端螺旋体病方法的研究

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所*

时曼华 詹洪 聂一新 阎可廷

提要 应用dot-ELISA和显微镜凝集试验对79份钩端螺旋体病患者血清标本进行检查。结果表明两种方法的符合率为96.19%。20份正常人血清、4份乙型肝炎病人血清和4份出血热病人血清经用dot-ELISA检测均为阴性。我们认为dot-ELISA方法具有简便、快速,适用于诊断钩体病病人。

关键词 钩端螺旋体病 dot-ELISA 显微镜凝集试验

钩端螺旋体病(简称钩体病)是一种世界性分布的人兽共患病。我国分布广泛,流行严重,对人的健康危害极大。目前常规应用血培养分离钩端螺旋体(简称钩体)和血清学试验—显微镜凝集试验(简称显凝试验)诊断病人,但由于耗时数周至一月且需要一套新鲜的活钩体标准菌种(14群15型)以及暗视野显微镜,给基层卫生人员确诊钩体病人带来了一定困难。

Pappas^[1]和Watt^[2]应用dot-ELISA诊断寄生虫感染、利什曼原虫病和钩体病。应用本法检查乙型肝炎表面抗原也获得较好的结果。我们建立了dot-ELISA检测钩体病病人血清并与显凝试验进行了比较。

材料与方 法

一、材料:

1. 钩体抗原:将黄疸出血群赖型70091株接种于Korthof培养基28℃培养七天,离心收集菌体,按侯林浦法^[3]制备超声波抗原,离心弃去沉淀,上清即为钩体抗原,应用紫外线或蛋白浓缩染料测其蛋白浓度55μg/ml,保存于4℃备用。

2. 硝基纤维素膜:采用二种纤维素膜。一种为BA-45孔径0.45μ(德国, Schleicher & Schull),另一种为国产硝基纤维素膜孔径0.45μ(北京化工学校生产)。用时剪成

0.5×0.5cm小块,避免与手接触。

3. 洗涤液:0.02M磷酸盐缓冲液(pH7.2)。

4. 封闭液:0.2% Triton-100 0.02M磷酸盐缓冲液。

5. 结合物:葡萄球菌蛋白A辣根过氧化物酶结合物(SpA-HRP),流研所生产。

6. 显色液:取3mg四氯一萘酚溶于1ml冷甲醇(比例为3:1),避光4℃保存,溶液呈现黄色时不可使用。临用时配制10ml 0.02M磷酸盐缓冲液加入2ml四氯一萘酚贮存液,轻轻混匀后再加入30%双氧水7μl。

7. 塑料凹孔板。

8. 钩体病人血清:由湖南省卫生防疫站提供。病人血清均作显凝试验(14群15型),双份血清滴度有4倍增长,单份血清在1/320以上。

二、实验方法:将4μl钩体抗原滴于硝基纤维素膜片上,37℃干燥15分钟。加入封闭液轻轻振摇,放置室温15分钟,将此封闭液吸出。加入1:10稀释的病人血清,然后递次对倍稀释病人血清或正常人血清,轻轻摇匀放置37℃1小时。吸出血清用磷酸盐缓冲液洗涤抗原片3次。加入1:100 SpA-HRP结合物轻轻摇匀在室温结合1小时,用磷酸盐缓冲液洗涤三次。加入四氯一萘酚显色液30分钟,用蒸馏水洗涤。阳性对照应用钩体免疫血清1:100稀

* 北京, 邮政编码 102206

释,其紫色为阳性(++) ,根据紫色的深浅判定结果,正常人血清不显色。

结 果

对79份钩体病患者血清(19名患者早期血清和恢复期血清共38份及41名患者单份恢复期血清)和20份正常人血清进行了显凝试验和dot-ELISA测定结果(附表),由表可以看

出两种方法有很高的符合率(96.19%),经统计学分析,无显著性差异($P>0.05$)。对79份患者血清显凝试验阳性数为64份(81.01%);而dot-ELISA阳性数为67份(84.82%)。

显凝试验为阴性的早期血清15份,用dot-ELISA检测则有9份血清为阳性。

附表 79份钩体病患者血清显凝试验与 dot-ELISA的符合率(%)

	检查血清 总份数	显凝试验		dot-ELISA		符合率		总符 合率
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	
钩体病病人	79	64 (81.01)	15 (18.99)	67 (84.82)	12 (15.18)	64 (81.01)	12 (15.18)	76 (96.19)
正常人	20		20		20		20	

结 论

用dot-ELISA和显凝试验对79份钩体病患者血清标本检查,结果表明两种方法的符合率为96.19%。特别是显凝试验为阴性的早期血清15份标本,而用dot-ELISA可检出9份为阳性,这9名患者恢复期的血清抗体有显著升高而确诊为钩体病患者。由此可以说明 dot-ELISA 阳性不是假阳性。正常人血清20份、乙型肝炎病人血清4份、出血热病人血清4份经用 dot-ELISA检测均为阴性,表明dot-ELISA 具有特异性。

我们初步认为dot-ELISA方法简便、快速,适合于基层卫生人员应用于现场诊断钩体病病人。

A Rapid Method to Diagnose Leptospirosis
Shi Manhua, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

Seventy-nine sero-samples from patients with leptospirosis were tested by dot-ELISA and microscopical agglutination test(MAT). Results sho-

wed that the accordance rate was 96.19%. 20 sero-samples obtained from healthy people, 4 from hepatitis B(HBV) and 4 from epidemic hemorrhage fever (EHF) were negative by dot-ELISA.

We believe dot-ELISA is a simple, rapid method which can be used to diagnose those patients with leptospirosis.

Key words Leptospirosis dot-ELISA
Microscopical agglutination test (MAT)

参 考 文 献

1. Pappas MG, et al. Dot-enzyme linked immunosorbent assay (dot-ELISA): a micro-technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Immunol Method* 1983; 64: 205.
2. Watt G, et al. The rapid diagnosis of leptospirosis; a prospective comparison of the dot-enzyme linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stage of illness. *J Infect Dis* 1988; 157(4): 840.
3. 侯林浦,等. 酶联免疫吸附试验用于钩端螺旋体病诊断的研究 I. ELISA与显微镜下特异性凝集试验的比较. *中华医学检验杂志* 1981; 4(1): 30.

(1990年10月19日收稿,同年12月5日修回)