

基因和抗原检测技术在鼠疫监测中的应用与评价

海荣 俞东征 史献明 张忠兵 唐永娇 王鹏 夏连续 魏绍振 徐兵 秦迎旭
张志凯 石国祥 徐冬蕾 蔡虹 张恩民 魏建春 耿英芝 黄德惠 赵斌
汪立茂 马凤琴 黄富 王月 张涛 张建华

【摘要】 目的 对鼠疫特异性基因和抗原检测新技术进行鼠疫监测现场的应用及评价。方法 检测来自鼠疫自然疫源地的各类标本中鼠疫菌 DNA 和 F1 抗原,采用多重 PCR、胶体金免疫技术和酶联免疫吸附试验,与鼠疫菌培养和反向间接血凝试验进行平行对照。结果 使用 5 种方法平行检测鼠类、蚤类标本 1798 份,共判定鼠疫标本 132 份,总阳性率为 7.34%;与单纯鼠疫菌培养阳性相比(113 份,阳性率为 6.28%),其中鼠疫菌培养与基因、抗原检测的总阳性率为 7.34%,与单纯检菌阳性率比较检出率提高 16.81%,符合率达到 97.13%。结论 在鼠疫监测中增加基因与抗原联合检测,可以提高鼠疫的确诊率。

【关键词】 鼠疫耶尔森菌;基因;抗原;监测

Study on the application and evaluation of methods for gene and antigen detection in plague surveillance program HAI Rong*, YU Dong-zheng, SHI Xian-ming, ZHANG Zhong-bing, TANG Yong-jiao, WANG Peng, XIA Lian-xu, WEI Shao-zhen, XU Bing, QIN Ying-xu, ZHANG Zhi-kai, SHI Guo-xiang, XU Dong-lei, CAI Hong, ZHANG En-min, WEI Jian-chun, GENG Ying-zhi, HUANG De-hui, ZHAO Bin, WANG Li-mao, MA Feng-qin, HUANG Fu, WANG Yue, ZHANG Tao, ZHANG Jian-hua. *State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To apply and evaluate new methods regarding specific gene and antigen detection in plague surveillance program. **Methods** 1798 samples from natural foci of plague were tested, using internal quality control multiple-polymerase chain reaction, F1 antigen marked by immuno chromatographic assay and enzyme linked immunosorbent assay. Culture of *Yersinia pestis* and reverse indirect hemagglutination assay were used as reference diagnostic methods. **Results** The overall positive rate of culture on *Yersinia pestis* together with gene and antigen detection was 7.34%, showing an 16.81% increase when comparing to 6.28% using *Yersinia pestis* culture method alone. The rate of coincidence was 97.13%. **Conclusion** The new standard being used for specific gene and antigen detection could increase the positive rate of diagnosis on plague.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Gene; Antigen; Surveillance

目前鼠疫疫情形势发生了新的变化,传统的鼠

疫检测技术已不再适应疾病控制的要求^[1-4],亟需发展新型快速诊断方法,以解决鼠疫监测、早期诊断和疫情控制中的突出问题^[5,6]。为此本研究建立了鼠疫内部质量控制多重 PCR 检测、胶体金免疫色谱 F1 抗原检测(GICA)、ELISA,并与鼠疫菌培养、反向间接血凝(RIHA)试验做平行对比;通过对鼠疫监测中实际数据的分析,建立了与鼠疫菌培养同等意义的新标准。

材料与方法

1. 标本来源:项目起始时间为 2004 年 12 月至 2006 年 12 月。全国 17 个鼠疫现场监测点参加了

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2004BA718B07-01)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(海荣、俞东征、夏连续、张志凯、徐冬蕾、蔡虹、张恩民、魏建春、马凤琴、张建华);河北省鼠疫防治所(史献明);内蒙古自治区地方病防治中心(张忠兵);甘肃省疾病预防控制中心(唐永娇);云南省地方病防治所(王鹏);青海省地方病预防控制中心(魏绍振);新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心(徐兵);宁夏回族自治区疾病预防控制中心(秦迎旭);浙江省疾病预防控制中心(石国祥);辽宁省疾病预防控制中心(耿英芝);广西壮族自治区疾病预防控制中心(黄德惠);中国疾病预防控制中心鼠疫布鲁氏菌病防治中心(赵斌);四川省疾病预防控制中心(汪立茂);内蒙古自治区乌兰察布市地方病防治中心(黄富);贵州省疾病预防控制中心(王月);广东省湛江市鼠疫防治所(张涛)

此项工作。按照全国鼠疫监测的标准,分别采集新疆、青海、甘肃、宁夏、内蒙古、河北、辽宁、吉林、浙江、贵州、四川、广东、广西、云南等地区各类鼠疫自然疫源地中 60 多种啮齿动物的肝脏、脾脏及蚤类标本 3827 份,其中阴性对照标本 351 份,来自于辽宁和吉林省的非鼠疫地区。

2. 试剂与设备:①试剂:赫氏消化液培养基各实验室自行制备,RIHA 试剂(鼠布基地产品,批号:200501、200601),PCR 引物合成赛百盛基因技术有限公司,胶体金抗原检测试剂(北京庄笛浩禾生物技术有限公司产品,批号:20050402、20060605),ELISA 检测试剂(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心,批号:0403,0503,0506,0605),其他常规试剂购自鼎国、华美和生工生物工程公司。②设备:基因扩增仪为杭州博日科技有限公司产品,水平电泳仪为北京六一厂产品。

3. 检测方法:①鼠疫菌培养按常规方法进行^[1,3,7]。②PCR 检测按照张志凯等^[8]建立的方法进行,以鼠疫菌 *pla* 和 *caf1* 作为目标基因,同时设内部质量控制对照;引物:*caf1* 5'-GGA ACC ACT AGC ACA TCT GTT-3', *caf1* 3'-ACC TGC TGC AAG TTT ACC GCC-3',设计扩增长度 249 bp;引物:*pla* 5'-ACT ACG ACT GGA TGA ATG AAA ATC-3', *pla* 3'-GTG ACA TAA TAT CCA GCG TTA ATT-3',设计扩增长度 456 bp。内部质量控制对照使用 *caf1* 引物序列,设计扩增长度为 645 bp。③RIHA 按常规方法^[9]。④GICA 检测方法:将待检测样品 200 μ l 加入试剂的加样孔内,从滴加样品开始计时,15 min 内观察结果;阳性结果为:可见 2 条紫红色条带,并检测线与质控线显色一致;阴性结果为:仅见 1 条紫红色条带,即只有质控线显色;无效结果为:无条带出现或仅有检测线出现,说明试剂失效,应重新检测。⑤ELISA 检测方法:采用双单抗体夹心检测鼠疫 F1 抗原^[10],微量板使用鼠疫 F1 单克隆抗体(IgG)包被,加入待检测标本,再加入用辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠疫 F1 单克隆抗体(IgM)进行检测;结果判定:标本 A/阴性对照, $A > 2.1$ 为阳性。

4. 评价:参照文献[11]规定的方法,对所有的实验结果进行评价。在评价中暂以分离获得的鼠疫菌以及基因检测与任意一种方法(RIHA、GICA 和 ELISA)抗原检测结果同时阳性作为“扩大的鼠疫判定标准”。每一单项检验结果只有在与该标准相符

时,才判定为真阳性(a)或真阴性(d);相反,单项检验阳性而扩大标准阴性为假阳性(b),单项检验阴性而扩大标准阳性则为假阴性(c);并据此计算每一种检验的灵敏度 $a/(a+c)$ 、假阳性率 $b/(a+b)$ 和符合率 $(a+d)/(a+b+c+d)$ 。

结 果

1. 使用多重 PCR、GICA、ELISA、鼠疫菌培养和 RIHA 方法平行检测 1798 份标本,共判定鼠疫标本为 132 份,总阳性率为 7.34%,与单纯鼠疫菌培养阳性相比(113 份,阳性率为 6.28%),检出率提高 16.81%。但在检菌阳性的 113 份标本中,有 2 份标本为鼠疫菌培养阳性,而 F1 抗原和核酸检测阴性,这个结果意味着如果只根据采抗原或核酸检测,还将会有 1.77% 的阳性标本被漏检。在完成 5 项检测的 1798 份标本中,各单项检测与扩大的鼠疫判定标准比较,其灵敏度、假阳性率和符合率见表 1^[11]。此外,来自辽宁和吉林省非鼠疫流行地区的 351 份标本作为阴性对照,使用上述 5 种方法平行检验,所有结果均为阴性,符合率为 100%。

表 1 1798 份标本鼠疫菌培养检验结果

检测方法	扩大的鼠疫判定标准		合计
	阳性	阴性	
鼠疫菌培养			
阳性	113(a)	0(b)	113
阴性	19(c)	1666(d)	1685
合计	132	1666	1798
PCR			
阳性	114(a)	115(b)	229
阴性	18(c)	1551(d)	1569
合计	132	1666	1798
GICA			
阳性	128(a)	38(b)	166
阴性	4(c)	1628(d)	1632
合计	132	1666	1798
RIHV			
阳性	113(a)	9(b)	122
阴性	19(c)	1657(d)	1676
合计	132	1666	1798
ELISA			
阳性	113(a)	13(b)	126
阴性	19(c)	1653(d)	1672
合计	132	1666	1798

注:括号内 a、b、c、d 为计算灵敏度和符合率公式中符号

2. 鼠疫菌培养结果:按照扩大的鼠疫判定标准的规定,分离获得鼠疫菌者为真阳性,但有 19 份标本为鼠疫菌培养阴性,F1 抗原及核酸检测阳性,因此,鼠疫菌分离的灵敏度为 85.61%,假阳性率为 0,

符合率为 98.94%。也就是说如果增加这 2 种方法的联合检测,可增加 16.81% 的阳性标本发现机会。

3. PCR 检测结果:与扩大的鼠疫判定标准相比,PCR 检验的灵敏度为 86.36%,假阳性率 50.22%,符合率为 92.60%。但在 229 份 PCR 阳性标本中,其他检验均阴性 115 份,占 PCR 总阳性数的 50.22%,这个结果除显示 PCR 较高的灵敏性之外,还提示在试验过程中可能发生过 PCR 产物的污染。

4. GICA 检测结果:与扩大的鼠疫判定标准相比,GICA 检验的灵敏度为 96.97%,假阳性率 22.89%,符合率为 97.66%。其中仅 GICA 一项阳性的标本数为 38,其原因可能是由于非特异性吸附造成的隐约可见的条带所致(表 1)。

5. RIHA 检测结果:与扩大的鼠疫判定标准相比,RIHV 检验的灵敏度为 85.60%,假阳性率 5.36%,符合率为 98.44%。

6. ELISA 检测结果:与扩大的鼠疫判定标准相比,ELISA 检验的灵敏度为 85.61%,假阳性率 10.32%,符合率为 98.22%。试验结果显示,ELISA 与 RIHA 具有同等的敏感程度,说明在实际的鼠疫监测中,如果能够同时使用不同的抗原检测方法,可以提高检出率。

7. 本次研究中有些地区只完成了 5 项检测中的部分检测项目,因此总检测标本为 2404 份,其中鼠疫菌培养阳性率为 6.20% (149/2404),与均完成 5 项检测的 1798 份标本的阳性率接近。将每一种检测方法 with 鼠疫菌培养结果相比,其灵敏度、特异性和符合率与完成 5 项检测的 1798 份标本比较也基本相符。

讨 论

在传染病的诊断过程中,快速诊断方法除了具有使用方便、快捷的特点之外,还显示了可以与传统方法进行直接互补的优势,增加了阳性结果发现的概率。尤其是对不明原因疾病或突发疫情的筛查,更显示了其早期诊断的重要性和准确性。然而,任何新方法的建立,除了应获得研究和部分现场验证的数据之外,还需要在鼠疫监测的大批量标本中进行推广使用,验证实际应用的情况,并对其可靠性和准确性进行评价^[11-14]。

尽管有资料报道越南曾经发现在健康人的咽部携带鼠疫菌^[15],一些疫源地的静息期间也曾偶尔检

获过弱毒的鼠疫菌^[16,17],但是我国其他的鼠疫菌株均来自典型的鼠疫病例和动物宿主。近年来,由于盲目使用抗生素、标本陈旧、污染或者延误了最佳采样时机等多种原因,现场工作中有相当一部分确为鼠疫的病例无法分离到鼠疫菌。在本研究中,判定为鼠疫的标本中鼠疫菌的分离率仅为 83.33%,按照现行的鼠疫诊断标准将造成漏诊,或只能停留在疑似诊断阶段。这种情况说明,在鼠疫诊断方法中加入基因和抗原的检测确实非常必要。2006 年 4 月,世界卫生组织在非洲的马达加斯加召开了世界鼠疫防治工作会议,并重点介绍了鼠疫快速诊断方法在非洲鼠疫地区的应用情况,肯定了这些方法在鼠疫疫情的早期诊断、处理和追溯诊断中所发挥的决定性作用^[18]。

为确定在实验室中建立的鼠疫菌基因与抗原检测方法的可靠性,全国共有 14 个鼠疫监测省的 17 个监测点参加了本项工作。共采集各类鼠疫抗原标本 3827 份,标本来源覆盖了我国所有类型的鼠疫自然疫源地。其中来自非鼠疫疫源地区的标本 351 份,经 5 项试验指标检测均为阴性,实际验证了上述新方法的可靠性和特异性。本项研究证实,鼠疫快速诊断方法的联合使用,克服了由于任何单项检测方法可能出现的假阳性或误判的不足之处,准确识别人类、动物和环境微生物的标本;它与传统方法相比较,可在获得标本数小时之内确诊 85% 以上的鼠疫菌,提高了检出率和确诊率,这对于提高我国的鼠疫监测和控制水平具有重要的现实意义。

在研究中 PCR 检验假阳性率较高,在 229 份阳性标本中,共有 115 份不能为细菌分离或抗原检验所证实,占 PCR 总阳性数的 50.22%。其原因可能是在个别批次的试验中发生了扩增产物的污染,这也说明,单纯以基因检验诊断鼠疫存在着误诊的风险,必须加以其他试验方法核实其检验结果。另一方面,PCR 检验的缺点还在于其灵敏度不够高(86.36%),在能够分离获得鼠疫菌的标本中仍有 18 份标本无法用 PCR 方法检出,类似这样的情况在非洲马达加斯加也曾有报道^[19]。检测也发现在鼠疫的急性期病例和新近死于鼠疫的动物、蚤类标本中,因含有大量的鼠疫菌,PCR 方法可以准确地检出。然而,如果标本中含菌量少、较为陈旧或者发生污染,在培养分离还能够检出鼠疫菌的情况下,PCR 也可能显示阴性,说明单纯的快速检验方法还不能取代传统的细菌分离。

在既往的研究中,通常认为胶体金抗原检测方法的敏感程度较低,只能检出 10^5 /ml 水平的鼠疫菌,作为一种初筛方法,可能会漏掉一部分阳性结果^[20]。然而,在本次研究中,却显示胶体金抗原检测的敏感程度最高,在使用扩大标准判定的阳性标本中,只有 1 份不能用胶体金抗原检测方法检出。在本研究中观察到多份不能用该方法检出的标本,在 4℃ 将标本放置 24 h 后,就可以得出阳性结果。分析其原因,可能是在放置过程中鼠疫菌裂解,原来为颗粒性质的抗原释放出来成为可溶性抗原,就可以结合更多的带有标记的抗体。当然,这个新的鼠疫判定系统仍需要进一步的完善,PCR 检测方法是其关键性的环节;虽然采取了抗原检测作为旁证其假阳性已不足虑,但其敏感性较低已成为新的鼠疫判定系统中的限制性因素。影响鼠疫菌培养阳性率的各种因素,对 PCR 检测体系多数都有抑制作用,而没有 PCR 检测的旁证,抗原检测的结果也不能得到承认。因此,提高 PCR 方法的检出率,将是今后一个时期的主要目标。

参 考 文 献

- [1] 鼠疫诊断标准. GB 15991-1995.
- [2] 鼠疫自然疫源地及动物鼠疫流行判定标准. GB 16883-1997.
- [3] 纪树立. 鼠疫. 北京:人民卫生出版社,1990:252-265.
- [4] Tikhomirov E, Dennis DT, Gage KL, et al. Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control. Pub. No. WHO/CDC/CSR/EDC/99. 2, WHO, Geneva, 1999 Chapter 1: 11-44.
- [5] Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, et al. Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dispstick. Int J Med Microbiol, 2000, 290(3):279-283.
- [6] 刘建欣,郑昌学. 现代免疫学. 北京:清华大学出版社,2002:14-53.
- [7] May C Chu. Laboratory manual of plague diagnostic tests. WHO, Geneva, Switzerland, and CDC, Ft Collins, Colorado, USA, 2000:67-90.
- [8] 张志凯,海荣,张恩民,等. 聚合酶链反应方法检测鼠疫耶尔森菌内部对照研究. 中华流行病学杂志,2005,26(1):36-38.
- [9] 耿贯一. 流行病学(续编). 实验室方法在流行病学中的应用. 北京:人民卫生出版社,1984:30-36.
- [10] 徐秉臣. 鼠疫 F1 McAb 及应用研究//张鸿猷. 新疆鼠疫. 乌鲁木齐:地方病通报编辑部,1994:102-107.
- [11] 王滨有. 诊断试验及其评价. 中国地方病学杂志,2004,23(6):630-631.
- [12] 蒋先敏,孔健,林涛,等. 甲胎蛋白胶体金诊断试剂临床应用研究. 中华流行病学杂志,2003,24(3):210-212.
- [13] 李雅娟,庄辉,李杰,等. 特异性引物聚合酶链反应乙型肝炎病毒基因分型法的建立及应用. 中华微生物学和免疫学杂志,2006,26(9):859-862.
- [14] Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. Lancet, 2003, 18:361(9353):211-216.
- [15] 王淑纯. 近十年世界人间鼠疫的分布及特征. 中华流行病学杂志,1985,6 鼠疫论文专辑:108-112.
- [16] 黄念君,贾明和,朴昌国,等. 不同毒力鼠疫杆菌的实验生物学与实验病理学研究. 中华流行病学杂志,1982,3 鼠疫论文专辑:110-113.
- [17] 刘纪有,张万荣. 内蒙古鼠疫. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1997:117-120.
- [18] Sylvie Cot. WHO consultant Laboratory techniques for the diagnosis of human plague (A review of current techniques and new tools proposition for uses of diagnosis tests in field situations: endemic/emerging areas). 2006:10-29.
- [19] Rahalison L, Vololonirina E, Ratsitorahina M, et al. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. J Clin Microbiol, 2000, 38(1):260-263.
- [20] 王鹏,杜春红,郭英,等. 胶体金免疫层析法快速诊断鼠疫的实验研究. 地方病通报,2006,21(1):1-3.

(收稿日期:2007-01-25)

(本文编辑:尹廉)

· 阅读信息 ·

本刊近期连载“流行病学与计算机应用”系列讲座

近年来知识和信息已经达到每4-5年更新一次的速度。流行病学虽然隶属自然科学,但许多内容介于自然科学与社会科学、信息科学与生物科学、电子与分子之间。流行病学学科的进步依赖于边缘学科的发展,同理,相辅相成,流行病学的发展也促进其他学科的进步。我国政府提出“以信息化带动工业化,以信息化推动现代化”的决策,使信息化的步伐大大加速。我国各地的信息化,电子政务、商务,远程教育、医疗,家庭网络等都在蓬勃兴起。在流行病学方面,急性传染病网络直报已经形成,生命统计系列软件也在编制。上海地区已在应用健康档案的贮存和分析及恶性肿瘤、糖尿病的报告、管理软件。浙江省已开发出细菌学检索和致癌剂结构分析的软件。随着硬、软件的不断开发,计算机在流行病学上的应用将会愈来愈广泛和深入。为了适应时代的发展,复旦大学预防医学研究所组织了海内外流行病学专家编写了《流行病学与计算机应用》一书。为了便于更多的读者阅读,本刊为先睹为快,从中有目的选择了部分内容,由复旦大学预防医学研究所俞顺章教授编写,本刊将在 2007 年第 7 期起以“系列讲座”形式逢单月刊出。敬请读者关注。