

# 酶免疫斑点试验用于钩端螺旋体病 早期血清学诊断的研究

林涛<sup>1</sup> 时曼华<sup>1</sup> 龙健<sup>2</sup> 聂一新<sup>1</sup>

**摘要** 应用酶免疫斑点试验(dot-ELISA)和显微镜凝集试验(MAT)对培养钩端螺旋体(钩体)阳性的30份早期钩端螺旋体病(钩体病)人血清进行了检测,发现dot-ELISA的阳性率(40%)明显高于MAT的阳性率(13.3%)。同时对198份临床确诊为早期钩体病人的血清进行了dot-ELISA、MAT和血培养对照研究,证明dot-ELISA的阳性率(64.6%)也明显高于血培养阳性率(15.2%),同时也高于MAT的阳性率(14.1%)。随着发病时间的延长,血培养阳性率逐渐降低,dot-ELISA阳性率变化不明显。

**关键词** 钩端螺旋体病 酶免疫斑点试验 显微镜凝集试验 血培养

自Pappas MG等首先将酶免疫斑点试验(dot-ELISA)应用于原虫病的诊断<sup>[1]</sup>之后,国内外有些学者又对此法进行了一些研究<sup>[2~4]</sup>。我们应用该法对198份临床确诊的早期钩体病人血清进行了检测,与血培养和MAT进行比较,证明其有灵敏度高、特异性好、简单、快速、成本低、易于保存和运输、适用于早期诊断及易于推广等特点。

## 材料和方法

### 一、实验材料:

1. 钩端螺旋体超声波抗原及固相抗原片的制备:基本参照1992年本实验室操作方法<sup>[4]</sup>,并作改进。

2. 硝酸纤维素膜:BA-4S膜,孔径为0.45 $\mu$ m(Schleicher & Schull);浙江黄岩人民化工厂生产膜,孔径为0.25 $\mu$ m;北京化工学校生产膜,孔径为0.2 $\mu$ m。

3. 封闭液:①10%脱脂奶粉液;②2%牛血清白蛋白(Gmb H & Co,批号11924)磷酸盐缓冲液;③0.1%吐温20(LPC出品,上海科学用品采购供应站试剂加工厂,批号63—03—20)磷酸盐缓冲液;④0.2% Triton-100磷酸盐缓冲液。

4. 酶结合物:①葡萄球菌蛋白A辣根过氧

化物酶结合物(SPA-HRP,本所生产);②兔抗人免疫球蛋白辣根过氧化物酶结合物(抗人IgG-HRP,北京生物制品研究所生产)。使用前经方阵滴定其工作浓度。

### 5. 底物液及其配制:

(1) 4-氯-1-萘酚(4CIN):Sigma Chemical Co,批号:C-8890;上海医科大学化学教研室合成;4CIN的配制:称取3mg 4CIN,溶于1ml冷乙醇中,然后加0.02mol/L, pH7.4的PBS液5ml,最后加入3.5 $\mu$ l 30%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,轻轻摇匀,立即使用。

(2) 3,3'-二胺基联苯二胺盐酸盐(DAB)为北京化工厂产品。DAB的配制:称取3mg DAB溶于10ml 0.02mol/L, pH7.4的PBS液中,加5 $\mu$ l 30%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,轻轻摇匀,立即使用。

6. 稀释液及洗涤液:稀释液为0.02mol/L, pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS),洗涤液为含0.05%吐温20, pH7.4的PBS。

7. 被检病人血清:江西省上高县临床确诊的钩体病病人血清。

8. 阳性血清为兔高效价免疫血清(1:

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所  
102206 北京市

2 江西省上高县卫生防疫站



10000), 阴性血清为健康人血清。

二、实验方法: 从病人血液中分离的钩体的鉴定按常规方法进行〔5〕。血清检测按常规方法进行〔5〕。dot-ELISA试验参照有关文献〔4〕, 并加以改进。

### 结 果

一、最佳实验条件的选择: 我们对抗原的种类、浓度、硝酸纤维素膜的种类、封闭液的种类和浓度、抗原片的保存条件和时间、底物的选择及各步反应时间等都作了探索。结果证明, 与Patoc I菌株相比, 黄疸出血群赖型赖株作为抗原效果更好, 超声波抗原浓度以55~80μg/ml效果较好。进口膜扩展性好, 国产膜则韧性较好, 二者均可使用。用0.1%吐温20和0.2% Triton100效果不如2% BSA和10% 脱脂奶粉, 而奶粉由于成本低、购买容易, 使用起来更为方便。制成的抗原片在室温、干燥条件下保存、运输至少18个月性质无明显改变。两种底物比较, DAB较灵敏, 但不易控制假阳性结果, 而4CIN则较稳定; 在配制4 CIN时用甲醇和乙醇作溶剂结果无明显差异。用10%奶粉封闭时, 时间以1小时较合适, 而抗原片与被检血清结合时间, 酶结合物结合时间都以1小时为好, 底物反应时间以阳性对照出现明显颜色反应为准。

二、两种血清学试验及血培养阳性率的比较: 用dot-ELISA法和MAT检测了临床确诊为钩体病病人的198份早期病人血清, 同时作血液钩体培养。结果表明, dot-ELISA阳性128份, 阳性率为64.6%; 血培养阳性30份, 阳性率为15.2%; MAT阳性28份, 阳性率14.1%; 在血培养阳性的30份血清中, MAT阳性4份, 阳性率为13.3%; dot-ELISA阳性为12份, 阳性率为40%。由此可以看出, dot-ELISA的阳性率明显高于MAT和血培养(表1和表2)。

三、钩体病患者不同发病时间三种方法阳性率比较: 钩体病患者早期血液主要在1~4日分离出钩体, 5日后未分离出钩体。dot-ELISA

表1 198份早期钩体病人血清dot-ELISA、MAT和血培养阳性率结果比较

血清样本数	dot-ELISA		血培养		MAT	
	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
198	128	64.6	30	15.2	28	14.1

表2 30份血培养阳性早期钩体病人血清dot-ELISA和MAT阳性率结果比较

血清样本数	dot-ELISA		MAT	
	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
30	12	40.0	4	13.3

最早发病后1天出现阳性, 2~5天内均有阳性结果。而用分离出钩体的30份血清作MAT试验, 仅有4份阳性。发病后采血时间越早, 钩体血培养阳性率越高, 钩体血培养阳性率随时间变化明显( $\chi^2 = 11.69, P < 0.05$ ), dot-ELISA在5天内阳性率也较高, 但其阳性率随时间变化不明显( $\chi^2 = 3.34, P > 0.05$ ), 而MAT在5天内仅有少数血清能测出钩体抗体(表3)。

表3 167份钩体病人血清不同发病时间dot-ELISA和血培养阳性率结果比较

发病时间(天)	血清样本数	dot-ELISA		血培养	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
1	4	3	75.0	2	50.0
2	55	35	63.6	15	27.3
3	57	31	54.4	10	17.5
4	23	14	60.9	3	13.0
≥5	28	21	75.0	—	—
合计	167	104	62.3	30	18.0

四、双份血清dot-ELISA检查结果: 共采集8份双份血清, 其中有5份血清为发病后第1天采集的, 有2份血清为发病后第2天采集的, 有1份血清为发病后第3天采集的, 第二份血清于第一份血清采集后10~17天采集。其中有6份血清抗体滴度有4倍以上增长, 1份血清抗体



滴度降低2倍, 1份降低4倍(表4)

五、从早期钩体病人血液中分离出的30

表4 钩体病人双份血清dot-ELISA检测结果

采血时间	血清编号							
	13	24	32	41	42	48	50	53
第1份血清	1:40	1:20	1:20	1:10	1:80	1:20	1:80	1:40
第2份血清	1:20	1:160	1:80	1:40	1:320	1:160	1:320	—
滴度升高倍数	-2	8	4	4	4	8	4	-4

株钩体分群结果: 30株钩体分属于爪哇群(6株)、澳洲群(2株)、流感伤寒群(3株)、七日热群(15株)、明尼群(1株)、赛罗群(2株), 尚有一株钩体因一直生长不良而未定群。

### 讨 论

我们对dot-ELISA实验条件进行了选择和比较, 通过对198份临床确诊为钩体病患者血清的考核, 认为应用2.5 $\mu$ l浓度为55~80 $\mu$ g/ml超声波抗原点样在北京化工学校生产的孔径为0.2 $\mu$ m的硝酸纤维素膜上效果较好, 用10%脱脂奶粉作封闭液, 底物以4CIN为好, 以上实验条件较易在基层开展工作。

对于早期病人血清, dot-ELISA具有较高的阳性率(64.6%), 而MAT阳性率较低(14.1%), 血培养阳性率也很低(15.2%)。

随着发病时间的增加, 钩体血培养阳性率降低, 而dot-ELISA变化不明显。

用dot-ELISA作病人双份血清检测, 同样符合其它血清学试验规律, 即双份血清抗体滴度呈4倍以上增长, 尽管我们两次采血时间间隔较短(10~17天), 但大部分血清抗体滴度已呈4倍以上增长, 这说明dot-ELISA同样可作为一种定量检测手段。还有2份血清抗体滴度反而降低, 这可能由于病人原为同型菌的继往感染, 新侵入的病原体中和了机体中原有的抗体或病程较久, 抗体滴度已开始下降的原因。

从30株钩体鉴定结果来看, 此次江西省上高县为以七日热群为主, 同时有爪哇群、澳洲

群、流感伤寒群、明尼群和赛罗群钩体混合感染的一次钩体病疫点爆发。

Pappas MG [1] 和Watt G [2] 等报道的斑点法均以1:8为阳性, 而鲍行豪等 [3] 应用酶免疫斑点试验对153份MAT阳性及103份阴性血清进行检测, 以1:20作为阳性判定标准, 其阳性检出率可达98.04%, 而对阴性标本的交叉率仅为3.88%, 因此以1:20作为诊断标准。我们实验室应用dot-ELISA和MAT检测钩体病患者恢复期血清, 以1:20为诊断标准, 二种方法符合率为96.19% [4]。本文主要应用血培养、MAT和dot-ELISA三种方法对临床确诊为钩体病人的早期血清进行检测, 血培养钩体阳性的30份血清用dot-ELISA方法检测有12份为阳性, 而MAT仅有4份阳性。通过实验和现场考核, 我们认为dot-ELISA可以作为基层卫生人员诊断钩体病的方法, 它具有简单、快速、敏感性好、特异性高及适合早期诊断的特点, 其试剂盒易于保存和运输。

Studies on the Early Serodiagnosis of Leptospirosis by dot-ELISA Lin Tao, Shi Manhua, Long Jian, et al. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Thirty serum samples of patients with early leptospirosis from whom cultures of leptospira were positive were tested by dot-enzyme linked immunosorbent assay (dot-ELISA) and microscopical agglutination test (MAT). The results showed that the positive rate of dot-ELISA (40%) was higher than that



of MAT (13.3%). One-hundred and ninety-eight serum samples from patients with clinical diagnosis of early leptospirosis were tested by dot-ELISA, MAT and blood culture. The results showed that the positive rate of dot-ELISA (64.6%) was higher than that of blood culture (15.2%) and MAT (14.1%). The longer the time of the illness, the lower the positive rate of the blood culture. However, the positive rate of dot-ELISA was stable in different stages of the illness.

**Key words** Leptospirosis Dot-ELISA  
MAT Blood culture

**参 考 文 献**

1 Pappas MG, Hajkowski R. and Hockmeyer W. Dot enzyme-linked immunosorbent assay

(dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral Leishmaniasis. J Immunol Meth, 1983, 64 (1-2): 205.

2 Watt G, Alquiza LM, Pader LP, 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 stages of illness. J Infect Dis, 1988, 157 (4): 840.

3 鲍行豪, 梅玲玲, 杨宁敏. 酶免疫斑点试验作钩体病血清学诊断的研究. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7(6): 2.

4 时曼华, 詹洪, 聂一新, 等. 一种快速诊断钩端螺旋体病方法的研究. 中华流行病学杂志, 1992, 13(1): 45.

5 于恩庶, 罗海波, 鲍行豪, 等主编. 钩端螺旋体病学. 北京: 人民卫生出版社, 1992, 205~206, 419~422.

(收稿: 1993-10-21 修回: 1994-12-06)

## 急性心肌梗塞发病与生物三节律的关系

戈继业<sup>1</sup> 张振岭<sup>2</sup> 陈长清<sup>2</sup> 冉和平<sup>1</sup>

本世纪初发现人体存在分别以23、28、33天为周期的体力、情绪、智力三种生物节律(三节律), 并影响某些疾病的发生, 我们研究了急性心肌梗塞(AMI)发病与三节律的相关性。

**一、资料与方法:** 病例为住院患者; 选择出生日期、发病时间均明确者, 共199例次, 其中男122例次, 女77例次。分别计算出生到发病时生存总天数与发病日所处三节律周期天数。统计三节律周期的高、低潮及临界期发病例数, 以各期的日平均发病例数进行比较。据三节律周期的高、低潮及临界期不同组合概率, 计算出各组合下理论发病例数, 并与实际发病例数进行比较。

**二、结果:** 三节律不同时期发病不均衡, 尤其体力周期表现最明显, 情绪周期次之, 而智力周期差别不大。①体力周期中男性于临界期发病最多, 低潮期最少, ≥50岁者更明显; 女性高潮期发病最多, 临界期最少, <50岁者更明显。②情绪周期中, 男性于临界期发病最少, 女性临界期发病最多, 高潮期最少。③智力周期中仅男性临界期发病多于高潮期具有统计学意义。体力、情绪、智力周期中发病高峰日分别是第23、15、1天, 各发病15、14、11例; 低谷日分别

是第16、21、20天, 各发病1、2、2例。三节律在临界、低潮期相互重叠时发病较多, 而体力高潮期、情绪临界期重叠时发病较少。多次心梗者多在某节律周期的同一天发病。本组二次心梗5例, 其中1例两次发病均在体力周期的第14天, 1例均在第23天, 1例均在情绪周期的第7天, 三次心梗者1例, 分别于体力周期的第4、5、4日发病。

**三、讨论:** 以往的研究疾病多发生于体力、情绪周期的临界、低潮期。阎晓清报道AMI于体力周期的低潮期、情绪周期的临界期发病最多, 本组研究显示三节律周期不同时期对AMI发病影响不等, 但与上述报道有差异, 可能与样本量及各期划分标准不同有关。劳累和情绪激动是AMI发病常见诱因, 男性于体力临界期易过劳而诱发AMI, 女性情绪于临界期间波动较大, 而男性在情绪低落时往往克制, 心情压抑, 可能是发病多的原因。理论上讲, 体力低潮期易过劳致AMI, 本结果不然, 可能系低潮期机体自动调节起到保护作用。

(收稿: 1994-01-17 修回: 1994-03-21)

1 沧州卫生学校医院 061001

2 沧州市中心医院