

间接酶联免疫吸附试验检测北京市昌平地区体检人群中汉赛巴尔通体抗体

杨小冉 刘起勇 崔步云 王连秀 彭智会 任东升

【摘要】 目的 调查北京市昌平地区健康体检人群血清汉赛巴尔通体抗体阳性情况。方法 用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫荧光抗体(IFA)试剂盒检测体检人群血清汉赛巴尔通体抗体情况。结果 以 IFA 为参考标准,间接 ELISA 方法的灵敏度为 70.6%,特异度为 91.6%;阳性预测值为 82.2% (60/73),阴性预测值为 84.9%。ELISA 共检测了 357 份健康体检人群血清,汉赛巴尔通体抗体阳性率为 34.5%, IFA 共检测了 239 份体检血清,其汉赛巴尔通体抗体阳性率为 35.6%。结论 间接 ELISA 方法对于检测汉赛巴尔通体感染是一种快速、敏感、特异的方法,昌平地区健康体检人群中存在汉赛巴尔通体抗体阳性的情况。

【关键词】 汉赛巴尔通体;间接酶联免疫吸附试验

Using direct enzyme linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibody on *Bartonella henselae* among healthy people in Changping, Beijing YANG Xiao-ran*, LIU Qi-yong, CUI Bu-yun, WANG Lian-xiu, PENG Zhi-hui, REN Dong-sheng. *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: LIU Qi-yong, Email: Liuqiuyong@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To detect *Bartonella henselae* IgG antibody among healthy people in Changping, Beijing. **Methods** Using indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence antibody assay (IFA) to detect IgG antibody of *Bartonella henselae* among human beings. **Results** The sensitivity and specificity of ELISA were 70.6% and 91.6% respectively, with the positive predictive value of serological test as 82.2%, and the negative predictive value as 84.9%, based on results of IFA. The positive rate was 34.5% among 357 healthy people on indirect ELISA but was 35.6% among 239 people with IFA. **Conclusion** The results indicated that the indirect ELISA was a very quick, sensitive and available method for detecting *Bartonella henselae* in human beings, as well as a high positive percent age of *Bartonella henselae* among the healthy people of Changping Beijing.

【Key words】 *Bartonella henselae*; Direct enzyme linked immunosorbent assay

研究已经证实汉赛巴尔通体是导致人类猫抓病的主要致病菌,猫是其储存宿主^[1],主要通过猫的抓伤和咬伤传播,动物通过媒介节肢动物蚤类、蜱类、恙螨及白蛉等的叮咬传播^[2,3]。对于汉赛巴尔通体的研究,国内大多数局限于实验室,临床上还没有一个比较完善的诊断手段。本研究主要以超声波粉碎的汉赛巴尔通体细菌作为抗原,建立了以间接酶联免疫吸附试验(ELISA)为基础的汉赛巴尔通体抗体检测方法。

材料与方法

1. 材料:

(1) 实验菌株:汉赛巴尔通体 (*Bartonella henselae*) 标准菌株 (ATCC 49882), 购自美国 ATCC, 复苏后接种在含 5% 羊血的胰酶大豆琼脂培养基上,放入 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱中培养 6-10 d。本次试验所用的菌株是第四代培养的汉赛巴尔通体。

(2) 血清标本:2005 年 12 月收集的昌平区疾病预防控制中心健康体检者血清标本 357 份,主要是从事食品卫生和环境卫生的从业人员,年龄 16~60 岁,男性 162 份,女性 195 份,有猫、犬接触或抓伤史的 67 例。血清经 56℃ 灭活 30 min,加入 0.01% 硫

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371246)

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(杨小冉、刘起勇、崔步云、任东升);北京市昌平区疾病预防控制中心(王连秀、彭智会)

通讯作者:刘起勇,Email: Liuqiuyong@icdc.cn

柳汞, -20℃ 储存备用。

(3) 实验器材及试剂: 酶标仪 (BIO-RAD Model 550)、洗板机 (BIO-RAD Model 1575)、96 孔酶标板 (Costar)、超声波粉碎机 (KIKI T25)、高速冷冻离心机 (Hitachi)、8 通道移液器 (Finnpipette)、细胞粉碎机 (宁波新枝)、ND-1000 分光光度计、荧光显微镜 (olympus)、比浊管、CO₂ 培养箱、生物安全柜。

2. 间接 ELISA 方法:

(1) 抗原的制备: 用无菌接种环刮取培养 6-10 d 的第四代汉赛巴尔通体菌株 (约 15 块平板), 放入灭菌的 0.9% 生理盐水中, 混均后, 65℃ 水浴灭活 30 min, 将菌液放置在冰水混合物上, 用超声波细胞粉碎机进行处理 (功率 400 W), 粉碎 5 s, 间隔 6 s, 共粉碎 30 min。然后用低温离心机 3000 g (4830 r/min) 离心 10 min, 除去较大的细胞碎片, 取上清液即为所需粗提抗原, 用 ND-1000 分光光度计进行抗原浓度测定, 小份分装后 -20℃ 存放备用。

(2) ELISA 检测^[4]: 将制备好的抗原 (11 μg/ml) 100 μl/孔加入 Costar 酶标板中, 空白对照包被缓冲液, 用封口膜封口, 4℃ 冰箱过夜包被; 用 0.01 mol/L PBST 缓冲液洗涤后, 每孔加入 0.25% 牛血清白蛋白封闭, 置于 37℃ 温育 3 h, 洗涤后加一抗血清 1:400, 同时设立阳性和阴性对照, 37℃ 温育 1 h。加碱性磷酸酯酶标记 A 蛋白 (1:2000), 每孔 100 μl。37℃ 温育 2 h。再加入 100 μl 磷酸对硝基苯酯 (PNPP) 底物溶液, 室温反应 30 min; 酶标仪读取吸光度 (A) 值 (490 nm)。

(3) 重复性实验: 分别取猫、人和鼠血清阳性和阴性标本各 1 份, 按照标准的 ELISA 操作步骤进行检测, 每份标本设 8 个重复孔。

(4) 稳定性试验: 用上述同样的血清在不同时间分 4 次在 4 块板上做间接 ELISA 实验, 每份标本设 4 个重复孔。

(5) 结果判定: 根据公式: $P/I = (\text{待检样品 } A \text{ 值} - \text{空白对照 } A \text{ 值}) \div (\text{阴性对照 } A \text{ 值} - \text{空白对照 } A \text{ 值})^{[5]}$, 计算每份标本的 P/I 值, 同时计算 IFA 检测阴性的 154 份标本 P/I 值的均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 用 $\bar{x} \pm s$ 作为 cut-off 临界值。本研究 $\bar{x} \pm s$ 值为 2.8, 为提高试验的灵敏度, 取 P/I 值 2.5 为阳性临界值, >2.5 判为阳性, <2.5 判为阴性。变异系数 (CV) = $s / \bar{x} \times 100$ 。

3. 质量控制: 为保证试验的准确性, 尽量减少和

避免试验中的操作误差、技术误差和统计误差, 必须进行有效的质量控制, 本研究主要从以下几方面进行质量控制: ① 采血过程中做到无菌操作, 使用高压灭菌的离心管及必要的设备, 防止细菌污染; 血清在采集后送检过程中保证低温储存, 以免抗体滴度的下降。② 使用校对过的微量移液器, 排除自然误差。③ 在试剂使用之前, 应该进行阴、阳性对照及样品反复对照试验, 判定试剂符合要求后方可使用。④ 每次实验均设立阳性和阴性对照, 且保证每次实验的阳、阴性对照值在误差允许的范围。

4. 免疫荧光抗体检测: 使用 EMROIMMUN 公司生产的 IFT 标记的免疫荧光试剂盒, 按照说明书进行操作。

5. 统计学分析: 采用 Excel 和 SPSS 12.0 软件进行统计分析。

结 果

1. 重复性试验: 根据公式计算每份标本的 CV 值, 结果显示, $CV = 3.5 \sim 4.8$, 均 < 10, 说明批内重复性较好 (表 1)。

2. 稳定性试验: 用同样的血清在不同时间分 4 次在 4 块板上做间接 ELISA 实验, 根据公式计算批间重复试验的 CV 值。结果显示, $CV = 3.4 \sim 14.1$, 说明实验的稳定性较好 (实验数据未公布)。

3. ELISA 检测结果: IFA 共检测了 239 份标本, 其中汉赛巴尔通体抗体阳性 85 份, 阳性率为 35.6% (85/239), 以 IFA 为参考标准, 分析间接 ELISA 方法的灵敏度和特异度, 发现 IFA 检测抗体阳性的 85 份标本中, 间接 ELISA 检测出 60 份阳性, 而 IFA 检测的 154 份阴性标本中, ELISA 检测 141 份阴性, 其灵敏度为 70.6% (60/85), 特异度为 91.6% (141/154)。阳性预测值 82.2% (60/73), 阴性预测值为 84.9%。ELISA 共检测了 357 份健康体检人群血清, 汉赛巴尔通体抗体阳性率为 34.5% (123/357), 其中男性阳性率为 33.3% (54/162), 女性阳性率为 35.4% (69/195), 经检验男女性感染率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.16, P = 0.68 > 0.05$)。不同年龄组的阳性率分布见表 2; 其中 >40 岁人群的阳性率最高。表 3 显示, 357 份标本中有猫、犬动物接触史的有 63 份, 占全部调查人数的 17.6%, 抗体阳性率为 33.3% (21/63), 无动物接触史的抗体阳性率为 34.7% (102/294), 经检验两者差异无统计学意义。体检人群不同性别和年龄分布见图 1。

表1 重复性实验结果

标本编号	重复次数								$\bar{x} \pm s$	CV 值
	1	2	3	4	5	6	7	8		
1 ⁺	0.395	0.382	0.389	0.386	0.405	0.417	0.436	0.402	0.402 ± 0.0194	4.836
2 ⁺	0.374	0.369	0.394	0.391	0.372	0.389	0.387	0.401	0.385 ± 0.0103	2.667
3 ⁺	0.703	0.694	0.690	0.712	0.698	0.725	0.706	0.718	0.706 ± 0.0118	1.679
4 ⁻	0.152	0.155	0.159	0.159	0.161	0.156	0.153	0.161	0.157 ± 0.0034	2.140
5 ⁻	0.130	0.129	0.128	0.135	0.133	0.129	0.122	0.130	0.130 ± 0.0041	3.179
6 ⁻	0.082	0.089	0.087	0.086	0.086	0.092	0.086	0.099	0.088 ± 0.0031	3.483

表2 昌平地区体检人群不同年龄组阳性率分布

年龄 (岁)	ELISA		阳性率 (%)	合计
	阳性	阴性		
<18	3	11	21.4	14
18~	71	136	34.3	207
30~	28	52	35.0	80
>40	21	35	37.5	56
合计	123	234	27.8	357

注: $\chi^2=1.29, P=0.73 > 0.05$

表3 昌平地区体检人群中与动物接触者 ELISA 检测结果

ELISA	男性接触史		女性接触史		合计
	有	无	有	无	
阳性	10	44	11	58	123
阴性	15	93	27	99	234
合计	25	137	38	157	357

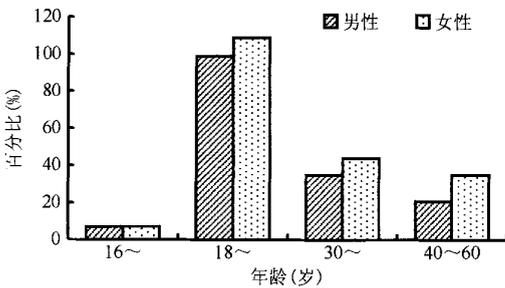


图1 北京市昌平区不同性别和年龄体检人群分布

讨论

汉赛巴尔通体的感染可导致人类多种疾病,包括心内膜炎、菌血症、肝紫癜及神经系统疾患等^[6],其临床表现复杂,很容易同其他疾病相混淆。国外对汉赛巴尔通体流行病学调查显示,人群和动物,如猫及啮齿类动物中均有很高的抗体阳性率^[7,8]。各国人群中汉赛巴尔通体抗体的血清阳性率不同,但大多数是在3.6%~11.0%。美国每年平均有因汉赛巴尔通体感染导致的猫抓病例24 000例^[9],2004年白瑛等^[10]用 IFA 对我国南方健康人群进行了调查,发现巴尔通体在健康人群有一定程度的流行。

ELISA 自 1971 年建立以来,就以其简便、快速、特异、敏感、安全、可自动化操作优点而被广泛用于人类及动物抗原抗体的监测。本研究以德国欧蒙公司生产的 IFA 试剂盒为参考标准,同时用 IFA 和本研究建立的间接 ELISA 方法检测昌平地区健康人群体检血清标本,以 IFA 检测阴性的 154 份血清作为确定 cut-off 值的阴性血清,经过 ELISA 检测后,计算其 P/I 比值,用 P/I 均值加上 2 个标准差作为实验中阳性和阴性的上限,检测结果表明这种判定方法可以有效的消除个体差异,检测结果具有可比性。由重复性和稳定性试验结果可以看出,其 CV 分别在3.5%~4.8%和3.4%~14.1%之间,说明试验的稳定性和重复性良好,灵敏度和特异度分别为70.6%和91.6%,这同 Michael 等^[11]报道相接近。

本研究结果显示,昌平地区健康体检人群汉赛巴尔通体 IgG 抗体阳性率高达35.4%,显著高于国外健康人群的感染率。男女性感染率无明显差异,其中有与动物接触史的抗体阳性率为32.8%,无动物接触史的阳性率为34.8%,两者无明显差异。汉赛巴尔通体作为一人畜共患性传染病可经过猫或犬的抓伤和咬伤传播给人类,但本次试验的结果发现二者间没有明显差异,可能的原因是,一方面本次调查的人数较少,尤其是有动物接触史的人群较少,具有一定的偏倚性;另一方面,可能是被调查者对猫或犬接触史的记忆模糊或者遗忘,而被划为无动物接触史人群中;再者,巴尔通体感染作为一种媒介传播疾病,在无猫、犬动物接触史的人群中,也可能存在着媒介节肢动物传播的可能,从而导致了无动物接触史的人群阳性率偏高。分析其不同年龄阶段的抗体阳性率,发现 18 岁以下的未成年人的阳性率偏低,因本次调查主要针对就业的成年人,可能是由于人数太少造成的偏倚。对18~岁和30~岁人群的抗体阳性进行比较,结果发现两者阳性率无明显差异,40 岁以上人群的阳性率偏高(37.5%)。可能的原

因是年龄偏大的人群其抵抗力相对较低,易于感染的缘故。本研究用间接 ELISA 和 IFA 方法对调查人群血清汉赛巴尔通体抗体分布及流行情况提供了良好的技术手段。

参 考 文 献

- [1] Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev, 1997, 10: 203-219.
- [2] Foil LE, Andress RL, O'Reilly KL, et al. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (*Siphonaptera: Pulicidae*) feces. J Med Entomol, 1998, 35: 625-628.
- [3] Schouls LM, Rijpkema SG, Schot CS, et al. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch Ixodes ricinus ticks. J Clin Microbiol, 1999, 37: 2215-2222.
- [4] Funk ND, Tabatabai LB, Elzer PH. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Brucella melitensis*-specific antibodies in goat milk. J Clin Microbiol, 2005, 43: 721-725.

- [5] 黄仕霞, 李毅, 刘秀梵. ELISA 检测鸡沙门氏菌抗体的研究. 中国畜禽传染病, 1990, 1(1): 31-33.
- [6] Beloo M, Samir SS, Adam JR, et al. Cat scratch disease presenting as orbital abscess and osteomyelitis. J Clin Microbiol, 2003, 41: 3991-3993.
- [7] Chomel BB, Kasten RW, Yamamoto K, et al. Epidemiology of *Bartonella* infections in domestic and wild carnivores and ruminants. J Microbiol Methods, 1999, 37: 280-281.
- [8] Bruno BC, Rickie WK, Kim FH, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J Clin Microbiol, 1996, 34: 1952-1956.
- [9] Jackson LA, Perkins BA, Wenger JD, et al. Cat scratch disease in the United States; an analysis of three national databases. Am J Pub Heal, 1993, 83: 1707-1711.
- [10] 白瑛, Kosoy MY, 白鹤鸣, 等. 云南健康人群巴尔通体感染的血清学评估. 中国地方病防治杂志, 2004, 19(1): 17-19.
- [11] Michael GY, Kletter B, Giladi M, et al. Enzyme immunoassay for the diagnosis of cat-scratch disease defined by polymerase chain reaction. Clin Infect Dis, 2001, 33: 1852-1858.

(收稿日期: 2006-10-25)

(本文编辑: 尹廉)

· 疾病控制 ·

青海省贵德县 2004 - 2006 年大骨节病监测

杨萍 李强 赵志军

青海省贵德县东沟乡(新建坪、斜马浪、高红崖)3村是大骨节病历史重病区。1982年定为大骨节病病区,同年人群投服亚硒酸钠、维生素C、维生素E、硫代硫酸钠等药物,进行连续4年的综合防治,于1984年改水,1995年纳入国家监测点范围。现将该监测点2004-2006年的监测情况报告如下。

1. 对象与方法:监测对象为监测点内7~12岁在校儿童。监测指标:监测点内不少于100人,均进行右手X线拍片检查(采用国产30 mAX线机,片距50~60 cm,中心线以右手第三掌骨头为准),统计I度以上患病率及X线、干骺端、骨端检出率。诊断标准按全国大骨节病诊断标准(GB 16003-1995)执行,X线片由大骨节病专家及专业人员集体读片确诊。

2. 结果与分析:共调查3个监测点的学龄儿童363人,临床检出64例,患病率为17.63%。共获得右手正位X线片363张,检出74例,总检出率20.39%。其中骨端改变者55例,占15.15%;干骺端改变者23例,占6.34%(表1)。

青海省贵德县大骨节病检出率2006年较2005年上升了11个百分点(可能与2005年剔除了7~12岁以外的儿童有关),说明病情有反复,致病因子活跃。监测结果显示,临床I度以上大骨节病患病率、X线检出率呈年度波动变化。同时,通过3年监测数据可看出干骺端病情是监测大骨节病的灵敏指标。该病区在1984年经改水、补硒等措施进行预防,但收效甚微,原因是居民的居住环境、生活条件、饮食卫生状况改变不大,生活习惯依旧,粮食自给自足,而这些都与大骨节病病情关系密切。

表1 青海省贵德县 2004 - 2006 年大骨节病临床、X线检查结果

年份	临床检查			X线检查			干骺端		骨端	
	人数	病例数	患病率(%)	人数	阳性例数	检出率(%)	例数	检出率(%)	例数	检出率(%)
2004	123	18	14.63	123	32	26.02	10	8.13	25	20.33
2005	124	27	21.77	124	15	12.10	1	0.81	14	11.29
2006	116	19	16.38	116	27	23.28	12	10.34	16	13.79
合计	363	64	17.63	363	74	20.39	23	6.34	55	15.15

(收稿日期: 2007-03-15)

作者单位: 811602 西宁, 青海省地方病预防控制所

(本文编辑: 张林东)