

# 钩端螺旋体病三种检测手段假阳性率的比较研究

汪海波<sup>1</sup>, 赵俊华<sup>1</sup>, 唐明慧<sup>1</sup>, 王琪<sup>1</sup>, 杨泽<sup>1</sup>, 林继灿<sup>1</sup>, 史咏梅<sup>1</sup>, 胡孔新<sup>2</sup>, 莫秋华<sup>1</sup>

(1. 珠海国际旅行卫生保健中心, 广东 珠海 519020; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

**摘要:** 目的 对钩端螺旋体病的三种不同检测手段的假阳性率进行比较研究。方法 收集 50 例健康人的血液标本, 分别采用钩体 IgG ELISA 试剂盒、IgM ELISA 试剂盒和 PCR 方法进行检测, 平行比较三种检测手段的检测结果。结果 在所检测的样本中, IgG 抗体检测有 4 例呈阳性反应, IgM 抗体检测有 11 例呈阳性反应, 而 PCR 检测全为阴性。结论 由于抗体检测技术可能出现的非特异性及假阳性, 有必要对钩体病进行更为特异性、更加可靠的 PCR 检测。

**关键词:** 钩端螺旋体病; 检测; ELISA; PCR; 方法比较

中图分类号: R377.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3619(2015)09-1171-03

## Comparison study on the false positive rate of three diagnosis methods for Leptospirosis

WANG Hai-bo<sup>1</sup>, ZHAO Jun-hua<sup>1</sup>, TANG Ming-hui<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>, YANG Ze<sup>1</sup>, LIN Ji-can<sup>1</sup>,  
SHI Yong-mei<sup>1</sup>, HU Kong-xin<sup>2</sup>, MO Qiu-hua<sup>1</sup>

(1. Zhuhai International Travel Healthcare Center, Zhuhai, Guangdong 519020; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

**Abstract: Objective** To compare the false positive rate of three different diagnosis methods for Leptospirosis. **Methods** IgG ELISA, IgM ELISA and PCR methods were applied to detect Leptospira in blood samples from 50 healthy individuals. Then a head-to-head comparison was conducted. **Results** In all those samples, four were positive for IgG antibody while 11 were positive for IgM antibody. However, when PCR method was used, all of them showed negative results. **Conclusion** As the non-specific and false-positive results generated by antibody detection methods, PCR method should be used instead as a more specific and reliable diagnosis approach for Leptospira detection.

**Key words:** Leptospirosis; diagnosis; ELISA; PCR; comparison

钩端螺旋体病(简称钩体病)是由钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*)引起的人畜共患传染病,早期临床表现包括三症状(寒热、酸痛、全身乏力)和三体征(眼红、腿痛、淋巴结肿大)。在实验室检测方法中,经典的菌体分离培养法和显微镜凝集实验虽然准确但是历时较长,不利于对钩体病的快速确证<sup>[1-2]</sup>。抗体(包括 IgG 和 IgM)检测技术和 PCR 检测技术均可对钩体病进行快速的诊断,然而它们的检测结果是否存在差异尚未有报道。本研究拟对钩体病抗体检测和 PCR 检测方法进行平行比较,对比筛选钩体病检测最优的方法,为钩体病临床诊断提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 样本 健康人全血样本采自珠海国际旅行

基金项目:“十二五”国家科技重大专项课题(2011ZX10004-001)

作者简介:汪海波(1983-),男,博士,副主任技师,研究方向为传染病检测与防控

通讯作者:莫秋华(1973-),男,博士,主任技师,研究方向为传染病检测与防控, E-mail: mqzh13@163.com

卫生保健中心体检人员,共 50 份;钩体标准株购自中国药品生物制品检定所。

1.1.2 试剂和仪器 ELISA 试剂盒 SERION ELISA classic Leptospira IgG/IgM 购自德国维润赛润(virion-serion)公司;全血 DNA 提取试剂盒和细菌 DNA 提取试剂盒购自北京天恩泽基因科技公司;rTaq, dNTP 和 100 bp DNA ladder Marker 均购自 TaKaRa 公司;琼脂糖购自美国英潍捷基(Invitrogen)公司;C1000 型 PCR 扩增仪和凝胶成像系统购自美国伯乐(Bio-Rad)公司;NanoDrop 2000 型微量紫外分光光度计购自美国 Thermo 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 ELISA 钩体 IgG/IgM 抗体 ELISA 检测按照试剂盒说明进行。首先,将待测样本(血清或血浆)用试剂盒配备的专用稀释液(测 IgM 时该稀释液中须加入 20%的内风湿因子吸附剂)进行 100 倍稀释,加入 ELISA 板中 37℃ 孵育 60 min,洗涤 4 次后加入酶标抗体,37℃ 孵育 30 min;再次洗涤后加入显色底物,37℃ 孵育显色 30 min 后加入终止液终止显色反应,在 405 nm 波长下读取 OD 值,参比波长设为 655 nm。按照试剂盒提供的结果参照表

进行阴/阳性结果判定。

1.2.2 DNA 提取 全血和钩体培养物中 DNA 提取按照相应的 DNA 提取试剂盒的说明书进行,测浓度后分装于-70℃ 保存备用。

1.2.3 PCR 反应 采用荷兰皇家热带研究院世界卫生组织钩体病参考中心设计的引物<sup>[3-4]</sup>进行 PCR 反应。正向引物:5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3'; 反向引物:5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3',扩增产物大小为 285 bp。PCR 反应体系为 Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)2.5 μl,dNTPs(各 2.5 mmol/L)2.0 μl,rTaq DNA 聚合酶(5 U/μl)0.25 μl,引物(10 μmol/L)各 1 μl,模板 2 μl,ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μl。反应条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。取 5 μl 扩增产物和 1 μl 上样缓冲液混匀后,用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳并成像观察结果。

## 2 结果

2.1 抗体 IgG ELISA 检测结果 50 例健康人中有 4 例对钩体 IgG 呈阳性反应(OD 值分别为 0.711, 0.723, 0.860 和 1.044),其余 46 例为阴性。

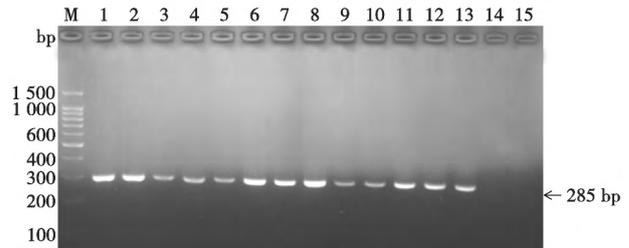
2.2 抗体 IgM ELISA 检测结果 50 例健康人中 11 例呈现钩体 IgM 阳性反应(OD 值介于 1.167 和 2.547 之间),其余 39 例呈阴性反应。

2.3 PCR 检测结果 经过条件优化,从 13 种不同血清群的钩体标准株中均可以扩增得到一条特异性的 285 bp 目的条带(图 1)。而在 12 例钩体抗体(IgG 或 IgM)阳性标本中只出现了非特异性的扩增(图 2),经条件优化后仍然不能得到特异性的 285 bp 条带,表明这些样本中未能检测到钩体核酸。

2.4 方法的比较研究 上述结果表明,该抗体检测试剂 IgG 抗体检测的假阳性率为 8%(4/50),IgM 抗体检测的假阳性率更高达 22%(11/50),而 PCR 检测则无 1 例出现假阳性结果。

## 3 讨论

钩体病广泛分布于全世界,在中国危害也较严重<sup>[5-7]</sup>。由于钩体侵犯人体的多种脏器,所以临床表现复杂,是一种多临床型别的传染病。临床症状分为流感伤寒型、肺出血及肺弥漫性出血型、黄疸出血型、肾型及脑膜炎型等多种类型。其中肺出血型钩体病多出现在病后的 2~3 d,往往由于早期的不正当治疗而导致死亡<sup>[8]</sup>。因此,钩体病的早期诊断是降低其病死率的关键。传统的钩体分离培养由于培养时间长,易受污染而影响了钩体病的早期诊断。抗体检测和 PCR 检测由于具有快捷、灵敏等优



M: 100 bp Marker; 1~13: 黄疸出血群、爪哇群、犬群、致热群、秋季群、澳洲群、波摩那群、七日热群、巴达维亚群、塔拉索夫群、曼耗群、赛罗群和明尼群; 14: 阴性对照; 15: 空白对照。

图 1 不同血清群的钩体标准株的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR results of *Leptospira* reference strains from different serogroups



M: 100 bp Marker; 1~12: 健康人 T1483、T1486、T1489、T1490、T1493、T1497、T1508、T1516、T1518、T1529、M359 和 M362; 13: 空白泳道,以防点样渗漏; 14: 阳性对照; 15: 阴性对照; 16: 空白对照。

图 2 抗体阳性样本的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR results of those samples with positive antibody responses

势,被引入钩体病的诊断领域,提高了对钩体病的诊断能力。

本研究中钩体 IgG 抗体检测选用的是德国维润赛润(virion-serion)公司生产的试剂盒,采用的是间接法,检测前按照试剂盒操作说明对样本进行了高比例的稀释(100 倍稀释)以消除人体接触外界环境刺激所产生的非特异 IgG 对实验结果的影响,但是仍然出现 8% 的假阳性率,推测可能同包被抗原的纯度不够高有关。目前抗体间接法检测中所使用的抗原大多为基因工程重组抗原,这些重组抗原虽然经过了纯化,尽可能地去除了用于蛋白表达的宿主(大肠杆菌或酵母)的抗原<sup>[9]</sup>,但是可能纯化工艺尚不够先进,使得重组抗原中仍然存在微量的宿主抗原,导致由于人体存在对这种宿主抗原的抗体而引起假阳性反应。

IgM 抗体检测选用的是同 IgG 抗体检测配套的间接法检测试剂盒,检测时也遵照试剂盒操作说明对样本进行了内风湿因子吸附处理,摒除了由于其能与固相抗人 μ 链抗体结合从而导致假阳性反应的可能性<sup>[10-11]</sup>。但检测结果同样出现了高达 22% 的假阳性率。在使用间接法测 IgM 抗体时,由于样

本中含有高浓度的 IgG 抗体易与 IgM 抗体竞争固相抗原,干扰 IgM 抗体的检测。因此,通常须将样本用抗人 IgG 抗体或 SPA 进行预处理,从而去除 IgG 的干扰。此外,非特异性 IgM 抗体也对检测结果存在一定的影响。有研究表明,改用捕获法也有助于提高 IgM 抗体检测的准确性<sup>[12-13]</sup>。

与抗体检测截然不同,在 PCR 检测中,所使用的引物和优化过的扩增条件可检测 13 种不同血清群的钩体,并且只出现一条特异性的扩增条带,说明 PCR 检测技术具有很好的广谱性和特异性。而在对这些临床样本进行 PCR 检测时,虽然反应条件经过了进一步的优化,包括调整反应体系和调整扩增循环条件,都只能检测到很弱的非特异性扩增,未能出现特异性的 285 bp 目的片段条带,因此应该对这些样本出具阴性检测结果报告。利用经典的钩体分离培养技术对这些抗体检测阳性的样本进行的鉴定结果表明,未能分离得到钩体菌株,进一步证明 PCR 检测技术是可靠的。

本研究不足之处在于未能收集得到足够多的钩端螺旋体阳性病人的血清作为阳性对照组,导致未能阐明该抗体检测试剂盒的阳性预期值和阴性预期值,这一点还有待进一步的研究。

综上所述,在钩体病的检测当中,抗体检测技术(包括 IgG 和 IgM 检测)容易产生非特异性,出现假阳性结果;而 PCR 检测技术则表现出了很好的特异性和广谱性,是一种更为可靠的检测方法。鉴于此,PCR 检测技术应该被进一步的推广应用,以指导临床诊断。

#### 参考文献

- [1] Calderón A, Rodríguez V, Múttar S, et al. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics [J]. Trop Anim Health Pro, 2014, 46(2): 427-432.
- [2] 严智先, 莫伟雄, 葛德珊. TR/Patoc-I 株抗原肉眼凝集试验在钩端螺旋体病中的临床意义 [J]. 热带医学杂志, 2005, 5(2): 188-192.  
Yan ZX, Mo WX, Ge DS. Clinical significance of quick slide agglutination test in Leptospirosis [J]. J Trop Med, 2005, 5(2): 188-192.
- [3] Gravekamp C, van de Kemp H, Franzen M, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers [J]. J Gen Microbiol, 1993, 139(8): 1691-1700.
- [4] Cermakova Z, Kucerova P, Valenta Z, et al. Leptospirosis: possibilities of early laboratory and clinical diagnosis [J]. Cent Eur J Med, 2013, 8(1): 84-89.
- [5] 孙小康, 林燕峰, 徐国洪. 清远市 2004 年钩端螺旋体病监测分析 [J]. 热带医学杂志, 2005, 5(6): 832-835.  
Sun XK, Lin YF, Xu GH. Surveillance of Leptospirosis in Qingyuan City in 2004 [J]. J Trop Med, 2005, 5(6): 832-835.
- [6] 余录根. 国内钩端螺旋体病的流行特征与外膜疫苗研究进展 [J]. 预防医学论坛, 2006, 12(1): 69-71.  
Yu LG. Epidemiology of leptospirosis in China and research progress on leptospire out membrane vaccine [J]. Prev Med Trib, 2006, 12(1): 69-71.
- [7] Hu WL, Lin XA, Yan J. Leptospira and leptospirosis in China [J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(5): 432-436.
- [8] 罗文英. 钩端螺旋体病的实验室诊断及研究进展 [J]. 现代预防医学杂志, 2008, 35(20): 18-19.  
Luo WY. Laboratory diagnosis and research progress of leptospirosis [J]. Mod Prev Med, 2008, 35(20): 18-19.
- [9] Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, et al. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2011, 105(5): 289-297.
- [10] Smits H, Eapen C, Sugathan S, et al. Lateral-Flow Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis [J]. Clin Vaccine Immunol, 2001, 8(1): 166-169.
- [11] Li YC, Yang F, Ji XY, et al. False Human Immunodeficiency Virus Test Results Associated with Rheumatoid Factors in Rheumatoid Arthritis [J]. Chin Med Sci J, 2014, 29(2): 103-106.
- [12] Hansen K, Pii K, Lebech A. Improved immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated Borrelia burgdorferi flagella [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(1): 166-173.
- [13] Alizadeh S, Eshraghi S, Pourmand M. Diagnostic Efficacy of Lsa63 Antigen for Human Leptospirosis [J]. Iran Red Crescent Med J, 2014, 16(3): e14753.

收稿日期: 2014-12-03