

# 两种方法检测钩端螺旋体病的一致性评价

黄德蕙, 曾竣, 蒋震玲, 王鸣柳

广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028

**[摘要]** **目的** 了解钩体显微镜凝集试验 (MAT) 与胶体金免疫凝集试验 (GICA) 特性, 掌握方法间的优劣, 评价两种方法的一致性。**方法** 选择广西钩体病监测点人血清及鼠血清, 同时进行 MAT 和 GICA 检测。**结果** MAT 特异度和灵敏度分别为 70% (49/70)、52.09% (349/670); 胶体金灵敏度为 30% (21/70)、特异度则为 47.91% (321/670)。两种方法间具有高度显著性差异, 其卡方值  $X^2=12.31$ ,  $P<0.01$ ; 两种方法间的特定一致性为 27.27% (15/55), 二者间一致性为 89.19% (330/370), 其  $K_a$  值为 0.37, 显示两种方法一致性强度为“尚好”。**结论** MAT 与 GICA 比较具有不同的特点, MAT 适用于钩体病的临床及监测, 而 GICA 则适用于突发事件现场使用。**[关键词]** 方法 钩端螺旋体 一致性 评价

Consistency evaluation of two methods for detection of *Leptospira*

Huang De-hui, Zeng-jun, Jiang Zhen-ling, Wang Ming-liu

The Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control, nanning 530028, china

钩端螺旋体病是由致病性钩端螺旋体引起的自然疫源性疾病, 可引起全身性感染和免疫反应。由于钩体病不但能引起中毒性败血症, 随着病情发展还能累及不同组织和器官。因此, 早发现、早诊断对钩体病的防控具有重要的流行病学意义。胶体金免疫层析技术起步于 90 年代, 目前广泛应用各种细菌、病毒等疾病的检测。本文应用传统方法显微镜凝集试验 (MAT) 与新技术胶体金同时检测, 平行比对两者的优劣。现将结果报道如下:

## 1 材料

**1.1 人血清** 选择 2009 年广西钩端螺旋体病监测点中宾阳县、金秀县及 2009~2010 年广西壮族自治区疾病预防控制中心门诊收集的人血清作为研究对象。共 303 份, 其中男性血清 166 份 (54.79%), 女性 137 份 (45.21%), 供血者年龄范围 9~75 岁, 平均年龄  $(38.64 \pm 15.94)$  岁。

**1.2 鼠血清** 选择 2009 年广西百色市疾病预防控制中心采集的鼠血清作为研究对象。

## 2 方法

**2.1 钩端螺旋体显微镜凝集试验 (MAT)** 钩端螺旋体显微镜凝集试验 (MAT) 原理: 将我国 15 群 15 型钩端螺旋体标准菌株于 EMJH 培养基中培养, 置 28℃ 5~7 天, 作为凝集抗原备用。病人血清用生理盐水以 1:50 稀释加入血清稀释液 0.1ml/孔, 加显微镜凝集抗原 0.1ml/孔, 混匀, 置 37℃ 孵育 1~2 小时, 于暗视野显微镜下观察结果。标本实验操作及结果判断均按照中华人民共和国卫生行业标准, 钩端螺旋体病诊断标准<sup>[1]</sup>WS290-2008, 附录

A.3.1 显微镜凝集试验 (MAT) 进行。抗体滴度以 1:400 判为阳性。

**2.2 胶体金免疫凝集试验 (GICA)** 胶体金免疫荧光试验原理: 将钩端螺旋体抗原包被在硝酸纤维膜上, 用于捕捉血清标本中的钩端螺旋体抗体, 同时用标记了的金黄色葡萄球菌蛋白 A 的免疫胶体金探针进行检测。按军科院生产的钩端螺旋体抗体快速检测试剂 (胶体金法) 说明书进行操作及判断结果。阳性结果: C 窗和 T 窗出现 2 条红色沉淀线为阳性; 阴性结果: C 窗出现 1 条红色沉淀线为阴性; 试剂失效: C 窗未出现红色沉淀线, T 窗是否出现沉淀线均判为试剂失效。

**2.3 统计分析:** 应用 EXCEL 表格将资料数据进行统计分析。

## 3 结果

**3.1 观察对象人群中性别、年龄分布** 共观察人群有 303 例, 其中男性为 166 例、女性

为 137 例, 男女间性别比为 1:0.83; 年龄组中例数最多为 40~组占 69 例、最少为 1~组 8 例。;

**3.2 钩体病显微镜凝集试验、胶体金检测结果分布** MAT 总阳性率为 13.24%、胶体金总阳性率为 5.68%; 标本间比对: 人血清 MAT 阳性率为 16.17%、胶体金阳性率则为 6.93%; 鼠血清 MAT、胶体金阴性率均为 100%; MAT 特异度和灵敏度分别

[在此处键入]

为 70%、52.09%；胶体金灵敏度为 30%、特异度则为 47.91%。两种方法间差异具有高度显著性差异，其  $X^2=12.31$ ， $P<0.01$ 。其他见表 1 中所示。

表 1. 两种方法显微镜凝集试验（MAT）、胶体金免疫凝集试验（GICA）检测结果

标本	数量	MAT				GICA			
		阳性数	阳性率 (%)	阴性数	阴性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)	阴性数	阴性率 (%)
人血清	303	49	16.17	254	83.83	21	6.93	282	93.07
鼠血清	67	0	0	67	100.0	0	0	67	100.0
合计	370	49	13.24	321	86.76	21	5.68	349	94.32

3.3 两种方法平行比对结果 不同方法的检出率分别为：MAT 为 13.24%（49/370）、胶体金为 5.68%（21/370）；两种方法均阳性有 15 例、两种方法均阴性有 315 例，二者均一致性有 330 例，两种方法总一致性为 89.19%（330/370）；两种方法特定一致性为 27.27%（15/55）；两种方法比较其 KA 值为 0.37，二者间一致性为 89.19%（330/370），显示两种方法一致性强度为“尚好”。其他见表 2。

表 2. 两种方法平行比对结果

方法	MAT		
	M+	M-	合计
胶体金+	15	6	21
胶体金-	34	315	349
合计	49	321	370

4 讨论

4.1 方法间优劣性评价：

众所周知，钩端螺旋体病自然宿主动物种类繁多，分布广泛，我国从 60 多种动物体内检出病原体；广西也发现多种宿主动物携带或感染钩端螺旋体。中国问号（致病性）钩端螺旋体参考菌株 18 群 76 型中有 2 株由广西病人中分离，其中 1 株是巴达亚群巴叶赞型（56612）分离于 1958 年；另一株明尼群（56655）于 1972 年广西病人中分离。目前，国际上钩端螺旋体种下的分类方法有：血清学分类法和分子生物学分类法。血清学分类方法历史悠久，应用广泛、具有预防和诊断的实用性。血清学分类鉴定分为分群检定与分型检定。分群鉴定通过显微镜凝集试验，具有定性和定量作用；分型鉴定的标准方法是凝集交叉吸收试验。

钩端螺旋体显微镜凝集试验（MAT）与胶体金免疫凝集试验（GICA）各自具有不同优点。MAT 优点：能够分群分型，具体诊断，易于临床医生判断和治疗；MAT 缺点：菌株保存、传代复杂，菌株易于丢失难保存；操作复杂、显微镜观察难以判断。由于 MAT 操作复杂，但可分群，适宜对钩体监测及临床检测并给予相应的治疗；利用 MAT 可了解我国各省市钩体病流行病学特征、掌握各地钩体病流行菌群，采取相应的防控措施<sup>[2-8]</sup>。

胶体金试剂是检测循环系统总抗体，即包括 IgG、IgM 均可检出；本试剂可检出黄疸出血群赖型、爪型、犬型、拜伦型、致热型、秋季热型、澳洲型、波摩那型、流感伤寒群临型、七日热型、赛罗群乌尔扶型、明尼型、巴达维亚群巴叶赞型、塔拉索夫型、曼耗 II 型。其他血清型抗体可能漏检。杜新安<sup>[9]</sup>阐明：胶体金具有很高的动力学稳定性。主要在电镜水平、光镜等检测中广泛应用；卿格非<sup>[10]</sup>提示：胶体金技术通过特异性抗体和胶体金标记二抗，能对组织、细胞中特异抗原的分布进行形态学研究，并可把形态和功能研究结合；李岩伟<sup>[11]</sup>报道：免疫胶体金试剂具有特异敏感等特点，试剂稳定性好，非常适宜基层或突发事件现场使用。胶体金优点：操作简单快速、易于判断。适用于人血清及大多数动物哺乳动物血清中检测。易于现场使用、突发性疫情判断；较体金缺点：仅用于血清学诊断，不能用于钩体菌群（型）确定；试剂取出应立即使用，否则受潮后易失效。胶体金适用于突发性疫情现场检测，缺陷为不能分群。结合两种方法特点在实际工作中灵活应用可提高检测速度及提高检验水平。

4.2 影响因素 实验中影响检测质量的关键因素包括：人员、样本（采集与运输）、试剂及耗材准备、培养基配制及质量控制、量值溯源、仪器设备维护与管理、实验条件控制等，因此实验室应建立、实施与钩体相应的

质量管理体系，首先①应建立质量控制体系。建立实验室质量控制体系文件、实验标准操作程序、生物安全防护体系、质量控制参考菌株；②应对人员进行相应的质量考核。③进行室内质量控制。通过对各种实验设备、实验条件、操作过程进行监测和控制；④开展室间质量评价。能完善实验室建设，不断提升检验质量水平。

胶体金特点是可取代三大传统标记物，用于肉眼水平的免疫检测中。它的优点具有①试剂和样本量极少；②不需要贵重仪器；③适用于现场应用；④没有反射性物质；⑤实验结果可长期保存；⑥检测时间大大缩短，提高检测速度；⑦其敏感性可达到酶标水平。胶体金技术是继三大标记技术（荧光素、放射性同位素、酶）后发展起来的固相免疫测定技术，是以胶体金作为示踪标志物，应用于抗体抗原反应的一种新型免疫标记技术，近年来该技术在医学、动植物、食品安全监督等各领域得到了日益广泛应用。把胶体金层析方法、颗粒标记、免疫检测等技术放在在一起的一种技术。不需要特殊仪器，适合现场快速检测，具有极高应用价值。

总之，钩端螺旋体病是一种自然疫源性、人兽共患传染病，为了提高钩体病检验技术，必须对各种影响因素进行相应的质量控制，才能提高检验方法的灵敏度和特异性，达到尽早控制疾病传染的目的。加强和完善钩体病监测，是控制其流行的根本因素。

### 参考文献：

- [1] 中华人民共和国卫生行业标准 WS290-2008. 钩端螺旋体病诊断标准. 北京. 人民卫生出版社[S]. 2008-01-16
- [2] 程均福, 张亚兵, 张令要等, 三峡坝区钩端螺旋体监测结果分析[J], 公共卫生与预防医学, 2008, 19 (1) : 27-30
- [3] 王岚, 吴子贵, 龙智纲等, 湖南省 2000-2005 年钩端螺旋体病病原学及血清学监测结果分析[J], 实用预防医学, 2006, 13 (3) : 644-645
- [4] 陈经雕, 孙小康, 杜志明等, 2001-2003 年广东省钩端螺旋体病监测结果分析[J], 中国卫生检验杂志, 2004, 14 (5) : 604-605
- [5] 陈志林, 王丽娟, 冯开军等, 山东省 1985-2002 年钩端螺旋体病监测概况分析[J], 职业与健康, 2004, 20 (4) : 63-66。
- [6] 黄自英, 赵慕愚, 郭宗琪等, 1993-2000 年四川省钩端螺旋体菌群分布[J], 预防医学情报杂志, 2001, 17 (14) : 229-230
- [7] 刘运芝, 湛志非, 张红, 等. 湖南省 2008 年钩端螺旋体宿主动物感染状况结果分析[J], 实用预防医学, 2009, 16 (6) : 1780-1782
- [8] 潘敏楠, 徐国英, 陈阳, 等. 福建省钩端螺旋体流行特点分析[J], 实用预防医学, 2012, 19 (2) : 188-190
- [9] 杜新安, 曹务春主编, 生物恐怖的应对与处置[S]人民军医出版社, 2005 年第一版。
- [10] 卿格非, 戴保民, 王远萍, 应用胶体金技术对钩体抗原超微定位的研究[J], 华西医大学报, 1989, 20 (4) : 366-368
- [11] 李岩伟, 程君生, 左庭婷等, 免疫胶体金试剂检测布鲁菌苗接种中牛血清结果分析[J], 军事医学, 2013, 37 (11) : 873-874。