

## 应用微量免疫荧光法检测 IgM 抗体对乙脑病人早期诊断\*

李钟铎 王鹤翔\*\* 宋光昌 陈万荣

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

本文报告了用免疫荧光技术检测乙脑病人血清中 IgM 抗体的方法, 用乙脑病毒感染 BHK 21 传代细胞固定后作为间接免疫荧光染色的抗原底物, 对 60 例常规血清学检查确诊为乙脑病人的急性期血清进行了检测, 其中 57 例为阳性。同时对 26 例非乙脑病人及 32 例健康人血清的检测皆未发现特异性 IgM 抗体。

检测时采用微量法, 特异性强, 敏感性高, 节省试剂, 手续简便。

应用免疫荧光法检查病人血清中抗病毒 IgM 抗体来诊断疾病是近年来血清学诊断工作中的一个较新的技术。在风疹、流感、森林脑炎等病的研究中都已已有报告<sup>[1-3]</sup>。

对乙脑病人急性期血清用血凝抑制试验, 2-巯基乙醇 (2-ME) 法检测 IgM 抗体进行早期诊断<sup>[4]</sup>, 只有在抗体滴度较高时才能引起血凝滴度明显下降, 因此可靠性较差<sup>[5]</sup>, 敏感性不高。按 Robert 报告, 检出率仅为 57%<sup>[6]</sup>。

本文报告了用微量免疫荧光技术检测病人急性期单份血清中特异性 IgM 抗体的结果, 为乙脑病人的早期特异性诊断提供了一个较好的方法。

### 材料和方法

#### (一) 血清标本

乙脑病人血清采自 1979 年 8—9 月份北京市第一、第二传染病医院、儿童医院、解放军 302 医院及海军总医院等处之临床诊断为乙脑的住院病人。共收集 83 例病人的急性期单份血清, 其中有 60 例病人有恢复期双份血清 HI 或/和 CF 试验证明为乙脑。其他 23 例未收集到恢复期血清。另外, 还收集了临床诊断为类风湿、风湿热、腺病毒

感染、血液病及原因不明发烧者的血清共 27 份。健康体检者血清 32 份, 做为对照血清。

#### (二) 羊抗人 IgM 及羊抗人 IgG 血清荧光结合物的制备

羊抗人 IgM 由本所免疫室赠给。按本组荧光血清制备法提取球蛋白, 再标记 FITC 荧光素。经 Sephadex G-50 柱去除游离荧光素, 过 DEAE-纤维素层析纯化, 制备成羊抗人 IgM 荧光抗体结合物<sup>[7]</sup>, 染色单位 1:16。

羊抗人 IgG 血清为本组 1974 年制备, 环状沉淀试验效价 1:128。用饱和硫酸铵提取球蛋白之后, 按 Bergquist 报告法稍加改进与异硫氰酸四乙基罗达明荧光素 (RBITC) 结合<sup>[8]</sup>, 染色效价为 1:64。

#### (三) 病毒

乙脑病毒, 京卫研 1 株, 用于制备感染细胞标本, 鼠脑滴定 LD<sub>50</sub> 7.6。

登革 2 型、森脑 (森张株) 及西方马脑炎病毒均由本室毒种组提供。分别用于制备各病毒的感染细胞标本。

#### (四) 组织培养感染细胞标本的制备

组织培养采用 BHK21 传代细胞。感染乙脑、

本文于 1980 年 3 月 6 日收到。

\* 本工作中使用的病人血清由北京市第一、第二传染病医院、儿童医院、302 医院、307 医院及海军总医院协助采集, 谨致谢意。

\*\* 成都军区军事医学研究所。

登革 2 型、森林脑炎及西马病毒的细胞标本皆按本组 1975 年报告法制备<sup>[7]</sup>, 每批标本片在正式试验前都取样用直接免疫荧光法染色, 镜下观察证明均存在特异性感染细胞。

### (五) 荧光抗体染色及观察

采用微量荧光抗体法染色, 将病人血清 1:10 稀释, 经 56℃、30 分钟灭活作为间接法第一血清与感染细胞标本在 37℃ 结合 2 小时, 第二血清羊抗人 IgM 或羊抗人 IgG 荧光抗体在 37℃ 与标本结合 45 分钟, 最后封片镜检<sup>[7]</sup>。

镜检使用德国 Leitz 厂 Orthoplan 荧光显微镜, 光源为 HBO 200 汞灯, 用落射光装置观察。FITC 结合物使用③号转换器, RBITC 结合物使用④号转换器。按特异性荧光强度判定阳性结果“4+、3+、2+、+”, 无特异荧光为阴性“-”。照相用保定 17DIN 彩色胶卷, 感光 7 分钟。

### (六) 补体结合及 2-ME 血凝抑制试验

采用微量法进行补体结合试验及 2-ME 血凝抑制试验, 对单份血清补体结合试验效价皆按 1:8 以上作为阳性。血抑试验效价在 1:160 以上或 2-ME 处理后血凝滴度下降 4 倍者为阳性。

## 结 果

### 一、感染病毒的 BHK21 细胞荧光染色特征

BHK 21 传代细胞由椭圆形及部份梭形的细胞组成, 经荧光抗体染色后在感染细胞的胞浆内可见特异性荧光, 胞核不着色。抗 IgM 荧光血清染色阳性的细胞呈黄绿色胞浆内特异荧光, 未感染的细胞可因伊文思蓝染色而呈淡红色。感染标本经抗 IgG 荧光血清染色后, 阳性细胞之胞浆内呈特异性桔红色荧光, 而周围未感染的细胞呈淡红色不发荧光(图版 I-1、2)。

### 二、各种血清的 IgM 荧光抗体染色

对收集的全部血清按病人种类分组进行间接免疫荧光抗 IgM 检查。在 60 例经双份血清用补结和/或血抑试验证明为乙脑病人的急性期血清中有 57 例 IgM 抗体检出阳性, 占 95%。在 27 份非乙脑病人

及 32 份健康人的血清中皆未发现乙脑病毒 IgM 抗体(表 1)。抗乙脑病毒 IgM 抗体仅为乙脑病人所特有, 因此可以认为微量免疫荧光法检出乙脑 IgM 抗体作为乙脑的诊断指标是特异的, 可靠的。

表 1 病人及健康者血清检测结果

| 病 种                | 抗 IgM 荧光染色例数 |    |     |
|--------------------|--------------|----|-----|
|                    | 阳性           | 阴性 | 合计  |
| 乙脑                 | 57           | 3  | 60  |
| 腺病毒感染              | /            | 10 | 10  |
| 风湿及类风湿             | /            | 6  | 6   |
| 肠道病毒感染             | /            | 1  | 1   |
| 各种原因发烧(上感肺炎等)      | /            | 6  | 6   |
| 其它疾病(血液病、IgM 骨髓瘤等) | /            | 4  | 4   |
| 健康人                | /            | 32 | 32  |
| 合 计                | 57           | 62 | 119 |

### 三、乙脑病人血清中 IgM 的检出与常规血清学试验的比较

采用临床诊断为乙脑的急性期单份血清进行检查, 发现常规血清学补体结合及血凝抑制试验阳性者荧光法全部检出 IgM 抗体, 没有发现 CF 和 HI 阳性而荧光检出阴性者。用 CF 法未能检出抗体者有 39 例而经荧光法检出 IgM 抗体, 有 5 例两法检查都是阴性。HI 有 30 例检查为阴性的标本用荧光抗体法检出 IgM, 有 8 例两法检查都是阴性(表 2)。

从表 2 可见荧光抗体法最敏感检出率约占 90% (73/83), HI 法次之为 51.3% (40/78), CF 的敏感性最低为 26.7% (16/60)。

我们还对 25 份 IgM 阳性的血清进行了荧光抗体染色效价滴定, 发现最高可达 1:1280, 最低为 1:40, 其中有 19 份(占 76%) 标本在 1:160—1:640 之间。

### 四、IgM 抗体的染色时间及效果

众所周知, IgG 抗体可以在 30 分钟内

表 2 常规血清学检测与荧光抗体检出的结果比较

| 荧光抗体法检测 IgM 抗体 | 例 数 | 补体结合试验 |     |       | 血凝抑制试验 |     |       |
|----------------|-----|--------|-----|-------|--------|-----|-------|
|                |     | 阳 性    | 阴 性 | 抗补或未作 | 阳 性    | 阴 性 | 可疑或未作 |
| 阳 性            | 73  | 16     | 39  | 18    | 40     | 30  | 3     |
| 阴 性            | 10  | —      | 5   | 5     | —      | 8   | 2     |
| 合 计            | 83  | 16     | 44  | 23    | 40     | 38  | 5     |

表 3 病人血清中 IgM 抗体与染色时间的关系

| 病人血清 | IgM 染色时间 |     |     |      |      |
|------|----------|-----|-----|------|------|
|      | 30'      | 60' | 90' | 120' | 180' |
| 1    | —        | —   | +   | +    | 未作   |
| 2    | —        | —   | —   | +    | 未作   |
| 3    | —        | —   | —   | +    | +    |
| 4    | —        | —   | —   | +    | +    |

表 4 与不同病毒感染的标本交叉染色结果

| 病人血清 | 不 同 病 毒 感 染 的 标 本 |    |          |    |    |
|------|-------------------|----|----------|----|----|
|      | 乙 脑               | 森脑 | 登革(II 型) | 西马 | 正常 |
| 马××  | 4+                | —  | —        | —  | —  |
| 张××  | 2+                | —  | —        | —  | —  |
| 爱××  | 3+                | —  | —        | —  | —  |
| 黄××  | 2+                | —  | —        | —  | —  |
| 杨××  | 3+                | —  | —        | —  | —  |

表 5 血清处理后荧光抗体染色的结果

| 病人血清 | 处 理 前 |       | 2-ME 处理后 |       | 71℃ 10' 加热 |       |
|------|-------|-------|----------|-------|------------|-------|
|      | 抗 IgM | 抗 IgG | 抗 IgM    | 抗 IgG | 抗 IgM      | 抗 IgG |
| 门××  | 3+    | 3+    | —        | 3+    | —          | 3+    |
| 马××  | 4+    | 4+    | —        | 4+    | —          | 3+    |
| 张××  | 3+    | 4+    | —        | 2+    | —          | 3+    |

与标本抗原结合,而对 IgM 抗体在 30 分钟内不能与标本抗原结合。我们取 4 份 IgM 阳性的乙脑病人血清标本,以 1:10 稀释后进行染色,发现染色 90 分钟时只有 1 份显示阳性,120 分钟时 4 份均为阳性(表 3)。

从实验中发现染色时间必须在 2 小时以上。

#### 五、乙脑病人血清 IgM 抗体与其他几种病毒抗原的交叉染色试验

经森脑、西马及登革(2 型)荧光抗血清染色为阳性的标本,用乙脑 IgM 抗体阳性病人血清(1:10 稀释)进行间接法染色,结果未发现交叉反应(表 4)。

证明乙脑病人血清中 IgM 抗体为乙脑的特异性抗体。

#### 六、破坏 IgM 抗体后的荧光抗体染色效果

将乙脑病人血清分别用 2-巯基乙醇(2-ME)和加热破坏血清中的 IgM 抗体,实

验结果证明在 IgM 抗体破坏后, 抗 IgM 荧光血清染色显阴性, 而未经处理的呈阳性结果, 说明抗 IgM 荧光血清是特异性的。另发现将病人血清于 71℃ 加热 5 分钟即可将 IgM 处理干净, 加热时将血清作 1:10 稀释, 与 2-ME 处理后浓度一致, 进行染色 (表 5)。

从表 5 也可看出抗人 IgM 荧光血清与人 IgG 抗体无交叉关系, 因为 IgG 抗体可见阳性结果, 而抗 IgM 荧光血清染色是阴性。

### 七、IgM 抗体检出与采血时间的关系

从 60 例常规血清学试验确定的乙脑病人采血日期来看, 最早可在病后 2—3 天检出 IgM 抗体, 但也有个别病人在 6、7 天时尚未检出 (表 6)。

表 6 IgM 抗体检出与采血时间的关系

| 发病后采血天数 | 例 数 |    |    |
|---------|-----|----|----|
|         | 阳性  | 阴性 | 合计 |
| 第 2—3 天 | 14  | 1  | 15 |
| 4       | 11  | 0  | 11 |
| 5       | 8   | 0  | 8  |
| 6       | 12  | 1  | 13 |
| 7       | 3   | 1  | 4  |
| 8       | 7   | 0  | 7  |
| 12      | 1   | 0  | 1  |
| 13      | 1   | 0  | 1  |
| 合 计     | 57  | 3  | 60 |

## 讨 论

检查病人血清中 IgM 特异性抗体对疾病进行早期诊断是近年来开始使用的一种血清学方法。我们用免疫荧光法对 60 例乙脑病人急性期血清中抗乙脑病毒特异性 IgM 抗体进行检测, 阳性为 57 份, 占 95%, 而非乙脑病人及健康人的血清则无一例阳性, 说明此法应用于乙脑病人的诊断是可靠的。

文献报道用荧光抗体法检查 IgM 及

IgG 抗体对风疹的诊断可信度为 100%。选择患者适当时间的单份血清进行 IgM 检查可鉴别是原发感染还是继发病例<sup>[10,11]</sup>。Vera 用免疫荧光法对 16 例森脑病人急性期血清检查发现了 9 份有 IgM 抗体, 认为它有助于急性期森脑病人的确诊<sup>[3]</sup>。

在我们的试验中有 3 例确诊为乙脑病人而荧光抗体法在急性期血清中未检出 IgM 抗体, 可能是病人抗体反应低, 其中 2 例在 20 天左右收集到恢复期血清, 测定 IgM 抗体已转阳性。

关于 IgM 抗体荧光抗体染色检测的敏感性问题, 有人认为血清中特异性 IgG 的高效价对抗原有封闭作用, 检出率不高<sup>[12]</sup>。我们对 3 种血清学方法进行比较, 荧光法最敏感, 血抑次之。

关于乙脑 IgG 抗体与乙脑病人的关系无疑是密切的<sup>[12]</sup>, 我们在测定 IgM 抗体的同时也测定了 IgG 抗体, 发现了急性期病人血清中 IgG 抗体的产生, 而且有些效价可达 1:640。但是由于乙脑自然隐性感染及疫苗的使用, 在非乙脑病人及健康者的血清中 IgG 抗体出现的比例也相当高, 占 57.6% (34/59), 而 IgM 抗体仅为急性期乙脑病人所特有, 因此用它的检出作为诊断的指标是较可靠的。

有些学者提出类风湿因子的干扰问题<sup>[13,14]</sup>, 我们在实验中使用的抗人 IgM 抗体, 经过人 IgG 的吸收, 对 4 例类风湿, 2 例风湿热患者血清检查都未发现交叉反应。在实验中还用了 1 例 IgM 骨髓瘤病人血清做交叉染色对照, 在高 IgM 存在下也未发现对乙脑特异性 IgM 抗体检测的干扰现象。

## 参 考 文 献

- [1] Cohen, S. M.: *J. Lab. Clin. Med.*, **72**: 760—766, 1968.
- [2] Blaskovic, P.: *Virusfor.*, **41**: 354—359,

- 1973.
- [3] Vera, R.: *J. H. E. M. I.*, 22: 502—504, 1978.
- [4] Edelman, R. & A. Pariyanonda: *Am. J. Epidemiol.*, 98: 29—38, 1973.
- [5] Galasso, G. J.: *Antiviral Agents and Viral Diseases of man*, N. Y., Paven Press, 241—243, 1979.
- [6] Robert, E. & J. S. Robert: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 25: 733—738, 1976.
- [7] 中国人民解放军236部队五所病毒诊断小组: 微生物学通报, 2:22—26, 1975.
- [8] Bergquist: *J. Immunol. Method*, 5: 189—198, 1974.
- [9] 李钟铎等: 流行病学杂志, 2:108, 1980.
- [10] Haire, M.: *J. Med. Microbiol.*, 5(2): 237—242, 1972.
- [11] Iwakata, S.: *Can. Med. Assoc. J.*, 106(4): 327—330, 1972.
- [12] Tatsuo, K.: *Biken Journal*, 11: 157—168, 1968.
- [13] Fraser, K. B.: *Br. Med. J.* 3: 707, 1971.
- [14] Reimer, C. B.: *Am. N. Y. Acad. Sci.*, 254: 77—93, 1975.

## THE USE OF IMMUNOFLUORECENT METHOD IN DETECTION OF IGM ANTIBODY FOR EARLY DIAGNOSIS OF JAPANESE B ENCEPHALITIS (JBE)

Li Zhongduo, Wang Hexiang, Song Guangchang, Chen Wanrong

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

The study of the JBEV-specific IgM antibody reponse by indirect immuno-fluorescent method was reported. In 57 out of 60 patients this antibody was found in the sera taken 2 to 13 days after the onset of illness. It was not found in 26 patients of other diseases and 32 healthy individuals.

For the indirect FA staining, the specimens of JBEV-infected BHK21

cells are incubated with the patient serum at 37°C for 2 hours. After washing, the preparation was treated with fluorescein-conjugated anti-human IgM anti-body at 37°C for 45 minutes. In these experiments a micro-fluorescent antibody technique was used. This technique is very simple, and can be early performed and may be used in any laboratory.