

间接免疫荧光试验检测登革 IgG 的应用

广东省流行病防治研究所 (广州 510300)

梁凤屏 文建华 郑 葵 罗会明

摘要 1995年广东省番禺等市发生登革热流行,应用间接免疫荧光试验检测58份待测登革IgG的标本,38份阳性,阳性率65.52%(38/58);检测疑似登革热患者早期血标本51份,用C6/36细胞分离出28株登革I型病毒,阳性率54.90%(28/51),证实本次流行是登革I型病毒所引起,二者检出率差异无显著性($X^2=1.28, P>0.05$)。IgG最早检出于发病后第三天,一周后达高峰,患者血清中各型登革IgG呈高度交叉反应,不能分型,其平均几何滴度在1:100以上。此外,IFA检测确诊登革病人血清9份,IgG阳性率为100%,滴度范围为1:160~1:1280;检测非登革血清336份,滴度1:40有15份,1:80有1份,阳性率为4.76%。此法检测登革IgG,方法简单、敏感、快速、经济。结果表明:病后一周取检,IgG抗体滴度达1:80以上,对诊断为登革热感染有参考意义。

关键词 登革热 间接免疫荧光试验 IgG 抗体

登革热的常规实验诊断,常用病毒分离和血清学试验,病毒分离需时较长,血清学通常用的补体结合试验、血凝抑制试验,需取双相血进行诊断,而ELISA捕捉IgM方法又较繁琐^[1]。1995年广东登革热流行时,我们除对疑似登革患者早期血作常规病原分离外,还应用间接免疫荧光试验检测登革IgG,现将结果报道如下。

材料和方法

1. 标本:采自1995年8~11月登革热流行期疑似登革患者,早期血清作病原分离,6天后血清作抗体测定。乙脑血清由广东省站提供,其余标本均是我所1995年检测标本。

2. 登革病毒I—IV型抗原片:标准株来自北京药品生物制品检定所,用C6/36细胞培养,由我所自行制备。

I—IV型登革病毒单克隆抗体由中国军事医学科学院提供。

羊抗人IgG及羊抗鼠IgG荧光抗体分别由上海生物制品研究所和浙江省防疫站提供。

3. 方法:病毒分离用C6/36白纹伊蚊细胞培养,用单克隆抗体间接免疫荧光试验作鉴定。方法按文献^[2]。

登革IgG测定血清从1:40开始对倍稀释,荧光镜检达“++”的血清最高稀释度为该血清抗体阳性滴度。IFA方法按文献^[3]进行。

结 果

1. 登革 IgG 检测和病毒分离结果:检测患者抗体标本 58 份,阳性 38 份,阳性率为 65.52% (38/58);51 份疑似登革热患者早期血清接种 C6/36 细胞作病毒分离,分离出 28 株登革 I 型病毒,阳性率为 54.90% (28/51),表明 1995 年广东省番禺等市的登革流行是由登革 I 型病毒引起的,结果见表 1。

表 1 疑似患者血清登革 IgG 检测及病毒分离结果

检测点	登革 IgG		病毒分离数	
	检测数	阳性数	检测数	阳性数
海珠区	15	10	15	5
番禺市	8	4	17	10
肇庆市	21	14	11	9
潮安县	3	3	4	2
东莞市	5	3	4	2
中山市	6	4	-	-
合 计	58	38	51	28

表 1 中显示 6 个检测点均检出登革抗体,病毒分离除中山点无样本外,亦分离出登革热病毒,二者阳性率差异无显著性($X^2 = 1.28, P > 0.05$)。提示用 IFA 方法检测登革 IgG 是可行的。

2. 登革患者血清 IgG 滴度分布:检测 38 份登革患者血清 IgG 滴度分布,见表 2。

从表 2 中看出,登革各型 IgG 呈高度交叉反应,抗体平均几何滴度均在 1:100 以上,登革 II、IV 型最高, I 型最低,提示检测登革 IgG 不能作出登革病毒流行型别的诊断。

3. 登革 IgG 检出时间:取明确发病与取材时间的登革患者的血清作检测对象,检测 65 份血清,结果见表 3。

表 3 结果显示,登革 IgG 最早检出时间为发病后 3 天,第 5 天已有半数检出抗体,第 8 天起检出率为 100% (16/16)。随着发病时间延长,抗体检出率增高,提示 IgG 检测宜于发病一周后取检。

表 2 38 例患者血清对 I—IV 型登革抗原反应情况

型 别	血 清 稀 释 度						平均几何滴度
	<1:40	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
D1	3	6	4	12	9	4	110
D2	3	3	5	9	7	11	148
D3	4	4	5	7	8	10	123
D4	2	5	7	7	8	9	144

表 3 登革 IgG 出现时间的检测

发病天数	检测数	阳性数
0~1	9	0
2	6	0
3	8	3
4	5	2
5	8	4
6	10	7
7	3	2
8	2	2
9	3	3
10	11	11
合 计	65	34

4. 登革 IgG 的特异性检测:取确诊为登革热病人的双相血清,乙脑患者、非登革热患者和健康人等的血清与登革各型抗原作 IFA 检测,结果见表 4。

从表 4 中看出登革热患者血清 100% (9/9) 检出登革 IgG,且抗体滴度较高,在非登革热人群中也可检出登革 IgG,但滴度只有一份既往登革流行区的正常人中检出 1:80 的抗体,其余均为 1:40,阳性率为 4.76% (16/336)。

表 4

各类人群血清登革 IgG 检测结果

血清类别	检测数	阳性数	阳性率(%)	抗体滴度
1※登革热	9	9	100	1:160~1280
2乙脑	10	0	0	<1:40
3麻疹	7	1	14.29	1:40
4中毒	37	3	8.11	1:40
5非登革流行区正常人	50	0	0	0
6既往登革流行区正常人	232	12	5.17	1:40~80

※此为 1990 年和 1985 年登革病毒分离阳性的第二相血,前者 4 份,后者 5 份。(本次登革流行,无取得二相血清)。

讨 论

目前,国内已应用分子生物学技术对登革病毒进行分析研究^[4],并直接从患者血清中检测登革病毒和分型鉴定^[5~6],对诊断登革热提供快速方法,但因条件所限还未能普遍应用。1995 年广东省部分地区登革热流行,作者应用 IFA 检测登革 IgG,对于诊断登革热感染有较好效果。检出 IgG 阳性的登革热流行点,病毒分离也获得阳性,以 IgG 检测结果而排除登革热感染的,最后确诊为麻疹和中毒。用 IFA 检测登革 IgG 方法简单、敏感、快速、经济,患者病后一周 IgG 达高峰,因此,可根据患者血标本情况,早期作病毒分离,一周后作 IgG 测定,5~6 天则二种方法同时进行。

登革 IgG 抗体检测结果,各型呈高度交叉反应,平均几何滴度在 1:100 以上,以 II、IV 型最高,而登革 I 型最低,不能反映出登革热流行型别。

对于非登革热者检出登革 IgG 是否为特异性的问题,广东省是乙脑流行省,登革热又反复流行,涉及面广,造成既往感染或隐性

感染致抗体残留也是可能的,但确切情况有待进一步阐明。

根据实验结果,作者认为病后一周取血,抗体滴度达 1:80 以上,对诊断为登革热感染有参考意义。

至于登革 IgG 能维持多长时间、再次感染或流行对诊断的影响等问题,有待今后探讨。

参考文献

1. 杜福,文建华,梁凤屏,等. 单克隆抗体 ELISA 法捕捉 IgM 在登革热血清学诊断上的应用. 中华实验和临床病毒学杂志, 1991, 5(2):194
2. 梁凤屏,杜福,文建华,等. 1990 年广州登革热流行的病原学研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 1992, 3(特刊 7):361
3. 戴华生等编著. 新实验病毒学. 北京:中国学术出版社, 1983:402
4. 杨佩美,司炳银,徐品芳,等. 中国登革 2 型病毒分离株乳鼠致病性差异与基因变化关系的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 1994, 14(5):296
5. 李刚,王飞,郭日波,等. 逆转录聚合酶链反应快速诊断登革病毒感染及型别鉴定. 中华医学杂志, 1993, 73(10):605
6. 方美玉,陈火胜,陈翠华,等. 嵌套式 PCR 法分型检测登革病毒基因. 中山医科大学学报, 1995, 16(2):39

(1996 年 5 月 20 日收稿, 8 月 6 日修定)

Application of Indirect Immunofluorescent Assay for Detecting IgG of Dengue Virus

Liang Fengping et al

(Institute of epidemic control and prevention of Guangdong Province, Guangzhou, 510300)

Abstract Dengue fever was prevalence in Panyu and other cities of Guangdong Province in

1995. Indirect Immunofluorescent assay (IFA) was carried out for detecting anti-dengue virus IgG. Of 58 sera specimens tested, 38 were positive and the positive rate was 65.52% (38/58). C6/36 cell culture was used for virus isolation. Of 51 serum samples of early phase blood, type I dengue virus was isolated in 28 specimens and the positive rate was 54.90% (28/51). It verified that type I dengue Virus was the cause of this epidemic. There was significant difference between the two positive rates ($X^2 = 1.28, P > 0.05$). IgG was first detected on the third day and its positive rate reached peak in a week after onset. Patients' sera were not able to type because of the high cross-reaction among 4 types and the mean geometric titres of IgG were all above 1:100. In addition, the specificity of IFA in the detection of antidengue virus IgG was established. 9 sera samples of confirmed dengue fever patients were tested, the positive rate of IgG was 100% and their titres were 1:160 - 1:1280. Of 336 samples of sera other than dengue fever patients, 16 were positive (15 samples 1:40; 1 sample, 1:80) and the positive rate was 4.76%. The results showed that if the IgG titre reached 1:80 or above, it was helpful in the diagnosis of dengue virus infection, but the diagnosis should be confirmed by virus isolation. The authors concluded that this assay was simple, sensitive, rapid and economical.

Key words Dengue Fever, Indirect Immunofluorescent Assay IgG Antibody