

IFA、ELISA 和 WB 用于莱姆病血清学诊断的比较研究

刘志云^{1,2}, 侯学霞², 霍秋波³, 耿震², 刘劼², 万康林², 郝琴²

(1 南华大学病原生物所, 湖南 衡阳 421001; 2 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206; 3 黑龙江省牡丹江林业中心医院)

摘要: **目的** 比较研究间接免疫荧光试验(IFA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和蛋白免疫印迹试验(WB)3种检测方法对莱姆病血清学的诊断效果。**方法** 收集临床疑似莱姆病患者血清标本及其流行病学和临床资料,分别采用IFA、ELISA和WB进行血清抗伯氏疏螺旋体抗体(IgM和IgG)检测,结合流行病学和临床资料进行综合分析。**结果** 实验共检测莱姆病疑似患者血清398份,ELISA阳性86例,阳性率21.61%,其中IgM阳性27例,IgG阳性59例;IFA阳性82例,阳性率20.60%,其中IgM阳性26例,IgG阳性56例;WB阳性83例,阳性率20.85%,其中IgM阳性31例,IgG阳性52例;并且实验表明,在对于游走性红斑病例的诊断上,WB法阳性率明显高于ELISA和IFA($\chi^2=6.34, P<0.05$)。**结论** 在莱姆病的实验室诊断中,IFA、ELISA和WB3种方法结合运用,可提高诊断的灵敏性和特异性;WB在排除ELISA和IFA的假阳性结果中有着重要作用。

关键词: 莱姆病; 伯氏疏螺旋体抗体; 酶联免疫吸附试验; 间接免疫荧光试验; 蛋白免疫印迹试验

中图分类号: R377 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2011)03-0236-03

Serologic diagnosis of Lyme disease with indirect immunofluorescence assay, enzyme-linked immunosorbent assay and western blot

LIU Zhi-yun^{1,2}, HOU Xue-xia², HUO Qiu-bo³, GENG Zhen², LIU Jie², WAN Kang-lin², HAO Qin²

1 Institute of Pathogenic Biology, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China; 2 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 3 Mudanjiang Forestry Center Hospital, Heilongjiang Province
Corresponding author: HAO Qin, Email: haoqin@icdc.cn

Supported by the 11th Five-Year Major National Science and Technology Projects of China (No. 2008ZX10004-010)

Abstract: Objective To compare the effectiveness of indirect immunofluorescence assay (IFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot (WB) in serologic diagnosis of Lyme disease. **Methods** Serum samples, epidemiological data and clinical information of potential Lyme disease patients were collected. Serum antibodies (IgM, IgG) against *Borrelia burgdorferi* were detected by IFA, ELISA and WB. Results were interpreted based on clinical manifestations and epidemiological data. **Results** Of the 398 serum samples collected from suspected patients, 86 were ELISA-positive (21.61%), including 27 IgM positives and 59 IgG positives; 82 were IFA-positive (20.60%), including 26 IgM positives and 56 IgG positives; and 83 were WB-positive (20.85%), including 31 IgM positives and 52 IgG positives. The positive rate of WB for the diagnosis of patients with erythema migrans (EM) was significantly higher than that of ELISA and IFA ($\chi^2=6.34, P<0.05$). **Conclusion** The combination of IFA, ELISA and WB may improve the sensitivity and specificity of the laboratory diagnosis of Lyme disease. WB has a lower false positive rate than ELISA and IFA.

Key words: Lyme disease; *Borrelia burgdorferi*; Indirect immunofluorescence assay; Enzyme-linked immunosorbent assay; Western blot

莱姆病是一种经蜱传播,由不同基因型的伯氏疏螺旋体引起的一种多系统和复杂病程的感染性疾病

病^[1]。其主要的临床症状有游走性红斑(EM)、面神经麻痹、神经根炎、心脏病、关节炎和慢性萎缩性肢皮炎等,严重者导致终身残疾,甚至死亡。血清学诊断是最重要的诊断方法,已广泛用于临床症状不典型的莱姆病检测。ELISA和间接免疫荧光试验(IFA)是最常用的血清学方法,但其存在一定的假阴性和假阳性结果,蛋白免疫印迹试验(western blot, WB)

基金项目: 国家“十一五”科技重大专项课题(2008ZX10004-010)

作者简介: 刘志云(1980-),女,硕士研究生,从事莱姆病研究。

Email: liuzhiyun0207@126.com; 侯学霞(1968-),女,主管技师,从事莱姆病研究。

通讯作者: 郝琴, Email: haoqin@icdc.cn

刘志云和侯学霞同为第一作者

是目前推荐的用于莱姆病抗体检测的确诊方法^[2,3]。我们用ELISA、IFA、WB对398例血清标本进行抗体检测,从而了解不同方法对于伯氏疏螺旋体抗体的检测效果。

1 材料与方法

1.1 病例血清标本 共收集疑似莱姆病患者血清398份,其中373份由黑龙江省牡丹江林业中心医院提供,25份为不同医院送诊病例。包括皮肤环形红斑65例、慢性萎缩性皮炎28例、硬皮病11例、面神经麻痹118例、神经炎63例、格林巴氏综合征15例、关节痛35例、不明原因发热41例和心血管疾病22例。

1.2 试剂 羊抗人IgM和IgG荧光抗体、HRP标记的羊抗人IgM和IgG,均购自美国Sigma公司。

1.3 IFA 用我国莱姆病螺旋体PD₉₁菌株常规制备抗原片,40×10视野下每视野100条螺旋体。将血清用3%卵黄PBS液从1:16开始倍比稀释。在荧光显微镜40×10视野下>50%螺旋体染上明亮荧光,抗体效价达到IgM≥1:64,IgG≥1:128或双份血清抗体效价有4倍增高者为阳性^[4]。同时做阳性、阴性对照。

1.4 ELISA 我国PD₉₁菌株常规制备超声波抗原包被酶联板。用酶联检查仪在波长450 nm处测吸光度(A)值。被检血清A值大于均数±3个标准差(0.13)者为阳性^[5]。以上2项试验皆为阳性的血清要进行钩端螺

旋体(钩体)显微镜凝集试验(MAT)和梅毒(USR)检测,以排除钩体病和梅毒。血清抗体检查IFA和ELISA均为阳性且钩体病和梅毒皆为阴性者可判为莱姆病血清学阳性。

1.5 WB 我国PD₉₁菌株常规制备的NC膜条。以PBST(磷酸盐吐温缓冲液)按1:25稀释待测血清,将NC膜条置入其中,室温反应4 h后弃反应液,用PBST(0.01 mol/L pH 7.4)洗5次,每次10 min。洗后分别加入稀释好的羊抗人HRP-IgM或HRP-IgG,置室温反应1 h,用PBST(0.01 mol/L pH 7.4)洗5次,每次10 min,加入显色液,当阳性对照血清出现最佳条带时加双蒸水终止反应。当IgM出现P83/100、P58、OspA、P30、OspC、P17和P41中的任一蛋白带时为阳性,IgG出现P83/100、P58、P66、P39、OspA、P30、OspC和P17中的任一蛋白带为阳性^[6]。同时做阴、阳性对照。

1.6 统计学方法 3种方法检测结果分析采用SPSS软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 ELISA、IFA和WB血清IgM检测 398份标本中,ELISA检测27例阳性,阳性率为6.78%;IFA检测26例阳性,阳性率为6.53%;WB检测31例阳性,阳性率为7.79%。经 χ^2 检验,三者间差异无统计学意义($\chi^2=0.53,P>0.05$)(表1)。

表1 ELISA、IFA、WB方法对398例疑似莱姆病患者血清IgM检测结果

Table 1 Serum IgM tests for 398 suspected cases with ELISA, IFA and WB

临床症状	检查例数	ELISA		IFA		WB		
		阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)	
皮肤系统疾病	皮肤环形红斑	65	8	12.31	9	13.85	18	27.69
	慢性萎缩性皮炎	28	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	硬皮病	11	0	0.00	0	0.00	0	0.00
神经系统疾病	面神经麻痹	118	12	10.17	11	9.32	9	7.63
	神经炎	63	3	4.76	3	4.76	2	3.17
	格林巴氏综合征	15	0	0.00	0	0.00	0	0.00
心血管系统疾病	22	1	4.54	0	0.00	0	0.00	
关节炎	35	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
发热	41	3	7.32	3	7.32	2	4.88	
合计	398	27	6.78	26	6.53	31	7.79	

2.2 ELISA、IFA和WB血清IgG检测 398份标本中,ELISA检测59例阳性,阳性率为14.82%;IFA检测56例阳性,阳性率为14.07%;WB检测52例阳性,阳性率为13.07%。经 χ^2 检验,三者间差异无统计学意义($\chi^2=0.886,P>0.05$)(表2)。

2.3 ELISA、IFA和WB法检测 比较分析398例疑似患者IgM抗体检测结果,ELISA与IFA符合率为98.24%(391/398);IFA与WB两者的符合率为96.73%

(385/398),ELISA与WB的符合率为96.48%(384/398),ELISA、IFA与WB符合率为95.23%(379/398)。比较分析398例疑似患者IgG抗体检测结果,ELISA与IFA两者符合率为96.23%(383/398),IFA与WB的符合率为95.98%(382/398),ELISA与WB的符合率为96.23%(383/398),ELISA、IFA与WB符合率为93.22%(371/398)。

2.4 ELISA、IFA和WB法对不同临床表现病例诊断效果 对于EM的诊断WB的阳性率明显高于ELISA和

表2 ELISA、IFA、WB对398例疑似莱姆病患者血清IgG检测结果
Table 2 Serum IgG tests for 398 suspected cases with ELISA, IFA and WB

临床症状	检查例数	ELISA		IFA		WB		
		阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)	
皮肤系统疾病	皮肤环形红斑	65	2	3.08	1	1.54	3	4.62
	慢性萎缩性皮炎	28	5	17.86	5	17.86	5	17.86
	硬皮病	11	3	27.27	3	27.27	3	27.27
神经系统疾病	面神经麻痹	118	28	23.73	30	25.42	28	23.73
	神经炎	63	6	9.52	4	6.35	5	7.94
	格林巴氏综合征	15	3	20.00	3	20.00	3	20.00
心血管系统疾病	22	2	9.09	2	9.09	1	4.55	
关节炎	35	7	20.00	6	17.14	3	8.57	
发热	41	3	7.32	2	4.88	1	2.44	
合计	398	59	14.82	56	14.07	52	13.07	

IFA($\chi^2=6.34, P<0.05$)。而对慢性肢皮炎、硬皮病、格林巴氏综合征等临床症状严重病例3种检测方法阳性符合率为100%。

3 讨论

莱姆病由于其临床症状复杂多样,易与其他疾病混淆,而其临床诊断特征性标记EM^[7],只有少数患者能出现,因而用血清学方法检测伯氏疏螺旋体抗体是莱姆病诊断的重要手段。目前用于莱姆病实验室诊断的血清学主要方法是ELISA、IFA和WB。我们用ELISA、IFA、WB 3种方法同时对398份标本检测IgM,发现65例EM中ELISA阳性者8例(12.31%),IFA阳性者9例(13.85%),WB阳性者18例(27.69%),结果表明WB对EM莱姆病患者的检测敏感性明显高于前2种方法,与相关文献报道一致^[8]。而对于临床症状较严重的慢性肢皮炎、硬皮病等3种方法皆阳性者,能为莱姆病的临床诊断和治疗提供强有力的证据。

ELISA、IFA检测阳性标本中WB检测阳性率分别为81.40%和82.93%,前2种方法存在的假阳性结果,可能是一些抗核苷酸抗体或抗磷脂抗体与伯氏疏螺旋体的某些成分反应导致的^[9]。美国内科医师协会推荐的血清学方法对于临床症状较典型的病例诊断率为20%~80%,而对于头痛、乏力等症状者诊断率更低($\leq 20%$)^[10]。因此,有时ELISA、IFA阳性结果可能为假阳性,导致误诊和不必要的抗生素治疗。

莱姆病早期关节炎发作常是短暂的,而晚期常表现为间歇性单关节或少数关节疼痛,多发生在大关节,特别是膝关节。易与类风湿关节炎混淆,其产生的一些自身免疫抗体及免疫复合与伯氏疏螺旋体存在交叉反应。在本次研究中发现,WB对关节炎病例的检测结果与ELISA和IFA结果之间存在差异,可能是由于后2种方法特异性较低,存在假阳性造成。

ELISA和IFA是目前用于莱姆病初筛的主要方法,在实际使用中,ELISA优于IFA,尤其是在大批量标本筛查中有着易测定,结果可靠,可自动化操作等优点。而WB对于排除一些假阳性检测结果和了解莱姆病病程有着不可忽视的作用。但对于莱姆病的诊断应该将其血清学检测结果与其临床症状及流行病史结合起来综合分析。

参考文献

- [1] Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, et al. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato[J]. Clin Microbiol, 1997, 35(6): 1433-1444.
- [2] Reed KD. Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities[J]. Clin Microbiol, 2002, 40(2): 319-324.
- [3] Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2003, 3(4): 215-227.
- [4] Gratz NG. Emerging and resurging vector-borne diseases[J]. Annu Rev Entomol, 1999(44): 51-75.
- [5] Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis[J]. Lancet, 2003, 362(15): 93-96.
- [6] Jiang Y, Hou XX, Gen Z, et al. Interpretation criteria for standardized Western blot for the predominant species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in China[J]. Biomed Environ Sci, 2010, 23(5): 341-349.
- [7] Aucott J, Morrison C, Munoz B, et al. Diagnostic challenges of early Lyme disease: Lessons from a community case series [J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(10): 79.
- [8] Grodzicki RL, Steere AC. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosis of early Lyme disease [J]. Infect Dis, 1988, 157(4): 790-797.
- [9] Mackworth-Young CG, Harris EN, Steere AC, et al. Anticardiolipin antibodies in Lyme disease [J]. Arthritis Rheum, 1988, 31(8): 1052-1056.
- [10] American College of Physicians. Guidelines for laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease [J]. Ann Int Med, 1997(127): 3718-3721.

收稿日期:2010-12-29