

抗 ToRCH-IgM 型抗体临床对比检测研究

况二胜¹, 杨复华^{1**}, 何祥旺², 刘剑雄², 严银芳³

(1. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072; 2. 湖北省医学检验研究中心, 武汉 430060; 3. 武汉大学医学院病毒学研究所, 武汉 430071)

Experimental Studies and Comparison on Clinic Diagnosis
of ToRCH IgM AntibodyKUANG Er-sheng¹, YANG Fu-hua^{1**}, HE Xiang-wan², LIU Jian-xiong², YAN Yin-fang³

(1. College of life science, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Hubei Provincial Research Center for Medical Laboratories, Wuhan 430060, China; 3. Institute of Virology, College of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

Abstract: To research ToRCH IgM clinic diagnosis, four kinds for methods for non-specific interference removed have been compared in IgM detection; then ToRCH IgM in sera of 256 female donors, 143 normal pregnant women and 61 abnormal pregnant women were detected with the best method, anti-human IgG(γ chain specific), resolving non-specific interference. The results show that the positive rate of ToRCH IgM in normal population was very high, it was up to 23.1% in health pregnant women (Tox 5.6%, CMV 9.8%, RuV 8.4%, HSV 4.9% respectively), while it increased dramatically in abnormal pregnant women ($p < 0.01$), so did Tox, CMV, RuV IgM (9.7%, 26.2%, 24.6% respectively). Then ToRCH pathogen active infection during pregnancy can cause abnormal pregnancy and should be inspected carefully, esp. Tox, CMV, RuV.

Key words: ToRCH, IgM

摘要: ToRCH 系列病原微生物(包括弓形虫 Tox、风疹病毒 RuV、巨细胞病毒 CMV、单纯疱疹病毒 HSV I/II 等)是一组具有致畸作用的病原体, 孕妇感染可导致流产、早产、畸形甚至死胎。目前 ToRCH IgM 型抗体的检测都在不同程度上受到非特异性的干扰, 采用有效方法消除干扰对 ToRCH IgM 型抗体检测的准确性至关重要。为此我们对比了多种消除 IgM 检测中非特异性干扰的方法, 并以最佳方法对 256 例女性献血者、143 例正常妊娠和 61 例异常妊娠标本进行 ToRCH IgM 抗体的对比检测。结果显示健康人群中 ToRCH 活动性感染率较高, 健康孕妇 ToRCH IgM 的总阳性率高达 23.1% (其中 Tox 5.6%、CMV 9.8%、RuV 8.4%、HSV 4.9%); 而异常妊娠则显著上升 ($p < 0.01$), 其中 Tox、CMV、RuV IgM 阳性率上升明显 ($p < 0.05$), 分别为 19.7%、26.2%、24.6%。由此可见孕期 ToRCH 病原微生物活动感染是致异常妊娠的主要因素之一, 应严密监视孕期 ToRCH 病原微生物活动性感染, 特别是弓形虫、风疹病毒和巨细胞病毒的感染。

关键词: ToRCH IgM

中图分类号: R373 文章标识码: A 文章编号: 1003-5125(2002)01-0056-04

ToRCH 系列是一组具有致畸作用的病原体, 包括弓形虫 Tox、风疹病毒 RuV、巨细胞病毒 CMV、单纯疱疹病毒 HSV I/II 等。在人群中广泛传播, 感染后往往因缺乏特异的临床症状或表现为隐性感染

而易被漏诊或误诊, 但孕妇感染可通过胎盘、产道或母乳传染胎儿或新生儿, 引起先天感染而导致流产、早产、畸形甚至死亡。近年来 ToRCH 系列倍受重视, 开展孕期 ToRCH 常规检查检测 IgM 型抗体, 以

收稿日期: 2001-06-26, 修回日期: 2001-09-04

作者简介: 况二胜(1974-), 男, 硕士研究生, 从事分子病毒学研究。

** 通讯作者: 杨复华(1946-), 男, 副教授, 从事分子病毒学研究。Correspondence author.

Tel: 0086-027-87686653. E-mail: fhyang@whu.edu.cn

此确定预防接种或取舍妊娠方案。但目前 ToRCH IgM 型抗体的检测都在不同程度上受到特异 IgM 和类风湿因子(RF)的干扰,采用有效方法消除干扰对 ToRCH IgM 型抗体检测的准确性至关重要。我们采用科学的方法对 ToRCH IgM 检测进行研究,并对 256 例女性献血者、143 例正常妊娠和 61 例异常妊娠标本进行对比检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 G 蛋白、羊抗人 IgG 抗体(γ 链特异、亲和纯化、SAH IgG)购自 Sigma;标准 ToRCH 试剂购自 HOPE 公司和 Human 公司;类风湿因子胶乳购自军事医学科学院动物中心。ToRCH PCR 试剂为上海复华生物医学工程公司和广州瑞康生物技术研究所产品。

1.1.2 血清 弱阳性标准血清由同济医科大学寄生虫教研室、湖北省医学科学院病毒所和湖北医科大学病毒研究所提供;其他血清为临床检测中收集,并经两种标准试剂或阻断试验确证;异常妊娠病例同时采集宫颈分泌物和咽部分泌物。

1.1.3 毒种 弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 I / II 毒株分别为 Gondii 株、Gos、AD169、SM40/Sav,由湖北省医学科学院病毒所和湖北医科大学病毒研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 抗原制备 弓形虫虫体以胰酶消化 10 分钟后超声波破碎,离心取上清即为虫体抗原。将 RuV、CMV、HSV 接种于相应的敏感细胞上培养,至病变达 4+ 后收集培养液和病变细胞,经冻融数次

和超声波破碎,并以福尔马林灭活后甘油密度梯度离心纯化。测定蛋白质含量后加等量甘油 -20℃ 保存。

1.2.2 间接 ELLSA 按文献^[1]操作。

1.2.3 对比试验 以含相应抗原(排除 ToRCH-IgM 阳性)的稀释液(PBS pH7.4, 10% 胎牛血清)稀释 RF 阳性血清,检测筛选出 18 份干扰血清。选取不同 OD₄₅₀ 值范围的干扰血清和阳性血清,以含不同浓度的 SAHIgG、蛋白 G、致敏胶乳等的稀释液稀释标本,37℃ 放置 30min 后按常规操作。含不同浓度尿素的洗涤液按常规方法操作。然后比较两组 OD₄₅₀ 值选定各种方法的最佳工作浓度范围进行比较。

1.2.4 阻断试验 以含相应抗原的稀释液稀释血清,37℃ 放置 30min 后按常规操作并与非阻断对照组对照,OD₄₅₀ 显色值下降 50% 以上即判为阻断试验阳性。 β -二巯基乙醇破坏实验按文献^[1]操作。

1.2.5 ToRCH PCR 检测 操作步骤按说明书进行。

2 结果

2.1 四种方法消除干扰比较

SAHIgG、G 蛋白、致敏胶乳、尿素洗涤液等方法都能有效地消除干扰,但效果有所差别(见表 1)。后两种方法对 RF 弱干扰并不能彻底消除,而且对强干扰标本效果不佳。G 蛋白对 RF 干扰有很强的消除作用,但需要较高用量才能达到满意效果,表 1 中所列 G 蛋白用量为 25mg/mL。相比之下,SAHIgG 是最有效最经典的方法。

表 1 四种方法消除非特异性干扰的效果比较(%)

Table 1 Four kinds of methods compared on non-specificity removed

非特异性标本 non-specific sample No.	SAHIgG		G 蛋白		致敏胶乳		尿素洗涤液	
	Anti-human IgG		Protein G		Latex		Urea	
	-	+	-	+	-	+	-	+
1 #	0.324	0.058(82.1)	0.396	0.091(77.1)	0.356	0.182(48.9)	0.420	0.216(48.5)
2 #	1.075	0.197(81.7)	0.931	0.248(73.3)	0.980	0.653(33.4)	0.965	0.601(37.7)

注: - / +, 表示不含有 / 含有该成分。括号中数字为非特异性干扰去除的百分比(%)。

Note: - / +, without / with the ingredient. The numbers in brackets were percent of non-specific interference removed.

2.2 样品稀释液选择及结果判断标准的制定

不含特异成分的稀释液和含 SAHIgG 稀释液的

结果如表 2。在兼顾特异性和灵敏度的条件下,我们对处理后的非特异性干扰血清 OD₄₅₀ 值进行统计学

处理($OD_{450} < 0.15$ 的不干扰标本除外),确定相应的临界值 Cut-off,使所测得的干扰 $A_x + 2SD$ 小于 Cut-off,非特异显色 $A_x + 2SD = 0.169 + 0.028$,阴性参照 $N_x \pm 2SD = 0.080 \pm 0.036$,由此可确定 $Cut-off = N_x + 0.12$ 。可保证弱阳性不漏检而假阳性被剔除。

2.3 试剂的特异性和敏感性

80份阴性标本和 ToRCH 四项各 20份随机阳性标本检测全部相符。随机取样 100份血清标本进行 ToRCH IgM 检测的阳性标本与相应抗原进行阻断试验和 β -二巯基乙醇破坏试验,结果皆为阳性。20孔平行检测分析批间、批内变异系数(CV)均在 10%以下。

2.4 临床检测结果

对 256例女性献血者、143例正常妊娠标本和 61例异常妊娠标本进行 ToRCH-IgM 抗体检测并对异常妊娠标本同时进行 PCR 检测(结果如表 3)。健康人群中 ToRCH 活动性感染率较高,女性献血者 IgM 总阳性率为 18.7%,健康孕妇 IgM 总阳性率高达 23.1%(其中 Tox 5.6%、CMV 9.79%、RuV 8.4%、HSV 4.9%)。妊娠时 ToRCH IgM 阳性率略有上升,但无显著性($p > 0.05$)。而异常妊娠显著升高($p < 0.01$),其中 Tox、CMV、RuV、IgM 阳性率上升明显($p < 0.05$),分别为 19.7%、26.2%、24.6%,HSV 则未见显著变化($p > 0.05$)。异常妊娠的 PCR 结果和 IgM 抗体检测结果基本相同,但 PCR 阳性率较高。

表 2 含 SAHIgG 的样品稀释液对非特异性干扰的去除效果和对阳性血清的影响

Tab. 2 Effect and sensitivity of sample diluent with SAHIgG on non-specific interference and positive sera

样品稀释液 Sample diluent	阳性血清 Positive sera No.					非特异性干扰标本 Non-specific samples No.					阴性对照 Negative Control
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	
无 SAHIgG without SAHIgG	0.257	0.356	0.473	0.754	0.956	0.296	0.368	0.514	0.781	0.927	0.114
含 SAHIgG with SAHIgG	0.174	0.247	0.336	0.547	0.716	0.043	0.078	0.107	0.178	0.196	0.080
下降 decline (%)	33.3	30.6	29.0	27.5	25.1	85.5	78.8	79.1	77.2	78.9	29.8

表 3 ToRCH IgM⁺ 和 PCR 临床检测结果 (%)

Tab. 3 Result of clinical diagnosis of ToRCH IgM and PCR (%)

项目 Project	女性献血者组 female donors	正常妊娠组 normal pregnant	异常妊娠组 abnormal pregnant	异常妊娠组 PCR 结果 PCR of abnormal pregnant
Tox	14(5.47)	8(5.6)	12(19.7)	14(22.9)
CMV	17(6.64)	14(9.79)	16(26.2)	19(31.1)
RuV	21(8.20)	12(8.4)	15(24.6)	18(29.5)
HSV I/II	5(1.95)	7(4.9)	7(11.5)	9(14.7)
多项合并感染	6(2.34)	5(3.50)	7(11.5)	8(13.1)
合计(Total)	48(18.7)	33(23.1)	40(65.6)	46(75.4)

* 所有阳性都经阻断试验或标准试剂确诊,未有 RF 干扰产生的假阳性出现。

* All positive results were authenticated in blocking tests or standard kits

3 讨论

IgM 抗体的检测易受到特异 IgG 和类风湿因子 RF 等因素的干扰,因此有必要在 IgM 检测时对血清进行处理,去除特异 IgG 和 RF。特别是在人

群感染率较高的 ToRCH 系列 IgM 抗体检测中,由于血清中较多存在相应 IgG 抗体, IgM 的检测更易受到干扰。目前国内外同类产品都使用了吸附剂,但都不能完全消除 RF 的干扰。为求得最佳效果,我们对比了几种能有效消除干扰的方法,结果表明

G 蛋白等方法能取得较好效果,致敏乳胶、含尿素的洗涤液也能有效消除 RF 和 IgG 的干扰,但用 SAHIgG 的效果最佳。并且亲和纯化的抗 γ 链的抗体要优于未纯化的粗制抗血清(结果未显示)。虽然该方法能使弱阳性标本的检测受到一定影响,但通过兼顾特异性和敏感性科学地制订结果判断标准,可以使检测的准确性达到最佳水平。

我们的结果表明孕期发生较高的 ToRCH 系列病原微生物活动性感染(总阳性率为 23.1%),而异常妊娠的 ToRCH IgM 总阳性率为 65.6%,PCR 总阳性率为 75.4%。孕期 ToRCH 系列病原微生物活动性感染与异常妊娠直接相关,是致病的主要因素之一。故应严密监视孕期 ToRCH 系列病原微生物的活动,特别是弓形虫、风疹病毒和巨细胞病毒的活动性感染。女性献血者一般健康状况较好,但也检测出相当高的 ToRCH IgM 阳性,说明即使无症状的健康人群 ToRCH 的活动性感染频繁,同时作为献血者的活动性感染很容易导致受血者产生输血感染,也是个值得注意的问题。

由于 IgM 的产生有赖于机体的免疫应答,很难对 ToRCH 妊娠早期胎儿感染和 IgM 高峰已过等作出准确诊断。异常妊娠一般已过 IgM 高峰,IgM 检测并不能真实反映其感染状况。PCR 技术可以在 IgM 出现前或转阴后检测到病原体基因的存在^[2]。我们对 61 例异常妊娠进行 PCR 检测时标本取样于活动性排毒标本宫颈分泌物(弓形虫、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒)或咽部分泌物(风疹病毒),这些标本

中检测出病原体与体内活动性感染有较大相关性。实验中 ToRCH IgM 和 PCR 两项检测结果基本相符,但 PCR 检测结果的阳性率略高于 IgM。由于检测方法和检测对象的临床意义不同,ToRCH IgM 检测后进行 PCR 或病毒分离等检测对 ToRCH 系列病原微生物感染的准确诊断是必要的^[3,4]。且由于弓形虫、巨细胞病毒和单纯疱疹病毒常见潜伏性和非活动性感染,PCR 指标并不能反映病原体的活动状态。故而对 ToRCH 系列病原微生物感染的诊断及其后果仍需谨慎对待,并针对不同情况而考虑采集相应检测标本。

致谢 感谢湖北省医学科学院病毒所龚镇奎所长、李川江老师的无私指导和感谢湖北省云梦中心血站、湖北医科大学附一医院检验科病毒室、血库和湖北省妇幼保健院遗传室帮助收集标本。

参考文献

- [1] 黄柄祥 医学病毒学基础及实验技术[M] 北京:科学出版社,1990
- [2] Xu W, Sundovist V, Brytting M, *et al*. Diagnosis of cytomegalovirus infection using polymerase chain reaction, virus isolation and serology[J]. *Scand J Infect Dis* 1993,25:311-316
- [3] Newton E R. Diagnosis of perinatal TORCH infections[J] *Clin Obstet Gynecol*. 1999,42(1):59-70.
- [4] Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, *et al*. Cytomegalovirus infection in pregnancy: a still complicated problem[J]. *Intervirology* 1998,41(4-5):149-157