

胶体金免疫渗滤法检测日本血吸虫病血清抗体的研究

许静¹, 严自助¹, 张瑞鉴², 冯婷¹, 王强¹, 钱翠珍¹, 吴晓华¹, 朱丹¹, 郭家钢¹, 周晓农¹

【摘要】应用建立的胶体金免疫渗滤法检测日本血吸虫病血清抗体, 并以快速酶联免疫吸附试验(F-ELISA)方法检测作平行对照。现场和实验室试验表明, 胶体金渗滤法与 F-ELISA 方法在敏感度和特异度的差异无统计学意义($P>0.05$), 两法具有较高的一致性。但胶体金免疫渗滤法操作简便快速, 无特殊要求, 在临床和现场防治工作中具有比较广泛的应用前景。

【关键词】胶体金免疫渗滤法; 快速酶联免疫吸附试验; 日本血吸虫病; 抗体

中图分类号: R532.21

文献标识码: B

Antibody Detection in Sera of Patients with Schistosomiasis Japonica by Dot Immunogold Filtration Assay

XU Jing¹, YAN Zi-zhu¹, ZHANG Rui-jian², FENG Ting¹, WANG Qiang¹, QIAN Cui-zhen¹,
WU Xiao-hua¹, ZHU Dan¹, GUO Jia-gang¹, ZHOU Xiao-nong¹

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China; 2 Bofeng Biological and Technical Limited Company, Sanming City, Fujian Province, Sanming 365000, China)

【Abstract】Serum antibody of schistosomiasis patients was detected by dot immunogold filtration method (DIGFA) in laboratory and field, and F-ELISA was used as control. The results showed that there was no significant difference between these two assays in sensitivity and specificity($P>0.05$), with a high coincidence. DIGFA is easy to operate and may deserve a wide application in the diagnosis of schistosomiasis.

【Key words】Dot immunogold filtration assay; F-ELISA; Schistosomiasis japonica; Antibody

金标免疫渗滤法(dot immunogold filtration assay, DIGFA)是近几年发展的以胶体金为标记物的快速斑点免疫试验。它以硝酸纤维(NC)膜为载体, 利用其微孔膜的可滤过性和毛细管作用, 使抗原抗体反应迅速发生在一个特殊的渗滤装置上, 反应过程为2~3 min, 无需任何仪器设备和特殊操作技术, 肉眼观察结果, 适用于各级医疗单位, 特别是条件较差的基层防治站所。本研究用日本血吸虫虫卵抗原包被 NC 膜, 用胶体金标记羊抗人 IgG 为捕捉抗体, 建立了快速检测日本血吸虫病血清抗体的 DIGFA。本文报道了该方法的敏感性、特异性及制成试剂盒后反应的重演性、试剂的保存期效等, 并与快速酶联免疫吸附试验(F-ELISA)进行比较观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 DIGFA 试剂盒制备 可溶性日本血吸虫虫卵抗原(SEA)按常规法制备并纯化, 各取 1 μ l 倍比稀释至合适浓度的 SEA 和人 IgG, 分别点样于孔径为 0.45 μ m 的 NC 膜(上海医药工业研究院生产)的上部和下部(入 IgG 点为质控点)。加样后的 NC

膜置室温待干。再经封闭加上吸水填料, 置含直径为 1cm 的反应小孔塑料小盒内, 而后密封于塑料袋, 4[°]C 保存。将 0.01% 氯金酸水溶液 100 ml 加热至沸腾。于磁力搅拌下加入 1% 柠檬酸三钠水溶液 3 ml, 继续加热至溶液呈橙红色。冷却后, 用 0.1 mol/l K_2CO_3 调节 pH 值至 5.9~6.2。按每毫升胶体金中加 10 μ g 羊抗人 IgG 的比例混合均匀, 再加适量的聚乙烯醇(PEG), 经高速离心纯化, 4[°]C 保存备用。

1.1.2 F-ELISA 试剂盒 由中国 CDC 寄生虫病预防控制所严自助研究员提供^[1]。

1.1.3 血清样本 日本血吸虫病患者血清 100 份, 采自江西省都昌县万户镇塘美村, 病原学检查均为阳性, 每克粪便虫卵数(EPG)范围为 24~4032。50 份正常人血清, 采自山东和河北非血吸虫病流行地区的健康人群。

1.1.4 现场筛查实验 对本所寄生虫病咨询门诊 110 例待检者及安徽省石台县血吸虫病流行区 199 份居民血清同期进行 DIGFA 和 F-ELISA 检测。

1.2 检测方法

1.2.1 DIGFA 室温下, 小盒中央孔内加 2 滴 pH7.4 的 PBS, 渗入后加受检血清 20~100 μ l, 待渗入后, 加胶体金-抗体结合物 2 滴, 渗入后再加 2 滴 pH7.4 的 PBS 洗涤液。结果判断: 检测点和对照点均呈红色斑点的为阳性反应; 仅有对照点呈红色

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025
2 福建省三明博峰生物科技有限公司, 三明 365000

斑点的为阴性反应, 若对照点不显色, 则表明试剂盒质量有问题(图 1)。

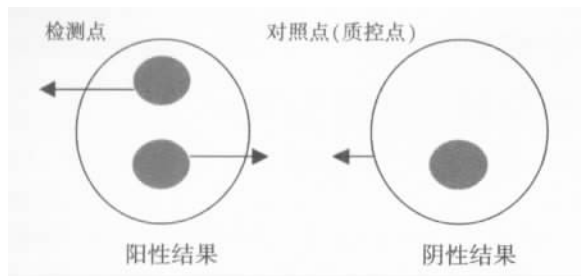


图 1 DIGFA 结果判断示意图

1.2.2 F-ELISA 虫卵抗原包被经特殊处理的 PVC 反应板, 待测血清作 1 50 稀释, 酶结合物作 1 1 000 稀释, 底物为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB), 每板设阳性和阴性参考血清。

2 结果

2.1 敏感性和特异性 用 DIGFA 检测 100 份慢性血吸虫病患者血清, 97 份呈阳性反应, 阳性率为 97.0%; 检测 50 份正常人血清未见阳性反应。DIGFA 检测 65 份其他寄生虫及乙型肝炎患者血清, 除 3 份并殖吸虫病患者血清、2 份旋毛虫病患者血清、1 份华支睾吸虫病患者血清呈阳性反应外, 其余均为阴性(表 1)。

表 1 DIGFA 法检测日本血吸虫患者血清抗体的敏感性和特异性

血清样本	检测份数	阳性数(阳性率%)
慢性血吸虫病	100	97(97.0)
健康人	50	0
并殖吸虫病	14	3(21.4)
旋毛虫病	12	2(16.7)
囊尾蚴病	9	0
华支睾吸虫病	15	1(6.7)
乙型肝炎	15	0

2.2 DIGFA 法与 F-ELISA 法的比较观察 用 DIGFA 和 F-ELISA 法平行检测同批患者血清, 敏感度分别为 97.0%和 99.0%(χ^2 校正=0.255, $P>0.05$), 其中双阳性 96 份; 特异度分别为 100%和 98%(χ^2 校正=0, $P>0.05$)(表 2)。

表 2 DIGFA 与 F-ELISA 检测结果的比较

血清样本 (份数)	DIGFA		F-ELISA	
	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数
慢性血吸虫病患者(100)	97	3	99	1
健康人(50)	0	50	1	49

2.3 重演性实验 将 10 份患者血清、5 份健康人血清不定期地用同批试剂重复测定 3 次, 反应结果无差异。表明本反应稳定性好, 具有重演性。

2.4 最适血清量的测定 随机取 2 份 DIGFA 呈阳性反应的血清, 用同批试剂反应时, 血清量分别为 50、40、30 和 20 μ l, 结果不同量的血清均呈现阳性反应, 反应强度无明显差别。另随机取 10 份慢性血吸虫病患者血清及 5 份健康人血清分别为

50 μ l 和 20 μ l, 结果表明 2 种血清量的反应结果均一致, 反应强度无明显差别。

2.5 试剂盒的批间差异及保存期 将本试验的反应板及有关试剂制成试剂盒。对不同时间制备的 4 批试剂盒(批号为 040212、040316、040326、040410)同时测定 10 份慢性血吸虫病患者血清及 5 份健康人血清, 结果患者血清均呈阳性反应, 健康人血清均呈阴性反应, 反应强度无明显差别。另用保存 9 个月及 6 个月的试剂盒对 10 份患者血清和 5 份健康人血清进行测定, 结果患者血清均呈阳性反应, 健康人血清均呈阴性反应。试剂盒保存 6 个月时, 其反应强度与新鲜制备时一致, 保存 9 个月时其反应结果不变, 但反应强度略低于保存 6 个月者。

2.6 门诊和现场筛查实验 在本所寄生虫病咨询门诊, 对 110 例待查者血清进行 DIGFA 和 F-ELISA 联合测定, 结果除 2 份血清 F-ELISA 呈弱阳性反应而 DIGFA 呈阴性反应外, 其余 108 例血清 2 种反应结果均相同。对安徽石台县珂田乡台山村 199 份人血清进行检测结果, F-ELISA 和 DIGFA 检测均阳性的为 30 份, 均阴性的为 131 份, F-ELISA 检测为阴性而 DIGFA 检测为阳性的为 26 例, F-ELISA 检测为阳性而 DIGFA 检测为阴性的为 12 例, 两种方法检测结果的一致率为 80.9%。

3 讨论

胶体金作为四大免疫标记技术之一, 现已广泛应用于生物医学的各个领域。目前在医学检验中应用的主要是免疫层析法和免疫渗滤法。后者在日本血吸虫病抗体的检测方面已有报道, 有些已制成试剂盒或用于现场试验^[2-4]。

本研究应用自制胶体金标记的抗人 IgG 和高效特异的虫卵抗原与患者血清中的血吸虫抗体快速反应, 检测了一批慢性血吸虫病患者、健康人及其他寄生虫病和内科疾病患者血清, 同时与 F-ELISA 法比较。结果显示该方法敏感性高、特异性强。反应快速, 整个实验过程仅需 2~3 min, 且不需要特殊仪器设备。制成试剂盒后便于现场普查。同时本文对试剂盒的制备进行了严格的质量控制, 在每个反应板孔中均设立了质控点和检测点, 提高了反应的可靠性。此外进行了同份血清的重复性试验以及检测了不同时间制备的试剂盒的批间差异, 表明试验的重复性好, 结果的稳定性强。试剂的保存期效达 6~9 个月。用不同量血清进行试验, 20~100 μ l 血清量对反应无明显差异。根据反应颜色, 推荐采用 30 μ l 血清量, 即使血清量有所增减亦不影响结果。本法与 ELISA 相比较, 后者操作步骤多, 应用的试剂也多, 还需要定量加样, 工作人员需经过严格培训才能操作。虽然 F-ELISA 经过不断改进已更加简便、快速, 但与之相比, DIGFA 检测时仅需 2 种试剂, 且不需严格定量操作, 试剂盒可在室温下邮寄, 使得该方法既可以在现场大规模使用, 也可在临床上对少量个体进行检测。

本研究中应用的血吸虫虫卵可溶性抗原, 可能与并殖吸虫、旋毛虫、华支睾吸虫具有共同的抗原组分, 因此与这部分患者血清存在不同程度的交叉反应。另外由于肉眼观察结果, 一些弱阳性反应较难判断, 因此与 F-ELISA(肉眼观察结果)同时检测流行区居民时, 相符率还不够满意。尚需寻找敏感性高、特异性更强、价廉且更易制备的血吸虫病诊断抗原。
(下转第 155 页)

3 讨论

血吸虫病是一个严重的公共卫生问题, 全世界约有6亿人口受威胁, 感染人数约2亿^[1]。核酸疫苗是一种全新的疫苗, 近年来, 国内外有关血吸虫核酸疫苗研究较多, 但至今尚无令人满意的结果^[2]。核酸疫苗的作用机制及文献报道的血吸虫核酸疫苗效果需进一步研究证实^[3]。

§20.8基因是本研究所筛选日本血吸虫成虫cDNA文库^[4]后得到的新基因^[5,6]。其 cDNA全长871 bp, 编码176个氨基酸残基, 蛋白质相对分子量Mr为 20 800。本研究利用PRIMER5.0软件设计特异性引物, PCR法成功扩增了该基因, 其目的片段长551 bp, 包含起始密码子和终止密码子, 又被克隆到pUCm-T载体和亚克隆到pcDNA3.1真核表达载体。将制备的核酸疫苗免疫小鼠, 于末次免疫1、3 d后在小鼠股四头肌检测到§20.8基因, 7 d后扩增条带不明显, 28 d后未能检测到§20.8基因片段。表明该核酸疫苗能在小鼠肌肉组织或细胞中短时间存在。§20.8基因可在小鼠肌细胞中表达, 但未见高表达。保护性实验结果表明, 该核酸疫苗未能诱导BALB/c小鼠产生明显的免疫保护性作用。其原因可能是 注射后机体内转染效率低下^[7], 如物理障碍、宿主细胞内核酸酶降解、核膜的通透性低、核孔复合物的中央孔径小、不与染色体发生整合^[8], 也不进行复制而影响DNA摄取及表达; 肌细胞抗原提呈有限, 而使核酸疫苗的保护性作用减弱。但肝脏虫卵计数, 核酸疫苗免疫组、空载体对照组均显著低于生理盐水对照组。核酸疫苗载体-pcDNA3.1(-)的DNA骨架中含有两个5'-AACGTT-3'序列, 该序列具有较强的免疫激活作用或免疫佐剂作用, 可增强小鼠抵抗力^[8]。

本研究构建了pcDNA3.1(-)/§20.8真核表达重组质粒, 免疫小鼠后能在小鼠肌肉中短时间存在并有微弱表达, 但未能诱导小鼠

产生一定水平的保护性免疫。

参 考 文 献

- [1] Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccine: research to development[J]. Parasitol Today, 1998, 14: 99-104.
- [2] Luo YH, Yi XY. Progress on improving protective efficacy of the schistosome vaccine[J]. Foreign Med Sci Parasit Dis, 2004, 31: 112-116. (in Chinese)
(罗永慧, 易新元. 提高血吸虫疫苗保护性效果的研究进展[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2004, 31: 112-116.)
- [3] DenisMize KS, Dupuis M, Singh M, et al. Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles[J]. Cell Immunol, 2003, 225:12-20.
- [4] Yang S, Xiao JH, Zhang YK, et al. Construction and identification of adult Schistosoma japonicum cDNA expression library[J]. Pract Preven Med, 2002, 9: 577-579. (in Chinese)
(杨胜, 肖建华, 张愉快, 等. 日本血吸虫成虫 cDNA 表达文库的构建及鉴定[J]. 实用预防医学杂志, 2002, 9: 577-579.)
- [5] Zeng Q, Xiao JH, Wan ZG, et al. Acquiring and analysis of ESTs and new genes of Schistosoma japonicum[J]. J Trop Dis Parasitol, 2004, 2: 7-13.
- [6] Zeng Q, Xiao JH, Wan ZG, et al. Acquiring and analysis of 149 ESTs of Schistosoma japonicum[J]. J Nanhua University (Medical Edition) Jan, 2004, 32: 8-12. (in Chinese)
(曾桥, 肖建华, 万志刚, 等. 日本血吸虫表达序列标签和新基因的获取和分析[J]. 南华大学学报医学版, 2004, 32: 8-12.)
- [7] Barnfield C, Brew R, Tilling R, et al. The cellular basis of immune induction at mucosal surfaces by DNA vaccination[J]. Dev Biol (Basel), 2000, 104: 159-64.
- [8] Ledwith BJ, Manam S, Trillo PJ, et al. Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA[J]. Dev Biol (Basel), 2000, 104: 33-43.

(收稿日期:2004-08-10 编辑: 伯韦)

(上接第 147 页)

参 考 文 献

- [1] Yan ZZ, Wang W, Lu ZY, et al. Fast detection of anti-schistosome antibodies[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1996, 14: 302. (in Chinese)
(严自助, 王文, 吕再婴, 等. 血吸虫病抗体的快速测定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14: 302.)
- [2] Shi XH, Tang Y, Jiang JM, et al. The study on detecting anti-schistosome antibodies of by dot immunogold filtration assay[J]. Chin J Schisto Control, 1999, 11: 132-133. (in Chinese)
(施晓华, 汤益, 蒋健敏, 等. 滴金免疫测定法(DIGFA)检测血吸虫抗体的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1999, 11: 132-133.)

- [3] Zhang SE, Tang Y, Shi XH, et al. Field assay of dot immunogold filtration for detection of anti-schistosome antibodies[J]. Chin J Schisto Control, 2001, 13: 176-177. (in Chinese)
(张素娥, 汤益, 施晓华, 等. 滴金免疫测定法(DIGFA)检测血吸虫抗体的现场应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2001, 13: 176-177.)
- [4] Ding JZ, Gan XX, Shen HY, et al. Establishment and application of dot immunogold filtration assay for detection of anti-schistosome antibodies[J]. Chin J Parasit Dis Control, 1998, 11: 308-310. (in Chinese)
(丁建祖, 干小仙, 沈慧英, 等. 快速检测抗日本血吸虫抗体的金标免疫渗滤法的建立及应用[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1998, 11: 308-310.)

(收稿日期:2005-09-16 编辑: 伯韦)