

酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断牛 日本血吸虫病的研究

沈杰 孙纪岚 方渭民 徐泉兴 张美芬

(中国农业科学院上海家畜血吸虫病研究所)

周庆堂 冯德南

(湖南农学院)

(1984年4月16日收稿)

摘 要

对707头牛进行了酶联免疫吸附试验,其中感染血吸虫牛200头,检出率为97.5~97.7%,368头未感染血吸虫牛阴性符合率为97.2~98.5%,对寄生肝片吸虫、双口吸虫、东毕吸虫、棘球蚴牛共81头试验结果仅1头寄生肝片吸虫牛呈阳性反应,80头牛呈阴性反应,说明ELISA用于牛血吸虫病诊断具有较高的敏感性与特异性,对基本消灭血吸虫病地区的现场试验也取得相似结果,说明ELISA是一种诊断牛血吸虫病较好的方法。

酶联免疫吸附试验(ELISA)是七十年代才发展起来的技术,国内外学者陆续发展了多篇将该方法用于诊断人血吸虫病的研究报告(Huldt等1975、Durosoir等1975、Schinski等1976、Beggquist等1976、Deelder等1977、Ahmed等1977、严自助等1978)〔1,4〕,一致认为该方法对诊断人血吸虫病具有许多优点:敏感性和特异性高、操作简便、不需特殊仪器,判读结果可用分光光度计,比较客观,适于大规模查病,因此是一种诊断人血吸虫病的好方法。

随着血吸虫病防治工作的深入开展,我国牛日本血吸虫病的诊断工作需要有这样的方法。为此,我们开展了研究,以期摸索出适用于诊断牛日本血吸虫病的酶联免疫吸附试验。

材 料 和 方 法

一、抗原:用虫卵冷浸液经纯化后作抗原原液〔5〕。

二、兔抗牛IgG的制备:采取未接触过疫水的健康成年牛血清,将多只牛血清混和,用半饱和硫酸铵沉淀法提取球蛋白,经QAE-Sephadex A-50柱层析提取纯IgG,用酚试剂法测定蛋白质含量。

用纯IgG免疫正常雄性兔子,共进行4次注射,相隔时间分别为12天、28天、10天,每次按每千克体重1毫克注射,第一次加弗氏完全佐剂,作足垫肉注射,第二次加弗氏不完全佐剂,作小腿皮下多点注射,第三次及第四次均不加佐剂,作大腿肌肉多点注射,于第四次注射后7天采血测效价,用琼脂糖双向扩散和毛细管环状沉淀试验及稀释

健康牛血清来测定,凡琼脂扩散效价达500以上,环状沉淀达12800以上时采血,分离血清,提取纯IgG,即为兔抗牛IgG。

三、酶标记兔抗牛IgG:用辣根过氧化物酶(美国Sigma出品,RZ不低于3.0)标记兔抗牛IgG,标记方法按骆加里等报道进行^[6]。

四、底物及溶液配制:按改良的邻苯二胺溶液配制^[5]。

五、试验用牛:共对707头牛进行了试验。其中感染血吸虫黄牛157头(自然感染牛116头,均由粪解法查到毛蚴,人工感染牛41头,其中40头各感染尾蚴500条,1头感染4条)。感染血吸虫水牛43头(自然感染牛30头,均由粪解法查到毛蚴,人工感染牛13头,每头感染尾蚴3000条)。非流行区黄牛320头,水牛108头,均未到过疫区。基本消灭血吸虫病地区牛109头。所有牛均从颈静脉采血,分离血清。

阳性参考血清用人工感染500条尾蚴/头的黄牛,于感染后第50~55天采血,将所采10头牛血清混合。或用感染3000条尾蚴/头的水牛,于感染后第55~60天采血,将所采6头牛血清混合。

六、试验方法:用聚苯乙烯塑料板作载体,每凹井中加入0.2毫升用pH9.6的0.05M碳酸缓冲液稀释的抗原,其蛋白含量为10微克/毫升,在4℃中放置20小时,倒去抗原,用含0.05%吐温-20的pH7.4PBS液洗涤3次,每次3~5分钟,再于凹井中分别加入1:200稀释的各份试验牛血清,每凹井0.2毫升,在37℃下孵育2小时,倒去血清,如上洗涤,再于每凹井中分别加入用PBS-吐温20稀释的酶标记物溶液,37℃中孵育2小时,如上洗涤,每凹井加入底物溶液0.2毫升,37℃中放置1小时,立即在各凹井中加入0.05毫升2M硫酸以终止反应。每次试验时都包括参考阳性血清2个。测读结果用721型分光光度计,吸收波长492m μ 。

试验结果

一、感染血吸虫牛和未感染牛的ELISA测定

1. 检测了感染血吸虫黄牛157头、水牛43头、未感染血吸虫黄牛260头、水牛108头,结果如表1。

表1 ELISA测定感染血吸虫牛和未感染牛结果

牛 别	感染血吸虫牛			未感染血吸虫牛			感染血吸虫牛 与未感染牛平 均消光值比值
	试验头数	消光值范围	平均消光值	试验头数	消光值范围	平均消光值	
黄牛	157	0.089~1.642	0.362	260	0~0.299	0.047	7.7:1
水牛	43	0.151~1.102	0.510	108	0~0.339	0.120	4.3:1

2. 157头感染血吸虫黄牛中4头消光值在0.150以下,153头在0.150以上,而260头未感染血吸虫黄牛4头消光值在0.150以上,256头在0.150以下,如以150为阈值,则阳性检出率为97.5%,阴性符合率为98.5%。43头感染血吸虫水牛中42头消光值在0.200以上,1头在0.200以下,而108头未感染血吸虫水牛中3头消光值在0.200以上,105头在0.200以下,如以0.200作为水牛阈值,则阳性检出率为97.7%,阴性符合率为97.2%。

二、交叉反应试验

对105头未感染血吸虫牛作了交叉反应试验, 其中26头寄生肝片吸虫, 22头寄生前后吸盘吸虫, 3头寄生棘球蚴, 30头寄生东毕吸虫, 24头无吸虫及绦虫幼虫寄生。ELISA检测结果, 104头牛呈阴性反应, 仅1头寄生肝片吸虫牛呈阳性反应。提示这些虫的寄生不引起明显反应。

三、现场试验

在基本消灭血吸虫病地区对109头牛(82头水牛, 27头黄牛)用ELISA和粪孵常规法(三粪六检)同时进行了检查, 结果ELISA阳性8头, 粪孵法阳性2头。后者与ELISA阳性2头相符。对ELISA另6头阳性牛中2头经粪孵湿育法(三粪六检)检查, 均为阳性, 这一结果反映此次试验检出率、特异性与上二项试验结果相符。

讨 论

一、自1980年起, 不仅国外继续有许多关于酶联免疫吸附试验诊断人血吸虫病文章的报道, 国内也有较多的诊断人血吸虫病文章报道, 一般认为ELISA有较好的敏感性与特异性、操作简便、设备简单、适用于流行病学调查^[2], 并可目测结果^[7,8], 我们作了些改进, 用于牛血吸虫病也取得了较好的结果, 是一种诊断牛血吸虫病较好的方法。

二、这次试验用的抗原主要是经Sephadex G-200柱层析后第一部分, 即取虫卵溶液中分子量较大部分, 获得结果较好, 这与Rotmans报道应用曼氏血吸虫成虫抗原结果一致^[3], 而抗原越纯化, 得到的量越少, ELISA由于抗原用量少, 有利于进一步通过纯化提高敏感性和特异性。目前国内已有简易的酶标测读仪, 工业发达国家已实行自动化操作。

三、目前国内已应用的诊断家畜血吸虫病血清学方法有间接血凝试验和环卵沉淀反应。这两种方法对牛血吸虫病的检出率分别是90.8~96.4%和90.9~95%^[9~11], 两法的阴性符合率分别为94.1~97.3%, 和90.9~99.1%, 而ELISA的检出率与阴性符合率为97.5~97.7%与97.2~98.5%, 我们曾用血凝对本试验中的30头感染东毕吸虫牛血清进行试验, 有10%出现阳性, 而ELISA则全部阴性。又曾用环卵沉淀对一头感染东毕吸虫牛进行试验, 结果阳性。环卵沉淀用全血清, 血凝用1:20稀释血清, ELISA用1:200稀释血清。这些结果提示ELISA敏感性和特异性较其他两种方法可能为好。

参 考 文 献

- [1] Durosoir, J.L. et al. (1975). Use of peroxidase Labelled Globulins in parasitic Immunology, *Medicine Tropicale*, 35(6): 457~462.
- [2] Janitschke, R. et al. (1981). Evaluation of the ELISA test as an epidemiological tool in Schistosomiasis *Trop. Med. Hyg.* 84(4): 147.
- [3] Roitmans, J.P. et al. (1980). Separation and Comparative Immunoassay (DASS, ELISA) with antigens from adult *Schistosoma mansoni* *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74(4): 463.
- [4] 严自助等 (1978). 免疫酶标记技术及其应用的初步研究. *中华医学杂志*, 8: 470~472.
- [5] 沈杰等 (1982). 酶联免疫吸附试验技术的部分改进及其效果. *中国兽医杂志*, 8(10): 4~5.
- [6] 骆加里等 (1979). 辣根过氧化物酶标记抗体的简易方法. *寄生虫防治研究简报*, 5: 47~48.
- [7] 陶义训等 (1980). 酶联免疫吸附剂测定的研究 II 成套试剂在检测抗血吸虫抗体中的应用. *中华医学检验杂志*, 3: 207~209.
- [8] 郑思民等 (1981). 酶联免疫吸附剂测定用于血吸虫病诊断的研究—目视比色法与光度测定法的比较. *上海免疫学杂志*, 1(1): 8~9.
- [9] 沈杰等 (1981). 应用环卵沉淀试验诊断耕牛日本血吸虫病的研究. *中国兽医杂志*, 7(3): 2~5.
- [10] 周庆堂 (1981). 间接血凝试验诊断耕牛日本血吸虫病的研究. *湖南农业科学*, 2: 44~48.
- [11] 沈杰等 (1983). 应用纯化血凝抗原 (冻干) 诊断耕牛日本血吸虫病的研究. *畜牧兽医学报*, 14(1): 43~52.

STUDIES ON THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT
ASSAY (ELISA) FOR *SCHISTOSOMA JAPONICA*
INFECTIONS IN CATTLE AND BUFFALOES

Shen Jie, Sun Jilan, Fang Weimin

Xu Quanxing, Zhang Meifen

(*Shanghai Institute of Animal Schistosomiasis,*
Chinese Academy of Agricultural Sciences)

Zhou Qingtang, Feng Denan

(*Hunan Agricultural College*)

Abstract

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed for the detection of *Schistosoma japonica* infections in cattle and buffaloes. Seven-hundred-and-seven schistosomfree animals and animals infected with *S. japonica* were tested. The test has been found to have high sensitivity and specificity. 97.5-97.7% of *S. japonica*-infected animals were positive, and 97.2-98.5% of schistosom-free animals were negative. Eighty of 81 cattle infected with *Fasciola*, *Paramphistomum*, *Orientobilhar-*

zia and Echinococcus were negative, only one infected with Fasciola was positive. The test conducted in the endemic area also gave good result. The ELISA is not technically difficult to perform and is capable of handling large number of samples.

1986年刊物征订启事

《**中国农业科学**》是中国农业科学院主办的综合性农牧业科学学术性刊物。主要报道我国农业科学在基础理论和应用技术研究方面的学术论文, 重要科研成果的专题报告, 各学科研究的新进展和综述等。读者对象是国内外农牧业科技工作者和院校师生, 农业生产战线上的干部等。

本刊为双月刊, 期册16开本96页, 另附图版2—4页。国内发行每册定价0.80元, 全年4.80元, 全国各地邮局办理订阅, 代号2—138, 1985年11月份开始收订1986年各期, 请勿错过。

国外发行由中国国际书店承办, 代号: BM43。

《**国外畜牧科技**》是畜牧兽医科学技术综合性刊物, 面向生产、科研、教学、尽快报道国外畜牧兽医新技术、新理论, 为我国畜牧兽医事业提供知识和信息, 本刊现由中国农业科学院畜牧研究所编辑出版。适合从事畜牧兽医工作的科技人员、管理人员、领导干部、专业户、畜牧兽医生物专业师生、生物工作者、畜产外贸人员阅读。双月20日出版, 64页, 10万多字, 定价0.60元, 全年3.60元。全国邮局均可订阅, 代号2—215。逾期未订上者, 可汇款至北京海淀区马连洼中国农业科学院畜牧所本刊编辑部邮购。平寄不收邮费, 欲要求挂号投寄, 每册另加挂号费0.12元。