

一种简易、快速检测弓形虫 循环抗原的酶联免疫吸附试验

傅翠娥 陈彩华 杨纪顺 余毅

(浙江省医学科学院寄生虫病研究所)

摘 要

应用双抗体酶联免疫吸附试验(ELISA)夹心法,检测人工感染弓形虫兔血清循环抗原(CAg)的结果:潜伏期内的阳性检出率为10%;急性期和亚急性期的阳性率为40%~100%;慢性早期为20%。检出弓形虫抗原量为0.63 μ g/ml。本法与血吸虫、肺吸虫、丝虫、钩虫、蛔虫及旋毛虫抗原试验,均呈阴性。上述结果表明,本法具有特异、敏感、简易、快速等特点,可作为急性弓形虫病的快速诊断方法。

关键词 弓形虫病, 双抗体ELISA夹心法, 循环抗原

当前各国大都使用血清学方法检测弓形虫抗体,作为判断弓形虫病的标准^[1],但检测抗体基本上不具有急性感染的诊断价值。1986~1987年,我们建立了抗弓形虫单克隆抗体ELISA夹心法,应用于猪弓形虫病调查取得满意的结果^[2]。由于单抗试剂制备较复杂,大规模应用受到一定的限制。本试验应用抗弓形虫抗体ELISA夹心法(双多抗ELISA),检测人工感染弓形虫家兔血清CAg。初步结果表明,本法可作为急性弓形虫感染的快速诊断方法,现将研究结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、抗弓形虫特异性抗体(多抗) 为高免疫猪血清,系南京畜牧兽医研究所提供,采用盐析法提取的 γ 球蛋白。

二、酶结合物 辣根过氧化物酶标记抗体(多抗-HRP),采用快速过碘酸钠标记法制备^[3]。

三、抗原 可溶性弓形虫RH株速殖子抗原,按俞乃勋(1983)^[4]的方法制备;日本血吸虫虫卵抗原、肺吸虫成虫抗原、马来丝虫微丝蚴抗原、十二指肠钩蚴抗原、猪蛔虫体腔液抗原及猪旋毛虫蚴虫抗原,由本所有关实验室提供。

四、血清 1.弓形虫感染新西兰纯种兔10只,每兔腹腔接种CN株速殖子20万。于感染后1、2、3、4、5、6、7、9、11、13、15、22、30、45天各耳静脉抽血

* 浙江省医学科学院寄生虫病研究所为世界卫生组织蠕虫病研究合作中心。

** 承上海动植物检验检疫所刘颖研究员提供RH株弓形虫速殖子,在此表示感谢。

*** 本文于1989年9月27日收稿。

1次。2.同种系健康对照兔5只,与感染兔同步采血。血清置-4℃冷藏备用。试验兔于感染前用ELISA或和IHA检测弓形虫抗体均为阴性者。3.阳性及阴性参考血清:分别取感染后2周的兔混合血清及健康兔混合血清。

五、ELISA试验 参照Araujo(1980)^[5]方法加以改进。用棋盘滴定法选得抗体及血清的最适稀释度。于聚苯乙烯微孔塑料板中,加入以0.05M pH9.6碳酸盐缓冲液稀释的1:3000多抗150 μ l,置37℃温育2小时或4℃冰箱过夜,PBS-吐温洗涤3次,用含2%小牛血清PBS-吐温分别稀释受检血清1:20及多抗-HRP 1:3000,各取50 μ l相继加入,37℃温育1小时,洗涤,加入100 μ l邻苯二胺底物,室温下避光放置20分钟,加2M硫酸终止反应。用DG-3021型酶标检测仪于490nm测定OD值,以被检标本复孔OD值与阴性参考血清OD的比值 \geq 2.1者判为阳性。

结 果

一、家兔接种弓形虫后临床发病观察及血清CAg检测结果见表1。根据表1所示的临床发病情况,感染后1~3天无明显症状,可定为潜伏期。第4~11天出现发热等症状,可定为急性期。第13~30天症状消退,可定为亚急性期,其后定为慢性早期。以上各临床期限与猪弓形虫病各临床期限相符^[6]。感染兔血清CAg阳性检出时间及阳性兔检出率的高低,与感染兔临床发病情况的变化趋势基本一致。但当临床症状减轻甚至消退后,仍有较高的阳性检出率(100%~20%)。

二、家兔感染弓形虫后1~45天血清CAg水平的消长变化见图。家兔接种弓形虫后4~5天,CAg处于低水平,6天后较快上升,至9~11天达峰值,13天开始逐步下降,至30天已降至低水平。表明CAg存在时间较短,呈现高峰时间为10天左右。

表1 家兔感染弓形虫后临床观察
及血清CAg检测结果

感染后 天 数	*呈现弓形虫 病症兔数	ELISA检测CAg	
		阳性反应兔数	**P/N
1	0/10	0/10	/
2	0/10	0/10	/
3	0/10	1/10	2.6
4	3/10	4/10	3.2
5	3/10	4/10	3.6
6	3/10	4/10	5.4
7	4/10	9/10	6.8
9	4/10	9/10	8.4
11	4/10	10/10	7.9
13	0/10	10/10	6.4
15	0/10	9/10	6.0
22	0/10	8/10	5.4
30	0/10	4/10	3.5
45	0/10	2/10	2.3

*指体温超过40℃,出现精神萎靡,厌食等症状。

**CAg阳性反应兔OD均值(P)与阴性参考OD(N)的比值

三、多抗ELISA的敏感性和特异性试验结果见表2。将各种可溶性抗原从80 μ g/ml为起始浓度作对倍稀释,以含1%牛血清白蛋白的PBS作对照。结果表明,本法检出弓

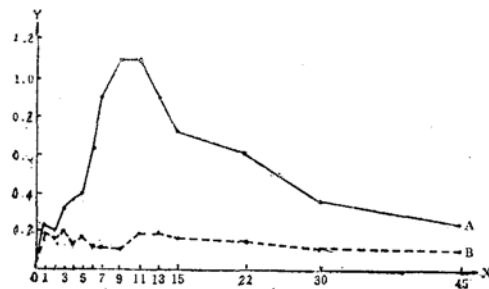


图 家兔感染弓形虫后血清CAg消长变化

Y—消光值 X—感染后天数 A—感染组
B—对照组

形虫抗原的最低量为0.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。检测血吸虫等6种寄生虫抗原,均呈阴性。

5只健康兔与感染兔同步检测CAg至45天,均阴性(OD $\bar{x} \pm \text{SD}$ 为0.15 \pm 0.08)。

表2 抗弓形虫抗体与不同抗原的ELISA试验结果

抗原类别	抗原浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)及OD值							
	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.63
弓形虫	1.06	0.98	0.81	0.79	0.48	0.42	0.31	0.22
日本血吸虫	0.09	0.09	0.08	0.10	0.09	0.03	0.07	0.06
肺吸虫	0.09	0.38	0.06	0.06	0.08	0.07	0.07	0.07
马来丝虫	0.08	0.09	0.08	0.07	0.07	0.08	0.06	0.07
十二指肠钩虫	0.09	0.09	0.07	0.07	0.08	0.07	0.06	0.06
猪蛔虫	0.08	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	0.07
猪旋毛虫	0.09	0.10	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08

注:1%牛血清白蛋白PBS的OD值为0.1

四、方法的重现性试验结果:用同1份弓形虫阳性参考血清在1个月内间歇测试18次,其OD值变异系数(CV)为14.7%;在3天内连续检测6次的CV为9.0%;选取CAg OD高低不等的血清3份,在1个月内每周检测1次共4次,其OD值的CV分别为5.2%、9.6%及9.0%。

讨 论

在急性弓形虫病的虫血症期,虫体的代谢和裂解物是构成循环抗原的主要成份,因此在血清中检出CAg,是确诊现症感染的可靠方法。Raizman等(1975)^[7]首次报道应用对流免疫电泳和琼脂双扩散法检测实验感染小鼠及兔血清中CAg获得成功。ISe等(1985)用亲和素生物素-ELISA检测弓形虫感染兔血清CAg,在感染后3天出现阳性反应,以后血清中CAg水平急剧上升,至8~9天,所有感染兔均死亡。该法检测弓形虫抗原量可少至4 ng/ml。本文采用一般双多抗ELISA法,感染兔在潜伏期内(第3天)检出10% CAg阳性。在急性期内基本上达全阳性,阳性兔OD均值达1.10(对照兔为0.19)。在此期间,发生急性临床症状兔仅40%,并在临床症状消失后2周,CAg仍保持阳性。感染兔在潜伏期及急性期内,CAg的检出率与ISe报告的结果相似,而检测抗原的量较高(0.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。由此表明本法检测CAg具有较高的敏感性。

于恩庶等^[6]论述弓形虫感染宿主后,增殖型原虫在急性期急剧增殖,在亚急性期增殖受免疫抑制,慢性期消失只有包囊存在,表明不同临床期的原虫增殖速率存在规律性变化。本文通过观察感染兔血清CAg水平的消长变化,发现与弓形虫的增殖消长规律相一致,表明检测CAg的水平能间接反映弓形虫的增殖情况,对弓形虫的活动性感染具有很高的诊断价值。

本法检测健康兔血清70份次,未出现假阳性反应;检测血吸虫、肺吸虫、丝虫、钩虫、蛔虫及旋毛虫抗原,均无交叉反应,表明本法具有高度的特异性。此外,方法试验的重现性亦较好。

本试验所提供的方法简便、快速,从包板至得出实验结果仅需半天时间。实验所需试剂制作简便、价廉,适用于临床及现场或基层单位使用。

参 考 文 献

- [1] 杨树森等, 1981, 弓浆虫病的血清学诊断。国外医学临床生化与检验学分册, 1: 24~27。
- [2] 傅翠娥等, 1987, 单克隆抗体应用于ELISA诊断猪弓形虫病的研究。中国兽医杂志, 13(8): 10~12。
- [3] 郭春祥等, 1983, 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法。上海免疫学杂志, 8(2): 97~100。
- [5] 俞乃勋等, 1983, 制备间接血凝试验抗原用弓形虫速殖子的净化。微生物学通报, 10(4): 161~164。
- [5] Araujo, F.G & Reming., J.S., 1980. Antigenemia in recently acquired acute Toxoplasmosis. J. Infect. Dis., 4(2): 144~149。
- [6] 于恩庶, 崔君亮主编, 1982, 弓形虫病, 102、297。人民卫生出版社。
- [7] Raizman, R.E & Nev F.A., 1975. Detection of circulating antigen in acute experimental infections with *Toxoplasma gondii*. J. Infect Dis., 132: 44~48。
- [8] Ise, Y. et al., 1985. Detection of circulating antigens in sera of rabbits infected with *Toxoplasma gondii*. Infect Immun., 48: 269~272。

A SIMPLE AND QUICK ELISA FOR DETECTION OF CIRCULATING ANTIGENS OF TOXOPLASMA

Fu Cuié, Chen Caihua, Yang Jishun, Yu Yi
(Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences*)

Abstract

This paper reports the results of detection of circulating antigen (CAg) in sera of rabbits infected with *Toxoplasma* by using double-PcAb sandwich ELISA. The frequency of positivity was 10% in incubation period, 40%~100% in acute and subacute period and 20% in early chronic period. The positive rate of CAg in rabbit sera was remarkably higher than the clinical incidence of their corresponding clinical periods. The protein amount of *Toxoplasma* was about 0.63g/ml. No cross reaction was found with antigens of *Schistosoma*, *Distoma*, *Brugia*, *Ancylostoma*, *Ascaris* and *Trichina*. It shows that this method is specific, sensitive, quick and simple to operate, and can be used in clinic and grassroot test.

Key words Toxoplasmosis, Double-PcAb sandwich ELISA, Circulating antigen

* WHO collaborating centre for research on helminthiasis