

文章编号:1000-7423(2007)-03-0256-03

Dot-ELISA 检测人芽囊原虫血清抗体的研究

苏水莲, 严宜明*, 廖华, 陈桂凤, 张瑞其,
谢琼君, 黎晓, 胡雅琼, 曾雪英, 兰海英, 谢瑞莲, 黄真

【提要】 分别收集本院大学生 322 份血清和粪便, 将粪使用体外培养法作为金标准检测出人芽囊原虫阳性 178 例, 阴性 144 例。用 dot-ELISA 分别对体外培养法阳性者和阴性者血清进行检测, 敏感度为 92.13%(164/178), 特异度为 97.92%(141/144)。表明 dot-ELISA 用于检测人芽囊原虫血清抗体较敏感、特异。

【关键词】 人芽囊原虫; 斑点-酶联免疫吸附试验; 抗体; 体外培养

中图分类号: R531.9 文献标识码: B

Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibody to *Blastocystis hominis* in Humans

SU Shui-lian, YAN Yi-ming*, LIAO Hua, CHEN Gui-feng, ZHANG Rui-qi, XIE Qiong-jun,
LE Xiao, HU Ya-qiong, ZENG Xue-ying, LAN Hai-ying, XIE Rui-lian, Huang Zhen

(Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China)

【Abstract】 Serum and stool samples were collected from 322 undergraduate students in medical school. Using stool *in vitro* cultivation as golden standard, 178 cases were found *Blastocystis hominis* positive and 144 were negative. Dot-ELISA was used to examine the serum samples with a sensitivity of 92.1% (164/178) and specificity of 97.1% (141/144). This revealed that dot-ELISA can be used for antibody detection against *Blastocystis hominis*.

【Key words】 *Blastocystis hominis*; Dot-ELISA; Antibody; *In vitro* cultivation

Supported by the Natural Science Fund of Jiangxi Province(No.0140020)

* Corresponding author, E-mail: yanyiming2000@tom.com

人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*)是一种最常见的人肠道寄生原虫, 呈世界性分布, 国外报道热带和亚热带人群感染率高, 发展中国家的感染率(约 30%~50%)明显高于发达国家(约 0.5%~23%)^[1,2]。我国有 20 多个省、市查到该虫感染者, 感染率约为 0.1%~32%^[3]。尽管对该虫的致病性颇有争议, 但近年来越来越多的研究者认为该虫与腹泻、肠易激综合征等肠道疾病明显相关^[2,4]。诊断人芽囊原虫感染的方法有直接涂片法、三色(trichrome)染色法、浓聚法及体外培养法等。因技术水平、标本质量、复检次数以及该虫的多形态特性, 采用直接涂片法和浓聚法, 因漏诊而导致假阴性。近年来, 体外培养被认为是人芽囊原虫检测的最好方法, 但费时, 故不适合大规模现场调查。为了寻找一种简便、敏感、特异性较强的检测手段, 本研究采用硝酸纤维素膜作为固相载体, 用人芽囊原虫可溶性抗原作包被抗原, 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 抗体(HRP-IgG)作酶标抗体, 初步建立检测人芽囊原虫血清抗体的 dot-ELISA 诊断方法。

1 材料与方 法

基金项目: 江西省自然科学基金(No.0140020)

作者单位: 赣南医学院病原生物学教研室, 赣州 341000

* 通讯作者, E-mail:yanyiming2000@tom.com

1.1 调查对象 对本校 2002 级和 2003 级大学生 322 名, 分别采集新鲜粪便, 同时抽取外周血, 分离血清, -20℃冻存备用。

1.2 试剂 硝酸纤维素薄膜(NC 膜)为美国 Bio-Rad 公司产品, 牛血清白蛋白(BSA)为上海华美生物工程公司产品, HRP-IgG(工作浓度 1:120, 批号: 20011001)为北京天坛生物制品股份有限公司产品, DAB(3, 3'-二氨基联苯胺盐酸盐)为瑞士 Fluka 公司产品, 胎牛血清(FBS)购于杭州四季青公司, 淋巴细胞分离液购于上海恒信化学试剂有限公司(批号: 20001102); 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 人芽囊原虫可溶性抗原的制备 按文献[5]方法制备 Locke's 鸡蛋双相斜面培养基。将 1 株来自崇义县有腹泻症状的女大学生的粪便培养于含 20% FBS 的 Locke's 鸡蛋双相斜面培养基内, 37℃培养 48 h 后收集虫体, 用 0.02 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 每次 1 000×g 离心 15 min, 加适量的 0.02 mol/L PBS (pH 7.4) 重悬沉淀(人芽囊原虫体)。取 2 ml 淋巴细胞分离液于试管中, 分离液上铺加 4 ml 虫体悬液, 1 000×g 离心 20 min, 取出虫体层, 用 0.02 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 每次 1 000×g 离心 15 min。用 0.02 mol/L PBS (pH 7.4) 重悬沉淀, 4℃超声粉碎 5 次, 每次 30 s, 间隔 1 min, 所得溶液经 12 000×g 离心 20 min, 上清液即为人芽囊原虫可溶性

抗原，用 Lowry 法测得蛋白质含量为 0.63 mg/ml，分装并于 -20 °C 冻存备用。

1.4 直接涂片法和体外培养法检测人芽囊原虫 将收集的 322 份新鲜粪便分别用生理盐水和碘液涂抹制成涂片，加盖片后用高倍镜(×400)观察。同时将新鲜粪使用 Locke's 鸡蛋双相斜面培养基培养 48~72 h，在高倍镜(×400)下观察。

1.5 Dot-ELISA 检测 将 NC 膜裁剪成直径为 8 mm 的圆片，取 1 μl 人芽囊原虫抗原(0.63 mg/ml)点样于滤膜的中央，制成抗原滤膜，室温自然干燥，置 4 °C 冰箱过夜。实验时将抗原滤膜置于 20 孔平底反应板小井内，每孔放置 1 张抗原滤膜，用洗涤液(含 0.5% Tween-20 的 0.02 mol/ml、pH 7.4 的 PBS)洗 2 次，每次 3 min，加 0.2 ml 封闭液(含 1% BSA 的 0.02 mol/L、pH 7.4 的 PBS)置 37 °C 振荡培养箱内孵育 30 min，吸去封闭液，加经含 0.5% BSA 的 PBS (pH 7.4) 稀释的 1:200 血清样品，在平底反应板内分别加入稀释度为 1:100、1:200、1:400、1:800 和 1:1 600 的受检血清，同时以 0.02 mol/L、pH 7.4 的 PBS 作对照，置 37 °C 振荡培养箱内孵育 30 min 用洗涤液洗涤抗原滤膜 3 次，每次 3 min。每孔加入 0.2 ml HRP-IgG，37 °C 振荡恒温培养箱轻微振荡 30 min。然后洗涤 3 次，每次 3 min，各孔加底物 DAB 0.2 ml，在 3 °C 恒温培养箱避光反应 10 min，去底物溶液，并以双蒸水终止反应。目测并记录结果，将体外培养人芽囊原虫感染阳性和阴性患者的血清抗体滴度来确定 dot-ELISA 判断阳性临界值(cutoff value)。每份血清样品的每个稀释度均做复孔。阳性的棕黄色斑点与白色的 NC 膜能形成鲜明对比。

1.6 统计学分析 用 Office2003 Excel 进行统计分析，以体外培养法为金标准，计算 dot-ELISA 的特异度、敏感度。

2 结果

2.1 直接涂片法和体外培养法检测人芽囊原虫 直接涂片法和体外培养法检测 322 例粪便，人芽囊原虫阳性率分别为 47.21% (152/322)和 55.28%(178/322)(图 1)。

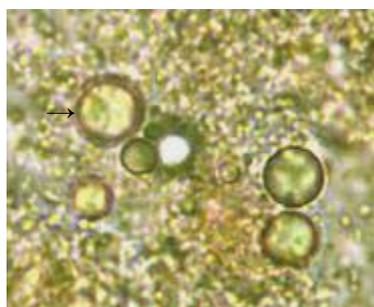


图 1 人芽囊原虫粪便碘液涂片(×400)

2.2 Dot-ELISA 检测血清抗体滴度的分布 144 例体外培养为人芽囊原虫阴性者中 141 例滴度在 1/100~1/200 之间，故将血清滴度 1/400 作为判断 dot-ELISA 检测人芽囊原虫感染阳性临界值。dot-ELISA 检测 322 份血清，人芽囊原虫感染率为 51.86% (167/322) (表 1)。

2.3 Dot-ELISA 法与直接涂片法检测人芽囊原虫感染的比较 以体外培养为金标准，dot-ELISA 法与直接涂片法的敏感

度分别为 92.13%和 75.28%，特异度分别为 97.92%和 87.50% (表 2)。

表 1 Dot-ELISA 检测体外培养为人芽囊原虫阳性和阴性者血清抗体滴度

检测方法	样本数	Dot-ELISA 血清滴度					
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	
体外培养	阳性	178	8	6	15	71	78
	阴性	144	74	67	3	0	0

表 2 Dot-ELISA 法和直接涂片法检测人芽囊原虫感染的比较

检测方法		体外培养		
		阳性 (%)	阴性 (%)	总计(%)
Dot-ELISA	阳性	164(92.13)	3(2.08)	167(51.86)
	阴性	14(7.87)	141(97.92)	155(48.14)
直接涂片	阳性	134(75.28)	18(12.50)	152(47.20)
	阴性	44(24.72)	126(87.50)	170(52.80)

3 讨论

人芽囊原虫是近 20 年来才被人们所重视的与腹泻相关的肠道寄生虫。在我国，已将其所致疾病列为新发传染病^[6]。国外报道^[2]在热带、亚热带以及发展中国家的感染率可高达 60%。国内报道^[3]人群感染率达 32%，腹泻患者感染率可达 15.9%。近几年在本校大学生中开展肠道寄生虫调查的情况，发现人芽囊原虫的感染率有明显上升趋势。本研究采用 Locke's 鸡蛋双相斜面培养方法检测 322 例粪便，感染率达 55.28%(178/322)，明显高于国内报道的人群感染率和腹泻患者感染率，究其原因可能是：这次受检的学生大多来自赣南农村，赣南老区地处亚热带，人口稠密，卫生条件较差，颇适宜寄生虫病的传播与流行，且 1996 年发生过人芽囊原虫的暴发流行^[7]。此外，本研究的标本收集时间是在 9 月初，而文献报道夏季的人芽囊原虫感染率高于其他季节^[8]；体外培养方法可以提高检测的敏感性^[8,9]。

本研究建立的用于检测人芽囊原虫血清抗体的 dot-ELISA 的临界值为 1/400 是根据体外培养证实为人芽囊原虫感染阳性的 178 例血清和人芽囊原虫感染为阴性的 144 例血清中抗体滴度来确定的，当血清抗体滴度大于或等于 1/400 被判定为人芽囊原虫感染阳性，反之为阴性。本研究以体外培养为金标准，比较了 dot-ELISA 和直接涂片法检测的特异度、敏感度，结果显示：dot-ELISA 法与直接涂片法的敏感度分别为 92.13%和 75.28%，特异度分别为 97.92%和 87.50%。由此可见采用直接涂片法易出现漏诊和误诊，而 dot-ELISA 敏感性和特异性均较高，因此，本研究建立的用于检测人芽囊原虫血清抗体的 dot-ELISA 方法是可行的。并具方法简便，肉眼即可判断结果，不需要特殊仪器设备，与体外培养法相比，所用时间短，整个实验流程可在 2 h 内完成，适用于临床检测和基层流行病学调查。

参 考 文 献

[1] Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* revisited[J]. Clin Microbiol Rev, 1996, 9: 563-584.

文章编号: 1000-7423(2007)-03-0258-02

江苏省 2006 年疟疾疫情分析

王伟明, 高琪, 金小林, 周华云

【摘要】 2006 年江苏省报告疟疾病例 767 例, 发病率为 0.107/万, 比 2005 年上升了 16.57%; 本地人口发热病人血检阳性率为 0.08%(293/361 896), 外地流动人口发热病人血检阳性率为 1.23%(251/204 40), 两者差异有统计学意义($P < 0.01$); 全省复发病例占发病总数的 9.00%(69/767)。清晨 50 顶蚊帐内捕获的中华按蚊平均密度为 0.61 只/顶, 较 2005 年(0.29 只/顶)上升 110%。提示中华按蚊数量明显增高是江苏省淮北市地区出现疟疾疫情反复的主要自然因素。

【关键词】 疟疾; 流行病学; 监测

中图分类号: R531.3 文献标识码: B

Malaria Epidemic Situation in Jiangsu Province in 2006

WANG Wei-ming, Gao Qi, JIN Xiao-lin, ZHOU Hua-yun

(Jiangsu Provincial Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

【Abstract】 In 2006, there were 767 reported malaria cases in Jiangsu Province with an incidence of 1.07‰ and increased by 16.57% in comparison to the previous year. Positive rate of blood examination in local febrile patients was 0.08% (293/361 896) but 1.23% (251/204 40) in mobile population ($P < 0.01$). Cases with relapses occupied 9.00% of the total. The density of *Anopheles sinensis* was 0.61 per net and increased by 110% more than the year 2005 (0.29/net). It is indicated that the increase of *A. sinensis* density has been the main factor for malaria recurrence in the area north of Huaihe River in the Province.

【Key words】 Malaria; Epidemiology; Surveillance

Supported by Jiangsu Provincial Department of Health (No.X200545;Y2006014)

江苏省属非稳定性间日疟流行区, 主要传播媒介为中华按蚊, 部分地区存在嗜人按蚊。经过多年的防治, 疟疾流行逐步得到有效控制。1996 年全省疟疾病例为 277 例, 为历史最低; 2000 年在北纬 32°以北单一中华按蚊媒介区陆续出现间日疟疫情回升。现将 2006 年疟疾疫情分析结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料来源 2006 年江苏省疟疾病例数据来自中国疾病预

防控制系统中疾病监测信息报告管理系统、全球基金疟疾项目、常规督导检查 and 流行病学调查。

1.2 蚊媒监测 来自 5 个全国疟疾监测点和 3 个省级监测点的媒介监测数据。国家监测点于 6 月下旬至 10 月上旬, 每半月一次, 在 19:00~24:00 h 室外半通宵帐内人饵诱捕法和清晨 50 顶蚊帐内全捕法进行媒介按蚊密度调查, 共调查 44 次。省级监测点, 于 6 月中旬至 10 月中旬, 每半月 1 次作畜舍中华按蚊密度调查, 在调查点选择相对固定的 4 间猪舍, 以 1 个人在每间猪舍捕蚊 15 min, 捕获的按蚊总数即为只/(人工·小时)密度。

基金项目: 江苏省卫生厅资助项目 (No.X200545; Y2006014)

作者单位: 江苏省寄生虫病防治研究所, 无锡 214064

[2] Tan KSW. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies[J]. *Vet Parasitol*, 2004, 126: 121-144.

[3] Liao YQ, Yu XL. Development of research in *Blastocystis hominis* in China[J]. *Chin J Schisto Control*, 2003, 15: 315-318. (in Chinese)
(廖远泉, 余学留. 国内人芽囊原虫研究的一些进展[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2003, 15: 315-318.)

[4] Yakoob J, Jafri W, Jafri N, et al. Irritable bowel syndrome: in search of etiology: role of *Blastocystis hominis*[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, 70: 383-385.

[5] Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15: 329-341.

[6] Pan XZ. *Emerging Infectious Diseases*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004. 153-155. (in Chinese)

(潘孝彰, 主编. *新发传染病* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004. 153-155.

[7] Wu GH, Xiong YS, Cao GL, et al. Investigation of an outbreak of blastocystiasis[J]. *Chin J Parasit Dis Control*, 2000, 13: 25-27. (in Chinese)
(吴国宏, 熊以树, 曹镛禄, 等. 一起人芽囊原虫病暴发流行的调查研究[J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2000, 13: 25-27.)

[8] Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2004, 23: 509-511.

[9] Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, et al. *In vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*[J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 2002, 96, 803-807.

(收稿日期: 2007-03-12 编辑: 盛慧锋)