

文章编号:1000-7423(2003)-06-0342-03

应用斑点免疫金渗滤法检测旋毛虫病患者血清 IgG

刘英杰¹ 刘云¹ 曲耀华¹ 郑勇² 刘艳红³ 张永利⁴ 陈娟³

【摘要】 目的 研究应用斑点免疫金渗滤法(DIGFA)快速检测旋毛虫病患者血清抗旋毛虫 IgG 抗体。方法 采用旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原,以胶体金颗粒结合的羊抗人 IgG 为标记抗体,以颜色深浅为判断阳性标准。结果 纯化的旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原与患者血清中特异性抗旋毛虫 IgG 抗体通过渗滤在硝酸纤维素膜上反应,10 min 内即可直接观察结果。在 76 份患者血清的检测中,阳性率为 94.74%,与 ELISA 法的检出阳性率 86.84% 相比差异无显著性($\chi^2 = 2.83, P > 0.05$)。交叉试验与重复试验结果显示 DIGFA 具有较好的特异性及稳定性。结论 DIGFA 法可快速检测旋毛虫病患者血清特异性旋毛虫 IgG 抗体。

【关键词】 旋毛虫病;斑点免疫金渗滤试验;酶联免疫吸附试验;膜抗原;免疫诊断

中图分类号:R383.15

文献标识码:A

Application of Dot-immunogold Filtration Assay in Detection of IgG in Sera of Trichinellosis Patients

LIU Ying-jie¹, LIU Yun¹, QU Yao-hua¹, ZHENG Yong², LIU Yan-hong³, ZHANG Yong-li⁴, CHEN Juan³

(1 Cellular and Molecular Immunology Laboratory of Henan University, Kaifeng 475001;

2 The First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475001;

3 Kaifeng Epidemic Prevention Station, Kaifeng 475000;

4 Huaihe Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000)

【Abstract】 **Objective** To study a new quick method for detecting serum IgG against *Trichinella spiralis* (T. s). **Methods** Membrane antigen of muscle larva of T. s was isolated and combined with the nitrocellulose membrane. Goat anti-human IgG was conjugated with the golden pellets of colloidal state which was used as marked antibody for the experiment of dot-immunogold filtration assay to examine specific IgG. **Results** T. s IgG and its corresponding antigen reacted on the membrane by filtration, and the result could be observed with naked eyes within 10 min. In the examination of 76 clinical serum samples, the positive rate was 94.7%. It was not significantly higher than that of ELISA ($\chi^2 = 2.83, P > 0.05$). **Conclusion** The dot-immunogold filtration assay is rapid and simple for performing and reading in the detection of IgG against T. s with high sensitivity and specificity.

【Key words】 trichinellosis, dot-immunogold filtration, ELISA, membrane antigen, immunodiagnosis

斑点免疫金渗滤法(dot-immunogold filtration assay, DIGFA)是以胶体金为非酶标记物的快速斑点免疫结合试验,该法具有简便、快速、高度敏感和特异的特点,将 DIGFA 法用以检测旋毛虫病患者血清抗体,尚未见报道。本文用敏感性和特异性较高的纯化旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原^[1],以硝酸纤维素膜为固相载体,用胶体金标记羊抗人 IgG,建立检测血清中旋毛虫 IgG 抗体的斑点免疫金渗滤法,经与 ELISA 法比较,结果令人满意,报告如下。

材料与方 法

1 旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原的制备和纯化

利用虫体膜蛋白和水溶性蛋白可在非离子去垢剂 Triton X-114 溶液中发生相分离的原理,按文献[1]的方法制备和纯化旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原(membrane antigen of muscle larva, MPA),用改进的酚试剂法测得

蛋白质含量为 1.617mg/ml。Triton X-114 购于 Sigma 公司。

2 金标记羊抗人 IgG

按文献[2]的方法制备,羊抗人 IgG 由卫生部上海生物制品研究所提供,直径为 20nm 的胶体金颗粒购自华美生物工程公司。

3 血清样本

76 份旋毛虫感染早期的患者血清,该病的诊断标准为:具有本病的临床表现;血清学检查抗旋毛虫抗体阳性;肌肉活检发现旋毛虫幼虫囊包;经阿苯达唑治愈。凡具备第一条和其余一条者即可诊断为本病,本组患者中有 10 例经肌肉活检确诊;7 份粪检经病原学确诊的日本血吸虫病急性患者血清、9 份粪检阳性的肝吸虫病急性患者血清、6 份痰检肺吸虫卵阳性的肺吸虫病急性患者血清,其诊断标准参见文献[3]。以上血清来自到河南大学第一附属医院、河南大学附属

作者单位:1 河南大学医学院 细胞与分子免疫学实验室,开封 475001; 2 河南大学第一附属医院,河南 开封 475001;3 开封市防疫站,开封 475000;4 河南大学附属淮河医院,开封 475000

表 1 DIGFA 与 ELISA 测定不同血清抗体的结果
Table 1 Results of serum antibody detection by DIGFA and ELISA

样 本 Sample	DIGFA			ELISA	
	样本数 No. samples	阳性数 No. positives	阳性率(%) Positive rate(%)	阳性数 No. positives	阳性率(%) Positive rate(%)
旋毛虫病患者血清 Sera from patients with trichinellosis	76	72	94.74	66	86.84
健康人血清 Sera from healthy persons	40	0	0	1	2.50
华支睾吸虫病患者血清 Sera from patients with clonorchiasis	9	0	0	1	11.11
日本血吸虫病患者血清 Sera from patients with schistosomiasis	7	0	0	1	14.29
肺吸虫病患者血清 Sera from patients with paragonimiasis	6	0	0	1	16.67

淮河医院与开封市防疫站就诊的患者;40 份健康人血清来自开封市防疫站中心血站。

4 DIGFA 法的应用

4.1 测定装置 参见文献[4],将旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原(MPA)浓度调至 1 mg/ml,取 1 μl MPA 液,点加在 0.45 μm 孔径的硝酸纤维素膜(上海医药工业研究院提供)中央,其下方加正常健康成人血清 IgG(2 mg/ml)0.5 μl,作为质控线,4 °C 放置 30 min,取出室温自然干燥。

4.2 测定过程 在圆孔膜上滴加封闭液 100 μl[含 10g/LBSA、0.5% Tween-20 的 PBS(0.01mol/L pH 7.4)]、PBS(0.01mol/L pH7.4)50 μl、滴加血清标本(10 倍稀释)50 μl、PBS(同上)50 μl、金标羊抗人 IgG50 μl、PBS(同上)50 μl,待渗入。结果观察:在膜中央出现红色斑点者为阳性,颜色稍浅者为弱阳性,否则为阴性。其下方的对照线为实验有效的标志,无论阳性或阴性结果对照线均应显红色。

5 ELISA 法

抗旋毛虫特异性抗体 ELISA 法试剂盒购自深圳市绿瀚生物技术有限公司,按说明书操作。

结 果

1 DIGFA 法与 ELISA 法检测不同血清抗体结果比较(表 1)

DIGFA 法和 ELISA 法对旋毛虫病患者血清 IgG 抗体检测阳性率差异无显著性 ($\chi^2 = 2.83, P > 0.05$)。

2 DIGFA 法与 ELISA 法检测血清标本中旋毛虫 IgG 抗体的比较

用本法测定 66 例经 ELISA 试剂盒检测阳性的血清及 47 份阴性血清,其敏感性为 95.45%,特异性为 93.62%。另外,将一强阳性血清倍比稀释,比较

ELISA 和 DIGFA 的敏感性。结果该血清经 ELISA 法测定 1:8 稀释仍为阳性,1:16 为阴性,而用 DIGFA 测定,1:16 仍为弱阳性,1:32 为阴性,后者敏感性略有提高(表 2)。

2 吸收试验

将纯化的 MPA 与 ELISA 检出的旋毛虫抗体阳性血清 10 份等体积混合后用 DIGFA 检测旋毛虫 IgG 抗体,结果均为阴性。

3 重复性试验

检测 2 份抗体阳性血清和 2 份抗体阴性血清,重复检测 5 次,阳性标本均阳性,阴性标本均阴性,批间及批内阳性斑点颜色变异不明显,试剂重复性好。

表 2 DIGFA 法与 ELISA 法测定旋毛虫 IgG 抗体结果比较
Table 2 Comparison of results of T. s IgG detection by DIGFA and ELISA

	ELISA		总计 Total
	阳性数 No. positives	阴性数 No. negatives	
DIGFA 阳性数 No. positives	63	3	66
DIGFA 阴性数 No. negatives	3	44	47
总计 Total	66	47	113

4 稳定性试验

将点样后的膜与金标抗体置 4 °C 冰箱保存,间隔 30 d 取出测定 1 次,共 6 次,结果无改变,说明 DIGFA 所用纤维素膜和金标抗体在 0~4 °C 至少可保存半年。

讨 论

通过研究,作者认为渗滤试验的硝酸纤维素的膜孔径以 0.45 μm 为宜,此时膜的吸附性能和渗滤速度均较合适,关于抗原和血清的浓度,作者采用棋盘滴定

法对抗原及血清进行倍比稀释,经筛选比较,选择抗原浓度 1 mg/ml、血清浓度 1:10 为最佳反应浓度。取一份混合阳性血清和一份混合阴性血清用方阵法对各种反应条件作滴定,最终选择 MPA 点样量为 1 μ l,金标抗体制备后与抗原膜滴配,稀释成最适浓度,以 50 μ l 用量时即可得到清晰的淡红色斑点。

旋毛虫病主要是通过食入含有旋毛虫幼虫的肉类而发生的,我国屠宰猪的旋毛虫感染率约为 0.1% ~ 0.2%,某些地区高达 2% ~ 7%^[5],影响了人们的食肉安全,目前多用 ELISA 法来诊断旋毛虫病,但其操作繁琐,需时长,不利及时诊断及治疗。本研究显示使用旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原的 DIGFA 法检测旋毛虫患者血清旋毛虫 IgG 抗体具有较高敏感性和特异性,重

复性和稳定性好,且方法简单、快速,具有一定的临床使用价值。

参 考 文 献

[1] 雷莉,冯瑞元. 旋毛虫肌肉期幼虫膜抗原的制备及应用价值的初步探讨[J]. 华西医科大学学报,1994,25:5-8.

[2] 皮国华,何红英,谷淑燕. 胶体金联免疫吸附试验检测丙型肝炎病毒抗体[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,1995,9:371-374.

[3] 李梦东. 实用传染病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:519-523.

[4] Spielberg F, Kabeya CM, Ryder RW, et al. Field testing and comparative evaluation of rapid, visually read screening assays for antibody to human immunodeficiency virus[J]. Lancet, 1989, 1(8638):580-584.

[5] 宋世佩. 旋毛虫病的危害与防治[J]. 医学动物防制, 2002, 18(1):39-40.

(收稿日期:2003-06-30 编辑:伯韦)

文章编号:1000-7423(2003)-06-0344-01

【病例报告】

棘颚口线虫致消化道出血一例

李继红¹ 崔茜¹ 包磊²

中图分类号:R383.1

文献标识码:D

患者 女性 苗族,42岁,农民。因黑便1天于2000年9月3日来恩施州中心医院就诊。主诉:上腹部疼痛月余,自1天前开始,大便黑色似柏油状,粘稠而反光,略为成形,无其它不适。疑为上消化道溃疡出血,行电子胃镜检查,见胃小弯距幽门切痕约1cm处,有一直径约1cm左右突出于胃壁的圆形瘤块,瘤块中央有一小孔,孔中有一弯曲线形虫体,浅肉红色略透明,前端埋入胃壁瘤块中后段游离于胃腔中,镜下取出未获成功,次日行胃部分切除术取出瘤块和虫体送恩施州中心医院病理科转我室鉴定。

鉴定:光学显微镜下观察,虫体乳白色,体长12mm,体宽约1mm。头部球形,上有8环小钩,第一环50个,第二环52个,第三环54个,第四环56个,第五环58个,第七环56个,第八环54个,中部小钩稍大,向两极延伸小钩逐渐变小。口周有一对肉质唇。体表有横纹,体前半部有叶状小棘,近头部体棘短而宽,齿尖游离端为锯齿状(三齿),稍后段体棘增长,再往后体棘逐渐变小变短,数量逐渐减少直至消失,齿尖由三齿过渡为单齿,体后部基本无棘,直到肛周腹面才有微棘。泄殖孔开口距尾端0.5mm处,泄殖孔两侧没有乳突,也未见明显膨大的假交合伞,但隐约可见两支极短小交合刺。经形态结构观察并与文献记载的虫体仔细对照^[1],确定为性未成熟的棘颚口线虫成虫。

讨论:据近期资料统计^[2],我国报告本虫感染24例,绝大多数为第三期幼虫或性未成熟的成虫,造成人体的损害主要是皮下脓肿、结节和皮肤型幼虫移行症,在人体胃中发现性未成熟成虫并造成典型胃部损害,尚未见报道。棘颚口线虫以剑水蚤为第一中间宿主,乌鳢、泥鳅和黄鳝等为第二中间宿主,蛇、蛙、鸡和鸭等为转续宿主,犬、猫、虎和豹等为终宿主。人并非本虫的适宜宿主,在人体一般不能发育成熟为成虫,因此,从人体获取的虫体大多为幼虫或性未成熟的成虫。本例患者为苗族人,有吃生食和喝生水的习惯,患者自述春夏季常生食青蛙,由此推测可能因生吃青蛙食入第三期幼虫而感染。一般情况下,人体感染第三期幼虫后,幼虫大多在皮下或内脏移行,且虫体短小,形成这种现象的原因,可能是本虫到达其他组织后很难回到胃壁后,而其他组织器官不能提供本虫发育的某些必要条件,因此发育不良。本例情况显示,本虫在胃壁定居生长,其生长环境类似正常终宿主提供的环境,因此,发育状况比在其他组织器官中好,体形较大,性状接近成虫,但不能达到性成熟,说明人体非本虫适宜的终宿主。

参 考 文 献

[1] 赵慰先主编. 人体寄生虫学[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1983, 704-706.

[2] 许隆祺等主编. 中国人体寄生虫分布与危害[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 2000, 828

(收稿日期:2003-10-29 编辑:伯韦)

作者单位:1 湖北民族学院医学院寄生虫学教研室,恩施 445000;
2 浙江省绍兴市妇女儿童医院病理科,绍兴 312000