

【论著摘要】

文章编号:1000-7423(2002)-06-0372-02

磁珠-ELISA 检测日本血吸虫循环虫卵抗原的研究

毛亚飞¹ 张悟澄¹ 潘劲草²

中图分类号:R383.24 文献标识码:A

循环抗原(circulating antigen, CAg)是宿主体内活虫(包括虫卵)所产生的具抗原性的代谢物质。它的存在表明血吸虫现症感染,并能大致反映感染虫荷,而且宿主有效化疗后 CAg 可被宿主迅速清除。故 CAg 检测不仅可作为诊断的依据,还可用于疗效考核。目前国内外已建立了多种检测 CAg 的方法如双夹心-ELISA、斑点-ELISA、反向间接血凝试验等,并采用不同样本(血液和/或尿液)进行血吸虫 CAg 的检测,均取得一定的成绩。本文以磁珠(magnetic bead, MB)作为固相载体,建立了检测日本血吸虫 CAg 的磁珠酶联免疫吸附试验(MB-ELISA)技术,通过对有关实验条件的优选,流程的确定,使方法标准化,并应用于血吸虫病患者血清 CAg 的检测,取得了初步效果,为进一步深入研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料和仪器 磁珠:Dynabeads(R) M-450 (manufactured by Dynal A. S. N-0212 Oslo, Norway),直径 5 μm。单抗 MG2:MG2 腹水由上海第二医科大学姜文娟教授惠赠。MG2 靶抗原为虫卵抗原,免疫球蛋白类型为 IgM。MG2 腹水用 PEG 沉淀法纯化,纯化后用紫外分光光度计测定蛋白质浓度。辣根过氧化物酶标记单抗(HRP-MG2)和可溶性虫卵抗原(SEA, 0.4777 mg/ml);由浙江省医学科学院寄生虫病研究所张素娥研究员惠赠。磁分离器:由本教研室自制。

1.2 血清 血吸虫感染兔血清:健康家兔感染日本血吸虫尾蚴(1 500 条/兔) 45 d 后采集血清。急性血吸虫病患者血清(10 人份);除临床病史、症状、体征符合外,均经 COIT 测定,环沉率达 20% 以上;慢性血吸虫病患者血清(64 人份)和姜片虫病者血清(7 人份),均为粪检虫卵阳性者;卫氏并殖吸虫病患者血清(15 人份)和旋毛虫病患者血清(13 人份),除临床病史、症状、体征符合外,ELISA 法抗体检测均为阳性;健康人血清(40 人份),为体检健康者血清,由杭州市卫生防疫站提供。

1.3 磁珠酶联免疫吸附试验(MB-ELISA)

1.3.1 磁珠-单抗(MB-MG2)的制备 按饶微等^[1]方法进行。用 0.05 mol/L pH 8.5 的 Tris 缓冲液将 25% 戊二醛水溶液稀释成 1.25% 浓度,用该溶液悬浮磁珠(6.76 × 10⁵/孔为宜),置室温振荡 1.5 h,用 Tris 缓冲液洗净,立即悬浮在含 MG2 单抗(2.5 μg/ml 为宜)的上述缓冲液中,置 37 ℃ 水浴 1 h,加等体积 0.5% BSA 缓冲液,37 ℃ 封闭 0.5 h,用 0.5% BSA 缓冲液清洗 3 次,并用该溶液恢复磁珠到原体积,置 4 ℃ 备用。

1.3.2 技术流程 将 MB-MG2 摇匀,吸于酶标板内(10 μl/

孔),加待检血清(1:4) 50 μl/孔,37 ℃ 振荡 20 min,弃上清,加 1:2 000 HRP-MG2 50 μl/孔,37 ℃ 振荡 20 min,PBS-T 彻底清洗,加 OPD 溶液 100 μl/孔,37 ℃ 振荡 10 min,最后加 2 mol/L 硫酸终止反应,用磁分离器将 MB 吸于一侧,测定 OD₄₉₀ 值。

1.4 常规夹心 ELISA(S-ELISA) 按李允鹤^[2]方法进行,包被单抗 MG2 工作浓度为 10 μg/ml,HRP-MG2 工作稀释度为 1:1 000。

2 结果

2.1 MB-ELISA 及 S-ELISA 检测灵敏度比较 MB-ELISA 检测 SEA 的极限浓度为 2.9 ng/ml,而 S-ELISA 则为 5.8 ng/ml;MB-ELISA 检测 3 份阳性血清终点滴度为 1:16,而 S-ELISA 则为 1:8,MB-ELISA 较 S-ELISA 略为敏感。

2.2 MB-ELISA 的初步应用结果

2.2.1 MB-ELISA 及 S-ELISA 检测感染兔血清的比较 用两法平行检测感染早期兔血清 24 例,结果 MB-ELISA 阳性率为 33.3%(8/24),而 S-ELISA 则为 25%(6/24)。经 χ^2 检验,两法的差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.2.2 MB-ELISA 及 S-ELISA 检测结果 急性血吸虫病、慢性血吸虫病、卫氏并殖吸虫病、姜片虫病、旋毛虫病患者血清及健康人血清检测结果见表 1。

表 1 MB-ELISA 及 S-ELISA 检测各类人群血清结果

血清	MB-ELISA	S-ELISA
	阳性率%	阳性率%
急性血吸虫病	100 (10/10)	100 (10/10)
慢性血吸虫病	62.5 (40/64)	56.3 (36/64)
健康人	10 (4/40)	10 (4/40)
卫氏并殖吸虫病	26.7 (4/15)	33.3 (5/15)
姜片虫病	14.3 (1/7)	14.3 (1/7)
旋毛虫病	0 (0/13)	0 (0/13)

P 均 > 0.05

3 讨论

本文应用抗虫卵 SEA-MG2 单抗建立 MB-ELISA 检测慢性血吸虫病患者血清,阳性率为 62.5%(40/64),与 S-ELISA 的 56.3%(36/64)相比,阳性率略高,但无显著性差异。MG2 检测的靶抗原为虫卵 SEA 抗原,而患者的 CAg 成分非常复杂,主要有 GAA、MAA、SEA 3 大类,它们在宿主的消长规律也不同,所以用抗虫卵 SEA 的单抗作夹心 ELISA 检测血吸虫 CAg 时,仅能检出具有 MG2 结合位点的相应的循环抗原。

作者单位:1 浙江大学医学院寄生虫学教研室,杭州 310031;
2 杭州市疾病预防控制中心,杭州 310006

本文应用 MB-ELISA 检测其它蠕虫感染者血清及健康人血清,对卫氏并殖吸虫病患者血清的交叉反应为 26.7% (4/15),似较 S-ELISA 33.3% (5/15) 略低,但无显著性差异;对姜片虫病患者血清及健康人血清,两法的假阳性率分别为 14.3%、10%,表明 MG2 用于本法并未显著提高特异性。文献报道日本血吸虫虫卵 SEA 抗原与卫氏并殖吸虫、姜片虫可溶性抗原均存在共同抗原组分及血清学交叉反应性^[3,4],曾庆仁等^[5]用 SDS-PAGE 和 ELISA 分析日本血吸虫虫卵可溶性抗原,发现有 8 条多肽分子带,其中 1 条(20/21 kDa)与卫氏并殖吸虫病患者血清起交叉反应,同样,在并殖吸虫成虫抗原 9 条多肽分子带中有 1 条(36/37 kDa)与血吸虫病患者血清起交叉反应。这表明日本血吸虫虫卵可溶性抗原与卫氏并殖吸虫抗原具有共同的抗原决定簇,存在交叉反应。为了把交叉反应降至最低,其关键在于筛选出更特异的单克隆抗体。

MB-ELISA 及 S-ELISA 检测感染兔血清的结果表明,对感染早期的兔血清,MG2 的检出率低,分别为 33.3% 和 25%。与潘劲草等^[6]用同一单抗的 BSAS-ELISA 方法检测感染兔血清的报道相似。这可能与感染动物体内 SEA 抗原的出现时间有关。日本血吸虫感染动物后最早在 24 d 开始产卵,再经 11 d 才发育为含毛蚴的成熟卵,此后分泌 SEA。刘世国等^[7]报道,日本血吸虫感染家兔在感染后第 4 周,8.6% 家兔 SEA 呈阳性反应,感染后第 6 周,3 类 CAg 均为低水平,第 8 周明显上升。本研究的感染兔血清系感染后 45 d 血清,其结果符合日本血吸

虫的生活史规律及文献报道。

MB-ELISA 是在 ELISA 原理的基础上建立的一种新型固相免疫检测技术,磁珠酶联免疫吸附试验 S-ELISA 敏感;对慢性血吸虫病的敏感性及卫氏并殖吸虫病的特异性方面的阳性率的绝对值也均较常规 S-ELISA 为好,但无统计学显著性差异。今后改进的关键问题一是筛选更理想的单克隆抗体,二是改进 MB 的性能,并降低成本。

参 考 文 献

- [1] 饶微,袁润章,徐华琴,等. 免疫磁性微珠在 HCG 定量检测中的批间稳定性研究[J]. 中国免疫学杂志,1998,14:291-292.
- [2] 李允鹤主编. 寄生虫病免疫学及免疫诊断[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1991:356-359.
- [3] Minai W, Hosaka Y, Yamashita T, et al. Analysis of soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum*: comparison of seroreactivities among schistosomiasis patients of different infection phases[J]. Jpn J Parasitol, 1992,41:401-408.
- [4] 龚唯,曹岷,施云松,等. 二种吸虫抗原与日本血吸虫抗原之间的交叉反应性及其表位研究[J]. 苏州医学院学报,1996,16:1014-1017.
- [5] 曾庆仁,张怡澄,陈翠娥,等. 日本血吸虫虫卵与卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原内的共同抗原组分研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1990,9:31-34.
- [6] 潘劲草,张惜涛. 建立 BSAS-ELISA 检测日本血吸虫循环抗原的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,1999,11:134-136.
- [7] 刘世国,石佑恩,韩家俊,等. 日本血吸虫循环抗原动态消长的实验研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1998,16:283-286.

(收稿日期:2001-10-22 编辑:富秀兰)

文章编号:1000-7423(2002)-06-0373-01

【简报】

透明胶纸粘贴法治疗蠕形螨感染的效果

王国英¹ 刘振荣² 闫文义¹

中图分类号:R384.423

文献标识码:D

透明胶纸粘贴法诊断蠕形螨感染已广为使用。1999~2001 年,我们用此法对蠕形螨感染者进行了实验治疗观察。结果报道如下。

1 治疗对象与方法

1.1 对象 河南大学 1999 级和 2000 级学生。经透明胶纸粘贴法鼻部检查(胶纸为 7 cm×1.8 cm),蠕形螨阳性者 189 例,其中男性 90 例,女性 99 例,年龄 18~21 岁。根据每张玻片蠕形螨检出数将患者分为:轻度感染组(1~3 条)117 例,中度感染组(4~6 条)54 例,重度感染组(7 条以上)18 例。

1.2 方法 患者每晚入睡前洗净面部,在鼻部(包括鼻尖和两侧鼻翼)贴一透明胶纸(8 cm×3 cm),清晨洗脸前取下。每次洗脸前用开水烫洗毛巾及脸盆。20 d 为一疗程,共两个疗程。每一疗程结束后用透明胶纸粘贴鼻部收集螨虫(连查 3 d),检查疗效。

1.3 疗效考核标准 治愈:连查 3 d 结果为阴性;显效:结果为阳性,感染度降低;无效:结果为阳性,感染度未降低。

2 结果

轻度感染组:治愈 89.74% (105/117),无效 10.3% (12/117);中度感染组:治愈 31.5% (17/54),显效 51.8% (28/54),无效 16.7% (9/54);重度感染组:治愈 11.1% (2/18),显效 61.1% (11/18),无效 27.8% (5/18)。轻度感染组治愈率显著高于中度和重度感染组。

3 讨论

结果表明,透明胶纸粘贴法治疗蠕形螨感染者,感染度不同疗效也不同。轻度感染者治愈效果显著,疗效好,费用低。中度和重度感染者可明显降低感染度。本法能否作为一种辅助疗法与药物治疗配合使用,有待进一步研究。本实验未发现皮肤过敏者,但最好慎用。

(收稿日期:2002-08-28 编辑:富秀兰)

作者单位:1 河南大学医学院寄生虫学教研室,开封 475001;

2 河南大学第一附属医院,开封 475001