

SPA-ELISA 检测弓形虫感染鼠尿中的循环抗原*

金武官¹, 李云珠¹, 俞善昌¹, 杨惠珍²

(1 上海第二医科大学附属瑞金医院儿科 上海 200025; 2 上海第二医科大学寄生虫教研组 上海 200025)

摘要 [目的] 探索弓形虫感染早期诊断的简便方法。[方法] 用 SPA-ELISA 检测轻度、中度和重度感染弓形虫鼠尿中弓形虫循环抗原(TCA)。[结果] 轻度、中度和重度感染弓形虫 3 组鼠尿中均检出 TCA, 上述 3 组分别于弓形虫感染后 d_6 、 d_3 和 d_4 显示阳性斑点。[结论] SPA-ELISA 能检出弓形虫感染鼠尿中的弓形虫循环抗原, 可用于弓形虫感染的早期诊断。

关键词: 弓形虫, 循环抗原, SPA-ELISA, 鼠尿
中图分类号: R531.804.3 文献编号: A

传统血清抗体的检测结果很难区分弓形虫慢性感染及早期急性感染, 70 年代以来, 学者们致力于寻找一种新的早期诊断弓形虫感染的方法。Raizman 等^[1] 首先以电泳及免疫扩散法证实了特异循环抗原的存在。Van Knapen^[2] 和 Araujo^[3] 用 ELISA 检测急性弓形虫感染的动物及弓形虫感染者的血清, 证实弓形虫循环抗原(TCA) 仅在新感染或再感染的急性期可测出, 而至慢性期则消失。Brooks 等^[4] 首先将 dot-ELISA 二抗间接法应用于血清 TCA 的检测, 并对检测到的弓形虫循环抗原作了定量研究, 灵敏度可达 40 ~ 130 pg/ml。Huskinson^[5] 用 ELISA 首次在弓形虫感染鼠尿中检测出弓形虫循环抗原, 认为它是一种早期诊断弓形虫感染的方法。1993 年, 本文作者等^[6] 于感染后 d_3 用改良的 ELISA 检测出弓形虫感染鼠尿液中的弓形虫循环抗原, 在实验感染后 d_3 , 从鼠尿液中测到了弓形虫循环抗原, 证实其为一种诊断早期弓形虫感染的灵敏、简便的方法。本实验用 SPA-ELISA 检测弓形虫感染鼠尿中的弓形虫循环抗原, 以寻找一种更灵敏、更简便的早期诊断弓形虫感染的方法。

f 材料与方法

1 动物

昆明株小鼠 20 ~ 25g、6 周龄, 由本校实验动物房供应。

2 鼠尿弓形虫循环抗原检测样本的制备

轻度感染组、中度感染组和重度感染组各取小鼠 20 只, 分别腹腔接种 1×10^4 、 1×10^6 和 1×10^8 RH 株弓形虫速殖子。同时取正常小鼠 30 只作平行对照组。上述各感染组分别于接种弓形虫后 d_1 、

d_2 、 d_3 、 d_4 、 d_5 和 d_6 用按摩挤压法收集尿液, 每次同时收集 5 只正常鼠尿作为平行对照组。样本置 -20℃ 保存。

3 兔抗弓形虫 IgG 的制备

按多点免疫法人工感染家兔, 获高价血清后, 用 LKB 层析柱 DE-52 提取弓形虫 IgG 其效价为 1:40 000。

4 试剂

酶标 SPA 购自上海生物制品研究所。DAB 进口分装。硝酸纤维薄膜(NC, 系上海医药工业研究院产品)。

5 SPA-ELISA 法

分别用冰冻保存的尿液样本、兔抗弓形虫 IgG、酶标 SPA 各种稀释度及孵育的温度和时间的反复试验, 最后确定以下实验条件及方法: 以 1:1 稀释的样本 1 μ l 点于硝酸纤维薄膜上, 在空气中干燥 2 h, 置 0.3% BSA、37℃ 封闭 1 h, 再置兔抗弓形虫 IgG 1:100 稀释液中, 37℃ 孵育 1 h, 冲洗后置酶标 SPA 1:40 稀释液中, 37℃ 孵育 30 min, 以 1:1 000 DAB 显色。结果判读: 以显示棕色斑点的为阳性, 对照组不显色。

结 果

轻度感染组、中度感染组和重度感染组各 3 组均检获循环抗原。感染虫体数量越多, 循环抗原测出的时间越早。感染鼠于 d_3 出现竖毛与不活泼等症状; 轻度感染组与中度感染组 d_4 症状加重, d_6 全部死亡, 其中重度感染组 d_5 全部死亡。循环抗原测出的时间与小鼠急性发病时间及症状轻重相平

行,表明检测血清中弓形虫循环抗原具有反映宿主急性感染期的价值。

SPA-ELISA 实验结果: 轻度感染组和中度感染组分别于感染后 d_6 和 $d_3 \sim d_6$ 均显示棕色阳性斑点; 重度感染组接种后大部分鼠均先后死亡, 唯一 d_4 的 1 份样本显示棕色阳性斑点。正常对照组鼠尿不显色。弓形虫感染鼠腹水上清液在感染 d_1 即显示淡棕色阳性斑点, 在 $d_2 \sim d_4$ 均显示较深的棕色阳性斑点; 2 只正常鼠腹水不显色。

讨 论

Acebes 等^[7]曾分别检测弓形虫感染者血清中的弓形虫抗体 IgM、IgG、弓形虫循环抗原 (TCA) 和免疫复合物 (IC), 以区分急性与慢性弓形虫病。结果在高抗体滴度 IgM 组可以 100% 测出 TCA 和 IC, 在亚急性和慢性感染组, 以 IgG 占优势为 100%。表明 TCA 是急性弓形虫病的主要标志。不同弓形虫株感染鼠血清, TCA 出现的时间可以有迟早。Lee 等^[8]的研究表明, RH 株感染后, TCA 出现较早, 为感染后 d_2 。Beverley 株出现于感染后 d_6 。TCA 在血清中有一定的消长规律。郭小华等^[9]在实验动物中, 64.7% 于感染后 d_1 血清中即测到 TCA, $d_{10} \sim d_{13}$ 达高峰, $d_{60} \sim d_{90}$ 消失。进一步证实了 TCA 出现于感染的早期。

Huskinson 等^[5]首次报告用 ELISA 在弓形虫感染鼠的尿液 d_3 中检测到 TCA, 本文作者 (1993 年) 曾用不同数量的 RH 株弓形虫速殖子接种 3 组小鼠, 取得轻度、中度和重度感染动物, 然后用经过改良的 ELISA 检测弓形虫感染鼠尿液中的 TCA, 结果轻度、中度和重度感染组分别于感染后 d_5 、 d_4 、 d_3 均检测出 TCA; 中度与重度感染组测出 TCA 的时间分别比 Huskinson 早了 1 d 和 2 d。为了探索 1 种更灵敏与更简便的检测 TCA 的方法, 本实验采用酶标金葡萄 A 蛋白作第二抗体的 dot-ELISA 法检测, 结果轻度与中度感染组分别于感染后 d_6 、 d_4 检测出了 TCA, 检测出的时间基本与原用改良的 ELISA 相同。

斑点酶免疫吸附试验为近 10 年来在酶联免疫吸附试验基础上发展的 1 种检测方法, 利用硝酸纤维薄膜 (NCS) 对抗原与抗体蛋白质有较强的吸附作用, 可与血清等样本内的抗体或抗原形成固相免疫复合物, 而后用酶标记的相应配基显示对应物的

存在。Hawkes 等^[10]首先采用 NCS 为固相载体替代聚苯乙烯反映板筛选单克隆抗体, 鉴于比常规 ELISA 法特异、灵敏而简便, 且取材量少, 故国内外迅速发展推广应用于细菌、病毒和寄生虫病的抗原和抗体检测。

斑点酶免疫吸附试验的原理和操作流程与常规 ELISA 基本相同, 根据固相包被的配基, 而可用于检测特异循环抗原或抗体, 并已有多种改良方法。本文的 SPA-ELISA, 是根据金葡萄蛋白 A 可与人及多种哺乳动物的 IgG 结合的原理, 用辣根过氧化物酶标记金葡萄 A 蛋白 (SPA) 替代 ELISA 法中的二抗结合物, 用 dot-ELISA 法检测鼠尿中的 TCA。

本文实验结果证实, 用 SPA-ELISA 法检测弓形虫感染鼠尿中的 TCA, 具有与 ELISA 法相似的敏感性, 而操作步骤却更简便, 不需昂贵的设备, 且可快速目测结果。用尿液作标本检测, 具有取材方便、无损伤、无痛苦及易为受检者接受的优点。因此, SPA-ELISA 法检测尿中的 TCA, 不仅是一种早期诊断弓形虫病的方法, 也适合于流行病学调查, 人群的大规模普查与筛选弓形虫病感染者。

参 考 文 献

- [1] Raizman RE, Neva FA. Detection of circulating antigen in acute experimental infections with *Toxoplasma gondii*. J Infect Dis, 1975, 132(1):44.
- [2] Van Knapen F, Panggabean SO. Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol, 1977, 6:545.
- [3] Araujo FG, Remington S. Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. J Infect Dis, 1980, 141:144.
- [4] Brooks RG, Sharma SD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol, 1985, 21:113.
- [5] Huskinson J, Stepick Bielski PN, Remington J. Detection of antigens in urine in acute toxoplasmosis. J Clin Microbiol, 1989, 27:1099.
- [6] 金武官, 杨惠珍, 姜昌斌, 等. 弓形虫感染鼠尿中弓形虫循环抗原的检测. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1993, 11:60~62.
- [7] Acebes-MV, Diez-B, Nicolas-R. Serological parameters for the diagnosis and follow-up of toxoplasmosis. Experimental models. Enferm? Infec Microbiol Clin, 1994, 12:141~145.
- [8] Lee-YH, Kim-KY, Kang-MS, et al. Detection of *Toxoplasma* antigens and antibodies in mice infected with different strains of *Toxoplasma gondii*. Korean J Parasitol, 1995, 33:201~210.
- [9] 郭小华, 陈观今, 徐秉强, 等. 实验弓形虫感染弓形虫循环抗原的检测研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1991, 9:178~181.
- [10] Hawkes R, Niday E, Gordon J, et al. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal Biochem, 1982, 119:142.

DETECTON OF CIRCULATING ANTIGEN IN URINE FROM MICE INFECTED WITH *TOXOPLASMA* TACHYZOITES BY SPA-ELISA

JIN Wu-guan¹, LI Yun-zhu¹, YU Shan-cang¹, YANG Hui-zheng²

(1 Department of pediatric Medicine, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025,

2 Department of Parasitology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025)

Abstract [Objective] To explore a simple and convenient immunoassay for early diagnosis of *Toxoplasma* infection. **[Methods]** Urine samples collected from three groups of mice infected with different doses of tachyzoites were detected for *Toxoplasma* circulating antigen (TCA) by dot-ELISA using HRP-SPA as a second antibody (SPA-ELISA). **[Results]** *Toxoplasma* circulating antigens were detected in all three groups of infected mice in contrast with the normal control group. *Toxoplasma* circulating antigen was detected on d₆ and d₃ after infection in mice of light- and moderate-infection groups, respectively. **[Conclusion]** SPA-ELISA is a simple and convenient method for early immunodiagnosis of recent *Toxoplasma* infection.

Key Words: *Toxoplasma*, circulating antigen, SPA-ELISA, mouse urine.