

文章编号: 1000-7423(2002)-06-0378-01

DIGFA 和 SPA-ELISA 检测弓形虫特异性抗体

任金华¹ 曹建平² 仇锦波³ 陈盛霞³

中图分类号: R382.5

文献标识码: A

弓形虫病的临床表现常因侵犯脏器的不同而异,几乎涉及内、外、妇、儿、眼、耳鼻喉、神经精神、传染病、肿瘤等各个学科^[1]。弓形虫感染的快速检测具有重要意义。本文采用斑点金免疫渗滤试验(dot immunogold filtration assay, DIGFA)和葡萄球菌 A 蛋白(SPA)-ELISA 检测弓形虫感染者血清中的特异抗体(IgG),寻找操作更简便、快速、可靠的检测弓形虫感染的方法。

1 材料与方法

1.1 血清采集 65 份弓形虫感染者血清均经临床和免疫学检查^[2]确诊为弓形虫感染者,年龄 3~53 岁。乙型肝炎患者血清 60 份,年龄 8~59 岁。此外,急性日本血吸虫病患者血清 30 份,并殖吸虫病患者血清 6 份,姜片虫感染者血清 30 份,30 份大学新生体检血清作为对照。阴性和阳性对照血清分别采用 IHA 检测抗体滴度 $\leq 1:4$ 的阴性血清和滴度 $\geq 1:1024$ 的阳性血清各 30 份等量混合而成^[3]。

1.2 弓形虫抗原制备 弓形虫 RH 株速殖子可溶性抗原按文献方法^[4]制备,置 -70°C 保存备用。

1.3 DIGFA 胶体金制备、标记和纯化按文献方法^[4]进行。DIGFA^[5]检测装置为一镶嵌有混合纤维素膜的塑料小盒,内有吸水垫料,外有过滤装置。基本过程包括抗原包被、加样、免疫金染色和洗涤液冲洗等步骤。弓形虫可溶性抗原蛋白浓度为 0.4 mg/ml ,点加 $1\ \mu\text{l}$ 于 $0.45\ \mu\text{m}$ 孔径^[6]硝酸纤维素膜(NC 膜,浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂), 37°C 致敏 $30\ \text{min}$,吹干后用含 1% 牛血清白蛋白的 $\text{pH}\ 7.4$ 、 $0.05\ \text{mol/L}$ PBS 封闭 $30\ \text{min}$,再用 PBS 洗涤 3 次,干燥后装入测定小盒。测定时,先用 $200\ \mu\text{l}$ PBS 湿润,滴加 $100\ \mu\text{l}$ 待检血清($1:10$ 稀释),再滴加 $100\ \mu\text{l}$ SPA-胶体金,待渗入后滴加双蒸水数滴洗涤至背景清晰。阳性结果在反应孔中央出现紫红色或红色斑点,斑点形状与抗原包被的形状相同,洗涤液冲洗不褪色;阴性结果为无明显颜色变化。每组实验均设阳性对照和阴性对照。

1.4 SPA-ELISA 经多次试验,确定以 $2.5\ \mu\text{g/ml}$ 弓形虫抗原包板, 4°C 过夜。洗涤后参照仇锦波等^[1,7,8]方法操作和阳性判断。被检血清 $1:200$ 稀释,辣根过氧化物酶(HRP)标记的冻干 SPA(上海生物制品研究所)工作浓度为 $1:40$,底物为 TMB,加 $2\ \text{mol/L}$ H_2SO_4 终止反应后,测定 OD_{490} 值。

1.5 常规 ELISA 和间接血凝试验(IHA) 按文献^[1,3]方法。

HRP 标记羊抗人 IgG 和 OPD 均为 Sigma 产品。

1.6 统计学处理 采用 χ^2 检验比较有关检验组的差异。

2 结果

2.1 敏感性和特异性 DIGFA 和 SPA-ELISA 检测 65 份弓形虫感染者血清,阳性率分别为 95.4% ($62/65$)和 96.9% ($63/65$),两者无显著性差异($P>0.05$)。检测 30 份体检者血清均为阴性。急性日本血吸虫病患者、并殖吸虫病患者和姜片虫感染者血清阳性率分别为 6.7% ($2/30$)、 0.0 。出现阳性反应者为相同的 2 份血清,常规 ELISA 和 IHA 检测显示其中 1 位患者均为阳性,表明为弓形虫感染者(IHA 滴度 $1:64$)。

2.2 重复性和稳定性 从 65 份弓形虫感染者和 30 份体检者血清中各随机选出 10 份,用两法检测特异性抗体,分别测定同一批次包被和不同的 3 个批次包被的抗原,共重复 3 次,结果相符。

2.3 乙型肝炎患者血清的检测 用两法检测乙型肝炎患者血清中弓形虫特异性抗体,阳性率分别是 13.3% ($8/60$)和 11.7% ($7/60$),两者差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

本研究采用弓形虫可溶性抗原作为包被抗原,应用自制的胶体金探针建立 DIGFA,通过对弓形虫感染血清和其它对照血清的检测表明,该法检测弓形虫特异抗体的敏感性和特异性与先前建立的 SPA ELISA 和常规 ELISA 相似。乙型肝炎患者可能由于细胞免疫和体液免疫功能下降,致使弓形虫感染率升高。DIGFA 与 ELISA 相比,有简便、快速、且无需专门仪器设备等优点,适合在基层医疗单位应用及单份检测。

参 考 文 献

- [1] 徐会娟,曹建平,仇锦波. SPA-ELISA 检测弓形虫感染者血清特异性抗体和循环抗原研究[J]. 镇江医学院学报, 2000, 10: 431-433.
- [2] 甘绍伯. 弓形虫病诊断标准[J]. 地方病通报, 2001, 16: 88.
- [3] 郑振世,吕翔,曹建平,等. 眼疾患者弓形虫感染的初步调查[J]. 中国实用眼科杂志, 1996, 7: 425-426.
- [4] 蔡文琴. 免疫金染色[A]. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[C]. 第 1 版. 成都: 四川科学技术出版社, 1994: 98-120.
- [5] 兰小鹏,黄俏佳,涂向东,等. 快速斑点免疫金渗滤试验法检测双链 DNA 抗体[J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30: 49-50.
- [6] Huang Q, Lan X, Tong Y, et al. Dot-immunogold filtration assay as a screening test for syphilis[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34: 2011-2013.
- [7] 仇锦波,邵英远,傅行礼,等. 免疫诊断技术用于姜片虫病流行病学调查的研究 II. 快速 SPA-ELISA 用于实验诊断及疗效考核[J]. 实用寄生虫病杂志, 1994; 2: 28-30.
- [8] 仇锦波,邵英远,傅行礼,等. 快速 SPA-ELISA 法检测姜片虫病患者血清抗体的动态学研究[J]. 镇江医学院学报, 1994; 4: 4-5.

(收稿日期: 2002-11-26 编辑: 庄兆农)

作者单位: 1 江苏省丹阳市人民医院传染科, 丹阳 212300;
2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025;
3 江苏大学医学技术学院病原生物学教研室, 镇江 212001