DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.05.011

尿素溶解性抗原用于ELISA诊断旋毛虫病的初步研究

张津利 赖福春 （寄生虫学教研室）

提 要 文本报告了旋毛虫感染期幼虫虫体尿素溶解性抗原的提取及其用于ELISA诊断旋毛虫病的效果。ELISA检测24例旋毛虫病人血清IgG和12例病人滤纸干血滴IgG，阳性率均为91.67%（22/24和11/12），21例病人血清IgM，阳性率为95.24%（20/21），对日本血吸虫病人血清作IgG和IgM检测时均有一定的交叉反应，而感染其它几种寄生虫的小鼠血清无交叉反应。

本实验结果表明尿素溶解性抗原用于ELISA诊断旋毛虫病具有较高的敏感性、特异性和好的重复性，是一种具有实用价值和经济价值的诊断抗原。

关键词 旋毛虫病；酶联免疫吸附测定；免疫酶技术；抗原；旋毛虫

旋毛虫病近年在我国有增加的趋势，以腓肠肌活检为主的确诊方法有很大的局限性，因此免疫学诊断是近年研究的重点。ELISA已经成为较常用的方法，但以往所用旋毛虫幼虫水溶性抗原制备过程中，有大量非水溶性成份被弃，其中可能还含有具有较强免疫原性和诊断价值的成份，本文将这部份非水溶性物质用尿素溶解后再次提取，比较了尿素溶解性抗原和水溶解性抗原用于ELISA诊断旋毛虫病的效果，并对小鼠感染不同数量旋毛虫后的抗体动态进行了观察。

材料和方法

一、旋毛虫抗原制备

旋毛虫幼虫经消化法从受染大鼠获取，滤去肉渣后，经20%～30%～40%聚蔗糖不连续梯度离心，120×g，15'[1]，取集中于30%层中幼虫用PBS清洗，超声粉碎100W，15'（间歇），加0.02%硫柳汞置4℃冷浸72h，超速离心45000×g，4℃1h[2]，上清即为旋毛虫幼虫水溶性抗原。离心后的沉渣再用少量8mol尿素缓冲液溶解，超声粉碎100W，10'（间歇），用该缓冲液稀释至1:50（W/V），4℃冷浸72h，按1:1（V/V）加入预冷的正丁醇，室温搅拌30'，离心45000×g，4℃30'，将尿素溶解物用蒸馏水4℃下透析72h[3]，即得旋毛虫幼虫尿素溶解性抗原。经方阵滴定，尿素溶解性和水溶性抗原检测人、鼠血清抗体的最适包被量分别为30μg/ml，25μg/ml和25μg/ml，10μg/ml。

二、酶结合物

HRP标记猪抗鼠IgG（本校免疫室提供，批号860901）和羊抗人IgG、IgM（军事医学科学院微生物流行病研究所生产，批号871101），3种酶标抗体的工作浓度分别为1:4000，1:1000，1:1000（用于尿素溶解性抗原）和1:8000，1:2000，1:2000（用于水溶性抗原）。

三、待检标本

1.旋毛虫病人血清24份，均经腓肠肌活检或对所吃剩的猪肉镜检证实有旋毛虫幼虫，并结合临床症状确诊的病人。2.正常人血清40份，采自重庆市健康献血员。3.日本血吸虫病人血清28份，取自粪检阳性或间接血凝试验阳性的病人。4.正常BALB/C小鼠血清40份；感染旋毛虫幼虫各100，300，600条的BALB/C小鼠不同时相的血清。5.感染日本血吸虫、犬钩虫幼虫、约氏疟原虫的BALB/C小鼠血清。

四、实验方法

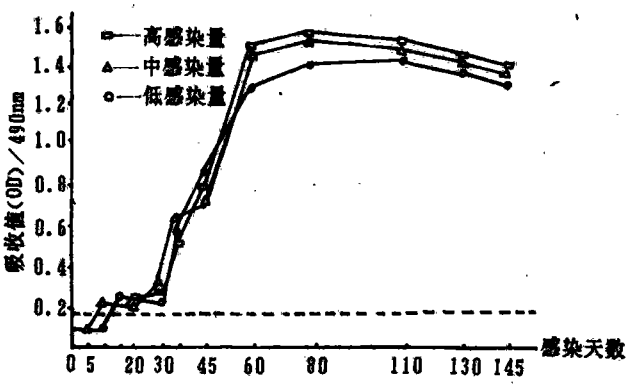
基本按ELISA间接法常规操作[4]，血清稀释液为含0.05%吐温－20和2%绵羊血清的PBS（PH 7.4，0.01mol），每孔加样0.1ml，每步反应2h，37℃，中间洗涤3'×3次。用GX M202型酶标比色计（四川分析仪器厂产品）测定OD_{490}值，将每份标本复孔均值按公式校正，每块板均设标准阳性、阴性和空白对照。算出30份正常小鼠和30份正常人血清的OD均值$\bar{X}$和标准差SD，以大于（$\bar{X}$+3SD）为抗体阳性。

结 果

一、方法学检验

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（一）特异性试验：1、吸收试验：对用2种抗原吸收和未吸收的小鼠阳性血清分别进行ELISA检测，结果吸收后的血清效价（均为1∶80）比未吸收的对照血清效价（均为1∶1280）下降16倍，吸收百分率大于50%。2、交叉反应：小鼠感染日本血吸虫、犬钩虫幼虫和约氏疟原虫的血清分别为10、8、8份，用2种抗原检测全部为阴性。日本血吸虫病人血清交叉反应率见表2。



附图 感染旋毛虫小鼠抗体动态（尿素溶解性抗原检测结果）

（二）重复性试验：2种抗原对小鼠标准阳性血清1∶10，1∶100，1∶1000 3个浓度各重复10孔（批内变异）作连续3天（批间变异）的ELISA检测，结果批内和批间变异系数均小于10%，表明本实验的重复性较好。

二、小鼠感染旋毛虫后的抗体动态（表1，附图）

表1中感染100，300，600条幼虫的3组小鼠，后两组先于第1组5天在第10天出现阳性反应，25天以前阳性率均高于第1组，2组和3组的阳性率在第15天和20天有显著性差异（$P<0.05$）。

三、旋毛虫病人血清检测（表2）

讨　论

ELISA是目前旋毛虫病免疫诊断常用的方法，所用抗原多为旋毛虫幼虫虫体水溶性抗原[2][6][4][7]，提取该抗原过程中，在吸取上清后常有大量沉渣被弃，其中可能含有

表1　小鼠感染不同数量旋毛虫后的抗体动态

感染时间（天）	100条			300条			600条		
	例数	阳性数	阳性率%	例数	阳性数	阳性率%	例数	阳性数	阳性率%
5	20	0	0	20	0	0	20	0	0
10	20	0	0	20	4	20	20	4	20
15	20	2	10	20	6	30	20	8	40
20	20	9	45	20	14	70	17	14	82
25	20	14	70	20	18	90	10	10	100
30	10	10	100	7	7	100	ND	—	—
35	20	20	100	15	15	100	10	10	100

注：①本表为尿素溶解性抗原检测结果，阳性标准为OD＞0.18。
②45天以后阳性率均为100%，未列出。ND即未作。

表2　ELISA法2种抗原检测病人血清结果

组别		水溶性抗原					尿素溶解性抗原				
		例	阳性%	OD范围	$\overline{OD}$	SD	例	阳性%	OD范围	$\overline{OD}$	SD
IgG	旋毛虫病人血清	24	91.67	0.298～1.628	0.612	0.315	24	91.67	0.263～1.211	0.522	0.239
	旋毛虫病人滤纸血	12	100	0.290～1.155	0.536	0.255	12	91.67	0.277～1.139	0.464	0.253
	日本血吸虫病人血清	28	25	0.276～0.613	0.386	0.113	28	10.71	0.313～0.857	0.503	0.25$_1$
IgM	旋毛虫病病人血清	21	95.24	0.459～1.392	0.888	0.231	21	95.24	0.401～1.611	0.932	0.293
	日本血吸虫病人血清	28	25	0.496～0.861	0.634	0.160	28	14.29	0.389～0.696	0.573	0.113

注：水溶性抗原和尿素溶解性抗原检测IgG、IgM的判阳标准分别为＞0.266、＞0.378和＞0.258、＞0.388

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一些具有诊断价值的成份，这无疑是很大的损失。Tsang等及其他学者[3][8]报道了几种吸虫尿素溶解性抗原的提取，这种抗原用于ELISA作免疫诊断时，效果比水溶性抗原好或与之相似，目前尚未见这种抗原提取技术用于线虫的报道。本实验参考文献方法[3]，提取了旋虫毛虫幼虫尿素溶解性抗原，该抗原检测病人血清IgG、IgM和滤纸血IgG时，具有与水溶性抗原相似的效果，阳性率均在90%以上，结合方法学检验的结果，说明该抗原具有较高的敏感性、特异性和好的重复性，它含有具有诊断价值的特异性成份，其制备扩大了抗原获取量，制备方法简单，是1种具有实用价值和经济价值的诊断抗原。

旋毛虫病的早期诊断是1个尚待解决的问题。本实验结果说明，小鼠感染旋毛虫后第10天可检出抗体，阳性率随感染时间的延长而增高，至30天各组均达100%。人一般于感染旋毛虫2～3周后出现明显症状，作者在云南大理旋毛虫病流行区的观察，感染后15～25天就诊人数最多，本文中13例大理病人全部阳性，其中4例感染38天，6例33天，另外3例分别为15、19和23天。因此，根据动物试验和人体试验的结果，似乎可以认为尿素溶解性抗原作ELISA可用于较早期旋毛虫病人的诊断。

本实验参考文献资料[1]，用聚蔗糖梯度离心法纯化旋毛虫幼虫，取得较满意效果。该法能同时纯化大量幼虫，纯化效果好，操作简便，聚蔗糖对幼虫抗原性没有影响，值得推广。

旋毛虫与曼氏、埃及血吸虫有共同的抗原成份[9]，与日本血吸虫的交叉反应是否特异性的尚未定论[10][11]。本实验中旋毛虫抗原与感染日本血吸虫的小鼠血清无交叉反应，而与日本血吸虫病人血清有一定的交叉反应，是否为特异性的有待进一步阐明。

对小鼠感染旋毛虫后抗体水平的动态观察结果，丰富了旋毛虫抗体应答方面的资料。对于旋毛虫病人IgM的检测初步证明它可为旋毛虫病人作早期辅助诊断。本实验结果还表明，滤纸血可以取得和血清一样的检测效果，将这种简便易行的采血方法用于旋毛虫病人血标本收集是可行的。

（本文工作中得到本室陈志强同志及云南大理康复医院江木生医师、大理医学院寄生虫学教研室杨毅梅、杜伟等同志的帮助，大理州血防所傅丽芳及四川省寄研所王秀珍同志提供部份血吸虫和旋毛虫病人血清，特此致谢。）

参考文献

1. Bartelmez SH, et al. Antigen-mediated release of eosinophil growth stimulating factor from Trichinella spiralis sensitized spleen cells: a comparison of Trichinella spiralis stage-specific antigen preparations. Immunology 1982; 45:605
2. Ruitenberg EJ, et al. Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in conventionally raised pigs. J Immunol Method 1976;10:67
3. 方　磊，等。斯氏狸殖吸虫尿素溶解性抗原的分离提取。第四军医大学学报 1987；8(6)：388
4. 余濒，等。临床免疫技术。第1版。上海：上海科学技术出版社，1982：201～224
5. Knapen PV, et al. Detection of specific immunoglobulins(IgG,IgM,IgA,IgE) and total IgE levels in human trichinosis by means of the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Am J Trop Med Hyg 1983; 31(5):973
6. Ruitenberg EJ, et al. Serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assay. Bull WHO 1974;51:108
7. 杨洪模，等。ELISA法诊断轻型旋毛虫病。寄生虫学与寄生虫病杂志 1986；4(4)：229
8. Tsang VCW, et al. Systematic fractionation of Schistosoma mansoni urea-soluble egg antigens and their evaluation

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

by the single-tube kinetic-dependent enzyme-linked immunosorbent assay(K-ELISA). J Parasitol 1981; 67(3):340

9. Aronstein WS, et al. Molecular identity of a major antigen of Schistosoma mansoni which cross-reacts with Trichinella spiralis and Fasciola hepatica. Parasitol 1986; 92(1):133

10.沈汉馨，等。应用ELISA法检测旋毛虫病人血清抗体。免疫学杂志1988；4(3)：205

11.陈雅棠，等。酶联免疫吸附试验、间接荧光抗体试验、间接过氧化物酶染色试验诊断人体旋毛虫病的初步研究。 重庆医科大学学报 1986；11(2)：87

(收稿：1988.11.8；修回：1989.7.5)

Preliminary Study of Immunodiagnosis of Trichinosis by ELISA Using Urea Soluble Antigen of Trichinella spiralis

Zhang Jinli and Lai Fuchun (Department of Parasitology, Third Military Medical College)

Urea soluble antigens of Trichinella spiralis infective larva were prepared and the efficiency of the antigens in diagnosis of trichinosis by ELISA are studied. Specific IgG antibodies are detected by ELISA using urea soluble antigens in 91.67%(22/24) of 24 sera and 91.67% (11/12)of 12 blood spots of filter paper of patients of trichinosis. Specific IgM antibodies are seen in 95.24%(20/21) of 21 sera of patients using the antigens. Sera of patients infected with Schistosoma japonicum have some cross reactions on the antigens. Sera from mice infected with Schistosoma japonicum, Ancyclostoma caninum larva, and Plasmodium yoelii are negative. The urea soluble antigen has a relatively high sensitivity, specificity and good reproducibility in diagnosis of trichinoisis by ELISA, and has a practical and economic value.

Key words: trichinosis/DI; ELISA(=enzyme-linked immunosorbent assay); immunoenzyme technique; antigens; Trichinella sipralis

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net