

酶联免疫吸附试验间接法诊断华枝睾吸虫病的初步报告

济南市卫生防疫站 吕炳俊

酶联免疫吸附试验(ELISA)在临床及预防医学中受到重视[1、2]。而用于华枝睾吸虫病(肝吸虫)的血清诊断,目前尚未见有正式报道,为此我们对试验方法及条件做了研究,同时又在本病流行区现场应用于155例少年儿童,并以50例健康人群血清(粪检阴性)做对照,为考查ELISA的实际应用意义,用常规粪检和微量间接血凝方法[3],做为对照指标,现将方法与结果报告如下:

材料和方法

一、聚苯乙烯塑料板: 4×10 孔(上海科仪公司)。

二、辣根过氧化物酶Horseradish Peroxidase(HRP): 西德进口。

三、底物:

邻苯二胺ortho-Phenyene diamine(O PD)。

3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐3,3'-Diamino benzidine.HCl(DAB)。

邻联甲苯胺ortho-Tolidine(OT)

四、羊抗人IgG、羊抗兔IgG: 按常规法制备,以硫酸铵盐析三次,并以 Sephadex G₂₀₀胶滤纯化。

五、HRP标记: 采用戊二醛两步法[4],用羊抗人和羊抗兔IgG分别进行标记,并对结合物效价进行检测,本试验报告结合物效价羊抗人1:2,000,羊抗兔1:4,000,标记物配制后,以0.15M pH7.2 PBS(磷酸盐缓冲液)配制的60%甘油与标记物等量混合,-20°C保存。

六、底物系统试剂配制条件: 参考文献[5]。

七、肝吸虫抗原: 系采用实验家兔人工感

染肝吸虫病,剖杀收集虫体,提取虫体抗原,含氮量200微克/毫升,经透析处理应用(由山东省寄生虫病研究所提供)。

八、肝吸虫病流行区: 155例少年儿童调查用碘化钾漂浮法做了三次粪检,虫卵阳性者有34例,此外对50例健康人群也做了粪检,虫卵均为阴性。

九、肝吸虫感染家兔: 人工感染肝吸虫病兔6只粪检虫卵涂片检查均为阳性。健康兔4只碘化钾漂浮法虫卵检查均为阴性。

十、肝吸虫抗原及阳性参考血清效价检测:

1. 以0.05M pH9.6 NaHCO₃-Na₂CO₃缓冲液,将抗原做1:10~1:80不同倍比稀释,分别加入 4×10 孔聚苯乙烯板,每孔0.2毫升,于4°C湿盒包被过夜。

2. 次日取出,以0.02M pH7.2 PBS含0.05% Tween⁴⁰(PBS-Tween⁴⁰),洗涤处理3次,每次保留3~5分钟空干。

3. 将肝吸虫病阳性参考血清(血凝效价1:5,120)正常健康兔血清(血凝效价阴性)以PBS Tween⁴⁰做1:50~1:25600稀释,分别加入各排不同倍比抗原孔,每孔0.2毫升,放37°C保温箱2~3小时。

4. 按程序2洗涤三次空干,加入用PBS-Tween⁴⁰做1:4000稀释的羊抗兔酶标记结合物,每孔0.2毫升置37°C 2小时,再按程序2洗涤3次空干。

5. 加入酶底物溶液,每孔0.2毫升放置室温避光30分钟,判读结果,反应终止液为2M H₂SO₄每孔50微升。

十一、155例标本检测及健康人群对照:

1. 以0.05M pH9.6 NaHCO₃缓冲液将肝

吸虫抗原做1:40倍稀释，加入4×10孔聚苯乙烯板，每孔0.2毫升，4°C包被过夜。

2. 次日取出用PBS-Tween⁴⁰洗涤三次，每次保留3~5分钟，空干。

3. 流行区受检血清做1:100稀释，健康人群对照血清做1:50稀释，每孔0.2毫升（做为初筛滴度），阳性结果再做定量检测，于37°C保温2~3小时。

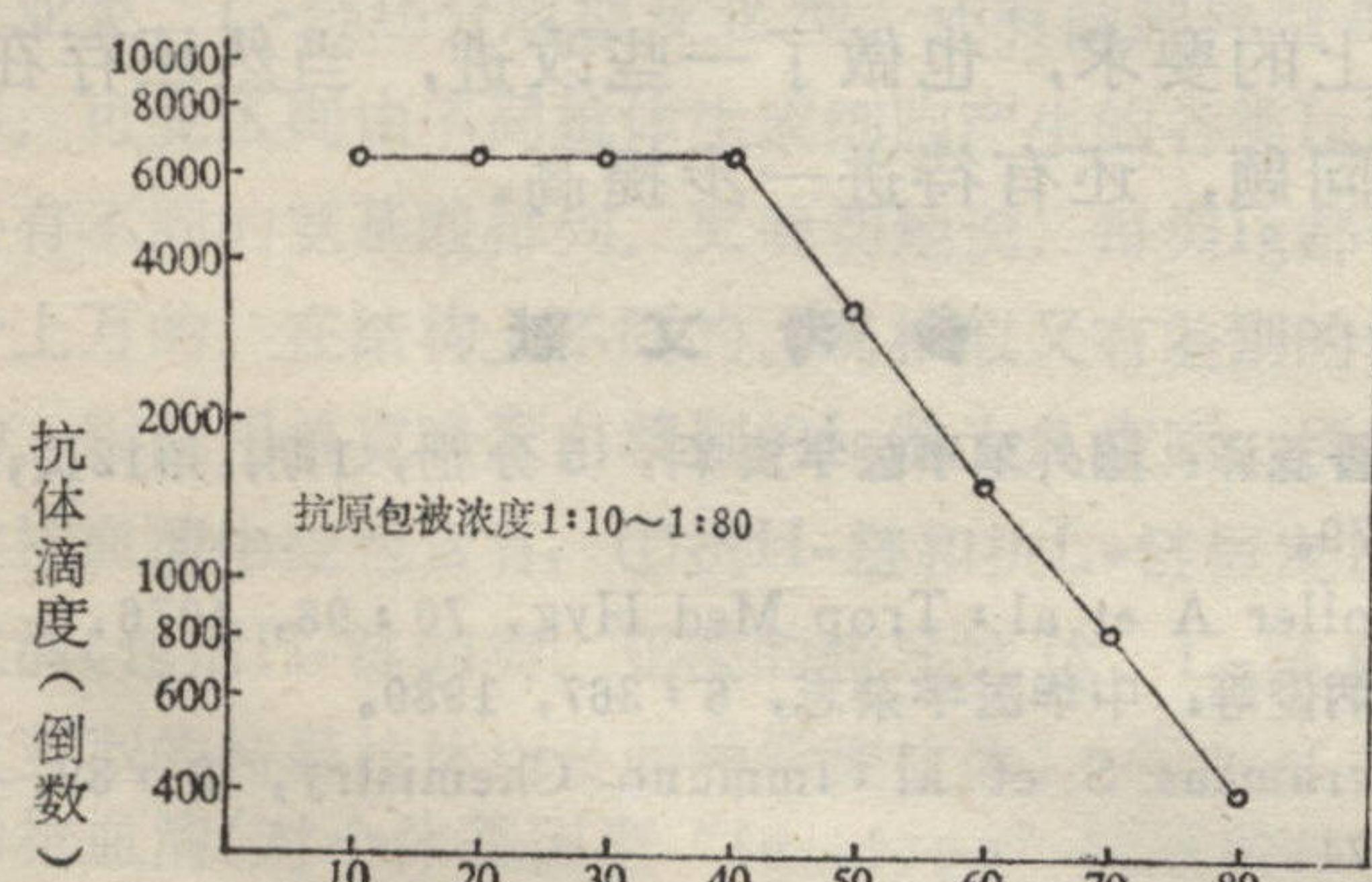
4. 按程序2洗涤三次空干，加入以PBS-Tween⁴⁰做1:2000稀释的羊抗人酶标记结合物，每孔0.2毫升于37°C2小时，洗涤三次空干，加入底物溶液每孔0.2毫升，放室温避光30分钟后，以2M H₂SO₄每孔50微升终止反应，判读结果。定量检查包被条件和试验方法同上，每板4×10孔做8份标本5个稀释度，每孔先加入0.1毫升pH7.4PBS-Tween⁴⁰，取已做1:50稀释的受检血清0.1毫升（加入第一排第一孔混匀，取出0.1毫升加入第二孔做对倍稀释至第5孔，稀释倍数分别为1:100~1:1600）。

5. 结果判读：目测根据色泽，以(+)号表示阳性强度。(+)微黄色，(++)黄色，(卅)深黄色，(#)桔黄色，阴性无色用(—)号表示。

结 果

一、以不同倍比肝吸虫抗原与肝吸虫病兔阳性参考血清和正常兔血清进行检测，抗原适宜包被效价为1:40，且阳性参考血清呈现最高滴度，对照血清为阴性反应，当抗原包被浓度低于1:40时，阳性血清滴度明显下降（附图）。

二、肝吸虫病兔阳性参考血清ELISA检



附图 华枝睾吸虫抗原适宜效价检测

测，目测结果血清稀释自1:100~1:25600，随着受检血清稀释度的增高，酶结合物与相应底物的色泽递减，阴性标本无色变；阳性与阴性结果有显著区别，阳性血清滴度在1:6400呈(++)，1:12800(+)。

三、155例标本检查：ELISA初筛滴度自1:100开始，其中阳性者占60例，对初筛阳性标本又做了定量检查，其中ELISA终点滴度在1:100者19例，1:200 16例，1:400 12例，1:800 10例，1:1600 3例，健康人群对照血清50例，有2例在1:50(+)为阳性，其余均为阴性结果，结果判读标准，目测以“十”号表示阳性。

四、ELISA和粪检、微量间接血凝结果对比，155例中ELISA阳性60例(38.7%)血凝阳性51例(32.9%)，粪检阳性34例(21.9%)，实验结果见表1。

表1 155例ELISA与粪检、血凝结果比较

ELISA	虫卵		血凝	
	+	-	+	-
+	34	26	48	12
-	0	95	3	92
符合数(%)	129	83.2%	140	90.3%
不符合数(%)	26	16.7%	15	9.37%

表2 ELISA及血凝滴度与虫卵阳性关系

ELISR	滴度	例数	虫卵阳性数	
			+	-
	1:100	19	6	
	1:200	16	5	
ELISR	1:400	12	11	
	1:800	10	9	
	1:1600	3	3	
	1:4	8	2	
	1:8	4	0	
	1:16	5	3	
血凝	1:32	7	6	
	1:64	3	1	
	1:128	11	9	
	1:256	4	4	
	1:512	9	9	

在155例受检标本中酶标与粪检两种方法均呈阳性者34例，均呈阴性者95例，其符合率为83.25%，无一例粪检阳性而酶标阴性，从

而说明本方法无假阴性反应。

在实验中对ELISA终点滴度和粪检阳性关系可以看出，血清滴度愈高，虫卵检出阳性率也高，这和血凝试验结果具有相关性，但由于ELISA具有较高的敏感性，因此，阳性标本血清滴度明显高于血凝方法，实验结果见表2。

讨论与结语

一、肝吸虫病是一种地方性疾病，在诊断上主要依靠粪检虫卵，检出效果低，特别对感染度轻的病例极易漏诊。近年来，随着免疫学工作的进展，从而为本病的诊断也相继建立了一些新方法，如皮变反应，间接血凝等。这对提高工作效率和检出效果及流行病学调查，都有一定助益。用ELISA间接法做为肝吸虫病诊断，本文经现场有限人群测试，并以粪检虫卵、血凝试验做为对比，初步认为它具有较好的敏感性和特异性，且操作简便，对受检人群采取耳垂微量血液，较收集粪便易被接受。ELISA和粪检、血凝方法对比，其符合率分别为83.2%和90.3%，经统计学处理酶标与粪检 $\chi^2=24.02$, $P<0.001$ ，有非常显著性差异，酶标与血凝 $\chi^2=4.27$, $P<0.05$ 有显著性差异。此外我们也注意观察了本方法与人体常见寄生虫病如蛔虫、钩虫、鞭虫感染者各20例做ELISA未出现交叉反应，证明是特异的，本试验方法与其它吸虫类是否有交叉反应尚需要进一步研究。在大面积人群进行调查时，受检血清可以先做过筛检查，1:100阳性者做为粪检对象，具有一定意义，如此次对比调查，ELISA 1:100以上阳性有60例，其一次粪检阳性者为27例，在第二次粪检时又检出了7例。因此可以接受用ELISA 1:100做为粪检复试指标，此外我们也发现26例ELISA阳性而粪检三次均为阴性的结果，它们的滴度均在1:200以内，对本组结果可否视为假阳性反应，排除肝吸虫病，应慎重考虑，因ELISA是通过免疫学原理检测血清抗体，它可以较客观的反应机体受染状态，而粪检方法既有局限性，也有漏检的可能，当然尚有部分患者治疗

后病愈，血清抗体可维持一段时间，根据我们过去的观察，驱虫治疗病例，血凝抗体动态变化在半年内明显下降，至一年左右多数转阴，因此对ELISA阳性而粪检阴性的人群，排除和确诊肝吸虫病，要进行综合性分析和检查，并需在今后大量调查中积累资料进一步深入研究。

二、ELISA是一项新兴的血清学诊断方法，在实验技术上，抗原的纯度和包被条件十分重要，根据我们的实验结果，抗原包被含量在每0.2毫升内含1~10微克为好，为了有效的选择受检标本和标记抗体的最适稀释度，以保证实验中高度敏感性，对标记抗体要严格注意纯化和适宜效价检测，以排除非特异性干扰，对受检血清微量稀释我们应用血红蛋白吸管取血清10微升加入1毫升PBS-Tween 40做1:100稀释，为初筛检查。定量检查可于凹孔内进行稀释，经与原法相比效果一致，在底物选择上，比我们曾分别对邻苯二胺，邻联甲苯胺，3.3-二胺基联苯胺四盐酸盐分别做了对比应用，实验结果表明，邻苯二胺具有较好的敏感性和稳定性，试剂配制方法，阴、阳性结果有明显色泽区别，本底无色。邻联甲苯胺对光和热极为敏感，在室温略高时容易有色变，弱阳性和阴性难以区别，3.3-二胺基联苯胺配制复杂，溶解困难，在实际应用上受到限制，为此根据我们的实验观察，辣根过氧化物酶的底物，选用邻苯二胺是满意的。

由于ELISA是一项引介技术，目前国内尚未达到标准化，因此，对实验设备、标本微量稀释，结果判读，标记条件，底物选择等方面都还存在一些实际困难，我们根据实验技术上的要求，也做了一些改进，当然还存在一些问题，还有待进一步提高。

参 考 文 献

1. 陈香蕊译：国外军事医学资料，5分册，1期，第12页，1979。
2. Voller A et al : Trop Med Hyg, 70: 98, 1976.
3. 吕炳俊等：中华医学杂志，6: 367, 1980。
4. Avrameas S et al : Immuno Chemistry, 8: 89, 1971.
5. 中国医学科学院寄生虫病研究所：世界卫生组织赴中国ELISA讲学小组资料，1978。