

· 论 著 ·

基于 IgY 的 ELISA 用于囊尾蚴循环抗原的检测

刘 玉,王元伦,唐雨德

[摘要] **目的** 建立基于 IgY 的双抗体夹心 ELISA 用于囊尾蚴病的诊断。**方法** 制备并纯化抗囊尾蚴循环抗原(CA)卵黄抗体(IgY),建立以抗 CA 的 IgY 为捕获抗体,酶标记抗 CA 的单克隆抗体 1A₅ 为检测抗体的双抗体夹心 ELISA 法,共检测样品 450 份,并与捕获抗体和检测抗体均为单克隆抗体的 ELISA 法比较,验证方法的敏感性、特异性与实用性。**结果** 成功制备并鉴定了特异性 IgY 抗体,建立了基于 IgY 的双抗体夹心 ELISA 检测体系。IgY-ELISA 和双单抗-ELISA 检测囊尾蚴 CA 的灵敏度分别为 8.3 μg/L 和 13.9 μg/L。IgY-ELISA 检测囊尾蚴病患者血清与脑脊液的 CA 阳性率分别为 100% (139/139) 与 89.5% (17/19),囊尾蚴病猪血清的阳性率 100% (222/222),健康人与健康猪血清的阴性率为 100%。**结论** 建立的基于 IgY 的双抗体夹心 ELISA 检测囊尾蚴 CA 用于囊尾蚴病诊断,具有较高的特异性和敏感性,可用于囊尾蚴病的辅助诊断。

[关键词] 囊尾蚴病;IgY;循环抗原;双抗体夹心酶联免疫吸附实验

[中图分类号] R383.34 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.02.012

Detecting the circulating antigen(CA) of *Taenia solium* cysticercosis with specific egg yolk antibody(IgY) by sandwich ELISA

LIU Yu, WANG Yuan-lun, TANG Yu-de. Center for Disease Control and Prevention of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To develop a sensitive and specific double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect circulating antigen (CA) of *Taenia solium* cysticercosis with chicken egg yolk immunoglobulin antibodies (IgY). **Methods** Hens were subcutaneously immunized with CA and the crude IgY was extracted from egg yolk by water dilution method. A sandwich ELISA had been developed by purified IgY antibodies as capture antibody and monoclonal antibodies labeled with peroxidase as detecting antibody. The detection limits of CA were analyzed. The sera and cerebrospinal fluid of patients, the sera of healthy people, sick pigs and healthy pigs were detected in parallel by the established ELISA methods. Its sensitivity and specificity were evaluated by comparison with ELISA based monoclonal antibodies. **Results** The minimal detectable concentration of CA was 8.3 and 13.9 μg/ml by sandwich ELISA based IgY and monoclonal antibodies, respectively. The positive rates of samples from 139 patients, 19 cerebrospinal fluid of patients and 222 sick pigs were 100% (139/139), 89.5% (17/19) and 100% (222/222) by sandwich ELISA based IgY respectively. The negative rates of samples from 50 healthy people and 20 healthy pigs were 100%. **Conclusion** The novel double-antibody sandwich ELISA using anti-CA IgY appears to be sensitive and specific for detection the CA of *Taenia solium* cysticercosis. It is the promising assay for immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis.

[Key words] *Taenia solium* cysticercosis; egg yolk immunoglobulin antibody (IgY); circulating antigen; sandwich ELISA

囊尾蚴病是我国常见的寄生虫病,俗称囊虫病,其循环抗原(circulating antigen, CA)可以反映囊尾蚴在体内的存活状况^[1],可以用于囊尾蚴病的诊断与疗效考核^[2,3]。IgY 是特定抗原免疫产蛋母鸡后在鸡卵黄中形成的多克隆抗体,即卵黄抗体(immunoglobulin Y)。本文应用抗囊尾蚴 CA 的 IgY 和酶标记抗 CA 单克隆抗体 1A₅ 组合,建立一种新型双抗体夹心 ELISA 检测囊尾蚴 CA,以探讨 IgY 用于囊尾蚴病免疫诊断的可行性,现将结果报告如下。

作者单位: 210002 江苏南京,南京军区疾病预防控制中心
通讯作者: 唐雨德, E-mail: tangyude65@163.com

1 材料与方法

1.1 血清与抗体 经 CT 和药物治疗结合确诊的囊尾蚴病患者样品 158 份(其中血清 139 份,脑囊尾蚴病患者脑脊液 19 份),分别获自内蒙古通辽囊虫病医院、南京脑科医院、南京军区总医院和南京 454 医院;经剖检确诊的囊尾蚴病病猪血清 222 份,采自内蒙古兴安盟科右前旗;健康人血清 50 份,采自南京的健康体检人员;健康猪血清 20 份,采自江苏镇江某部队农场;3 份弓形虫病患者血清由济南军区军事医学研究所提供,8 份包虫病患者血清由新疆军区防疫队提供。抗囊尾蚴 CA 单克隆抗体 1A₅ 由

本课题组制备并保存^[4]。

1.2 囊尾蚴 CA 由课题组采用亲和层析法纯化^[3], -20 ℃ 保存;弓形虫与棘球蚴纯化抗原分别由济南军区军事医学研究所与新疆军区防疫队赠与。

1.3 抗囊尾蚴 CA-IgY 的制备与鉴定 取 500 μg CA 与等体积福氏完全佐剂乳化经翅下静脉注射 25 周龄来亨蛋鸡 10 只(首次剂量为 500 μg/只,加强剂量为 200 μg/只),每次间隔 10 d。首次免疫 7 d 后开始收集鸡蛋。用水稀释法提取 IgY^[5-6], -20 ℃ 保存备用。采用紫外吸收法测定纯化后 IgY 的浓度,并采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析其相对分子量和纯度,间接 ELISA 检测 IgY 的活性与特异性。

1.4 血清处理方法 采用 IC 沸浴法^[4]。

1.5 抗囊尾蚴 CA 单克隆抗体 1A₅ 的酶标记 采用简易过碘酸钠法^[4]标记辣根过氧化物酶(HRP), HRP 为 Sigma 公司产品。

1.6 IgY-ELISA 的方法建立 将 IgY 按常规包被 ELISA 反应孔中,洗板后,用 100 g/L 的脱脂奶粉液(或牛血清清蛋白)37 ℃ 封闭 2 h, PBS-T 液洗涤 3 次;加入已处理的待测标本 100 μl, 37 ℃ 温育 30 ~ 60 min 后, PBS-T 液洗涤 3 次;加入稀释好的 HRP-1A₅ 100 μl, 37 ℃ 温育 30 ~ 60 min, PBS-T 液洗涤 5 次,采用 TMB 显色方法,测定吸光值(A₄₅₀)。每板均设阳性对照和阴性对照,以 A 值 > 阴性对照的 2.1 倍作为阳性判定标准。通过正交试验来确定最佳检测条件,设立 4 个实验因素,每因素设 2 个水平,分别为 IgY 包被浓度、血清温育时间、酶标抗体浓度和加酶标抗体后温育时间。

1.7 方法的敏感性与特异性 用已建立的方法检测囊尾蚴病患者血清、脑脊液、病猪血清以及健康人与健康猪血清以及 3 份弓形虫病患者血清、8 份包虫病患者血清并与双单抗-ELISA^[4,7]比较,验证方法的敏感性、特异性与可行性。

2 结 果

2.1 抗囊尾蚴 CA-IgY 的鉴定 首次免疫后 10 d 卵黄内检测到有特异性抗囊尾蚴 CA-IgY,加强免疫后效价逐步上升,至 30 d,琼脂扩散效价达 1:128,并维持到 55 d。每枚蛋黄经提纯后可得到约 66.12 mg IgY,经 SDS-PAGE 分析,纯化后的 IgY 在约 65 ku 处和 25 ku 处可见 2 条清晰的条带,分别为 IgY 的重链和轻链(图 1)。间接 ELISA 显示 IgY 与囊尾蚴 CA 发生特异反应,ELISA 效价大于 10⁸,与棘球蚴抗原、弓形虫抗原反应的 ELISA 效价小于 10。

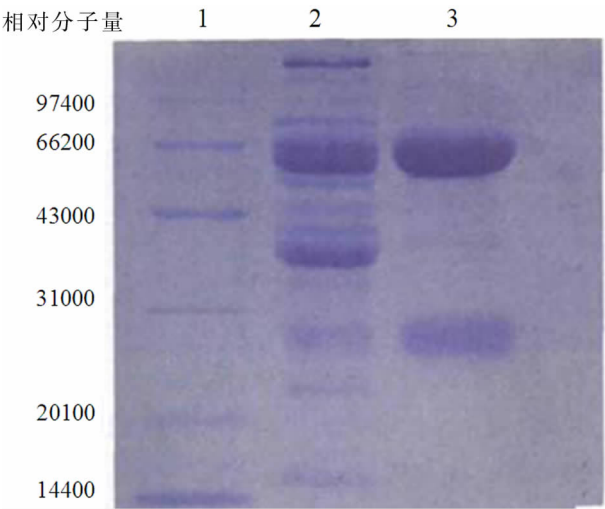


图 1 IgY 纯化前后 SDS-PAGE 分析
1:低分子量蛋白标志物;2:纯化前 IgY;3:纯化后 IgY

2.2 双抗体夹心 ELISA 方法的建立 经正交试验最终确定的检测条件为:IgY 包被浓度 1:1000、被检血清温育时间为 60 min;酶标记单抗浓度为 1:800,温育时间为 30 min。

2.3 灵敏度 IgY-ELISA 和双单抗-ELISA 检测囊尾蚴 CA 的灵敏度分别为 8.3 μg/L 和 13.9 μg/L。

2.4 方法的敏感性与特异性 应用 IgY-ELISA 和双单抗-ELISA 对 450 份样品检测结果比较,差异无统计学意义(P>0.05,表 1)。

表 1 基于 IgY 和双单抗的夹心 ELISA 检测结果比较

样本	n	IgY-ELISA 阳性数(%)	双单抗-ELISA 阳性数(%)
囊尾蚴病患者血清	139	139(100.0)	136(97.8)
脑囊尾蚴病患者脑脊液	19	17(89.5)	16(84.2)
健康人血清	50	0(0)	1(2.0)
囊尾蚴病猪血清	222	222(100.0)	222(100.0)
健康猪血清	20	0(0)	0(0)
弓形虫病患者血清	3	0(0)	0(0)
包虫病患者血清	8	0(0)	0(0)

3 讨 论

囊尾蚴 CA 的检测可作为疗效考核指标^[2-3]。建立高敏感性和特异性的 CA 检测方法是当前囊尾蚴病防治中亟待解决的问题之一。现有的囊尾蚴 CA 检测方法敏感性与特异性还有待提高,其原因是因为 CA 多为囊尾蚴的代谢分泌物,易受到机体免疫系统的清除,从而导致 CA 在患者血清中含量不高,独特型抗体的存在也能影响到循环抗原的检测^[8-9]。此外,囊尾蚴 CA 与棘球蚴抗原存在

严重的交叉反应^[9-10]。应用单克隆抗体作为检测系统,解决了特异性问题,但敏感性降低,而使用多克隆抗体作为检测系统,其特异性较差^[11]。

本实验利用 IgY 的优点^[5],制备出抗囊尾蚴 CA 的高效价 IgY 抗体,SDS-PAGE 与间接 ELISA 结果显示,纯化效果较好,可与 CA 发生特异反应,而与棘球蚴和弓形虫抗原不发生交叉反应。利用纯化的抗囊尾蚴 CA-IgY 作为捕获抗体、酶标记单抗 1A₅ 为检测抗体,建立了检测囊尾蚴 CA 的夹心 ELISA 法。其灵敏度为 8.3 μg/L,高于双单抗-ELISA 的 13.9 μg/L。从表 1 可知,IgY-ELISA 对 139 例囊尾蚴患者血清、19 例脑囊尾蚴患者脑脊液和 222 份囊尾蚴病猪血清进行检测,CA 阳性率分别为 100.0%、89.5% 和 100.0%,而双单抗-ELISA 的阳性率分别为 97.8%、84.2% 和 100.0%;对 50 份非疫区正常人与 20 份健康猪的血清检测,CA 阴性率均为 100%,而双单抗-ELISA 则分别为 98% 和 100.0%。两种方法对弓形虫病患者和包虫病患者血清检测,结果均为阴性。经统计学分析,IgY-ELISA 与双单抗-ELISA 的敏感性与特异性没有显著性差异,但前者的灵敏度似高于后者。

从理论上分析,本文所建立的检测方法采用多抗与单抗夹心的检测模式,多抗针对抗原的位点多^[12],用作捕捉抗体可以提高检测的敏感性;而单抗针对抗原的位点单一,用作检测抗体则可以提高检测的特异性^[13]。由于鸡与哺乳动物种系发生学关系较远,且 IgY 制备及纯化技术简单、成熟,卵黄中提取的 IgY 纯度高、含量大,将 IgY 应用于免疫诊断中,可减少假阳性的出现^[14],从而提高检测的敏感性与特异性。

【参考文献】

[1] Galan-Puchades MT, Fuentes MV. Diagnosis of human cysticercosis

- and *Taenia asiatica* [J]. Am J Trop Med Hyg, 2009, 81 (6) :1165.
- [2] Sciutto E, Hernandez M, Garcia G, et al. Diagnosis of porcine cysticercosis: A comparative study of serological tests for detection of circulating antigen and viable parasites [J]. Vet Parasitol, 2011, 78 (3) :185-194.
- [3] 顾志香,唐雨德,刘 玉,等.根据循环抗原检测结果进行囊尾蚴病的疗效考核[J].中国公共卫生,1999,15(11):62-64.
- [4] 刘 玉,唐雨德,顾志香,等.囊尾蚴病循环抗原酶联免疫检测试剂盒的研制[J].中国兽医学报,1999,19(5):471-476.
- [5] 李敏惠,邹 强,杨淑霞,等.鸡卵黄抗体 IgY 的分离纯化及鉴定[J].生物学杂志,2009,26(6):80-82.
- [6] 康亦兼,咸 漠,李文兴.水稀释法分离卵黄 IgY[J].吉林大学自然科学学报,2007,23(3):2245-2247.
- [7] 杨 楠,刘 玉.猪囊虫病循环抗原酶联免疫检测试剂盒的稳定性观察[J].东南国防医药,2004,6(5):257-258.
- [8] 潘丽红,王海民.囊尾蚴病免疫学诊断的研究进展[J].华北煤炭医学院学,2011,13(1):38-40.
- [9] 徐 鹏,张晓雷,赵权囊.囊虫病免疫诊断检测方法的研究进展[J].中国病原生物学杂志 2011,1(2):55-58.
- [10] DaSilva AD, Quagliato EM, Rossi CL, et al. Aqueous-titration enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *taenia solium* cysticerci [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 37(2):87-93.
- [11] Sato MO, Cavalcante TV, Sako Y, et al. Evidence and potential for transmission of human and swine *Taenia solium* cysticercosis in the Piracuruca region, Piauí, Brazil [J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 75 (5) :933-935.
- [12] 刘 玉,唐雨德,王 平,等.人源和猪源血清中囊虫循环抗原的免疫和理化性质比较[J].东南国防医药,2007,9(2):134-135.
- [13] Handali S, Klarman M, Gaspard AN, et al. Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for *taenia solium* cysticercosis and taeniasis [J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17 (1) :68-72.
- [14] 李旭旭,崔 晶,井丰军,等.抗旋毛虫肌幼虫 ES 抗原 IgY 的制备及鉴定[J].中国人兽共患病学报,2010,26(11):1028-1031.

(收稿日期:2012-12-20)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)