

弓形虫病免疫学与分子生物学 诊断方法研究进展

邓汝芳

云南省大理市动物疫病预防控制中心, 云南大理 671003

摘要 弓形虫病是一种呈世界性分布且危害严重的人兽共患寄生虫病。免疫学与分子生物学诊断方法的逐步建立和完善为弓形虫病的有效诊断提供了重要依据。本文就染色试验、凝集试验、酶联免疫吸附试验、免疫胶体金技术、核酸探针、聚合酶链式反应、环介导等温扩增、基因芯片技术等研究和应用进行简要介绍。

关键词 弓形虫病; 免疫学; 分子生物学; 诊断

弓形虫病 (Toxoplasmosis) 是由刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 引起的一种呈世界性分布且宿主范围广泛的人兽共患寄生虫病。人感染弓形虫的途径包括食入含有弓形虫包囊的生肉或未煮熟的肉类, 或者食入被弓形虫卵囊污染的食物或水, 或者长期与宠物密切接触^[1-2]。正常成年人感染弓形虫后不表现出明显临床症状, 呈隐性感染状态; 孕妇感染后可通过胎盘进行垂直传播, 引起死胎、流产、畸形和早产等先天性弓形虫病。AIDS 和肿瘤患者等免疫缺陷人群感染弓形虫后能使隐性感染状态转为急性重症, 常表现为脑炎、癫痫和精神异常等, 严重者可危及生命。本文主要针对该病的免疫学和分子生物学诊断方法进行简要介绍。

1 免疫学诊断方法

免疫学诊断方法的建立基于抗原与抗体反应

的基本原理, 可用已知抗原检测未知抗体 (抗体检测) 或用已知抗体检测未知抗原 (循环抗原检测)。由于该方法具有特异性和专一性的优点, 能简便、快速、准确进行诊断, 而被广泛应用于实验室研究和现场检测。

1.1 染色试验

国内于恩庶最先建立的染色试验 (dye test, DT) 起初被认为是检测血清中特异性弓形虫抗体的经典方法。但活虫体的获取和保存困难, 并存在严重的生物安全性, 所以较少应用。在此基础上建立的免疫酶染色试验 (immunoenzymic staining test, IEST) 具有操作简便、安全、敏感、特异、经济和重复性好等优点。该方法以载玻片上的弓形虫为抗原, 检测待检血清中的未知弓形虫抗体, 同时加入酶标二抗和底物显色, 当出现完整淡黄色判为阳性。

收稿日期: 2016-10-17

邓汝芳, 女, 1967 年生, 兽医师。

须认真对待操作过程的每一个环节, 任何一个环节出现错误都可能导致配种失败, 对养猪场或养猪户造成经济损失。

2) 应用猪的人工授精技术可以降低养猪成本, 减少公猪饲养头数, 节约引种费、饲料费、防疫费、建筑费, 提高优秀种公猪利用率。

3) 应用猪的人工授精技术可以解决公、母猪体格相差悬殊配种困难等问题, 特别是初产母猪和瘦

弱母猪的配种问题。

4) 采用猪的人工授精技术可以随时给发情母猪配种, 携带方便, 跨场配种不受地域限制, 避免疫病扩散蔓延, 经济实惠。

5) 本试验可表明: 猪自然交配和人工配种在一个情期受胎率和产仔数量上没有差别, 养猪业应大力推广猪的人工授精技术。

1.2 凝集试验

直接凝集试验 (direct agglutination test, DAT) 能与血清中存在的非特异性“天然抗体”IgM 结合, 产生假阳性结果, 而未得到广泛应用。Gamble 等^[9]在 DAT 基础上建立的改良凝集试验 (modified agglutination test, MAT) 与酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA) 同时检测 70 份阳性猪和 204 份阴性猪, 灵敏度和特异性都较高。但是该方法所需的诊断抗原速殖子较难获得, 而且试剂费用较高。

间接凝集试验虽然敏感性较差, 有时会发生非特异性凝集反应, 但其简便、经济、快速等优点适合弓形虫病的大规模筛选, 已广泛应用于弓形虫病血清流行病学调查。Miao 等^[10]应用 IHA 对云南省 266 份马和 133 份驴血清进行弓形虫抗体检测, 阳性率分别为 30.5% 和 20.3%, 较高的弓形虫病阳性率为该地区的弓形虫病防控提供一定依据。

乳胶凝集试验操作相对简单, 即在从 1:20 倍比稀释的待检血清中加入致敏乳胶颗粒, 震荡混匀, 室温过夜, 次日观察结果, 其剪感性强, 结果稳定且易于观察, 但是费时和特异性不强, 在弓形虫病流行病学调查中未得到广泛的应用。

1.3 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验在弓形虫病诊断中同样具有十分广泛的应用, 其作用原理是酶的催化作用以及底物的放大反应, 从而大大提高了特异性抗原抗体反应的灵敏性。该方法可以检测出弓形虫感染各个时期的 IgM、IgG、IgA 和 IgE 抗体。吕斌等^[9]用弓形虫 P35-GST 表面抗原建立的 IgM-ELISA 对 60 例病人进行抗体检测, 可明显区分近期感染和既往感染。但用于弓形虫循环抗原检测的 ELISA 方法相对较少。金武官等^[6]用 SPA-ELISA 能从鼠尿中检测出轻度、中度和重度弓形虫感染, 适用于弓形虫感染的早期诊断。

1.4 免疫胶体金技术

快速斑点免疫金渗滤法 (dot immunogold filtration assay, DIGFA) 以硝酸纤维素膜作为载体, 将已知弓形虫抗原封闭于 NC 膜后加入待检血清样品进行反应, 然后将洗涤后的 NC 膜用胶体金探针检测未知弓形虫抗体, 其中的金颗粒使反应结果在 NC 膜上放大显示出来。徐霞等^[7]用胶体金-SPA 显色建立的 DIGFA 与 IHA 确定的 11 份阳性和 30 份阴性人血清的符合

率达到 90.9%, 具有简便、快速和敏感的优点。

胶体金免疫层析法 (gold immunochromatography assay, GICA) 在快速斑点免疫金渗滤法的基础上建立, 该方法集胶体金标记技术、层析分析技术、免疫检测技术、单克隆抗体技术和新材料等技术于一体。由于操作更加简便, 在弓形虫病现场诊断中得到广泛应用。俞向前等^[8]采用 ELISA 和 GICA 两种方法对浦东新区的 194 份犬猫血清进行弓形虫 IgG 抗体检测, 抗体检测结果基本一致。

快速胶体染料试纸条法 (dipstick dye immunoassay, DDIA) 用胶体染料 D-1 标记的兔抗人 IgG 或 IgM 抗体来检测待检血清中抗弓形虫的 IgG 或 IgM 抗体, 然后用包被有弓形虫可溶性抗原的 NC 膜捕获产生的复合物。司进等^[9-10]用自主研制的 DDIA, 在检测弓形虫病 IgG 或 IgM 抗体上与进口试剂盒有较高符合率。

免疫金银染色法 (immunogold silver staining, IGSS) 将胶体金探针与待检血清中的弓形虫抗体结合形成的复合物用银显影处理后, 被金颗粒吸附, 从而显现出一种可见褐色。Liu 等^[11]应用该方法检测义务献血者提供的 6 份混合血样的灵敏度和特异性分别为 92.31% 和 99.96%, 与检测单份血样的结果符合率较高。

2 分子生物学诊断方法

2.1 核酸分子杂交技术

核酸分子杂交技术又称为核酸探针 (nucleic acid hybridization), 是将某一已知病原的部分或全部核酸序列用放射性同位素或生物素、地高辛配基等非放射性物质标记后作为探针, 与待检样品中互补核酸形成杂交双链, 然后通过放射自显影技术显示结果。根据性质和来源, 可以分为 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针、寡核酸探针等。起初用放射性同位素标记的核酸探针对人体具有一定危害性, 因而在应用上受到一定限制。安全高效的非同位素标记核酸探针在近年来有了较快发展。张洪花^[12]等应用生物素标记的核酸探针检测出脑囊虫病、疑似脑囊虫病、原发性癫痫患者和健康人群的弓形虫阳性率分别为 2.44%、3.70%、3.41% 和 0%, 该方法适合弓形虫病的现场诊断。

2.2 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction,

PCR)的作用原理是使目的 DNA 片段的拷贝数在酶的参与下扩增至百万倍以上,该方法具有特异、敏感和操作简便等优点。其衍生技术还包括巢氏 PCR、多重 PCR、原位 PCR、定量竞争性 PCR、逆转录 PCR 等,这些方法都已广泛应用于弓形虫病的实验室诊断。

1)常规 PCR。1989 年, Burg 最先以弓形虫 RH 株基因文库中的 B1 基因为目的基因来建立检测弓形虫病的 PCR 技术,其灵敏度可达到在 1×10^5 个人类细胞中检测到单个弓形虫速殖子的基因水平。谢德华等^[13]以弓形虫核糖体 DNA 第一内转录间隔区(ITS1)序列建立的 PCR 技术能检测出 10 个弓形虫速殖子 DNA,而且与其它相关寄生虫无交叉反应。方强等^[14]以弓形虫基因组中的高度重复序列 529 bp 建立的 PCR 技术最低可以检测出 10 个拷贝的 DNA,而且与健康人群全血、正常小鼠全血、恶性疟原虫、间日疟原虫和结核杆菌基因组 DNA 无交叉反应。弓形虫表面抗原在弓形虫入侵宿主细胞过程中起到关键作用,而基于其蛋白编码基因的 PCR 技术也得到一定研究。Vijaya 等^[15]用弓形虫 SAG2 基因建立的 PCR 技术对 20 例临床感染犬的淋巴结进行检测,其中有 2 份为阳性,该结果与改良直接凝集试验一致。

2)巢氏 PCR。巢氏 PCR 以外引物对目的基因进行第 1 次扩增,其产物作为第 2 轮的模板,用内引物再次扩增,该法的敏感性较普通 PCR 提高了 100 倍,而且与其它微生物 DNA 无交叉反应。在巢氏 PCR 基础上设计的半巢氏 PCR 更加敏感、特异和快速。孔得翔等^[16]根据弓形虫 RH 株的 P30 基因设计而成的特异性引物 P1、P2 和 P3 建立了半巢氏 PCR 技术,其灵敏度可最低检测出 18 fg 弓形虫 DNA,而且特异性强,与健康猪血和常见细菌病毒 DNA 无交叉反应。

3)实时定量 PCR。实时定量 PCR 又称为荧光定量 PCR,它将探针技术和 PCR 技术有机结合在一起,通过 PCR 产物中的 DNA 含量来定量分析检测样本中目的 DNA 或 mRNA 的含量。Luo 等^[17]根据 B1 基因设计的实时荧光定量 PCR 对小白鼠尿液中的弓形虫 DNA 进行检测,该方法的敏感性为 10^4 copies/mL,特异性为 100%。蔺智兵等^[18]根据 529 bp 基因建立的实时荧光定量 PCR 检出率要高于 LAMP 和普通 PCR,而且在 750 份羊、猪、牛和犬血样中都可以检测到弓形虫感染。彭武丽等^[19]根据牛

弓形虫 GRA6 基因设计的单重荧光定量 PCR 的最低检测底限为 7×10^2 copies/反应,灵敏度是普通 PCR 的 100 倍。

4)原位 PCR。原位 PCR 将原位杂交的定位性与 PCR 的高度敏感性结合,不仅节省提取 DNA 的繁琐步骤,而且可以在组织切片或细胞涂片中动态观察虫体位置及感染状况等。根据检测方式的不同,可以分为直接原位 PCR 和间接原位 PCR。李爽等^[20]用直接原位 PCR 对弓形虫 RH 株感染后制备成的肝脏石蜡切片和冰冻切片进行扩增,阳性率为 100%,检出率高于免疫组化法。卢慎^[21]采用间接原位 PCR 技术,即设计 1 对 B1 基因引物对 86 例淋巴结炎病例的石蜡包埋切片进行原位扩增,然后用地高辛标记探针进行原位杂交,共检测出 47 例弓形虫阳性病例。

2.3 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)最早由 Notomi 等^[22]建立,该方法在 Bst DNA 聚合酶参与下,通过识别靶序列上 6 个特异区域的 4 对引物进行瀑布式扩增,结果能直接通过肉眼观察。除此之外,该方法还具有高效、快速、特异性强和灵敏度高的特点。Kong 等^[23]根据弓形虫 529 bp 基因建立的 LAMP 方法能在试验小白鼠的血样中检测出 0.6 fg 弓形虫 DNA,而且与其它寄生虫无任何交叉反应,适用于小白鼠弓形虫病感染的早期诊断。Zhuo 等^[24]将根据弓形虫高度保守序列 ITS-1 基因构建的 LAMP 技术应用于肉食品弓形虫病的检测上,其最低限检出为 0.9 fg 弓形虫 DNA,而且敏感性比普通 PCR 大 10 倍。

2.4 基因芯片

基因芯片又称为 DNA 微阵列(DNA microarray),是在玻片、硅片等载体上按照特定排列方式固定大量 DNA 片段,然后与标记的核酸探针进行杂交,反应体系经芯片扫描仪扫描后用数据分析软件进行结果分析。该方法具有高通量和并行性的优点。易广才^[25]根据巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒和弓形虫基因序列分别设计寡核苷酸探针,并在氨基化玻片上制成基因芯片,该方法能对孕妇的 TORCH 感染进行检测,而且阳性结果与荧光定量 PCR 一致。

3 结 语

综上所述,免疫学诊断技术针对传统方法费

时、生物安全性低、灵敏度低、特异性差等问题进行改进,建立了大量新研究方法,部分研究成果已经或正在应用于弓形虫病的现场诊断,但其诊断抗原或抗体的制备工艺不成熟,造成检测试剂盒或试纸条质量存在一定差异,难免会出现假阳性结果。而 PCR 及其衍生的新分子生物学技术提高了弓形虫病检测的灵敏度、特异性和准确性,为弓形虫病实验室检测和研究提供了较为可靠的研究手段。但在基层推广中受到操作繁琐、专业素质要求高等因素的限制。有机整合现有的免疫学和分子生物学诊断资源,研究和开发出能集传统诊断方法所有优点于一体的新诊断方法将成为一种发展趋势。

参 考 文 献

- [1] DUBEY J P. Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis [J]. *Vet Parasitol*, 2004, 126(1/2): 57-72.
- [2] 陈昌源. 家养宠物与人群弓形虫感染情况的研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2001, 17(1): 76-77.
- [3] GAMBLE H R, DUBEY J P, LAMBILLOTTE D N. Comparison of a commercial ELISA with the modified agglutination test for detection of *Toxoplasma* infection in the domestic pig [J]. *Vet Parasitol*, 2005, 128(3/4): 177-181.
- [4] MIAO Q, WANG X, SHE L N, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in horses and donkeys in Yunnan Province, Southwestern China [J]. *Parasit Vectors*, 2013(6): 168.
- [5] 吕斌, 吴少廷, 周宜开, 等. 完整弓形虫 P35 重组蛋白 IgM-酶联免疫吸附测定法检测弓形虫急性感染[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(1): 134-137.
- [6] 金武官, 李云珠, 俞善昌, 等. SPA-ELISA 检测弓形虫感染鼠尿中的循环抗原[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2000, 18(1): 43-45.
- [7] 徐霞, 谢瑾灼, 陈柏铭. 检测血清弓形虫 IgG 抗体的滴金免疫测定法的建立及应用[J]. *广州医学院学报*, 2001(1): 26-27, 31.
- [8] 俞向前, 文德亮, 龚大弟, 等. 浦东新区犬猫弓形虫病血清学调查分析[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2013(2): 36-37.
- [9] 司进, 朱荫昌, 徐明, 等. 快速胶体染料试纸条法检测弓形虫病 IgM 抗体的研究[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2005, 17(2): 93-96.
- [10] 司进, 朱荫昌, 徐明, 等. 快速胶体染料试纸条法检测弓形虫病 IgG 抗体的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(12): 1000-1003.
- [11] LIU Y, ZHENG K, CHEN M, et al. Study on detecting antibodies to *Toxoplasma gondii* in pooled serum of blood donors by Dot-IGSS [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2001, 32(3): 558-561.
- [12] 张洪花, 王昌源, 汪照国, 等. ELISA IFAT 和 PCR/生物素探针检测中枢神经系统疾病中弓形虫感染[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2002(6): 450-452.
- [13] 谢德华, 朱兴全, 崔焕舜, 等. 猪弓形虫病特异 PCR 诊断方法的建立[J]. *中国兽医科技*, 2005(4): 289-293.
- [14] 方强, 夏惠, 陈兴智, 等. 基于 529 bp 高度重复序列的弓形虫 PCR 诊断方法的建立 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(7): 767-769.
- [15] VIJAVA B M, SREEKUMAR C, RAJENDRAN C. Polymerase chain reaction based detection of *Toxoplasma gondii* from lymph node aspirates of dogs [J]. *J Parasit Dis*, 2014, 38(1): 46-48.
- [16] 孔得翔, 王素华, 曲道峰, 等. 弓形虫半巢式 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(1): 52-54.
- [17] LUO F J, YAO H F, WANG Y M, et al. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction detection for *Toxoplasma gondii* B1 gene in mice urine [J]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 2010, 28(5): 336-338.
- [18] 蔺智兵, 张厚双, 曹杰, 等. 弓形虫 Real-time PCR 检测方法的建立和初步应用[J]. *畜牧与兽医*, 2011(12): 20-23.
- [19] 彭武丽, 季新成, 史茜, 等. 实时荧光定量 PCR 检测弓形虫 GRA6 基因方法的建立和应用[J]. *新疆农业科学*, 2014(1): 170-177.
- [20] 李爽, 甘绍伯, 彭瑞云, 等. 原位 PCR 对弓形虫感染鼠病理检测效果的观察[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000(3): 41-43.
- [21] 卢慎. 应用间接原位 PCR 诊断弓形虫淋巴结炎[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2008(1): 70-72, 97.
- [22] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [23] KONG Q M, LU S H, TONG Q B, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice [J]. *Parasit Vectors*, 2012(5): 2.
- [24] ZHUO X, HUANG B, LUO J, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays based on ITS-1 for rapid detection of *Toxoplasma gondii* in pork [J]. *Vet Parasitol*, 2015, 208(3/4): 246-249.
- [25] 易广才. 运用基因芯片技术研究孕妇 TORCH 感染[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006(5): 17-18, 21.