

技术与方法

# Dot-ELISA检测莱姆病血清抗体的实验研究

刘振龙 赵文明 张力平

(首都医科大学微生物学教研室 北京 100054)

**摘要** 经实验研究,建立了检测莱姆病血清IgG的Dot-ELISA方法。阻断试验表明,本法具有特异性。经对10例伯氏疏螺旋体人工感染兔血清和24例正常兔血清标本的检测证实,该法与常规ELISA法检测的符合率为100%。重复性试验表明其重复性良好。

**关键词** 莱姆病,伯氏疏螺旋体,斑点-ELISA

**分类号** Q939.2

莱姆病是1982年方确定其病原体为伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)的感染性疾病。迄今的血清流行病学调查资料证实,我国22个省(市、区)有莱姆病感染发生<sup>[1]</sup>,因此建立较为简便、适用的实验室诊断方法是必要的。本文报告以伯氏疏螺旋体人工感染兔血清和正常兔血清为检测标本,建立了一种检测莱姆病血清IgG抗体的斑点-ELISA(Dot-ELISA)新方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 抗原制备

选用伯氏疏螺旋体标准菌株B<sub>31</sub>菌株作为制备抗原用菌株(军事医学科学院微生物流行病学研究所惠赠)。使用BSK II液体培养基培养B<sub>31</sub>株。参照文献<sup>[2]</sup>用过滤法进行培养。取培养5d的培养物,经10000r/min离心30min,取沉淀物用PBS(0.01M pH7.4)洗三次后,于冰浴下超声处理20min,10000r/min离心30min后,弃沉淀,即得到超声抗原。

### 1.2 感染动物血清制备

用B<sub>31</sub>菌株人工感染家兔10只,雌雄各半(首都医科大学动物部提供)。于兔背部皮下多点注射培养5d的菌液,每点注射0.2ml,总量0.8ml。感染8周后采血,分离血清,另取24只正常健康家兔血清作为阴性血清。条件选择试验用阳性血清和阴性血清分别为各10只兔血

清的混合物。

### 1.3 Dot-ELISA 操作步骤

**1.3.1 包被抗原与封闭:**取2μl(20μg/ml)抗原滴于直径4mm的硝酸纤维素(NC)膜上(孔径0.45μm,华美公司产品),37℃包被15min后,再重复包被一次,然后将每张膜分别放入40孔酶标反应板孔中,每孔加封闭液(0.4%明胶)100μl封闭30min后去除封闭液。

**1.3.2 加待检血清:**每孔加1:320稀释的待检血清50μl 37℃反应1h,用PBS-T(含0.05%吐温20的PBS)洗涤3次,每次5min。

**1.3.3 加酶标抗体:**每孔加1:100稀释的酶标羊抗兔IgG抗体(HRP-IgG,军事医学科学院微生物流行病学研究所提供)50μl 37℃反应1h,用PBS洗涤3次,每次5min。

**1.3.4 加底物溶液:**每孔加DAB(日本东京化成株式会社产品)50μl 室温反应15min后,各孔用蒸馏水冲洗终止反应,观察结果。

**1.3.5 结果判定判准:**NC膜上的斑点呈深棕色者为++++,斑点呈中等棕色为++,介于++++和++之间为+++。斑点较弱者为+,背景无色判为-。待检血清以≥+++者判为阳性。

### 1.4 对照试验用 ELISA 法

参照文献[3]方法进行试验。使用酶联检

测仪(奥地利SLD公司产品)测定结果。判定标准为,将24例正常兔血清稀释为1:640,其OD值为 $0.226 + 0.032(\bar{X} + SD)$ ,被检血清的OD值 $\geq$ 平均值 + 3个标准差为阳性,即本试验用ELISA的阳性标准为OD值 $\geq 0.322$ 。

## 2 结果

### 2.1 Dot-ELISA试验条件选择

2.1.1 抗原、阳性和阴性血清及HRP-IgG最佳工作浓度的确定:经方阵法测定,抗原最适浓度为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ,阳性和阴性血清最佳稀释度1:320,HRP-IgG最适工作浓度为1:100。

2.1.2 封闭液的选择及封闭时间的确定:用不同浓度的小牛血清白蛋白(0.5%、1%、2%)、小牛血清(5%、10%)和明胶(0.2%、0.4%、0.6%)分别进行了不同时间(30min、60min、120min)的封闭试验。结果以0.4%明胶封闭30min的效果最好,即测阳性血清斑点显色最深,测阴性血清背景无色。

### 2.2 Dot-ELISA特异性试验

用阻断试验方法进行,取伯氏疏螺旋体人工感染兔血清10份,1:160稀释,每份稀释血清分别吸取0.5mL,加于等量的浓缩菌液中,充分混合后,37℃水浴吸收1h,其间多次振荡,离心

后获得的上清液,即为吸收后的1:320稀释血清,另取未经吸收的1:320稀释的相同血清,与经吸收的血清同时做Dot-ELISA试验,结果显示,吸收后的血清斑点为+或-,而未经吸收的血清呈+++或++。

### 2.3 Dot-ELISA检出率测定及与ELISA的比较

分别用Dot-ELISA法和ELISA法对10份伯氏疏螺旋体人工感染兔血清及24份正常兔血清进行了特异性IgG抗体的检测。按ELISA和Dot-ELISA分别确定的判定标准,ELISA测定为阳性的,Dot-ELISA也均为阳性;ELISA测定为阴性的,Dot-ELISA的测定结果也是阴性。结果表明,两种方法对相同的10例人工感染兔血清和24例正常兔血清样本的检测符合率为100%。两种方法对10例人工感染的兔血清检测结果的比较见表1。

### 2.4 Dot-ELISA重复性试验

对上述24例正常兔血清和10例人工感染兔血清样本,在相同的实验条件下,在不同工作日,又用Dot-ELISA和ELISA重复测定了3次。结果显示,Dot-ELISA方法具有很好的重复性,正常兔血清仍均为阴性,人工感染阳性血清还是全部为阳性。

表1 Dot-ELISA与ELISA检测结果的比较

方 法	血 清 标 本 号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dot-ELISA	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	++
ELISA(OD值)	0.524	0.575	0.503	0.457	0.489	0.452	0.489	0.522	0.450	0.371

## 3 讨论

一般认为,莱姆病的诊断应从流行病学、临床和血清学检查资料综合进行判断。但约有半数以上的患者不能确认有被蜱叮咬的经历,临床过程出现皮肤慢性游走性红斑是有力的证据,而其他症状难以作为莱姆病的鉴别特征<sup>[4]</sup>,因而莱姆病的血清学诊断具有重要诊断价值,也是诊断莱姆病的常用方法。

目前所用的血清学方法有间接免疫荧光

法、血凝法、补体结合反应、酶联免疫吸附试验等。大多数人认为,特异比较好的方法是酶联免疫吸附法。现在国外已建立了多种检测莱姆病的ELISA方法,国内也有应用ELISA方法的报道。考虑到我国莱姆病的多发区是林区、山区、草原等医学检测的仪器设备条件相对落后的地区,为此我们首先用动物实验研究的方法,进行了Dot-ELISA方法学的研究。Dot-ELISA最主要的特点是简便、快速、不需要仪器设备,适合于基层应用。今后更需要在上述研究的基

基础上,建立直接用于检测人血清中莱姆病血清抗体的 Dot-ELISA法。

### 参 考 文 献

[1] 张哲夫,万康林,张金声等. 中华流行病学杂志,1997,

18(1):8~11.

[2] 万康林,张金声,张哲夫. 中国媒介生物学及控制杂志,1992,特刊 2:107~109.

[3] 马海滨,万康林,张哲夫. 中国媒介生物学及控制杂志,1992,特刊 2:81~83.

[4] 川端貞人. 臨床と微生物,1991,18(1):69~72.

## THE STUDY OF DOT-ELISA FOR DETECTING THE ANTIBODY TO LYME DISEASE

Liu Zhenlong Zhao Wenming Zhang Liping

(Department of Microbiology, Capital University of Medical Sciences, 100054)

**Abstract** The Dot-ELISA for detecting the IgG antibody to Lyme disease was established. It was showed that the method was specific and the repeatability was good. The Dot-ELISA was coincident with the common ELISA in detecting 10 positive serum samples from artificially infected rabbits with *Borrelia burgdorferi* and 24 negative serum samples from normal rabbits.

**Key words** Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, Dot-ELISA