

DOI:10.13350/j.cjpb.220406

• 论著 •

基于 Fh010935 蛋白的绵羊肝片吸虫感染间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用*

段佳慧¹, 张楠¹, 刘少雄¹, 李建华¹, 宫鹏涛¹, 王晓岑¹, 李新¹, 于磊², 张西臣^{1**}, 唐博^{1**}

(1. 吉林大学动物医学学院 人兽共患病研究教育部重点实验室, 吉林长春 130062; 2. 赤峰市农牧业综合检验检测中心)

【摘要】 **目的** 利用肝片吸虫重组蛋白 Fh010935 建立绵羊肝片吸虫感染间接 ELISA 检测方法。 **方法** 通过对抗原包被量、血清稀释度、血清孵育时间、封闭剂种类、二抗稀释倍数及孵育时间、TMB 底物溶液反应时间等条件进行优化, 建立间接 ELISA 检测方法, 评价其敏感性、特异性和重复性, 并对吉林和内蒙古地区临床血清样品进行检测。 **结果** ELISA 优化试验确定的抗原最佳包被浓度为 0.25 μg/孔, 血清稀释度为 1:400, 血清孵育时间为 90 min, 封闭剂为 1% BSA, 二抗稀释倍数为 1:5000, 二抗孵育时间为 75 min, TMB 底物溶液反应时间为 15 min。优化各反应条件后建立的 ELISA 检测方法敏感性达到 1:800, 与羊捻转血矛线虫、双腔吸虫、新孢子虫阳性血清无免疫交叉反应, 批内批间变异系数均 < 6%。对吉林省某地区临床血清样品和粪便样品各 36 份进行 ELISA 和病原学检测, 两种方法一致性为 96%。对内蒙古地区 90 份临床血清样品进行检测, 阳性率为 18.9%。 **结论** 以肝片吸虫重组蛋白 Fh010935 为包被抗原建立的检测绵羊肝片吸虫感染的间接 ELISA 方法具有较好的敏感性、特异性和重复性, 可用于绵羊肝片吸虫病的快速检测及流行病学调查。

【关键词】 肝片吸虫; 诊断; 间接 ELISA**【中图分类号】** R383.2**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)04-0406-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Apr;17(4):406-409.]

Establishment and preliminary application of indirect ELISA method for *Fasciola hepatica* infection in sheep based on Fh010935 protein

DUAN Jia-hui¹, ZHANG Nan¹, LIU Shao-xiong¹, LI Jian-hua¹, GONG Peng-tao¹, WANG Xiao-cen¹, LI Xin¹, YU Lei², ZHANG Xi-chen¹, TANG Bo¹ (1. Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Chifeng City Comprehensive Inspection and Testing Center for Agriculture and Animal Husbandry)***

【Abstract】 **Objective** An indirect ELISA method for the detection of *Fasciola hepatica* infection in sheep was established by using the recombinant protein Fh010935 of *Fasciola hepatica*. **Methods** By optimizing the conditions such as the antigen coating amount, serum dilution, serum incubation time, type of sealant, dilution multiple of secondary antibody, incubation time of secondary antibody, reaction time of TMB substrate solution, an indirect ELISA method was established to evaluate its sensitivity, specificity and repeatability, and to detect the clinical serum samples in Jilin and Inner Mongolia. **Results** The optimum coating concentration determined by ELISA optimization test was 0.25 μg/well, the serum dilution was 1:400, the serum incubation time was 90min, the blocking solution was 1% BSA, the dilution multiple of secondary antibody was 1:5000, the incubation time of secondary antibody was 75min, and the reaction time of TMB substrate solution was 15 min. After optimizing the reaction conditions, the sensitivity of the ELISA method was 1:800. There was no immune cross reaction with the positive serum of *Haemonchus contortus*, *Dicrocoelium lanceatum* and *Neospora caninum*, and the coefficient of variation within and between batches was less than 6%. 36 clinical serum samples and 36 fecal samples from a certain area of Jilin Province were detected by ELISA and etiology. The consistency of the two methods was 96%. 90 clinical serum samples from a certain area of Inner Mongolia were tested, and the positive rate was 18.9%. **Conclusion** The indirect ELISA method for the detection of *Fasciola hepatica* infection in sheep based on the recombinant protein Fh010935 of *Fasciola hepatica* as the coating antigen has good sensitivity, specificity and repeatability, which can be used for rapid detection and epidemiological investigation of Fasciolosis in sheep.

【Key words】 *Fasciola hepatica*; diagnosis; indirect ELISA* **【基金项目】** 吉林省科技发展计划项目(No. 20200402044NC, 20190103075JH)。** **【通讯作者】** 唐博, E-mail: tang_bo@jlu.edu.cn; 张西臣, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn**【作者简介】** 段佳慧(1993-), 女, 辽宁铁岭人, 博士研究生, 主要研究方向为兽医寄生虫病学。E-mail: 1527706198@qq.com

肝片吸虫病是由肝片吸虫寄生于动物和人肝胆管内引起的人兽共患寄生虫病,呈世界性分布,常见于牛羊等反刍动物^[1-3]。患病动物呈现发热、消瘦、贫血、腹泻等多种症状,严重影响养殖业发展^[4-6]。目前对肝片吸虫病的控制主要依赖三氯苯达唑等化学药物,但易出现耐药性^[7],且尚无肝片吸虫疫苗生产上市,因此对患病动物进行及时的诊断与防控具有重要意义。传统的病原学诊断方法在感染后2~3个月才能在粪便中检测到虫卵,此时已严重危害动物健康并造成环境污染^[8]。分子生物学诊断方法需要操作人员较强的专业性,且费用较高,不适合基础应用^[9-10]。免疫学检查法因其操作简便、快速、敏感、特异等特点,具有一定的优势,成为肝片吸虫病较常用的诊断方法^[11-13]。目前,已经报道的诊断抗原主要包括组织蛋白酶L(CatL)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、鞘脂激活蛋白样蛋白(SAP)^[14-16]等,但总体来说,可供选择的诊断抗原仍然较少。用于寄生虫免疫学诊断的抗原特异性决定了方法的准确性,相比于虫体提取物抗原和分泌排泄抗原,重组抗原的准确性更高^[17]。本研究前期筛选获得了肝片吸虫特异性抗原基因,经克隆表达,得到重组蛋白Fh010935,该蛋白能够与肝片吸虫感染血清发生特异性反应,但其诊断价值尚未确定^[18]。本研究以肝片吸虫重组蛋白Fh010935为包被抗原建立间接ELISA检测方法,通过临床样品检测评价方法的敏感性和特异性,为绵羊肝片吸虫病血清学诊断试剂盒的开发奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株及血清 绵羊肝片吸虫阳性血清、绵羊肝片吸虫阴性血清、绵羊双腔吸虫阳性血清、绵羊捻转血矛线虫阳性血清及绵羊新孢子虫阳性血清由吉林大学动物医学学院寄生虫实验室保存;待检血清样品和粪便样品各36份采自吉林地区,待检血清样品90份采自内蒙古地区。

1.2 主要试剂 HRP Rabbit Anti-goat IgG(H+L)购自博士德生物有限公司;TMB底物溶液购自天根生化科技有限公司;脱脂奶粉购自博士德生物有限公司;牛血清白蛋白购自沈阳汇佰有限公司。

2 方 法

2.1 间接ELISA方法的建立 利用棋盘滴定法,在96孔板中包被梯度稀释的重组蛋白Fh010935抗原(2 μg/孔、1 μg/孔、0.5 μg/孔、0.25 μg/孔、0.125 μg/孔、0.063 μg/孔、0.032 μg/孔),确定最佳抗原包被浓度。对梯度稀释的血清进行孵育(1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400),确

定最佳阴性血清稀释倍数。确定最佳封闭剂,待检样品最佳孵育时间,二抗最佳稀释倍数,二抗最佳孵育时间,以及TMB底物溶液最佳反应时间。利用优化的ELISA方法对12份已知肝片吸虫阴性血清进行检测,计算总样本平均 A_{450} 值(\bar{x})和标准差(s),确定检测方法的阴阳性临界值。

2.2 敏感性试验 将肝片吸虫感染血清进行倍比稀释,浓度分别为1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600,用建立的ELISA法进行检测,评价方法的敏感性。

2.3 特异性试验 利用建立的ELISA方法分别对绵羊捻转血矛线虫、双腔吸虫、新孢子虫、肝片吸虫阳性血清进行检测,同时以肝片吸虫阴性血清作对照,评价方法的特异性。

2.4 重复性试验 利用建立的ELISA方法,采用同一批次包被的酶标板对12份绵羊血清进行批内重复性试验,采用不同批次包被的酶标板对上述血清样品进行批间重复性试验,分别计算变异系数,评价方法的重复性。

2.5 ELISA与病原学检测结果比较 利用水洗沉淀法对采自吉林地区的36份绵羊粪便样品进行处理,涂片后显微镜观察肝片吸虫虫卵,以确定肝片吸虫感染情况。同时利用建立的间接ELISA方法检测同一批绵羊的36份血清样品,对两种方法的检测结果进行比较分析。

2.6 临床样品检测 利用建立的间接ELISA方法对采自内蒙古地区的90份绵羊血清样品进行检测,分析检测结果。

2.7 统计学分析 数据利用GraphPad Prism 5软件进行统计分析。

结 果

1 间接ELISA方法的建立

利用棋盘滴定法确定ELISA最佳反应条件为:抗原包被浓度0.25 μg/孔,封闭剂为1%BSA;待测血清稀释倍数为1:400(P/N值最大),孵育时间为90 min;二抗稀释倍数为1:5000,孵育时间为75 min;TMB底物溶液反应时间为15 min。

利用优化的ELISA方法对12份已知肝片吸虫阴性血清进行检测,计算样品平均 A_{450} 值(\bar{x})为0.212,标准差(s)为0.024。其阴阳性临界值为 $\bar{x} + 3s = 0.284$ 。为避免假阳性结果出现,在临界值上加减一个标准差为可疑区间。因此,当 A_{450} 值 < 0.260 判为阴性;当 A_{450} 值 ≥ 0.308 ,且P/N大于2.1,判为阳性;当 $0.260 < A_{450}$ 值 < 0.308 为疑似阳性,需作重新检测。

2 ELISA的敏感性

分别将肝片吸虫感染血清和阴性血清进行倍比稀释,用建立的 ELISA 方法进行检测,结果如表 1。当肝片吸虫感染血清稀释至 1 : 800 时依然呈阳性,稀释至 1 : 1600 时检测结果为阴性。

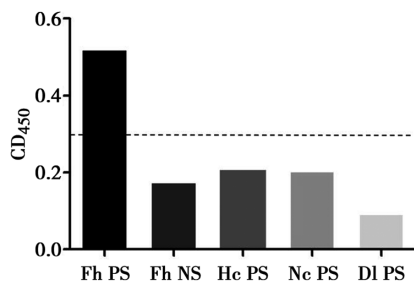
表 1 敏感性试验

Table 1 Result of sensitivity test

稀释倍数	阳性血清 A ₄₅₀	阴性血清 A ₄₅₀	P/N
Dilution ratio	Positive serum A ₄₅₀	Negative serum A ₄₅₀	
1 : 50	1.124	0.598	1.880
1 : 100	0.953	0.479	1.990
1 : 200	0.762	0.357	2.134
1 : 400	0.582	0.262	2.221
1 : 800	0.420	0.191	2.199
1 : 1600	0.274	0.144	1.903
1 : 3200	0.194	0.112	1.732

3 ELISA 的特异性

用建立的 ELISA 方法分别对绵羊捻转血矛线虫、双腔吸虫、新孢子虫、肝片吸虫阳性血清、肝片吸虫阴性血清进行检测,结果如图 1。只有肝片吸虫感染血清呈阳性,其余均阴性,表明建立的 ELISA 方法具有良好的特异性。



Fh PS 肝片吸虫阳性血清 Fh NS 肝片吸虫阴性血清 Hc PS 捻转血矛线虫阳性血清 Nc PS 新孢子虫阳性血清 Dl PS 双腔吸虫阳性血清

图 1 特异性试验

Fh PS *Fasciola hepatica* positive serum Fh NS *Fasciola hepatica* negative serum Hc PS *Haemonchus contortus* positive serum Nc PS *Neospora caninum* positive serum Dl PS *Dicrocoelium lanceatum* positive serum

Fig. 1 Result of specificity test

4 ELISA 的重复性

用建立的 ELISA 方法对 12 份绵羊血清样品进行检测,评价批内、批间试验结果的重复性,结果如表 2。建立的 ELISA 方法批内、批间变异系数均小于 6%,具有良好的重复性。

5 ELISA 与病原学检测结果比较

分别利用粪便检测法和建立的 ELISA 方法对采自吉林地区的 36 例绵羊粪便和血清样品进行检测,其中粪便检测阳性样品 24 份,阳性率为 66.7%;ELISA 法检测血清阳性为 25 份,阳性率为 69.44%,两种检测方法的一致率为 96%,间接 ELISA 的检出率略高。

表 2 重复性试验

Table 2 Result of repeatability test

样品序号 Sample No.	批内变异系数 Intra batch CV%		批间变异系数 Inter batch CV%	
	$\bar{x} \pm s$	CV	$\bar{x} \pm s$	CV
	1	0.162±0.007	4.320	0.174±0.007
2	0.209±0.007	3.110	0.214±0.006	2.904
3	0.24±0.001	0.420	0.250±0.008	3.200
4	0.243±0.008	3.290	0.235±0.002	0.851
5	0.216±0.002	0.690	0.218±0.004	1.835
6	0.209±0.006	2.730	0.216±0.006	2.778
7	0.200±0.005	2.500	0.191±0.004	2.094
8	0.234±0.014	5.770	0.217±0.007	3.226
9	0.647±0.016	2.473	0.615±0.023	3.740
10	0.552±0.019	3.442	0.522±0.020	3.831
11	0.652±0.019	2.914	0.632±0.026	4.114
12	0.481±0.022	4.574	0.484±0.012	2.479

6 临床样品检测

用建立的间接 ELISA 方法对采自内蒙古地区的 90 份绵羊血清样品进行检测,其中 17 份阳性,阳性率为 18.9%。

讨论

肝片吸虫病常用的免疫学诊断方法为酶联免疫吸附试验(ELISA)^[19-21]。Aguayo 等^[16]利用肝片吸虫分泌排泄抗原组分 GST 作为肝片吸虫病血清诊断抗原建立间接 ELISA 法,敏感性达 94.3%。然而,由于抗原成分复杂,特异性仅有 80.2%。Cornelissen 等^[22]利用虫体抗原和分泌排泄抗原粗提物进行绵羊肝片吸虫病的检测,可检出感染后 2 周的血清抗体,特异性与前者存在较大差异,达到 95% 以上。以分泌排泄抗原和虫体抗原为包被抗原建立的 ELISA 法虽具有较高的敏感性,但不同批次的 ELISA 检测产品特异性相差较大,同时提取和纯化难度大,产量少,难以满足诊断应用的需要。因此,以重组蛋白为诊断抗原的相关研究应运而生。Mirzadeh 等^[23]利用肝片吸虫重组蛋白 SAP-2 建立的 ELISA 法对 200 份血清样品进行检测,敏感性为 100%,特异性为 98%。王晓旭等^[24]利用重组蛋白 CatL1 制备的间接 ELISA 诊断试剂盒检测绵羊血清抗体,特异性和敏感性分别为 97.3% 和 94.0%,重复性良好。表明以重组蛋白为包被抗原建立的 ELISA 方法诊断效果良好。而且重组蛋白制备过程中克服了虫体提取物和分泌排泄产物抗原成分不纯引起的假阳性及虫源来源等问题^[25],可实现产品标准化及大规模生产,具有一定优势。

Fh010935 基因长 144 bp,编码 48 个氨基酸,序列分析发现无其他虫体同源性,存在 3 个 B 细胞抗原表位^[18]。前期研究证实重组蛋白 Fh010935 具有较好的抗原性,有成为诊断抗原的潜力^[18]。本试验以重组蛋白 Fh010935 为包被抗原建立间接 ELISA 方法检测

绵羊肝片吸虫病血清的敏感性高(阳性最大稀释度达1:800),且不与绵羊捻转血矛线虫、双腔吸虫、新孢子虫感染血清发生免疫交叉反应,特异性较高。本研究建立的ELISA方法与粪便病原检查法对相同绵羊的样品检测符合率为96%,且ELISA方法检出率更高,这可能与粪便检查法存在漏检情况有关。对内蒙古地区的绵羊血清样品进行检测,阳性率18.9%,表明该地区绵羊肝片吸虫感染率较高,因此需要加强对该病的防控,以保障养羊业的健康发展。

本研究建立了基于Fh010935蛋白的检测绵羊肝片吸虫感染的间接ELISA方法,其敏感性高,特异性强,且重复性好,可用于肝片吸虫病的流行病学调查,为肝片吸虫病血清学诊断试剂盒的开发奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Lefryekh R, Bensaad A, Bensardi F, et al. Hepatic fascioliasis presenting with bile duct obstruction: a case report [J]. Pan Afr Med J, 2017(28):44.
- [2] Dolay K, Hasbah eci M, Hatipoglu E, et al. Endoscopic diagnosis and treatment of biliary obstruction due to acute cholangitis and acute pancreatitis secondary to *Fasciola hepatica* infection [J]. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, 2018, 24(1):71-73.
- [3] Rawla P, Bandaru SS, Vellipuram AR. Review of infectious etiology of acute pancreatitis [J]. Gastroenterol Res, 2017, 10(3):153-158.
- [4] Furst T, Duthaler U, Sripa B, et al. Trematode infections: liver and lung flukes [J]. Infect Dis Clin North Am, 2012, 26(2):399-419.
- [5] Khoramian H, Arbabi M, Osqoi MM, et al. Prevalence of ruminants fascioliasis and their economic effects in Kashan, center of Iran [J]. Asian Pacific J Trop Biomed, 2014, 4(11):918-922.
- [6] Mehmood K, Zhang H, Sabir AJ, et al. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants [J]. Microbial Pathog, 2017(109):253-262.
- [7] Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, et al. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65 (Suppl 1):199-216.
- [8] Arenal A, Lopez V, Diaz A, et al. Development and validation of a meat juice ELISA for the diagnosis of *Fasciola hepatica* in cattle in Cuba [J]. Asian Pacific J Trop Dis, 2016, 6(8):622-626.
- [9] Martinez-Perez JM, Robles-Perez D, Rojo-V zquez FA, et al. Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep [J]. Vet Parasitol, 2012, 190(12):80-86.
- [10] 罗洪林, 钟晓艳, 汤忠进, 等. 肝片形吸虫种类鉴定 PCR 方法的建立[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2007, 32(5):86-90.
- [11] Khabisi SA, Sarkari B, Moshfe A, et al. Production of monoclonal antibody against excretory-secretory antigen of *Fasciola hepatica* and evaluation of its efficacy in the diagnosis of fascioliasis [J]. Monoclonal Anti Immun Immuno, 2017, 65(1):171-174.
- [12] Lopez Corrales J, Cwiklinski K, De Marco Verissimo C, et al. Diagnosis of sheep fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* using cathepsin L enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [J]. Vet Parasitol, 2021, 298(10):109517.
- [13] Heidari H, Zahiri H, Gharekhani J, et al. Comparison of dot-ELISA and ELISA techniques for detection of *Fasciola hepatica* in sheep using excretory-secretory antigens [J]. Istanbul Univer Vet Fakul Der, 2015, 41(1):21-25.
- [14] Aghamolaei S, Kazemi B, Bandehpour M, et al. Design and expression of polytopic construct of cathepsin-L1, SAP-2 and FhTP16.5 proteins of [J]. J Helminthol, 2020(94):e134.
- [15] Xifeng W, Mengfan Q, Kai Z, et al. Development and evaluation of a colloidal gold immunochromatographic assay based on recombinant protein CatL1D for serodiagnosis of sheep fasciolosis [J]. J Helminthol, 2019(94):e98.
- [16] Vasti A, Bianca V, Espino AM. Assessment of *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase as an antigen for serodiagnosis of human chronic fascioliasis [J]. Acta Trop, 2018, 186(10):41-49.
- [17] Mokhtarian K, Meamar AR, Khoshmirsafa M, et al. Comparative assessment of recombinant and native immunogenic forms of *Fasciola hepatica* proteins for serodiagnosis of sheep fasciolosis [J]. Parasitol Res, 2018, 117(1):225-232.
- [18] 段佳慧, 刘少雄, 马丹, 等. 肝片吸虫免疫显性抗原基因的筛选及鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(2):91-96.
- [19] Munita MP, Rea R, Martinez-Ibeas AM, et al. Comparison of four commercially available ELISA kits for diagnosis of *Fasciola hepatica* in irish cattle [J]. BMC Vet Res, 2019:15.
- [20] 李雪. 大片形吸虫幼虫的培育及早期诊断单抗夹心 ELISA 方法的建立及应用[D]. 广西大学, 2015.
- [21] Anuracpreeda P, Chawengkirttikul R, Sobhon P. Immunodiagnostic monoclonal antibody-based sandwich ELISA of fasciolosis by detection of *Fasciola gigantica* circulating fatty acid binding protein [J]. Parasitology, 2016, 143(11):1369-1381.
- [22] Cornelissen JB, de Leeuw WA, van der Heijden PJ. Comparison of an indirect haemagglutination assay and an ELISA for diagnosing *Fasciola hepatica* in experimentally and naturally infected sheep [J]. Vet Q, 1992, 14(4):152-156.
- [23] Mirzadeh A, Valadkhani Z, Yoosefy A, et al. Expression, purification and in vitro refolding of the recombinant truncated Saposin like protein 2 antigen for development of diagnosis of human fascioliasis [J]. Acta Tropica, 2017(171):163-171.
- [24] 王晓旭. 肝片吸虫病诊断抗原的筛选及间接 ELISA 方法的建立[D]. 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [25] 朵红, 付永, 沈秀英, 等. 细粒棘球蚴抗原 B8/2 蛋白单抗的制备及夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2021, 42(10):31-36.

【收稿日期】 2021-12-14 【修回日期】 2022-02-22