

· 研究论文 ·

# 卫氏并殖吸虫感染犬循环抗原和 特异性抗体的动态观察

陈韶红, 周晓农, 张永年, 陈家旭

(中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025)

**摘要:**目的 观察人工感染卫氏并殖吸虫的犬血清中特异性抗体和循环抗原的动态变化。方法 按常规方法从阳性溪蟹中分离卫氏并殖吸虫囊蚴并定量感染家犬, 从感染后 d4 开始采血分离血清, 用多抗 dot-ELISA 法检测犬血中循环抗原 (CAg), 观察从 d4 到 d133 之间感染犬血中循环抗原 (CAg) 及对感染卫氏并殖吸虫 2 个月的犬用吡喹酮治疗前后血清循环抗原 (CAg) 的动态变化。用 ELISA 法检测从感染 2w 至 19w 不同间隔时间内犬血清中特异性抗体 (Ab) 的动态变化。结果 人工感染卫氏并殖吸虫的家犬, 有 2 只犬在感染 d6 时有循环抗原出现, d10 6 只感染犬都能检测到循环抗原, 检出稀释度在 1:8~1:128 之间, 到感染后 14d 时, 稀释度最高可达到 1:256, 并一直维持到 34d, 56d 以后逐渐下降, 到 84d 下降至零。对感染卫氏并殖吸虫的犬用吡喹酮治疗 3d 后, 其循环抗原短暂出现上升的趋势, 但在 6d 后逐渐下降并消失。感染犬在 4 周时可检测到特异性抗体, 抗体最高滴度维持时间为 4 周~12 周, 并一直维持在一个较高的水平上。结论 犬在感染卫氏并殖吸虫后的 10~56d 内, 用多抗 dot-ELISA 法可在其血清中检测到循环抗原 (CAg), 得出在这段时间检测循环抗原具有早期诊断价值。但感染犬在用吡喹酮药物治疗后有短暂的循环抗原出现, 一周后逐渐消失。

**关键词:** 卫氏并殖吸虫; 循环抗原; 特异性抗体; 犬

中图分类号: S858.292.2735 文献标识码: A 文章编号: 1005-0868(2007)05-0011-04

## DYNAMICS OF SPECIFIC ANTIBODY AND CIRCULATING ANTIGEN IN SERA FROM THE DOGS INFECTED WITH PARAGONIMUS WESTERMANI

CHEN Shao-hong ZHOU Xiao-nong ZHANG Yong-nian CHEN Jia-xu

(National Institute of Parasitic Diseases/Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** Objective In order to observe dynamics of specific antibody and circulating antigen (CAg) in sera of the dogs infected with *P. westermani* experimentally. Methods Dogs were infected with the metacercaria of *P. westermani* isolated from freshwater crabs. Sera were collected from the infected dogs from 4 to 133 days for circulating antigen detection, and dynamics of the CAg in the sera of dogs were observed by dot-ELISA before and two months after praziquantel treatment. Dynamics of the specific antibody in sera of the dogs infected with *P. westermani* were observed with ELISA in different periods from 2 weeks to 19 weeks after the infection. Results Circulating antigen was firstly detected on the 6th day in the infected dog experimentally, and circulating antigen can be detected in all of the 6 dogs on the 10th day, with dilution level from 1:8 to 1:128, the highest dilution level being 1:256 on the 14th day and maintained to 34th day. The dilution title gradually decreased since 56th day to zero on the 84th day. The level of circulating antigen in serum increased temporarily 3 days after treatment with praziquan-

收稿日期: 2007-06-08

作者简介: 陈韶红 (1966~) 女, 浙江人, 公共卫生硕士 (MPH) 研究生, 寄生虫免疫学专业。

tel for the dogs infected with *P. westmani* and gradually decreased since 6th day after treatment until it disappeared. Specific antibody was detected in the infected dogs 4 weeks after the infection and the highest titer of the antibody was seen from 4 to 12 weeks after infection and thereafter maintained at a comparatively higher level. Conclusion The circulating antigen can be detected in sera of dogs 10-56 days after the infection and so it has an earlier diagnostic value. The circulating antigen occurred temporarily after treatment with praziquantel in infected dogs and disappeared gradually in one week.

**Key words** *Paragonimus westmani*; circulating antigen; antibody; dog

我国并殖吸虫分布广泛,种类繁多。有许多并殖吸虫感染者痰液中找不到并殖吸虫卵和无典型临床症状,病原诊断十分困难<sup>[1-5]</sup>。为了阐明寄生虫与宿主之间的关系,近年来有学者用实验动物来观察抗卫氏并殖吸虫循环抗原的动态变化,观察在小鼠体内感染囊蚴数量和次数之间的关系<sup>[6-7]</sup>,以及卫氏并殖吸虫童虫在终宿主体内移行过程的发育生理与微环境的关系<sup>[8-10]</sup>,从而为实验诊断技术打下基础。因此,通过实验感染适宜宿主动物并观察其血清中循环抗原和抗体的出现时间和维持水平的动态变化,来判定感染时间长短和感染度,对今后并殖吸虫感染的早期检测和疗效考核有着重要的临床意义。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物的感染** 从浙江省永嘉县大若岩村肺吸虫病流行区抓取的溪蟹盛放于竹筒中,把溪蟹捣碎,40目铜筛过滤、沉淀,在解剖镜下挑取卫氏并殖吸虫囊蚴。感染犬龄为24月龄,体重 $10\text{ kg}\pm 100\text{ g}$ 的实验犬(由上海动物医学中心提供),共计20只。在实验前均经过沉淀法粪便检查2次,证实无卫氏并殖吸虫感染,并经过肠道蠕虫的驱虫治疗后,每只犬喂200只囊蚴。感染犬于感染后59~70 d分别在粪便中查见并殖吸虫卵。

**1.2 成虫可溶性抗原的制备** 将感染卫氏并殖吸虫囊蚴(200只/犬)3个月的犬剖杀,从肺中分离出卫氏并殖吸虫成虫,用0.9%生理盐水洗净后,丙酮脱脂处理,加0.01%柳硫汞氯化钠,冻融3 d每天2次,超声粉碎3次,低温离心30 min,转速7000 r/min,上清为抗原,用PBS适当稀释后以PBS做空白对照于分光光度计测紫外吸收值。成虫可溶性抗原:蛋白含量为 $18.8\text{ mg/mL}$ 。

**1.3 多抗的制备** 选择成年雄性健康家兔,采用背部皮下多点免疫法免疫家兔。得到卫氏并殖吸虫多克隆抗体(PW-IgG),效价(ELISA法)测定结果1:40 000。

**1.4 动物分组** 按常规方法从阳性溪蟹中分离卫

氏并殖吸虫囊蚴并定量感染家犬13只,每只感染200只囊蚴。第一组为循环抗原检测组(6只),第二组为特异性抗体检测组(4只),第三组为吡喹酮治疗组(3只),第4组为正常对照组(3只)。

**1.5 血清的收集** 对饲喂卫氏并殖吸虫囊蚴的犬,第一组:从感染后4、6、10、14、18、24、28、34、56、84、133 d开始抽血并分离血清;用于循环抗原检测。第二组:从第2、4、6、8、10、12……19周抽血并分离血清用于检测抗体;第三组:治疗前、治疗后3、6、9、12 d抽血并分离血清;正常犬抽血并分离血清。

**1.6 CAb-ELISA法检测抗体** 用卫氏并殖吸虫成虫可溶性抗原包被96孔酶标板,包被浓度 $1:1\ 800$ ( $10.4\ \mu\text{g/mL}$ ),每孔 $100\ \mu\text{L}$ ,4℃过夜。待检犬血清稀释度1:200,37℃ 1h PBS/T洗涤3次,羊抗犬IgG-HRP结合物稀释度1:2 000,37℃仅应1h PBS/T洗涤3次,加底物OPD,2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 液终止反应,490nm测OD值。同时设空白和正常犬对照。判断标准:多份正常犬血清平均OD值为阴性参考值,感染犬血清检测值/阴性参考值(P/N) $\geq 2.0$ 为阳性临界值。

**1.7 CAg-dot-ELISA直接法检测循环抗原** 以待检血清犬血清1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256稀释(大约 $1\ \mu\text{L}$ )在硝酸纤维膜上点样,37℃ 2h,4℃冰箱备用。用PBS/T(或1%小牛血清)封闭洗涤1h,加多抗(HRP-PW-IgG)酶结合物工作浓度1:40,室温摇床反应2h PBS/T洗涤15 min,加4-氯-1萘酚和3,3-二氨基联苯氨混合底物,蒸馏水清洗终止反应。以出现黄兰色斑点判断为阳性,不出现为阴性,同时设空白和正常犬对照。

## 2 结果

### 2.1 抗体变化情况

**2.1.1 CAb-ELISA法检测感染犬特异性抗体变化** 共人工感染家犬4只,用CAb-ELISA方法观察犬血清中特异性抗体变化。感染后第4周时犬血清中特异性抗体滴度上升,至第6-8周为高峰,然后持续

维持在这一水平上,12 周后 3 只犬因环境和体质原因自然死亡,无法观察到其抗体水平变化,而唯一的一只成活的感染犬血清中的抗体还能检测到。(见图 1)

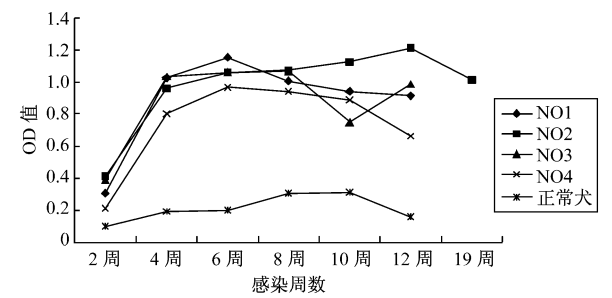


图 1 ELISA 法检测感染卫氏并殖吸虫犬血清抗体 (CAb) 的动态变化

Fig 1 Detection on changes of antibody in sera of the dogs infected with *P. westermani* by ELISA

2.2 循环抗原的变化情况

2.2.1 CAg-dotELISA 法检测感染犬血清中循环抗原变化 用 dot-ELISA 法检测 6 只感染犬在不同时间内(从感染后 4、6、10、14、18、24、28、34、56、84、133d)血清中的循环抗原 (CAg)变化情况。结果 2 只犬在感染后 6 d 能检测到 CAg 10 d 后 6 只感染犬都能检测到循环抗原,检出稀释度在 1:8~1:128 之间;至 14 d 时,最高稀释度可达到 1:256,并一直维持到 34d,56d 以后逐渐下降,到 84d 下降至零(图 2)。

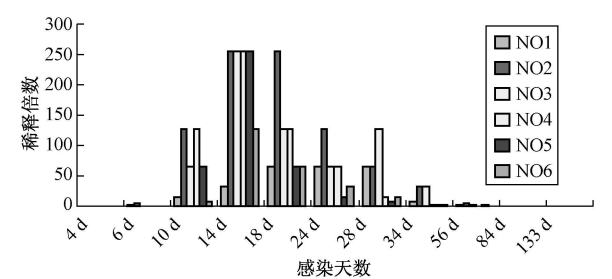


图 2 dot-ELISA 法检测感染犬不同时间循环抗原 (CAg) 的动态变化

Fig 2 Detection on changes of circulating antigen in sera from infected dogs at different times by dot-ELISA

2.2 dot-ELISA 法检测感染犬治疗前后循环抗原 (CAg) 对感染卫氏并殖吸虫囊蚴 2 月的犬进行治疗,用吡喹酮治疗按 120 mg/kg 剂量喂药,总剂量 3.6 g/犬,喂药后 d3、6、9、12 抽血,用 dot-ELISA 法检测循环抗原发现用吡喹酮治疗后 d3 能检测到循环抗原,6d 开始逐渐下降,12d 以后消失。(图 2)

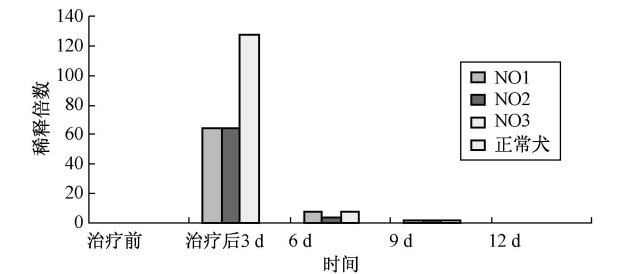


图 3 吡喹酮治疗前后感染卫氏并殖吸虫犬血清中循环抗原 (CAg) 的动态

Fig 3 Circulating antigen dynamic in sera of dogs infected with *westermani* before and after praziquantel treatment

3 讨论

机体在感染并殖吸虫后,机体免疫应答非常快速,章子豪<sup>[11]</sup>等报道在适宜宿主犬体内抗成虫特异性抗体出现时间是 d40、80 达到高峰,感染后 90~100d 后下降。比较本文实验结果,感染犬血中特异性抗体出现的时间为 4 周左右,抗体最高滴度维持时间为 4 周~12 周,直到 19 周(133d)时,抗体的滴度还维持在一个较高水平,表明犬体内抗体反应动态具有明显的期特异性<sup>[11]</sup>。从实验动物解剖结果中发现,犬在感染卫氏并殖吸虫囊蚴 60 d 后,虫体大多在肺部形成了囊腔,封闭了虫体抗原的释放<sup>[9]</sup>,与并殖吸虫在适宜宿主体内约需 70~90 d 发育成熟的时间相吻合。这和犬抗体滴度高峰开始与下降的时间基本一致,提示卫氏并殖吸虫虫囊的形成与宿主的抗体反应有着密切的联系。由于抗体在宿主体内出现的时间为 4~6 周后,因此,在感染早期较难检测到抗体。

由于循环抗原比抗体出现的时间早,临床上具有早期诊断的价值<sup>[15-16]</sup>;国内曾有研究者用多抗对感染卫氏并殖吸虫的犬和大白鼠的循环抗原进行观察,认为适宜宿主循环抗原的检出时间最早为 4d 适宜宿主感染 60 d 内检出循环抗原的几率较高<sup>[17]</sup>。张耀娟<sup>[12]</sup>等用单克隆抗体 (McAbA<sub>3</sub>D<sub>3</sub>) 检测感染犬循环抗原认为犬感染卫氏并殖吸虫后 d4 就检测到循环抗原,5~6 d 囊蚴和成虫抗原大幅度升高,到 19 d 循环抗原的滴度可高达 1:5120,60 d 后降低至低水平。本实验室用自制的多抗 (PW-IgG) 检测感染犬循环抗原的实验结果是 6 d 可检测到循环抗原,14 d 检出循环抗原的最高滴度为 1:256,10~34d 为循环抗原出现的高峰时间,56 d 后逐渐降低,检测结果达到与单抗检测同样的效果。由

此得出在 10~56d 这段时间用多抗 (PW-IgG) 来检测循环抗原进行早期诊断具有一定的临床意义, 但动物与人体感染肺吸虫后循环抗原出现的时间是否一致? 这有待进一步研究。

随着感染时间的推移, 发现 56d 以后感染犬血清中的循环抗原逐渐下降, 这可能是虫囊形成以后封闭了虫体抗原的物质释放, 与虫体到达肺部形成虫囊的时间是一致的, 也可推测循环抗原与机体产生的抗体形成免疫复合物不断的被中和<sup>[18]</sup>, 也是血清中循环抗原逐渐消失的原因之一。作者应用自己建立的 dot-ELISA 法, 以抗卫氏并殖吸虫成虫多克隆抗体 (PW-IgG) 检测感染犬的循环抗原, 发现在用药物治疗后, 犬体内循环抗原会出现短暂回升, 以后又快速下降, 这一现象反映虫体破囊而出或死亡, 从而使抗原物质大量释放, 也证实了虫体死亡抗原很快消失的情况, 提示我们治疗是有效的。这一现象同时也证明了吡喹酮对并殖吸虫的杀伤作用可靠, 虫体死亡时大量抗原释放, 并激起强烈的抗体应答, 在数日内循环抗原及其对应的抗体迅速上升并达到高峰, 而后下降, 尤其是循环抗原更为迅速, 所以它为疗效考核提供了有价值的实验资料。

从本实验研究中发现, 循环抗原比抗体的出现时间早, 维持时间短, 经治疗出现短暂升高后, 又迅速下降, 而抗体较循环抗原的维持时间长。所以, 宿主体内循环抗原和特异性抗体的变化规律为我们了解并殖吸虫感染情况、组合不同检测方法来确诊并殖吸虫的感染程度具有较高的临床意义。

#### 参考文献:

- [1] 石君帆, 钱凯先, 段芸芬, 等. ELIB 检测并殖吸虫病患者治疗前后血清中特异性短程抗体的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(6): 72-74.
- [2] 晋雪香, 崔晶, 王中全, 等. IFAT 诊断并殖吸虫病的研究. 中国寄生虫病防治杂志 [J]. 1997, 10(2): 153-154.
- [3] 段芸芬, 寿干成, 宋昌存, 等. 应用酶联免疫吸附试验检测非肺型肺吸虫病的初步研究 [J]. 浙江医学研究院院报, 1985, 12(36): 62-64.
- [4] 沈中立, 雷昌球, 李文钧, 等. 酶联免疫吸附试验诊断肺吸虫病的初步研究 [J]. 浙江医学, 1980, 2(6): 4-6.
- [5] Rim H J, Kim S J, Sun I J, et al. Antigenic localities in the tissues of *Paragonimus westermani* by developmental stages using immunogold labeling method [J]. Kisaengchunghak Chapchi 1992, 30(1): 1-14.
- [6] 严涛, 张惠群, 董长安. 卫氏并殖吸虫在小鼠体内的检出情况与感染次数和感染量的关系 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1993, 5(5): 279-281.
- [7] 张永刚, 宫志军, 于吉安, 等. 卫氏并殖吸虫囊蚴人工感染鸭鹅的实验研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13(1): 78.
- [8] 林建根, 姚丽君, 魏雪英. 小品系卫氏并殖吸虫童虫在终宿主体内生长发育的动态分析 [J]. 地方病通报, 1993, 8(1): 74-77.
- [9] 朱金昌, 陈国荣, 叶德育. 大白鼠卫氏并殖吸虫病的免疫反应 [J]. 温州医学学报, 1991, 4: 205-207.
- [10] Fukuda K, Fujino T, Oguma T, et al. 1993. Studies on host specificity in *Paragonimus westermani* ultrastructural study of inflammatory reactions to the parasite in rat muscles [J]. Int J Parasitol 23(6): 757-763.
- [11] 章子豪, 沈一平, 吴观陵, 等. 犬和大白鼠感染卫氏并殖吸虫后的抗体反应动态 [J]. 上海免疫杂志, 1982, 2(4): 6-9.
- [12] 张耀娟, 史志明, 章子豪, 等. 卫氏并殖吸虫感染犬循环抗原的动态观察 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1993, 6(3): 191-194.
- [13] 章子豪, 沈一平, 赵慰先. 卫氏并殖吸虫在大白鼠体内的发育和吡喹酮治疗的观察 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1983, 1(1): 53-56.
- [14] 高劲松, 刘约翰, 王小根, 等. 大剂量吡喹酮治疗家犬卫氏并殖吸虫感染的实验观察 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(3): 61-62.
- [15] Yang W, Shen Y, Zhang Z. Parasitic circulating antigens in hosts with *Filaria bancrofti* [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 1994, 74(3): 155-157, 191.
- [16] Yong T S, Kim T S, Lee J S, et al. Detection of circulating antigens in rats experimentally infected with *Paragonimus westermani* by ELISA [J]. Kisaengchunghak Chapchi 1987, 25(2): 141-148.
- [17] 冯笑川, 沈一平, 蔡士春. 感染卫氏并殖吸虫的犬和大白鼠循环抗原动态观察 [J]. 上海免疫学杂志, 1989, 9(5): 267-269.
- [18] 段义农, 邵义群, 朱顺星, 等. 卫氏并殖吸虫感染犬循环免疫复合物和循环抗原的动态比较 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(5): 52-53.