

我国并殖吸虫病免疫诊断研究进展

陈韶红 周晓农

【摘要】 在我国,对于并殖吸虫病方面的研究已 76 年,从形态学、流行病学、遗传学、分子生物学以及免疫诊断等各个方面均取得了较大的进展。但由于并殖吸虫虫种繁多、分布广泛、临床症状表现复杂多变,因此误诊、漏诊率较高。并殖吸虫病的确诊和疗效考核已成为流行病学、寄生虫学以及临床工作者的重要难题之一。该文主要就我国并殖吸虫病免疫诊断方法的研究进展作一综述。

【关键词】 并殖吸虫病;免疫诊断;研究进展

Research progress on immunodiagnosis of paragonimiasis in China CHEN Shao-hong, ZHOU Xiao-nong. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center for Malaria, Schistosomiasis, and Filariasis, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH, Shanghai 200025, China

【Abstract】 Chinese scientists have been engaging in the researches on paragonimiasis for 76 years, and significant progress has been achieved on morphology, epidemiology, immunodiagnosis, genetics and molecular biology of the parasite. But as there are many kinds of *Paragonimus*, which distribute widely with complicated clinic symptoms, the ratio of error or miss-diagnosis has been high at different places. Thus, to diagnose paragonimiasis and check the curative effect are becoming the difficult problem in clinic, epidemiology and parasitology. This article mainly summarizes the research progress on the immunodiagnosis methods of paragonimiasis.

【Key words】 Paragonimiasis; Immunodiagnosis; Research progress

并殖吸虫病是由卫氏并殖吸虫童虫、成虫在组织器官中移行、窜扰、定居,或由斯氏狸殖吸虫幼虫在人体内移行所引起的疾病^[1]。卫氏并殖吸虫引起以肺部病变为主的全身性疾病,因虫体不仅对组织的破坏大,又有游走性,可造成身体任何组织、器官的新、旧病变,所以临床症状十分复杂。而斯氏狸殖吸虫在人体内不能发育至性成熟产卵,较少进入肺脏形成典型囊肿,因此,斯氏狸殖吸虫在人体表现为游走性皮下包块和渗出性胸膜炎。卫氏并殖吸虫病流行区有 2 种类型,即以蝾蛄为传播媒介的东北部流行区和以溪蟹为传播媒介的东南部流行区,其中流行最严重的有浙江、黑龙江和吉林省。斯氏狸殖吸虫流行区分布于我国 16 个省,以四川、湖北、湖南、贵州最严重。近年来,随着人们饮食习惯多样化、物种交流机会的增加,在部分城市也有并殖吸虫病上升的趋势。

1877 年 Westerman 在荷兰首都一头印度虎肺内首次发现并殖吸虫,1879 年 Ringer 在我国台湾省一个葡萄牙人的肺内也发现此虫,这是人体发现并殖吸虫的开端。1880 年 Manson 在台湾一个厦门患者的痰液内检获虫卵。1889 年, Braun 创立了并殖

吸虫属 (*Paragonimus*)^[2,3]。我国对并殖吸虫的研究始于 1930 年。据统计,全世界报道的并殖吸虫近 50 种,亚洲报道了 31 种。我国 21 个省均有并殖吸虫病流行,发现并报道并殖吸虫共 28 种,主要有卫氏并殖吸虫 (*P. westermani*)、斯氏狸殖吸虫 (*P. skrjabini*)、怡乐村并殖吸虫 (*P. iloktsuenensis*)、大平并殖吸虫 (*P. ohirai*)、四川并殖吸虫 (*P. szechuanensis*)、巨睾并殖吸虫 (*P. macrorchis*)、福建并殖吸虫 (*P. fukienensis*) 等。国外报道的主要有克氏并殖吸虫 (*P. kellyi*)、结实并殖吸虫 (*P. compactus*)。

在我国,对于并殖吸虫病的研究已 76 年,在形态学、流行病学、遗传学、分子生物学以及免疫诊断等各个方面均取得了较大的进展。由于并殖吸虫虫种繁多、分布广泛、临床症状表现复杂多变,因此误诊、漏诊率较高。并殖吸虫病的确诊和疗效考核已成为流行病学、寄生虫学以及临床工作者的重要难题之一。本文主要就 50 多年来并殖吸虫病免疫诊断方法的研究进展作一综述。

1 并殖吸虫病的病原学诊断

1.1 痰液或粪便中查虫卵

全球报道并殖吸虫近 50 种(包括变种、亚种以及同种异名),我国流行的虫种占其中绝大多数(约 80%),由于寄生人体的并殖吸虫其移行部位多变,临床上通常分为肺内型和肺外型两大类^[1]。检查痰液

基金项目:科技部自然资源平台项目(2005DKA21104)

作者单位:200025 上海,中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室

中的并殖吸虫虫卵是确诊人体典型肺型并殖吸虫病最可靠的方法,因此,对于以肺部寄生为主的卫氏并殖吸虫感染大多依靠检测痰液或粪便中的虫卵进行确诊。Singh^[4]用 3% NaOH 处理痰液,检查了 39 例并殖吸虫病患者,检出率为 85%。该方法也是痰液检测并殖吸虫虫卵的主要方法,能提高痰液中虫卵的检出率,也是迄今为止痰液病原学检测虫卵,并确诊肺内型并殖吸虫病的主要依据。

1.2 皮下包块组织检查

由斯氏狸殖吸虫、异盘并殖吸虫引起的肺外型并殖吸虫病很少能查到虫卵。此外,某些虫种在人体呈转续寄生,难以发育至成虫阶段,仅童虫在宿主体内长期游走,从而出现多种幼虫移行症症状,依靠病原学方法检测虫卵很难确诊。因此,当时机适宜时,可切开皮下包块查并殖吸虫童虫或嗜酸性肉芽肿进行诊断。郑志仁等^[5]对四川地区 83 例斯氏狸殖吸虫患者的皮下结节进行组织活检,并提出有夏科-雷登氏晶体、弥漫性嗜酸性粒细胞浸润、坏死的窦道的病理切片,可诊断为斯氏狸殖吸虫感染。据资料统计,斯氏狸殖吸虫病患者中皮下有游走性包块史的占 30% ~ 60%,甚至更多,而卫氏并殖吸虫病患者有皮下游走性包块的则相对较少。

2 并殖吸虫病的免疫诊断

2.1 抗体的检测

2.1.1 皮内试验

机体在感染并殖吸虫后能快速建立免疫应答。应用制备的并殖吸虫各种抗原液注射于受试者皮内,抗原与局部肥大细胞表面的 IgE 结合从而引起超敏反应,以观察红肿(丘疹和红晕)的程度判断反应的强弱。Ritchie 等^[6]对 87 例并殖吸虫病患者采用皮内试验,阳性检出率达 95%。翁心值等^[7]采用皮内试验诊断并殖吸虫病,认为此诊断方法在临床上具有诊断价值,填补了肺外型并殖吸虫病诊断方法的空白。笔者对 9 篇相关文献采用 Mata 分析,皮内试验的阳性检出率可达 93% (1 157/1 251)。此法沿用了 50 多年,简便易行,常用于流行病学调查和疑似病例的初步鉴别。但皮内试验有时会引发过敏性反应,严重时致患者休克;此外,并殖吸虫抗原与其他吸虫类(华支睾吸虫、日本血吸虫等)的感染存在交叉反应,因此近年来该方法已逐渐被新的诊断方法所替代。

2.1.2 补体结合试验

Ando 首先将补体结合试验用于诊断并殖吸虫病患者,钟惠澜等^[8,9]在 20 世纪 50 年代对抗原制备

方法进行改进后,对并殖吸虫病患者的血清进行检测,收到了良好的效果,并提出补体结合试验对早期并殖吸虫病的诊断具有重要意义。季凤阁等^[10,11]在对 28 例脑型并殖吸虫病患者的临床诊断中,采用补体结合试验检测患者的脑脊液、血清,均为阳性反应。笔者对 5 篇相关文献采用 Mata 分析,补体结合试验的阳性检出率为 77% (75/98)。但并殖吸虫病患者的血清对华支睾吸虫病、肝片形吸虫病、日本血吸虫病有交叉反应^[12]。因此,临床上仅作为诊断并殖吸虫病的一个参考指标。

2.1.3 间接血凝试验

Oelerich 与 Yolkmer 应用间接血凝试验检查尼日利亚双侧宫并殖吸虫病流行区的患者,用同源性抗原检出的阳性率达 96%,检出率较痰液、粪便检测高 3 倍,认为间接血凝试验具有疗效考核的价值^[1]。王正仪等^[13]用间接血凝试验检测卫氏并殖吸虫、斯氏狸殖吸虫病患者血清,阳性检出率达 98%,高于补体结合试验和对流免疫电泳的检出率。但此法与日本血吸虫病患者的血清交叉反应较高,故在血吸虫流行区不宜推广。笔者对 9 篇相关文献采用 Mata 分析,间接血凝试验的阳性检出率达 91% (360/394)。

2.1.4 后尾蚴膜反应

用胆汁处理并殖吸虫囊蚴使之成为后尾蚴,置患者血清中,37℃温育 24 h 后用显微镜观察,根据尾蚴周围出现的薄膜状反光沉淀物来判断阳性。樊培方^[1]于 1975 年用后尾蚴膜反应来诊断卫氏并殖吸虫感染,并对斯氏狸殖吸虫病患者治疗前后的血清进行试验,敏感性分别为 33% 与 63%。笔者对 7 篇相关文献采用 Mata 分析,后尾蚴膜试验的阳性检出率达 92% (396/431)。虽然该法简单且敏感性最高可达 97%,但由于后尾蚴来源有限,取材和保存均有局限性,因此很难应用于临床和流行病学调查。

2.1.5 对流免疫电泳

国内于 20 世纪 70 年代中期采用对流免疫电泳诊断并殖吸虫病,并证明其比琼脂双扩散试验的敏感性高 13 倍。有研究者为进一步提高此法的敏感性,将受检血清浓缩或用辣根过氧化物酶标记抗原再作电泳,效果比常规方法更好,敏感性达 94%^[14]。顾元文等^[15]用对流免疫电泳和琼脂双扩散试验诊断并殖吸虫病。童运炎等^[16]用对流免疫电泳检测 47 份并殖吸虫病患者血清,均为阳性,证明此法敏感性高,适用于并殖吸虫病的诊断。

2.1.6 免疫荧光试验

肺外型并殖吸虫病病原诊断较困难,故常依靠免疫学方法来诊断。应用并殖吸虫虫体组织切片作为抗原来诊断此病,也是临床上常用的方法之一。黄天威^[17]曾用并殖吸虫成虫石蜡切片抗原,通过免疫荧光试验检测痰卵阳性的并殖吸虫病患者 37 例,阳性符合率达 97%。王中全^[18]应用并殖吸虫成虫冰冻切片抗原,通过免疫荧光技术检测并殖吸虫病患者血清中的抗体,结果均为阳性。晋雪香^[19]应用斯氏狸殖吸虫成虫冰冻切片抗原对 47 例并殖吸虫病患者进行免疫荧光试验,敏感性达 100%,并将上述抗原与 -20℃ 保存半年至 5 年的抗原片作比较,发现抗体滴度无明显变化。认为此法对诊断并殖吸虫病具有较高的敏感性及良好的稳定性。

2.1.7 ELISA、Dot-ELISA、酶联免疫印迹试验

我国于 20 世纪 80 年代初开始应用酶联免疫吸附试验诊断并殖吸虫病,此法的敏感性高、特异性强、可重复性好,优于其他多种免疫学检测方法,是近十几年来最优选的诊断方法之一。沈中立等^[20]用 ELISA 诊断 30 例并殖吸虫病患者血清,阳性检出率达 100%,而健康人和血吸虫病患者均为阴性,说明 ELISA 具高度的敏感性和特异性。张月清等^[21]认为,虽然此法与日本血吸虫、华支睾吸虫等病出现轻度的交叉反应,但适当提高血清稀释度,交叉反应即可消失。段芸芬等^[22,23]运用 ELISA 检测卫氏并殖吸虫病取得较好的效果。笔者对 6 篇相关文献采用 Meta 分析,ELISA 的阳性检出率达 91% (303/332)。近年来,在 ELISA 的基础上发展了一种更简易、敏感、快速的 Dot-ELISA,以硝酸纤维滤膜为固相载体,基本原理和操作与 ELISA 相似^[24]。石君帆^[25]采用酶联免疫印迹技术对并殖吸虫病患者治疗前后的特异性抗体进行动态研究,认为其可用于诊断并殖吸虫病和疗效考核。因此,诊断在痰中找不到虫卵、无典型临床症状的并殖吸虫感染者及非肺型并殖吸虫病流行区的患者,应用 ELISA、Dot-ELISA、酶联免疫印迹试验均具有十分重要的意义。

2.2 抗原的检测

近年来,免疫学检测循环抗原越来越引起人们的重视^[26],因虫体的代谢抗原、腺体分泌液、脱落的虫体表层等都属于抗原性物质,检测血清中的抗原成分,可表明有活性物质的存在。由于循环抗原比抗体出现得早,临床上具有早期诊断的价值;治疗后虫体死亡,抗原很快消失,又有助于疗效考核。

2.2.1 多克隆抗体 ELISA 法

用并殖吸虫成虫可溶性抗原免疫家兔获取抗血

清,经饱和硫酸铵提纯,用二乙氨基乙基 (DEAE) 纤维素离子交换柱层析纯化,制备抗成虫抗原的抗体,采用双抗体夹心 ELISA 检测循环抗原。冯笑川等^[27]应用抗卫氏并殖吸虫成虫 IgG 的双抗体夹心 ELISA 检测 58 例并殖吸虫病患者治疗前后的血清特异性循环抗原,转阴率达 100%,而检测抗体的转阴率仅 48%,证明检测循环抗原可考核疗效,优于检测抗体。但并殖吸虫多克隆抗体的特异性较单克隆抗体差,用多抗检测并殖吸虫循环抗原,与其他吸虫存在交叉反应,故一直未在临床和流行病学上推广应用。

2.2.2 单克隆抗体 ELISA 法

随着对检测并殖吸虫循环抗原研究的不断深入,特别是并殖吸虫病患者治疗后特异性抗体水平下降缓慢,研究者开始用并殖吸虫的囊蚴和成虫分别制备并筛选出多种抗囊蚴和成虫的单克隆抗体,以检测并殖吸虫病患者的早期感染情况和疗效考核^[28]。史志明等^[29,30]制备了分泌抗卫氏并殖吸虫囊蚴抗原单克隆抗体,并通过 ELISA 夹心法检测并殖吸虫早期感染者,38 例均阳性,健康人则均阴性。1993 年章子豪等引进美国哈佛大学的技术和方法,制备并建立了 P. WM 和 P. WA-Meb 酶联免疫吸附试验检测卫氏并殖吸虫循环抗原,具有高度的敏感性与特异性,为诊断卫氏并殖吸虫现症活动性感染与疗效考核提供了可靠的检测指标,并为今后研究制备标准试剂盒奠定了基础^[31]。但获取特异性高的单抗十分困难。由于单抗的效价不稳定等因素的存在,很难在临床上推广应用,国内目前也仅少数科研机构用其进行研究。近年来,虞蔚岩等^[32]采用金标免疫渗滤法检测卫氏并殖吸虫循环抗原,取得了较好的结果,采用金标免疫渗滤法检测 59 例卫氏并殖吸虫病患者,阳性检出率达 97% (57/59),与其他寄生虫作交叉反应,特异性达 99%。因此,深入检测循环抗原的研究有利于临床上对并殖吸虫感染作早期诊断,有利于疗效的考核、对预后的判断,也可减少临床上的误诊。

3 并殖吸虫病的分子生物学诊断

自 20 世纪 50 年代以来,分子生物学一直是生物学的前沿与生长点。刘云霞^[33]应用混合单抗双抗体夹心法 ELISA 诊断罕见混合型并殖吸虫病。常正山等^[34]从卫氏并殖吸虫病患者痰液中分离出虫卵,通过基因序列分析,可以确诊患者所感染的虫种类型,并将虫卵 ITS2 基因序列与卫氏并殖吸虫参照株基因序列比较,同源性为 100%,而与斯氏狸殖

吸虫的基因仅 92% 的同源性。凌家俭^[35]从卫氏并殖吸虫成虫 cDNA 文库中筛选并鉴定用于卫氏并殖吸虫病免疫诊断与免疫预防的基因克隆,运用预吸收成虫抗原免疫兔血清筛选阳性克隆。刘静^[36]运用二次杂交瘤技术制备了分泌抗卫氏并殖吸虫囊蚴 (PWH) 以及抗辣根过氧化物酶 (HRP) 双特异性单抗 (BSMab) 的三源杂交细胞株,并以此检测卫氏并殖吸虫病患者体内特异性循环抗原,从而为分子生物学诊断提供了又一新的诊断手段。

4 结语

并殖吸虫病临床表现的多样性与复杂性对其诊断提出更高的要求。病原学、免疫学、影像学、分子生物学诊断均取得了可喜的结果。自 20 世纪 50 年代皮内试验的初次应用,80 年代 ELISA、免疫荧光试验、诊断抗原纯化技术的广泛应用,到 90 年代单克隆抗体杂交瘤细胞技术的推广和特异的 DNA 基因文库制备 DNA 探针的兴起,寄生虫病免疫学诊断的研究重点经历了从查抗体到查抗原的转移,这也将是并殖吸虫病免疫诊断的新方向。

参 考 文 献

- [1] 赵慰先,主编. 人体寄生虫学. 北京:人民卫生出版社,1983. 414-437.
- [2] Manson P. *Distoma ringieri*. Medical Report, 1880, 20:10-16.
- [3] Miyazaki I. Two types of the lung fluke which has been called *Paragonimus westermani* (kerbert, 1878). Jap Med J, 1978, 54 (4):251-263.
- [4] Singh TS, Mutum SS, Razaque MA, et al. Pulmonary paragonimiasis: clinical features, diagnosis and treatment of 39 cases in Manipur. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1986, 80(6):967-971.
- [5] 郑志仁. 对四川地区 83 例肺吸虫皮下结节的观察. 中华病理学杂志, 1963, 7(2):79.
- [6] Ritchie LS, Hunter GW, Pan C, et al. Skin tests for paragonimiasis with antigens from adult worms of *Paragonimus westermani*. J Parasitol, 1951, 37 (Suppl):28.
- [7] 翁心值,贺联印,钟惠澜. 等. 肺吸虫病皮内试验临床价值的研究. 中华医学杂志, 1954, 3:182.
- [8] 钟惠澜,候宗昌,翁心值. 等. 肺吸虫病补体结合试验的临床诊断价值. 中华医学杂志, 1954, 72(3):178.
- [9] 钟惠澜. 肺吸虫病补体结合试验进一步的研究与吸虫类补体结合试验的交叉免疫反应. 中华医学杂志, 1955, 41 (12):1212.
- [10] 季凤阁,王箐箐,邓卫康. 脑型肺吸虫病 28 例临床分析. 贵州医药, 1985, 9(2):14-16.
- [11] 屠宝琦. 肺吸虫补体结合试验初步报告. 中华内科杂志, 1956, 4(4):189.
- [12] 蔡士椿,沈一平. 几种吸虫抗原对肺吸虫病人血清交叉反应的初步试验. 寄防简报, 1980, 5:38-39.
- [13] 王正仪. 间接红细胞凝集试验诊断肺吸虫病的观察. 中华医学检验杂志, 1979, 2(1):1-2.
- [14] Hu XS, Feng RY, Hu AQ, et al. Immunodiagnosis of paragonimiasis by counterimmunoelectrophoresis and agar gel diffusion. Chin Med J (Engl), 1980, 93(8):557-561.
- [15] 顾元文,叶永祥,邓吉邨. 卫氏肺吸虫病 200 例临床观察. 中华医学检验杂志, 1983, 6(4):244.
- [16] 章运炎. 对流免疫电泳诊断肺吸虫病的实验观察. 中华医学检验杂志, 1983, 6(4):244.
- [17] 黄天威. 成虫石蜡切片免疫荧光技术诊断肺吸虫病. 浙江医科大学学报, 1986, 15(2):49.
- [18] 王中全,晋雪香,崔晶. 等. 皮内试验和间接荧光抗体试验诊断并殖吸虫病的初步研究. 郑州大学学报, 1993, 28(4):317-319.
- [19] 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, 1997, 10(2):154.
- [20] 沈中立,雷昌球,李文钧. 等. 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 诊断肺吸虫病的初步研究. 浙江医学, 1980, 2(6):4-6.
- [21] 张月清. 应用酶联免疫吸附试验诊断肺吸虫病的观察. 中华微生物学和免疫学杂志, 1982, 1(1):54-56.
- [22] 段芸芬,寿干城,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. 浙江医学研究院院报, 1985, 12 (36):62-64.
- [23] 寿干城,段芸芬,汪小卫. 等. ELISA 检测肺吸虫抗体的临床应用. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1987, 5(1):73.
- [24] 蒋作君,沈一平. 国产混合纤维素膜为载体的点免疫结合试验. 生物化学与生物物理进展, 1988, 15(2):156.
- [25] 石君帆,钱致先,段芸芬. 等. ELISA 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. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(6):72-74.
- [26] Knobloch J, Paz G, Feldmeier H, et al. Serum antibody levels in human paragonimiasis before and after therapy with praziquantel. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1984, 78(6):835-836.
- [27] 冯笑川,沈一平. 并殖吸虫病治疗前后循环抗原检测结果分析. 中国寄生虫病防治杂志, 1990, 3(2):136.
- [28] 蒋作君. 应用抗 PWMJ-Sag 单克隆抗体诊断早期和肺外型卫氏并殖吸虫病病人循环抗原的研究. 中国血吸虫病防治杂志, 1990, 2(2):46.
- [29] 史志明,章子豪,沈一平. 分泌抗卫氏并殖吸虫囊蚴抗原单克隆抗体的制备. 南京医科大学学报, 1988, 8(4):273.
- [30] 史志明,沈一平. 应用单克隆抗体 ELISA 双抗体法检测肺吸虫病循环抗原. 南京医科大学学报, 1989, 9(2):146.
- [31] 章子豪,张耀娟,陆志刚. 等. 卫氏并殖吸虫囊蚴和成虫抗原的分析及单克隆抗体识别. 中国寄生虫病防治杂志, 1994, 7 (4):266-268.
- [32] 虞蔚岩,侯敏,张耀娟. 金标免疫渗滤法检测卫氏并殖吸虫循环抗原的研究. 南京医科大学学报, 2002, 22(6):483-485.
- [33] 刘云霞,宋晓福,张霞. 等. 用混合单抗双抗体夹心-ELISA 法诊断罕见混合型肺吸虫病一例. 南京医科大学学报, 1996, 16 (3):318.
- [34] Chang ZS, Wu B, Blair D, et al. Gene sequencing for identification of *Paragonimus* eggs from a human case. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2000, 18(4):213-215.
- [35] 凌家俭,章子豪,张跃娟. 等. 卫氏并殖吸虫成虫 cDNA 文库的多抗筛选. 南京医科大学学报, 2001, 21(6):473-475.
- [36] 刘静. 抗肺吸虫囊蚴和抗辣根过氧化物酶双特异性单克隆抗体的研究及应用. 见:南京医科大学. 硕士生论文集. 2000. 401.

(收稿日期:2006-09-01)

(本文编辑:刘悦)