

- [7] T. Ohkawara, K. Miyashita, J. Nishihira, et al. Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis *Clinical & Experimental Immunology* Volume 140 Issue 2 Page 241 - May 2005
- [8] H. Murakami, SK. MD. Fazle Akbar, H. Matsui, et al. Macrophage migration inhibitory factor in the sera and at the colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: clinical implications and pathogenic significance *European Journal of Clinical Investigation* Volume 31 Issue 4 Page 337 - April 2001
- [9] H. MURAKAMI, S. M. F. AKBAR, H. MATSUI, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis *Clinical & Experimental Immunology* Volume 128 Issue 3 Page 504 - June 2002
- [10] Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205
- [11] Farrell JR, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet* 2002; 359: 331-40.
- [12] Shigeo Inoue, Takayuki Matsumoto, Mitsuo Iida, et al. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity *American Journal of Gastroenterology* Volume 94 Issue 9 Page 2441 - September 1999
- [13] MELGAR, M. M.-W. YEUNG, A. BAS, et al. Over-expression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis *Clinical & Experimental Immunology* Volume 134 Issue 1 Page 127 - October 2003
- [14] Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302.
- [15] Ivan J. Fuss, Frank Heller, Monica Boirivant, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis 2004 May 15; 113(10): 1490-1497
- [16] Yuriko Tsukada, Tetsuo Nakamura, Mitsutoshi Iimura, et al. Cytokine profile in colonic mucosa of ulcerative colitis correlates with disease activity and response to granulocytapheresis *American Journal of Gastroenterology* Volume 97 Issue 11 Page 2820 - November 2002

## 人群血吸虫病抗体水平检测方法研究进展

罗兴建<sup>1</sup>, 周晓农<sup>2</sup>, 肖邦忠<sup>1</sup>

(1 重庆市疾病预防控制中心, 重庆 400042; 2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所)

血吸虫病是一种严重危害人类健康、影响全球经济发展的重要寄生虫病, 流行于76个国家和地区<sup>[1]</sup>。为了有效控制和消灭此病, 国内外许多学者进行了大量的研究, 试验了多种实验室诊断、检测技术, 而人群抗体水平检测作为一种间接检测方法, 因其较高的灵敏性、特异性、简便易行等优点在该病的诊断和流行病学调查中具有重要意义。下面就目前研究和应用较多的人群血吸虫病抗体水平检测诊断

【作者简介】罗兴建(1968-)男, 重庆市人, 副主任医师, 主要从事疾病控制工作。

方法进行综述。

## 1 常用检测方法

人群血吸虫病抗体水平研究的血清学方法主要有胶乳凝集试验(LA)、环卵沉淀试验(COPT)、间接血球凝集试验(IHA)、间接荧光抗体试验(IFAT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等,均建立在用已知抗原制剂去检测标本中可能存在的特异性抗体,具有一定的灵敏性和特异性<sup>[2]</sup>。

1.1 胶乳凝集试验(LA) LA无需特殊器材,具有敏感性高,特异性强,操作方便,获得结果迅速、重复性好等优点,但其的胶乳颗粒本身的性状以及致敏的方法等对其稳定性、敏感性有很大影响<sup>[3]</sup>。

1.2 环卵沉淀试验(COPT) COPT具有较高的敏感性和特异性,综合查病应用较多。常见有双面胶纸法和塑料管法,双面胶纸法稍优于塑料管法。双面胶纸法具有操作简便,方法规范,正确率高,省工、省时,提高工效等优点;塑料管法则具有器材简单,便于携带,采血方法易为群众接受,节约材料等优点,但采血量小,重复实验有困难<sup>[4]</sup>。

COPT沉淀反应常受多种因素影响,其中一个重要因素是干卵抗原的免疫活性。俞文美等<sup>[5]</sup>研究发现,干卵抗原虫卵的免疫活性大小直接影响COPT的环沉率,认为需探讨鉴定干卵抗原免疫活性的新指标,即最终阳性稀释度。同时相对于胶体染料试纸条,COPT有操作技术要求高,反应时间较长(48-72 h),需要专用的仪器和设备,大规模现场查病受一定限制等缺点<sup>[6]</sup>。

1.3 间接血球凝集试验(IHA) IHA具有敏感性高、简便、快速等优点,广泛应用于诊断和现场普查中。Van Gool T等<sup>[7]</sup>曾用成虫抗原致敏红血球作为抗原,对曾患曼氏血吸虫病的75名患者、埃及血吸虫病的20名患者和临床钉螺热患者10名进行间接血球凝集试验,当阳性判断值为1:160(WA/IHA(160)),其灵敏度分别为88.0%、80.0%、86.0%和70.0%,特异度为98.9%。当阳性判断值1:80(WA/IHA(80))其灵敏度分别为94.7%、92.0%、94.0%和90.0%,特异度为94.7%。张建等<sup>[8]</sup>研究证明IHA与金标准COPT相比,具有敏感度高,特异性好,准确度高,且不易发生误诊的显著特点。彭喜松等研究表明IHA检测血吸虫病高抗体滴度的敏感性大大高于LA<sup>[9]</sup>。

1.4 间接荧光试验(IFT) IFT是最早用作血吸虫病的血清学诊断方法之一,主要用于血吸虫病的研究、抗原定位以及低流行区或非流行区血吸虫病的诊断和疫情监测。敏感性高是其主要特点。IFT与环卵沉淀试验(COPT)对107例血吸虫病人的检出率分别为95.3%和82.4%<sup>[10]</sup>;与dot-ELISA同时对3个流行村低年龄组儿童进行检测,IFT阳性检出率在低流行村为1.33%,在两个高流行村分别为11.52%和15.79%,而dot-ELISA仅在高流行村检出1例阳性<sup>[11]</sup>。Burlandy-Soares等<sup>[12]</sup>采用IHA和加藤法检测低流行区人群抗体水平,IgM-IHA、IgG-IHA检测流行率分别为33.5%、33.2%,Kato-Katz法仅为1.6%。Silva等<sup>[13]</sup>采用IgG-ELISA、IgM-IFAT及加藤法等三种方法,对曼氏血吸虫病低流行区的650名学童作流行病学监测,阳性率分别为43.0%、56.2%及8.5%,IFAT监测效果明显高于病原学方法。

1.5 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)是利用免疫反应的高度特异性和酶联反应的高度敏感性进行抗体或抗原的检测,是一种可以定性和定量的综合性技术。它具有敏感、特异、高效、经济、方便、安全的特点,应用广泛<sup>[14]</sup>。敏感性可达88.8%-98.3%,但对健康人有不同程度的假阳性,对其它寄生虫感染也有一定的交叉反应。近年来,研究最多的有以下几种改进方法。

1.5.1 纯化抗原的ELISA法 使用纯化抗原(组分抗原)可显著提高ELISA的特异度,减少交叉反应。沈健<sup>[15]</sup>用SDS-PAGE聚丙烯酰胺凝胶电泳分离技术获得纯化抗原与粗抗原比较。两种方法在检测急性和慢性患者血清时,纯化抗原的阳性率分别为91.77%和90.14%,粗抗原的阳性率分别为94.74%和95.77%,差异无显著性;检测华枝睾吸虫患者血清30份,肺吸虫患者血清10份,姜片虫患者15份和健康人血清70份,组分抗原均未检出阳性;粗抗原检出阳性7份,假阳性率为5.60%,其中华枝睾吸虫病人、肺吸虫病人和健康人血清的假阳性率分别为6.61%、30.00%和2.86%。黄跃龙等<sup>[16]</sup>用过碘酸钠处理粗抗原后

作对比试验,灵敏度差异无显著性,特异度增高显著。Doenhoff等<sup>[17]</sup>运用纯化抗原和粗抗原对患者治疗6月前后抗体水平检测,前法患者抗体水平滴度光密度值(OD)下降程度显著高于后法,分别下降60%和45%。

1.5.2 捕获-ELISA法 应用Cystatin捕获血吸虫吐出物中的半胱氨酸蛋白酶,再进行ELISA试验检测患者血清中的特异性抗体,具有敏感且高特异性的特点。该法由Ikeda<sup>[18]</sup>首先用于肝片吸虫和并殖吸病人血清抗体检测,获得较高的灵敏度和特异度。黄跃龙等<sup>[19]</sup>在人群血吸虫病的检测中应用本法与成虫分泌物抗原(ES)、成虫抗原(AWA)和虫卵抗原(SEA)进行对比试验,通过对慢性患者、非疫区健康者和华支睾吸虫患者的检测,Cystatin-ELISA慢性患者检测阳性率为98.3%,另两组未检出;而ES、AWA、SEA的慢性患者检测阳性率分别为89.2%、90.8%、93.3%,非疫区健康者检出阳性率分别为13.1%、13.1%、7.1%,华支睾吸虫病患者要检出阳性率为19.4%、16.7%、11.1%。

1.5.3 斑点-ELISA(Dot-ELISA) Dot-ELISA技术是在进行ELISA测定时,借用了免疫印迹技术的原理和方法,操作更为方便、简单、快速和经济实用。主要优点是在定性和半定量检测两个方面。沈定文等<sup>[20]</sup>曾用Dot-ELISA和常规ELISA检测117例急性血吸虫病患者血清抗体,阳性率分别为94.0%和97.4%,高于粪便阳性率(92.3%),两法检测结果符合率达96.6%;检测108例粪检阳性患者,两法阳性率分别为94.4%和97.2%,符合率为97.2%;但对肝吸虫病25例和健康人50例检测均出现不同程度的交叉反应。

Dot-ELISA试验中使用的抗原不同,特异度亦不同。沈定文等<sup>[21]</sup>曾用组分抗原、虫卵抗原和成虫抗原检测108例患者血清中的特异性IgG抗体,检出率分别为92.6%、94.4%和95.4%,组分抗原检测健康人50例和肝吸虫患者25例,均为阴性,肺吸虫患者20例,1例阳性,虫卵抗原和成虫抗原对健康人、肝吸虫和肺吸虫患者均有不同程度的交叉反应;三者敏感度无差异,但特异度组分抗原显著增高。

1.5.4 NP30快速ELISA 抗独特型抗体NP30快速ELISA检测急性慢性血吸虫病人血清抗体取得了与虫源性抗原相似的结果,具有快速、简便、适用于现场的特点<sup>[22]</sup>;该法检测治疗后病人血清结果与经典抗体检查法结果比较,治疗后患者血清抗体阴转率NP30检测法明显高于经典抗体系统<sup>[23]</sup>。

1.5.5 PCR-ELISA PCR-ELISA是运用分子生物学技术和免疫学技术的一种实验室检测方法,它原理是通过PCR将样本中极微量的病原核酸进行扩增放大,扩增产物直接与特殊标记的已固化在微孔板上的特异探针反应,加热开链,复性时探针与开链结合,再与酶标记的抗体反应、显色、读OD值。较PCR和ELISA,具备了更特异、敏感、简便、快速、客观和优点,适于大量血样本检测。该法已逐步在相关疾病控制领域应用,如乙肝病毒<sup>[24]</sup>、汉坦病毒<sup>[25]</sup>、结核杆菌<sup>[26]</sup>等病原的检测,但国内外尚少见在血吸虫病防制中应用的报道。

## 2 检测方法的研究

2.1 定性检测 主要是用于未知感染者的诊断,目前的分子生物学和免疫学检测方法均可进行血吸虫病的实验室抗原或抗体的定性检测,结果判定仅为阴性或阳性,在检测时不需要对样本多倍稀释和作标准曲线,相对定量检测,操作较为简单,是应用最广泛的检测技术<sup>[27]</sup>。

2.2 定量检测 抗体的定量检测方法多为免疫学方法,其终点判定方法在不断改进中。通常用来表示抗体水平的方法有终点滴度和光密度值法。终点滴度法由于终点靠近ELISA剂量反应曲线的坪区,结果可能不准确且易变,加之连续稀释造成综合性的技术误差,使检测的变异系数可达±100%;光密度值法只需单一稀释度即可进行血清测定,节省试剂、器材,重复性较好,变异系数为±10%。因此光密度法在实际工作中运用越来越普遍<sup>[28,29]</sup>。

但ELISA法反应步骤较多,测量值易受包板、环境、酶联检测仪等因素影响,不同时间、不同实验室、不同包板之间都可能存在一定的系统误差,使OD值难以进行比较。吴海玮等<sup>[30]</sup>从反应动力学角度出发,提出校正公式,较准确地反映了ELISA中抗体与OD值之间的关系。用其对不同酶标板、不同时间检测的待测血清的OD值进行校正后,同一血清校正值的变异系数小于4%。

2.3 联合检测 各种免疫学检测方法,因其影响因素较多,存在不同的灵敏度和特异度,在现场检测中,呈现出不同的假阳性和假阴性<sup>[31]</sup>。运用联合检测,可提高检测的灵敏度和特异度,增加检测结果的可行度。

2.3.1 串联检测 采用多种检测方法同时检测,均为阳性,即判为阳性。该法可提高检测结果的准确率。李洪等<sup>[32]</sup>曾用IHA和ELISA联合检测500名疫区人员,双阳性率为6%,而IHA阳性率为9%,双法符合率为91%。李淑华<sup>[33]</sup>曾用ELISA、IHA、COPT联合检测,急性病例3法同时阳性为83%,慢性为80%,3法各自的阳性率急性和慢性病例分别为95.1%、94.26%、92.99%和93.60%、93.06%、93.41%。

2.3.2 并联检测 采用多种检测方法同时检测,一种检测阳性,判为阳性。该法可提高检测方法的灵敏性。张恩英等<sup>[34]</sup>运用夹心ELISA和常规ELISA检测血吸虫病患者尿液中的抗原和抗体,急性和慢性病例联合检测的总阳性率分别为100%和71.7%,而特异性抗原检测阳性率分别为60%和40%,特异性抗体检测阳性率分别为80%和61.7%。Van Gool等<sup>[7]</sup>应用SEA-ELISA和WA/IHA联合检测,获得了很高的灵敏度和特异度;当IHA阳性值定为1:80时,该方法对埃及血吸虫病、曼氏血吸虫病、埃及和曼氏血吸虫混合感染的灵敏度均为100%,对钉螺热为90%,特异度为92.5%,当IHA阳性值定为1:160时,对4种病例的灵敏度分别为98.7%、96.0%、98.0%、80%,特异度为97.2%。

同时,在国外血吸虫病混合流行区,多种检测方法的联合,可进行病例的分型鉴定。Turner等<sup>[28]</sup>运用曼氏血吸虫SEA、CEF6和马格伊血吸虫粗虫卵抗原的ELISA检测患者血清,发现利用CEF6法的光密度值(OD)与马格伊血吸虫粗虫卵抗原的OD值的比率,可对病例进行曼氏或埃及血吸虫病的分型鉴定,灵敏度分别为88%、84%。

因此,血吸虫病血清流行病学的检测方法已得到了快速发展,人们利用抗原纯化或基因克隆技术,制备各类抗原,以及多项血清学检测技术的联合检测,使检测方法的灵敏度和特异度明显提高,特别是特异度较早期改进显著,以ELISA为甚。血吸虫病血清学检测的发展方向主要是开发新的特异的抗原,改进和完善现有的各种血清学方法,使其更加敏感、特异、高效、经济、方便和安全,在已有基础上建立新的且易于推广的血清学诊断检测技术。

## [参 考 文 献]

- [1] 陈名刚. 世界血吸虫病流行情况及防治进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002 年, 14(2):81-83
- [2] 傅奇. 血吸虫病免疫学研究若干进展[J]. 中华医学杂志, 1990 年, 70(9):534-536
- [3] 李莉, Mesaru Minai. 胶乳凝集试验在诊断血吸虫病中的应用价值研究[J]. 实用寄生虫病杂志, 1998 年, 6(1):43
- [4] 陈前, 李定新, 田斌. 两种环卵沉淀试验在血吸虫病检验中的应用比较[J]. 实用寄生虫病杂志, 2000 年, 8(2):82
- [5] 俞文美, 俞慧芳, 王金荣. 影响血吸虫病环卵沉淀试验因素探讨[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002 年, 14(6):461-462
- [6] 高金彬, 李秋梅, 夏春华, 等. 胶体染料试纸条与环卵沉淀试验现场应用效果比较[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002 年, 14(5):247
- [7] Van Gool T, Vetter H, Vervoort T, et al. Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *S. mansoni* egg antigens. J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3432-3437
- [8] 张经建, 葛琴娟, 王琳. 间接血球凝集试验用于日本血吸虫病诊断和扩大化疗的评估[J]. 地方病通报, 2000 年 11 月, 15(4):20-21
- [9] 彭喜松, 李佩安, 吴昭武, 等. IHA 和 LAT 配对检测血吸虫病皮试阳性者结果比较[J]. 实用预防医学, 1994 年, 1:158
- [10] 李允鹤. 应用间接免疫荧光抗体试验和免疫酶染色试验诊断日本血吸虫病[J]. 中华内科杂志, 1988, 27(1):31-32
- [11] 李飞, 夏代光, 马灿华. 血吸虫病人工潜伏疫区监测措施的初步研究[J]. 昆明医学院学报, 1999, 20(2):31-34
- [12] Burlandy-Soares LC, de Souza Dias LC, Kanamura HY, et al. Schistosomiasis mansoni: follow-up of control

- program based on parasitologic and serologic methods in a Brazilian community of low endemicity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Sep;98(6):853-859
- [13] Silva RM, Kanamura HY, Carnargo ED, et al. A comparative study On IgG-ELISA, IgM-IFT and Kato-Katz methods for epidemiological purposes in a low endernic area for schistosomiasis[J]. Mere Imt Oswaldo Cruz, 1998, 93(Suppl 1):279-282
- [14] 朱立平, 陈学清主编. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社. 2000: 342-365
- [15] 沈健. 虫卵组分抗原 ELISA 诊断血吸虫病的临床价值[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2000 年, 12(6):371-372
- [16] 黄跃龙, 易新元, 曾宪芳, 等. 过碘酸钠氧化可溶性虫卵抗原 ELISA 诊断血吸虫病的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003 年 8 月, 21(4):238-241
- [17] Doenhoff MJ, Wheeler JG, Tricker K. The detection of antibodies against Schistosoma mansoni soluble egg antigens (SEA) and CEF6 in ELISA, before and after chemotherapy. Ann Trop Med Parasitol. 2003 Oct;97(7):697-709
- [18] Ikeda. Cystatin capture ELISA of human paragonimiasis and fascioliasis. Am J Med Hyg. 1998;59(2):286-290
- [19] 黄跃龙, 易新元, 曾宪芳, 等. Cystatin-ELISA 法诊断日本血吸虫病的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002 年, 14(2):115-118
- [20] 沈定文, 陈喜圭, 罗金萍, 等. Dot-ELISA 快速诊断日本血吸虫病的实验研究[J]. 咸宁医学院学报, 2001 年, 15(1):36-38
- [21] 沈定文, 陈喜圭, 罗金萍. 3 种抗原 Dot-ELISA 诊断日本血吸虫病的比较[J]. 中国公共卫生, 2001 年, 17(5):446-447
- [22] 黄佩君, 潘世洋. 抗独特型抗体 NP30 快速 ELISA 法检测血吸虫抗体[J]. 临床检验杂志, 1999 年, 17(4):237
- [23] 施文艳, 黄连春, 陶如华, 等. 抗独特型抗体 ELISA 检测日本血吸虫病治疗后病人血清抗体[J]. 临床检验杂志, 2002 年, 20(3):166-167
- [24] 刘衍春, 吴敏慧, 王锐, 等. PCR-ELISA 法检测 HBV DNA 的探讨[J]. 江苏预防医学, 2003 年, 14(1):62-63
- [25] 韦三华, 白雪帆, 潘蕾, 等. PCR-ELISA 用于 HFES 病人早期诊断的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002 年, 18(1):76-78
- [26] 郭晏海, 种咏梅, 赵锦荣, 等. PCR-ELISA 检测 TB DNA 方法的建立及其初步应用[J]. 第四军医大学学报, 2002 年, 23(22):2086-2088
- [27] 卫生部疾控司编. 血吸虫病防治手册[M]. 第三版. 上海:上海科学技术出版社, 2000. 23-25, 84-96
- [28] Turner P, Laloo K, Bligh J. Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. J Clin Pathol. 2004 Nov;57(11):1193-1196
- [29] 吴海玮, 张兆松, 陈淑贞, 等. 人群日本血吸虫病再感染与优势抗体应答的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志. 1997 年, 15(6): 345-348
- [30] 吴海玮, 罗建平, 吴观陵. 用 ELISA 法研究血吸虫抗体水平时 OD 值标准化的方法[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1995 年 9 月, 2(3):140-145
- [31] 冯正, 裴丽妹, 陈名刚, 等. 从平行检测和监测结果分析我国血吸虫病诊断试剂的现状[J]. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 1998 年. 321-325
- [32] 李洪, 李涛, 潘炳荣. 间接和快速酶标联合检测血吸虫病的应用[J]. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 2000 年, 4:23
- [33] 李淑华. 3 种方法联合应用诊断血吸虫病结果观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2001 年, 13(6):II
- [34] 张恩英, 姜文娟, 薛纯良, 等. 日本血吸虫病患者尿液循环抗原和抗体联合检测的诊断价值[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000 年, 18(1):24-25